



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 697 21 007 T2** 2004.02.12

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 921 810 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **697 21 007.3**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US97/15294**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **97 940 708.7**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 98/008536**

(86) PCT-Anmeldetag: **02.09.1997**

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: **05.03.1998**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **16.06.1999**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **16.04.2003**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **12.02.2004**

(51) Int Cl.⁷: **A61K 38/17**

A61K 38/14, G01N 33/564, G11C 7/16

(30) Unionspriorität:

706209 30.08.1996 US

(73) Patentinhaber:

**Yeda Research and Development Co., Ltd.,
Rehovot, IL**

(74) Vertreter:

BOEHMERT & BOEHMERT, 24105 Kiel

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI,
LU, MC, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:

**COHEN, R., Irun, Rehovot 76344, IL; BIRK, Ohad,
Rockville, US**

(54) Bezeichnung: **SENKUNG DER HEFTIGKEIT EINER HOST-VERSUS-GRAFT-REAKTION DURCH UNTERDRÜCKUNG DER HSP60 AUTOIMMUNITÄT**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung**HINTERGRUND DER ERFINDUNG****Gebiet der Erfindung**

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung einer Verbindung oder aktivierter T-Zellen, die eine hsp60-Autoimmunität herabzuregulieren vermögen, für die Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zum Reduzieren der Schwere einer host-versus-graft-Reaktion (HVGR) durch Senken der Autoimmunität gegenüber dem Hitzeschockprotein hsp60. Insbesondere betrifft die Erfindung die Verwendung eines hsp60 Proteins oder eines hsp60 Epitopeptides für die Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Unterdrückung einer Transplantatabweisung durch Senken der hsp60-Autoimmunität.

Beschreibung des Standes der Technik

[0002] Autoimmunstörungen, z. B. insulinabhängige Diabetes Mellitus (IDDM oder Typ I-Diabetes), Multiple Sklerose, rheumatische Arthritis oder Thyroiditis sind gekennzeichnet durch eine Reaktion des Immunsystems auf ein endogenes Antigen mit der Folge der Gewebebeschädigungen. Diese Immunantwort auf Eigen-Antigene wird durch die dauerhafte Aktivierung der eigen-reaktiven T-Lymphozyten aufrechterhalten.

[0003] Das 60 kDa Hitzeschockprotein (hsp60) ist ein Stressprotein, das in allen Zellen des Körpers exprimiert wird. Nichtsdestoweniger manifestieren gesunde Individuen eine hohe Häufigkeit von autoimmunen T-Zellen, die spezifisch sind für hsp60 Eigenepitope. Es kann gezeigt werden, dass die normale gesunde Maus und der Mensch T-Zellen haben, die auf ihr eigenes hsp60 Antigene gerichtet sind (Kaufmann, 1990; Kaufmann et al., 1994; Young, 1989; Cohen, 1992b). Demnach sind diese autoimmunen T-Zellen auch an von T-Zellen vermittelten Autoimmunerkrankungen beteiligt: eine hohe Konzentration von gegen eigene hsp60-Antigene gerichtete T-Zellen wurden bei Autoimmunläsionen der menschlichen chronischen Arthritis (Cohen, 1991; Res et al., 1989, van Eden et al., 1989), der Multiple Sklerose (Selmaj et al., 1991), der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (Selmaj et al., 1991) und der adjuvanten Arthritis (Hogervorst et al., 1992) gefunden. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass Anti-hsp60 T-Zellen eine Rolle in der Diabetes Mellitus im Mäusemodell, in der Nicht-Obesen Diabetes (NOD) spielen (Elias et al., 1990; Elias et al., 1991, Elias et al., 1994; Elias et al., 1995; Birk et al., 1996a; Birk et al., 1993; Cohen, 1991).

[0004] NOD Mäuse entwickeln spontan eine Typ I-Diabetes, die durch autoimmune T-Zellen verursacht wird, die die Insulin erzeugenden β -Zellen der Langerhansschen Inseln betreffen. Der autoimmune Angriff ist verbunden mit einer T-Zellenreaktivität auf eine Vielzahl von Eigenantigenen einschließlich einem Peptid des 60 kDa Wärmeschockproteins (hsp60) und Peptiden der Glutaminsäuredehydrogenase (GAD). So konnte beispielsweise die spontane Diabetes, die sich in dem NOD/Lt Stamm der Mäuse entwickelt mit hsp60 (U.S. Patent 5,114, 844) oder mit antigenen hsp-Fragmenten, etwa als Peptid, das als P 277 bezeichnet wird, entsprechend den Positionen 437–460 der humanen hsp60 Sequenz (PCT-Patentveröffentlichung Nr. W?90/ 10449); Varianten des P 277 Peptids, in dem eine oder beide Cysteine an den Positionen 6 und/oder 11 sitzt ersetzt worden sind durch Valin und/oder der Thr-Rest an der Position 16 ersetzt wird durch Lys (s. PCT-Veröffentlichung W?96/19236), oder verschiedene andere Peptide wie solche, die durch P12 und P32 bezeichnet werden, entsprechend den Positionen 166–185 beziehungsweise 466–485 der menschlichen hsp60 Sequenz (s. PCT-Anmeldung PCT/US96/11375). Es ist zu beachten, dass das hsp60 Protein früher als hsp65 bezeichnet worden ist, aber jetzt in Hinblick auf genauere Informationen über das Molekulargewicht als hsp60 bezeichnet wird, beide Bezeichnungen bezeichne dasselbe Protein.

[0005] Von der Immunisierung gegen hsp60 oder des Peptids P277 in einem geeigneten Adjuvant ist es bekannt IDDM (W?90/10449) zu induzieren, wenn die Immunisation eine TH1 Antwort auslöst. Eine Impfung mit hsp60 oder Peptid P277 ohne ein wirksames Adjuvant und vorzugsweise mit einem tolerogenen Träger oder, besonders bevorzugt, mit einem TH2 induzierenden aktiven Träger, kann eine Resistenz gegenüber dem autoimmunen Prozess des IDDM erzeugen. Die subkutane Gabe von P277 in einem inkompletten Freundschens Adjuvant (IFA; Mineralöl) führt zur Begrenzung des Fortschreitens der Krankheit bei jungen NOD Mäusen (Elias et al., 1991) oder bei 12 – 17 Wochen alten NOD Mäusen mit fortgeschrittener Insulitis (Elias et al., 1994 und 1995). Sowohl beim Menschen (Elias et al., 1994 und 1995) als auch bei der Maus (Birk et al., 1996a) waren Varianten von P277 wirksam. NOD Mäuse, die transgen für das Mäuse-hsp60-Gen auf einer MHC Klasse II Promoters waren, zeigten eine Senkung ihrer spontanen T-Zellen Proliferations-Antwort auf P277 und ein signifikanter Anteil der Mäuse wurde von der Entwicklung von Diabetes verschont (Birk et al., 1996b). Darüber hinaus führt die Gabe von P277 bei C57BL/KsJ Mäusen zum Abbruch der Entwicklung von autoimmuner Diabetes in Mäusen, die zuvor eine sehr geringe Dosis von für β -Zellen-toxisch wirkenden Streptozotocin (STZ) erhalten hatten; eine Behandlung dieser Mäuse mit einem Peptid der GAD65-Moleküle war nicht effektiv (Elias et al., 1996). Bevorzugte TH2-induzierende aktive Träger zur Verwendung bei der Gabe derartiger hsp60 Frag-

mente sind bestimmte Fettemulsionen wie etwa Intralipid oder Lipofundin (s. PCT/US96/11373).

[0006] Weiter wurden T-Zellen, die auf hsp60 oder anderen hsp-Molekülen reaktiv waren, von das Herz betreffenden Eigentransplantaten (Moliterno et al., 1995) sowie auch von anderen entzündlichen Läsionen (Selmaj et al., 1991, Mor et al., 1992) isoliert. Folglich sammeln sich Anti-hsp60 autoimmune T-Zellen an Entzündungsorten. Es wird angenommen, dass donorspezifische T-Lymphozyten, die solche Charakteristiken wie etwa cytolytische Aktivität und Produktion von Lymphokinen zeigen, dort eine Transplantatabstoßung vermitteln, wo hsp-reaktive T-Zellen vermutlich eine Rolle in der Immunkaskade von entzündlichen Prozessen bei der Transplantatabstoßung spielen (Moliterno et al., 1995).

[0007] Es wurde kürzlich durch die Untersuchungen der Erfinder der vorliegenden Anmeldung entdeckt, dass die erfolgreiche Behandlung des autoimmunen Prozesses bei IDDM durch die Gabe des Peptids P277 in Öl verursacht wird durch den Effekt dieser Behandlung, in dem die Autoimmunität vom TH1-Typ gegen mehrere unterschiedliche Antigene gestoppt und stattdessen eine P277 Autoimmunität im TH2 Modus aktiviert wird. T-Zellen vom CD4-Helfer Typ wurden in zwei Gruppen aufgeteilt, TH1 und TH2, aufgrund der kennzeichnenden Cytokine, die sie nach Aktivierung absondern (Mosman et al., 1989). Das TH1-Zellen sekretieren IL-2, das die T-Zellen Proliferation induziert, und Cytokine wie IFN- γ , die eine Gewebsentzündung vermitteln. TH2-Zellen, dagegen sondern IL-4 und IL-10 ab. IL-4 hilft den T-Zellen Antikörper bestimmter IgG Isotypen abzusondern und unterdrückt die Erzeugung von TH1-entzündlichen Cytokinen (Abas et al., 1994). IL-10 inhibiert indirekt die TH1-Aktivierung durch Beeinflussen der Antigen-Präsentation und der Erzeugung entzündlicher Cytokine durch Makrophagen (Moore et al., 1993). Es sind diese TH1-Zellen, die zu der Pathogenese organspezifischer Autoimmunerkrankungen beitragen. Die TH1-Typ Antworten scheinen auch bei anderen von T-Zellen vermittelten Krankheiten oder Zuständen, wie einer Kontaktdermatitis (Romagnani, 1994), beteiligt zu sein. Deshalb kann eine Erkrankung mit einem Spektrum von Autoreaktivitäten mit einem einzelnen Peptid ausgeschaltet werden, das dazu in der Lage ist, eine T-Zellen Cytokin Umschaltung zu induzieren.

[0008] Die Transplantation ist gegenwärtig die Behandlung der Wahl bei Organversagen. Während der achtziger Jahre des 20. Jahrhunderts spielte die Entdeckung des Cyclosporins A eine Rolle bei der erheblichen Zunahme des Überlebens von Transplantaten. Die Verwendung von Transplantaten ist jedoch immer noch begrenzt wegen des Phänomens der akuten Immunabstoßung (host-versus-graft-Abstoßung oder HVGR), das das transplantierte Gewebe innerhalb von Tagen oder Monaten nach dem chirurgischen Eingriff zerstören kann. Die Steuerung oder Regulation von HVGR ist entscheidend für die Entwicklung besserer Transplantationsverfahren.

[0009] Die nichtspezifische immununterdrückende Therapie bei einem erwachsenen Patienten erfolgt gewöhnlich durch Cyclosporin, beginnend mit einer intravenösen Gabe zum Zeitpunkt der Transplantation und oral verabreicht, nachdem die Nahrungsaufnahme toleriert wird. Typischerweise wird zum Zeitpunkt der Transplantation auch Methylprednison gegeben, sodann auf eine Beibehaltungsdosis reduziert. Auch Azathioprin wird oft in Verbindung mit Prednison gegeben, um eine adäquate Immunsuppression zu erreichen. Während das Ziel der Immunsuppression darin besteht, das Transplantat zu schützen, kann die allgemeine oder übermäßige Immunsuppression zu unerwünschten Komplikationen führen, z. B. zu opportunistischen Infektionen und potentiellen Malignitäten. Die Toxizität der immunsuppressiven Wirkstoffe ist dosisabhängig.

[0010] Mittel zum Verringern oder Vermeiden von HVGR wurden seit langem gesucht. Ein Verfahren, das imstande ist, die Heftigkeit des Abstoßungsvorgangs und zum die Dosen von immunsuppressiven Wirkstoffen zu reduzieren, die erforderlich sind, um das Transplantat zu erhalten, wären ein erheblicher Fortschritt.

[0011] Das Zitieren von Dokumenten dient hier nicht zur Anerkennung, dass diese Dokumente zum Stand der Technik gehören oder betrachtetes Material betrifft nicht die Patentierbarkeit irgendwelcher Ansprüche der vorliegenden Anmeldung. Jede Aussage bezüglich des Inhalts oder des Datums jedes Dokuments basiert auf der Information, die dem Anmelder zum Zeitpunkt der Einreichung verfügbar ist und bildet keine Behauptung bezüglich der Richtigkeit einer solchen Aussage.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0012] Es ist eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, die Verwendung einer Verbindung oder aktivierter T-Zellen bereit zu stellen, die dazu in der Lage sind, eine hsp60 Autoimmunität herunterzuregeln, für die Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zum Verhindern einer Transplantatzurückweisung eines Spenderorgans oder von Gewebe bei einem Transplantatempfänger.

[0013] Die Erfindung betrifft die Erkenntnis, dass dann, wenn das Hitzeschockprotein hsp60 oder Peptide oder Analoga von diesem in einem Empfängersubjekt vor der Transplantation eines Organs oder Gewebes gegeben wird, die Autoimmunität gegenüber hsp60 heruntergeregelt wird, was zu der Verhinderung oder Unterdrückung der Transplantatabstoßung des transplantierten Organs oder Gewebes führt.

[0014] In Experimenten bezüglich der Frage, ob in einer Autoimmunkrankheit beobachtete hsp60 Autoimmunität bei der Abstoßung von Transplantaten beteiligt war, zeigten die Untersuchungen der Anmelder der vorliegenden Erfindung, dass die Expression von hsp60 in der Spenderhaut während der Abstoßung hochreguliert

wurde. Das Abstoßen von fremden Hauttransplantaten in Mäusen wurde weiter untersucht und es wurde beobachtet, dass transgene Hautgewebetransplantate, die Eigen-hsp60 überexprimieren, bei normalen Mäusen einer beschleunigten Abstoßung unterlagen, wenn die Transplantate auch größere oder kleinere fremde-Histokompatibilitäts-Antigene trugen. Wenn dagegen die Empfängermaus konstitutiv Eigen-hsp60 überexprimierten, zeigten sie nicht nur eine herabgesetzte hsp60-Autoimmunität, sondern zeigten auch eine verlangsamte Abstoßung von Fremdhauttransplantaten. Die Transplantatempfänger konnten gegenüber Fremdtransplantaten tolerant gemacht werden, wenn ihre hsp60-Autoimmunität durch vorherige Gabe von hsp60 oder hsp60-Peptiden und analogen Peptiden reduziert wurde. Die Erfinder der vorliegenden Anmeldung haben die überraschende Entdeckung gemacht, dass Autoimmunität Fremdimmunität regeln kann. Wenn die hsp60-Autoimmunität gesteigert wird, wird auch die Fremdimmunität und die Transplantatabstoßung verstärkt, wenn die hsp60-Autoimmunität reduziert oder herabgeregelt wird, wird die Fremdimmunität und die Transplantatimmunität unterdrückt oder verhindert.

[0015] Die vorliegende Erfindung betrifft somit die Verwendung einer Verbindung oder aktivierter T-Zellen, die dazu in der Lage sind, eine hsp60-Autoimmunität herabzuregulieren, für die Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Unterdrückung und Verhinderung einer Transplantatabstoßung. Durch Behandeln eines Transplantatempfängers mit einer solchen Zusammensetzung wird eine Herabregulierung der hsp60-Autoimmunität in dem Transplantatempfänger verursacht entweder vor, gleichzeitig mit oder kurz nach Transplantation eines Organs oder Gewebes, vorzugsweise unmittelbar davor.

[0016] Die hsp60-Autoimmunität kann in jeder bekannten Weise und vorzugsweise durch Mittel, die bereits bekannt sind für die Herabregulierung der hsp60-Autoimmunität bei der Behandlung von IDDM, herabgeregelt werden. Die Herabregulation kann erreicht werden durch Gabe einer pharmazeutischen Zusammensetzung, die eine Verbindung aufweist, die dazu in der Lage ist, die hsp60-Autoimmunität herabzuregulieren, etwa hsp60 oder ein Peptidfragment von hsp60 oder ein analoges Salz oder ein funktionales Derivat davon. Beispiele solcher Verbindungen sind humanes hsp60 (SEQ ID NO: 1) und die folgenden Aminosäuren-Residuen von SEQ ID NR: 1: Residuen 31–50, Residuen 136–155, Residuen 151–170, Residuen 166–185, Residuen 195–214, Residuen 255–274, Residuen 286–305, Residuen 346–365, Residuen 466–485, Residuen 511–530, Residuen 343–366 und Residuen 458–474. Beispiele von Analoga, die verwendet werden können, schließen die Peptide von SEP ID NR: 2, SEQ ID NR: 3, SEQ ID NR: 4, SEQ ID NR: 5, SEQ ID NR: 6, SEQ ID NR: 7 und SEQ ID NR: 8 ein. Die Verbindung wird vorzugsweise in einem tolerogenen Träger, etwa dem inkompletten Freund'schen Adjuvant oder einem biologisch aktiven Träger gegeben, der die Induzierung einer TH1 → TH2-Verschiebung unterstützt, etwa einer Fettemulsion, die 10%–20% Triglyceride pflanzlichen oder tierischen Ursprungs, 1,2%–2,4% Phospholipiden pflanzlichen und/oder tierischen Ursprungs, 2,25%–4,5% eines Osmoregulators, 0%–0,5 % eines Antioxidants und steriles Wasser enthält.

[0017] Die vorliegende Erfindung betrifft weiter ein Verfahren zum Auswählen eines optimalen hsp-Peptids oder eines Analogs zum Herabregulieren der hsp60-Autoimmunität in dem bestimmten zu behandelnden Individuum. Antigen-präsentierende Zellen peripherer Blutlymphocyten, die aus dem Blut des Individuums isoliert worden sind, können mit einem Panel individueller Peptide kontaktiert werden. Die Peptide, die als Ergebnis dieses Screenings einen optimalen Effekt auf die hsp60-Immunität haben, würden als das optimale Antigen für das zu verwendende Vaccine selektiert werden, das für das bestimmte Individuum zum Verhindern einer Transplantatabstoßung zu verwenden ist.

[0018] Hsp60, hsp60-Peptid und Analoga, Salze und funktionale Derivate davon können für die Präparation einer pharmazeutischen Zusammensetzung zum Herabregulieren der hsp60-Autoimmunität in einem Wirt und zum Herabregulieren der Schwere der host-versus-graft-Reaktion bei Organtransplantationen verwendet werden.

KURZE ERLÄUTERUNG DER ZEICHNUNGEN

[0019] **Fig. 1** zeigt die Expression von hsp60 in Mäusehaut. Die Bahnen 1–4 zeigen jeweils die hsp60-Expression während der Abstoßung von BALB/c (H-2^d)-Haut, die 10 Tage nach der Transplantation bei allogenen NOD (H-2^k)-Mäusen entfernt wurde. Die Bahnen 5–8 zeigen die Expression von hsp60 in BALB/c-Haut, die 10 Tage früher auf syngenetische BALB/c-Mäuse transplantiert worden war. Bahn 9 zeigt die spontane Expression von hsp60 in nicht-transplantiertem E⁺-hsp60 transgener NOD-Haut. Bahn 10 zeigt die Expression von hsp60 in nicht-transplantiertem Wild-Typ NOD-Haut.

[0020] Die **Fig. 2A–F** zeigen, dass die Expression von hsp60 die allogene Hautabstoßung betrifft, gemessen als Transplantatüberleben über die Zeit. Die statistische Analyse des Hauttransplantatüberlebens erfolgte unter Verwendung des Wildcoxon-Tests. **Fig. 2A** zeigt, dass E⁺-hsp60 transgene Haut nicht abgestoßen wurde, wenn sie auf eine NOD-Wild-Typ Maus transplantiert wurde und **Fig. 2B** zeigt, dass E⁺-hsp60 transgene Mäuse-Wild-Typ-Haut nicht abstößt. **Fig. 2C** zeigt die beschleunigte Abstoßung ($p < 0,0001$) von E⁺-hsp60 transgener NOD-Maus (Rauten) verglichen zu Wild-Typ NOD-Haut transplantiert auf BALB/c-Mäuse (Quadrat). **Fig. 2D** zeigt die beschleunigte Abstoßung ($p < 0,038$) von E⁺-hsp60 transgener, männlicher NOD-Haut transplantiert auf HY inkompatible, weibliche NOD-Wild-Typ Mäusen. **Fig. 2E** zeigt die Verzögerung bei der Absto-

ßung ($p = 0,004$) durch allogene C57BL/6 (H-2^b)-Haut durch E α -hsp60 transgene NOD-Mäuse (H-2^g). **Fig. 2F** zeigt Verzögerung der Abstoßung ($p = 0,001$) von BALB/k CH-2k-Haut durch E α -hsp60 transgene Mäuse. Jede Gruppe beinhaltete 10–12 Mäuse.

[0021] Die **Fig. 3A–B** zeigen, dass die Behandlung mit hsp60 oder hsp60-Peptiden eine verzögerte Abstoßung von Hautallotransplantaten gemessen anhand des Transplantatüberleben über die Zeit. **Fig. 3A** und **3B** zeigen die Effekte der Behandlung von C57BL6 (H-2^b)-Mäusen (**Fig. 3A**) oder NOD (H-2^g) Wild-Typ Mäusen (**Fig. 3B**) mit hsp60 (50 μ g in inkompletten Freundschem Adjuvant, Sigma), subkutan in den Rücken zwei Wochen vor der Transplantation von BALB/c (H-2^d)-Haut gegeben (Elias et al., 1994; Elias et al., 1995). Rekombinantes humanes hsp60 wurde wie beschrieben präpariert (Elias et al., 1990). Die Kontrollgruppen von Mäusen wurden nicht behandelt (offene Quadrate) oder mit inkomplettem Freundschem Adjuvant, das 50 μ g rekombinante Glutathiontransferase enthielt, behandelt (offene Rauten). Die Unterschiede in der Abstoßung zwischen der Behandlung mit hsp60 (geschlossene Quadrate) und der Kontrollgruppe, bestimmt unter Verwendung des Wilcoxon-Tests, waren signifikant ($p < 0,05$ für **Fig. 3A** und $p < 0,001$ für **Fig. 3B**).

[0022] **Fig. 4** zeigt, dass die Behandlung mit hsp60 Peptiden eine verzögerte Abstoßung von Hautallotransplantaten induziert. Wild-Typ-NOD (H-2^g)-Mäuse wurden mit verschiedenen hsp60 Peptiden in inkomplettem Freundschem Adjuvant behandelt. Peptide der Maus hsp60-Sequenz wurden synthetisiert und wie beschrieben gereinigt (Elias et al 1991). Die Sequenz des Peptids p11 ist Val-Ile-Ala-Glu-Leu-Lys-Lys-Gln-Ser-Lys-Pro-Val-Thr-Thr-Pro-Glu-Glu-Ile-Ala-Gln (SEQ ID NR: 9). Peptid p277 ist das V-substituierte humane p277 Peptid Val-Leu-Gly-Gly-Gly-Val-Ala-Leu-Leu-Arg-Val-Ile-Pro-Ala-Leu-Asp-Ser-Leu-Thr-Pro-Ala-Asn-Glu-Asp (SEQ ID NR: 7) wie früher beschrieben (Elias et al 1991) und als kreuzreaktiv mit dem Mäuse-p22-Homolog nachgewiesen (Birk et al., 1996a). Die Kontrollmäuse wurden nicht behandelt (offene Quadrate) oder wurden mit inkomplettem Freundschem Adjuvant mit 50 μ g Peptid p11, einem nicht-immunogenen hsp60 Kontroll-Peptid (geschlossene Rauten) behandelt. Die Unterschiede in der Abstoßung zwischen der Behandlung mit p12 (geschlossene Quadrate) oder p277 (offene Dreiecke) und die Kontrollen waren signifikant ($p < 0,001$). Jede Gruppe beinhaltete 10–12 Mäuse.

EINGEHENDE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0023] Die vorliegende Erfindung basiert auf der Entdeckung, dass die hsp60-Autoimmunität als ein Beschleuniger für Fremdimmunität wirkt und auf der weiteren Entdeckung, dass die Herab-Regulierung der hsp60-Autoimmunität die Transplantatabstoßungsreaktion unterdrückt oder verhindert. Dementsprechend reduziert die Verwendung einer Verbindung oder aktivierter T-Zellen in Übereinstimmung mit der vorliegenden Erfindung die Intensität der host-versus-graft-Reaktion (HVGR) und erlaubt eine Reduktion der Dosierung immunosuppressiver Wirkstoffe, wie Cyclosporin und Prednison, die erforderlich sind, um das Transplantat zu erhalten. Die Verwendung einer Verbindung oder aktivierter T-Zellen nach der vorliegenden Erfindung wird vorzugsweise gemeinsam mit der immunosuppressiven Wirkstoffbehandlung durchgeführt, die Dosen der Wirkstoffe werden jedoch geringer sein und weniger Nebeneffekte bewirken.

[0024] Die Herab-Regulierung der hsp60-Autoimmunität ist bereits für andere Indikationen bekannt, etwa zur Prevention oder zur Behandlung der IDDM oder des Anfangsstadiums der IDDM. Solche Verfahren sind bekannt, sie schließen die Gabe von hsp60, Peptiden des hsp60-Moleküls oder Varianten von diesen mit einem tolerogenen Träger ein, um eine Toleranz gegenüber hsp60 zu erzeugen und damit die hsp60-Autoimmunat-tacke herab zu regeln oder mit einem biologisch aktiven Träger, der eine TH1 $\rightarrow$ TH2-Verschiebung vermittelt. Es ist bekannt, dass die hsp60-Autoimmunität immer dann herab geregelt werden kann, wenn eine Verschiebung von hsp60 T-Zellen, die überwiegend vom TH1-Typ sind, auf hsp60 T-Zellen, die vorwiegend vom TH2-Typ sind, verursacht wird. Die Verwendung eines biologisch aktiven Trägers in einem solchen Vaccin, der eine solche TH1 $\rightarrow$ TH2-Verschiebung bewirkt, wird zur Erreichung einer solchen hsp60-Autoimmunitäts-herab-regelung bevorzugt.

[0025] Ein anderes Vorgehen, das in dem Stand der Technik zum Herabregeln der hsp60-Autoimmunität bekannt ist, schließt die Aktivierung autologer T-Zellen ex vivo gegenüber hsp60 oder Peptiden oder Varianten davon und deren Rückgabe an den Wirt ein, um so eine Immunantwort zu verursachen, die gegen T-Zellen gerichtet ist, um so autoimmune Anti-hsp60 T-Zellen zu unterdrücken und damit die hsp60-Autoimmunität herab zu regeln. Siehe dazu das erteilte US Patent Nr. 5,578,303, dessen gesamter Inhalt hier durch Bezugnahme einbezogen wird.

[0026] Es sind so viele Wege zur Herabregulierung der hsp60-Autoimmunität bereits bekannt und die vorliegende Erfindung ist nicht per se auf solche Verfahren zum Herabregeln der hsp60-Autoimmunität gerichtet. Die vorliegende Erfindung ist darauf gerichtet, dass ein solches Herabregulieren bei Gabe an Transplantatempfänger die Transplantatabstoßung verhindern oder unterdrücken wird. Entsprechend soll die Verwendung einer Verbindung oder aktivierter T-Zellen, die in der Lage sind, die hsp60-Autoimmunität herab zu regulieren, für die Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung bei einer Verwendung für Transplantatempfänger,

entweder direkt vor, gleichzeitig oder kurz nach der Transplantation durch die vorliegende Erfindung erfasst sein.

[0027] Ein bevorzugtes Verfahren, das ein Herabregulieren der hsp60-Autoimmunität bewirkt, ist die Gabe von hsp60-Protein oder hsp60-Peptiden oder Varianten als ein immunologischer Wirkstoff mit einem tolerogenen oder biologisch aktiven Träger. Die humane hsp60-Proteinsequenz ist SEQ ID NR: 1 und Tabelle 1 listet Peptide und Peptidanaloga von hsp60 auf, die eine hsp60-Autoimmunität herabregeln. Diese Peptide und Analoga haben sich als nützlich bei der Verhinderung oder Behandlung des autoimmunen Vorgangs von insulinabhängiger Diabetes Mellitus (IDDM) erwiesen (siehe PT/US96/11375). Der Fachmann erkennt, dass das hsp60-Protein und die hsp60-Peptide, die in Tabelle 1 identifiziert sind, nicht beschränkende Beispiele immunologischer Wirkstoffe sind, die als ein Teil einer pharmazeutischen Zusammensetzung zum Herabregeln der hsp60-Autoimmunität und der Transplantatabstoßung gegeben werden können. Die Selektion des Proteins oder des Peptids als immunologischer Wirkstoff, der fast immer optimal für einen bestimmten Transplantatempfänger verwendet werden kann, wird später in diesem Abschnitt diskutiert werden.

[0028]

TABELLE 1

Peptide	SEQ ID NO: (Residuen)
p3	1 (31–50)
p 10	1 (136–155)
p11	1 (151–170)
p12	1 (166–185)
p14	1 (195–214)
p18	1 (255–274)
p20	1 (286–305)
p24	1 (346–365)
p29	1 (421–440)
p30	1 (436–455)
32	1 (466–485)
p35	1 (511–530)
p39	1 (343–366)
p278	1 (458–474)
p277	1 (437–460)
p277 (Lys ¹⁹)	2
p277 (Val ⁶)	3
p277 (Val ⁶ -Lys ¹⁹)	4
p277 (Val ¹¹)	5
p277 (Val ¹¹ -Lys ¹⁹)	6
p277 (Val ⁶ -Val ¹¹)	7
p277 (Val ^{6,11} -Lys ¹⁹)	8
Mäuse p12	9
Mäuse p38	10

[0029] Wenn hier nicht anders spezifiziert, ist die humane Sequenz gemeint. Die Maus-p 12-Peptide und die Maus-p38-Peptide sind von den Maus-hsp60-Protein und entsprechend den Residuen 168–188 bzw. 556–573 vom Maus-hsp60 abgeleitet.

[0030] Das hsp60-Protein oder die hsp60-Peptide, die als immunologischer Wirkstoff in der pharmazeutischen Zusammensetzung verwendet und zum Verhindern oder Unterdrücken der Transplantatabstoßung gegeben werden, sollen Salze und funktionelle Derivate von diesen umfassen, aber auch hsp60-Peptidanaloga, etwa solche, wie sie für Peptid p277 in Tabelle 1 beispielhaft angegeben sind, solange die biologische Aktivität des Proteins oder Peptids bezüglich der Herabregulierung von hsp60-Autoimmunität beibehalten wird.

[0031] Varianten des hsp60 Peptids p277, hier als „Peptidanaloga“ bezeichnet, bei denen der einzige Threoninrest durch einen Lysinrest und/oder ein oder beide der Cysteinreste durch ein oder mehrere Valinres ersetzt worden war, wurde vorher bei den Untersuchungen der Erfindern der vorliegenden Anmeldung als ebenso aktiv wie p277 bei der Herabregulierung der hsp60-Autoimmunität erkannt, wie eine Behandlung gegen IDDM. Es wird erwartet, dass, dieselben Peptideanaloga die hsp60-Autoimmunität herabregeln, wenn sie zur Verhinderung oder Unterdrückung der Transplantatabstoßung einer Organ- oder einer Gewebetransplantation folgend gegeben werden.

[0032] „Salze“ von hsp60-Peptiden nach der Erfindung, die von der Erfindung beachtet werden, sind physiologisch akzeptable organische und anorganische Salze.

[0033] „Funktionale Derivate“ der hsp60-Peptide, wie sie hier verwendet werden, decken die Derivate ab, die von den funktionellen Gruppen präpariert werden können, die als Seitenketten an den Residuen oder den N- oder C-terminalen Gruppen auftreten, durch Mittel, die in dem Stand der Technik bekannt sind. Sie werden von der Erfindung eingeschlossen, solange sie pharmazeutisch akzeptabel bleiben, d. h. sie die Aktivitäten der Peptiden nicht zerstören, sie schließen jedoch toxische Eigenschaften auf Zusammensetzungen nicht ein und beeinflussen deren antigenische Eigenschaften nicht nachteilig.

[0034] Diese Derivate können, beispielsweise, aliphatische Ester der Carboxylgruppen, Amide der Carboxylgruppen, erzeugt durch Reaktion mit Ammoniak oder primären oder sekundären Aminen, N-Acylderivate der freien Aminogruppen der Aminosäurenresiduen gebildet durch Reaktionen mit Alkylgruppen (beispielsweise Alkanoyl oder carbocyclischen Aroylgruppen) oder O-Acylderivaten freier Hydroxylgruppen (beispielsweise denen von Seryl oder Threonylresiduen) gebildet durch Reaktion mit Alcygruppen aufweisen.

[0035] Die Behandlung zur Herunterregulierung der hsp60-Autoimmunität erfolgt vorzugsweise unmittelbar vor der Transplantation. Der Ausdruck „unmittelbar“ soll eine Zeitperiode einschließen, während der die Herabregulierung der hsp60-Autoimmunität durch eine solche Behandlung ausgeführt wird, noch in dem Wirt vorhanden bleibt, vorzugsweise zu einem Zeitpunkt derart, dass die optimale Herabregulation mit dem Zeitpunkt der Transplantation zusammenfällt. Die Behandlung zur Herabregulierung der hsp60-Autoimmunität kann auch gleichzeitig mit der Transplantation oder kurz danach ausgeführt werden. Der Ausdruck „kurz danach“ soll eine Zeitdauer einschließen, bei der die hsp60-Autoimmunitätherabregulierung vor dem Auftreten einer erheblichen Transplantatabstoßung eintritt.

[0036] Bei der vorliegenden Erfindung kann die Gabe der pharmazeutischen Zusammensetzung, die hsp60, die hsp60-Peptide oder Analoga davon, als immunologisch aktive Wirkstoffe zur Herabregulierung der hsp60-Autoimmunität in einem Empfänger auf verschiedenen, bekannten Wegen erfolgen, etwa oral, intranasal, intravenös, intramuskulär oder subkutan. Bevorzugte Arten der Gabe sind intravenös, was als Induzieren einer Toleranz bekannt ist oder oral oder intranasal, was bekannt ist, eine TH1 → TH2-Verschiebung zu induzieren. Siehe Wraith et al., 1995; Metzler et al., 1996; Metzler et al., 1995; Tian et al., 1996; Daniel et al., 1996; Weiner et al., 1994. Die bevorzugte Dosierung des hsp60-Proteins oder der Peptide oder Analoga davon, liegt in dem Bereich von etwa 100 µg bis 25–30 mg vor der Transplantation des Organs oder des Gewebes. Eine optimale Dosierung oder Verabreichung kann durch den Fachmann durch Messen einer Verschiebung von einer TH1-Cytokinantwort auf eine TH2-Cytokinantwort bestimmt werden.

[0037] Während es bevorzugt ist, die hsp60-immunologischen Wirkstoffe vor der Transplantation in Abhängigkeit von dem Ausmaß der Herabregulierung der hsp60-Autoimmunität zu geben, können weitere Gaben von hsp60-Protein der Peptiden oder Analoga davon nach der Transplantation gegeben werden, um das Ausmaß der hsp60-Autoimmunität weiter zu reduzieren oder herab zu regeln. Ebenso kann eine Impfung mit T-Zellen, die spezifisch auf die hsp60-autoimmunologischen Wirkstoffe sind und in vitro durch einen Kontakt mit dem hsp60-immunologischen Wirkstoffen aktiviert worden sind, kann weiter die hsp60-Autoimmunität herab regeln und eine Transplantatabstoßung nach der Transplantation unterdrücken.

[0038] Die Gabe von hsp60-immunologischen Wirkstoffen erfolgt vorzugsweise die Gabe einer konventionellen immunsuppressiven Therapie begleitend, obwohl die Reduktion der Schwere der HVGR eine Reduktion der Dosierung der üblichen immunsuppressiven Wirkstoffe, etwa Cyclosporin oder Prednison erlaubt.

[0039] Eine Transplantationabstoßung erwies sich als durch hsp60-Autoimmunität reguliert und die Unterdrückung oder Verhinderung von hsp60-Autoimmunität, die der Organ- oder Gewebstransplantation folgte, wird nicht von einer T-Zellentoleranz oder Anergie begleitet, sondern eher mit einer Verschiebung in den Cytokinen, die von den autoimmun T-Zellen, die auf hsp60 oder hsp60-Peptide reaktiv sind, von einem TH1-artigem Profil (unter Erzeugung von IL-2, IFN γ zu einem TH2-artigen Profil (IL-4, IL-10) begleitet. Das Einhergehen der hsp60-Proteingabe oder hsp60-Peptidgabe mit einem Umschalten in der Reaktivität auf solche immunologischen Stoffe von einer T-Zellen-Proliferation auf Antikörper weist darauf hin, dass der protektive Effekt sich aus einer Verschiebung in den predominant Cytokinen ergibt, die durch die autoimmun T-Zellen in der behandelten Person erzeugt werden. TH1-Zellen sekretieren IL-2, das eine T-Zellen Proliferation und Cytokine wie IFN- γ induziert, die eine Gewebsentzündung vermitteln, wodurch sie zu der entzündlichen Antwort gegen transplantierte Organe oder Gewebe beitragen; TH2-Zellen dagegen sekretieren IL-4 und IL-10. IL-4 hilft B-Zellen, Antikörper bestimmter IgG-Isotypen zu sekretieren und unterdrückt die Erzeugung von TH1-Entzündungscytokine. IL-10 verhindert indirekt eine TH1-Aktivierung durch Beeinflussen der Antigenpräsentation und der entzündlichen Cytokinproduktion durch Macrophagen. TH2-Zellen unterdrücken so die TH1-Aktivität (siehe Liblau et al., 1995). Die Verschiebung von einem TH1-artigen zu einem TH2-artigen Verhalten wurde durch die Analyse der Isotypen der Antikörper festgestellt, die vor oder nach einer Peptid p277-Therapie in seiner Verwendung bei der Behandlung von IDDM erzeugt wurden. Jede gleichzeitige Behandlung, die diese TH1 → TH2-Verschiebung unterstützt, kann in Verbindung mit der beiliegenden Erfindung benutzt werden.

[0040] Es wird erwartet, dass verschiedene Epitope des hsp60-Proteins für die hsp60-Autoimmunität bei unterschiedlichen Individuen wichtiger sein können. Es ist beispielsweise bekannt, dass Individuen verschiedener humaner Leukozytenantigen (HLA)-Typen verschiedene HLA-Moleküle haben. Diese verschiedenen Arten

von HLA-Molekülen haben ihre individuellen Peptidbindungsmotive. Bei einem bevorzugten Ausführungsbeispiel der vorliegenden Erfindung können daher die autologen peripheren Blutlymphozyten des beabsichtigten Empfängers gegen eine Gruppe von hsp60-Peptiden geprüft werden, um zu sehen, welches Peptid den optimalen Effekt auf die hsp60-Autoimmunität hat. Es ist in dem Stand der Technik anerkannt, dass Klasse II-MHC-Moleküle an 12–15 Aminosäurenresiduen lange Peptide binden, mit einer minimalen Länge, die vielleicht lediglich 9 Aminosäurenresiduen besitzt und das Klasse I-MHC-Moleküle Peptide von 7–9 Aminosäurenresiduen-Länge binden. Die Peptide von hsp60, wie sie in Tabelle 1 angegeben sind, können geeignet geprüft werden, um eines oder mehrere optimale Peptide zu bestimmen, die einem bestimmten individuellen Empfänger gegeben werden können oder einem Empfänger eines bestimmten HLA-Typs, um eine TH2 Cytokin Antwort zu verschieben und dadurch ihre/seine eigene hsp60-Autoimmunität herabzuregulieren. Das optimale Peptid sollte für verschiedene Individuen vom selben HLA-Typ gleich sein.

[0041] Irgendwann wird eine größere Kenntnis über die Peptid-Bindungsstruktur von HLA-Molekülen eine Vorhersage erlauben, welche Peptide am besten an die Bindungsstelle passen und angeboten werden. Bis dahin können Prüftechniken, wie sie im folgenden dargestellt werden, verwendet werden.

[0042] Periphere Blutlymphozyten (PBL) eines individuellen humanen Empfängers können von Blut durch eine Ficoll-Hypaque Dichtegradientenzentrifugation, wie sie in dem Stand der Technik bekannt ist, isoliert werden. Diese Probe der Lymphozyten des Empfängers kann auf Bindung der zu prüfenden Peptide in Übereinstimmung mit dem Verfahren, das in Mozes et al., U. S. Patent 5,356,779 offenbart ist, getestet werden, oder kann auf in vitro T-Zellen-Proliferation und anschließender T-Zellen Cytokin Antwort zur Analyse zum Bestimmen einer optimalen oder nahezu optimalen hsp60-Peptids für einen spezifischen individuellen Empfänger geprüft werden. Mozes et al., U.S. Patent 5,356,779, das hier durch Bezugnahme einbezogen wird, offenbart die direkte Bindung von Peptiden, die T-Zellen Epitope sind, an humane Antigen-präsentierende Zellen (APC) in peripheren Blutlymphozyten, die aus Vollblut durch Ficoll-Hypaque Dichtegradientenzentrifugation isoliert worden sind. Die Detektion der gebundenen T-Zellen Epitope wird durch Beobachten beispielsweise einer Fluoreszenzprobe, etwa Phycoerythrin oder seiner Analoga, das kovalent an die Peptidepitope konjugiert ist, erreicht. Eine Gruppe von überlappenden Peptiden von sieben bis fünfzehn Aminosäurenresiduen-Länge kann also von der Gesamtlänge des hsp60-Proteins präpariert und auf eine Bindung mit APC des Empfängers geprüft werden. Diejenigen, die optimal binden, sind diejenigen, die zur Verwendung für den bestimmten Empfänger bei der Herabregulierung der hsp60-Autoimmunität bevorzugt sind.

[0043] Ein anderer Weg zum Prüfen dieser Gruppe von Peptiden ist das Testen der Lymphozyten des Empfängers auf eine in vitro Proliferation im Vorhandensein eines jeden Peptids der Gruppe oder das Testen auf eine TH1-TH2 Verschiebung, die durch solche Peptide verursacht wird. Die Überstände der mit Testpeptiden mit einer Konzentration von 5–50 µg/ml kultivierten T-Zellen können zu verschiedenen Zeitpunkten gesammelt werden und auf die Aktivität verschiedener Cytokine geprüft werden, etwa IFN γ und IL-4, die in das Kulturmedium abgegeben worden sind, was durch ELISA unter Verwendung von standardmäßigen ELISA Protokollen oder das Vorhandensein von Antikörpern bestimmter Klassen quantifiziert werden kann.

[0044] Es ist beispielsweise bekannt, dass in Mäusen T-Zellen vom TH1-Typ die Produktion von Antikörpern der IgG2a-Klasse induzieren, während Antikörper vom TH2-Typ die Produktion von Antikörpern der IgG1-Klasse induzieren. Während die humanen Äquivalente bisher nicht gut definiert sind, kann, wenn der Unterschied begründet ist, eine Prüfung auf den Isotyp der Antikörper zu dem hsp60 immunologischen Wirkstoff verwendet werden, um die Verschiebung von einer TH1-T-Zellen Antwort auf eine TH2-T-Zellen Antwort zu beobachten. Es ist beispielsweise bekannt, dass im Menschen der IgE Isotyp durch TH2-Zellen induziert wird.

[0045] Entsprechend ist es bekannt, dass TH1-Zellen Cytokine sekretieren, die eine T-Zellen-Proliferation und Cytokine wie IFN γ induzieren, die eine Gewebeentzündung vermitteln. Auf der anderen Seite sekretieren TH2-Zellen IL-4, das β -Zellen hilft, Antikörper der IgG und IgE Klasse zu sekretieren und die Produktion von TH1 entzündlichen Cytokinen unterdrücken, als auch von IL-10, was indirekt eine TH1-Aktivierung durch Beeinflussung einer Antigen-Präsentation und Produktion von entzündlichen Cytokinen von Makrophagen verhindert. Entsprechend wird eine Messung der Cytokin-Profile der in vitro gewachsenen T-Zellen auch ein Anzeichen einer Verschiebung von einer TH1 T-Zellen Antwort auf eine TH2 Z-Zellen Antwort sein. Die TH1 $\rightarrow$ TH2 Verschiebung kann daher als ein Marker zum Beobachten der in vitro Antwort von T Lymphozyten eines Empfängers auf verschiedene Testpeptide bei dem Bestimmen von optimalen oder nahezu optimalen Peptiden dienen.

[0046] Besondere Verfahren zur Prüfung der Isotypen von Antikörpern und zur Überprüfung des Vorhandenseins von verschiedenen Cytokinen bilden an sich keinen neuen Teil der vorliegenden Erfindung. Sie sind dem Fachmann in verschiedener Art und Weise zur Prüfung auf Antikörper-Isotype oder für die verschiedenen Cytokine, die von TH1- und den TH2-Zellen erzeugt werden, bekannt. Solche Verfahren können für die Zwecke der vorliegenden Erfindung zum Erkennen einer TH1 zu TH2 Verschiebung verwendet werden. Die hier gezeigten Beispiele offenbaren illustrative Verfahren, um dies zu tun, sie sollen jedoch die vorliegende Erfindung nicht darauf beschränken.

[0047] Wenn das Verfahren, das zur Herabregulierung der hsp60-Autoimmunität ausgewählt worden ist, die

Gabe von hsp60 oder eines Peptids oder einer Variante davon ist, muss der Träger oder das gewählte Adjuvant einer sein, der eine Toleranz zu dem gegebenen Peptid erzeugt oder der aktiv eine TH1 → TH2 Verschiebung induziert. Ansonsten könnte die Autoimmun-Antwort sogar verstärkt werden. Beispiele solcher bekannter tolerogener Trägerstoffe schließen Mineralölträger wie das inkomplette Freudsche Adjuvant (IFA) ein. IFA ist eine Emulsion von mineralischem Öl. IFA ist jedoch nicht für die menschliche Verwendung zugelassen, da mineralisches Öl nicht metabolisierbar ist und von dem Körper nicht abgebaut werden kann.

[0048] Biologisch aktive Träger, die die TH1 → TH2 Verschiebung verstärken, sind besonders bevorzugt in Übereinstimmung mit der vorliegenden Erfindung. Es hat sich kürzlich gezeigt, dass bestimmte Fettemulsionen, die seit vielen Jahren für die intravenöse Ernährung von menschlichen Patienten verwendet werden kann, auch als biologisch aktive Vehikel für eine Peptidtherapie, die die Peptide der vorliegenden Erfindung verwendet, wirken können. Zwei Beispiele derartiger Emulsionen sind die käuflich erhältliche Fettemulsionen, die als „Intralipid“ und Lipofundin bekannt sind. „Intralipid“ ist eine eingetragene Marke von Kabi Pharmacia, Schweden, für eine Fettemulsion zur intravenösen Ernährung, beschrieben in dem US Patent Nr. 3,169,094. „Lipofundin“ ist eine eingetragene Marke von B. Braun, Melsungen, Deutschland. Beide beinhalten Sojabohnenöl als Fett (100 oder 200 g in 1.000 ml destilliertem Wasser: 10% bzw. 20%). Eidotterphosphorlipide werden als Emulgatoren in Intralipid (12 g/l destilliertem Wasser) verwendet und Eidotterlecithin in Lipofundin (12 g/l destilliertem Wasser). Die Isotonizität ergibt sich aus der Zugabe von Glycerol (25 g/l) sowohl in Intralipid als auch in Lipofundin. Diese Fettemulsionen sind recht stabil und wurden für die intravenöse Ernährung von Patienten, die an gastrointestinalen oder neurologischen Störungen leiden, verwendet, es vermeidet eine orale Ernährung, sie können so die Kalorien erhalten, die sie zum Erhalt des Lebens benötigen. Gewöhnliche tägliche Dosen für eine intravenöse Ernährung kann bis zu einem Liter täglich betragen.

[0049] Obgleich Intralipid und Lipofundin bevorzugte Beispiele biologisch aktiver Träger für das als Behandlung zur Unterdrückung oder Verhinderung einer Transplantatabstoßung gegebenes Protein oder peptidimmunologischer Wirkstoff sind, kann jeder pharmazeutisch akzeptabler Träger, insbesondere Lipidträger, die eine Verschiebung von einer TH1 Antwort zu einer TH2 Antwort verursachen, in der pharmazeutischen Zusammensetzung der vorliegenden Erfindung verwendet werden. Vorzugsweise umfasst ein solcher biologisch aktiver Lipidträger eine Fettemulsion, die 10–20% Triglyceride pflanzlichen und/oder tierischen Ursprungs, 1,2–2,4% Phospholipide pflanzlichen und/oder tierischen Ursprungs, 2,25–4,5% Osmoregulator, 0–0,05% Antioxidans und steriles Wasser auf 100% auf. Intralipid und Lipofundin sind die am meisten bevorzugten Beispiele dieser bevorzugten Fettemulsionen. Die Triglyceride und Phospholipide pflanzlichen oder tierischen Ursprungs können von jedem geeigneten pflanzlichen Öl, etwa Sojabohnenöl, Baumwollsaamenöl, Kokosnussöl oder Olivenöl oder von Eidotter oder Rinderserum gewonnen werden. Vorzugsweise ist das Gewichtsverhältnis zwischen Triglyceriden und Phospholipiden etwa 8 : 1.

[0050] Jeder geeignet Osmo-Regulator kann zu der Fettemulsion, vorzugsweise Glycerol, Xylitol oder Sorbitol zugegeben werden. Die Fettemulsion kann optional ein Oxidans, beispielsweise 0,05% Tocopherol aufweisen.

[0051] Ein bevorzugter biologisch aktiver Träger, der bei der vorliegenden Erfindung verwendet werden kann, ist eine Fettemulsion, die 10% Sojabohnenöl, 1,2% Eidotter-Phospholipide, 2,5% Glycerol und steriles Wasser auf 100 ml (Intralipid 10%) aufweist. In einem anderen Ausführungsbeispiel ist die Trägersubstanz eine Fettemulsion, die 20% Sojabohnenöl, 2% Eidotter-Phospholipide, 2,5% Glycerol und steriles Liter auf 100 ml aufweist.

[0052] Bei einem anderen bevorzugten Ausführungsbeispiel ist die Trägersubstanz eine Fettemulsion, die 5% Sojabohnenöl und weitere 5% Triglyceride tierischen Ursprungs, beispielsweise 5% Kettentriglyceride von Butter, 1,2% Eidotterlecithin, 2,5% Glycerol und destilliertes Wasser auf 100 ml (Lipofundin 10%) aufweist. In einem anderen bevorzugten Ausführungsbeispiel des biologisch aktiven Lipidträgers wird die Fettemulsion, wie sie oben definiert ist, durch Zentrifugation verarbeitet, beispielsweise bei 10.000 g oder mehr, so dass eine kleine, triglycerid-reiche (etwa 90% Triglyceride) Schicht auf der Oberfläche der phospholipidangereicherten wässrigen Dispersion, die ungefähr 1 : 1 Triglyceride : Phospholipide enthält, und diese letztgenannte wässrige Dispersion wird als lipide Trägersubstanz in der pharmazeutischen Zusammensetzung der Erfindung benutzt.

[0053] Die Fettemulsionen, die bei der vorliegenden Erfindung genutzt werden können, werden vorzugsweise frisch aufbereitet oder nach der Speicherung in einem Behälter, der gegenüber der Atmosphäre nicht offen ist, benutzt. Eine längere Lagerung von Intralipid, beispielsweise bei dem Vorhandensein atmosphärischer Luft, verursacht eine Abnahme des pH Wertes und eine entsprechende Abnahme der biologischen Aktivität.

[0054] Die Wirksamkeit der Herabregelung der hsp60-Autoimmunität kann in dem Wirt durch Beobachten der TH1 → TH2 Verschiebung in diesem beobachtet werden. Dies kann in der Art und Weise erreicht werden, wie es in der PCT/US96/11374 mit der Veröffentlichungsnummer WO 97/02052 beschrieben ist.

[0055] Nachdem die Erfindung jetzt allgemein beschrieben worden ist, wird diese unter Bezugnahme auf das nachfolgende Beispiel, das zur Erläuterung dient, besser verständlich. Dieses Beispiel dient nicht dazu, die vorliegende Erfindung einzuschränken. Das hier beschriebene Beispiel zeigt die Effektivität der vorliegenden Erfindung in einem wissenschaftlich akzeptierten Mäusemodell für das Überleben einer Hauttransplantation.

BEISPIEL 1:

[0056] Um festzustellen, ob die natürliche Autoimmunität gegenüber hsp60 nur mit der Gesundheit verträglich ist, oder aber ob die natürliche hsp60-Autoimmunität tatsächlich zur Funktion des Immunsystems beiträgt, haben die Erfinder der vorliegenden Anmeldung eine hsp60-transgene NOD-Maus entwickelt, die Mäuse-hsp60 unter der Einwirkung des Promoters für den Haupt-Histokompatibilitätskomplex (MHC) Klasse II E α Moleküle (Birk et al., 1996b) überexprimiert. Diese Mäuse exprimieren hohe Mengen von hsp60 im Thymus und in antigen-präsentierenden Zellen (APC) im gesamten Körper, was zu einem relativen Verlust ihrer ansonsten spontanen hsp60-Autoimmunität führt. Untersuchungen zur spontanen autoimmunen Diabetes in diesen transgenen NOD-Mäusen haben gezeigt, dass hsp60-Autoimmunität kritisch für die Zerstörung der Selbst-Beta-Zellen ist (Birk et al., 1996b). Wie unten gezeigt, werden die E α -hsp60-transgenen Mäuse entweder als Spender von Haut, die mit Selbst-hsp60 Expression angereichert ist oder als Empfänger von Fremdhaut genutzt.

[0057] Die Erfinder der vorliegenden Anmeldung haben erkannt, dass hsp60 in abgestoßenen Transplantaten überexprimiert wird und dass in den E α -hsp60 transgenen Mäusen eine solche Überexpression als von funktionaler TH1 vermittelter Bedeutung bei der Transplantatabstoßung nachgewiesen wurde. Die Transplantatabstoßung kann weiter durch eine therapeutische Modulation von hsp60-Autoimmunität verzögert und sogar verhindert werden. Die Ergebnisse dieser Experimente werden unten beschrieben.

[0058] **Fig. 1** zeigt die Expression von Maus-hsp60 in der Haut von Wildtyp-Mäusen, das einem allogenen Wirt transplantiert worden ist und einer Abstoßung unterliegt (Bahnen 1–4) oder auf syngenetischen Wirte transplantiert worden ist und toleriert wird (Bahnen 5–8). Rasierte Haut wurde chirurgisch entfernt und in TENN-Puffer (50 mM Tris, pH 8,0, 5 mM EDTA, 0,5% NP-40, 150 mM NaCl) lysiert. Gleiche Mengen von Protein (50 μ g, bestimmt unter Verwendung des Bradford-Reagents, Biorad) wurden auf 10% SDS-PAGE fraktioniert und auf Nitrocellulosepapier für eine Western Blotanalyse transferriert (Towbin et al., 1979) unter Verwendung von LK1, einem monoklonalen Antikörper, der für hsp60 spezifisch ist (Boog et al., 1992), in einer 1 : 500 Verdünnung, und einem ECL-Detektionssystem (Amersham, UK). Es kann durch Vergleichen der Bahnen 1–4 bis 5–8 erkannt werden, dass dieser Prozess der Abstoßung die Expression von hsp60 in Wildtyp-Haut steigert. Die erhöhte Expression von hsp60 in dem Gebiet des Abstoßungsvorgangs scheint es der hsp60-Autoimmunität zu erlauben, eine Rolle in dem Vorgang der Transplantationsabstoßung zu spielen.

[0059] Um dieser Frage nachzugehen, verwendeten die Anmelder der vorliegenden Erfindung transgene Mäuse. **Fig. 1** zeigt weiter, dass die Expression von hsp60 konstitutiv in E α -hsp60 transgener NOD Haut (Spur 9) verstärkt ist verglichen mit Wildtyp-NOD-Haut (Spur 10), wahrscheinlich aufgrund der Aktivierung des MHC Klasse III Promotors in den dendritischen Zellen der Haut (Kampgen et al., 1991). Die Konsequenzen dieser konstitutiven Überexpression sind in **Fig. 2** gezeigt, in der 1 cm² Hautabschnitt von dem Rücken getöteter Spendermäuse geschnitten und in Salzlösung gewaschen wurde. Stücke von dorsaler Haut in der Größe von einem cm² wurden von der mit Nembutal 6 mg/ml, 0,25 ml pro Maus behandelt anästhesierten Empfängermaus entfernt, und durch die Spenderhauttransplantate ersetzt. Histoacryl (B. Braun Mesungen AG, D-34209 Mesungen, Deutschland) wurde um die Transplantate herum aufgebracht und Nobecutan (ASTR, Astra Tech, POB 13, Glos G15, UK) wurde über diese gesprüht.

[0060] Die **Fig. 2A** und **2B** zeigen, dass die E α -hsp60 NOD transgene Haut nicht abgestoßen wird, wenn sie auf eine nicht-transgene NOD-Empfängermaus übertragen wird. Die hsp60-transgene Haut hat also nicht ein fremdes Histokompatibilitäts-Antigen während des Einfügens des Maus-hsp60-Transgens angenommen; E α -hsp60 transgene Haut ist noch eigen. Nichtsdestoweniger zeigen die **Fig. 2C** und **2D**, dass das überexprimierten E α -hsp60-Transgen die Allotransplantatabstoßung in zwei unterschiedlichen Abstoßungssystemen erheblich verstärken kann. **Fig. 2C** zeigt die Beschleunigung der Hautabstoßung über die MHC-Grenze (NOD H2⁹⁷ Haut transplantiert auf allogene BALB/c H-2^d Mäuse), der mittlere Abstoßungstag wurde von 20 auf 12 Tage reduziert ($p < 0,0001$), während **Fig. 2D** die Beschleunigung der Abstoßung durch weibliche NOD-Empfänger von männlicher E α -hsp60 transgener NOD-Haut verglichen mit der Abstoßung von männlicher Wildtyp-Haut wird der mittlere Abstoßungstag von 55 auf 30 Tage reduziert ($p < 0,038$). Die Abstoßung männlicher Haut durch syngene weibliche Mäuse wird durch ein kleines Histokompatibilitäts-Antigen verursacht, das durch das männliche Y-Chromosom (Scott et al., 1995) codiert ist. Die konstitutive Überexpression von Selbst-hsp60 in transgener Spenderhaut verstärkt den Abstoßungsvorgang, der auf die Fremdtransplantations-Antigene gerichtet ist, entweder größer und kleiner.

[0061] **Fig. 2E** und **2F** zeigen das umgekehrte Experiment, wobei die Empfänger NOD-Mäuse Träger der E α -hsp60 Transgene sind und daher eine herabgesetzte hsp60-Autoimmunität haben (Birk et al., 1996b). Verglichen mit der Wildtyp NOD-Maus zeigten die E α -hsp60 transgenen Mäuse einen verzögerten mittleren Tag der Abstoßung von allogenen C57BL/6 (H-2^b) Hauttransplantaten (**Fig. 2E**) von 20 Tagen ($p = 0,004$) und von BALB/k (H-2^k) Hauttransplantaten (**Fig. 2F**) von 10 Tagen ($p = 0,0001$). Die Abstoßung von BALB/k (H-2^d) und BALB/b (H-2^b) Haut war signifikant verzögert ($p = 0,001$ bzw. $p = 0,015$) nicht gezeigt. Mäuse mit unterdrückter Anti-hsp60-Autoimmunität zeigen eine herabgesetzte Allotransplantatabstoßungsreaktion.

[0062] Die Arbeiten der Erfinder der vorliegenden Anmeldung haben kürzlich entdeckt, dass die hsp60-Autoimmunität in Wildtyp-NOD-Mäusen (Elias et al., 1990; Elias et al., 1991; Elias et al., 1994; Elias et al., 1995) und in anderen Stämmen (Elias et al., 1996) durch therapeutisches Impfen der Mäuse subkutan mit ganzen hsp60 oder hsp60 Peptiden emulgiert in mineralischem Öl (incompletten Freund'schen Adjuvans; IFA) moduliert werden kann. Der Mechanismus der Modulation (Elias et al., 1996) scheint eine Verschiebung im Phänotyp der T-Zellenantwort auf hsp60 vom entzündungsfreundlichen TH1-Typ zu einem entzündungsfeindlichen TH2-Typ der Antwort einzuschließen (Finkelman et al., 1990).

[0063] Die **Fig. 3A–3B** zeigen, dass eine solche Impfung einer Wildtyp-NOD (H-2^{g7}) Empfängermaus oder einer C57BL/6 (H-2^b) Maus zwei Wochen vor der Transplantation von BALB/C (H-2^d) Haut eine Verzögerung in der Hautallotransplantatabstoßung verursachte. Es ist aus **Fig. 3A** ersichtlich, dass C57BL/6 Mäuse, ein Stamm der nicht dafür bekannt ist, an einer spontanen Autoimmunerkrankung zu leiden, eine signifikant verlängerte Überlebenszeit von BALB/c Hauttransplantaten nach der Impfung mit hsp60 ($p < 0,01$) zeigten. C57BL/6 Mäuse, die nur mit IFA geimpft worden waren oder mit dem rekombinanten Kontrollantigen Glutathiontransferase, zeigten keine verlängerte Überlebenszeit der BALB/c Haut. Es ist aus **Fig. 3B** erkennbar, dass NOD Mäuse auch eine verzögerte Abstoßung der BALB/c allogenen Haut nach einer hsp60 Impfung hatten verglichen mit einer Impfung mit dem rekombinanten Kontrollantigen ($p < 0,0001$). **Fig. 4** zeigt, dass ein Impfen der NOD Maus mit hsp60 Peptiden auch die Überlebenszeit der allogenen BALB/c Haut verlängerte ($p < 0,001$). Es ist erkennbar, dass die hsp60 Peptide p12 und p277 effektiv waren verglichen mit der unbehandelten Maus. Dagegen verlängerte Peptid p11, das in NOD Mäusen nicht immunogen ist, die Überlebenszeit des Hautallotransplantats nicht. Die Behandlung der NOD Maus mit einem immunogenen Peptid von mycobacteriellem hsp60, das nicht mit Eigen-hsp60 kreuzreaktiv ist, verlängerte die Überlebenszeit des Allotransplantats auch nicht (nicht gezeigt). Die Impfung mit hsp60 oder verschiedenen hsp60 Peptiden, die wie gezeigt die spontane hsp60 Autoimmunität beeinflussen kann (Elias et al., 1990; Elias et al., 1991; Elias et al., 1994; Elias et al., 1995; Elias et al., 1996), kann daher die Abstoßung von Fremdhaut signifikant hemmen.

[0064] In **Fig. 1** ist gezeigt, dass die Belastung der Transplantationsreaktion die hsp60 Expression auch in der nicht-transgenen Wildtyp-Haut heraufregulieren kann. T-Zellen, die auf hsp60 und andere hsp-Moleküle reaktiv sind, wurden von Herz-Allotransplantaten (Molitero et al., 1995), aber auch von anderen entzündlichen Läsionen (Selmaj et al., 1991; Mor et al., 1992) isoliert. Die anti-hsp60 autoimmunen T-Zellen akkumulieren sich daher an Orten der Entzündung. Es wird angenommen, dass die konstitutive Überexpression von hsp60 in der Spender-E α -hsp60-Haut die Aktivierung von anti-hsp60 autoimmunen T-Zellen an dem Ort verstärken und die lokale Immunantwort durch Hinzufügen von entzündungsfördernden (TH1-Typ) Cytokinen wie INF γ (Finkelman et al., 1990) bei der Allotransplantationsreaktion vergrößern, wodurch andere T-Zellen, angeregt und begründet werden, die auf die Fremdantigene antworten. Umgekehrt sollten hsp60 autoimmune T-Zellen, die zum Erzeugen von antientzündlichen Cytokinen vom TH2-Typ aktiviert wurden, wie IL-10, zum Absenken der Effektor-Immun-Reaktion durch eine Form von Hilfsunterdrückung dienen (Weiner et al., 1994). Um zu prüfen, ob die Behandlung mit hsp60 Peptiden, die Cytokin-Antwort modifiziert, wurden NOD- oder C57BL- Mäuse mit hsp60 oder mit hsp60 Peptid p12 behandelt. Die Kontrollmäuse wurden gar nicht oder mit einer Salzlösung, die in IFA emulgiert war, behandelt. Die Mäuse wurden mit BALB/c Hauttransplantaten transplantiert und zwanzig Tage später, gerade bei Beginn der Transplantatabstoßung in den Kontrollmäusen, wurden Gruppen von fünf bis zehn Mäusen getötet und ihre Milzzellen individuell in einer standardisierten gemischten Lymphozytenreaktion (MLR) mit bestrahlten BALB/c Milzzellen als Stimulator (Lohse et al., 1990) geprüft. Die MLR Kulturen wurden auf eine T-Zellen Proliferation durch Thymidin-Inkorporation geprüft (Lohse et al., 1990). Es ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den behandelten und den Kontrollgruppen. Dennoch wurden auch die MLR-Medien auf das Vorhandensein von TH1 Cytokin INF γ und von TH2 Cytokin geprüft. Es hat sich ergeben, dass die T-Zellen der Kontrollmäuse $9,25 \pm 1,7$ ng/ml INF γ produzierten, während die T-Zellen der mit hsp60 und p12 behandelten Mäuse nur $3,13 \pm 1,4$ ng/ml INF γ ($p = 0,002$) erzeugten. Im Gegensatz zu der Abnahme von INF γ zeigten die behandelten Mäuse eine erhöhte Produktion von IL-10; $8 \pm 1,4$ ng/ml verglichen mit $3,5 \pm 0,6$ ng/ml in den Kontrollmäusen ($p = 0,004$). Die Verlängerung der Überlebensdauer der Hauttransplantate, die durch Impfung mit hsp60 oder hsp60-Peptiden induziert war, war begleitet worden von weniger INF γ und mehr IL-10, das während der MLR in vitro sekretiert worden war. Es hat sich weiter gezeigt, dass die E α -hsp60 transgenen NOD-Mäuse eine besondere Abnahme in ihrer INF γ (TH1) Antwort auf hsp60 ausbilden. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Modulation der Allotransplantat-Reaktion durch hsp60 Autoimmunität durch unterschiedliche Cytokinproduktion vermittelt wird. Unabhängig von diesem Mechanismus zeigen die vorliegenden Ergebnisse, dass eine hsp60 Autoimmunität kritisch in der Antwort auf Fremdantigene sein kann, starke oder schwache. Die natürliche Autoimmunität gegen hsp60 und möglicherweise andere natürliche Eigenantigene, die in dem immunologischen Homunculus erkannt worden sind (Cohen 1992a; Cohen 1992), haben eine regulative Bedeutung.

[0065] Über diese theoretische Spekulation hinaus kann die Manipulation der hsp60 Autoimmunität praktischen Nutzen haben. Die Arbeit der Erfinder der vorliegenden Erfindung hat gezeigt, dass die natürliche hsp60 Autoimmunität benutzt werden kann, zum Induzieren von T-Zellen zur Unterstützung für eine Antwort auf

schwach immunogene bakterielle Antigene durch die Verwendung von hsp60 Peptid-bakteriellen Zuckerkonjugaten (Konen-Waisman et al, 1995). Daher kann das Hochregulieren der Autoimmunität gegen hsp60 kann helfen, eine Infektion zu bekämpfen. Die vorliegende Erfindung zeigt, dass die Herabregulierung der natürlichen hsp60 Autoimmunität bei der Vermeidung einer Transplantatabstoßung nützlich ist.

[0066] Nach der vollständigen Beschreibung dieser Erfindung ergibt es sich für die Fachwelt, dass diese innerhalb eines großen Bereichs äquivalenter Parameter, Konzentrationen oder Bedingungen verwirklicht werden kann, ohne sich von dem Gedanken und Schutzbereich der Erfindung zu entfernen und ohne weitere Experimente.

[0067] Obgleich die Erfindung in Verbindung mit bestimmten Ausführungsbeispielen beschrieben worden ist, versteht es sich, dass weitere Abwandlungen möglich sind. Diese Anmeldung soll verschiedene Variationen, Verwendungen oder Adaptionen der nachfolgenden Erfindungen im Allgemeinen beinhalten, die Prinzipien der Erfindung schließt solche Abweichungen von der vorliegenden Erfindung ein, wie sie allgemein bekannt sind oder allgemeine Praxis sind in dem Stand der Technik, auf den sich die Erfindung bezieht und wesentliche Merkmale, die im Folgenden beschrieben sind und die sich aus dem Schutzbereich der beiliegenden Erfindung ergeben.

[0068] Eine Bezugnahme auf bekannte Verfahrensschritte, übliche Verfahrensschritte, bekannte Verfahren oder übliche Verfahren ist in keiner Weise ein Zugeständnis, das irgendeinen Aspekt, eine Beschreibung oder ein Ausführungsbeispiel der vorliegenden Erfindung in dem relevanten Stand der Technik offenbart, gelehrt oder vorgeschlagen wird.

[0069] Die vorangehende Beschreibung der besonderen Ausführungsbeispiele wird so vollständig durch die allgemeine Natur der Erfindung erfasst, dass andere durch Anwendung der Kenntnisse innerhalb des Standes der Technik (einschließlich des Inhalts der hier zitierten Druckschriften) die Erfindung modifizieren und/oder für verschiedene Anwendungen adaptieren können. Für bestimmte Anwendungen in solchen Ausführungsbeispielen ohne erhebliche Versuche, ohne sich von dem allgemeinen Konzept der vorliegenden Erfindung zu lösen. Solche Adaptionen und Modifikationen sollen innerhalb der Bedeutung und des Bereiches der Äquivalente der offenbarten Ausführungsbeispiele, basierend auf der Lehre und der Anleitung, die hier präsentiert ist, sein. Es versteht sich, dass die Phrasen oder die Terminologie hier nur zur Erläuterung und nicht zur Einschränkung dient, so dass die Terminologie oder Ausdrucksweise der vorliegenden Beschreibung durch den Fachmann im Lichte der Lehre und der Führung, die hier präsentiert worden ist, in Kombination mit der Kenntnis des Fachmanns zu interpretieren ist.

Literaturverzeichnis:

- [0070] Abas, A. K. et al., eds., "Cellular and Molecular Immunology", 2nd ed. W. B. Saunders Co., pp. 239–260 (1994).
 Birk et al. Opin. Immunol. 5: 903–909 (1993).
 Birk et al. J. Autoimm. 9: 159–166 (1996a).
 Birk et al. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 93: 1032–1037 (1996b).
 Boog, C. J. et al. J. Exp. Med. 175: 1805–1810 (1992).
 Cohen, I. R. Annu. Rev. Immunol. 9: 576–589 (1991).
 Cohen, I. R. Immunol. Today 13: 441–444 (1992a).
 Cohen, I. R. Immunol. Today 13: 490–494 (1992b).
 Daniel, D. et al. Proc. Natl Acad Sci (USA) 93: 956–960 (1996).
 Elias, D. et al. Proc. Natl Acad Sci (USA) 87: 1576–80 (1990).
 Elias, D. et al. Proc. Natl Acad Sci (USA) 88: 3088–3091 (1991).
 Elias, D. et al. Lancet 343: 704–706 (1994).
 Elias, D. et al. Diabetes 44: 1132–1138 (1995).
 Elias, D. et al. Diabetes 45: 1168–1172 (1996).
 Finkelman, F. D. et al. Annu. Rev. Immunol. 8: 303–333 (1990).
 Hogervorst, E. J. M. et al. Intern. Immunol. 4: 719 (1992).
 Kampgen, E. et al. Proc. Natl. Acad. Sc. (USA) 88: 3014–3018 (1991).
 Kaufmann, S. H. E. Immunol. Today 11 129–36 (1990).
 Kaufmann, S. H. E. The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones (1994).
 Konen-Waisman, S. et al. J. Immunol. 5977–5985 (1995).
 Kristiansen, T. et al. J. Biosci. 5 (suppl. 1): 149–155 (1983).
 Lohse, A. W. et al. Eur. J. Immunol. 20 2521–2524 (1990).
 Liblau, R. S. et al. Immunology Today 6: 34–38 (1995).
 Metzler, B. et al. Adv. Exp. Med. Biol. 871B: 1243–1244 (1995).
 Metzler, B. et al. Ann. N.Y. Acad. Sci. 78: 228–242 (1996).
 Moliterno, R. et al. Transplantation 59: 594 (1995).

Moore, K. V. et al. Ann. Rev. Immunol 11: 165–190 (1993).
 Mor, F. et al. J. Clin. Invest. 90: 2447–2455 (1992).
 Mosmann, T. R. et al. Ann. Rev. Immunol. 7: 145–173 (1989).
 Res et al. Lancet 2: 478–480 (1989).
 Romagnani, S., Ann. Rev. Immunol. 12 227–257 (1994).
 Scott, D. M. et al. Nature 376: 695–698 (1995).
 Selmaj, K. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. 1 USA) 88: 6452–6456 (1991).
 Tian, J. et al. J. Exp. Med. 183: 1561–1567 (1996).
 Towbin, H. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 7: 4350–4354 (1979).
 van Eden, W. et al. Br. J. Rheumatol. 28 Suppl: I-3 (1989).
 Weiner, H. L. et al. Annu. Rev. Immunol. 12: 809–37 (1994).
 Wraith, D. C. et al. Ther. Immunol. 2: 53–58 (1995).
 Young, R. A. et al. Cell 59: 5–8 (1989).

SEQUENCE LISTING

– (1) ALLGEMEINE INFORMATION:

– (i) Anmelder:

(A) NAME : YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO. LTD.

(B) ANSCHRIFT : Postfach 95

(C) STADT : Rehovot

(E) LAND: Israel

(F) POSTLEITZAHL (ZIP): 76100

(G) TELEFON: 011-972-8-470617

(H) TELEFAX: 011-972-8-40739

(A) NAME: Irun R. COHEN

(B) STRASSE: 11 Hankin Street

(C) STADT: Rehovot

(E) LAND: Israel

(F) POSTLEITZAHL (ZIP) 76354

(A) NAME: Ohad Birk

(B) STRASSE: 1631 East Jefferson Street

(C) STADT: Rockville

(D) BUNDESSTAAT: Maryland

(E) LAND: USA

(F) POSTLEITZAHL (ZIP) 20852

– (ii) Titel der Erfindung : Senkung der Heftigkeit einer Host-versus-Graft-Reaktion durch Unterdrückung der HSP60 Autoimmunität

– (iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 11

– (iv) Korrespondenzadresse:

(A) ADRESSAT: Browdy and Neimark, PLLC.

(B) ANSCHRIFT: 419 Seventh Street, NW, Suite 300

(C) STADT: Washington

(D) Bundesstaat: DC

(E) LAND: USA

(F) POSTLEITZAHL (ZIP): 20004

– (v) Computerlesbare Datei:

(A) MEDIUM: FLOPPY

(B) Computer: PC

(C) Betriebssystem: PC/MS-DOS

(D) Software: PatentEPO Release. 1.0, Vers. 1.30

– (vi) Anmeldungsdaten:

(A) ANMELDENUMMER: PCT/US 97/15294

(B) ANMELDEDATUM: 02. Sept. 1997

– (vii) Prioritätsanmeldungsdaten:

(A) ANMELDENUMMER: US 08/706,209

(B) ANMELDEDATUM: 30. Aug. 1996

– (viii) Anwaltsinformation:

(A) NAME: Browdy, Roger L.

(B) Reg. Nr.: 25,618

(C) Ref. Nr.: COHEN = 32PCT

– (ix) Telekommunikationsinformation:

(A) Tel: 202-628-5197

(B) Fax: 202-737-3528

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 573 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäuren

(C) STRANDEDNESS: einzel

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

Met Leu Arg Leu Pro Thr Val Phe Arg Gln Met Arg Pro Val Ser Arg
 1 5 10 15
 Val Leu Ala Pro His Leu Thr Arg Ala Tyr Ala Lys Asp Val Lys Phe
 20 25 30
 Gly Ala Asp Ala Arg Ala Leu Met Leu Gln Gly Val Asp Leu Leu Ala
 35 40 45
 Asp Ala Val Ala Val Thr Met Gly Pro Lys Gly Arg Thr Val Ile Ile
 50 55 60
 Glu Gln Gly Trp Gly Ser Pro Lys Val Thr Lys Asp Gly Val Thr Val
 65 70 75 80
 Ala Lys Ser Ile Asp Leu Lys Asp Lys Tyr Lys Asn Ile Gly Ala Lys
 85 90 95
 Leu Val Gln Asp Val Ala Asn Asn Thr Asn Glu Glu Ala Gly Asp Gly
 100 105 110
 Thr Thr Thr Ala Thr Val Leu Ala Arg Ser Ile Ala Lys Glu Gly Phe
 115 120 125
 Glu Lys Ile Ser Lys Gly Ala Asn Pro Val Glu Ile Arg Arg Gly Val
 130 135 140
 Met Leu Ala Val Asp Ala Val Ile Ala Glu Leu Lys Lys Gln Ser Lys
 145 150 155 160
 Pro Val Thr Thr Pro Glu Glu Ile Ala Gln Val Ala Thr Ile Ser Ala
 165 170 175
 Asn Gly Asp Lys Glu Ile Gly Asn Ile Ile Ser Asp Ala Met Lys Lys
 180 185 190
 Val Gly Arg Lys Gly Val Ile Thr Val Lys Asp Gly Lys Thr Leu Asn
 195 200 205
 Asp Glu Leu Glu Ile Ile Glu Gly Met Lys Phe Asp Arg Gly Tyr Ile
 210 215 220
 Ser Pro Tyr Phe Ile Asn Thr Ser Lys Gly Gln Lys Cys Glu Phe Gln
 225 230 235 240
 Asp Ala Tyr Val Leu Leu Ser Glu Lys Lys Ile Ser Ser Ile Gln Ser
 245 250 255
 Ile Val Pro Ala Leu Glu Ile Ala Asn Ala His Arg Lys Pro Leu Val
 260 265 270
 Ile Ile Ala Glu Asp Val Asp Gly Glu Ala Leu Ser Thr Leu Val Leu
 275 280 285
 Asn Arg Leu Lys Val Gly Leu Gln Val Val Ala Val Lys Ala Pro Gly
 290 295 300
 Phe Gly Asp Asn Arg Lys Asn Gln Leu Lys Asp Met Ala Ile Ala Thr
 305 310 315 320
 Gly Gly Ala Val Phe Gly Glu Glu Gly Leu Thr Leu Asn Leu Glu Asp
 325 330 335
 Val Gln Pro His Asp Leu Gly Lys Val Gly Glu Val Ile Val Thr Lys
 340 345 350
 Asp Asp Ala Met Leu Leu Lys Gly Lys Gly Asp Lys Ala Gln Ile Glu
 355 360 365

```

Lys Arg Ile Gln Glu Ile Ile Glu Gln Leu Asp Val Thr Thr Ser Glu
 370                               375                               380

Tyr Glu Lys Glu Lys Leu Asn Glu Arg Leu Ala Lys Leu Ser Asp Gly
385                               390                               395                               400

Val Ala Val Leu Lys Val Gly Gly Thr Ser Asp Val Glu Val Asn Glu
                               405                               410                               415

Lys Lys Asp Arg Val Thr Asp Ala Leu Asn Ala Thr Arg Ala Ala Val
                               420                               425                               430

Glu Glu Gly Ile Val Leu Gly Gly Gly Cys Ala Leu Leu Arg Cys Ile
435                               440                               445

Pro Ala Leu Asp Ser Leu Thr Pro Ala Asn Glu Asp Gln Lys Ile Gly
450                               455                               460

Ile Glu Ile Ile Lys Arg Thr Leu Lys Ile Pro Ala Met Thr Ile Ala
465                               470                               475                               480

Lys Asn Ala Gly Val Glu Gly Ser Leu Ile Val Glu Lys Ile Met Gln
                               485                               490                               495

Ser Ser Ser Glu Val Gly Tyr Asp Ala Met Ala Gly Asp Phe Val Asn
                               500                               505                               510

Met Val Glu Lys Gly Ile Ile Asp Pro Thr Lys Val Val Arg Thr Ala
515                               520                               525

Leu Leu Asp Ala Ala Gly Val Ala Ser Leu Leu Thr Thr Ala Glu Val
530                               535                               540

Val Val Thr Glu Ile Pro Lys Glu Glu Lys Asp Pro Gly Met Gly Ala
545                               550                               555                               560

Met Gly Gly Met Gly Gly Gly Met Gly Gly Gly Met Phe
                               565                               570

```

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 24 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(C) STRANDEDNESS: einzel

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

```

Val Leu Gly Gly Gly Cys Ala Leu Leu Arg Cys Ile Pro Ala Leu Asp
1           5           10           15
Ser Leu Lys Pro Ala Asn Glu Asp
                20

```

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 24 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(C) STRANDEDNESS: einzel

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3

Val Leu Gly Gly Gly Val Ala Leu Leu Arg Cys Ile Pro Ala Leu Asp
 1 5 10 15
 Ser Leu Thr Pro Ala Asn Glu Asp
 20

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 24 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(C) STRANDEDNESS: einzel

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

Val Leu Gly Gly Gly Val Ala Leu Leu Arg Cys Ile Pro Ala Leu Asp
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Pro Ala Asn Glu Asp
 20

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 24 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(C) STRANDEDNESS: einzel

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

Val Leu Gly Gly Gly Cys Ala Leu Leu Arg Val Ile Pro Ala Leu Asp
 1 5 10 15
 Ser Leu Thr Pro Ala Asn Glu Asp
 20

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 24 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(C) STRANDEDNESS: einzel

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

Val Leu Gly Gly Gly Cys Ala Leu Leu Arg Val Ile Pro Ala Leu Asp
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Pro Ala Asn Glu Asp
 20

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO: 7:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 24 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(C) STRANDEDNESS: einzel

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

Val Leu Gly Gly Gly Val Ala Leu Leu Arg Val Ile Pro Ala Leu Asp
 1 5 10 15
 Ser Leu Thr Pro Ala Asn Glu Asp
 20

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO: 8:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 24 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(C) STRANDEDNESS: einzel

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

Val Leu Gly Gly Gly Val Ala Leu Leu Arg Val Ile Pro Ala Leu Asp
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Pro Ala Asn Glu Asp
 20

2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO: 9:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 20 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(C) STRANDEDNESS: einzel

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

Glu Glu Ile Ala Gln Val Ala Thr Ile Ser Ala Asn Gly Asp Lys Asp
 1 5 10 15
 Ile Gly Asn Ile
 20

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO: 10:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 18 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(C) STRANDEDNESS: einzel

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:

Pro Gly Met Gly Ala Met Gly Gly Met Gly Gly Gly Met Gly Gly Gly
 1 5 10 15
 Met Phe

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO: 11:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 20 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(C) STRANDEDNESS: einzel

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11:

Glu	Glu	Ile	Ala	Gln	Val	Ala	Thr	Ile	Ser	Ala	Asn	Gly	Asp	Lys	Asp
1			5					10					15		
Ile	Gly	Asn	Ile												
			20												

Patentansprüche

1. Verwendung einer Verbindung, die im Stande ist, die hsp60-Autoimmunität herunterzuregulieren, zum Herstellen einer pharmazeutischen Zusammensetzung zum Verringern der Heftigkeit einer Wirt-Transplantat-Reaktion in Verbindung mit der Transplantation eines Spenderorgans oder -gewebes in einen Wirt.

2. Verwendung nach Anspruch 1, wobei die Zusammensetzung einen tolerogenen Träger oder einen biologisch aktiven Träger, der im Stande ist, eine TH1 → TH2-Verschiebung zu vermitteln, und die Verbindung, die im Stande ist, die hsp60-Autoimmunität herunterzuregulieren, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus hsp60, hsp60-Peptiden und Analoga, Salzen und funktionellen Derivaten davon, umfasst.

3. Verwendung nach Anspruch 2, wobei die Verbindung ausgewählt ist aus der Gruppe von hsp60-Peptiden, bestehend aus solchen mit den folgenden Aminosäureresten von SEQ ID NO: 1 entsprechenden Sequenz: Reste 31–50, Reste 136–155, Reste 151–170, Reste 166–185, Reste 195–214, Reste 255–274, Reste 286–305, Reste 346–365, Reste 421–440, Reste 436–455, Reste 437–460, Reste 466–485, Reste 511–530, Reste 343–366, und Reste 458–474, und Salzen und funktionellen Derivaten davon.

4. Verwendung nach Anspruch 3, wobei die Verbindung die Sequenz aufweist, die den Resten 437 bis 460 von SEQ ID NO: 1 entspricht.

5. Verwendung nach Anspruch 3, wobei die Verbindung die Sequenz aufweist, die den Resten 166 bis 185 von SEQ ID NO: 1 entspricht.

6. Verwendung nach Anspruch 3, wobei die Verbindung die Sequenz aufweist, die den Resten 466 bis 485 von SEQ ID NO: 1 entspricht.

7. Verwendung nach Anspruch 2, wobei die Verbindung ein hsp60-Peptidanalogen ist, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Peptiden mit der Sequenz von SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 und SEQ ID NO: 8.

8. Verwendung nach Anspruch 2, wobei der biologisch aktive Träger eine Fettemulsion ist, umfassend:
 10–20% Triglyceride pflanzlicher und/oder tierischer Herkunft;
 1,2–2,4% Phospholipide pflanzlicher und/oder tierischer Herkunft;
 2,25–4,5% Osmoregulator;
 0–0,05% Antioxidationsmittel; und
 steriles Wasser.

9. Verwendung nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die pharmazeutische Zusammensetzung vor einer Transplantation eines Spenderorgans oder -gewebes oral, intranasal, intravenös, intramuskulär oder subkutan an den Wirt verabreicht werden soll.

10. Verwendung von aktivierten T-Zellen, die im Stande sind, die hsp60-Autoimmunität herunterzuregulieren, zum Herstellen einer pharmazeutischen Zusammensetzung zum Verringern der Heftigkeit einer Wirt-Transplantat-Reaktion in Verbindung mit der Transplantation eines Spenderorgans oder -gewebes in einen Wirt, wobei die T-Zellen in vitro mit hsp60-Protein, hsp60-Peptiden oder Peptidanaloga, Salzen und funktionellen Derivaten davon aktiviert worden sind.

11. Verfahren zum Auswählen eines hsp60-Peptids zur Verwendung bei der Verhütung oder Unterdrückung einer Transplantatabstoßung, umfassend die Schritte:
 Inkontaktbringen einer Reihe individueller hsp60-Peptide oder Analoga mit Antigen-präsentierenden Zellen von peripheren Blutlymphozyten, die aus dem Blut eines Individuums isoliert werden, das ein Kandidat für eine Organ- oder Gewebetransplantation ist, wobei die Peptide nachweisbar markiert sind;

Nachweisen von Peptiden, die an die Antigen-präsentierenden Zellen gebunden sind;
Auswählen von einem oder mehreren Peptiden, die im Stande sind, an die Antigen-präsentierenden Zellen zu binden.

12. Verwendung nach Anspruch 1, wobei die Verbindung ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus hsp60, hsp60-Peptiden und Analoga, Salzen und funktionellen Derivaten davon.

13. Verwendung nach Anspruch 12 zum Verringern der Heftigkeit einer Wirt-Transplantat-Reaktion bei einer Organtransplantation.

Es folgen 4 Blatt Zeichnungen

FIG. 1

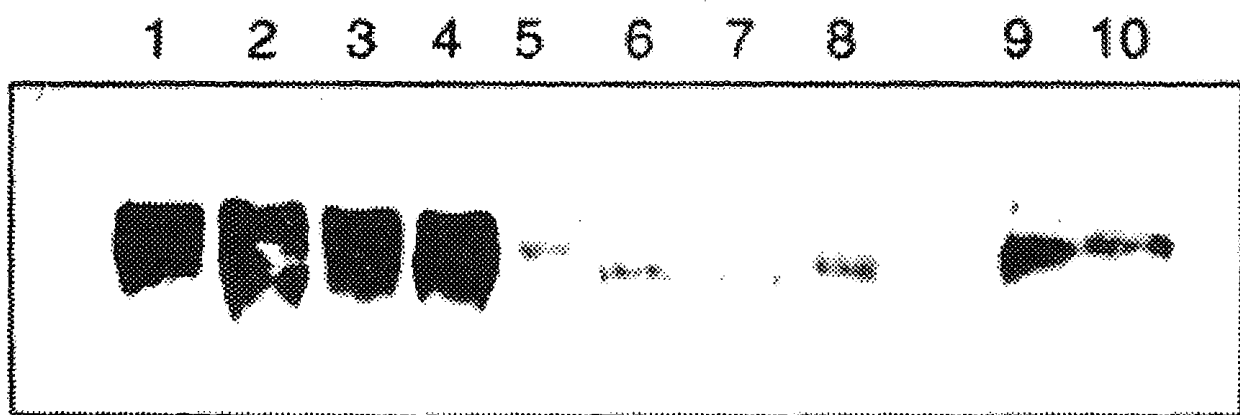


FIG. 2A

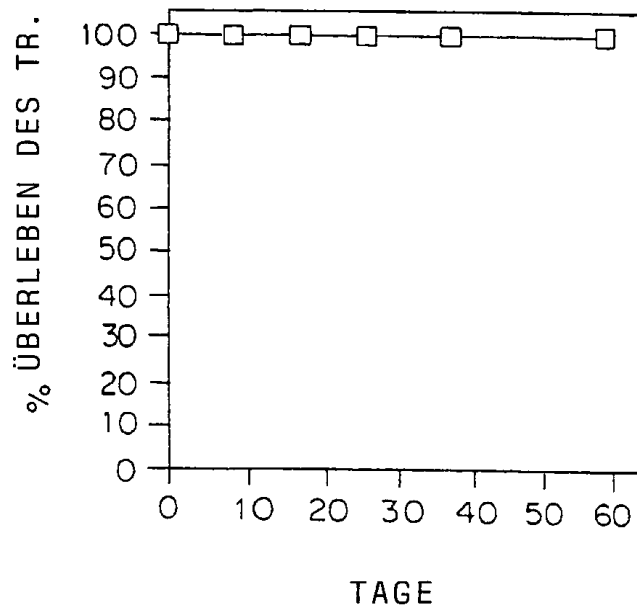


FIG. 2B

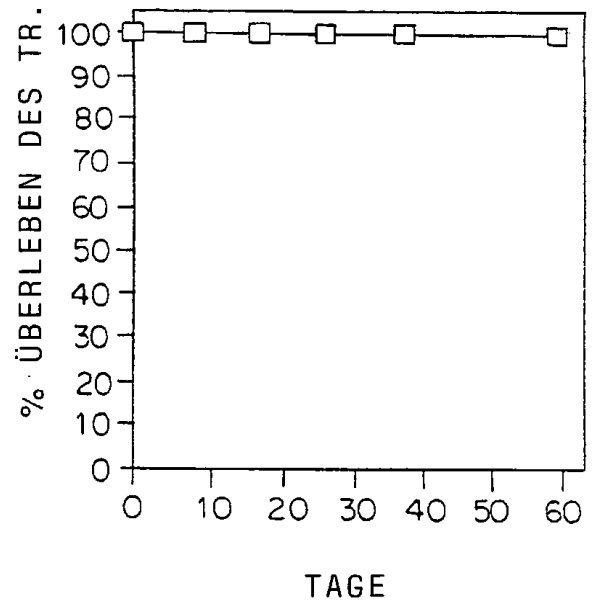


FIG. 2C

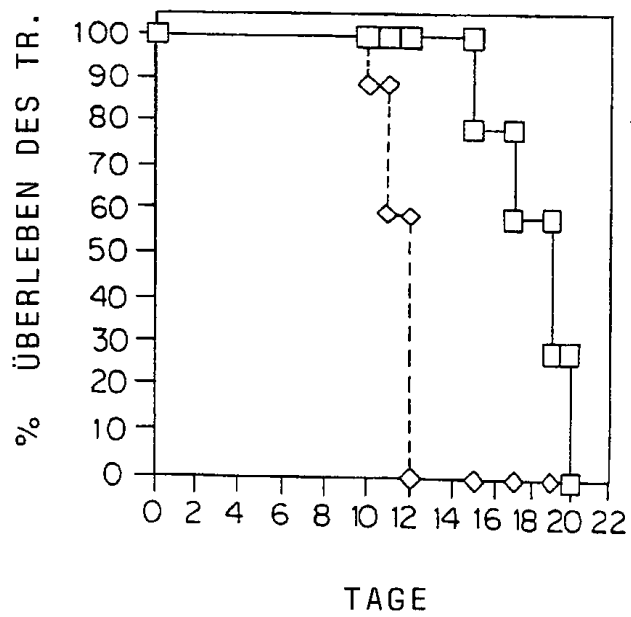


FIG. 2D

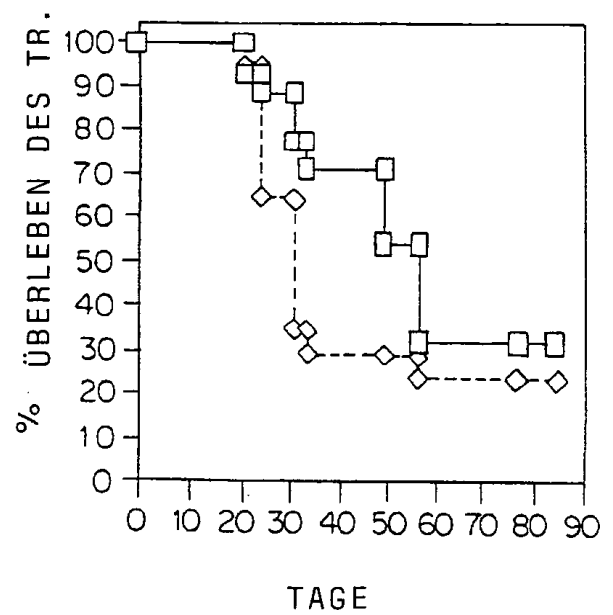


FIG. 2E

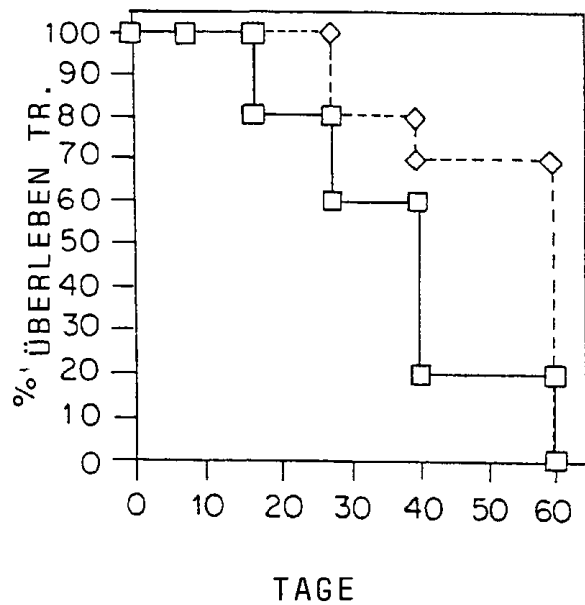


FIG. 2F

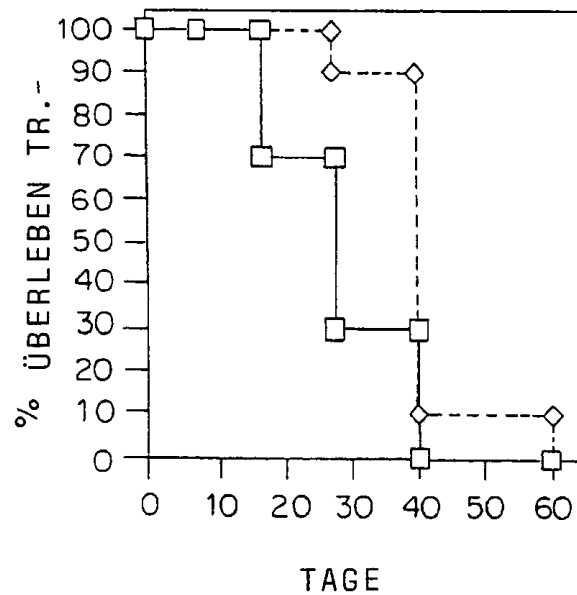


FIG. 3A

EMPFÄNGER: C57 BI/6
SPENDER: BALB/c

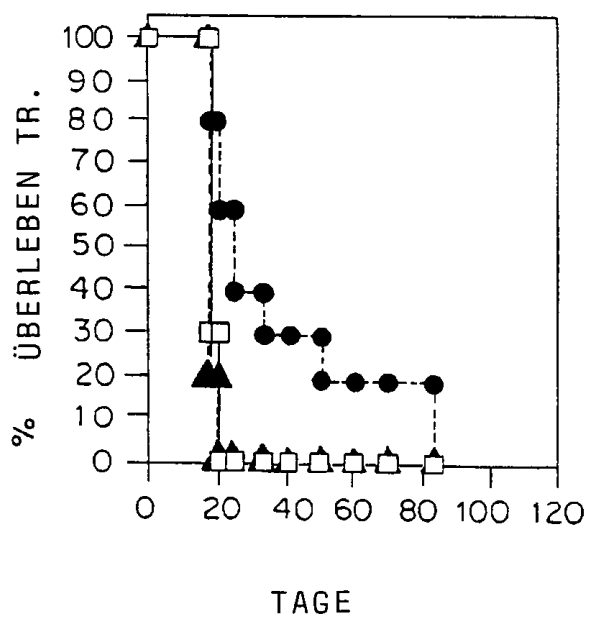


FIG. 3B

EMPFÄGER: NOD
SPENDER: BALB/c

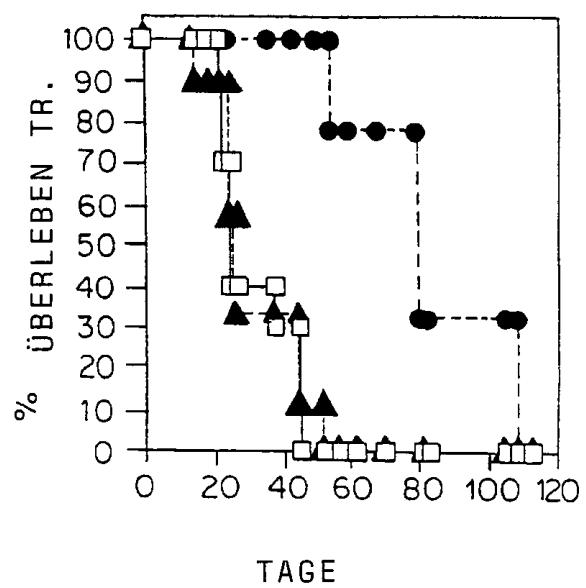


FIG. 4

