

(19)



REPUBLIK
ÖSTERREICH
Patentamt

(10) Nummer: **AT 412 241 B**

(12)

PATENTSCHRIFT

(21) Anmeldenummer: A 429/2003
(22) Anmeldetag: 18.03.2003
(42) Beginn der Patentdauer: 15.04.2004
(45) Ausgabetag: 25.11.2004

(51) Int. Cl.⁷: **G01N 33/50**
G01N 33/53, //C07K 14/475

(56) Entgegenhaltungen:

R. YOSHIMURA ET AL., "HEPATOCTE GROWTH FACTOR (HGF) AS A RAPID DIAGNOSTIC MARKER AND ITS POTENTIAL IN THE PREVENTION OF ACUTE RENAL REJECTION", TRANSPL. INT., 15, 2002, SEITEN 156-162;
H. KOMAI ET AL., "PLASMA HEPATOCTE GROWTH FACTOR LEVELS AFTER OPEN HEART SURGERY FOR CONGENITAL HEART DISCASE", J. CARDIOVASC. SURG., 43, 2002, SEITEN 799-802;

(73) Patentinhaber:

AHARINEJAD SEYEDHOSSEIN DR.
A-1130 WIEN (AT).

(54) VERFAHREN ZUR DETEKTION VON ABSTOSSUNGSREAKTIONEN NACH LUNGENTRANSPLANTATIONEN

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Diagnostizierung einer Lungentransplantat-Abstoßung, welches das Bestimmen der Menge des Hepatozyten-Wachstums-Faktors (HGF) in einer Körperflüssigkeit oder Gewebeprobe eines Patienten, der einer Lungentransplantation unterzogen wurde, umfasst.

AT 412 241 B

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Diagnostizierung einer Lungentransplantat-Abstoßung.

Seit ihren Anfängen (1) wurden gewaltige Fortschritte bei der Lungentransplantation (2-4) gemacht. Derzeit sind chronische obstruktive Lungenerkrankungen (chronic obstructive pulmonary disease, COPD), einschließlich Emphysem und α -1-Antitrypsin-Mangel-Syndrom, gefolgt von zystischer Fibrose, idiopathischer pulmonaler Fibrose und primärer pulmonaler Hypertonie, die häufigsten Indikationen für eine Lungentransplantation (3-5). Die wichtigsten Ursachen für die Morbidität und Mortalität bei einer Lungentransplantation ist das primäre Transplantat-Versagen, Infektion und akute und chronische Abstoßung (4). Überwachungsprotokolle mit transbronchialer Lungenbiopsie (TBB) zeigten, dass die meisten Transplantat-Empfänger mindestens eine Episode einer akuten Abstoßung erfahren, deren Auftreten in den ersten 100 Tagen nach der Transplantation am häufigsten ist (4, 6, 7).

Klinische Kriterien alleine sind zur Diagnostizierung einer Abstoßung ungenau. TBB kann eine Transplantat-Abstoßung diagnostizieren, ist jedoch invasiv und für eine wiederholte Durchführung unbrauchbar (7). Ein Übersehen einer frühen Abstoßung erhöht die Morbidität und Mortalität und hat zur Suche nach Markern für die Abstoßung geführt. Ein idealer Marker sollte a) nicht-invasiv erhalten werden, b) wiederholt verwendbar sein, c) empfindlich sein, d) leicht und rasch durchgeführt werden und e) kostengünstig sein. Ein serologischer Marker würde diesen Kriterien am besten entsprechen und könnte klinische Parameter (7) ergänzen, um eine Transplantat-Abstoßung genauer und rascher zu erkennen. Serum-Adhäsions-Moleküle und broncho-alveoläre Lavage(BAL)-Marker erwiesen sich als enttäuschende Marker (8, 9, 10), und keines davon wurde zu einem Standard-Test.

Offensichtlich besteht ein Bedarf an einem solchen Marker für eine einfache und verlässliche Diagnose einer Lungentransplantat-Abstoßung. Es ist daher ein Ziel der vorliegenden Erfindung, einen solchen geeigneten Marker vorzusehen. Das Test-System sollte auch einen frühen Nachweis einer Transplantat-Abstoßung ermöglichen.

Daher sieht die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Diagnostizierung einer Abstoßung eines Lungentransplantats vor, umfassend die Bestimmung der Menge eines Hepatozyten-Wachstums-Faktors (HGF) in einer Körperflüssigkeit oder Gewebeprobe von Patienten, die einer Lungentransplantation unterzogen wurden. Es zeigte sich mit der vorliegenden Erfindung, dass ein beträchtlich erhöhter HGF-Spiegel bei solchen Patienten ein Indikator für eine Lungentransplantat-Abstoßung ist. Die vorliegende Erfindung sieht ein rasches und verlässliches Werkzeug für die Diagnostizierung einer Lungentransplantat-Abstoßung selbst in einer sehr frühen post-operativen Phase vor (z.B. schon am Tag 2 oder 3), was eine rasche Verabreichung einer adäquaten Therapie (z.B. einer Steroid-Therapie) ermöglicht, um ein Transplantat-Versagen, welches zu einer erneuten Transplantation oder zum Tod des Patienten führen kann, zu verhindern. Es ist besonders die Möglichkeit eines frühen Beginns beispielsweise einer Steroid-Therapie, die einen Hauptvorteil der vorliegenden Erfindung darstellt, da die Erfolgsrate einer solchen Steroid-Therapie wesentlich vom (frühen) Zeitpunkt der Therapie abhängt. Außerdem kann mit der vorliegenden Erfindung eine Diagnostizierung unter Verwendung weiterer invasiver oder chirurgischer Schritte (wie TBB) vermieden werden. Außerdem kann die vorliegende Erfindung zur einfachen Überwachung von Lungentransplantations-Patienten dienen, wenn man bedenkt, dass Routine-Serum-Tests wiederholt an diesen Patienten während ihres post-operativen Spitalsaufenthalts sowie zu Kontroll-Zeitpunkten (zur Messung von Parametern wie Blut-Gasen, Nieren- und Leber-Enzymen, usw.) durchgeführt werden. Daher sind die HGF-Mengen in diesen Serum-Proben leicht detektierbar.

Das Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung umfasst im Allgemeinen bei einer Standard-Vorgangsweise die Schritte:

- Vorsehen einer Körperflüssigkeit oder Gewebeprobe, die von einem Patienten nach einer Lungentransplantation erhalten wurde,
- Bestimmen der HGF-Menge in diesen Proben,
- Vergleichen der ermittelten Menge des Post-Transplantations-HGF mit einer Standard-HGF-Menge und
- Diagnostizieren einer Lungentransplantat-Abstoßung, wenn die ermittelte Menge des Post-Transplantations-HGF wesentlich erhöht ist und daher ein Indikator für ein solches Ereignis ist.

HGF wurde erstmals im Plasma von teilweise hepatektomierten Ratten (11) nachgewiesen; und später aus Humanplasma und Lungen-Fibroblasten (12, 13) gereinigt. Zusätzlich zu seiner Rolle bei der Regenerierung einer verletzten Lunge (14) wirkt HGF auch in anderen Organen, und jüngste Studien an Tieren zeigen, dass er ein empfindliches Maß für eine Nierenabstoßung sein könnte (15, 16). Klinische Daten, die im Laufe der vorliegenden Erfindung geliefert wurden (siehe „Vergleichsbeispiel“ im Beispiel-Teil), zeigen, dass HGF-Mengen nicht zur Vorhersage und Analyse einer Nierentransplantat-Abstoßung beim Menschen verwendet werden können. Die Rolle von HGF als Marker bei Menschen für Nieren oder für andere Organe, wie die Lunge, war daher völlig unvorhersehbar. Überraschenderweise erwies sich HGF als ein geeigneter und verlässlicher Marker für eine (frühe und späte) Lungentransplantat-Abstoßung.

Die Körperflüssigkeit oder Gewebeprobe, in welcher die HGF-Menge gemäß der vorliegenden Erfindung ermittelt wird, kann aus jeder Quelle stammen, in welcher der erhöhte HGF-Spiegel ein Indikator für eine Lungentransplantat-Abstoßung ist, z.B. Quellen, die ausgewählt sind aus der Gruppe umfassend Serum, Plasma, Blut, Transsudate, Lungen- oder Bronchien-Drainagen oder Lavagen, Sputum, Harn, an die Lunge angrenzendes Gewebe und Lungengewebe. Da das Erhalten von Gewebeproben mit den Nachteilen verbunden sein kann, die für die derzeit verwendeten Methoden (TBB) bekannt sind, sind nicht-invasive Methoden zur Entnahme von Proben vom Patienten, die die invasive (operative) Belastung für die Lungen umgehen, bevorzugt: Serum, Plasma, Blut, Transsudate in intra-operativ implantierten Drains, Lunge- oder Bronchial-Lavagen und Sputum.

Vorzugsweise umfasst das Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung die folgenden Schritte:

- Vorsehen einer Körperflüssigkeit oder Gewebeprobe von einem Patienten, der einer Lungentransplantation unterzogen wurde,
- Bestimmen der HGF-Menge in dieser Körperflüssigkeit oder Gewebeprobe,
- Vergleichen, ob die ermittelte HGF-Menge im Vergleich zur HGF-Menge bei Patienten ohne Lungentransplantat-Abstoßung erhöht ist, und
- a) Diagnostizieren einer Lungentransplantat-Abstoßung, wenn die ermittelte HGF-Menge im Vergleich zur HGF-Menge bei Patienten ohne Lungentransplantat-Abstoßung erhöht ist, oder
- b) Nicht-Diagnostizieren einer Lungentransplantat-Abstoßung, wenn die ermittelte HGF-Menge nicht erhöht ist im Vergleich zur HGF-Menge bei Patienten ohne Lungentransplantat-Abstoßung.

Die Art, auf welche die HGF-Menge in der Probe ermittelt wird, ist nicht von kritischer Bedeutung; aus medizinischen Gründen muss eine solche Bestimmung standardisiert sein. Bevorzugte Methoden oder Mittel sind ausgewählt aus der Gruppe ELISA, RIA, Massenspektroskopie, Affinitäts-Chromatographie, Strömungs-Zytometrie, Protein-Mikroarrays, fluoreszierende Antikörper, HGF-bindende Substanzen, insbesondere monoklonale und polyklonale HGF-Antikörper oder HGF-Rezeptoren, immunohistochemische Methoden, Immunfällung, Western Blot, Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET), cDNA-Array und Nukleinsäure-Amplifikationsmethoden (die letztere natürlich nur für Gewebeproben, wobei erhöhte HGF-mRNA ein Indikator für Lungentransplantat-Reaktionen sein kann).

Die erhöhte HGF-Menge, die gemäß der vorliegenden Erfindung ein Indikator für eine Lungentransplantat-Abstoßung sein kann, kann vorzugsweise mit mindestens einem der Folgenden bestätigt werden:

- die ermittelte HGF-Menge beträgt mindestens 400%, vorzugsweise mindestens 500%, insbesondere mindestens 600%, des mittleren Grundlinien-Niveaus von HGF bei gesunden Kontrollen,
- die ermittelte HGF-Menge beträgt mindestens 200%, vorzugsweise mindestens 300%, insbesondere mindestens 350%, des mittleren Grundlinien-Niveaus von HGF bei Patienten vor einer Lungentransplantation,
- die ermittelte HGF-Menge beträgt mindestens 200%, vorzugsweise mindestens 300%, insbesondere mindestens 350%, des mittleren Grundlinien-Niveaus von HGF bei Patienten am Tag 3 oder später nach einer Lungentransplantation ohne Vorkommnisse, insbesondere ohne Transplantat-Abstoßung und/oder ohne Infektion.

Je nach der Art der Messung der HGF-Menge, der Patienten- oder Gruppen-Probe oder der Quelle der Probe, können bei solchen Vergleichs-Mengen an HGF, die „keine Transplantat-Abstoßung“ bedeuten, die absoluten und relativen Werte jedoch unterschiedlich sein; HGF erwies sich jedoch als ein ausgezeichneter und signifikanter Marker, so dass der Fachspezialist auf dem Gebiet die Lehre der vorliegenden Beschreibung leicht anwenden kann, um festzustellen, ob eine HGF-Menge beim Transplantations-Patienten erhöht ist oder nicht.

Beispielsweise können die oben erwähnten mittleren Grundlinien-Spiegel in den folgenden Bereichen (im Serum) vorliegen: mittlerer HGF-Grundlinien-Spiegel bei gesunden Kontrollen; zwischen 300 und 900 pg/ml Serum;

mittlerer HGF-Grundlinien-Spiegel bei Patienten vor Lungentransplantation: zwischen 900 und 1600 pg/ml Serum;

mittlerer HGF-Grundlinien-Spiegel bei Patienten am Tag 3 nach einer Lungentransplantation ohne Vorkommnisse, insbesondere ohne Transplantat-Abstoßung und/oder ohne Infektion: zwischen 800 und 1500 pg/ml Serum.

In absoluten Werten (die auch stark von der HGF-Bestimmungsmethode abhängen), kann eine erhöhte HGF-Menge, die ein Indikator für eine Lungentransplantat-Abstoßung ist, vorzugsweise durch einen Serum-Spiegel, vorzugsweise am Tag 3 (oder später) nach der Lungentransplantation von höher als 2000 pg/ml, vorzugsweise höher als 2300 pg/ml, insbesondere höher als 2500 pg/ml, bestätigt werden. Die Serum-HGF-Spiegel bei Patienten mit Lungentransplantat-Abstoßung können auf zwischen 3000 pg/ml bis 5000 pg/ml oder mehr steigen.

Ein bevorzugtes Verfahren zur Messung von HGF-Mengen ist, die Mengen im selben Patienten vor der Transplantation und danach zu überwachen. Dabei wird eine (geringfügig oder sogar stark) erhöhte Menge an HGF kurz nach der Operation (einige Stunden oder etwa ein bis zwei Tage) beobachtet, die jedoch wieder auf das vor der Operation bestehende Niveau oder sogar darunter geht und dort bleibt, wenn keine Abstoßungsreaktionen vorkommen. Ein signifikanter post-operativer Anstieg der HGF-Mengen oder ein Fehlen der post-operativen Verringerung ist ein Indikator für eine Abstoßungsreaktion; ein geringfügiger Anstieg am Tag 3 oder danach kann eine Infektion anzeigen.

Gemäß einem weiteren Aspekt sieht die vorliegende Erfindung die Verwendung von HGF bindenden Substanzen vor, um die Menge an HGF in einer Körperflüssigkeit oder in einer Gewebeprobe, die von einem einer Lungentransplantation unterzogenen Patienten stammt, zu messen. Eine HGF bindende Substanz kann jede Substanz sein, die eine spezifische Affinität zu HGF zeigt, durch welche eine HGF-Bestimmung ermöglicht wird, wie HGF-Antikörper (natürlich einschließlich aller Fragmente und Derivate davon, die dieselbe Spezifität aufweisen) oder HGF-Rezeptoren.

Gemäß einem anderen Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung weiters ein Set zur Diagnostizierung einer Lungentransplantat-Abstoßung, umfassend

- einen Probenbehälter mit einer Körperflüssigkeit oder einer Gewebeprobe eines einer Lungentransplantation unterzogenen Patienten, und
- Mittel zum Bestimmen der HGF-Menge in der Probe,
- oder die Verwendung eines Sets zur Bestimmung der HGF-Menge zur Diagnostizierung einer Lungentransplantat-Abstoßung.

Das Set gemäß der vorliegenden Erfindung umfasst weiters HGF-Vergleichs-Präparate, die eine bestimmte Menge an HGF enthalten, z.B. Plasma-Proben, HGF-Konzentrations-Reihen, HGF-Eichkurven usw.

Vorzugsweise ist das Set gemäß der vorliegenden Erfindung in Form einer (Mikro-)Platte, eines Biochips, einer Membran vorgesehen, d.h. wo das Mittel zum Bestimmen der HGF-Menge eine (Mikro-)Platte, einen Biochip oder eine Membran umfasst, wobei beispielsweise HGF-einfangende Moleküle und/oder HGF (Standards) an einer festen Oberfläche immobilisiert sind.

Die vorliegende Erfindung wird durch die folgenden Beispiele und die Zeichnungsfiguren weiter veranschaulicht, ohne jedoch auf diese eingeschränkt zu sein.

Beschreibung der Figuren:

Fig. 1: Mittlere HGF-Serum-Spiegel bei Kontrollen, und bei Patienten mit COPD, cystischer Fibrose (CF) und idiopathischer Lungenfibrose (LF) vor der Transplantation (prä-OP). Die HGF-Spiegel sind bei allen Patientengruppen erhöht, jedoch nicht signifikant verschieden im Vergleich zu Kontrollen.

Fig. 2: Mittlere HGF-Serum-Spiegel bei Kontrollen, Patienten vor der Transplantation (prä-OP) und bei Patienten ohne Vorkommnisse bis zu 24 Wochen nach der Transplantation. Die mittleren Serum-HGF-Spiegel bei Patienten ohne Vorkommnisse stiegen am ersten und zweiten postoperativen Tag gegenüber den Kontrollen signifikant an, nahmen ab und blieben stabil auf einem Niveau, das sich von den Kontrollen nicht signifikant unterschied. (d) Tage und (w) Wochen nach einer Transplantation. * signifikant unterschiedlich gegenüber den Spiegeln der Kontrollen ($p < 0,01$); † signifikant unterschiedlich gegenüber prä-Transplantations-Spiegeln ($p < 0,05$).

Fig. 3: Mittlere HGF-Serum-Spiegel bei Kontrollen, bei Patienten vor einer Transplantation (prä-OP), bei Patienten nach einer Transplantation ohne Vorkommnisse (kein Vorkommnis), bei Patienten mit einer Abstoßung vor einer Behandlung (Abstoßung), bei Patienten mit einer Abstoßung am Ende der Steroid-Behandlung (Abstoßung CTRL), bei Patienten mit einer Infektion vor der Behandlung (Infektion) und bei Patienten mit einer Infektion am Ende der Behandlung (Infektion CTRL). Die HGF-Spiegel stiegen bei der Abstoßung im Vergleich zu allen Gruppen signifikant an († $p < 0,01$ im Vergleich zu allen Gruppen). * $p < 0,05$ im Vergleich zu Kontrollen.

Fig. 4: Die Graphik zeigt die HGF-Serum-Spiegel bei einem Patienten 4 Tage vor und nachdem eine Transplantat-Abstoßung (■) klinisch diagnostiziert wurde (↓, Tag 0). Die Serum-Spiegel bei einem Patienten ohne Vorkommnisse (○) und bei einem Patienten mit einer bakteriellen Infektion (Δ) sind aufgetragen, um die Empfindlichkeit der HGF-Serum-Spiegel zur Voraussage einer Transplantat-Abstoßung zu zeigen. Die Serum-HGF-Spiegel steigen signifikant auf 5000 pg/ml nur beim Patienten mit der Transplantat-Abstoßung einen Tag, bevor die Diagnose klinisch erstellt und durch TBB verifiziert wurde, an.

Fig. 5: Mittlere HGF-Serum-Spiegel bei Kontrollen, bei Patienten nach Nierentransplantations-Operation ohne Vorkommnisse, und bei Patienten mit diagnostizierter Nierentransplantat-Abstoßung. HGF ändert sich nicht bei Patienten mit Abstoßung im Vergleich zu Patienten ohne Vorkommnisse nach einer Transplantation (* $p < 0,05$ im Vergleich zu Kontrollen).

BEISPIELE:

Patienten und Methoden:

Patienten: 86 Patienten, die einer Lungentransplantation unterzogen wurden und die eine informierte Zustimmung zur Teilnahme gaben, wurden in dieser Studie inkludiert. 12 gesunde Freiwillige, die nach Alter und Geschlecht dazu passten, dienten als Kontrolle. In Tabelle 1 sind die demographischen Daten der in der Studie inkludierten Individuen zusammengefasst. Vor und die erste Woche nach der Lungentransplantation wurden täglich Serum-Proben entnommen und codiert, danach alle zwei Tage ab der zweiten bis zur fünften Woche, nachfolgend wöchentlich bis zu 24 Wochen nach der Transplantation. Abstoßungs- und Infektions-Episoden, einschließlich der Behandlungs-Protokolle und einer Zeittafel dieser Vorkommnisse wurden bestimmt (Tabelle 2) und analysiert und mit codierten HGF-Serum-Spiegeln am Ende der Studie korreliert.

Tabelle 1. Anzahl, Alter, Geschlecht und die Diagnose der Patienten und Kontrollen

Diagnose	Patienten (n)	Alter		Geschlecht
		Mittel ± SA	Bereich	
COPD	53	54,3 ± 8,9 a	16-68 a	30M/23W
Zystische Fibrose	17	25,3 ± 11,1 a	12-45 a	6M/11W
Idiopathische Lungenfibrose	16	52,4 ± 10,5 a	36-67 a	8M/8W
Kontrollen	12	29,1 ± 8,9	14-42 a	7M/5W

Tabelle 2. Zeitverlauf der Abstoßungs- und Infektions-Episoden

	Diagnose	Reaktionen					
		Infektion	POD*	Geschlecht	Abstoßung†	POD	Geschlecht
5	COPD	bakteriell, mykotisch	7, 9, 10,	11M/5W	15	4, 5, 8,	11M/4W
12, 16, 19,			11, 14,				
21, 27, 29,			14, 16,				
33, 33, 34,			17, 20,				
34, 38, 40,			21, 21,				
10			41, 44, 54,			32, 46,	
			54, 56, 71,			94, 131	
15			77, 85, 102				
	Zystische Fibrose	bakteriell, mykotisch	7, 7, 12,	3M/6W	4	4, 9,	1M/3W
16, 18, 21,			16, 22				
28, 31, 37,							
40, 51, 52,							
69, 76							
20							
	Idiopathische Lungenfibrose	bakteriell mykotisch	8, 13, 19,	3M/1W	3	11, 18,	2M/1W
24, 25, 34,			20				
41							
25							

30 * Post-operativer Tag; † Anzahl der Abstoßungen

Diagnose und Behandlung der Vorkommnisse: Abstoßung und Infektion wurden auf Basis von TBB, BAL, Brustkorb-Radiographien, Blut-Gasanalyse, Pulmonal-Funktionstests und Leukozytenzählung diagnostiziert. Überwachungs-TBB wurden zum Zeitpunkt 3, 6, 12 und 24 Wochen nach der Transplantation oder bei klinischer Indikation vorgenommen. Eine Abstoßung wurde klinisch diagnostiziert, wenn die Patienten neue radiographische pulmonale Schatten und eine Verschlechterung von Blutgas und Lungenfunktion ohne Anzeichen einer Infektion hatten, und histologisch, wenn TBB einen Abstoßungsgrad 2 oder höher gemäß der Bewertung der Internationalen Gesellschaft für Herz- und Lungen-Transplantation aufwiesen.

Immunosuppressive Behandlung: Während der Operation wurden 500 mg Methylprednisolon vor der Revaskularisierung des Transplantats gegeben und alle 8 h zu 125 mg einen Tag lang zyklisch verabreicht. Prednisolon wurde zu 1 mg/kg/Tag gegeben, beginnend am Tag 2, und im Lauf der ersten Woche auf 0,5 mg/kg/Tag reduziert. Diese Dosis wurde auf 0,15-0,3 mg/kg/Tag im Laufe der folgenden 6 Monate verringert. Antithymozyt-Globulin (Thymoglobulin, Sero-Merieux, Frankreich) wurde als Induktions-Therapie zu 2,5 mg/kg/Tag die ersten 4 Tage lang nach der Transplantation verabreicht. Cyclosporin A (Sandimmun, Novartis, Basel, Schweiz) wurde i.v. begonnen, als der Empfänger nach der Transplantation hämodynamisch stabil war. Die Cyclosporin A-Verabreichung wurde dann auf oral umgestellt und progressiv auf einen Serum-Ziel-Spiegel von 250-350 ng/ml für den ersten Monat eingestellt, und danach auf 200-250 ng/ml. Mycophenolat-Mofetil (Cellcept, Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz) wurde zweimal zu 1 g innerhalb von 24 h nach der Transplantation verabreicht.

HGF-Test: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) für HGF (Quantikine™, R&D Systems, Minneapolis, MN) wurde gemäß dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Ein HGF-monoklonaler Antikörper wurde auf eine Mikroplatte vorbeschichtet, und 100 µl Test-Verdünnungsmittel (gepufferte Protein-Base) wurden in jede Vertiefung zugegeben, gefolgt von 100 µl Standard und der Serum-Probe. Die Vertiefungen wurden 2 h lang bei Raumtemperatur

inkubiert, dann aspiriert und gewaschen. HGF-Antikörper, der mit Meerrettich-Peroxidase (200 ml) konjugiert war, wurde zugegeben und 2 h lang bei Raumtemperatur inkubiert, gefolgt von drei Waschungen. Danach wurden 200 ml Substrat-Lösung (stabilisiertes Wasserstoffperoxid; stabilisiertes Chromogen und Tetramethylbenzidin) in jede Vertiefung zugegeben und 25 min lang bei Raumtemperatur zur Farbentwicklung inkubiert. Die Umsetzung wurde durch Zugabe von 50 ml 2N Schwefelsäure gestoppt. Die optische Dichte wurde bei 450 nm detektiert.

Statistische Analyse: Am Ende der Studie wurde der Schlüssel gebrochen, die klinischen Parameter sowie HGF-Serum-Spiegel wurden über die Zeit aufgetragen und unter Verwendung von ANOVA mit Bonferoni t-Test analysiert. P-Werte < 0,05 wurden als signifikant angesehen.

Ergebnisse:

Der mittlere Serum-HGF-Spiegel war 645 ± 259 pg/ml bei den Kontrollen, und 1425 ± 676 pg/ml, 1376 ± 540 pg/ml und 1239 ± 489 pg/ml bei prä-Transplantations-Patienten mit COPD, zystischer Fibrose bzw. idiopathischer Lungenfibrose (nicht signifikant; Fig. 1). Um zu verstehen, wie HGF-Serum-Spiegel sich nach einer Lungentransplantation verändern, wurden Serum-HGF-Spiegel bei allen Patienten, die nach der Operation keine Vorkommnisse hatten, gegen die Zeit aufgetragen. Der mittlere Serum-HGF-Spiegel stieg bei diesen Patienten auf 2584 ± 548 am ersten Tag nach der Operation ($p < 0,01$ im Vergleich zu Kontrollen; $p < 0,05$ im Vergleich zu prä-Transplantation), verringerte sich kontinuierlich auf 930 ± 537 am Tag 7 (Fig. 2). Außer nicht signifikanten Veränderungen beim Vergleich mit Tag 7 blieben die HGF-Serum-Spiegel stabil und erreichten 1034 ± 267 in der 24. post-operativen Woche (nicht signifikant im Vergleich zu prä-Transplantations-Serum-HGF-Spiegel; Fig. 2). Danach wurden die mittleren Serum-HGF-Spiegel bei transplantierten Patienten mit Abstoßung oder Infektion sowohl vor als auch nach Behandlung mit jenen in allen Gruppen verglichen. Die Serum-HGF-Spiegel stiegen bei Patienten mit Abstoßung signifikant an (3978 ± 1435) im Vergleich zu dessen Spiegel bei Kontrollen, bei prä-Transplantations-Patienten und bei Patienten ohne Vorkommnisse ($p < 0,01$). Nach einer Steroid-Behandlung nahmen die Serum-HGF-Spiegel von Patienten mit einer Transplantat-Abstoßung fast auf die prä-operativen Spiegel ab und blieben stabil (Fig. 3). Eine Infektion erhöhte die HGF-Serum-Spiegel der Patienten geringfügig, jedoch nicht signifikant (1543 ± 303) im Vergleich zu Patienten, bei welchen keine Vorkommnisse auftraten sowie im Vergleich zu Kontrollen. HGF-Werte bei Patienten, bei welchen eine Transplantatabstoßung diagnostiziert worden war, stiegen einen Tag vor der klinischen Erstellung der Abstoßungs-Diagnose und deren Verifizierung durch TBB signifikant an, wogegen ein mit Infektionen verbundener Anstieg der Serum-HGF-Spiegel nicht signifikant war (Fig. 4).

Diskussion:

Viele Untersuchungen konzentrierten sich auf die Rolle von Zytokinen und Wachstumsfaktoren bei der Entwicklung entzündlicher Reaktionen (17), der Transplantat-Dysfunktion (18) und der Transplantatabstoßung (19) nach einer Lungentransplantation. Es ist erwiesen, dass der Serum-Spiegel bestimmter Mitglieder der Interleukin-Familie während eines frühen hämodynamischen Versagens nach einer Lungentransplantation erhöht ist (17). Der transformierende Wachstumsfaktor beta könnte bei chronischer Lungentransplantat-Abstoßung mit Bronchiolitis obliterans wichtig sein, weil seine mRNA-Spiegel bei Patienten mit Bronchiolitis obliterans erhöht sind (19). Andererseits ist die gamma-Interferon-Gen-Expression, die mit ICAM-1 verbunden ist, im BAL-Fluid von Patienten mit einer Allotransplantat-Dysfunktion nach einer Lungentransplantation erhöht. Die Serum-Adhäsionsmoleküle erwiesen sich jedoch als enttäuschende serologische Marker (8), und die BAL-Marker könnten nützlicher sein (9, 10), jedoch wurde keines ein Standard-Test.

Diese erste Untersuchung betreffend Serum-Spiegel von HGF bei Patienten mit einer Lungentransplantation zeigt, dass die HGF-Serum-Spiegel kurz bevor die Transplantatabstoßung erfolgt, signifikant ansteigen. Die Serum-HGF-Spiegel steigen bei fulminanter Hepatitis (20) an, und es gibt Beweise dafür, dass die HGF-Spiegel bei Patienten mit entzündlichen Lungenerkrankungen ansteigen (21). Warum HGF bei einer akuten Abstoßung stärker ansteigen sollte als bei einer Infektion ist ungewiss. Obwohl sowohl eine akute Abstoßung als auch eine Infektion mit einer Entzündung verbunden ist, könnte die Abstoßung ein breiteres Spektrum von Mediatoren umfassen und mit größerer Wahrscheinlichkeit Wachstums- und Umformungsprozesse, die mit der chronischen Abstoßung eng verbunden sind, involvieren. Eine weitere Erklärung für dieses Phänomen könnte sein, dass die Stimuli, die eine Steigerung des HGF bewirken, wahrscheinlich

wichtiger sind als die vielen anderen Faktoren, die mit dem Abstoßungsprozess verbunden sind und die vielen Parameter, die zu seiner Messung gehören (1, 3, 6). Die vorliegende Erfindung zeigt, dass HGF ein pulmotrophes Molekül ist und seine Serum-Spiegel mit dem Grad der Lungenverletzung und deren Reparatur verbunden sind. In allen Fällen einer Transplantatabstoßung bei dieser Studie kehrten die HGF-Serum-Spiegel nach einer Steroid-Therapie auf beinahe die voroperativen Spiegel zurück, was mit den Erkenntnissen anderer (20, 21) übereinstimmt und für einen mechanistischen Zusammenhang mit Steroiden spricht.

Die anfängliche Steigerung des HGF nach einer Transplantation könnte auf die Reparatur, das Wachstum und die Umformung zurückzuführen sein, die sich aus der Transplantation ergeben können. Das Fehlen einer Korrelation mit Serum-Markern der Entzündung, wie früher berichtet (21), lässt darauf schließen, dass die Veränderung im HGF nicht direkt mit entzündlichen oder Akutphasen-Reaktionen verbunden ist; und die vorliegende Erkenntnis, dass die HGF-Serum-Spiegel nach, jedoch nicht vor einer Infektion einen moderaten Peak erreichen, stimmt mit dieser Erfindung überein.

Defrances und Mitarbeiter fanden, dass HGF im Bronchienepithel von Ratten im Entwicklungsstadium lokalisiert war, wobei sie die immunhistochemische Färbung verwendeten (22). Sie zeigten, dass HGF durch Mesenchym-Zellen in jedem Organ erzeugt wurde, was das Epithelzellenwachstum und die Organ-Morphogenese auf parakrine oder endokrine Weise regulieren könnte (23). In der Lunge sind die Hauptquellen für HGF die Mesenchymzellen (Makrophagen, Fibroblasten und Endothelzellen) (24). Die erhöhten HGF-Spiegel bei transplantierten Patienten könnten auch mit einer Reperfusionsverletzung und Endothelzellen-Produktion von HGF verbunden sein. Alternativ werden Fibroblasten während der frühen Reparatur-Stadien bronchialer und vaskulärer Anastomosen aktiviert (25). Der HGF stimuliert die Proliferation der Lungenepithelzellen (22), und der HGF könnte eine wichtige Rolle bei der Replikation des Bronchienepithels spielen (21). Insgesamt zeigt diese Untersuchung, dass eine Transplantatabstoßung, nicht jedoch eine Infektion, zu frühen, signifikant erhöhten HGF-Spiegeln führt und diese Spiegel nach Steroidbehandlung absinken. Wie die vorliegenden Ergebnisse zeigen, reagiert HGF empfindlich für die Voraussage einer Lungentransplantatabstoßung.

Vergleichsbeispiel: HGF bei Nierentransplantatabstoßung

Patienten, die eine Nierentransplantation erfahren hatten, wurden im Hinblick auf ihre HGF-Spiegel einer Analyse unterzogen. 19 Patienten wurden mit 12 gesunden Kontrollen verglichen. Bei 12 Patienten gab es keine Vorkommnisse; bei 7 Patienten kam es zu einer Abstoßung. Die mittleren HGF-Serum-Spiegel bei Kontrollen, bei Patienten nach Operation ohne Vorkommnisse, und bei Patienten mit Abstoßung wurden ermittelt und sind in Fig. 5 veranschaulicht. Die vorliegenden klinischen Vergleichsdaten zeigen deutlich, dass HGF sich bei Abstoßung im Vergleich zu Patienten ohne Vorkommnisse nach einer Nierentransplantation nicht verändert (* $p < 0,05$ im Vergleich zu Kontrollen).

Bei der vorliegenden Erfindung zeigen der Vergleich der HGF-Serum-Spiegel bei Patienten mit Lungentransplantation gegenüber Patienten mit Nierentransplantation einerseits, und die Ergebnisse für Ratten-Nieren andererseits Folgendes: Erstens ist HGF ein pulmotrophes Protein, und Zellen, die dieses Protein erzeugen, unterstreichen diese Tatsache noch weiter, d.h. Bronchienepithelzellen, Fibroblasten und Makrophagen. Die beiden letzteren Zelltypen, insbesondere die Makrophagen, sind an lokalen und entfernt gelegenen Immunreaktionen beteiligt und finden sich häufig im Lungengewebe. Daher können sie leicht stimuliert werden, um HGF infolge einer Lungentransplantatabstoßung zu erzeugen. Zweitens kann HGF nicht als allgemeiner Marker für eine Festtransplantat-Abstoßung angesehen werden, was durch die HGF-Spiegel bei Nierentransplantatabstoßung in dieser Studie angezeigt ist. Außerdem könnte die diskutierte Rolle der Zellen, die an der HGF-Produktion beteiligt sind, und ihre signifikant höhere Dichte in der Lunge im Gegensatz zur Niere, der wohlbekannte „hepato-pulmonale“ Reaktionsweg, der sowohl unter physiologischen als auch unter pathologischen Bedingungen (26) zur Wirkung kommt, die vorliegenden Erkenntnisse weiters erklären. Schließlich könnten Tierversuche, insbesondere jene mit Nagern, kein perfektes Maß komplexer pathophysiologischer Prozesse sein, die bei humanen Transplantatabstoßungen aktiviert werden.

Literaturstellen

1. Toronto Lung Transplant Group. Unilateral lung transplantation for pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* 1986;314:1140-1145.
- 5 2. Grossman RF, Frost A, Zamel N, Patterson GA, Cooper JD, Myron PR, Dear CL, Maurer J. Results of single-lung transplantation for bilateral pulmonary fibrosis. The Toronto Lung Transplant Group. *N Engl J Med* 1990;322:727-733.
3. Pattersen GA. Results of bilateral lung transplantation. In: (Patterson GA und Couraud L, Hersgb.), *Current Topics in General Thoracic Surgery*, Bd. 3, Lung Transplantation. Elsevier, Amsterdam, 1995, S. 363-378.
- 10 4. Arcasoy SM, Kotloff RM. Lung transplantation. *N Engl J Med* 1999;340:1081-1091.
5. Hosenpud JD, Bennett LE, Keck BM, Fioll B, Boucek MM, Novick RJ. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: sixteenth official report--1999. *J Heart Lung Transplant* 1999;18:611-626.
- 15 6. Bando K, Paradis IL, Komatsu K, Konishi H, Matsushima M, Keena RJ, Hardesty RL, Armitage JM, Griffith BP. Analysis of time-dependent risks for infection, rejection, and death after pulmonary transplantation. *J Thorax Cardiovasc Surg* 1995;109:49-59.
7. Williams TJ. Rejection in lung transplantation. In: (Patterson GA und Couraud L, Hersgb.), *Current Topics in General Thoracic Surgery*, Bd. 3, Lung Transplantation. Elsevier, Amsterdam, 1995, S. 501-513.
- 20 8. Bewig B, Tiroke A, Bottcher H, Padel K, Hirt S, Haverich A, Cremer J. Adhesion molecules in patients after lung transplantation. *Clin Transplant* 1999;13:432-439.
9. Khurshid A, Barnett VT, Sekosan M, Schraufnagel DE, Erdös EG, Deddish P. Carboxypeptidase (CPM) in bronchoalveolar lavage (BAL) fluid of lung transplant recipients. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157:A811.
- 25 10. Bewig B, Stewart S, Bottcher H, Bastian A, Tiroke A, Hirt S, Haverich A. Eosinophilic alveolitis in BAL after lung transplantation. *Transpl Int* 1999;12:266-272.
11. Nakamura T, Nawa K, Ichihara A. Partial purification and characterization of hepatocyte growth factor from serum of hepatectomized rats. *Biochem Biophys Res Commun* 1984;122:1450-1459.
- 30 12. Gohda E, Tsubouchi H, Nakayama H, Hirono S, Sakiyama O, Takahashi K, Miyazaki H, Hashimoto S, Daikuhara Y. Purification and partial characterization of hepatocyte growth factor from plasma of a patient with fulminate hepatic failure. *J Clin Invest* 1988;81:414-419.
13. Rubin JS, Chan AM, Bottaro DP, Burgess WH, Taylor WG, Cech AC, Hirschfield DW, Wong J, Miki T, Finch PW, et al. A broadspectrum human lung fibroblast-derived mitogen is a variant of hepatocyte growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:415-419.
- 35 14. Yanagita K, Matsumoto K, Sekiguchi K, Ishibashi H, Niho Y, Nakamura T. Hepatocyte growth factor may act as a pulmotrophic factor on lung regeneration after acute lung injury. *J Biol Chem* 1993;268:21212-21217.
- 40 15. Yoshimura R, Kasai S, Wada S, Watanabe Y, Hase T, Chargui J, Nakatani T, Tanaka H, Yamamoto K, Kishimoto T. Hepatocyte growth factor: a sensitive indicator for the acute rejection of renal transplants. *Transplant Proc* 2000;32:2073-2074.
16. Yoshimura R, Watanabe Y, Kasai S, Wada S, Ohyama A, Hase T, Nakatani T, Chargui J, Touraine JL, Nakamura T. Hepatocyte growth factor (HGF) as a rapid diagnostic marker and its potential in the prevention of acute renal rejection. *Transpl Int* 2002;15:156-162.
- 45 17. Mal H, Dehoux M, Sleiman C, Boczkowski J, Leseche G, Pariente R, Fournier M. Early release of proinflammatory cytokines after lung transplantation. *Chest* 1998;113:645-651.
18. El-Gamel A, Sim E, Hasleton P, Hutchinson J, Yonan N, Egan J, Campbell C, Rahman A, Sheldon S, Deiraniya A, Hutchinson IV. Transforming growth factor beta (TGF-beta) and obliterative bronchiolitis following pulmonary transplantation. *J Heart Lung Transplant* 1999;18:828-837.
- 50 19. Ross DJ, Moudgil A, Bagga A, Toyoda M, Marchevsky AM, Kass RM, Jordan SC. Lung allograft dysfunction correlates with gamma-interferon gene expression in bronchoalveolar lavage. *J Heart Lung Transplant* 1999;18:627-636.
20. Tsubouchi H, Niitani Y, Hirono S, Nakayama H, Gohda E, Arakaki N, Sakiyama O, Takahashi K, Kimoto M, Kawakami S, et al. Levels of the human hepatocyte growth factor in serum of
- 55

patients with various liver diseases determined by an enzyme-linked immunosorbent assay. Hepatology 1991;13:1-5.

21. Maeda J, Ueki N, Hada T, Higashino K. Elevated serum hepatocyte growth factor/scatter factor levels in inflammatory lung disease. Am J Respir Crit Care Med 1995;152:1587-1591.

22. Defrances MC, Wolf HK, Michalopoulos GK, Zarnegar R. The presence of hepatocyte growth factor in the developing rat. Development 1992;116:387-395.

23. Matsumoto K, Tajima H, Hamanoue M, Kohno S, Kinoshita T, Nakamura T. Identification and characterization of "injurin," an inducer of expression of the gene for hepatocyte growth factor. Proc Natl Acad Sci U S A 1992;89:3800-3804.

24. Yanagita K, Nagaike M, Ishibashi H, Niho Y, Matsumoto K, Nakamura T. Lung may have an endocrine function producing hepatocyte growth factor in response to injury of distal organs. Biochem Biophys Res Commun 1992;182:802-809.

25. Hall SM, Odom N, McGregor CG, Haworth SG. Transient ultrastructural injury and repair of pulmonary capillaries in transplanted rat lung: effect of preservation and reperfusion. Am J Respir Cell Mol Biol 1992;7:49-57.

26. Schraufnagel DE, Kay JM. Structural and pathologic changes in the lung vasculature in chronic liver disease. Clin Chest Med 1996; 17:1-15.

PATENTANSPRÜCHE:

1. Verfahren zur Diagnostizierung einer Lungentransplantat-Abstoßung, welches das Bestimmen der Menge des Hepatozyten-Wachstums-Faktors (HGF) in einer Körperflüssigkeit oder Gewebeprobe eines Patienten, der einer Lungentransplantation unterzogen wurde, umfasst.

2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Körperflüssigkeit oder Gewebeprobe ausgewählt ist aus der Gruppe umfassend Serum, Plasma, Blut, Transsudate, Lungen- oder Bronchien-Drainagen oder -Lavagen, Sputum, Harn, der Lunge benachbartes Gewebe und Lungengewebe.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, **gekennzeichnet durch** die folgenden Schritte:

- Vorsehen einer Körperflüssigkeit oder Gewebeprobe von einem Patienten, der einer Lungentransplantation unterzogen wurde,
- Bestimmen der HGF-Menge in dieser Körperflüssigkeit oder Gewebeprobe,
- Vergleichen, ob die ermittelte HGF-Menge im Vergleich zur HGF-Menge bei Patienten ohne Lungentransplantat-Abstoßung erhöht ist, und
- a) Diagnostizieren einer Lungentransplantat-Abstoßung, wenn die ermittelte HGF-Menge erhöht ist im Vergleich zur HGF-Menge bei Patienten ohne Lungentransplantat-Abstoßung, oder
- b) Nicht-Diagnostizieren einer Lungentransplantat-Abstoßung, wenn die ermittelte HGF-Menge nicht erhöht ist im Vergleich zur HGF-Menge bei Patienten ohne Lungentransplantat-Abstoßung.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Menge an HGF durch die Verwendung eines Verfahrens oder Mittels ausgewählt aus der Gruppe ELISA, RIA, Massenspektroskopie, Affinitäts-Chromatographie, Strömungs-Zytometrie, Protein-Mikroarrays, fluoreszierende Antikörper, HGF-bindende Substanzen, insbesondere monoklonale und polyklonale HGF-Antikörper oder HGF-Rezeptoren, immunohistochemische Methoden, Immunfällung, Western Blot, Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET), cDNA-Array und Nukleinsäure-Amplifikationsmethoden, bestimmt wird.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, **dadurch gekennzeichnet**, dass eine erhöhte HGF-Menge, die ein Indikator für eine Lungentransplantat-Abstoßung ist, mit mindestens einem der Folgenden bestätigt wird:

- die ermittelte HGF-Menge beträgt mindestens 400%, vorzugsweise mindestens 500%, insbesondere mindestens 600%, des mittleren Grundlinien-Niveaus von HGF bei gesunden Kontrollen,
- die ermittelte HGF-Menge beträgt mindestens 200%, vorzugsweise mindestens 300%,

- insbesondere mindestens 350%, des mittleren Grundlinien-Niveaus von HGF bei Patienten vor einer Lungentransplantation,
- die ermittelte HGF-Menge beträgt mindestens 200%, vorzugsweise mindestens 300%, insbesondere mindestens 350%, des mittleren Grundlinien-Niveaus von HGF bei Patienten am Tag 3 oder später nach einer Lungentransplantation ohne Vorkommnisse, insbesondere ohne Transplantat-Abstoßung und/oder ohne Infektion.
- 5
6. Verfahren nach Anspruch 5, **dadurch gekennzeichnet**, dass
- der mittlere HGF-Grund-Spiegel bei gesunden Kontrollen zwischen 300 und 900 pg/ml Serum liegt; oder
 - 10 • der mittlere HGF-Grund-Spiegel bei Patienten vor Lungentransplantation zwischen 900 und 1600 pg/ml Serum liegt; oder
 - der mittlere HGF-Grund-Spiegel bei Patienten am Tag 3 nach einer Lungentransplantation ohne Vorkommnisse, insbesondere ohne Transplantat-Abstoßungs-Vorkommnisse und/oder ohne Infektion, zwischen 800 und 1500 pg/ml Serum liegt.
- 15
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, **dadurch gekennzeichnet**, dass eine erhöhte HGF-Menge, die ein Indikator für eine Lungentransplantat-Abstoßung ist, durch einen Serum-Spiegel am Tag 3 oder später nach der Lungentransplantation von höher als 2000 pg/ml, vorzugsweise höher als 2300 pg/ml, insbesondere höher als 2500 pg/ml, bestätigt wird.
- 20
8. Verwendung von HGF-bindenden Substanzen zum Messen der Menge an HGF in einer Körperflüssigkeit oder einer Gewebeprobe von einem Patienten, der einer Lungentransplantation unterzogen wurde, zur Überprüfung, ob eine Lungentransplantat-Abstoßung erfolgt.
9. Set zur Diagnostizierung einer Lungentransplantat-Abstoßung, umfassend
- 25 • einen Probenbehälter mit einer Körperflüssigkeit oder einer Gewebeprobe eines einer Lungentransplantation unterzogenen Patienten, und
 - Mittel zum Bestimmen der HGF-Menge in der Probe.
10. Set nach Anspruch 9, **dadurch gekennzeichnet**, dass es weiters Vergleichs-HGF-Präparate enthält, die eine bestimmte Menge an HGF enthalten.
- 30
11. Set nach Anspruch 9 oder 10, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Mittel zum Bestimmen der Menge an HGF eine (Mikro-)Platte, einen Biochip oder eine Membran umfasst.

HIEZU 3 BLATT ZEICHNUNGEN

35

40

45

50

55

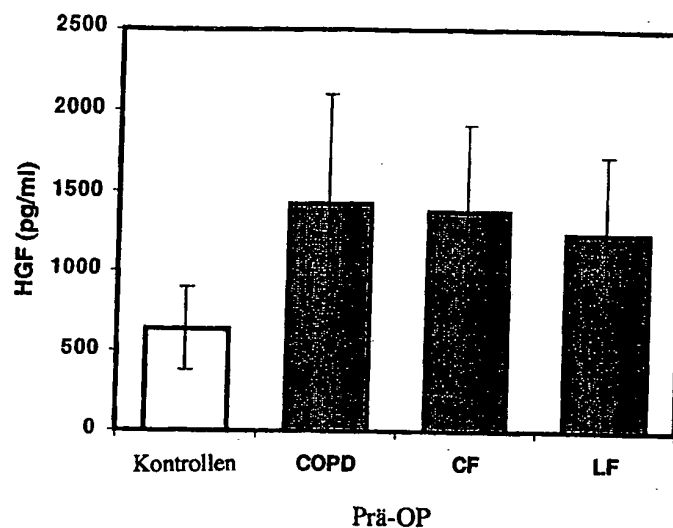


Fig. 1

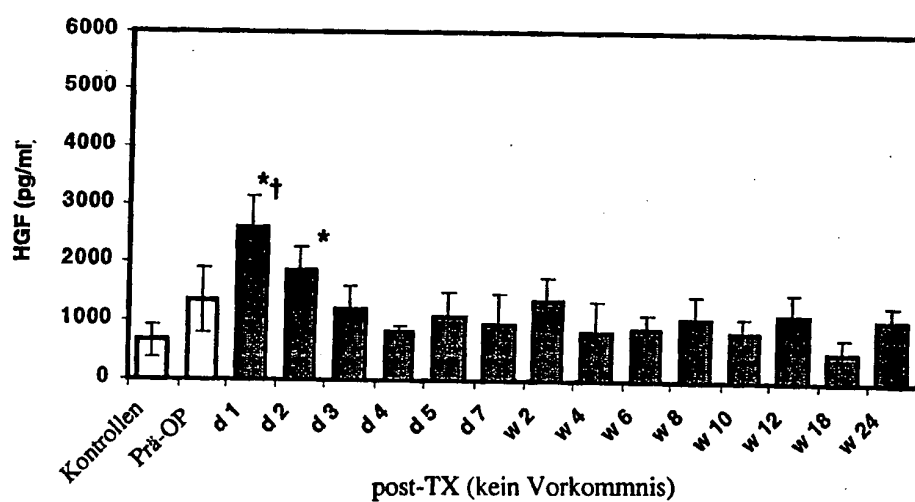


Fig. 2

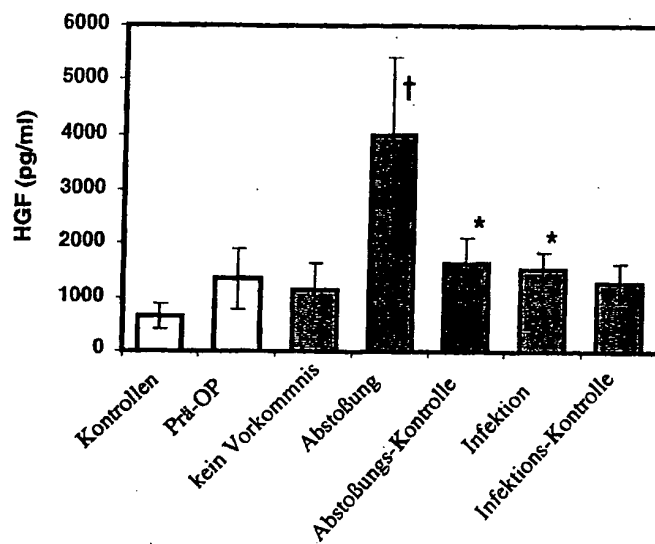


Fig. 3

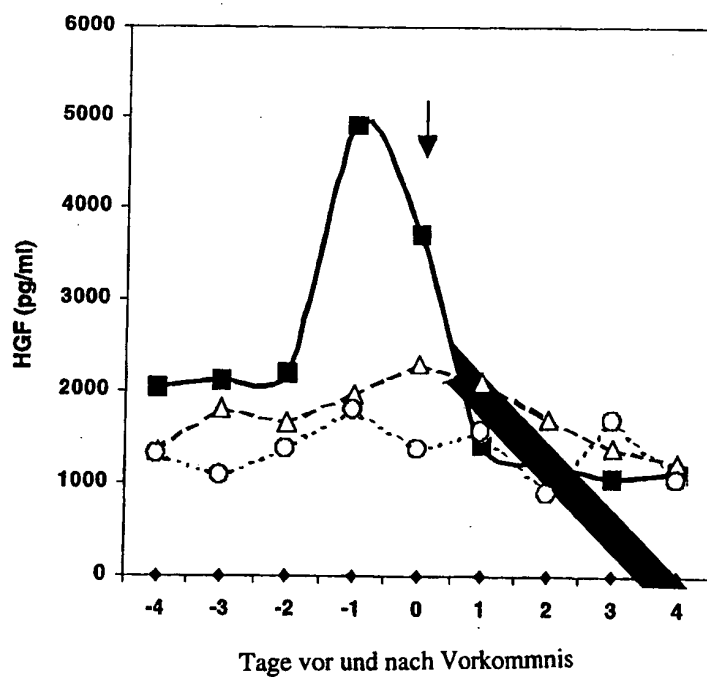


Fig. 4

Nierentransplantation: HGF

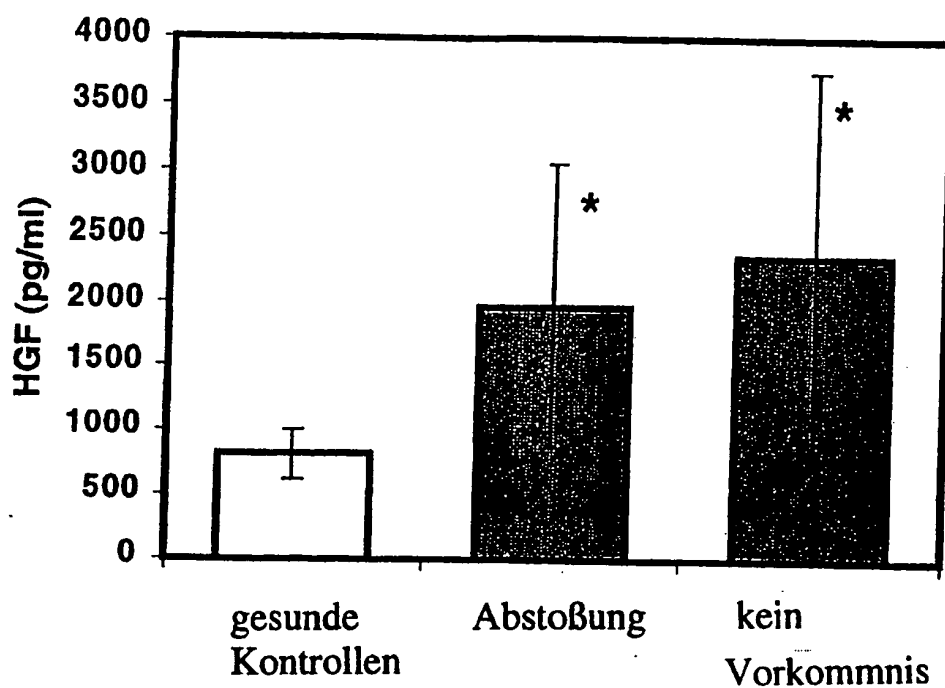


Fig. 5