

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

A61K 39/395

A61K 38/00

G01N 33/48

A61P 37/06



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 98806441.3

[45] 授权公告日 2005 年 4 月 6 日

[11] 授权公告号 CN 1195546C

[22] 申请日 1998.6.19 [21] 申请号 98806441.3

[30] 优先权

[32] 1997.6.20 [33] US [31] 60/050,267

[32] 1998.3.9 [33] US [31] 60/077,265

[86] 国际申请 PCT/US1998/012892 1998.6.19

[87] 国际公布 WO1998/058669 英 1998.12.30

[85] 进入国家阶段日期 1999.12.21

[71] 专利权人 拜奥根有限公司

地址 美国马萨诸塞

共同专利权人 迈阿密大学

[72] 发明人 N·S·凯尼昂 C·瑞科迪

D·W·索马斯 L·布克利

审查员 牛艳玲

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商
标事务所

代理人 周中琦

权利要求书 1 页 说明书 23 页 附图 3 页

[54] 发明名称 结合 CD154 的单克隆抗体抑制产生
胰岛素的组织移植物的排斥的用途

[57] 摘要

本发明提供抑制移植受体对产生胰岛素组织排斥的组合物和方法以及延长移植存活或功能、逆转移植排斥或恢复损伤移植物功能和诱导对移植的产生胰岛素组织的免疫耐受性的方法和组合物。本发明方法和组合物适于治疗或预防血葡萄糖自身稳定代谢调控中的缺陷,包括表现为糖尿病(DM)的缺陷。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. CD40:CD154 结合阻断剂的用途，用于制备抑制灵长类移植受体对产生胰岛素的组织移植物的排斥的药物，其中所述 CD40: CD154 结合阻断剂是结合 CD154 的单克隆抗体，且其中所述药物不包含耐受剂。

2. 权利要求 1 的用途，其中所述单克隆抗体具有单克隆抗体 5c8 的抗原特异性结合特征。

3. 权利要求 1 的用途，其中产生胰岛素的组织是：

(a) 完整胰腺组织；或

(b) 分离的胰岛；或

(c) 包括分离的成年胰岛 β 细胞的细胞群；或

(d) 包括分离的胎儿胰岛 β 细胞的细胞群；或

(e) 包括培养的胰岛 β 细胞的细胞群；或

(f) 包括无限增殖化胰岛 β 细胞的细胞群；或

(g) 包括稳定表达胰岛素基因的宿主细胞的细胞群；或

(h) 包括可诱导表达胰岛素基因的宿主细胞的细胞群。

4. 权利要求 1 的用途，其中产生胰岛素的组织对于移植受体是同种异体或异种的。

5. 权利要求 1 的用途，其中移植受体是人类。

6. 权利要求 5 的用途，其中移植受体患葡萄糖代谢调控损伤。

7. 权利要求 6 的用途，其中移植受体患糖尿病。

结合 CD154 的单克隆抗体抑制 产生胰岛素的组织移植物的排斥的用途

相关申请

本申请为 1997 年 6 月 20 日提交的在先美国临时 S.N. 60/050,267 和 1998 年 3 月 9 日提交的在先美国临时 S.N. 60/077,265 的继续部分申请。2 个更早提交的临时专利申请的内容在此引用作为参考。

发明领域

本发明总的涉及抑制不需要的免疫反应、具体地抑制逆适应性 T-淋巴细胞介导的免疫反应。本发明具体地涉及预防、治疗、抑制或逆转受体宿主中免疫系统驱动的对移植组织或移植器官的排斥。

发明背景

遗传上不同的个体之间的器官移植总是通过 T 细胞依赖性机制导致对该器官的免疫排斥，除非排斥过程通过施用抑制 T 细胞功能的药物而受到抑制。数个美国专利公开了使用这样的免疫抑制药物来抑制排斥，包括 U.S. Nos 5,104,858; 5,008,246 和 5,068,323。其它常规药剂描述于 Suthanthiran 等(1994), 331 新英格兰医学杂志 365-367。钙调磷酸酶抑制剂和糖皮质激素均在临床上使用，并且都阻止 T 细胞介导的活化细胞因子、特别是 IL-2 的释放。然而，用这些常规药剂治疗仍不完善。这 2 种类型均通过 T 细胞抗原受体 (TCR) (T 细胞抗原特异性的唯一介质) 损害信号传导来起作用，并且不加区别地作用于所有 T 细胞。此外，这些药物的效应不持久，使得治疗的终止一般导致移植物丢失。因此，为了维持移植物存活、有功能的整合，移植受体必须承受长期、非特异性免疫移植的后果。这些后果包括增加的感染和恶性肿瘤的风险以及毒性，特别是对敏感器官或组织如肾脏、肝脏和胰腺的毒性。胰岛细胞移植 (ICT) 可以导致糖尿病 (DM) 患者中高血糖的逆转和血葡萄糖代谢调控的正常化 (Ricordi, 糖尿病综述 4:356-369, 1996; Scharp 等, 糖尿病 39:515-518, 1990; Socci 等, 糖尿病学报 28: 151-157, 1991; Warnock 等,

糖尿病学 34: 55-58, 1991; Ricordi 等, 移植 53:407-414, 1992;Gores 等, 柳叶刀 341:19-21, 1993;Alejandro 等, 糖尿病 46: 1983-1989, 1997)。即使没有胰岛素依赖性时, 在带有功能性胰岛同种异体移植物(基准 c-肽产量>1.0ng/mL) 的移植受体中施用减少剂量的外源胰岛素导致很好的代谢调控和血红蛋白 Alc(HbAlc)的正常化(Ricordi, 糖尿病综述 4:356-369, 1996;Scharp 等, 糖尿病 39:515-518, 1990;Socci 等, 糖尿病学报 28: 151-157, 1991; Warnock 等, 糖尿病学 34: 55-58, 1991; Ricordi 等, 移植 53:407-414, 1992;Gores 等, 柳叶刀 341:19-21, 1993;Alejandro 等, 糖尿病 46: 1983-1989, 1997)。未观察到高血糖并且现已记录到移植后 6 年多患有自身免疫性糖尿病的受体中有功能的胰岛同种异体移植物(Alejandro 等, 糖尿病 46: 1983-1989, 1997)。尽管有这些重要进展, 但是基于胰岛细胞移植来控制 DM 的广泛应用受到需要对受体进行长期而普遍的免疫抑制的限制。此局限性不仅涉及与长期免疫抑制有关的危险, 而且涉及目前所用的免疫抑制药物的糖尿病效应。

目前控制 DM 的治疗的局限性激发了开发用于诱导供体特异性免疫学耐受性的疗法的广泛兴趣以避免对移植受体进行终生免疫抑制的必要。数位研究人员使用各种啮齿动物模式系统进行同种异体移植, 获得期望的初步结果。然而, 当在大型动物临床前模型(例如犬、非人灵长类动物)中测试时, 发现啮齿动物的结果不足以预测更接近地模拟人 ICT 的模型中的 ICT 结果。

因此, 需要改进的或更有效的对移植受体包括人类的免疫抑制或免疫调节治疗。特别地, 需要无须泛 T 细胞免疫抑制的治疗法, 即不使受体对恶性肿瘤或机会性感染易感的治疗法。更应指出的是, 需要比现行治疗试剂毒性更小的疗法。类似地, 需要促进移植物持续有功能整合, 即在治疗过程结束后继续维持整合的治疗法。

发明概述

本发明的一个目的是提供减轻逆适应性 T 细胞反应而不需要泛 T 细胞免疫抑制的免疫调节剂。另一目的是提供促进组织移植物、特别是胰岛来源的组织移植物在受体宿主、特别是人类宿主中有功能整合的免疫

调节剂。另一目的是提供抑制对移植组织、特别是移植的胰岛或其它产生胰岛素组织的免疫学排斥的免疫调节剂。进一步的目的是提供阻断共刺激信号向活化T细胞传递的免疫调节剂。具体的目的是提供CD40:CD154结合阻断剂如CD154阻断剂用于治疗,尤其是用于减轻、延缓或逆转对移植组织的免疫学排斥的治疗。本发明更普遍的目的是通过提供允许非自身组织(例如同种异体或异种组织)有功能地整合入受体宿主的免疫调节组合物来增加组织移植,特别是产生胰岛素的组织移植的实用性。进一步的普遍目的是防止、减轻、减弱或治疗糖尿病(DM)。

本发明在于发现使用CD40:CD154结合阻断剂如CD154阻断剂(无论单独使用还是与其它治疗试剂如免疫调节剂或耐受剂结合使用)可减弱、抑制、防止、延缓或逆转受体宿主体内对移植的产生胰岛素组织的逆适应性免疫系统排斥而无须广泛抑制受体的免疫系统。

因此本发明提供对移植的产生胰岛素组织的受体进行免疫调节治疗的方法和组合物。第一种方法抑制移植受体对产生胰岛素组织移植物的排斥。第二种方法延长组织移植物的存活。第三种方法逆转对组织移植物的排斥。第四种方法保持组织移植物的功能。第五种方法恢复受损移植物的功能。第六种方法诱导对组织移植物的免疫耐受性。所有前面的方法包括用CD40:CD154结合阻断剂治疗移植受体,CD40:CD154结合阻断剂是指任何阻断CD40配体(即CD40L,也称为CD154或5c8抗原,并且有时在本领域中称为gp39)与其反受体或相关受体(本文为CD40)结合的试剂治疗移植受体。优选地,结合阻断剂是CD154(CD40L)阻断剂,即任何与CD154结合并阻止或干扰其与反受体(例如CD40)结合的试剂。CD154阻断剂的实例是单克隆抗体(MAb),具体地是在美国专利5,474,771中公开的具有5c8MAb抗原特异性结合特征的单克隆抗体,在此引用该文献作为参考。

前述的方法可以用所有类型的产生胰岛素的组织移植植物如分离的完整胰腺组织或胰岛通过常规技术来实施。因此,本发明适用于移植受体(受体宿主)是哺乳动物、优选地灵长类动物、最优选地人类的情况。特别地,本发明适用于移植受体患葡萄糖代谢调控失调如DM或有此危险

的情况。移植供体可以是与移植受体相同种系发生物种的非同源成员（即提供同种异体组织的同种异体供体）或者不同种系发生物种的成员（即提供异种组织的异种供体）。如果异种共同用作移植组织来源，优选供体与受体宿主是相对 MHC 相容性的，例如狒狒或黑猩猩应优选为用于将组织移植给人类的供体。本发明可用于促进其它类型产生胰岛素组织的移植，包括分离的成年或胎儿胰岛 β 细胞或者培养的胰岛 β 细胞的细胞群体（源自原始细胞培养物或无限繁殖化细胞系）。的确，本发明可用于促进任何可诱导或稳定表达胰岛素基因的细胞，如通过常规遗传工程技术加工或制备的宿主细胞的移植。选择性地，产生胰岛素的组织可以通过免疫分离器与受体组织在物理上分开。

鉴于前面所述，应该明白本发明提供恢复需要其的哺乳动物中葡萄糖代谢调控的方法。此方法包括将产生胰岛素的组织移植给哺乳动物并且用 CD40:CD154 结合阻断剂、优选地用 CD154 阻断剂治疗该哺乳动物。在优选的实施方案中，CD154 阻断剂是具有 MAb 5c8 的抗原特异性结合特征的单克隆抗体。通过在人类 DM 的有关大型动物临床前模型中测试证实的方法实例中，通过在 ICT 之前施用 MAb，接着（优选地）在 ICT 后 2 周内（即移植产生胰岛素的组织后）至少 2 次施用 MAb 来诱导移植。之后，根据需要，在 ICT 后（规定为 4 周）通过施用 MAb 一月来维持移植。此维持可根据需要或为了小心而重复进行。

选择性地，移植可以通过同时用耐受剂（是指任何在免疫调节或免疫抑制停止后维持移植的药物）治疗哺乳动物而得到增强。耐受剂的实例包括与组织移植（在此与产生胰岛素组织）相容的骨髓组织、骨髓衍生的细胞种群。优选地，骨髓或细胞与产生胰岛素组织的供体或来源同源。因此，耐受剂在移植受体内的长期存活使得受体为免疫学嵌合性的，即供体特异性免疫学耐受性表现的状态。骨髓衍生的细胞种群即 CD34 (+) 造血细胞（干细胞）作为耐受剂是特别优选的。特别优选的是具有 CD40 (-) 细胞表面表型的干细胞种群。

在另一方面，本发明提供测定哺乳动物中葡萄糖代谢调控损伤的方法。此方法足够敏感以揭示血葡萄糖代谢的亚临床（例如隐蔽或无症状

的)损伤,例如哺乳动物正处于患 DM 的危险中或排斥移植的产生胰岛素组织的危险中或在其早期阶段。该方法包括分析在哺乳动物摄食后至少 1 小时并且不到 6 小时(优选地约 2 小时)时从该哺乳动物提取的含血样品的葡萄糖含量。如果发现此摄食后(PPD)样品的葡萄糖含量是 150mg/dl 或更高(即超过约 150mg/dl),则认为该哺乳动物有损伤的葡萄糖代谢。如果分析在连续天数提取的 2 种这样的样品并且 2 种样品均显示 150mg/dl 或更高的葡萄糖含量,则提高了此方法的可靠性。

附图简述

本发明前述和其它目的、特征和优势以及本发明本身在与附图一起阅读时将从下面优选实施方案的描述中得到更充分的理解,其中:

图 1 是绘制 CD154 阻断剂治疗的狒狒 ICT 受体的禁食血葡萄糖(FG)水平与手术后天数(POD)的函数的线性图。

图 2 是绘制 CD154 阻断剂治疗的猕猴 ICT 受体的 FG 水平与手术后天数(POD)的函数的线性图。

图 3 是比较示于图 2 中猕猴受体 FG 水平与患 DM 并且接受常规胰岛素替代治疗人类患者 FG 水平比较的线性图。

发明详述

T 细胞活化和依赖其的免疫学过程既需要 T 细胞受体(TCR)介导的信号又需要同时传送的共刺激信号。重要的共刺激信号通过 CD40 与抗原呈递细胞的结合传递,例如 B 细胞通过 T 细胞上的 CD40L(CD154)传递。人类 CD40 是成熟 B 细胞以及巨噬细胞和活化内皮细胞上表达的 50kD 细胞表面蛋白。CD40 属于与编程性细胞死亡有关的一类受体,包括 Fas/CD95 和肿瘤坏死因子(TNF) α 受体。人 CD154(CD40L)是具有与瞬间表达的 TNF α 的同源性的 32KD II 型膜糖蛋白,主要在活化 T 细胞上瞬间表达。已经证明 CD40:CD154 结合是所有 T 细胞依赖性抗体反应所必需的。特别地,CD40:CD154 结合提供抗编程性细胞死亡和/或淋巴因子刺激的信号。

在发现人类 X-连锁的 hyper-IgM 综合症(X-HIGM)是由功能性 CD154 的遗传缺陷所导致的表型时,CD40:CD154 结合在促进 T 细胞依赖性生物学反应方面的重要性得到更充分地理解。患者具有正常或高 IgM 水平,

但不能产生 IgG, IgA 或 IgE 抗体, 并且患有复发的、有时严重的细菌及寄生虫感染以及有增加的淋巴瘤和腹部癌症的得病几率。类似表型在非人类动物中观察到, 其导致编码 CD154 的基因成为零合基因 (敲除动物)。CD154 无效合子的 B 细胞可以在无 CD40:CD154 结合时产生 IgM, 但不能进行同型转换或在亲和成熟后正常存活。在组织学上, 淋巴结生发中心不能正常发育, 并且记忆 B 细胞缺乏或发育不足。在功能上, 这些缺陷导致次级 (成熟) 抗体反应的严重减少或缺失。也观察到细胞免疫性的缺陷, 表现为增加的细菌和寄生虫的感染几率。许多细胞介导的缺陷可通过施用 IL-12 或 IFN- γ 加以逆转。这些观察结果证实了这样的观点, 即正常的 CD40:CD154 结合促进 I 型 T-辅助细胞免疫学反应的形成。

许多临床前研究已经证实能阻断 CD40:CD154 结合的试剂有作为免疫调节剂的前景。具体地, 包括小型动物器官或组织移植模型的研究显示 CD40:CD154 阻断剂促进同种异体移植物的存活。在所选的模型中, 短暂施用干扰 T 细胞共刺激的试剂导致无限制移植接受的产生。特别地, CD40:CD154 结合的阻断已得到理想结果, 因为看来这种反受体对的接合在时序和层次上先于其它共刺激信号 (Ranheim 等, 实验医学杂志 177:925-935, 1993; Roy 等, 欧洲免疫学杂志 25:596-603, 1995; Han 等, 免疫学杂志 155:556-567, 1995; Shinde 等, 免疫学杂志 157:2764-2768, 1996; Yang 等, 科学 273:1862-1864, 1996; Grewal 等, 科学 273:1864-1867; Lederman 等, 免疫学杂志 149:3817-3826, 1992)。CD40:CD154 结合的阻断导致延长心脏 (Larsen 等, 移植 61:4-9, 1996; Larsen 等, 自然 381:434-438, 1996)、皮肤 (Larsen 等, 自然 381:434-438, 1996; Maekees 等, 移植 64:329-335, 1997) 和胰岛同种异体移植植物 (Parker 等, 美国国家科学院院报 92:9560-9564, 1995; Rossini 等, 细胞移植 5:49-52) 在啮齿动物中的存活以及同种异体肾脏在灵长类动物中的存活 (Kirk 等, 美国国家科学院院报 194:8789-8794, 1997)。也已证明延缓了非肥胖糖尿病 (NOD) 小鼠中自身免疫糖尿病的发生 (Balasa 等, 免疫学杂志 159:4620-4627, 1997)。最近, 有报道干扰 CD40:CD154 结合防止了炎性细胞因子的产生 (Dechanet 等, 免疫学杂志 159:5640-5647;

Kiener 等, 免疫学杂志 155:4917-4925, 1995)。

因此, CD40:CD154 阻断可以提供强有力的治疗以防止有缺陷性葡萄糖代谢如 I 型糖尿病的个体中胰岛同种异体移植或异种移植的失败。然而, 正如上述, 在啮齿动物模式系统中的研究结果与大型动物包括人类的试验或治疗结果很少相关。

在此公开的是测定优选的 CD154 阻断剂即具有 MAb 5c8 抗原特异性结合特性的人化 MAb (Lederman 等, 实验医学杂志 175:109 在此引用作为参考 01, 1992) 在胰岛同种异体移植的大型动物临床前模型中的效应的研究结果。具体地, 本模型包括对狒狒 (*Papio hamadryas*) 和其它非人灵长类动物的 CD154 阻断单独治疗。从这些研究中获得的结果强烈地显示 CD154 阻断单独治疗将促进产生胰岛素的组织长期移植入人体, 特别是患 DM 或类似的葡萄糖体内平衡缺陷的患者中。

下面的讨论描述并且举例说明可以实施本发明以及提供证据原理研究结果的各种内容和条件, 包括本发明的特定实施方案。

受体宿主

本发明可用于治疗或预防产生胰岛素组织移植的任何哺乳动物受体或需要产生胰岛素组织移植的任何哺乳动物。因此受体宿主 (也称为受体或宿主) 患血糖代谢 (葡萄糖体内平衡) 调控缺陷或正处于此危险中。例如, 患者可以为高血糖或低血糖。本发明特别适用于糖尿病受体, 特别是患糖尿病 (DM) 的受体。优选地, 受体是灵长类动物, 更优选地高等灵长类动物, 最优选地人类。在其它实施方案中, 受体可以是需要组织移植的其它哺乳动物, 特别是具有商业重要性的哺乳动物或宠物或其它有价值动物如濒危物种的成员。因此, 受体宿主也包括但不限于绵羊、马、牛、山羊、猪、狗、猫、兔、豚鼠、仓鼠、沙鼠、大鼠和小鼠。

供体或移植组织

本发明可以采用任何类型的产生胰岛素组织移植或移植方法、特别是其中供体 (移植) 组织受受体宿主免疫系统影响或排斥或有失败风险的方法。特别地, 本发明可用于任何供体组织与受体组织是非组织相容性的 (MHC 相容性的) 的情况。因此, 除了自身或同源的供体组织, 本发

明可以用于同种异体或甚至异种供体组织。供体组织可以通过常规方法从志愿者或其它存活供体或尸体供体得到。优选地，供体与受体宿主与可操作性一样是组织相容性的。因此，当受体宿主是人时，优选的是自体 and 同种异体供体。然而，供体组织可以从异源物种（在此情况，称为异种移植）如非人灵长类动物（例如黑猩猩或狒狒）或者其它相对相容性的哺乳动物（例如猪）获得。

在有些实施方案中，供体组织包括完整胰腺。在另一些实施方案中，供体组织包括供体胰腺的一部分、部分或活体解剖材料。供体胰腺可以从存活供体或适当尸体获得。如果使用尸体供体，胰腺优选地暴露于冷缺血性状况不超过约 8 小时。在另一些实施方案中，供体组织包括产生胰岛素细胞，特别是分离或悬浮的胰岛或胰岛细胞，包括从胎儿或成年供体取出或切除的细胞在原始培养物中保持的细胞或无限繁殖化细胞系。从完整胰腺制备供体胰岛或胰岛细胞悬浮液的适当方法是众所周知的（参见，例如 Ricordi 等 (1988), 37 糖尿病 413-420; Tzakis 等 (1990), 336 柳叶刀 402-405; Linetsky 等 (1997), 46 糖尿病 1120-1123）。适当的胰腺从基本上无血葡萄糖体内平衡缺陷的供体获得。产生胰岛素细胞的其它来源包括选择性地 在初级培养物中扩增的胎儿胰岛前体细胞。然而，可以使用任何适当的细胞类型，包括带有编码可表达胰岛素基因的外源遗传物质的细胞。因此，本发明包括使用转染或转化的宿主细胞，它们已经过遗传操作以组成性或可诱导地（例如在葡萄糖反应性启动子或增强子的控制之下）表达胰岛素（或源自已经过遗传操作的祖细胞）。在其它实施方案中，本发明包括使用源自转基因哺乳动物的胰腺或其它供体细胞类型，其中哺乳动物已经过遗传操作以在其所有身体组织或其部分组织中包含产生胰岛素所必需的遗传物质。

将产生胰岛素组织（供体组织）系统或局部导入受体宿主。例如，可以将分离、悬浮或分散的产生胰岛素的细胞血管内输注或移植入所需的位点如骨髓腔、肝脏、肾小囊内、肌肉内或腹膜内。在有些实施方案中，细胞具有有丝分裂能力并且产生新的供体来源组织。在另一些实施方案中，细胞无有丝分裂能力但是在供体中保持存活并且产生或表达胰

胰岛素。在任何情况中，移植有效量的产生胰岛素细胞或组织，即足以减轻（可检测到减轻）受体的葡萄糖代谢缺陷（例如高血糖或低血糖）的量。最好，该量足以恢复受体维持葡萄糖体内平衡的能力-即使受体不再依赖常规（例如注射或吸入）胰岛素替代治疗。

在有些实施方案中，产生胰岛素组织通过免疫分离器在物理上与受体的周围组织分开（隔开）。适当的分离器保护产生胰岛素组织免受大多数细胞和体液免疫效应物，包括但不限于淋巴细胞、免疫球蛋白和补体的影响。因此，免疫分离器一般提供可半透屏障如具有足以阻止大于约 50 - 100kD 的分子扩散的孔径大小的膜。该屏障分隔了其中放置产生胰岛素组织的分离室并且保证没有产生胰岛素组织可能在物理上与屏障外细胞或组织接触的位点。可以使用任何常规的仪器、包膜、胶囊或微胶囊，包括单层或双层壁的海藻酸盐微胶囊（例如在美国专利 5,227,298 中所述的，在此引用其内容作为参考）。其它常规微胶囊（包括海藻酸盐聚赖氨酸微胶囊、化学交联的海藻酸盐微胶囊以及由其它生物相容性聚合物组成的胶囊）形成结构上合理的任何所需形状或大小的免疫分离器（参见，例如 Jaink 等（1996），61 移植 4，在此引用其内容作为参考）。

在进一步的实施方案中，向受体宿主移植耐受剂如来源于其本身的骨髓或细胞。任何致耐受性组织或细胞类型可用作耐受剂，包括胰腺基质细胞以及骨髓细胞。致耐受性细胞与产生胰岛素组织是 MHC 相容性的并且优选地从提供产生胰岛素组织或与其同源的供体获得。制备骨髓或其细胞种群的适当方法是众所周知的（参见，例如 Sharp 等（1984），69 免疫学方法杂志 187-195，Fontes 等（1995），细胞移植方法，Ricordi 编，R. G. Landes 出版公司，619-628 页）。优选地，用 Ceperate®SC 干细胞浓缩系统（CellPro, Inc., Bothell, WA; 参见 1997 年 6 月 1 日修订的 CellPro 研究人员手册）或与其类似产品处理骨髓细胞以提供骨髓衍生的富含 CD34（+）造血细胞的细胞种群。标准荧光-活化细胞分选（FACS）分析或免疫荧光染色显示该 CD34（+）细胞种群基本上无 CD40（+）细胞，然而可能会观察到一些模糊的 CD40 染色。由于 CD34（+）细胞种群是动态干细胞种群，故认为低水平 CD40（+）细胞的存在对应于干细胞开始沿

B 细胞谱系分化的频率。的确，初步 FACS 研究已经确定在 CD34 (+) 干细胞种群中只有 CD40 (+) 细胞 (一般表现不超过总数的约 0.7%) 也是 CD19 (+)。CD19 为目前已知的最早 B 细胞谱系标记。因此，为了确保将真正的干细胞用作耐受剂，可通过常规负选择方法 (例如选择性细胞裂解、细胞分选、淘选等) 进一步除去 CD34 (+) 细胞中的 CD40 (+) 细胞。

CD40:CD154 结合阻断剂的实例

用于实施本发明的治疗化合物包括任何阻断细胞表面 CD40 (例如位于 B 细胞上) 与例如活化 T 细胞表面上表达的 CD40L (CD154) 相互作用的化合物。应该特别注意的 CD40:CD154 结合阻断剂化合物如 CD154 阻断剂包括单克隆抗体和多克隆抗体 (MAbs) 以及抗体衍生物如嵌合分子、人化分子、具有降低效应物功能的分子、双特异性分子和抗体的偶联物。在优选的实施方案中，抗体具有 MAbs 5c8 抗原特异性结合特征，如美国专利 5,474,771 中所述，在此引用其公开内容作为参考。在目前高度优选的实施方案中，抗体是人化的 5c8。其它已知的抗 CD154 的抗体包括抗体 ImxM90、ImxM91 和 ImxM92 (来自 Immunex)、商业上可从 Ancell 得到的抗-CD40L mAb (克隆 24-31, 目录号 353-020, Bayport, MN) 和商业上可从 Genzyme 得到的抗-CD40L mAb (Cambridge, MA, 目录号 80-3703-01)。同样商业上可以得到的有来自 PharMingen 的抗-CD40L mAb (San Diego, 目录号 33580D)。许多其他抗-CD40L 抗体也得到制备和鉴定 (参见，例如 Bristol-Myers Squibb 的 WO 96/23071, 在此引用其说明书作为参考)。

本发明也包括使用其它类型的 CD154 阻断剂如完整 Fab 片段、F(ab')₂ 化合物、V_H 区、F_V 区、单链抗体 (参见，例如 WO 96/23071)、多肽、多肽融合构建体、CD40 融合体 (如 CD40Ig, 如在 Hollenbaugh 等, 免疫学方法 188:1-7, 1995 中所述，在此引用作为参考) 和小分子化合物如小的半肽化合物或非肽化合物，所有这些均能够阻断或阻止 CD40:CD154 结合。设计、筛选和优化小分子的方法在 1996 年 6 月 21 日提交的 PCT/US96/10664 中提供，在此引用其说明书作为参考。

各种形式的抗体也可用标准重组 DNA 技术加以制备 (Winter 和 Milstein, 自然 349: 293-99, 1991)。例如，可以构建 “嵌合” 抗体，

其中将来自动物抗体的抗原结合区与人恒定区连接（一种最初来自非人类哺乳动物的抗体，其中已使用重组 DNA 技术用来自人免疫球蛋白轻链或重链的相应区域置换了其所有或部分重链铰链区和恒定区和/或轻链恒定区）（参见，例如 Cabilly 等，美国专利 No. 4, 816, 567; Morrison 等，美国国家科学院院报 81: 6851-55, 1984）。嵌合抗体用于人类治疗或预防时降低由动物抗体引发的免疫原性反应。

此外，可以合成重组的“人化”抗体。人化抗体是起初从非人类哺乳动物衍生的抗体，其中已使用重组 DNA 技术用来自人免疫球蛋白轻链或重链的相应区域的氨基酸取代了抗原结合不需要的部分或所有氨基酸。即它们是主要包含人免疫球蛋白序列的嵌合体，其中插入了负责特异性抗原结合的区域（参见，例如 PCT 专利申请 WO 94/04679）。用目的抗原免疫动物，分离相应的抗体并去除负责特异性抗原结合的可变区序列部分。然后将动物来源的抗原结合区克隆入抗原结合区已删除的人抗体基因适当位置。人化抗体最大限度地减少了异源（种间）序列在用于人类治疗的抗体中的使用，并且很可能较少引发不想要的免疫反应。也可类似地制备灵长类人化抗体。

本发明的另一实施方案包括使用可以在非人动物如带有一种或多种人类免疫球蛋白转基因的转基因动物中制备的人类抗体。这样的动物可以用作用于制备杂交瘤的脾细胞的来源，如 U.S. 5, 569, 825 中所述。

抗体片段和单价的抗体也可用于实施本发明。单价抗体包括与第二种重链的 Fc(或主干)区域结合的重链/轻链二聚体。“Fab 区”是指那些与包含重链 Y 分支部分的序列大致相同或相似或在整体上与轻链大致相同或相似并且已表明整体上（集合体）表现抗体活性的链部分。Fab 蛋白包括一条重链和一条轻链的集合体（常称为 Fab'）以及对应于抗体 Y 2 个分支片段的四聚体（常称为 F(ab)₂），无论上述任何形式是共价或非共价集合体，只要集合体能选择性与特定抗原或抗原家族反应即可。

此外，可用标准重组 DNA 技术通过改变抗原结合位点附近的氨基酸残基来改变重组抗体与其抗原的结合亲和性。可根据分子模型通过诱变来增加人化抗体的抗原结合亲和性（Queen 等，美国国家科学院院报 86:

10029-33, 1989; PCT 专利申请 WO 94/04679)。根据靶组织类型或预想的特定治疗方案增加或减小抗体对 CD40L 的亲合性可能是有利的。这可用噬菌体展示技术来进行(参见, 例如 Winter 等, 免疫学年鉴 12:433-455, 1994 和 Schier 等, 分子生物学杂志. 255:28-43, 1996, 在此引用作为参考)。例如, 为了半预防性治疗, 用恒定水平的具有减小的对 CD40L 的亲合性的抗体治疗患者是有利的。同样, 具有增加的对 CD40L 的亲合性的抗体对于短期治疗可能是有利的。

给药途径

用于本发明的 CD40:CD154 结合阻断剂, 包括 CD154 阻断剂可以用医学上可接受的任何方式给药。根据具体情况, 局部或系统给药可能是理想的。优选地, 药剂通过胃肠外途径如通过静脉内、动脉内、皮下、肌肉内、眼眶内、心室内、腹膜内、被膜下、颅内、脊髓内或鼻内注射、输注或吸入给药。药剂也可通过在供体组织移植之前或之后将输入泵或者可生物相容或可生物降解的缓释移植物植入受体宿主来给药。选择性地, 本发明的某些化合物或其制品可适于口腔或肠道给药。本发明还有一些化合物将适于体表给药。

在进一步的实施方案中, 通过施用编码阻断剂的载体或其它可表达的遗传物质将 CD40:CD154 结合阻断剂间接提供给受体。将遗传物质导入受体的细胞或组织并在其中表达, 由此在原位产生阻断剂。例如, 适当的核酸构建体将包含编码一种或多种 MAbs 5c8 免疫球蛋白(Ig)链的序列, 如 U.S. 专利 5,574,771 中公开的。其它适当的构建体将包含编码嵌合或人化版本的 MAbs 5c8 Ig 链或其抗原结合片段。其它适当构建体将包含编码部分或全部其它 CD154 特异性 MAbs 的序列。将构建体系统或局部地运送到例如邻近表达胰岛素组织移植部位的位点。

选择性地, 将编码阻断剂的载体或其它遗传物质导入适当的分离细胞种群中以制备产生阻断剂的宿主细胞。然后将这些宿主细胞局部或系统地移植或输注给受体以提供 CD40:CD154 结合阻断剂的原位产生。适当宿主细胞包括培养细胞如永生化细胞以及从受体获得的细胞(例如外周血或淋巴结细胞如天然杀伤(NK)细胞)。

一般地，将本发明的化合物施用给受体宿主。然而，化合物也可施用给供体或供体组织。例如，本发明的化合物可包含在整合入受体宿主之前保存或运输供体组织的灌流或防腐液中。

制剂

一般来说，将用于实施本发明的化合物悬浮、溶解或分散于药学上可接受的载体或赋形剂中。得到的治疗组合物对受体的体内平衡，特别是电解液平衡没有负面影响。因此，载体实例包括正常的生理盐水（0.15M NaCl, pH7.0 到 7.4）。其它可接受的载体在本领域内众所周知并且描述于例如雷明顿药物科学，Gennaro 编，Mack 出版公司，1990。可接受的载体可包括可生物相容的、惰性或可生物吸附的盐、缓冲剂、寡糖或多糖、聚合物、粘性增强剂、防腐剂等。

配制用于实施本发明的任何 CD40:CD154 结合阻断剂如 CD154 阻断剂以运送药学上有效的或治疗上有效的量或剂量，即足以对受体产生可检测到的、优选医学上有利的效应的量。医学上有利的效应将包括防止、延缓或减轻受体医疗状态的恶化或可检测到地改进其医疗状态。例如，可通过常规测定血尿素氮或肌酐的浓度或尿液体积或溶质含量或相关溶质从血液向尿液清除的速度来监测肾同种异体或异种移植物的功能和健康。类似地，可通过常规测定血液或尿液的葡萄糖、葡萄糖代谢物或胰岛素的浓度或例如在常规葡萄糖耐受测试中测定对葡萄糖攻击的胰岛素反应来监测产生胰岛素的同种异体移植物或异体移植物的糖调节功能和健康。因此，本发明治疗化合物如 CD154 阻断剂的有效量是可检测到地降低受体对胰岛素替代治疗的依赖的任何量。更具体地，有效量是导致供体产生胰岛素组织部分或基本上完全移入（接受并且发挥作用）的量。

治疗剂量和频率

用于完成本发明任何特定化合物给药的剂量和频率在组织移植领域普通医生如移植外科医生的技术和临床判断能力之内。基本剂量和施用方案通过临床前和临床试验加以确定，试验包括广泛但常规的研究以测定所需化合物的有效、例如最佳给药参数。即使在完成这些建议之后，

临床医生通常将根据各种因素如受体年龄、医疗状态、体重、性别和与其它药物的共同治疗针对不同受体宿主改变这些剂量。测定用于抑制移植排斥的每种 CD40:CD154 结合阻断剂的有效剂量和给药方案是药物和医学领域技术人员的日常事务。给药量和疗程应该足以在受体健康状态的一个或多个指标中产生临床上有利的改变。疗程和剂量方案的实例列于这里包括的证据-原理研究中。基本上,本发明包括以诱导接受的方案施用 CD40:CD154 结合阻断剂(以人化 MAb 5c8, hu5c8 为例),如果为了谨慎可接着实施维持接受的方案。

为了举例说明抗 CD40L 化合物的剂量因素,给出下面关于抗 CD40L mAb 施用策略的实例。给药量可容易地针对其它类型的抗 CD40L 化合物加以调整。一般地,应该考虑约 0.05 - 50mg/kg 病人体重的单一剂量, 1-20mg/kg 范围的剂量最常用。对于急性治疗如在移植之前或移植过程中或者针对移植排斥开始的任何迹象时,有效的抗体剂量范围是约 1mg/kg 体重到约 20mg/kg 体重,每天施用并维持约 1 到 5 天时间,优选地通过大剂量静脉注射。相同的剂量和给药方案可以用于维持药量方案的负荷期,维持期包括静脉内或肌肉内施用约 0.1mg/kg 体重到约 20mg/kg 体重范围内的抗体,在任何情况下的治疗时间为每周到 3 月间隔。慢性治疗也可通过维持方案进行,其中抗体以约 0.1mg/kg 体重到约 20mg/kg 体重的范围通过静脉内或肌肉内途径施用,剂量间隔从约 1 周变化到约 3 个月。此外,慢性治疗可以通过间歇大剂量静脉内方案来实施,其中施用药 1.0mg/kg 体重到约 100mg/kg 体重的抗体,顺序治疗的间隔为 1 到 6 个月。除了间歇大剂量静脉内方案之外,所有给药方案也可通过口腔、肺、鼻或皮下途径。

如果需要,可以通过连续或与常规抗排斥治疗剂或药物如皮质醇或免疫抑制剂联合使用来增加抗体的有效性。选择性地,抗体可以与常规药物偶联。这可以有利地允许常规药剂以少于常规剂量的量施用,例如当该药剂作为单一治疗施用时少于常规剂量的约 50%。因此,应该避免了许多与该药剂有关的副作用发生。

根据本发明所述的对移植排斥的结合治疗包括一起使用抗 CD40L 抗

体与靶向 B 细胞的药剂如抗 CD19、抗 CD28 或抗 CD20 抗体（未偶联或放射标记的）、IL-14 拮抗剂、LJP394（LaJolla 药物受体阻断剂）、IR-1116（Takeda 小分子）和抗 Ig 独特型的单克隆抗体。选择性地，这些组合可能包括 T 细胞/B 细胞靶向药剂如 CTLA4Ig、IL-2 拮抗剂、IL-4 拮抗剂、IL-6 拮抗剂、受体拮抗剂、抗 CD80/CD86 的单克隆抗体、TNF、LFA1/ICAM 拮抗剂、VLA4/VCAM 拮抗剂、brequinar 和 IL-2 毒素偶联物（例如 DAB）、脱氢可的松、抗 CD3 MAb（OKT3）、mycophenolate mofetil（MMF）、环磷酰胺以及其它免疫抑制如钙调磷酸酶信号阻断剂，包括但不限于 tacrolimus（FK506）。这些组合也可包括 T 细胞靶向药剂如 CD4 拮抗剂、CD2 拮抗剂和 IL-12。

为了维持移植物的整合或者在抑制移植排斥急性事件之后的时期内，如果必要，单独或与常规抗排斥药剂结合施用维持剂量的抗 CD40L 抗体。随后，可以降低给药的剂量或频率或同时降低这二者。在无移植排斥体征出现时，治疗可以停止，但注意监测移植排斥的体征。在其它情况下，根据普通医生的判定，例如可以以 4 周或更长间隔施行不定期治疗。然而，根据疾病症状的任何复发，受体宿主可能需要长期的间歇治疗。

用于评估 CD40:CD154 阻断剂治疗方案的临床前模式系统

用于测试 CD40:CD154 阻断化合物（例如，抗-CD40L 化合物或 CD154 阻断剂，如具有 MAb 5c8 特异性的 MAb）效率的优选模式系统实例是在先相关美国临时 S.N. 60/050,267 (06/20/97) 中公开的灵长类动物（狒狒和/或猕猴）胰岛同种异体移植模型，在此引用其内容作为参考。已经证明这些灵长类动物模型是免疫调节精确的测试方法：它们对同种异体移植功能中即使微小的变化都十分敏感或对受体损伤愈合和免疫系统功能的副作用十分敏感。此外，这些模型与人类肾脏移植有明显的生物学相似性。具体地说，编码 MHC 蛋白的基因在人类和用作模型基础的灵长类动物之间高度保守，并且灵长类动物对血管化器官的排斥与临床环境中见到的情形十分相似。

胰腺切除术诱导糖尿病的狒狒 ICT 模型

供体-受体对的鉴定

将取自来自 Mannheimer 公司 (Homestead, FL) 的 10 只待用受体 (狒狒, *Papio hamadryas*, 雄性和雌性, 1-2 岁, 约 4.0kg) 的外周血单核细胞 (PMBC) 用作一维混合淋巴细胞培养物 (MLC) 中针对来自 11 只雄性供体 (大于 2 岁, 购自 Texas 的 Southwest Foundation) 的 PMBC 的应答者。狒狒 MLC 通过标准化的人类 MLC 方法进行。至于低背景和高特异性反应性, 与含有狒狒或胎牛血清的培养基相比, 使用补加人类血清的培养基得到更好的结果。供体足够大, 即从 1 个供体获取足够的胰岛和骨髓以允许移植给 2 个受体。与观察到的适度 MLC 反应相反, 当将来自 Mannheimer 动物的 PMBC 用作 MLC 应答者和刺激者时, 这些动物之间的 MLC 反应活性很高, 所有待用受体针对刺激者产生 ≥ 10.0 的刺激指数 (S. I.) (供体, 背景 $< 200-300$ 记数/每分钟, cpm)。试图挑选对指定供体具有类似 MLC 反应活性的 2 只受体, 并且挑选具有不同程度同种异体反应性的供体-受体对。认为 > 10 的 MLC S. I 是强反应性并选为可接受的最小不匹配性; 作为比较, 当来自 Mannheimer 的动物用作供体和受体时, MLC S. I 通常不到 5。

胰岛/骨髓的制备和施用

用 Liberase® (0.47mg/ml 胶原酶溶液, 得自 Boehringer-Mannheim, Indianapolis, IN) 通过对人胰岛分离自动方法 (Ricordi 等, 糖尿病 37, 413-420, 1988; Selvaggi 等, 移植方法 29:1967-1968, 1997) 的微小修改在 ICT 前一天 (即在 -1 研究日) 从胰腺分离胰岛。胰腺冷却缺血时间平均 0.5 ± 0.1 小时。将胰岛富集于 3 层不连续的 Euroficoll 梯度 (1.108, 1.096, 1.037) 中, 其中经消化的胰腺组织铺于 1.108 底层。使用细胞分离器 (COBE 299 1, COBE, Lakewood, CO) 离心该梯度 (Robertson, Chadwick, Contrator, James, London 糖尿病学报 30:93-98, 1993)。按如下测定获得的胰岛的数目、体积与纯度: 将最终的胰岛制品悬浮于 250ml RPMI 1640 溶液中, 将三份 $100 \mu\text{l}$ 的样品双硫腺染色 (Latif 等, 移植 45:827-830, 1988) 并且记数以分析总胰岛产量, 并且将数据进行数学转换以测定具有 150pm 平均直径的胰岛 (胰岛等价物,

IEQ) 总数 (Ricordi 等, *Acta Diabetol. Lat.* 27:185-195, 1990)。

对于增强耐受性的研究, 从胰腺供体获取椎体并且基本上根据对人椎体的处理方法的常规改进来处理以得到供体骨髓细胞 (DBMC)。对于供体骨髓的受体, 在 ICT 后在第 5 天和第 2 天进行输注。每 kg 受体体重施用共 10^9 个有核细胞的剂量。

动物的约束

对于化学约束, 将盐酸开他敏注射入臀肌中 (10mg/kg 体重)。通过以 5mg/kg 剂量施用盐酸开他敏而实现镇静状态的延长。如果动物对捏脚趾刺激有反应, 就再施用额外的开他敏。因为以前的研究已经表明开他敏降低对葡萄糖的一期胰岛素反应 (FPIR), 所以在所有代谢测试中的开他敏剂量维持尽可能低 (Lehmann 等, *灵长类动物医学杂志*. 26:312-321, 1997)。维持超过 30 分钟时间的满意安静状态的总剂量为 35 ± 2 mg/kg。在通过开他敏镇静的同时将动物身体固定。用 betadine 和酒精轮流洗擦来准备手术和血管穿透位点。将留置导管置于静脉内并且加以固定。

胰腺切除术和 ICT

在 ICT 的那一天 (0 研究日), 离心胰岛制品并且将沉淀重新悬浮于补充的 CMRL 1066 中, 然后在 22°C 培养过夜。移植前, 离心该制品并且将沉淀重新悬浮于 20ml 含有 2.5% 供体血清和 200IU 肝素的 RPMI 1640 溶液中。移植前立即测定 IEQ 的数目。完整胰腺切除按照已经成熟的外科技术进行。完成完整胰腺切除后, 将 20G 血管导管插入一根门静脉的肠系膜血管分支中, 并且通过在 10 分钟内重力输注胰岛制品来实现 ICT。

免疫抑制和术后看护

选择 FK506 (tacrolimus) 作为免疫抑制剂, 因为该药剂目前用于人类 ICT。FK506 施用在 ICT 之前 5 天开始。将 0.1mg/kg/天的剂量肌肉内施用给受体狒狒。每日监测药物水平并且调整剂量以维持约 15ng/ml 低水平。在研究日-1、3 和 10 时以 10 或 20 mg/kg 剂量施用人化抗-CD154 (源自 MAb 5c8, Lederman 等, *实验医学杂志* 175:1091-1101, 1992), 并且通过 ELISA 测定 5c8 和抗-5c8 的血清水平。

手术后第 1 天（研究日 1 或 POD1），对狒狒进行静脉内流体给药。随后以每天含有 60g 碳水化合物的食物喂养动物，包括 45g 猴饼干（补加 viokase）和 15g 水果。根据以抗-CD154 处理的头 2 只动物的经验，以后的狒狒在胰岛移植后 14-20 天时期以小剂量皮下胰岛素（每天约 0.5U/kg 体重）治疗以防止胰岛“衰竭”，由此成功移植必需的条件得到优化。

监测

通过足后跟穿刺和用 Glucometer Elite 测试血来监测禁食和摄食后的血葡萄糖（分别为 FG 和 PPG），并且至少每周一次，采集血液样品以获得血浆以使用 Beckman 葡萄糖分析仪进行 FG 水平的测定。一般也提取血液样品以证实异常高的读数。在抗-CD154 研究中，每次 MAbs 剂量之前（-1 天之前以及正好在抗体给药之前 3 和 5 天）从所有动物抽取血液样品并且此后每周抽取。在移植后约 3 个月时，测试减少至隔周进行。将血液样品用于对外周血鉴定表型以分析淋巴细胞亚型和测定 CBC 和化学、5c8 和抗-5c8 水平、胰岛素和 C 肽水平以及嵌合现象。周期性取血用于重新测定 MLC 对供体和第 3 组抗原的反应性。

分析

血浆胰岛素通过两种方法进行测定（Linco Research, Inc., St. Charles, MO）。测定低限为 20pmol/l 并且平均分析内系数变化为 6%。分析血浆中的 C-肽，其测定低限为 6%并且分析内系数变化为 6%。用葡萄糖分析仪（Beckman Instruments, Palo Alto, CA）测定血浆葡萄糖。用 Elite Glucometer（Bayer, Elkhart, IN）测定毛细血管全血葡萄糖水平。通过将稀释血清中的胰岛素浓度与胰岛素标准曲线比较来证明对狒狒胰岛素分析的有效性。用双抗体分析（DPC, Los Angeles, CA）测定胰高血糖素。以前已通过系列稀释证明了这些商业试剂盒的有效性（Goodner 等，糖尿病 38: 925-931, 1989）。

静脉内葡萄糖耐受性测试（IVGTT）

以前已经证明体内胰岛细胞功能测试能得到 β 细胞量改变的准确反映（McCulloch 等，糖尿病 40: 673-679, 1991）。按照前述（Lehmann 等，灵长类动物医学杂志 26:312-321, 1997）在禁食过夜 16 到 18 小时后进行

静脉内葡萄糖耐受性测定。简言之，在-10、-5 和 0 分钟收集血液样品。然后以 0.5g 葡萄糖/kg 体重将 50%葡萄糖溶液在超过 20 秒的时间内注入隐静脉。在注射后 1、3、5、7、10、15、20、25、30 分钟从对侧股动脉中收集 1.5ml 样品。因此，在 40 分钟时间内抽取共 12 个血液样品。将这些样品吸入含有 0.05ml 15%流体 EDTA 和 0.2ml 抑肽酶(500K. I. U. 抑肽酶/ml 血液)的玻璃管中，置于冰上，并且在 10 分钟内离心。然后将血浆冷冻于-80℃并随后分析葡萄糖、免疫反应性胰岛素和胰高血糖素。

统计分析和计算

结果表示为平均值 $\pm$ SEM。葡萄糖消失常数(Kg)根据 IVGTT 计算为 10 到 30 分钟之间 $\log_e(\ln)$ 血浆葡萄糖的下降斜率。对葡萄糖的急性胰岛素反应(AIRG)计算为 IV 葡萄糖注射后 1 到 10 分钟之间胰岛素曲线下增加的面积(AUC)。根据梯形法则减去从 1 到 30 分钟的基值来计算增加的反应(AUC 葡萄糖, AUC 胰岛素)，数据用 Statistica for Windows 软件(5.0 版, 1997, Statsoft, Inc., Tulsa, OK, USA)加以分析。

结果

CD154 阻断治疗延长胰岛同种异体移植物的存活和功能

所有狒狒在移植后立即变得血糖量正常。如下表 1 中所示，在无免疫抑制或 CD154 阻断治疗时，同种异体胰岛的 ICT 在第 8 天时导致排斥。常规用 FK506(单独或与全骨髓或干细胞筛选出的骨髓联合使用)的免疫抑制未能改善胰岛的存活，其中动物分别在 10、8 和 10 天发生排斥。与之明显相反，用抗-CD154(5C8) MAb 治疗的 5 只狒狒中的 4 只得到胰岛同种异体移植物存活的延长，大大超过了对照或 FK506 治疗的动物存活。此研究结果也在图 1 中以线性图表示，该图将禁食血葡萄糖(FG)作为 POD 功能的函数作图。此结果第一次证明 CD154 阻断治疗延长了胰腺切除诱导的糖尿病非人类灵长类动物模型中胰岛同种异体移植物的接受时间。显然，这些结果也证实了抗-CD154 治疗逆转急性排斥的能力。

CD154 阻断治疗可以与骨髓细胞移植结合应用

3 只狒狒在 POD 5 和 11 接受全骨髓(n=2)或干细胞选择的骨髓(经过 Ceprate®柱, Cellpro, Bothell, WA 筛选)(n=1)的延迟输注。对这些狒

狒给以 5C8 诱导治疗 (20mg/kg, -1, 3 和 10 天), 然后在 POD 28 开始进行每月维持治疗。一只动物表现十分良好, 直到 POD 241 仍然没有排斥。对在 POD 112 出现排斥的第 2 只动物进行排斥治疗并且维持到 POD 162。对在 70 天排斥的第 3 只动物进行治疗并且维持到 POD 124。

CD154 阻断治疗对移植物功能包括葡萄糖代谢调控的影响

在对照动物中重复 IVGTT 表明一期胰岛素分泌 (FPIS) 的良好可重复性。特别地, 在 79 天施行无痛死亡的动物中进行的一次葡萄糖耐受性测试 (IPGTT) 和免疫组织化学分析显示出肝脏中有功能的移植组织, 在肝外位点无残余胰岛素产生。在该研究中的其它动物中发现有功能性胰岛同种异体移植物, 其中移植物存活在 >125 到 >220 天之间。胰腺切除术和胰岛移植后 4 到 16 周重复的 IVGTT 在所有动物中表现几乎相同的 Kg 值, 高达术后 8 周。在注射时以 hu5c8 治疗的狒狒中, Kg 值的确在此后下降。在以维持剂量的 hu5c8 治疗的狒狒中观察到稳定值。通过 FPIS 估计的胰岛数目随着每次排斥在一段时间内减少。相反, 对处于 hu5c8 维持治疗的动物在胰岛移植后的 FPIS (随后多达 16 周) 得到很好保持。也研究了 2 只对照动物。在一些 IVGTT 中, 技术问题促使较以前研究施用更多开他敏, 这导致降低的 Kg 值和 FPIR。然而, 给以标准剂量的开他明后, 这些指数恢复正常。

在本发明研究过程中发现移植排斥在 FG 上升之前可通过分析 2 小时 PPG 来加以测定。在组织学上, 胰岛移植排斥定义为 2 次连续 FG 大于 250mg/dl。因此, 无论是用 CD154 阻断剂或常规抗排斥药剂, 抗排斥治疗的应用可以在排斥过程足够早地应用以允许挽救代谢上存活的移植组织。为了通过 hu5c8 挽救受排斥的移植物, 重复用于诱导移植接受的相同剂量方案。

狒狒研究的结论

前面的研究证明 hu5c8 促进胰岛的移植, 允许同种异体胰岛的长期存活, 并且对胰岛素分泌或整体胰岛素敏感性无不利影响。此外, 这些研究第 1 次确定移植可以维持, 并且用 CD154 阻断治疗逆转大型动物模型中的胰岛排斥症状是可能的。因此, 在此所述的治疗方案可以导致在

大型动物中以 ICT 前的水平保持胰岛素分泌和整体胰岛素敏感性。

表 1. 用抗-CD154 延长非人灵长类动物同种异体移植物的存活

组别	N	物种	胰岛素非依赖性的时间 (以 PODs 表示)
对照	1	狒狒	8
FK506	3	狒狒	8, 10, 10
抗-CD154 诱导+抗排斥	5	狒狒	^a 8, ^b 59, ^c 229, ^d 264, ^e 284
抗-CD154 诱导+维持	2	狒狒	^f 113, ^g 238
抗-CD154 诱导+维持	4	^h 猕猴	ⁱ 16, >80, >94, >166

- a)接受减少剂量的 5c8
- b)动物 34R; 在 POD 79 宰杀, 具有部分功能, 在 POD 58 经历了排斥事件, 排斥事件成功地得到逆转
- c)动物 12R; 在 POD 302 宰杀, 具有部分功能, 在 POD 59 开始经历了 6 次得到成功治疗的排斥事件
- d)动物 29R; 在 POD 300 宰杀, 完全排斥, 经历了 1 次排斥事件
- e)动物 14R; 在 POD 301 宰杀, 具有部分功能, 在 POD 31 开始经历了 4 次得到成功治疗的排斥事件
- f)在 POD 130 宰杀, 完全排斥
- g)在 POD 253 宰杀, 具有部分功能
- h)下面讨论
- i)由于部分的肠道阻塞, 在 POD 16 胰岛素独立性消失

胰腺切除术诱导糖尿病的猕猴 ICT 模型

除非特别说明, 所有方法基本与上述狒狒模型研究相同。

动物方法

2-7 岁的 SPF 猕猴可容易地从 COVANCE (Alice, TX) 或 Mannheimer Foundation, Inc. (Homestead, FL) 或类似商家获得。买入时, 检查所有猴子以测定其基本健康、身体状况和心理状态。所有外科步骤在无菌条件下进行。手术前让动物禁食 12-18 小时, 并且将用肌内开他敏 (10mg/kg) 和阿托品 (0.04mg/kg) 对其进行预麻醉。一旦动物安静下来, 立即安装气管内插管和静脉内导管。气管内插管用于保护气道并提供紧急药物的方便入口。用异氟烷 (isoflurane) 和氧气的组合物麻醉动物。在整个 ICT 操作过程中以 10ml/kg/小时速率通过导管输注注射用正常盐溶液。

进行中缝切开以达到腹部器官。对于供体和受体动物, 进行完全胰腺切除术并保留十二指肠。通过常规方法从供体胰腺分离胰岛用于随后移植入切除胰腺的糖尿病猴子内。在麻醉状态下对供体放血后, 借助 Striker Saw 沿腹部切口取出椎体。立即处理该骨头以取出骨髓。在有些受体中, 用带有滤膜的 y 型血液装置将骨髓细胞经头静脉输注入受体中。

受体动物的胰腺切除术后, 在肠系膜静脉的上或下分支中插入导管并且借助重力驱动将胰岛输注入肝脏中。之后, 按照常规手术技术缝合手术切口。手术结束时, 将动物置于仅有氧气中并且当动物充分复苏而能够控制气道时取出气管内插管。ICT 后, 将受体置于 ICU 笼内并且进行观察直至它们在临床上达到稳定。手术后给以抗生素 (Baytril) (肌内 5mg/kg, q24 小时, 5 天)。必要时使用 Bupomorphine (肌内 0.05mg/kg) 作为镇痛剂。

手术后使猴子禁食并且在 POD1p.o. 给以给他力 (gatorade)。在 POD 2, 它们开始每日 2 次软饮食, 包括香蕉和 (用水) 软化的含有 viokase 的高蛋白猴食品 (1 份香蕉加 4 片饼干)。正常饮食在 POD3 恢复 (6-8 片饼干加水果, 含有 viokase, 每日 2 次)。每只动物单独喂养以避免摄食过程中的竞争。人工喂养病猴以改善其基本健康和营养。重病动物将单独治疗直到它们恢复健康。经检查为将死或不可治疗的猴子通过经静脉内导管快速注射氯化钾而杀死。

检测

用于葡萄糖和胰岛素监测、免疫监测等的采血在任何时间不超过体

重的 1%或者在 1 个月内不超过体重的 7%。通过用柳叶刀刺破足后跟获得一小滴血放在葡萄糖测定纸条上测定禁食血葡萄糖 (FG) 水平。在某些情况下, 例如葡萄糖看来高时 ($>200\text{mg/dl}$), 进行静脉穿刺以得到血浆样品用于在 Beckman 葡萄糖分析仪上进行分析。也在移植之前或移植间隙提取血样以分析受体的抗供体免疫反应性。按照上述在移植前以及之后 4-6 周内进行静脉内葡萄糖耐受性测试 (IVGTT)。

结果

CD154 阻断治疗延长了糖尿病猕猴和狒狒中胰岛同种异体移植物的存活和功能

如上表 1 中所示, 本研究证明 hu5c8 单独治疗延长了第 2 种非人类灵长类动物中胰岛同种异体移植物的接受时间。此研究在研究日 -1、0、3 和 10 使用 hu5c8 给药的诱导接受方案。为了维持血清的 hu5c8 水平, 接下去是每月的维持接受方案。这些结果 (也在图 2 中列出) 令人吃惊: 有功能的胰岛同种异体移植物得到维持而无排斥症状发生。此发现结果的显著性通过比较图 3 中列出的数据而得到加强, 图 3 中除了猕猴研究动物, 还显示了患 DM 并且目前正在接受强化胰岛素替代治疗的病人 (称为 LAURA) 的 FG 图。LAURA 在 14 个月年龄时诊断患有 DM, 并且在研究时为 6 岁并且每日接受 2 到 3 次胰岛素注射。

等价物

本发明可以体现在其它特定形式中而不背离本发明精神或基本特征。因此, 应当认为前述实施方案是在此公开的本发明所有方面的举例说明而不是对其进行限定。因此本发明的范围通过附属的权利要求而不是前面的描述来说明, 并且认为在这些权利要求含义和相同范围内的所有改变也应当包括在本发明范围之内。

图 1：用抗CD154延长狒狒胰岛同种异体移植的存活

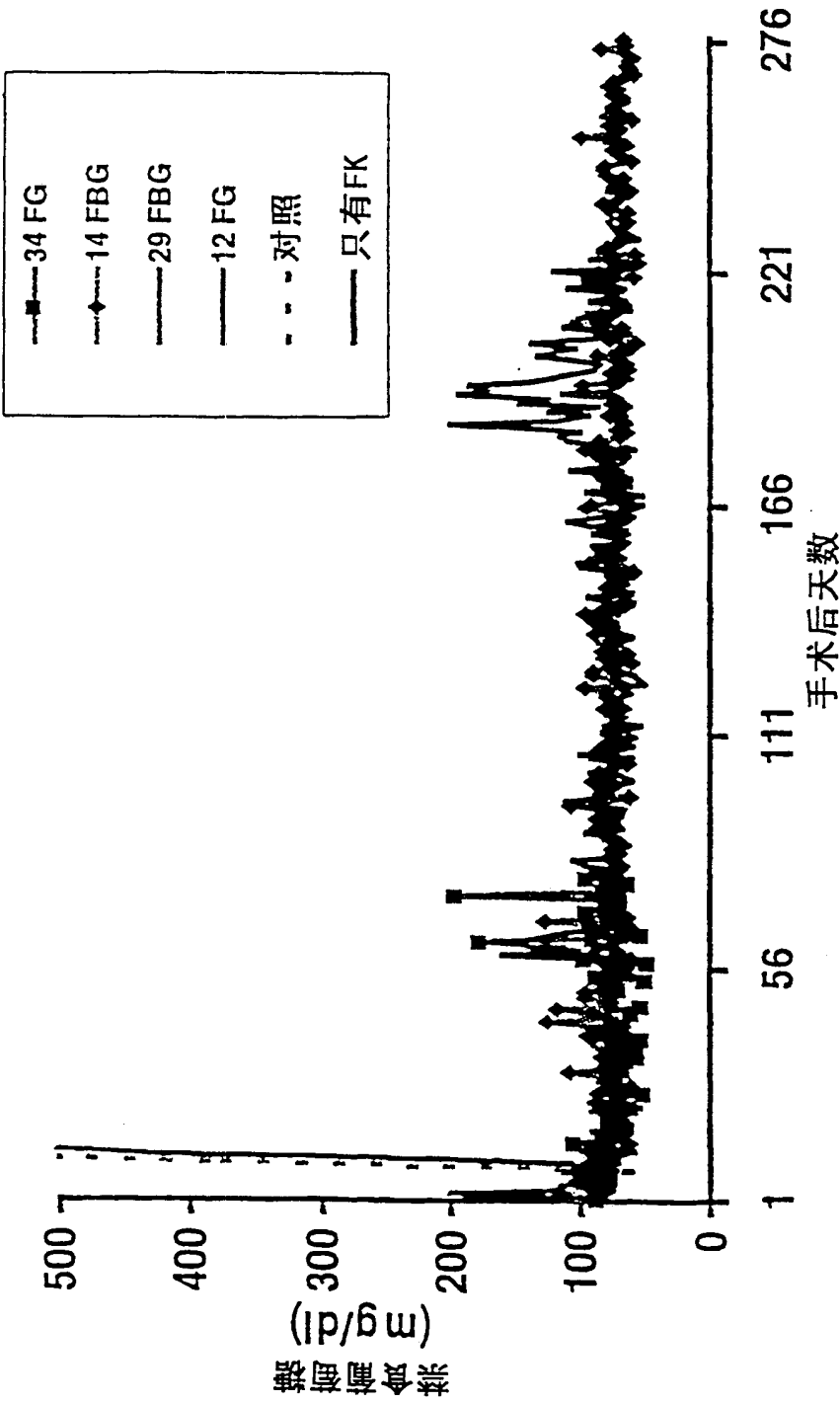


图 2：在猕猴中用起作用的胰岛同种异体移植控制血糖

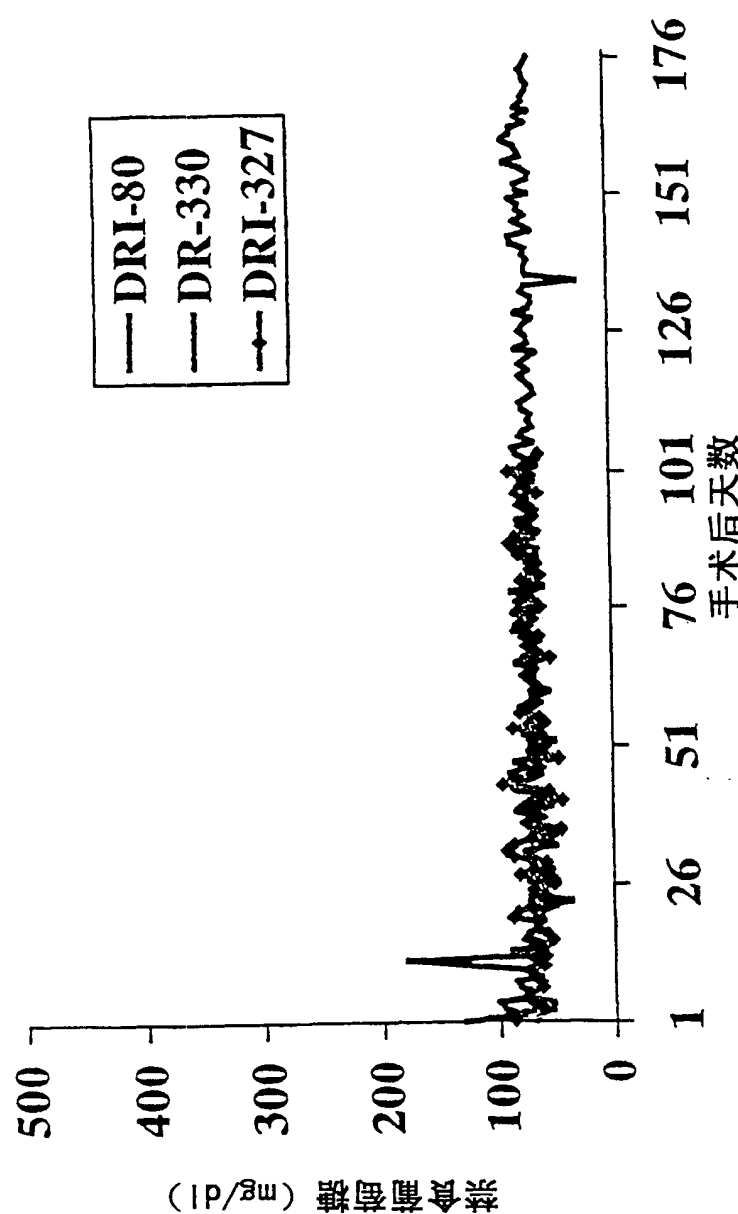


图3：用起作用的胰岛同种异体移植控制血糖与加强胰岛素治疗控制血糖的比较

