



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 699 32 084 T2** 2007.06.28

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 140 170 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **699 32 084.4**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/AU99/01163**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **99 966 798.3**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2000/040262**

(86) PCT-Anmeldetag: **24.12.1999**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **13.07.2000**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **10.10.2001**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **21.06.2006**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **28.06.2007**

(51) Int Cl.⁸: **A61K 39/395** (2006.01)

A61P 27/02 (2006.01)

A61K 51/10 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

PP803399 05.01.1999 AU

PQ330599 07.10.1999 AU

(73) Patentinhaber:

**The Flinders University of South Australia,
Bedford Park, South Australia, AU**

(74) Vertreter:

**Patentanwälte von Kreisler, Selting, Werner et col.,
50667 Köln**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

**THIEL, Alexander, Michael, CH-8001 Zurich, CH;
ZOLA, Heddy, Evandale South Australia 5069, AU;
COSTER, John, Douglas, Heathpool, S.A. 5068,
AU; WILLIAMS, Anne, Keryn, Kingswood, S.A.
5062, AU**

(54) Bezeichnung: **Antikörperfragmente zur lokalen Behandlung von Augenerkrankungen**

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

[0001] Die vorliegende Erfindung bezieht sich allgemein auf Zusammensetzungen zur Behandlung von Augenstörungen und auf die Herstellung solcher Zusammensetzungen. Insbesondere betrifft die Erfindung solche Zusammensetzungen zur Behandlung und Bereitstellung von Indikationen, die zum Diagnostizieren von Augenstörungen unter Verwendung von antigenbindenden Subimmunglobulin-Molekülen geeignet sind.

[0002] Verschiedene Augenstörungen sind bekannt, aber für viele davon stehen nur suboptimale Behandlungs- oder Diagnoseverfahren zur Verfügung. Zum Beispiel ist akute Uveitis anterior, eine Entzündung der Iris und des Ziliarkörpers, ein häufiger Zustand mit einer kumulativen Häufigkeit von 0,4% in der allgemeinen Bevölkerung (Rothova et al., 1987, Am. J. Phtholmol. 103: 137–145). Die Krankheit beginnt häufig in der Kindheit oder im frühen Erwachsenenalter, ist häufig bilateral und im Allgemeinen rezidivierend. Akute Uveitis anterior ist schmerzhaft, fast immer mit einer gewissen Morbidität verbunden und kann zur Erblindung führen. Diese Krankheit ist eine antigengetriebene Überempfindlichkeitsreaktion des verzögerten Typs, die durch T-Lymphocyten gesteuert wird (Smith et al., 1998, Immunol. Cell Biol. 76: 497–512). Topische Corticosteroide werden verwendet, um die Entzündung zu bekämpfen, doch sind sie selbst mit erheblichen Komplikationen verbunden; dazu gehören Katarakt, steroidinduziertes Glaukom und Infektion.

[0003] Die Hornhauttransplantatabstoßung ist eine weitere Augenstörung, für die es an wirksamen Behandlungen mangelt. Die Erfolgsrate bei einer Hornhauttransplantation in Australien beträgt mit 10 Jahren 62% (Williams et al., 1993; Aust. NZ. J. Ophthalmol. 21: 1–48). Die irreversible Abstoßung ist die Hauptursache für ein Versagen des Hornhauttransplantats und ist für wenigstens 30–50% aller Fälle verantwortlich und tritt trotz der universellen Verwendung von topischen Glucocorticosteroiden auf (Williams et al., 1993, Aust. NZ. J. Ophthalmol. 21: 1–48). Die unterstützende Behandlung mit systemischen Immunsuppressiva, wie Cyclosporin A, wird gelegentlich verwendet, bringt aber wahrscheinlich nur wenig Nutzen in Bezug auf das Überleben des Transplantats und kann mit schwerer Morbidität verbunden sein (Williams et al., 1993, Transplantation Reviews 7: 44–64).

[0004] Herpeskeratitis wird durch eine Infektion der Trigeminalganglien mit Herpes simplex-Virus verursacht (Streilein et al. 1997, Immunol. Today. 18: 443–9, Hendricks, R. L. 1997, Cornea. 16: 503–6). Herpetische Augenerkrankungen sind die häufigste infektiöse Ursache von Blindheit in Industrieländern (Streilein et al. 1997, Immunol. Today 18: 443–9), und bei 3% der betroffenen Individuen kommt es zu schweren Folgeerscheinungen einschließlich Schmerzen, Iritis, bakterielle Superinfektion, Corneaperforation und Blindheit. Epitheliale herpetische Erkrankung (z.B. dendritische Ulzeration) wird leicht unter anderem durch Tests auf der Basis von Polymerase-Kettenreaktion (PCR) diagnostiziert und kann mit antiviralen Mitteln einigermaßen erfolgreich behandelt werden. Diagnose und Behandlung sind bei scheibenförmiger Endotheliitis oder bei der Stromaerkrankung (z.B. Keratitis disciformis, irreguläre Stromakeratitis, Keratouveitis), die bei einem Fünftel der Patienten mit Augenherpes vorkommt, weitaus schwieriger. Es ist ungewöhnlich, Viruspartikel in Stromabiopsieproben zu finden, und sehr schwierig, Virus daraus zu kultivieren. Die Diagnose wird gewöhnlich aufgrund klinischer Befunde und durch Ausschluss gestellt. Topisches Acyclovir ist die Behandlung der Wahl für Herpeskeratitis (obwohl das Auftreten von wirkstoffresistenten Stämmen Sorge bereitet), und eine langfristige orale Prophylaxe halbiert die Häufigkeit von Rückfällen (Herpetetic Eye Disease Study Group. 1998, N. Engl. J. Med. 339: 300–6). Hornhautschäden werden jedoch durch Acyclovir nicht verhindert. Die Pathogenese der epithelialen Erkrankung resultiert aus einer produktiven lytischen Infektion von Hornhautepithelzellen. Dagegen resultiert die Pathogenese von herpetischer Erkrankung von Stroma- oder Endothelzellen aus einer Immunreaktion auf virales Antigen, das auf Corneazellen exprimiert oder in das Stroma freigesetzt wird (Streilein et al. 1997, Immunol. Today 18: 443–9, Hendricks, R. L. 1997 Cornea 16: 503–6).

[0005] Erwähnt sei auch die Acanthamoeba-Keratitis, eine sehr schwere, schmerzhafteste Krankheit, die zum Verlust der Sehkraft bei dem betroffenen Auge führen kann. Der Zustand, der durch eine häufige freilebende Boden- und Süßwasseramöbe (Acanthamoeba) verursacht wird, galt früher als selten, aber in den letzten 5–10 Jahren gab es eine exponentielle Zunahme der Zahl der berichteten Fälle. Über 90% der Fälle sind bei Kontaktlinsträgern aufgetreten, die sich nicht an die empfohlenen Linsenreinigungs- und -desinfektionsverfahren gehalten haben. Von entscheidender Bedeutung für das Erreichen eines guten Sehkraftergebnisses ist die frühe Diagnose. In den frühen Stadien der Infektion findet man Amöben im Hornhautepithel, wo sie durch Säuberung entfernt werden können, häufig ohne dass antimikrobielle Mittel notwendig sind (Brooks et al. 1994, Cornea 13: 186–189). Leider wird die Diagnose oft verzögert, da das Krankheitsbild dem von anderen Formen infektiöser Keratitis, insbesondere Herpeskeratitis, ähneln kann. Dies ermöglicht es den Organismen, in das Stroma der Cornea einzudringen, wo sie Keratocyten angreifen (Badenoch et al. 1995, Int. J. Parasitol. 25: 229–239) und irreversible Gewebeschäden verursachen. In dieser Situation ist der Versuch, eine Labordiag-

nose anhand von Hornhautgeschabsel zu erreichen, gewöhnlich nicht erfolgreich, und die tiefe Biopsie, die selbst schädigend ist, ist unzuverlässig.

[0006] Immunglobuline haben in verschiedenen medizinischen Bereichen eine verbreitete diagnostische und therapeutische Anwendung gefunden. Zum Beispiel werden ganze monoklonale und/oder polyklonale Antikörper verwendet, um die Transplantatabstoßung zu unterdrücken, um verschiedene Autoimmunkrankheiten zu modulieren, um Neoplasien zu behandeln und um Infektionskrankheiten zu verhindern und zu behandeln. Typischerweise ist für diese Zwecke die systemische Verabreichung von Antikörpern erforderlich, die schwere systemische Nebenwirkungen verursachen kann. Diese Nebenwirkungen haben die systemische Anwendung von Antikörpern zur Behandlung von Krankheiten, die nichtlebenswichtige Organe, wie das Auge, betreffen, verhindert. Es gibt jedoch viele Augenkrankheiten wie die oben beschriebenen, bei denen eine Antikörperbehandlung Vorteile hätte.

[0007] Im Hinblick darauf offenbaren Whitcup et al. (WO 93/06865) die Verwendung von monoklonalen Antikörpern gegen Zelladhäsionsmoleküle, um Augenentzündung zu behandeln. Insbesondere ziehen Whitcup et al. die Verabreichung solcher Antikörper an das Auge durch intravenöse Injektion, durch intrakamerale oder periokuläre Injektion, durch operative Implantation eines Depots und durch topische Verabreichung unter Verwendung von Augentropfen oder Augensalbe in Betracht. Whitcup et al. geben geeignete Verfahren für die parenterale Verabreichung von Anti-Zelladhäsionsmolekül-Antikörpern in einem Tiermodell an. Sie geben jedoch keine geeigneten Verfahren für die topische Verabreichung solcher Antikörper an und schweigen völlig über irgendwelche Daten, die den Nutzen der beanspruchten Verfahren belegen würden. Tatsächlich haben die Erfinder der vorliegenden Erfindung herausgefunden, dass herkömmliche ganze Antikörper allein nicht auf topischem Weg in die Cornea oder Sklera eindringen können.

[0008] Verschiedene anatomische Barrieren, die sich auf das Auge beziehen, können dem schlechten intraokulären Eindringvermögen von ganzen Antikörpern zugrundeliegen. In dieser Hinsicht ist die Cornea die Hauptbarriere für den Eintritt von Fremdsubstanzen. Sie weist zwei unterschiedliche Penetrationsbarrieren auf, das Hornhautepithel und das Hornhautstroma (Burstin und Anderson, 1985, J. Ocul. Pharmacol. 1(3): 309–26; Maurice D.M., 1980, Int. Ophthalmol. Clin. 20(3): 7–20; und Mishima S., 1981, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 21(4): 504–41). Das Hornhautepithel ist eine Hauptbarriere für hydrophile Substanzen. Hydrophile Moleküle von weniger als 350 Da können über einen parazellulären Weg eintreten, aber größere hydrophile Moleküle sind im Wesentlichen ausgesperrt. Diese Barrierefunktion kann durch die Verwendung von Penetrationsverstärkern bis zu einem gewissen Grad moduliert werden. Die zweite Barriere, das Hornhautstroma, stört das Eindringen von lipophilen Wirkstoffen und großen hydrophilen Wirkstoffen. Das Hornhautstroma wird regelmäßig als "transparent" für hydrophile Moleküle von bis zu 500 kDa bezeichnet (Bartlett und Jaanus in Clinical Ocular Pharmacology). Dieser Zahl widersprechen jedoch Studien von Olsen et al. (1995, Inv. Ophthalm. Vis. Sci. 36(9): 1893–1903), die in vitro zeigten, dass die Permeabilität der humanen Sklera bis zu etwa 40 kDa linear mit zunehmendem Molekulargewicht von hydrophilen Verbindungen abnimmt und die Permeabilität danach scharf abfiel. Vergleichsstudien mit Rinder- und Kaninchenstroma und -sklera lassen vermuten, dass das Stroma ähnlich, wenn auch etwas transparenter ist (Maurice und Polgar, 1977, Exp. Eye Res. 25: 577–582). Dementsprechend würde man erwarten, dass das Ergebnis von Olsen et al. (1995, loc. cit.) auch für das humane Hornhautstroma gilt.

[0009] Die Penetration von Sklera oder Stroma eines intakten Auges durch ganze IgG erfolgt wenn überhaupt nur sehr langsam, unabhängig davon, ob die Anwendung topisch (Pleyer et al. 1995, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 36(1): 52–6), subkonjunktival (Osusky et al. 1993, Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol. 231(2): 122–128) oder systemisch (Verhagen et al. 1990, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 31(8): 1519–1525) erfolgt. Die Zubereitung von ganzen IgG in einer Lipidumgebung, zum Beispiel innerhalb eines Liposoms, kann die Übertragung durch das Hornhautepithel erleichtern (Pleyer et al. 1995, loc. cit.), löst jedoch nicht das Problem der langsamen Passage durch das Stroma oder die Sklera bei Molekülen dieser Größe.

[0010] Trotz der ermutigenden Daten von Pleyer et al. (1995, loc. cit.) mit liposomaler Verkapselung haben die Erfinder der vorliegenden Erfindung gezeigt, dass die intrakamerale Injektion von monoklonalen Antikörpern eine schädliche fibrinöse Reaktion in der vorderen Augenkammer verursacht (Williams et al. 1992, Transplantation, 54: 38–43). Diese entzündungsfördernde Nebenwirkung kann eine lokale Komplementaktivierung durch den Fc-Teil des Antikörpers widerspiegeln. Das Auge enthält viele nichtregenerierende Strukturen, die durch solche entzündlichen Nebenwirkungen irreversibel geschädigt werden. Wenigstens in einem beschriebenen Fall hatte die entzündliche Nebenwirkung von intraokulären Antikörpern eine Erblindung des Patienten zur Folge (Fall beschrieben von M. Böhnke, Bern, vorgestellt bei der internationalen Konferenz zur Hornhauttransplantation, Heidelberg, September 1994).

[0011] WO 97/43416 beschreibt mehrere Moleküle, die an die gc-Kette eines Cytokinrezeptors binden, einschließlich monoklonaler Antikörper und Fragmenten von Antikörpern, und dadurch die Reaktion einer Zelle auf IL-2 und andere Cytokine blockieren. Es wird gesagt, solche Moleküle seien in der Lage, Krankheiten einschließlich Uveitis zu behandeln, obwohl dies nicht nachgewiesen wurde.

[0012] Oakes und Lausch (1981) offenbaren, dass intravenöse Injektionen von Fab₂-Fragmenten von Anti-Herpes-simplex-Virus nach einer Impfung der Cornea mit dem Virus vor HSV schützen.

[0013] Aus dem obigen geht trotz eines lange bestehenden Bedürfnisses nach intraokulären immuntherapeutischen Strategien hervor, dass Antikörper nur ein begrenztes klinisches Potential für eine wirksame Behandlung von Augenstörungen haben.

[0014] Die Erfinder der vorliegenden Erfindung haben herausgefunden, dass antigenbindende Subimmunglobulin-Moleküle, wie Fv-Immunglobulinfragmente, Minibodies und dergleichen, in die Hornhaut eindringen können und für eine wirksame Behandlung und/oder Diagnose von Augenstörungen mit merklich reduzierten Nebenwirkungen sorgen.

[0015] Dementsprechend gibt die Erfindung in einem Aspekt die Verwendung eines antigenbindenden Subimmunglobulin-Moleküls, dem ein Fc-Teil eines Immunglobulins fehlt und das gegenüber einem mit einer Augenstörung zusammenhängenden Zielantigen immuninteraktiv ist, bei der Herstellung eines Medikaments zur Behandlung einer Augenstörung an, wobei das Medikament zur topischen Verabreichung zubereitet ist. Wir beschreiben auch ein Verfahren zur Behandlung einer Augenstörung, das das Verabreichen einer effektiven Menge eines antigenbindenden Subimmunglobulin-Moleküls, das gegenüber einem mit der Störung zusammenhängenden Zielantigen immuninteraktiv ist, an einen Patienten, der einer solchen Behandlung bedarf, umfasst.

[0016] In einem anderen Aspekt der Erfindung wird die Verwendung eines antigenbindenden Subimmunglobulin-Moleküls, dem ein Fc-Teil eines Immunglobulins fehlt und das gegenüber einem mit einer Augenstörung zusammenhängenden Zielantigen immuninteraktiv ist, bei der Herstellung eines Medikaments zur Diagnose eines Augenzustands angegeben, wobei das Medikament für die topische Verabreichung vorgesehen ist.

[0017] In noch einem weiteren Aspekt der Erfindung wird eine topische Zusammensetzung zur Behandlung oder Diagnose einer Augenstörung bereitgestellt, die ein antigenbindendes Subimmunglobulin-Molekül, das gegenüber einem mit der Störung zusammenhängenden Zielantigen immuninteraktiv ist, einen Penetrationsverstärker, der die Penetration des antigenbindenden Subimmunglobulin-Moleküls in das Auge oder das Hornhautepithel verbessert, und einen Träger umfasst.

[0018] In einem weiteren Aspekt besteht die Erfindung in einer pharmazeutischen Zusammensetzung, die zur topischen Verabreichung an das Auge zubereitet ist und Folgendes umfasst: ein antigenbindendes Subimmunglobulin-Molekül, dem ein Fc-Teil eines Immunglobulins fehlt und das gegenüber einem Zielantigen im Auge immuninteraktiv ist, einen Penetrationsverstärker, der die Penetration des antigenbindenden Subimmunglobulin-Moleküls in das Auge oder das Hornhautepithel verbessert, und einen pharmazeutisch annehmbaren Arzneimittelhilfsstoff, Verdünnungsmittel oder Träger.

[0019] Die Erfindung wird nun unter Bezugnahme auf die Zeichnungen beschrieben:

[0020] [Fig. 1](#), die aus Plückthun et al. (1996, Antibody engineering: A practical approach, 203–252) entnommen ist, ist eine schematische Darstellung von antigenbindenden Subimmunglobulin-Molekülen, die für eine funktionelle Expression auf hohem Niveau in *E. coli* und für die Verwendung gemäß der vorliegenden Erfindung geeignet sind.

[0021] [Fig. 2](#) zeigt eine Cornea-Perfusionskammer: eine korneosklurale Scheibe wird seziert und fest in die Perfusionskammer eingespannt. Ein feines Gewinde ermöglicht die Einstellung der Einspannung ohne die Gefahr einer Gewebeschädigung. Die Flüssigkeit auf der "Empfänger"-Seite der Hornhaut zirkuliert ständig. Das gesamte Flüssigkeitsvolumen beträgt 3,5–4 ml. Der erhöhte Kammerausfluss in das Reservoir verursacht einen Überdruck innerhalb der Kammer, wodurch physiologische Bedingungen im Auge nachgebildet werden.

[0022] [Fig. 3](#) zeigt eine Kammer, die für die Messung des Eindringvermögens eines Wirkstoffs in ganze menschliche oder Schweineaugen geeignet ist. Ganze Augen mit intaktem Bindehautgewebe werden so auf dem Teflon-Block positioniert, dass sich die Hornhaut innerhalb einer im Teflon-Block gebildeten Vertiefung be-

findet. Die Vertiefung wird mit dem Wirkstoff gefüllt, so dass die Hornhaut das einzige Gewebe ist, das mit dem Wirkstoff in Kontakt ist. Das ganze Auge wird mit einem umgedrehten Kunststoffbehälter bedeckt, so dass eine feuchte Kammer entsteht, und der Aufbau wird über ein Wasserbad gebracht, um das Auge auf einer Temperatur von 35 bis 37 °C zu halten.

[0023] [Fig. 4](#) ist eine Graphik, die die in einem Durchflusszytometrie-Assay gemessene antigenbindende Aktivität zeigt. Das scFv zeigt eine konzentrationsabhängige Bindung an sein Zielantigen mit einem Muster, das dem mit dem ganzen Antikörper erhaltenen ähnlich ist.

[0024] [Fig. 5](#) ist eine Graphik, die die scFv-Penetration durch Schweinehornhautstroma (Epithelbarriere entfernt) bei pH 7,0 zeigt.

[0025] [Fig. 6](#) ist eine Graphik, die die scFv-Penetration durch Schweinehornhautstroma (Epithelbarriere entfernt) bei pH 8,0, pH 7,0 und pH 3,5 zeigt. Eine Senkung des pH-Werts von 7,0 auf 3,5 hat eine nachteilige Wirkung auf die Penetration. In einer Hornhaut mit einem intakten Epithel konnte mit scFv bei einem pH-Wert von 3,5 keine Penetration nachgewiesen werden.

[0026] [Fig. 7](#) ist eine Graphik, die zeigt, dass reines scFv in Katzenhornhäuten ohne Epithelbarrieren nach 3 Stunden schnell mit steigender Bindungsaktivität auf der Spenderseite eindrang. Katzenhornhäute sind um 20-40% dünner als Schweinehornhäute, was das schnellere Eindringen erklärt. Ganze Antikörper (mAb) drangen innerhalb einer Beobachtungszeit von 8 Stunden nicht ein.

[0027] [Fig. 8](#) ist eine Graphik, die die Penetration von Natriumfluorescein durch eine intakte Schweinehornhaut in der Perfusionskammer zeigt. Auf der Empfängerseite der Schweinehornhaut wurde Natriumfluorescein erst nach 3 Stunden nachweisbar, mit einer anschließenden exponentiellen Erhöhung während des Rests des Experiments.

[0028] [Fig. 9](#) ist eine Graphik, die die Beziehung zwischen der Penetration von scFv in Hornhautperfusionsexperimenten und Penetrationsexperimenten mit dem ganzen Augapfel zeigt. Der Pfeil zeigt die scFv-Bindungsaktivität in der vorderen Kammer des ganzen Auges (ohne Epithel) an.

[0029] [Fig. 10](#) ist eine Graphik, die die OX38-scFv-Penetration durch intakte Schweinehornhäute in Perfusionskammern in An- und Abwesenheit von 0,5% Caprinsäure zeigt.

[0030] [Fig. 11](#) ist eine Graphik, die die Penetration von Miniantikörpern und ganzen IgG-Antikörpern durch Schweinehornhautstroma in der Perfusionskammer zeigt.

[0031] [Fig. 12](#) ist eine Graphik, die die Penetration von Miniantikörpern durch Hornhautstroma und intakte Hornhäute bei ganzen Schweineaugen zeigt.

[0032] [Fig. 13](#) ist eine Graphik, die die Penetration von OX38-Miniantikörpern durch eine intakte menschliche Hornhaut im Penetrationsaufbau mit ganzen Augen zeigt.

[0033] [Fig. 14](#) ist eine Graphik, die die Titration der Miniantikörper-Bindungsaktivität in Augentropfen und nach der Penetration in der vorderen Kammer zeigt.

[0034] Wenn nichts anderes definiert ist, haben alle hier verwendeten wissenschaftlichen Fachausdrücke dieselbe Bedeutung, wie sie der Fachmann auf dem einschlägigen Gebiet gewöhnlich versteht. Bei der praktischen Durchführung oder beim Testen der vorliegenden Erfindung können zwar beliebige Verfahren und Materialien, die den hier beschriebenen ähnlich oder äquivalent sind, verwendet werden, doch sind hier die bevorzugten Verfahren und Materialien beschrieben. Für die Zwecke der vorliegenden Erfindung werden unten die folgenden Ausdrücke definiert.

[0035] "Affinität" bedeutet die Stärke der Wechselwirkung zwischen einer individuellen antigenbindenden Stelle auf einem immunreaktiven Molekül und der entsprechenden Stelle auf dem Antigen.

[0036] "Mit der Störung zusammenhängend" bedeutet, dass das Zielantigen direkt oder indirekt mit der Störung verknüpft sein kann. Zum Beispiel kann das Zielantigen ein Epitop eines Signalmoleküls sein, das die Augenstörung indirekt verursacht, dazu beiträgt oder auf sie hinweist.

[0037] Der Ausdruck "Diagnose" wird hier in seinem weitesten Sinn verwendet und umfasst den Nachweis eines Antigens, das gegenüber einem antigenbindenden Subimmunglobulin-Molekül reaktiv ist. Der Ausdruck umfasst auch die Analyse von Störungsmechanismen, die mit Augenstörungen verbunden sind. Dementsprechend umfasst der Ausdruck "Diagnose" auch die Verwendung von antigenbindenden Subimmunglobulin-Molekülen für Forschungszwecke als Werkzeuge zum Nachweisen und Verstehen von Mechanismen, die mit Augenstörungen zusammenhängen.

[0038] Der hier verwendete Ausdruck "effektive Menge" bedeutet eine Menge an antigenbindendem Subimmunglobulin-Molekül, die eine Augenstörung erfolgreich behandelt oder verhindert. Die effektive Menge kann eine Menge sein, die eine Wirkung eines Zielantigens, gegenüber dem das antigenbindende Subimmunglobulin-Molekül reaktiv ist, hemmen kann. Verfahren zur Hemmung einer Wirkung können die Sättigung des Zielantigens im Auge mit einem antigenbindenden Subimmunglobulin-Molekül umfassen, wodurch das Zielantigen neutralisiert wird.

[0039] Wenn hier von "immuninteraktiv" die Rede ist, umfasst der Ausdruck jede Wechselwirkung, Reaktion oder andere Form der Assoziation zwischen Molekülen, insbesondere dann, wenn eines der Moleküle eine Komponente des Immunsystems ist oder einer solchen nachgebildet ist.

[0040] Der hier verwendete Ausdruck "Augenzustand" soll irgendeinen Zustand der Augen beschreiben. Er kann einen gesunden Zustand oder einen ungesunden Zustand, wie eine Störung des Auges (Augenstörung), umfassen.

[0041] Der Ausdruck "Patient" bezieht sich auf Patienten menschlicher oder anderer tierischer Herkunft und umfasst jedes Individuum, das man unter Verwendung der Verfahren der Erfindung untersuchen oder behandeln möchte. Man wird sich jedoch darüber im Klaren sein, dass "Patient" nicht bedeutet, dass Symptome vorhanden sein müssen.

[0042] "Pharmazeutisch annehmbarer Träger" bedeutet einen festen oder flüssigen Füllstoff, Verdünnungsmittel oder verkapselnde Substanz, der, das bzw. die bei systemischer Verabreichung unbedenklich verwendet werden kann.

[0043] "Antigenbindendes Subimmunglobulin-Molekül" bedeutet ein Molekül, das kleiner als ein Immunglobulinmolekül ist und eine Bindungsaffinität zu einem Zielantigen aufweist. Man wird sich darüber im Klaren sein, dass sich dieser Ausdruck auch auf nicht von Immunglobulinen abgeleitete Proteingerüste erstreckt, die eine antigenbindende Wirkung aufweisen. Man wird sich auch darüber im Klaren sein, dass dieser Ausdruck nicht durch die Quelle, aus der eine Nucleotidsequenz, die das antigenbindende Molekül codiert, erhalten wird, oder durch die Quelle, aus der das antigenbindende Molekül exprimiert oder isoliert wird, beschränkt ist.

[0044] "Zielantigen" bedeutet ein Antigen, dass mit einer Augenstörung zusammenhängt, für die eine Behandlung oder Diagnose angestrebt wird.

[0045] Der Ausdruck "Behandlung" wird hier in seinem weitesten Sinn verwendet und umfasst sowohl therapeutische als auch prophylaktische (d.h. präventive) Behandlung, die die Augenstörung lindern soll.

[0046] Überall in dieser Beschreibung sollen die Wörter "umfassen", "umfasst" und "umfassend", wenn der Kontext nichts Anderes erfordert, implizieren, dass eine angegebene ganze Zahl oder Gruppe von ganzen Zahlen mit eingeschlossen ist, aber nicht, dass irgendeine andere ganze Zahl oder Gruppe von ganzen Zahlen ausgeschlossen ist.

[0047] Die vorliegende Erfindung geht auf das unerwartete Ergebnis zurück, dass antigenbindende Subimmunglobulin-Moleküle bis zu erheblichen Konzentrationen in die Hornhaut eindringen können, wenn sie topisch auf das Auge aufgebracht werden. Im Lichte dieses Ergebnisses glauben die Erfinder, dass das Eindringen solcher Moleküle in das Auge auch auf alternativen Wegen einschließlich parenteraler Verabreichung und periokulärer Injektion erreicht werden kann.

[0048] Um die Behandlung von Augenstörungen zu ermöglichen, erfüllen antigenbindende Subimmunglobulin-Moleküle der Erfindung vorzugsweise die folgenden Bedingungen. Erstens ist es wünschenswert, dass sie die Applikation auf das Auge ermöglichen, um einige systemische Nebenwirkungen zu vermeiden oder wenigstens teilweise abzumildern. Eine zweite Bedingung besteht darin, dass diese Bindungsmoleküle keine potentiell schädlichen entzündungsfördernden Nebenwirkungen innerhalb des Auges verursachen dürfen.

[0049] Zu den geeigneten antigenbindenden Subimmunglobulin-Molekülen gehören unter anderem Fv-, Fab-, Fab'- und F(ab')₂-Immunglobulinfragmente. Das antigenbindende Subimmunglobulin-Molekül umfasst nicht den Fc-Teil eines Immunglobulinmoleküls.

[0050] Vorzugsweise umfasst das antigenbindende Subimmunglobulin-Molekül ein synthetisches Fv-Fragment. Zweckmäßigerweise wird das synthetische Fv-Fragment stabilisiert. Beispielhafte synthetische stabilisierte Fv-Fragmente sind einzelkettige Fv-Fragmente (sFv, häufig auch scFv genannt), bei denen ein Peptidlinker verwendet wird, um den N-Terminus oder C-Terminus einer V_H-Domäne mit dem C-Terminus bzw. N-Terminus einer V_L-Domäne zu verbrücken. Den scFv fehlen alle konstanten Teile von ganzen Antikörpern und sie können das Komplement nicht aktivieren. Geeignete Peptidlinker für die Verbindung der V_H- und V_L-Domänen sind solche, die es den V_H- und V_L-Domänen ermöglichen, sich zu einer einzigen Polypeptidkette zu falten, die eine antigenbindende Stelle mit einer dreidimensionalen Struktur aufweist, die derjenigen der antigenbindenden Stelle eines ganzen Antikörpers, von dem das Fv-Fragment abgeleitet ist, ähnlich ist. Linker, die die gewünschten Eigenschaften aufweisen, können nach dem Verfahren erhalten werden, das im US-Patent Nr. 4,946,778 offenbart ist. In manchen Fällen ist jedoch kein Linker vorhanden. Beispielhafte synthetische Fv-Fragmente sind in [Fig. 1](#) gezeigt.

[0051] Zum Beispiel können scFvs gemäß den Verfahren hergestellt werden, die bei Kreber et al. skizziert sind (Kreber et al. 1997, J. Immunol. Methods; 201(1): 35–55). Alternativ dazu können sie auch nach Verfahren hergestellt werden, die im US-Patent Nr. 5,091,513, im Europäischen Patent Nr. 239 400 oder in den Artikeln von Winter und Milstein (1991, Nature 349: 293) und Plückthun et al. (1996, in Antibody engineering: A practical approach, 203–252) beschrieben sind.

[0052] Alternativ dazu umfasst das synthetische stabilisierte Fv-Fragment ein disulfidstabilisiertes Fv (dsFv), bei dem Cysteinreste in die V_H- und V_L-Domänen eingeführt sind, so dass die beiden Reste im vollständig gefalteten Fv-Molekül eine Disulfidbrücke dazwischen ausbilden. Geeignete Verfahren zur Herstellung von dsFv sind zum Beispiel beschrieben in Glockscuther et al. Biochem. 29: 1363–1367; Reiter et al. 1994, J. Biol. Chem. 269: 18327–18331; Reiter et al. 1994, Biochem. 33: 5451–5459; Reiter et al. 1994, Cancer Res. 54: 2714–2718; Webber et al. 1995, Mol. Immunol. 32: 249–258.

[0053] Als antigenbindende Subimmunglobulin-Moleküle ebenfalls in Betracht gezogen werden einzelne Domänen des variablen Bereichs (dAbs genannt), wie sie zum Beispiel in Ward et al. 1989, Nature 341: 544–546; Hamers-Casterman et al. 1993, Nature 363: 446–448; Davies & Riechmann, 1994, FEBS Lett. 339: 285–290, offenbart sind.

[0054] Zweckmäßigerweise ist das antigenbindende Subimmunglobulin-Molekül ein "Minibody". In dieser Hinsicht sind Minibodies kleine Versionen von ganzen Antikörpern, die in einer einzigen Kette die wesentlichen Elemente eines ganzen Antikörpers codieren. Zweckmäßigerweise besteht der Minibody aus den V_H- und V_L-Domänen eines nativen Antikörpers, die mit dem Scharnierbereich und der CH3-Domäne des Immunglobulins fusioniert sind, wie es zum Beispiel im US-Patent Nr. 5,837,821, auf das hier ausdrücklich Bezug genommen wird, offenbart ist.

[0055] In einer alternativen Ausführungsform kann das antigenbindende Subimmunglobulin-Molekül auch nicht von Immunglobulinen abgeleitete Proteingerüste umfassen. Genannt sei zum Beispiel Ku & Schultz, 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92: 652–6556, wo ein Vierhelix-Bündelprotein-Cytochrom b562 offenbart ist, das zwei Schleifen aufweist, die so randomisiert sind, dass komplementaritätsbestimmende Bereiche (CDRs) entstehen, die in Bezug auf die Antigenbindung ausgewählt wurden.

[0056] Das antigenbindende Subimmunglobulin-Molekül kann eine modifizierende Struktureinheit umfassen. In einer Form kann die modifizierende Struktureinheit die Effektorfunktion des Moleküls modifizieren. Zum Beispiel kann die modifizierende Struktureinheit ein Peptid zum Nachweis der antigenbindenden Moleküls, zum Beispiel in einem Immunassay, umfassen. Alternativ dazu kann die modifizierende Struktureinheit die Reinigung des antigenbindenden Moleküls erleichtern. In diesem Fall umfasst die modifizierende Struktureinheit unter anderem Glutathion-S-transferase (GST), Maltosebindungsprotein (MBP) und Hexahistidin (HIS₆), die insbesondere für die Isolierung des antigenbindenden Moleküls durch Affinitätschromatographie geeignet sind. Für die Zwecke der Reinigung durch Affinitätschromatographie sind relevante Matrices für die Affinitätschromatographie mit Glutathion, Amylose und Nickel oder Cobalt konjugierte Harze, wie in der Technik wohlbekannt ist. Die modifizierende Struktureinheit kann ein therapeutisches Mittel umfassen, das zu wenigstens einem Teil des Auges zielgesteuert werden soll. Alternativ dazu kann die modifizierende Struktureinheit auch ein Enzym umfassen, wie ein Enzym von potentielltem therapeutischem Nutzen, z.B. fibrolytische Mittel (Holvoet

et al., 1991, J. Biol. Chem. 366: 19717-19724; Yang et al. 1994, Biochem. 33: 606-612) oder Medikamentenvorstufen-Aktivatoren (Bosslett et al., 1992, Br. J. Cancer, 65: 234-238; Goshorn et al., 1993, Cancer Res., 53: 2123-2127; Rodrigues et al., 1995, Cancer Res., 55: 63-70), und Enzyme, auf denen kolorimetrische Assays zur Verwendung in Immunoassays beruhen können. In einer anderen Form kann die modifizierende Struktureinheit das intraokuläre Eindringvermögen des antigenbindenden Moleküls erhöhen. In diesem Fall kann die modifizierende Struktureinheit eine Lipid-Struktureinheit oder einen Lipidschwanz umfassen, wie es zum Beispiel von Barr et al. beschrieben wird (1998, Adv. Drug Delivery Reviews 32: 247-271, auf das hier ausdrücklich Bezug genommen wird). Alternativ dazu kann die modifizierende Struktureinheit auch das HIV-tat-Protein umfassen, wie zum Beispiel von Schwarze et al. beschrieben wird (1999, Science 285: 1569-1572).

[0057] Das antigenbindende Subimmunglobulin-Molekül kann mehrwertig sein (d.h. mehr als eine antigenbindende Stelle haben), vorausgesetzt, es ist zur Penetration ins Auge befähigt, wenn es parenteral oder topisch verabreicht oder in den subkonjunktivalen, peri- oder retrobulbären Raum injiziert oder direkt ins Auge injiziert wird. Solche mehrwertigen Moleküle können für ein oder mehrere Antigene spezifisch sein. Mehrwertige Moleküle dieses Typs können durch Dimerisierung von zwei Antikörperfragmenten über ein cysteinylhaltiges Peptid hergestellt werden, wie es zum Beispiel von Adams et al., 1993, Cancer Res. 53: 4026-4034; Cumber et al., 1992, J. Immunol. 149: 120-126, offenbart ist. Alternativ dazu kann die Dimerisierung auch durch Fusion der Antikörperfragmente mit amphiphilen Helices, die natürlicherweise dimerisieren (Pack P. Plüncckhuhn, 1992, Biochem. 31: 1579-1584, auf das hier ausdrücklich Bezug genommen wird), oder durch Verwendung von Domänen (wie der Leucin-Reißverschlüsse jun und fos), die vorzugsweise heterodimerisieren (Kostelny et al., 1992, J. Immunol. 148: 1547-1553), erleichtert werden. In einer alternativen Ausführungsform kann das mehrwertige Molekül auch einen mehrwertigen einzelkettigen Antikörper (Multi-scFv) umfassen, der wenigstens zwei scFvs umfasst, die über einen Peptidlinker miteinander verknüpft sind. In dieser Hinsicht können nichtkovalent oder kovalent verknüpfte scFv-Dimere, die "Diabodies" genannt werden, verwendet werden. Multi-scFvs können bispezifisch oder höherspezifisch sein, je nach der Zahl der eingesetzten scFvs mit unterschiedlichen Antigenbindungsspezifitäten. Multi-scFvs können zum Beispiel nach Verfahren hergestellt werden, die im US-Patent Nr. 5,892,020 offenbart sind.

[0058] Die Erfindung erstreckt sich auch auf eine Zusammensetzung zur Verwendung bei der Behandlung oder Diagnose einer Augenstörung, wobei die Zusammensetzung ein antigenbindendes Subimmunglobulin-Molekül, das gegenüber einem mit der Störung zusammenhängenden Zielantigen immuninteraktiv ist, zusammen mit einem Träger umfasst.

[0059] Der Träger ist vorzugsweise ein pharmazeutisch annehmbarer Träger. Eine Vielzahl von pharmazeutisch annehmbaren Trägern, die in der Technik wohlbekannt sind, kann verwendet werden. Diese Träger können aus einer Gruppe ausgewählt werden, die Zucker, Stärken, Cellulose und ihre Derivate, Malz, Gelatine, Talk, Calciumsulfat, Pflanzenöle, synthetische Öle, Polyole, Alginsäure, phosphatgepufferte Lösungen, Emulgatoren, isotonische Kochsalzlösung und pyrogenfreies Wasser umfasst.

[0060] Die obigen Zusammensetzungen können in einer Weise, die mit der Dosiszubereitung verträglich ist, und in einer solchen Menge, die therapeutisch wirksam ist, um Augenstörungen von Patienten zu lindern, verabreicht werden. Die einem Patienten verabreichte Dosis sollte im Zusammenhang der vorliegenden Erfindung ausreichend sein, um im Laufe der Zeit eine günstige Reaktion bei einem Patienten, wie eine Reduktion oder Unterbindung von Blutverlust, zu bewirken. Die zu verabreichende Menge der antigenbindenden Moleküle kann von dem zu behandelnden Patienten einschließlich seines Alters, Geschlechts, Gewichts und allgemeinen Gesundheitszustands abhängen. In dieser Hinsicht hängen genaue Mengen der antigenbindenden Moleküle für die Verabreichung von der Einschätzung des behandelnden Arztes ab. Bei der Bestimmung der wirksamen Menge des antigenbindenden Moleküls, das bei der Behandlung einer Augenstörung verabreicht werden soll, kann der Arzt den Fortschritt der Störung im Verlauf der Zeit bewerten. Auf jeden Fall kann der Fachmann leicht geeignete Dosen des antigenbindenden Moleküls der Erfindung bestimmen. Solche Dosen können in der Größenordnung von Nanogramm- bis Milligrammmengen des antigenbindenden Moleküls liegen.

[0061] Die Zusammensetzung umfasst zweckmäßigerweise einen Penetrationsverstärker, wie Digitonin, Dihydrocytochalasin B, Caprinsäure, Erhöhung des pH-Werts von 7,0 auf 8,0. Vorzugsweise ist der Penetrationsverstärker auf eine Verstärkung der Penetration des bzw. der antigenbindenden Moleküle durch das Hornhautepithel gerichtet.

[0062] Zweckmäßigerweise umfasst die Zusammensetzung Liposomen, in denen die antigenbindenden Moleküle der Erfindung eingekapselt sind. Jedes geeignete Verfahren der Liposomenverkapselung wird in Betracht gezogen. In dieser Hinsicht werden beispielhafte Verfahren von Frasta et al. (1999, J. Pharm. Pharma-

col. 51(5): 565–576) und Masuda et al. (1996, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 37(9): 1914–1920) offenbart.

[0063] Die Halbwertszeit des antigenbindenden Moleküls der Erfindung kann gegebenenfalls durch jedes geeignete Verfahren verlängert werden. Vorzugsweise werden solche Moleküle mit Polyethylenglycol (PEG) einschließlich Monomethoxypolyethylenglycol chemisch modifiziert, wie es zum Beispiel von Chapman et al. (1999, Nature Biotechnology 17: 780–783) offenbart wird.

[0064] Zu den geeigneten Zielantigenen gehören unter anderem ein MHC-Molekül einschließlich MHC-Molekülen, die Klasse-I- oder Klasse-II-restringiert sind, ein costimulatorisches Molekül (z.B. CD80, CD86 und CD152), ein Adhäsionsmolekül (z.B. CD11b/e, CD18, CD54 und CD62L), ein rezeptorassoziiertes Molekül (z.B. CD3, CD4, CD8, CD28, CD40, CD40L und CTLA4), ein Cytokin-Rezeptor (z.B. der Interleukin-2-Rezeptor (IL-2R) oder eine Untereinheit davon, wie CD25, und der Interferon- γ -Rezeptor (IFN- γ R) und ein virales Oberflächenantigen (z.B. gD2- und gB2-Antigen des Herpes-simplex-Virus oder ein Oberflächenantigen des Herpes-Virus, das Herpeskeratitis verursacht).

[0065] Die Erfindung stellt auch eine Augenzusammensetzung bereit, die ein antigenbindendes Subimmunglobulinmolekül umfasst, das gegenüber einem Zielantigen im Auge immuninteraktiv ist.

[0066] Beschrieben wird hier auch ein Verfahren zur Behandlung einer Augenstörung, das das Verabreichen einer effektiven Menge eines antigenbindenden Subimmunglobulin-Moleküls, das gegenüber einem mit der Störung zusammenhängenden Zielantigen immuninteraktiv ist, an einen Patienten, der einer solchen Behandlung bedarf, umfasst.

[0067] Die Augenstörung kann jede mit dem Auge zusammenhängende Krankheit oder Störung sein. Im Allgemeinen wird die Störung eine Krankheit des Auges sein, die das Auge direkt beeinflusst. Krankheiten oder Störungen, die mit dem Auge zusammenhängen, können auch solche Krankheiten oder Störungen sein, die aus andere Teile des Körpers zurückgehen und die indirekt als Nebenwirkung der Hauptkrankheit oder -Störung das Auge beeinflussen.

[0068] Zu den typischen Krankheiten oder Störungen gehören die Hornhauttransplantatabstoßung, Uveitis, jede Augeninfektion, Entzündungs- und Infektionskrankheiten, wie virale (z.B. Herpeskeratitis und adenovirale), bakterielle oder Chlamydien-Konjunktivitis, Augentumoren, neovaskulär-proliferative Krankheiten, wie diabetische Retinopathie, neovaskuläre Makulopathien, rheumatoide Hornhautausdünnungsstörungen oder Autoimmunstörungen, wie okuläres Pemphigoid.

[0069] Das Verfahren umfasst die Verabreichung einer wirksamen Menge des antigenbindenden Subimmunglobulin-Moleküls an den Patienten. Das antigenbindende Subimmunglobulin-Molekül kann lokal verabreicht werden, entweder topisch an einen Teil des Auges, oder es kann in das Auge injiziert werden, zum Beispiel in den subkonjunktivalen, peri- oder retrobulbären Raum oder direkt ins Auge. Alternativ dazu kann das antigenbindende Molekül auch systemisch durch parenterale Verabreichung verabreicht werden.

[0070] Am meisten bevorzugt wird das antigenbindende Molekül topisch und als Augentropfen auf das Auge angewendet. Die Augentropfen können auf die Hornhaut (klarer Teil in der Mitte des Auges) aufgetragen werden, wodurch die Moleküle in das Auge eindringen können. Für die Behandlung einer Krankheit, die den hinteren Teil des Auges betrifft, kann es am wünschenswertesten sein, dass das antigenbindende Molekül in die Sklera eindringt, wenn es unter die Bindehaut oder um den Augapfel herum injiziert wird.

[0071] Die Verabreichung des antigenbindenden Moleküls kann nach einem vorbereitenden Schritt des Modulierens der Oberfläche des Auges zur Verbesserung der Penetration der Moleküle durchgeführt werden. Vorzugsweise wird die Epithelschicht, wie das Hornhautepithel, durch einen Penetrationsverstärker so moduliert, dass eine ausreichende und rasche Penetration der Moleküle möglich ist, wie es zum Beispiel oben beschrieben ist.

[0072] Alternativ dazu ist der Schritt der Verabreichung dadurch gekennzeichnet, dass man wenigstens einen Teil des Auges einer Iontophorese unterzieht, so dass das antigenbindende Molekül in einen gewünschten intraokulären Bereich eindringt. Zu den geeigneten Verfahren, die in dieser Hinsicht eingesetzt werden können, gehören diejenigen, die zum Beispiel von Behar-Cohen et al. (1998, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 39(6): 897–904) und Frucht-Pery et al. (1996, Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol. 234(12): 765–9) offenbart wurden.

[0073] Der Teil des Auges, in oder auf den das antigenbindende Molekül vorzugsweise verabreicht wird, ist der Teil, der ein Eindringen des antigenbindenden Moleküls ermöglicht. Wie oben beschrieben, wird die Verabreichung vorzugsweise auf der Hornhaut und Bindehaut durchgeführt, oder die Substanz kann in den subkonjunktivalen, peri- oder retrobulbären Raum injiziert werden, um nach der Penetration der Sklera das Innere des Auges zu erreichen.

[0074] Wir beschreiben ein Verfahren zur Diagnose eines Augenzustands, das Folgendes umfasst: das In-Kontakt-Bringen eines Teils eines Auges mit einem antigenbindenden Subimmunglobulin-Molekül, das gegenüber einem mit dem Zustand zusammenhängenden Antigen immuninteraktiv ist, und das Nachweisen der Anwesenheit eines Komplexes, der das antigenbindende Subimmunglobulin-Molekül und das Antigen umfasst.

[0075] In einem bevorzugten Aspekt umfasst das Verfahren das In-Kontakt-Bringen eines Teils eines Auges mit einem antigenbindenden Subimmunglobulin-Molekül, das gegenüber einem mit der Störung zusammenhängenden Antigen immuninteraktiv ist, und das Nachweisen der Anwesenheit eines Komplexes, der das antigenbindende Subimmunglobulin-Molekül und das Antigen umfasst.

[0076] Das Antigen, das den Zustand anzeigt, kann ein Antigen sein, das direkt oder indirekt mit dem Augenzustand assoziiert ist. Es kann sich um ein Zielantigen oder um ein Antigen eines Moleküls, das als Nebenprodukt des Augenzustands resultiert, handeln.

[0077] Die Anwesenheit oder Abwesenheit des Zielantigens im Auge kann bestimmt werden, indem man das antigenbindende Molekül an das Auge verabreicht, wie es zum Beispiel oben beschrieben ist. Vorzugsweise wird das antigenbindende Molekül als Augentropfen oder durch periokuläre Injektion an das Auge verabreicht.

[0078] Anschließend wird der Nachweis des Komplexes bestimmt. Jede geeignete Technik zur Bestimmung der Bildung des Komplexes kann verwendet werden. Zum Beispiel kann ein antigenbindendes Subimmunglobulin-Molekül gemäß der Erfindung, mit dem ein nachweisbarer Marker assoziiert ist, in Immunoassays verwendet werden, die auf den in-vivo-Nachweis des Zielantigens anwendbar sind. Immunoassays können gemäß dem in der Technik üblichen Verständnis kompetitive Assays einschließen.

[0079] Der mit dem antigenbindenden Molekül assoziierte Marker kann Folgendes beinhalten:

- (i) direkte Bindung des Markers an das antigenbindende Molekül;
- (ii) indirekte Bindung des Markers an das antigenbindende Molekül; d.h. Bindung des Markers an ein anderes Assayreagens, das anschließend an das antigenbindende Molekül bindet; und
- (iii) Bindung an ein anschließendes Reaktionsprodukt des antigenbindenden Moleküls.

[0080] Der Marker kann aus einer Gruppe ausgewählt sein, die ein Chromogen, einen Katalysator, ein Enzym, ein Fluorochrom, ein chemilumineszentes Molekül, ein Lanthaniden-Ion, wie Europium (Eu^{3+}), ein Radioisotop und einen direkten visuellen Marker umfasst.

[0081] Im Falle eines direkten visuellen Markers kann ein kolloidales metallisches oder nichtmetallisches Teilchen, ein Farbstoffteilchen, ein Enzym oder ein Substrat, ein organisches Polymer, ein Latexteilchen, ein Liposom oder ein anderes Vesikel, das eine signalproduzierende Substanz enthält, und dergleichen verwendet werden.

[0082] Eine große Zahl von Enzymen, die zur Verwendung als Marker geeignet sind, ist in den US-Patentschriften 4,366,241, 4,843,000 und 4,849,338 offenbart. Zu den geeigneten Enzymmarkern, die für die vorliegende Erfindung geeignet sind, gehören Alkalische Phosphatase, Meerrettich-Peroxidase, Luciferase, β -Galactosidase, Glucose-Oxidase, Lysozym, Malat-Dehydrogenase und dergleichen. Der Enzymmarker kann allein oder in Kombination mit einem zweiten Enzym, das in Lösung vorliegt, verwendet werden.

[0083] Zweckmäßigerweise wird das Fluorochrom aus der Gruppe ausgewählt, die Fluoresceinisothiocyanat (FITC), Tetramethylrhodaminisothiocyanat (TRITL) oder R-Phycoerythrin (RPE) umfasst.

[0084] Ein bevorzugtes Isotop für Bildgebungsanwendungen ist $^{99\text{m}}\text{Tc}$ wegen seiner physikalischen Eigenschaften, der Kosten, Verfügbarkeit und Sicherheit. Um die Markierung mit diesem radioaktiven Metall zu erleichtern, wurden antigenbindende Moleküle, wie scFv, mit einem kurzen Peptid fusioniert, das $^{99\text{m}}\text{Tc}$ innerhalb einer N_3S -Koordinationsstelle chelatisieren soll (Huston et al., 1996, Quarterly Journal of Nuclear Medicine, im Druck; George et al., 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92: 8358–8363). Das resultierende Molekül lässt sich

leicht in einer einstufigen Reaktion markieren, was ein hochgradig stabiles Produkt ergibt, das die Immunogenität des ursprünglichen scFv beibehält.

[0085] Die vorliegende Erfindung wird nun ausführlicher unter Bezugnahme auf die folgenden Beispiele beschrieben. Man sollte sich jedoch darüber im Klaren sein, dass die folgende Beschreibung nur zur Veranschaulichung dient und in keiner Weise als Einschränkung der Allgemeinheit der oben beschriebenen Erfindung angesehen werden sollte.

Beispiele

Beispiel 1

Intraokuläre Penetration von scFv-Antikörperfragmenten und zweiwertigen Miniantikörpern

Gestaltung und Expression von scFv-Antikörperfragmenten und zweiwertigen Miniantikörpern

[0086] Ausgangsmaterial für die Antikörpergestaltung war OX38, eine Hybridomzelllinie, die ganze Antikörper mit Bindungsspezifität gegen Ratten-CD4-Antigen produziert. Das Herstellungsverfahren für das scFv-Antikörperfragment folgte genau einer Technik, die von Kreber et al. (1997, J. Immunol. Methods 201(1): 35–55) und Plückthun et al. (Producing antibodies in Escherichia coli: from PCR to fermentation. In: McCafferty J., Hoo-genboom H., Chiswell D. (Hrsg.), Antibody engineering: A practical approach. Oxford: Oxford University Press, 1996: 203-252 (Hames B. (Hrsg.), Reihe "The practical approach")) beschrieben wurde. Kurz gesagt, mRNA wurde aus einer wachsenden Hybridomzelllinie extrahiert, und die mRNA wurde einer Reversen Transcription zu cDNA unterzogen. Die genetische Information für den variablen Teil der leichten und schweren Kette des Antikörpers wurde getrennt durch Polymerase-Kettenreaktionen (PCR) amplifiziert, wobei man einen erweiterten Primersatz verwendete, wie er von Kreber et al (loc. cit.) und Plückthun et al (loc. cit.) beschrieben wurde. Die DNA-Produkte für beide Ketten wurden zusammen gespleißt und in den pAK100-Vektor eingesetzt, der verwendet wurde, um E. coli JM83 (Spende von A. Plückthun) zu transformieren. scFv-Fragmente wurden in E. coli exprimiert und aus dem Kulturüberstand gewonnen. Diese Fragmente wurden in einem Durchflussscytometer auf ihre Bindungsaktivität getestet, wobei man Rattenthymocyten als Quelle für das Ratten-CD4-Antigen verwendete.

[0087] Für die Produktion im großen Maßstab wurde das für ein funktionelles scFv codierende Insert aus dem pAK100-Vektor geschnitten und in einen pHB400-Vektor integriert, der durch Integrieren der skp-Coexpressionscassette aus dem Vektor pHB110 (Bothmann et al., 1998, Nat. Biotechnol. 16(4): 376–80) in den Vektor pAK400 (Kreber et al., loc. cit.) abgeleitet war. Der Vektor pHB400 enthält einen starken Translationsstartbereich (Shine-Dalgarno-SDT7g10-Sequenz) für eine optimierte scFv-Expression, einen 6-Histidin-Tag für die Reinigung durch Ionenaffinitätschromatographie mit immobilisiertem Metall (IMAC) und eine Cassette für die Coexpression von skp, einem Chaperon, das die korrekte scFv-Faltung im periplasmatischen Raum verbessert.

[0088] Für die Expression von scFv-Fragmenten als zweiwertige Miniantikörper wurde das Insert mit der scFv-Sequenz in den Vektor pHB540 ligiert, einen Vektor, der konstruiert wurde, indem man die scFv-Dimerisierungscassette aus pAK500 (Kreber et al., loc. cit.) in den Vektor pHB400 addierte. Damit können scFv-Fragmente mit einem zusätzlichen Doppelhelixmotiv exprimiert werden, das von einem Antikörper-Scharnierbereich abgeleitet ist, der es ermöglicht, dass zwei einwertige Fragmente nichtkovalent unter Bildung eines zweiwertigen Miniantikörpers mit einer Größe von 66 kDa dimerisieren.

Fermentation von E. coli

[0089] E. coli HB2151 oder E. coli BL21 wurden mit den obigen Vektoren für die Expression von scFv oder Miniantikörper transformiert. Bakterienkulturen wurden in einem 20-l-Tischfermenter gezüchtet, der dem von Plückthun et al. (loc. cit.) beschriebenen ähnlich war, wobei Terrific-Broth-Komplexmedium verwendet wurde. Bei den Kulturen wurde bei 25 °C und einer optischen Dichte (OD_{600nm}) von 20 die Proteinexpression durch Zugabe von 0,1 mM IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid) induziert. Nach drei bis vier Stunden Expression wurden die Kulturen in einer Beckman-J21-Zentrifuge geerntet (4000 x g während 25 min bei 4 °C), und die Bakteriensedimente wurden entweder sofort verarbeitet oder bei -70 °C gelagert.

Reinigung von scFv und Miniantikörpern

[0090] Um korrekt gefaltete und funktionelle scFv oder Miniantikörper zu erhalten, wurden die Bakteriensedimente in 50 mM Natriumborat (NaBo), 0,15 M NaCl, pH 8,0, unter Verwendung von 2 ml Extraktionspuffer pro Gramm Sediment resuspendiert, und die Bakterien wurden durch Ultraschall in einem Manton-Gaulin-Durchflusshomogenisator lysiert. Das Lysat wurde 30 min lang bei 4 °C mit 13 000 x g zentrifugiert, bevor der scFv oder Miniantikörper enthaltende Überstand durch ein 0,2-µm-Filter passiert und mit 1% Triton X-100, 1% Tween-20 und 20 mM Imidazol ergänzt wurde. Das geklärte Lysat wurde auf eine IMAC-Säule mit einem Nickel-Nitrilotriessigsäure(Ni-NTA)-Harz (Qiagen, QIAexpressionist, Qiagen, Deutschland, 1999) geladen. Die Säule wurde mit 20 Säulenvolumina (CV) Äquilibrierungspuffer (50 mM NaBo, 1% Triton X-100, 1% Tween-20, 20 mM Imidazol, pH 8,0) und 5 CV 50 mM NaBo, 20 mM Imidazol, pH 8,0, gewaschen. Gebundenes Protein wurde unter Verwendung eines linearen Imidazolgradienten von 20–500 mM über 10 CV von der Säule eluiert. Proteinhaltige Fraktionen wurden vereinigt und auf eine Q-Sepharose-HP-Anionenaustauschersäule geladen und mit 20 mM HEPES-Puffer (N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N'-[4-butansulfonsäure]), pH 8,0, äquilibriert. Ungebundenes Protein wurde mit 3 CV Äquilibrierungspuffer ausgewaschen, bevor gebundenes Protein in 20 mM HEPES, pH 8,0, mit einem linearen NaCl-Gradienten von 0–1 M über 7 CV eluiert wurde. Fraktionen, die die gereinigten scFv oder Miniantikörper enthielten, wurden vereinigt, sterilfiltriert und bei 4 °C gegen 2 x 150 Volumina 20 mM HEPES, pH 8,0, 0,15 mM NaCl, dialysiert. Während des Reinigungsvorgangs wurden immer wieder Proben genommen und mit Hilfe von SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) analysiert. In einer bevorzugten Ausführungsform werden die gereinigten Moleküle unter Verwendung des Verfahrens von Chapman et al. (1999, Nature Biotechnology 17: 780-783) mit Monomethoxypolyethylen-glycol (PEG) chemisch modifiziert, um ihre Halbwertszeit zu verlängern.

Testen der scFv auf Antigenbindung

[0091] Alle Tests mit scFv-Fragmenten auf Antigenbindung wurden mittels Durchflusszytometrie an Ratten-Thymocyten durchgeführt. Thymocyten-Suspensionen wurden mit Standardvorschriften aus frisch geerntetem Rattenthymusgewebe hergestellt. Thymocyten (5×10^5), die in 50 µl RPMI-Kulturmedium suspendiert waren, wurden pro Assayröhrchen verwendet. Hochempfindliche durchflusszytometrische Assays wurden bei 4 °C durchgeführt, wobei man Inkubationsschritte von 30 Minuten für scFv (50-µl-Probe), Anti-Poly-His-Maus-Antikörper (50 µl verdünnt 1:200, Sigma), biotinylierten Ziegen-Anti-Maus-Antikörper (50 µl verdünnt 1:50, Vector) und Streptavidin-R-Phycoerythrin-Konjugat (50 µl verdünnt 1:50, Sigma) verwendete. Die Zellen wurden zwischen den Inkubationen mit 30 Volumina PBS-Azid gewaschen. Die Assays wurden durch Zugabe von 50 µl Fixierer (PBS, 0,5% Formaldehyd) fixiert und in einem Durchflusszytometer abgelesen.

Hornhautpenetrationsexperimente

Hornhautgewebe

[0092] Die Penetration von scFv, Miniantikörpern und ganzen IgG-Antikörpern wurde an Augen von normalen 8–14 Monaten alten Schweinen getestet, die 2–5 Stunden vor den Experimenten in einem nahegelegenen Schlachthof zum menschlichen Verzehr getötet wurden. Ein einzelnes menschliches Auge, das für die klinische Verwendung zur Transplantation nicht geeignet war, wurde von der lokalen Augenbank erhalten und innerhalb von 2 Stunden nach der Entkernung verwendet. Vier Hornhäute von Katzen, die im Tierheim des Institute for Medical and Veterinary Sciences (Adelaide, South Australia) gehalten und aus anderen experimentellen Gründen getötet wurden, wurden innerhalb von 3 Stunden nach der Entkernung verwendet.

[0093] Korneosklerale Scheiben wurden mit Hilfe von Standard-Augenbanktechniken herausgeschnitten. Es wurde besonders darauf geachtet, eine Verzerrung der Hornhäute während der Gewebepreparation oder Montierung auf den Kammern zu verhindern, da dies die Integrität der Barrierefunktion beeinflussen könnte. In denjenigen Augen, die nur zur Untersuchung der Stromapenetration verwendet wurden, wurde das Hornhautepithel mit einem 11er Skalpell und einem trockenen Wattestäbchen sorgfältig entfernt, bevor die korneosklerale Scheibe präpariert wurde.

Aufbauten zur Hornhautpenetration

Hornhautperfusionskammern

[0094] Die in-vitro-Penetration von scFv durch Katzen- und Schweinehornhäute wurde in einer Hornhautperfusionskammer untersucht ([Fig. 2](#)). Die Perfusionskammer besteht aus 3 Teilen: dem Hauptkörper, einer

Spannhülse und einem Fixierring, wobei alle Teile aus Polycarbonat bestanden (hergestellt vom Centre of Biomedical Engineering, Flinders Medical Centre, Adelaide). Die "Schultern" des Hauptkörpers, die die hintere Seite der Klammer bilden, sind um 30° gewinkelt, um die natürliche Krümmung von Hornhäuten von verschiedenen Spezies, wie Mensch, Schweinen und Katzen, zu stützen. Der zentrale Hohlraum, der zusammen mit der montierten Hornhaut die Kammer auf der Empfängerseite bildet, ist 12 mm im Durchmesser und 3 mm tief. Der Hauptkörper beherbergt auch die Kanäle für das Ein- und Ausströmen der Perfusionsleitungen. Die Spannhülse, die die Hornhaut von der Epithelseite her auf den Hauptkörper klemmt, weist zwei Edelstahl-Führungsstifte auf, die die senkrechte Bewegung ohne Verdrehung lenken, um mögliche Scherspannungen und Beschädigungen des Rands der Hornhaut während des Zusammensetzens zu verhindern. Die Spannhülse enthält auch einen Fluidkanal, durch den aufgetragene Augentropfen angesaugt werden können, um den Tränenabfluss nachzubilden. Die Hornhaut und die Spannhülse auf ihrer Oberfläche werden durch den Fixierring gegen den Hauptkammerkörper gepresst, der ein feines Gewinde (Ganghöhe 1 mm) aufweist, um eine sehr genaue Justierung der Spannkraft zu ermöglichen. Sobald die Hornhaut richtig montiert ist, wird die ganze Kammer an einem Wärmetauscherblock befestigt, durch den warmes Wasser aus einem Wasserbad zirkuliert.

Bewertung des Hornhautgewebes

[0095] Die Lebensfähigkeit des Gewebes wurde während allen Experimenten routinemäßig alle 30 min bewertet, indem man die Hornhautdicke mit einem Handpachymeter (BVI-Taschenpachymeter, B.V. International, 63100 Clermont-Ferrand, Frankreich) maß. Zu Beginn jedes Experiments wurden die Hornhäute eine Stunde lang perfundiert, und in drei oder mehr verschiedenen Messungen während der zweiten 30 Minuten wurden die Grundlinienwerte der Hornhautdicke festgestellt. Eine Erhöhung der Dicke um mehr als 10% gegenüber den Grundlinienwerten während der anschließenden Experimente wurde als Dysfunktion des Endothels angesehen, und die Hornhaut wurde verworfen.

[0096] Die experimentellen Wirkstoffe, wie scFv, Miniantikörper, ganze IgG-Antikörper oder Fluorescein, in reiner Form oder ergänzt mit verschiedenen Penetrationsverstärkern wurden alle 20 bis 30 Minuten als Augentropfen auf die Epithelseite der Hornhaut verabreicht. Auf der Empfängerseite der Hornhaut bildete die Perfusionskammer einen künstlichen intraokulären Raum, der mit BSS-Plus (Alcon) gefüllt wurde. Das Gesamtvolumen der BSS-Plus-Lösung, die kontinuierlich durch das künstliche Auge und das Reservoir zirkulierte, betrug 4 ml. Durch Anheben des Lösungsreservoirs bis 25 cm oberhalb des Niveaus des künstlichen Auges entstand innerhalb der Kammer ein Überdruck von 12 mm Hg, wodurch physiologische Bedingungen simuliert wurden ([Fig. 2](#)).

[0097] Um die Wirkstoffpenetration zu bewerten, wurden stündlich Proben von 100 µl auf der Empfängerseite aus der zirkulierenden Flüssigkeit entnommen und durch dasselbe Volumen frisches BSS-Plus ersetzt. Die Penetration von scFv, Miniantikörper und ganzem IgG-Antikörper wurde mittels Standard-Durchflussscytometrie bestimmt (Zola et al., 1990, 7. Immunol. Methods 135(1–2): 247–55), wobei Rattenthymocyten als Quelle für CD4-Antigen und ein sekundärer Maus-Anti-Poly-His-Tag-Antikörper (Sigma) verwendet wurden. Die Penetration von Natriumfluorescein wurde bewertet, indem man die Extinktion bei 493 nm unter Verwendung eines ELISA-Ablesegeräts mit den geeigneten Filtern maß.

Aufbau zur Penetration des ganzen Auges

[0098] Ganze Menschen- oder Schweineaugen mit intaktem Bindegewebe wurden auf einem Teflon-Block mit einer in die Teflonoberfläche geätzten Vertiefung positioniert, so dass die nach unten weisende Hornhaut in eine Vertiefung gelegt werden konnte ([Fig. 3](#)). Die Vertiefung wurde teilweise mit 100 µl scFv oder Miniantikörpern gefüllt. Es wurde darauf geachtet, dass kein anderes Gewebe außer der Hornhaut mit dem Wirkstoff in Kontakt kam. Das ganze Auge wurde mit einem umgedrehten Kunststoffbehälter bedeckt, so dass eine feuchte Kammer entstand, und der Aufbau wurde über ein Wasserbad gebracht, um das Auge auf einer Temperatur von 35 bis 37 °C zu halten. Am Ende der Inkubationszeit wurde der gesamte Augapfel mehrmals mit BSS gewaschen, mit einem Papiertuch getrocknet und erneut gewaschen. Proben der Flüssigkeit der vorderen Kammer wurden mit einer 27G-Spritzennadel genommen, die durch die Hornhaut in die vordere Kammer geführt wurde. Die Konzentration des eingedrungenen scFv und Miniantikörper wurde wie beim Perfusionskammeraufbau in einem FACS-Assay bewertet.

[0099] Am Ende aller Experimente wurden die Hornhäute in gepuffertem Formalin (10% Formalin in PBS) fixiert und in Paraffin eingebettet. Standard-10-µm-Schnitte wurden mit PAS angefärbt und unter einem Mikroskop untersucht.

Ergebnisse

Reinigung von scFv und Miniantikörper

[0100] Das Eluat aus der Nickel-NTA-Reinigungssäule hatte eine Proteinkonzentration von 0,5 mg/ml mit einer Reinheit von 52% für das OX38-scFv bzw. eine Proteinkonzentration von 0,74 mg/ml mit einer Reinheit von 21% für den OX38-Miniantikörper. Die anschließende Reinigung über einer Q-Sepharose™-Anionenaustauschersäule führte zu einer endgültigen scFv-Konzentration von 3,98 mg/ml mit einer Reinheit von 98% und einer Miniantikörperkonzentration von 1,83 mg/ml und einer Reinheit von 75%. Die zweistufige Reinigungsvorschrift über eine Nickel- und eine anschließende Ionenaustauschersäule führte zu einer Reinheit klinischer Qualität mit Endotoxinkonzentrationen von nur 1,08 Endotoxineinheiten (EU) pro mg scFv und 36 EU/mg Miniantikörper.

[0101] Nach dem ersten Reinigungsschritt über die Nickelsäule waren die Hauptkontaminanten in der scFv-Charge Rotamase (Peptidyl-Propyl-cis-trans-Isomerase SLYD) und das histonartige Protein HLP1. Rotamase ist ein histidinreiches Protein, das wahrscheinlich unabhängig von den scFv-Fragmenten auf der Nickelsäule mitgereinigt wurde. Es wurde durch die anschließende Reinigung über die Q-Sepharose-Säule effektiv entfernt. Die zweite Kontaminante HLP1 enthält weder Histidin, Cystein noch Tryptophan. Es wurde daher die Hypothese aufgestellt, dass HLP1 entweder an das scFv oder an die Rotamase gebunden war, um seine Mitreinigung in der Nickelsäule zu ermöglichen. Da HLP1 einen isoelektrischen Punkt von 9,5 hat, erwarteten wir, dass diese Kontaminante durch Anionenaustauscherchromatographie über Q-Sepharose™ bei pH 8,0 entfernt werden würde. HPL1 wurde jedoch auch nach diesem chromatographischen Schritt noch im Endprodukt gefunden, was darauf hinweist, dass es an einen Teil des OX38-scFv-Fragments gebunden durch den Reinigungsvorgang geschleppt worden sein muss. HLP1 hat eine Größe von 15,6 kDa, was die effektive Größe von kontaminierten scFv-Molekülen auf 43 kDa erhöht.

[0102] Die in dieser Studie für Penetrationsexperimente verwendeten scFv-Fragmente wurden über eine Nickelsäule nur mit einer endgültigen scFv-Konzentration von 0,2 bis 0,25 mg/ml gereinigt. Die für das Penetrationsexperiment verwendeten Miniantikörper durchliefen die volle zweistufige Reinigungsvorschrift mit einer endgültigen Miniantikörperkonzentration von 1,8 mg/ml.

ScFv-Spezifität für Ratten-CD4-Antigen

[0103] Die scFv-Bindung an Ratten-CD4-Antigen wurde in einem Durchflussscytometrieassay unter Verwendung von Rattenthymocyten getestet. Mehr als 95% aller Thymocyten exprimierten CD4-Antigen auf ihrer Oberfläche, was in einem Durchflussscytometrieassay mit OX38, einem ganzen monoklonalen Antikörper, gezeigt wurde. OX38 bindet spezifisch an Ratten-CD4. Das CHRI-r4-Fv1-scFv band in identischer Weise an alle Thymocyten. Die maximale Fluoreszenzintensität von Proben mit CHRI-r4-Fv1-scFv betrug etwa zwei Drittel der bei OX38 gefundenen Intensität. Die Fluoreszenzintensität in einer Verdünnungsreihe nahm bei OX38-Antikörpern und CHRI-r4-Fv1-scFv in einem identischen Muster ab, was ähnliche Bindungseigenschaften anzeigt ([Fig. 4](#)).

[0104] Um eine CD4-unabhängige oder unspezifische Bindung von CHRI-r4-Fv1-scFv an Zellmembranen auszuschließen, wurden Durchflussscytometrieassays mit Jurkat-Zellen (einer humanen T-Zelllinie) und J5.CD4 (transfizierte Jurkat-Zelllinie, die auf ihrer Oberfläche Ratten-CD4 in voller Länge exprimierte) durchgeführt. CHRI-r4-Fv1-scFv zeigte keine unspezifische Bindung, wie durch negative Durchflussscytometrieassays unter Verwendung von Jurkat-Zellen gezeigt wurde. Die Spezifität der Bindung an Ratten-CD4 wurde in einem Durchflussscytometrieassay an transfizierten J5.CD4 nachgewiesen, wo scFv in ähnlicher Weise wie OX38 band.

Hornhautpenetration von scFv (28 kDa)

[0105] Die Penetration des Hornhautstromas durch scFv wurde in einer ersten Gruppe von Experimenten unter Verwendung der Hornhautperfusionskammer getestet. Das Hornhautepithel wurde vor dem Experiment entfernt. Wie in [Fig. 5](#) gezeigt ist, drang das scFv erfolgreich durch das Stroma von Schweinehornhäuten und behielt seine spezifische antigenbindende Aktivität bei. Es gab ein vierstündiges Intervall zwischen dem ersten Abfall von scFv auf der Spenderseite und dem Nachweis einer eindeutigen Bindungsaktivität auf der Empfängerseite.

[0106] Der pH-Wert des Puffers, in dem ein Wirkstoff gelöst ist, kann die Löslichkeit und Hornhautpenetration

eines Wirkstoffs häufig beeinflussen. Das OX38-scFv hat einen isoelektrischen Punkt von 6,1, ein pH-Wert, bei dem erwartet wird, dass die scFv-Penetration am schlechtesten ist. Wir untersuchten daher die Penetration des OX38-scFv-Fragments durch Schweinehornhautstroma bei pH 8,0, 7,0 und 3,5. Während eine Erhöhung des pH-Werts von 7,0 auf 8,0 zu einer beschleunigten Penetration führte, verursachte eine Senkung des pH-Werts weg vom isoelektrischen Punkt auf 3,5 zu einer Reduktion der Penetration ([Fig. 6](#)).

[0107] Um eine speziesunabhängige Stromapenetration nachzuweisen, wurde das Experiment mit einer normalen Katzenhornhaut wiederholt. Ergebnisse von der Perfusionskammer zeigten bei Katzen eine ähnliche Penetration von scFv wie bei Schweinen. Die scFv-Bindungsaktivität nach der Penetration durch die um 25% dünnere Katzenhornhaut wurde nach 2 Stunden nachweisbar ([Fig. 7](#)).

[0108] Um zu beweisen, dass diese positiven Penetrationsergebnisse nicht durch eine Gewebebeschädigung an den eingespannten Rändern der Hornhaut oder durch ein Durchsickern um die montierte Hornhaut herum, das eine Stromapenetration simuliert haben könnte, verursacht wurde, wurden ganze OX38-IgG-Antikörper als negative Kontrolle verwendet. Wegen ihrer Molekülgröße von etwa 150 kDa wird nicht erwartet, dass ganze Antikörper durch das Stroma dringen. Dies ist eindeutig größer als der molekulare Schwellenbereich von 60–90 kDa für die Stromapenetration. Monoklonale Antikörper in einer Konzentration, die in einer Verdünnung von 1 Teil in 2 Millionen einen positiven Nachweis ermöglicht, wurden alle 20 Minuten als Augentropfen verabreicht. Während der Probenahmezeiten von bis zu 14 Stunden wurde auf der Empfängerseite keine Bindungsaktivität gefunden ([Fig. 6](#) und [Fig. 10](#)).

[0109] Penetrationsexperimente in den Perfusionskammern ermöglichen eine Untersuchung von individuellen Hornhäuten über eine längere Zeit hinweg, wobei auf der Empfängerseite wiederholt Proben genommen wurden, um die Kinetik des Penetrationsvorgangs zu bewerten. Da die Fragmente, die durch die Hornhaut in die Perfusionskammern eingedrungen sind, jedoch in einem großen Volumen (4 ml) verdünnt werden, unterschätzen die Ergebnisse die Konzentration von scFv und der Miniantikörper, die in einem echten Auge mit einem Volumen der vorderen Kammer von 0,3 bis 0,5 ml erreichbar sind. Um einen groben Vergleich der in den Perfusionskammerexperimente erhaltenen Penetrationsergebnisse mit den erwarteten Werten in einem Auge eines lebenden menschlichen Wesens zu ermöglichen, wurden zusätzliche Penetrationsexperimente in den Perfusionskammern unter Verwendung von Natriumfluorescein-Augentropfen durchgeführt. Natriumfluorescein ist ein Molekül von 332 Da, dessen Penetration in das menschliche Auge in vivo ausführlich untersucht wurde. Nach einem einzelnen Tropfen von 2% (w/v) Fluorescein wird der Wirkstoff nach 30 Minuten im menschlichen Auge nachweisbar (Araie et al., 1983, Jpn. J. Ophthalmol. 27(3): 421–33). Eine Wiederholung der Verabreichung von Fluorescein verursacht eine weitere wesentliche Erhöhung der Menge, die man in der vorderen Kammer findet (Adler et al., 1971, Exp. Eye Res. 11(1): 34–42). Um die bei Schweineaugen erhaltenen scFv-Penetrationsergebnisse vergleichen zu können, wurde eine Schweinehornhaut mit normalem Epithel 14 Stunden lang alle 20 Minuten mit Augentropfen mit 2% Fluorecein behandelt. 100-µl-Proben wurden in derselben Weise wie bei den scFv- und Miniantikörper-Experimenten aus dem Kammerreservoir entnommen. Die Konzentration von Natriumfluorescein wurde mit einem ELISA-Ablesegerät bei 492 nm mit einer Nachweis-schwelle von 2 ppm bestimmt.

[0110] Auf der Empfängerseite der Schweinehornhaut wurde Natriumfluorescein erst nach 3 Stunden nachweisbar, mit einer anschließenden exponentiellen Erhöhung während des Rests des Experiments, wie in [Fig. 8](#) gezeigt ist.

[0111] Um eine bessere Schätzung der scFv-Konzentration, die in einem normalen Auge erreichbar ist, zu ermöglichen, wurde die scFv-Penetration auch im Modell des ganzen Auges getestet. In diesem Modell kann aus jedem Auge nur einmal eine Probe entnommen werden, was viele Augen mit unterschiedlichen Einwirkungszeiten erfordert, um kinetische Informationen zu erhalten. Da das vordere Segment des Auges jedoch im physiologischen Sinn eine wohldefinierte Struktur mit einer nur minimalen pharmakologischen Wechselwirkung mit dem Rest des Körpers ist, reflektieren Ergebnisse aus solchen Experimenten mit ganzen Augen das Ausmaß der Penetration, das in vivo erreichbar ist, genauer.

[0112] Für dieses Experiment wurde das Hornhautepithel eines ganzen Schweineauges entfernt, und die Hornhaut wurde 7 Stunden lang in OX38-scFv-haltiges Teflon eingetaucht. Nachdem die Oberfläche gründlich gereinigt wurde, wurde eine 100-µl-Probe von Flüssigkeit der vorderen Kammer durch eine Spritze mit einer 27G-Nadel erhalten. Die Bindungsaktivität wurde in einem FACS-Assay an Ratten-Thymocyten mit einer Nachweis-schwelle von 1 Teil auf 2000 (500 ppm) getestet. Die Flüssigkeit der vorderen Kammer, von der nach 7 Stunden eine Probe entnommen wurde, zeigte eine starke Bindungsaktivität, die einer scFv-Konzentration von 1 Teil auf 250 äquivalent war ([Fig. 9](#)).

[0113] Die Kinetik der scFv-Penetration durch das Hornhautepithel wurde in den Perfusionskammern unter Verwendung von intakten Hornhäuten näher untersucht. Es gab über einen Penetrationszeitraum von 8 Stunden hinweg keine nachweisbare Bindungsaktivität, wenn scFv in reiner PBS-Lösung (pH 7,2–7,4) als Augentropfen angewendet wurde. Wenn die scFv/PBS-Lösung mit 0,01% Benzalkoniumchlorid, einem häufig verwendeten Konservierungsmittel für Augentropfen, ergänzt wurde, wurde bei Schweinehornhäuten am Ende der achtstündigen Probenahmezeit eine schwache Bindungsaktivität beobachtet (Daten nicht gezeigt).

[0114] Dasselbe Experiment wurde mit scFv in PBS bei einem pH-Wert von 8,0 (eingestellt mit 1 M NaOH) wiederholt. Unter diesen Bedingungen drang scFv auch ohne einen Penetrationsverstärker durch ein gesundes Epithel und Stroma, was eine steigende Bindungsaktivität auf der Empfängerseite nach 8 Stunden zeigt. Die Zugabe von 0,5% Caprinsäure führte zu einer erleichterten Hornhautpenetration, wobei nach 6 Stunden eine steigende Bindungsaktivität nachweisbar ist ([Fig. 10](#)).

Hornhautpenetration von OX38-Miniantikörpern (66,8 kDa)

[0115] Die Penetration von OX38-Miniantikörpern mit einer Molekülgröße von 66,8 kDa durch das Hornhautstroma wurde genauso getestet wie die der einwertigen scFv-Fragmente in der Perfusionskammer. Während der gesamten Versuchszeit von 14 Stunden konnte keine Penetration von ganzem OX38-IgG-Antikörper nachgewiesen werden, der als negative Kontrolle verwendet wurde. Dagegen wurde die OX38-Miniantikörperbindung nach 3 Stunden positiv, mit einer weiteren exponentiellen Zunahme, bis der Fluocytometerassay mit der Probe von 8 Stunden und den anschließenden Proben eine Sättigung erreichte ([Fig. 11](#)).

[0116] Die Penetration von OX38-Miniantikörper ohne Penetrationsverstärker durch eine Schweinehornhaut mit einer intakten Epithelbarriere war viel langsamer und wurde erst nach 11 Stunden schwach nachweisbar.

[0117] Wie bei dem einwertigen scFv wurde die erreichbare Konzentration von Miniantikörpern in der vorderen Kammer eines normalen Auges im Modell des ganzen Auges untersucht. Aus Schweineaugen, von denen das Hornhautepithel entfernt worden war, wurde zum ersten Mal nach 3 Stunden eine Probe entnommen, die bereits die Hälfte der maximalen Signalintensität zeigte. Proben nach 5 bzw. 7 Stunden Miniantikörperwirkung zeigten eine Bindungsaktivität innerhalb des Bereichs eines maximalen Testsignals. Anschließend wurden sechs Schweineaugen mit einer normalen Epithelbarriere Miniantikörpern ausgesetzt, die mit 0,5% Caprinsäure ergänzt waren. Die Miniantikörper-Bindungsaktivität wurde bei Augen, aus denen nach 5 Stunden Einwirkungszeit eine Probe entnommen wurde, eindeutig nachweisbar, und die Aktivität nach 7 bzw. 8 Stunden war nur minimal geringer als bei Augen ohne eine Epithelbarriere ([Fig. 12](#)).

[0118] Die Bedingungen, die die größte Herausforderung darstellten, waren in allen obigen Experimenten die Penetration der relativ großen Miniantikörper durch Hornhäute mit einer intakten Epithelbarriere. Alle diese Ergebnisse wurden bei jungen Schweineaugen erhalten, die ein um 25% dickeres Stroma haben als menschliche Hornhaut. Die wichtigste Penetrationsbarriere ist jedoch die Epitheloberfläche, und die Kenntnis der Ultrastruktur dieser Barriere in Schweineaugen ist beschränkt. Um die obigen Penetrationsergebnisse, die mit Schweine- und Katzenaugen erhalten wurden, mit der potentiellen Penetration von Subimmunglobulin-Fragmenten durch eine menschliche Hornhaut zu vergleichen, wurden bei einem frischen menschlichen Auge die Bedingungen verwendet, die die größte Herausforderung darstellten. Dieses Auge mit einem intakten Epithel wurde im Aufbau für das ganze Auge mit OX38-Miniantikörper behandelt. Die Hornhaut wurde fünf Stunden lang 100 µl der Standard-Miniantikörper-Konzentration von 1,8 mg/ml, ergänzt mit 0,5% Caprinsäure, bei pH 8,0 ausgesetzt. Die intraokuläre Probe, die nach 5 Stunden erhalten wurde, zeigte im Fluocytometer eine maximale Signalintensität mit vollständiger Sättigung von $1,5 \times 10^6$ Thymocyten pro ml. Eine Titration der Bindungsaktivität in dieser Probe zeigte eine Miniantikörperkonzentration von 0,8 µg/ml in der vorderen Kammer dieses untersuchten menschlichen Auges ([Fig. 13](#) und [Fig. 14](#)).

Diskussion

[0119] Diese Studie beweist, dass künstlich gestaltete rekombinante Antikörperfragmente nach topischer Verabreichung als Augentropfen erfolgreich durch die Hornhaut dringen und das Innere des Auges erreichen können. Außerdem behalten diese Fragmente ihre volle Antigenbindungsaktivität bei, was die Möglichkeit eines auf Antikörpern beruhenden therapeutischen und diagnostischen Eingriffs im Auge bietet. Gleichzeitig hat diese Studie wie viele andere zuvor (Verhagen et al., 1990, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 31(8): 1519–25; Osusky et al., 1993, Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol. 231(2): 122–8) gezeigt, dass natürlich vorkommende ganze Antikörper die Hornhaut nicht oder wenigstens nicht in einer therapeutisch nützlichen Weise durchdringen und dass der Schwellenwert für die maximale Molekülgröße, der noch eine Penetration durch die Hornhaut er-

laubt, viel kleiner ist als die 500 kDa, die man in einer häufig zitierten, aber nie wiederholten Studie findet (Maurice D., Mishima S., *Ocular Pharmacokinetics*, Springer-Verlag Berlin, 1984, Sears M. (Hrsg.) *Pharmacology of the Eye*).

[0120] Die Hornhaut enthält zwei wichtige Penetrationsbarrieren, das oberflächliche Hornhautepithel und das Hornhautstroma. Das Hornhautepithel bildet eine starke Penetrationsbarriere für alle lipophilen Moleküle außer den kleinen. Größere Moleküle müssen durch den interzellulären Raum dringen, der normalerweise durch feste Verbindungen blockiert ist (Maurice D.M., 1980, *Int. Ophthalmol. Clin.* 20(3): 7–20; Burstein et al., 1985, *J. Ocul. Pharmacol.* 1(3): 309–26). Poren innerhalb dieser engen Verbindungen ermöglichen die Penetration von Molekülen bis zu einer Größe von 1–5 kDa (Edelhauser et al., 1998, *Adv. Exp. Med. Biol.* 438: 265–71). Die Penetrationsbarriere des Hornhautepithels hängt von gesunden zellulären Strukturen ab. Es ist wohl bekannt, dass die Epithelbarrierefunktion beim Menschen durch Alterung (Chang et al., 1993, *Cornea* 12(6): 493–9 [siehe Kommentare]) und viele häufige Krankheiten, wie Diabetes oder trockene Augen (Gobbels et al., 1989, *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 227(2): 142–4; Yokoi et al., 1998, *Br. J. Ophthalmol.* 82(7): 797–800), erheblich reduziert wird. Außerdem haben mehrere Studien gezeigt, dass chirurgische Eingriffe, wie Hornhauttransplantation (Shimazaki et al., 1999, *Cornea* 18(5): 559–64; Chang et al., 1994, *Ophthalmic Res.* 26(5): 283–9) oder Trabeculektomien (Tanihara et al., 1997, *Am. J. Ophthalmol.* 123(4): 487–93) zur Behandlung von Glaukomen, zu einem Monate oder sogar Jahre dauernden Zusammenbruch der Barrierefunktion führen.

[0121] Die zweite Barriere, das Hornhautstroma, erlaubt die Penetration von größeren Fragmenten, und es wurde beschrieben, dass es die Penetration von Molekülen bis zu 500 kDa oder noch größerer Moleküle erlaubt, wenn das Gewebe ödematös wird (Burstein et al., 1985, loc. cit.). Die Zahl von 500 kDa ist jedoch aus einer einzigen Studie abgeleitet, die in der Literatur ohne Gutachterverfahren (Peer Review) veröffentlicht wurde (Maurice et al., 1984, loc. cit.). Tatsächlich galten mehrere Studien der Penetration von IgG-Antikörpern mit einer Größe von 150 kDa. Diese Studien haben wiederholt gezeigt, dass Moleküle dieser Größe nicht durch die Hornhaut dringen oder nur mit einer äußerst geringen Geschwindigkeit hindurchdringen, die einen Zeitraum von 1–2 Wochen erfordert, um das Hornhautstroma zu durchdringen (Verhagen et al., 1990, loc. cit.; Osusky et al., 1993, loc. cit.). Im Gegensatz zur Epithelbarriere gibt es keine bekannten Penetrationsverstärker, die die Wirkstoffabgabe durch das Hornhautstroma verbessern.

[0122] Die oben vorgestellten Daten beweisen, dass rekombinante Antikörperfragmente wenigstens bis zu einer Größe von 66 kDa schnell durch das Hornhautstroma dringen können und innerhalb des Auges ihre volle Antigenbindungskapazität beibehalten. Die Penetration dieser Antikörperfragmente scheint speziesunabhängig zu sein, da die Penetration bei Schweinen, Katzen und Menschen dokumentiert werden konnte. Die Penetration des Stromas durch einen Wirkstoff hat eine umgekehrte lineare Korrelation mit der Stromadicke und Wirkstoffgröße und eine direkte Korrelation mit der Wirkstoffkonzentration (Burstein et al., 1985, loc. cit.). Die schnellere Penetration von scFv durch die um 25% dünnere Katzen und Menschenhornhaut als durch die Schweinehornhaut scheint in guter Übereinstimmung mit dem obigen Ergebnis zu sein. Die Tatsache, dass der zweieinhalbmal so große Miniantikörper auf der Empfängerseite der Hornhautperfusionskammer nach einem ähnlichen Zeitintervall wie das kleine scFv-Fragment nachgewiesen wurde, ist wahrscheinlich auf die sieben- bis achtmal höhere Konzentration von Miniantikörpern in den Augentropfen zurückzuführen, die in dieser Studie verwendet wurden. Daher führt eine Erhöhung der scFv-Konzentration, wie wir mit dem zweistufigen Reinigungsvorgang für Material mit klinischer Qualität nachgewiesen haben, wahrscheinlich zu noch höheren intraokulären Konzentrationen als denjenigen, die in der vorliegenden Studie gefunden werden.

[0123] Wie oben erwähnt, ist das oberflächliche Epithel die stärkere Barriere gegen Wirkstoffpenetration, und es ist daher keine Überraschung, dass die Penetration von scFv und Miniantikörper-Fragmenten durch Hornhäute mit einer intakten Epithelbarriere erheblich langsamer erfolgt. Tatsächlich ist es ziemlich überraschend, dass gezeigt werden konnte, dass scFv und Miniantikörper überhaupt durch eine intakte Epithelbarriere dringen, wenn auch mit einer sehr geringen Geschwindigkeit. Die Epithelbarriere stört jedoch sogar viel kleinere Moleküle in einem solchen Ausmaß, dass die meisten der zur Zeit verwendeten ophthalmischen Wirkstoffe mit irgendeiner Form von Penetrationsverstärker ergänzt werden. Diese Penetrationsverstärker funktionieren dadurch, dass sie die festen Verbindungen der obersten Epithelzellen lockern (Burstein N.L., 1985, *Trans. Ophthalmol. Soc. UK* 104 (Pt 4): 402–9; Ashton et al., 1991, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 259(2): 719–24; Green et al., 1971, *Am. J. Ophthalmol.* 72(5): 897–905). Der am häufigsten verwendete Penetrationsverstärker ist Benzalkoniumchlorid (Tang et al., 1994, *J. Pharm. Sci.* 83(1): 85–90; Burstein N.L. et al., 1980, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 19(3): 308–13), das auch als Konservierungsmittel gegen mikrobielle Kontamination wirkt. Es wird gewöhnlich bis zu einer endgültigen Konzentration von 0,01 bis 0,05% hinzugefügt. Ein zukünftiges pharmazeutisches Präparat von rekombinanten Antikörperfragmenten in Form von Augentropfen wird unabhängig von ihren Epithel-Penetrationseigenschaften Konservierungsmittel benötigen. Wir ergänzten daher einige der scFv

und der Miniantikörperfragmente in dieser Studie mit 0,5% Caprinsäure, einem normalen Milchproduktbestandteil, das zu einer reversiblen Erhöhung der Permeabilität der festen Verbindung in der Darmschleimhaut sowie im Hornhautepithel führt (Morimoto et al., 1989, Arch. Int. Pharmacodyn. Ther. 302: 18–26; Soderholm et al., 1998, Dig. Dis. Sci. 43(7): 1547–52; Sasaki et al., 1995, Pharm. Res. 12(8): 1146–50). Caprinsäure verbesserte die Penetration von scFv und Miniantikörper durch ein intaktes Epithel beträchtlich. Im Gegensatz zu anderen Penetrationsverstärkern, wie Benzalkoniumchlorid, Digitonin oder Tween 20, zeigten Hornhäute, die mit 0,5% Caprinsäure behandelt worden waren, keine Epithelveränderungen, wenn sie mit herkömmlichen histologischen Verfahren untersucht wurden.

[0124] Das einzelne menschliche Auge, das für diese Penetrationsexperimente erhalten werden konnte, erhielt Miniantikörper, die mit 0,5% Caprinsäure ergänzt waren. Die Miniantikörper-Bindungsaktivität, die man nach 5 Stunden in der Flüssigkeit der humanen vorderen Kammer findet, überstieg die Penetration, die man nach derselben Zeit bei Schweineaugen findet, bei weitem. Dies könnte eine primär niedrigere Penetrationsbarriere dieser 77 Jahre alten menschlichen Hornhaut im Vergleich zu den 8–14 Monate alten Schweineaugen oder eine allgemein bessere Wirkung von Caprinsäure bei menschlichen Hornhäuten widerspiegeln. Dies bleibt jedoch Spekulation, bis mehr menschliche Augen untersucht worden sind.

[0125] Alles in allem zeigt diese Studie, dass scFv-Antikörperfragmente in das Auge eindringen können, wenn sie als Augentropfen verabreicht werden. Dadurch sind sie ein potentieller Kandidat für eine neue Klasse von Wirkstoffen für die Behandlung von vielen ophthalmischen Krankheiten, insbesondere für die Prävention und Behandlung von Hornhauttransplantatabstoßung, entzündlicher oder infektiöser Keratitis, Konjunktivitis und Uveitis, wie im Folgenden beschrieben wird. Da scFv mit verschiedenen Tags markiert werden können, wird ihnen auch diagnostisches Potential zugeschrieben.

Beispiel 2

Experimentelle Tiermodelle

Tiere

[0126] Männliche und weibliche Ratten der Inzuchtstämme Fischer 344, DA, Lewis und Wistar-Furth sowie Porton-Outbred-Ratten im Alter von 6–16 Wochen werden in der Flinders University of South Australia (Adelaide, Australia) gezüchtet. Die Ratten werden in einem Zyklus von 12 Stunden Licht und 12 Stunden Dunkelheit bei 21 °C und 50% Feuchtigkeit untergebracht und erhalten Wasser und Trockenfutter (New Joint Stock, Ridley Agriproducts, Murray Bridge, South Australia, Australien) ad libitum. Erwachsene männliche und weibliche Balb/c- oder OLA-Mäuse werden in einem Zyklus von 12 Stunden Licht und 12 Stunden Dunkelheit bei 21 °C und 50% Feuchtigkeit untergebracht und erhalten Wasser und Trockenfutter (New Joint Stock, Ridley Agriproducts, Murray Bridge, Australien). Alle Verfahren und Tötungen werden unter Inhalationsvollnarkose (Halothan; Zeneca Ltd., Macclesfield, United Kingdom) durchgeführt. Die experimentellen Vorschriften wurden im Einklang mit den "Guidelines for the Use of Animals in Research" des National Health and Medical Research Council of Australia entwickelt und werden stets dem Animal Welfare Committee at Flinders University of South Australia zur Genehmigung zugeleitet.

Induktion von Endotoxin-induzierter Uveitis (EIU)

[0127] Ratten wird nach dem Verfahren von Rosenbaum et al. (1980, Nature 286: 611–613) in einen hinteren Fußballen 200 µg E.-coli-055:B55-Lipopolysaccharid (Sigma Chemical Company), das in 100 µg normaler Kochsalzlösung solubilisiert war, injiziert. Die Entzündung wird 12 Stunden nach der Injektion sichtbar, ist nach 24 Stunden maximal und ist nach 48 Stunden wieder verschwunden. Die Tiere werden nach 24 Stunden an der Spaltlampe untersucht und bewertet. Wir haben ausgedehnte Erfahrungen mit diesem Modell (Smith et al., 1998, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 39: 658–661; Immunol. Cell. Biol. 76: 497–512).

Induktion von experimenteller melanininduzierter Uveitis (EMIU)

[0128] Experimentelle melanininduzierte Uveitis (EMIU) ist ein robustes und relevantes Modell der akuten Uveitis anterior (Smith et al., 1998, Immunol. Cell. Biol. 76: 497–512; Smith et al., 1999, Clin. Exp. Immunol. 115: 64–71). Okuläres Melanin wird gemäß der Vorschrift, die von Broekhuysen und Kollegen (1984, Curr. Eye Res. 3: 1405–1412) beschrieben wurde, aus Rinderaderhäuten extrahiert und als Trockengewicht quantifiziert. EMIU wird bei Fischer-344-Ratten durch Immunisierung mit 250 µg gereinigtem Rinderaderhaut-Melanin, das in Hunters Adjuvans emulgiert war, mit Pertussis-Toxin als Coadjuvans (Broekhuysen und Kollegen, 1984, loc.

cit.; 1995, Ocul. Immunol. Inflamm. 3: 149–155; 1996, Jpn. J. Ophthalmol. 40: 459–468) induziert. Insbesondere erhalten die Ratten 125 µg Rinder-Augenmelanin in einer 1:1-Emulsion in steriler, nichtpyrogener 0,9%iger normaler Kochsalzlösung und Hunters TitreMax™-Adjuvans (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA) in einem Gesamtvolumen von 60 µl durch Injektion in den rechten hinteren Fußballen. Unmittelbar danach wird ihnen intraperitoneal dieselbe Menge Melanin, das mit 1 µg Pertussis-Toxin (Sigma Chemical Company) gemischt ist, in einem Gesamtvolumen von 40 µl normaler Kochsalzlösung injiziert. Uveitis ist im Allgemeinen bilateral, tritt 10–20 Tage nach der Injektion auf, verschwindet nach 2–3 Wochen wieder und ist bei 20% der Tiere rezidivierend.

Überwachung von Uveitis und Sammlung von uveitischen Augen

[0129] Die Tiere werden täglich an der Spaltlampe untersucht, um das Einsetzen und den Verlauf der Uveitis zu identifizieren. Die Schwere wird nach einem wohlvalidierten System aufgezeichnet, bei dem wässrige Zellen und erythematöse Reaktion, die Anwesenheit von Fibrin, Synechie, Pupillenreaktivität, Irishyperämie und Emphyem allesamt bewertet werden. Die verwendete Skala ist wie folgt: keine Entzündung: normales Erscheinungsbild; leichte Krankheit: keine Schwellung, aber offensichtliche Infiltration der Uvea anterior mit oder ohne zelluläres Exsudat in der vorderen oder hinteren Kammer; mäßige Krankheit: leichte oder mäßige Schwellung und Infiltration der Uvea anterior, mäßiges zelluläres Exsudat in der vorderen und hinteren Kammer; schwere Krankheit: massive Schwellung und Infiltration der Uvea anterior, großes zelluläres Exsudat in der vorderen und hinteren Kammer mit Vitritis. Die Tiere werden durch eine Überdosis anästhetisches Halothan getötet, und die Augen werden für die weitere Verarbeitung sofort entnommen.

Rattenmodell der Hornhauttransplantation

[0130] Die Erfinder der vorliegenden Erfindung waren die ersten, die das verbreitet verwendete Modell der orthotopischen Hornhauttransplantation der Inzuchtratte entwickelten (Williams & Coster, 1985, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 26: 23–30; Williams et al., Corneal transplantation in small animals. In: Experimental Transplantation Models in Small Animals, Hrsg M.K. Green, T.E. Mandel, Chur, Schweiz: Harwood Academic Publishers, 1995, Kapitel 5, 5. 107–132). Fischer-344-Inzuchtratten (F344; Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) Haplotyp RT^M) und Wistar-Furth-Inzuchtratten (WF; MHC-Haplotyp RT^U) werden für die Hornhauttransplantation verwendet. Erwachsene F344-Ratten sind die Empfänger von Hornhauttransplantaten von entweder erwachsenen F344-Ratten (Isotransplantate) oder erwachsenen WF-Ratten (Allotransplantate). Die Transplantationen werden nicht zwischen unterschiedlichen Geschlechtern durchgeführt, aber Allotransplantate werden über MHC-Klasse-I- und -II- und Nebenantigenbarrieren hinweg durchgeführt.

[0131] Eine unilaterale rechte penetrierende Hornhauttransplantation mit 3 mm Durchmesser wird unter Vollnarkose durchgeführt, wie es schon früher beschrieben wurde. Eine 1%ige Chloramphenicolsalbe wird postoperativ auf das Transplantat aufgetragen, aber es wird keine andere Immunsuppression verabreicht als die, die in einem bestimmten Experiment angegeben ist. Die Transplantationsfäden werden nicht entfernt. Die Empfänger werden täglich an der Spaltlampe auf Klarheit der Hornhaut, Entzündung des vorderen Segments, Synechien und Neovaskularisierung der Hornhaut untersucht. Insbesondere werden die Klarheit und Ödem-bildung jeweils auf einer Skala von 0–4 bewertet, wobei 0 vollständig transparent (Klarheit) bzw. dünn (Ödem) bedeutet und 4 vollständig undurchsichtig (Klarheit) bzw. maximal dick (Ödem) bedeutet. Jede Ratte, die in irgendeinem Stadium einen postoperativen Katarakt entwickelt oder die am fünften Tag nach der Operation undurchsichtige Stellen in der Hornhaut aufweist, gilt als technischer Fehler und wird von der Analyse ausgeschlossen.

[0132] Die Abstoßung erscheint als zunehmende Hornhautundurchsichtigkeit in einem zuvor dünnen, klaren Hornhauttransplantat und ist stets mit einer Neovaskularisierung des Transplantats verbunden. Der Tag der Abstoßung ist definiert als der erste Tag, an dem der Rand der Pupille durch die implantierte Hornhaut hindurch nicht mehr klar sichtbar ist. Bei der Inzuchtstammkombination WF auf F344 erfolgt die Abstoßung bei einem Medianwert von 16 Tagen nach der Transplantation. Ratten, die 100 Tage mit klaren Transplantaten erreichen, gelten als Langzeitüberlebende.

Mausmodelle der HSV-Stromakeratitis

[0133] Hornhäute von Balb/c-Mäusen werden mit einer Nadel vernarbt, und 4 µl, die 10⁶ pfu HSV-1 (klinisches Isolat) enthalten, werden topisch aufgetragen (Thomas et al., 1998, J. Immunol. 160: 3965–70). Die Krankheit schreitet über einen Zeitraum von 3 Wochen hinweg bis zur Stromakeratitis fort. Ein klinisches Bewertungssystem wird verwendet, um die Krankheit an der Spaltlampe zu verfolgen: 0 – klare Hornhaut, 1 – leichte Trü-

bung, 2 – mäßige Undurchsichtigkeit oder Narbenbildung, 3 – schwere Undurchsichtigkeit, aber Irisrand sichtbar, 4 -Iris nicht sichtbar, 5 – nekrotische Stromakeratitis. Ein gut charakterisiertes Modell der rezidivierenden HSV-Keratitis in der NIH/OLA-Maus (Harland) wird ebenfalls verwendet (Laycock et al., 1991, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 32: 2741–2746). Eine Hornhaut wird wie oben vernarbt und geimpft. Gleichzeitig werden 0,5 ml gepooltes Humanserum, das Antikörper gegen HSV enthält (Chemicon, Temecula, CA), intraperitoneal verabreicht, um das Auge vor Schäden während der akuten Infektionsphase zu schützen. Dann werden die Mäuse 5 Wochen lang in Ruhe gelassen, um Latenz festzustellen. Eine Reaktivierung des Virus wird unter Verwendung eines UVB-Transilluminators (FS40 Westinghouse Lamps) erreicht. Anästhetisierte Mäuse werden durchmustert, so dass nur das Auge bestrahlt wird. Eine Dosis von 248 mJ/cm² über 55 Sekunden ist für die HSV-Reaktivierung optimal.

Rattenmodell von Acanthamoeba-Keratitis

[0134] Acanthamoeba-Keratitis wird durch Impfung der Hornhaut von Outbred-Ratten mit Acanthamöben und einem Corynebacterium sp. gemäß einem in unserem Labor entwickelten Modell (Badenoch et al., 1990, Arch. Ophthalmol. 108: 107-112) induziert. Erwachsene weibliche Porton-Ratten werden anästhetisiert. Ein 2-mm-Einschnitt durch die partielle Dicke erfolgt mit einer Skalpellklinge in der peripheren Hornhaut, ungefähr 1 mm vom Hornhautrand entfernt. Unter dem Operationsmikroskop wird ein 1-µl-Volumen von 10⁴ Acanthamoeba castellanii (> 90% Trophozoite; > 90% Lebensfähigkeit), die mit 10⁶ Corynebacterium xerosis gemischt sind, eingeimpft, wobei man eine mit einer 31er Nadel ausgestattete Mikrospritze verwendet. Die Nadel wird durch die Wunde in die zentralen Hornhautlamellen eingeführt. Alle Tiere werden nach der Impfung täglich beobachtet. Bei allen Tieren entwickelt sich Acanthamoeba-Keratitis, wobei eine Leukocyten-Infiltration am Tag 5 sichtbar ist und eine eitrige Keratitis bis zum Tag 7 wohl etabliert ist.

Statistische Analysen

[0135] Die experimentellen Gruppen enthalten 10 Tiere. Daten zum Überleben der Transplantate und zur Häufigkeit der Krankheit werden mit dem bindungskorrigierten Mann-Whitney-U-Test analysiert. Kategorische Daten (z.B. Bewertungen der Schwere der Krankheit) werden mit Hilfe des zweiseitigen exakten Fisher-Tests analysiert.

Hornhautphotographie Immunocytochemie Histopathologie und Durchflusscytometrie

[0136] Hornhautphotographie wird an anästhetisierten Tieren unter Verwendung einer Kamera des Typs Wild Heerbrugg Photoautomat MPS 45, die mit dem Operationsmikroskop (für Ratten, Mäuse) verbunden ist, durchgeführt. Immunhistochemie wird unter Verwendung einer Immunperoxidase-Technik an Kryostatschnitten von PLP-fixiertem Gewebe durchgeführt; ein breites Spektrum von monoklonalen Antikörpern ist gegen Ratten- und Mäuseleukocyten und andere Zelloberflächenmarker gerichtet, die eine genaue Identifizierung der Zusammensetzung von Hornhautleukocyteninfiltraten ermöglichen. Histopathologische Korrelationen werden an H&E-Schnitten von formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten ganzen Augen durchgeführt. Durchflusscytometrie wird unter Verwendung von indirekter Standard-ein-Farben-Immunfluoreszenz und einer hochempfindlichen Technik durchgeführt.

Zusätzliche Antikörper die bei der künstlichen Gestaltung von Antikörpern verwendet werden

[0137] Anti-Ratten-B7-1- (CD80: 3H5; IgG1) und Anti-B7-2-(CD86: 24F; IgG1)-Hybridome waren eine freundliche Spende von Dr. H. Yagita (Juntendo University, Tokyo, Japan). Das Anti-CD28-Hybridom (JJ319; IgG1) war eine großzügige Spende von Dr. T. Hunig (Institut für Virologie und Immunologie, Universität Würzburg, Deutschland). Anti-Polyhistidin-Antikörper (HI5-1; Maus; IgG2a) wurden von der Sigma Chemical Company (St Louis, MO, USA) bezogen. FITCkonjugierte Ziegen-Anti-Maus-Immunglobuline wurden von Silenus Laboratories (Melbourne, Victoria, Australien) bezogen. Meerrettichperoxidase-konjugiertes Streptavidin und biotinylierte Ziegen-Anti-Maus-Immunglobuline wurden von der DAKO Corporation (Carpinteria, Kalif., USA) bezogen.

Verabreichung von Antikörperreagentien

[0138] Eine systemische Verabreichung kann durch intraperitoneale (ip) Injektion von Antikörper in gepufferter Kochsalzlösung mit 1% fetalem Kälberserum (FCS), das als Träger hinzugefügt wird, durchgeführt werden. Die genauen Injektionsanweisungen hängen von dem Experiment ab. Eine topische Verabreichung kann durch direkte Applikation von Antikörper in ophthalmischer Balanced Salt Solution, die mit 1% FCS und einem oder

mehreren Penetrationsverstärkern ergänzt ist, auf die Hornhaut durchgeführt werden.

Ascitesproduktion

[0139] Um monoklonale Antikörper als Ascites zu erzeugen, werden Hybridomzellen gemäß Standardverfahren intraperitoneal in getrennte Gruppen von pristanbehandelten Balb/c-Mäusen injiziert. Ascites wird aseptisch aufgefangen, nachdem die Mäuse getötet worden waren. Der resultierende Ascites wird mit sterilem pyrogenfreiem PBS, das 1 Vol.-% fetales Kälberserum enthielt, verdünnt.

Monoklonale Antikörper die für Immunhistochemie verwendet werden

[0140] Monoklonale Mäuseantikörper, die bei der immunhistochemischen Identifizierung von Ratten- oder Mäusezelloberflächenantigenen verwendet werden, werden als unverdünnte Überstände von in stationärer Phase befindlichen Hybridomen produziert. Die Hybridome X63 (unbekannte Spezifität; IgG1-Isotyp, negative Kontrolle), OX-1 (Anti-CD45 [den Leukocyten gemeinsames Antigen]; IgG1-Isotyp), OX-35 und OX-38 (Anti-CD4; IgG1- bzw. IgG2a-Isotyp), OX-8 (Anti-CD8; IgG1-Isotyp), NDS61 (Anti-CD25 [Interleukin-2-Rezeptor (IL-2R)]; IgG1-Isotyp), R73 (Anti-T-Zell-Rezeptor (TCR); IgG1-Isotyp), OX-26 (Anti-CD71 [Transferrin-Rezeptor]; IgG2a-Isotyp), OX-42 (Anti-CD11b/CD18 [C3b-Rezeptor]; IgG2a-Isotyp), ED-1 (cytoplasmatisches Antigen von Anti-Ratten-Monocyten, Makrophagen und dendritischen Zellen; IgG1-Isotyp) und OX-6 (Anti-MHC, monomorphe Klasse-II-Determinante; IgG1-Isotyp) wurden von der European Collection of Animal Cell Cultures erhalten, und das Hybridom SAL5 (Anti-Salmonella-Antigen; IgG2a-Isotype, negative Kontrolle) war eine Spende von Dr. L. Ashman (University of Adelaide, Adelaide, Australien). Hybridome, die monoklonalen Antikörper gegen verschiedene Maus-Oberflächenmarker (Maus-CD4 (GK1.5), -CD8 (TIB150), -CD11b/c (TIB213, HB8466) und IL-2-Rezeptor (PC61)) produzieren, waren Spenden von Dr. P. Macardle und Dr. P. H. Hart, beide Flinders University.

Immunhistochemische Anfärbung von Zelloberflächenantigenen

[0141] Nach dem Töten der Ratte oder Maus wurden die Augen entkernt und hinter der Pars plana eingestochen, durch 4 Stunden Eintauchen in 2% (w/v) Paraformaldehyd/0,075 M Lysin/0,0375 M Natriumphosphat/0,01 M Natriumperodat bei 4 °C vorfixiert und in sukzessive ausgetauschter 7%iger und 15%iger (w/v) Saccharose in Dulbeccos A-phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) dehydratisiert, in OCT-Verbindung (Miles, Elkhart, IN, USA) eingebettet und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Augenquerschnitte wurden mit dem Kryostat in einer Dicke von 5–8 µm geschnitten. Die Schnitte wurden 10 Minuten lang bei Raumtemperatur mit 10-Vol.-%igem normalem Schweineserum (Commonwealth Serum Laboratories, Melbourne, Australien) in Dulbeccos A-phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) und dann 18 Stunden lang mit dem primären Antikörper inkubiert. Zu diesem Zeitpunkt und anschließend wurden die Schnitte mit PBS, das 0,2% (w/v) Gelatine enthielt, gewaschen. Sie wurden 30 Minuten lang mit biotinyliertem affinitätsisoliertem Ziegen-Anti-Maus-Immunglobulin (DAKO Corporation, Carpinteria, Calif., USA), das 1 zu 500 in PBS, welches 1 Vol.-% normales Rattenserum enthält, verdünnt war, inkubiert, gewaschen und dann weitere 30 Minuten mit Meerrettich-Peroxidase-konjugiertem Streptavidin (DAKO Corporation), das 1 zu 1000 in PBS verdünnt war, inkubiert. Die Schnitte wurden gewaschen und 5 Minuten lang in 9 mM Tris-HCl-Puffer bei pH 7,6 mit 40 mM Natriumazid, 20 mM 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid, 9 mM Imidazol und 0,07 Vol.-% Wasserstoffperoxid (Sigma Chemical Company) entwickelt. Die Reaktivität und Spezifität von Antikörpern wurden vor ihrer Verwendung in der Immunhistochemie mittels Durchflussscytometrie an geeigneten Ratten- oder Mäuse-Zielzellen (normalen Zellen und/oder Transfektanten) und vor ihrer Verwendung im Auge an fixierten Schnitten von nichtokulärem Gewebe überprüft.

Histologische Bewertung von Ratten- und Mäuseaugen

[0142] Entkernte Augen werden mindestens 24 Stunden lang in 10%igem gepufferten Formalin fixiert, in 100%igem Ethanol dehydratisiert, weiterhin 18 Stunden lang in Chloroform fixiert und in Paraffinwachs eingebettet. Gewebequerschnitte werden 5 µm dick geschnitten und mit Hämatoxylin und Eosin angefärbt.

Überwachung von Untergruppen peripherer Ratten-T-Zellen in vivo

[0143] Untergruppen peripherer T-Zellen wurden mittels Durchflussscytometrie von Schwanzblutpräparaten überwacht. Proben wurden von den Ratten unmittelbar vor der ersten Antikörperinjektion und an den Tagen 7, 14 und 28 nach der Krankheitsinduktion entnommen. Bis zu 1 ml peripheres Blut wurde in einem mit Lithiumheparin beschichteten Röhrchen aufgefangen und mit HEPES-gepuffertem RPMI-1640-Medium (ICN Biome-

dicals Inc., Aurora, Ohio, USA), das 100 IE/mL Penicillin, 100 µg/ml Streptomycinsulfat, 2 mM Glutamin und 10 Vol.-% fetales Kälberserum enthielt, auf 5 ml verdünnt. Lymphocyten wurden unter Verwendung von Lymphoprep™ (Nycomed Pharma AS, Oslo, Norwegen) gemäß der Beschreibung des Herstellers abgetrennt, außer dass 40 mM Meglumindiatrizoat (Angiografin, Schering AG, Berlin, Deutschland) verwendet wurde, um die relative Dichte des Lymphoprep auf 1,09 einzustellen. Die gewonnenen Zellen wurden in einer Konzentration von 1×10^7 Zellen/ml in PBS/0,02 M Natriumazid (PBS-azid) suspendiert, und zu 50 µl dieser Lymphocyten-suspension wurden 50 µl monoklonaler Antikörper gegeben. Dieses Gemisch wurde 30 Minuten lang auf Eis inkubiert, dann in PBS-azid gewaschen und 5 Minuten lang bei 4 °C mit 400 x g zentrifugiert. Das Sediment wurde in 25 µl normalem Rattenserum und 50 µl FITC-konjugiertem Ziegen-Anti-Maus-Immunglobulin (Silenus Laboratories, Melbourne, Australien), das 1 zu 50 mit PBS-azid verdünnt war, resuspendiert. Nach 30 Minuten Inkubation auf Eis erfolgten zwei aufeinanderfolgende Waschvorgänge. Das Zellsediment wurde in 50 ml Fixiermittel, das 10 mM Glucose, 5 Vol.-% Formaldehyd und 5 mM Natriumazid in PBS enthielt, resuspendiert. Die Antikörperbindung wurde mittels Durchflusszytometrie unter Verwendung eines Standard-Fluorescein-Filtersatzes (FACScan™, Becton Dickinson, Mountain View, Kalif., USA) gemessen.

Endotoxin-Assay

[0144] Endotoxinkonzentrationen wurden durch den Multitest-Limulus-Amöbocyten-Lysat-Assay (Whittaker Bioproducts, Walkersville, MO, USA) (Empfindlichkeit = 0,125 EU/ml) gemäß den Anweisungen des Herstellers gemessen.

Proteinbestimmung

[0145] Das Gesamtprotein in Reagentien wurde nach einem modifizierten Lowry-Verfahren unter Verwendung eines kommerziellen Proteinbestimmungskits (Sigma Diagnostics, St. Louis, MO, USA) gemäß den Anweisungen des Herstellers gemessen. Die Extinktion wurde bei 750 nm gemessen.

Gemischte Lymphocytenreaktion bei Ratten

[0146] Mononukleäre Zellfraktionen wurden durch Dichtezentrifugation auf Lymphoprep (Nycomed Pharma, Oslo, Norwegen) isoliert. Zwanzigtausend lebensfähige Responder-Splenocyten wurden mit 2×10^5 Mitomycin-C-inaktivierten (250 ng/ml, 37 °C während 30 min; Kyowa Hakko Kogyo Co. Ltd., Kyowa, Japan) Stimulatoren in einem endgültigen Volumen von 250 µl vollständigem RPMI-Medium (20 Vol.-% FCS, 100 IE/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 2 mM L-Glutamin, 5×10^{-5} M 2-Mercaptoethanol) in 96-Napf-Rundboden-Mikrotiterplatten inkubiert. Monoklonale Antikörperreagentien oder -fragmente wurden hinzugefügt, und die Kulturen wurden 6 Tage lang mit 5% CO₂ in angefeuchteter Luft bei 37 °C inkubiert. Um die Zellproliferation zu messen, wurde 1 µCi tritiiertes Thymidin (Amersham, Buckinghamshire, UK) während der letzten 18 Stunden zu den Kulturen gegeben. Nach der Ernte wurden die imprägnierten Glasfaserpapiere in Masken eingelegt, und 20 µl Szintillationsflüssigkeit wurden in jeden Napf gegeben. Die Papiere wurden mit einem Topcount™-Zähler gezählt. Alle Kulturen wurden in dreifachen Parallelansätzen durchgeführt.

Beispiel 3

Bewertung von künstlich gestalteten Antikörperfragmenten in vitro

[0147] Die funktionelle Aktivität von einwertigen oder zweiwertigen Antikörpern in vitro wird mit dem ganzen monoklonalen Stammantikörper und mit irrelevanten Kontroll-scFv verglichen. Fragmente können einzeln und in Kombination getestet werden. Wenn die scFvs die "Markersequenz" Poly-His enthalten, kann der Nachweis mittels Durchflusszytometrie und Immunhistochemie durch Verwendung eines monoklonalen Antikörpers (HIS-1, Sigma) gegen den Marker erreicht werden. Man wird sich jedoch darüber im Klaren sein, dass auch andere Identifikationsmarker in ähnlicher Weise verwendet werden können. Um die richtige Spezifität der künstlichen Konstrukte zu bestätigen, wird die Bindung mittels Durchflusszytometrie an unfixierten normalen Rattenzellen oder Transfektanten und/oder Immunhistochemie an Cytozentrifugenpräparaten von fixierten Transfektanten, normalen Ratten- oder Mäusezellen, mitogenstimulierten Rattenmilzzellen, HSV-infizierten Hep-2-Zellen und MRC-5-Fibroblasten oder kultivierten Acanthamoeba-Zellen bewertet. Die Aktivität wird gegebenenfalls mittels Durchflusszytometrie titriert. Die Gewebefixierung wird an 5–8 µm dicken kryostatgeschnittenen Schnitten von PLP-fixiertem normalem Rattenaugen, Lymphknoten, Milz, Niere, Herz und Leber durch Immunperoxidase-Anfärbung bewertet. Durchflusszytometrie an peripherem Blut, das aus der Schwanzvene aufgefangen wird, wird verwendet, um zu bestimmen, ob Fragmente bei der in-vivoscFv-Verabreichung an zirkulierende Zellen gebunden haben. Die An/Aus-Raten der scFv-Affinität werden mit einem optischen Biosensor

(BIAcore™) unter Verwendung von gereinigtem Antigen als fester Phase untersucht.

Beispiel 4

Modulation von EMIU durch scFv

[0148] Wir werden zuerst Anti-CD4-scFv testen, da wir bereits gezeigt haben, dass ganzer monoklonaler Anti-CD4-Antikörper (aber nicht Anti-CD8-Antikörper) eine de-novo-Krankheitsentwicklung bei EMIU blockiert und möglicherweise auch die rezidivierende Krankheit blockiert (Smith et al., 1999, Clin. Exp. Immunol. 115: 64–71). Dann wird Anti-ICAM-1-scFv untersucht. Kontrollen beinhalten Gruppen, die keine andere Behandlung als die Krankheitsinduktion erfahren, solche, die die Krankheitsinduktion plus scFv der negativen Kontrolle erfahren, und solche, die die Krankheitsinduktion plus ganzen monoklonalen Antikörper erfahren. Für die systemische Verabreichung wird Ratten 3 Tage vor der Krankheitsinduktion, am Tag 0 und an den Tagen 3, 5, 7, 9 und 11 danach > 1 mg scFv pro ml Protein (1-ml-Volumina) ip injiziert, und die Häufigkeit und Schwere der Uveitis wird durch Untersuchung mit der Spaltlampe gemessen. Experimente zur Bestimmung der geeigneten therapeutischen Dosis müssen noch durchgeführt werden: In einem vorläufigen Experiment verhinderte die systemische Verabreichung von 1 mg Anti-CD4-scFv pro ml Gesamtprotein EMIU bei über 30% der getesteten Tiere (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1

Antikörper	Häufigkeit der Uveitis
Kontrollen	27/28 (96%)
ganze monoklonale Anti-CD8-Antikörper	8/8 (100%)
ganze monoklonale Anti-CD4-Antikörper	8/20 (40%)
Anti-CD4-scFv	16/23 (70%)

[0149] Die topische Verabreichung von scFv wird an dem Tag der Krankheitsinduktion begonnen und 28 Tage lang fortgesetzt. In beiden Gruppen von Experimenten werden zu speziellen Zeitpunkten nach der Immunisierung mit Melanin einige Tiere getötet, und die Augen werden für die Histologie und Immunhistochemie entnommen, um die Zusammensetzung eines gegebenenfalls vorhandenen zellulären Infiltrats zu bestimmen und um zu bestimmen, ob es durch die Behandlung geändert wurde. Sollte eines der beiden Test-scFv die Häufigkeit von Uveitis signifikant reduzieren, werden Versuche unternommen, um die Krankheit durch weitere Immunisierung mit Melanin zu reinduzieren und dann zu bestimmen, ob eine Reaktionslosigkeit induziert wurde. Wir werden die Wirkung einer Behandlung der bestehenden Krankheit durch Verabreichen von scFv am ersten Tag, an dem Zellen und erythematöse Reaktion in der vorderen Kammer beobachtet wurden, und danach 5 Tage lang täglich untersuchen. Ratten werden an der Spaltlampe untersucht, und einige Augen werden für die Histologie gesammelt.

Beispiel 5

Modulation der Hornhaut-Allotransplantatsabstoßung durch scFv

[0150] Die Wirksamkeit von scFvs, die gegen CD4, CD54, IL-2R, CD28, CD80 und CD86 gerichtet sind, bei der Prävention der Hornhaut-Transplantatsabstoßung bei WFauf-F344-Allotransplantaten wird untersucht. Für die costimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 wird ein scFv-Cocktail verwendet. Zu den Kontrollen gehören Ratten, die keine Behandlung erfahren, solche, die eine Behandlung mit einem scFv irrelevanter Spezifität, mit Anti-CD8-scFv und mit ganzem Antikörper erfahren. Eine kleine Zahl von Isotransplantationen wird durchgeführt, um auf Toxizität oder andere Nebenwirkungen zu überprüfen. Die systemische Verabreichung wird mit Hilfe von Vorschriften getestet, die für ganze Antikörper bekanntermaßen wirksam sind. Ratten wird an den Tagen -3, 0, 3, 5 und 7 bezüglich der Transplantation eine ip-Injektion verabreicht. Die Bestimmung der Menge an künstlichem Fragment, die für eine Wirkung in vivo erforderlich ist, erfolgt in vorbereitenden Experimenten auf der Basis der Menge an ganzem Antikörper, die für eine ähnliche Wirkung benötigt wird, zusammen mit einer Titration der scFv-Aktivität. Dann werden scFv topisch auf ihre Fähigkeit getestet, das Einsetzen der Abstoßung zu verhindern (direkte Auftragung auf das Transplantat vom Tag der Transplantation an täglich 28 Tage lang) und eine eingesetzte Abstoßung zu behandeln (direkte Auftragung täglich 5 Tage lang beginnend

mit dem ersten Tag, an dem Hornhaut-Blutgefäße zum ersten Mal die Verbindung zwischen Transplantat und Wirt durchqueren, oder mit dem ersten Tag, an dem Anzeichen einer Entzündung des vorderen Segments beobachtet werden, je nachdem, was zuerst stattfindet). Zu speziellen Zeitpunkten nach der Transplantation werden einige Tiere getötet, und die Augen werden für die Histologie und Immunhistochemie entnommen, um die Zusammensetzung eines gegebenenfalls vorhandenen zellulären Infiltrats zu bestimmen.

[0151] Ganzer monoklonaler Antikörper, der gegen Ratten-CD4 gerichtet ist, kann, wenn er gemäß der obigen Beschreibung systemisch mit ungefähr 0,2 mg/ml gegeben wird, die Überlebenszeit des Hornhauttransplantats erhöhen, wie in der folgenden Tabelle 2 und von Ayliffe et al. (1992, Brit. J. Ophthalmol. 76: 602–6) und He et al. (1991, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 32: 2723–8) gezeigt wird.

Tabelle 2

Antikörper	Überlebenszeit des Transplantats (Tage)
Kontrolle	13, 14, 17, 23
W3/25	9, 12, 20, > 100
OX35+OX38	29, 29, > 100, > 100

Beispiel 6

Diagnose und Behandlung von Herpeskeratitis durch Antikörperfragmente

[0152] Um das Potential von scFvs als therapeutische Mittel für die stromale Herpeskeratitis zu untersuchen, werden sowohl das nekrotische als auch das rezidivierende Modell der Krankheit verwendet. Mäuse erhalten viermal täglich 1 Tropfen topisch appliziertes scFv (Anti-CD4-, -CD8-, -CD11b/c-, -IL-2R- oder -HSV-gpD-Antigen) in Augentropfen oder scFv von irrelevanter Spezifität. Eine zusätzliche Kontrollgruppe erhält viermal täglich topisch 0,5% ophthalmisches Prednisolonphosphat und 3% Acyclovir-Augensalbe (Zovirax, Glaxo-Wellcome). Tiere mit nekrotischer Krankheit werden von Tag 14 bis Tag 21 nach der Impfung behandelt; Tiere mit rezidivierender Krankheit werden von Tag 2 bis Tag 4 nach der Reaktivierung behandelt. Die systemische Verabreichung von scFv wird ebenfalls untersucht. Die Wirksamkeit wird klinisch an der Spaltlampe und durch Endpunkt-Immunhistochemie und Histologie gemessen, um die Zusammensetzung des Leukocyteninfiltrats zu bestimmen. Zu diagnostischen Zwecken wird das scFv gegen HSV-gpD an Fluorescein gekoppelt, ein Fluorochrom, das bereits in topischen ophthalmologischen Präparaten verwendet wird und das leicht sichtbar gemacht werden kann, indem man die Blaulichtquelle an der Spaltlampe verwendet. Nach der Verabreichung des Fluorochrom-markierten scFv als Augentropfen an die infizierte Hornhaut werden wir versuchen, die Anwesenheit von viralem Antigen in der Hornhaut in situ durch direkte Untersuchung und durch Spaltlampenphotographie mit dem Blaufilter nachzuweisen. Im nekrotischen HSV-Keratitis-Modell wird das Potential von scFv für eine schnelle Diagnose in der dritten Woche nach der Impfung untersucht. Im rezidivierenden Keratitismodell werden Augentropfen am dritten Tag nach der Reaktivierung gegeben. Die Ergebnisse der direkten Untersuchung werden mit Histopathologie und Viruskultur korreliert.

Beispiel 7

Diagnose und Behandlung von Acanthamoeba-Keratitis durch Antikörperfragmente

[0153] Fluorochrom-markierte scFvs und dimerisierte Fragmente, die gegen ein 40-kDa-Protein gerichtet sind, das bekanntermaßen auf der Oberfläche sowohl von Trophozoiten als auch von Cysten vorhanden ist, werden erzeugt. Das passende IgG-Hybridom ist von der ATCC erhältlich. Porton-Ratten erhalten scFv-Augentropfen am Tag 4, 7 oder 10 nach der Impfung mit *Acanthamoeba castellanii* Neff. In diesen Stadien gibt es hauptsächlich Trophozoiten, hauptsächlich Trophozoiten und Cysten bzw. hauptsächlich Cysten in ihren Hornhäuten. An jedem Tag werden Augentropfen, die verschiedene Konzentrationen des konjugierten scFv enthalten, gegeben, und die Augen werden mit Hilfe der Spaltlampe untersucht und photographiert. Dann werden die Tiere getötet und ihre Augen für die Histologie verarbeitet. Dies ermöglicht es uns, die Spaltlampenuntersuchungen mit der Pathologie zu korrelieren. Um die potentielle therapeutische Verwendung von Fragmenten zu untersuchen, werden infizierte Ratten von Tag 6 bis Tag 10 nach der Impfung durch den Tag jede Stunde topisch mit unkonjugiertem dimerem Fragment behandelt. Andere Ratten erhalten nur ein Kontrollfragment oder eine Kombination von Propamidin und Polyhexamethylenbiguanid, die derzeitigen Behandlungen der

Wahl für Amöbenkeratitis. Die Wirksamkeit der Behandlung wird durch klinische Bewertung, Histopathologie und Quantifizierung der lebensfähigen Amöben durch Grenzverdünnung ausgehend von homogenisierten Hornhäuten bewertet.

[0154] In der gesamten Beschreibung war es das Ziel, die bevorzugten Ausführungsformen der Erfindung zu beschreiben, ohne die Erfindung auf eine bestimmte Ausführungsform oder eine spezielle Sammlung von Merkmalen einzuschränken. Der Fachmann wird sich daher darüber im Klaren sein, dass im Lichte der vorliegenden Offenbarung verschiedene Modifikationen und Änderungen in den besonderen, beispielhaft genannten Ausführungsformen vorgenommen werden können, ohne vom Umfang der vorliegenden Erfindung abzuweichen. Alle solchen Modifikationen und Änderungen sollen im Umfang der beigefügten Ansprüche mit enthalten sein.

Patentansprüche

1. Verwendung eines antigenbindenden Subimmunglobulin-Moleküls, dem ein Fc-Teil eines Immunglobulins fehlt und das gegenüber einem mit einer Augenstörung zusammenhängenden Zielantigen immuninteraktiv ist, bei der Herstellung eines Medikaments zur Behandlung einer Augenstörung, wobei das Medikament zur topischen Verabreichung zubereitet ist.

2. Topische Zusammensetzung zur Behandlung oder Diagnose einer Augenstörung, umfassend ein antigenbindendes Subimmunglobulin-Molekül, dem ein Fc-Teil eines Immunglobulins fehlt und das gegenüber einem mit der Störung zusammenhängenden Zielantigen immuninteraktiv ist, einen Penetrationsverstärker, der die Penetration des antigenbindenden Subimmunglobulin-Moleküls in das Auge oder das Hornhautepithel verbessert, und einen Träger.

3. Pharmazeutische Augenzusammensetzung, die zur topischen Verabreichung an das Auge zubereitet ist und Folgendes umfasst: ein antigenbindendes Subimmunglobulin-Molekül, dem ein Fc-Teil eines Immunglobulins fehlt und das gegenüber einem Zielantigen im Auge immuninteraktiv ist, einen Penetrationsverstärker, der die Penetration des antigenbindenden Subimmunglobulin-Moleküls in das Auge oder das Hornhautepithel verbessert, und einen pharmazeutisch annehmbaren Arzneimittelhilfsstoff, Verdünnungsmittel oder Träger.

4. Verwendung eines antigenbindenden Subimmunglobulin-Moleküls, dem ein Fc-Teil eines Immunglobulins fehlt und das gegenüber einem auf einen Augenzustand hinweisenden Zielantigen immuninteraktiv ist, bei der Herstellung eines Medikaments zur Verwendung bei der Diagnose eines Augenzustands, wobei das Medikament für die topische Verabreichung vorgesehen ist.

5. Verwendung oder Zusammensetzung gemäß einem der vorstehenden Ansprüche, wobei das antigenbindende Subimmunglobulin-Molekül ein synthetisches Fv-Fragment, ein synthetisches stabilisiertes Fv-Fragment, vorzugsweise ein Einzelketten-Fv-Fragment, oder einen Minibody umfasst.

6. Verwendung oder Zusammensetzung gemäß einem der vorstehenden Ansprüche, wobei das Zielantigen aus einem MHC-Molekül, einem Costimulatormolekül, einem Adhäsionsmolekül, einem rezeptorassoziierten Molekül, einem Cytokinrezeptor und einem viralen Oberflächenantigen ausgewählt ist.

7. Verwendung oder Zusammensetzung gemäß Anspruch 6, wobei das Costimulatormolekül aus CD80, CD86 und CD152 ausgewählt ist.

8. Verwendung oder Zusammensetzung gemäß Anspruch 6 oder 7, wobei das Adhäsionsmolekül aus CD11, CD18, CD54 und CD62L ausgewählt ist.

9. Verwendung oder Zusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 6 bis 8, wobei das rezeptorassoziierte Molekül aus CD3, CD4, CD8, CD28, CD40, CD40L und CTLA4 ausgewählt ist.

10. Verwendung oder Zusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 6 bis 9, wobei der Cytokinrezeptor aus dem Interleukin-2-Rezeptor, einer Untereinheit des Interleukin-2-Rezeptors und dem Interferon- γ -Rezeptor ausgewählt ist.

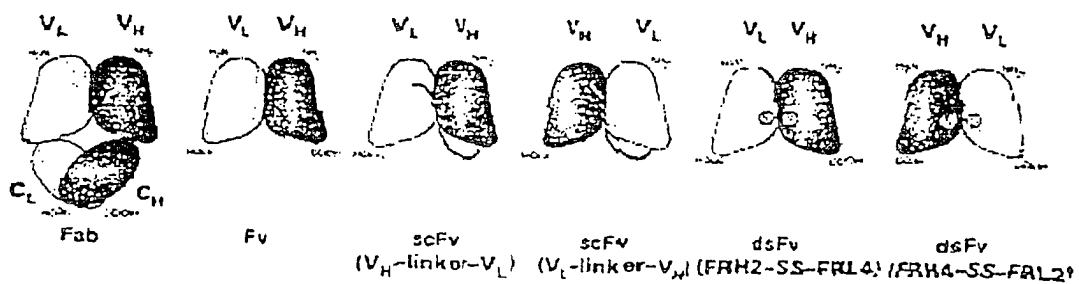
11. Verwendung oder Zusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 6 bis 10, wobei das virale Oberflächenantigen ein Herpesvirus-Oberflächenantigen umfasst.

12. Verwendung oder Zusammensetzung gemäß Anspruch 11, wobei es sich bei dem Herpesvirus-Oberflächenantigen um gD2 oder gB2 handelt.
13. Verwendung oder Zusammensetzung gemäß einem der vorstehenden Ansprüche, wobei das antigenbindende Subimmunglobulin-Molekül so modifiziert ist, dass es eine verlängerte Halbwertszeit hat.
14. Verwendung oder Zusammensetzung gemäß Anspruch 13, wobei das antigenbindende Subimmunglobulin-Molekül mit Polyethylenglycol chemisch modifiziert ist.
15. Verwendung gemäß einem der Ansprüche 1 und 4 bis 14, wobei das Medikament mit einem Penetrationsverstärker zubereitet ist, so dass die Penetration des antigenbindenden Subimmunglobulin-Moleküls in das Auge oder das Hornhautepithel verbessert wird.
16. Verwendung gemäß Anspruch 15 oder Zusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 2 bis 14, wobei der Penetrationsverstärker aus Caprinsäure, DMSO, Dihydrocytochalasin B, Digitonin, Tensiden und einer beliebigen Kombination davon ausgewählt ist.
17. Verwendung oder Zusammensetzung gemäß einem der vorstehenden Ansprüche, wobei das Medikament oder die Zusammensetzung zur Iontophorese zubereitet ist.
18. Verwendung oder Zusammensetzung gemäß einem der vorstehenden Ansprüche, wobei das Medikament oder die Zusammensetzung in Form von Augentropfen oder eines Collagen Shield vorliegt.
19. Verwendung gemäß Anspruch 4 oder einem der Ansprüche 5 bis 18, soweit sie von Anspruch 4 abhängen, wobei mit dem antigenbindenden Subimmunglobulin-Molekül ein nachweisbarer Marker assoziiert ist.
20. Verwendung gemäß Anspruch 19, wobei der Marker ein Fluorochrom umfasst.
21. Verwendung gemäß Anspruch 20, wobei es sich bei dem Fluorochrom um Fluorescein handelt.
22. Verwendung- oder Zusammensetzung gemäß einem der vorstehenden Ansprüche, wobei die Augenstörung aus einer Hornhauttransplantatabstoßung, Uveitis, Entzündungs- und Infektionskrankheiten und Autoimmunstörungen ausgewählt ist.
23. Verwendung oder Zusammensetzung gemäß Anspruch 22, wobei die Entzündungs- und Infektionskrankheit aus viraler, bakterieller oder chlamydialer Konjunktivitis oder Keratitis, Augentumoren, neovaskulär-proliferativen Krankheiten, neovaskulären Makulopathien und rheumatoiden Hornhautausdünnungsstörungen ausgewählt ist.
24. Verwendung oder Zusammensetzung gemäß Anspruch 22, wobei es sich bei der Autoimmunstörung um okuläres Pemphigoid handelt.

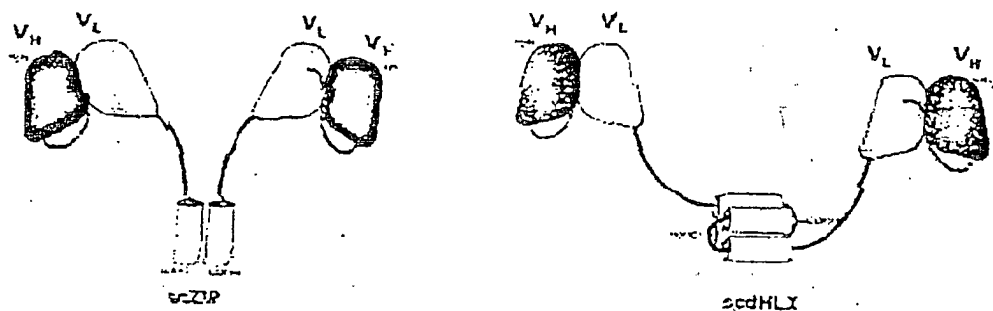
Es folgen 14 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

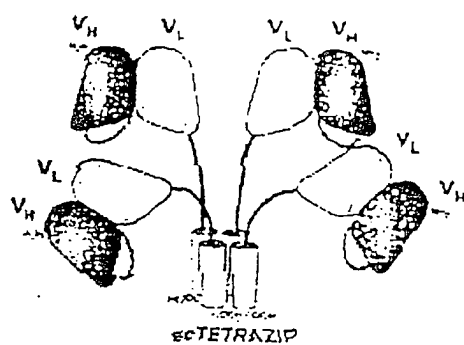
Monomere Fragmente



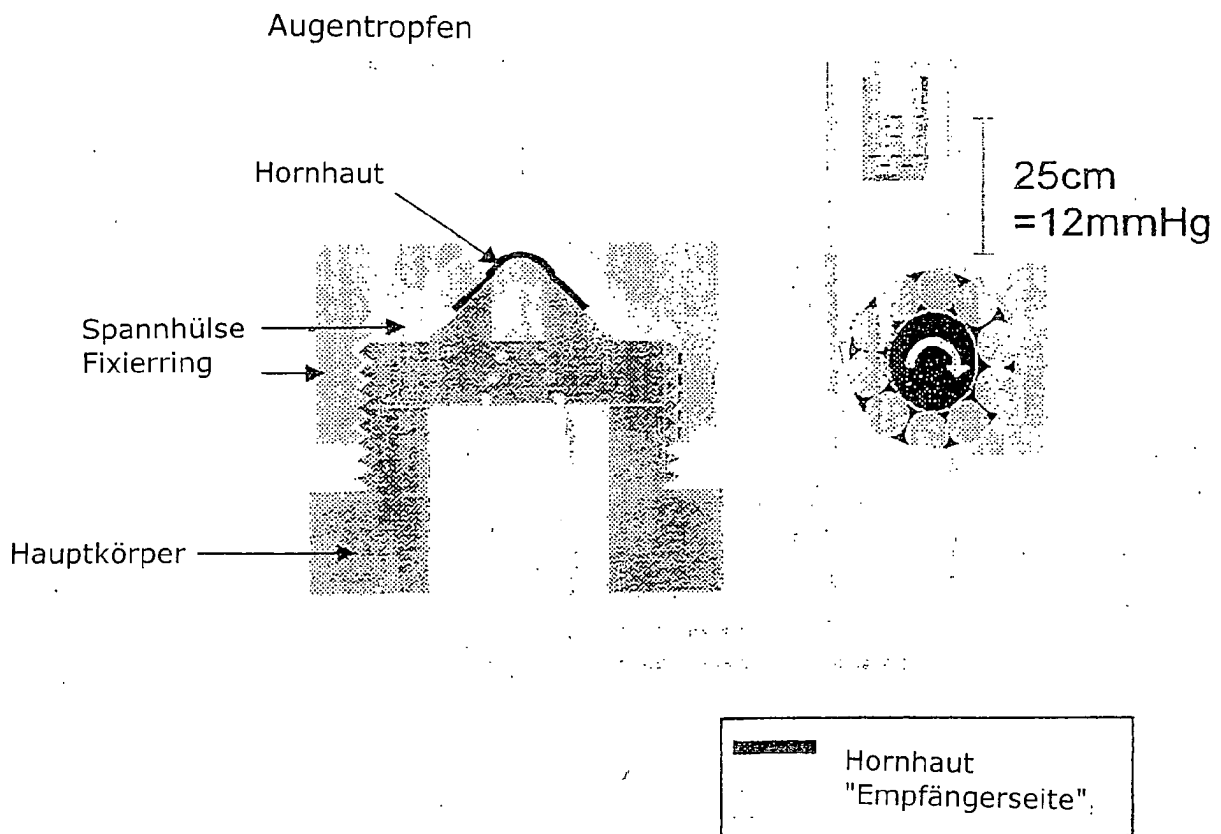
Dimere Fragmente



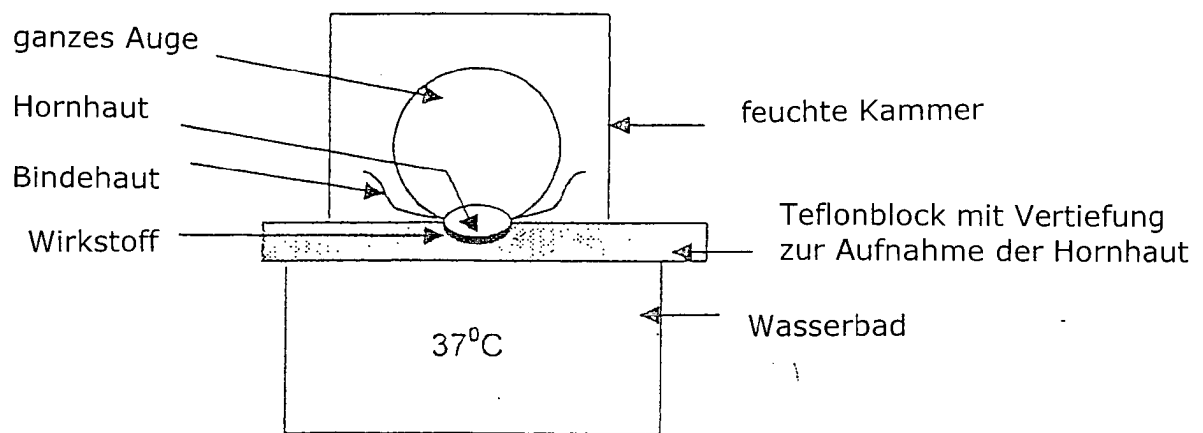
Tetramere Fragmente



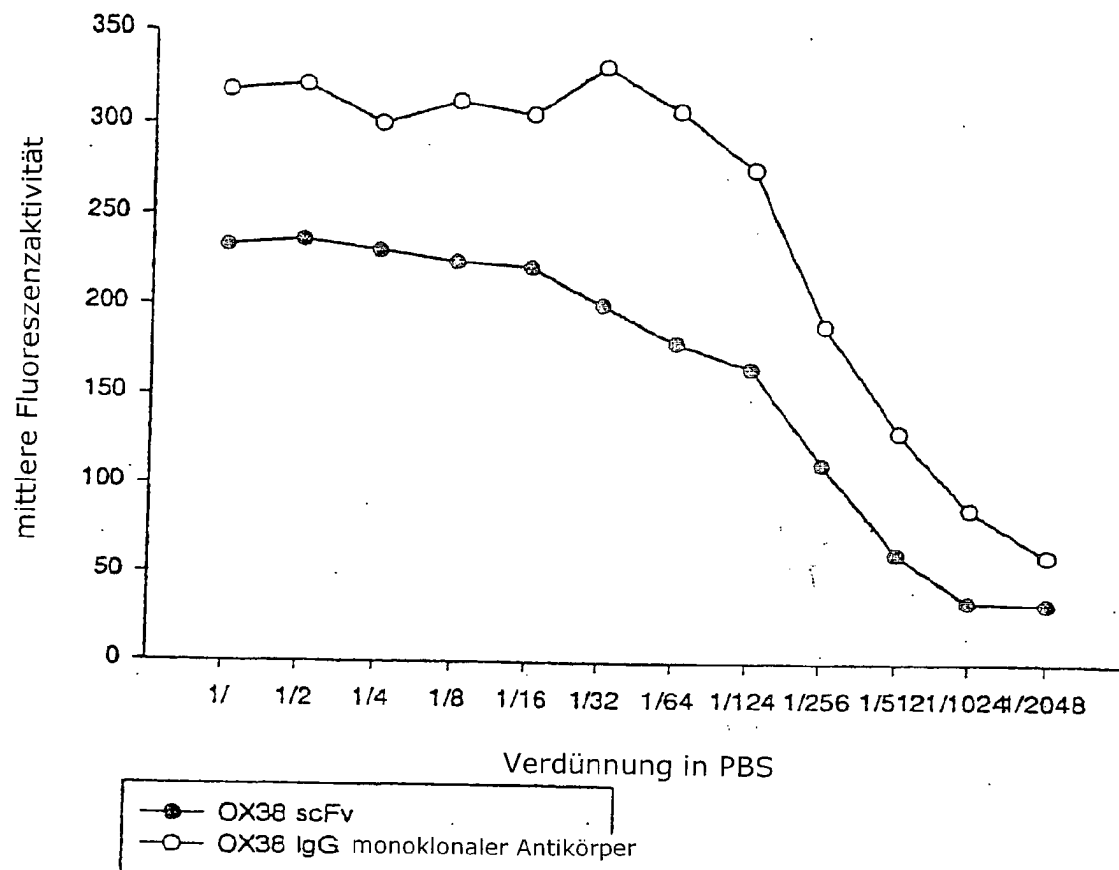
FIGUR 1



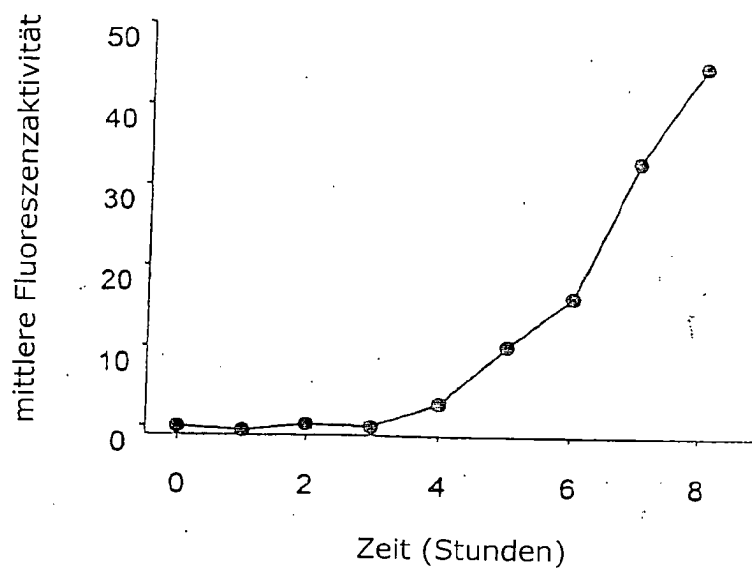
FIGUR 2



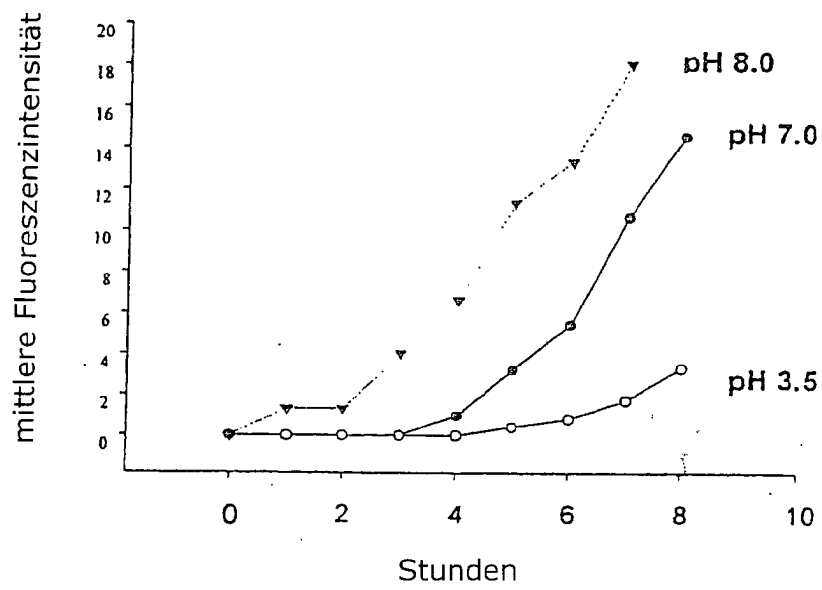
FIGUR 3



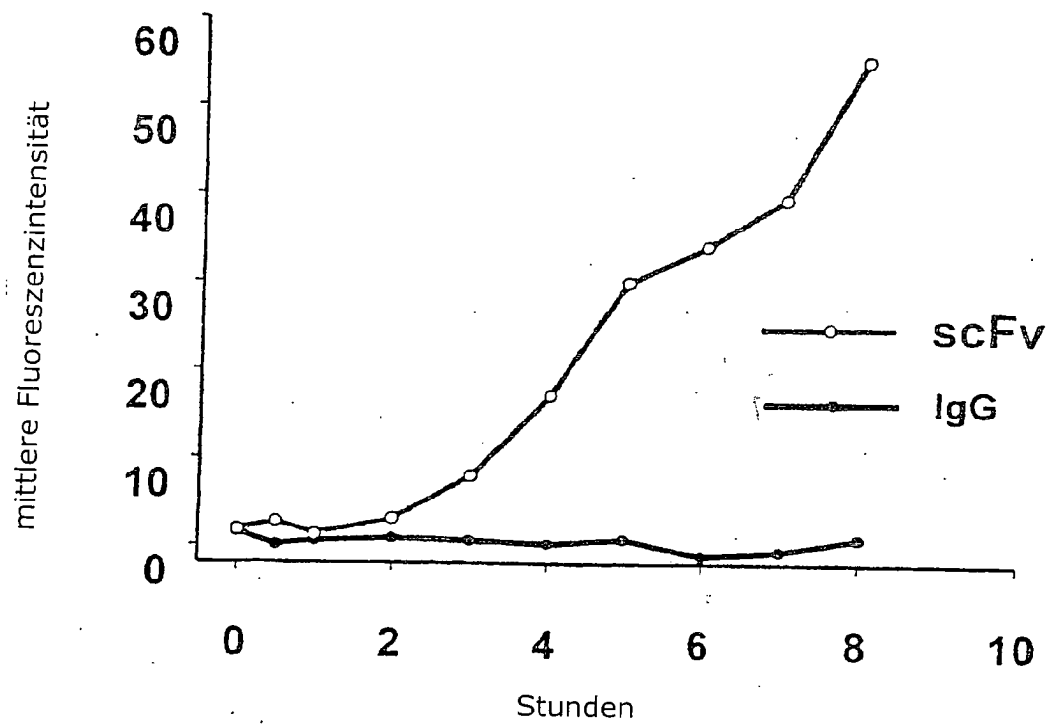
FIGUR 4



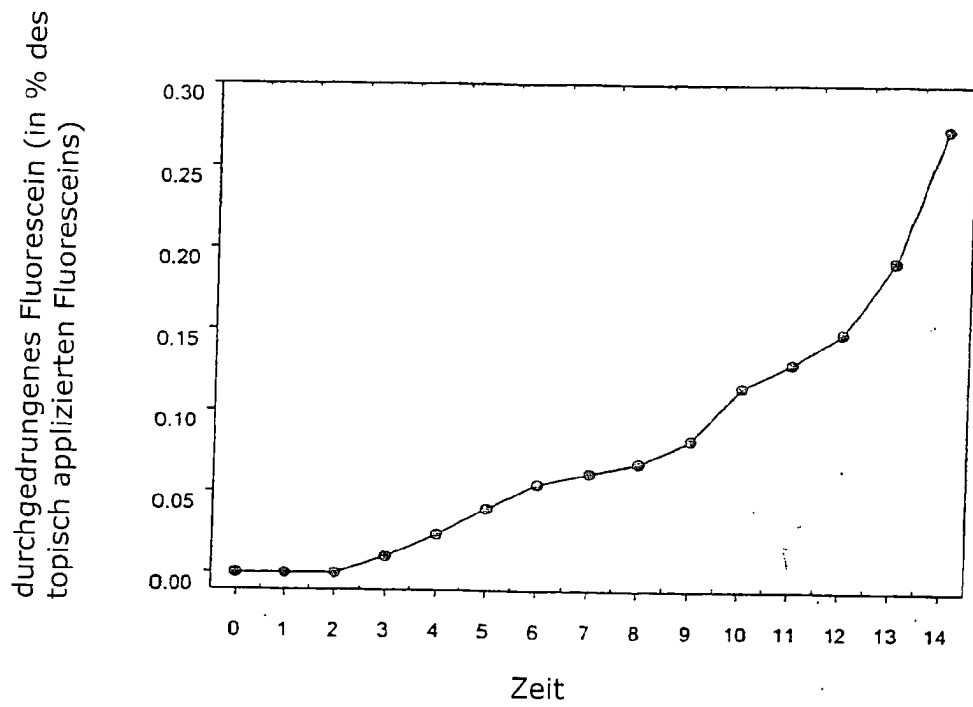
FIGUR 5



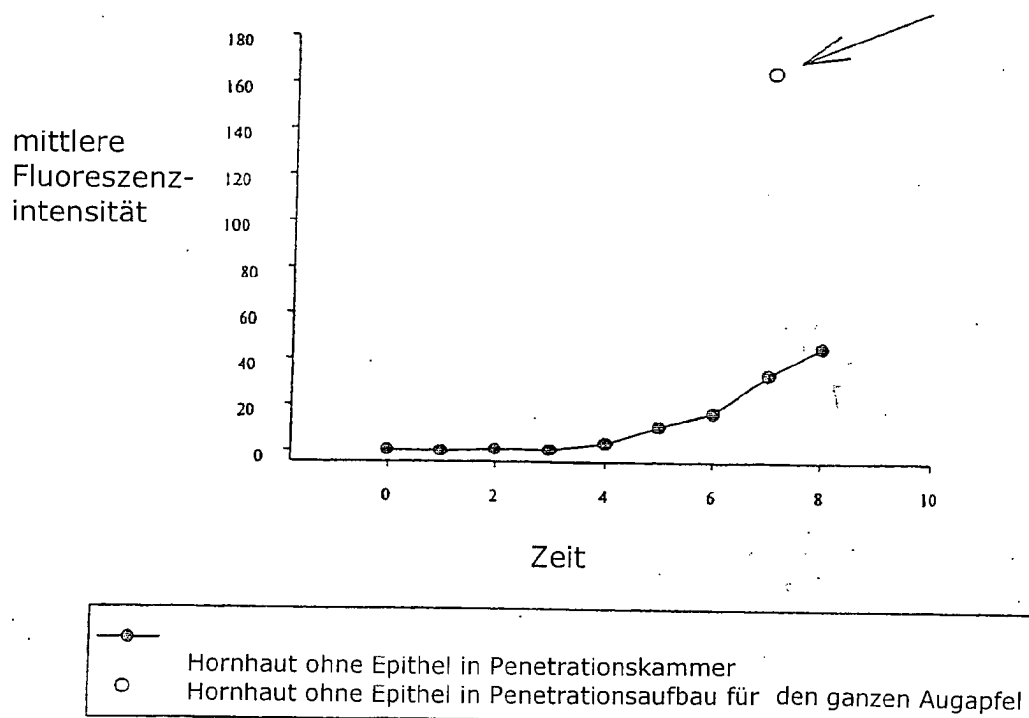
FIGUR 6



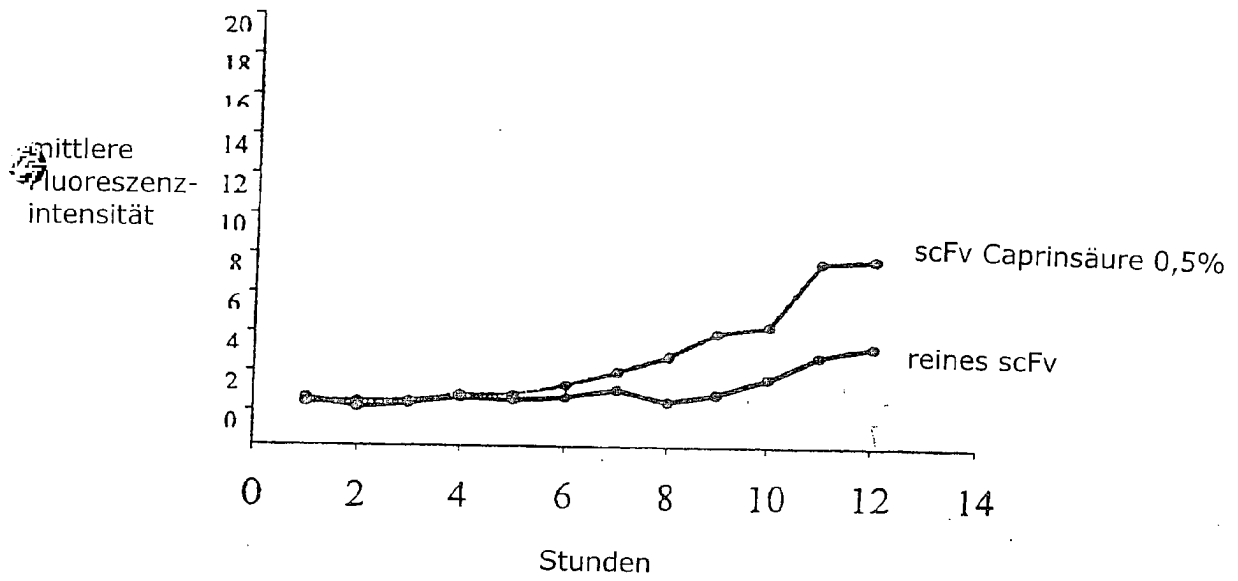
FIGUR 7



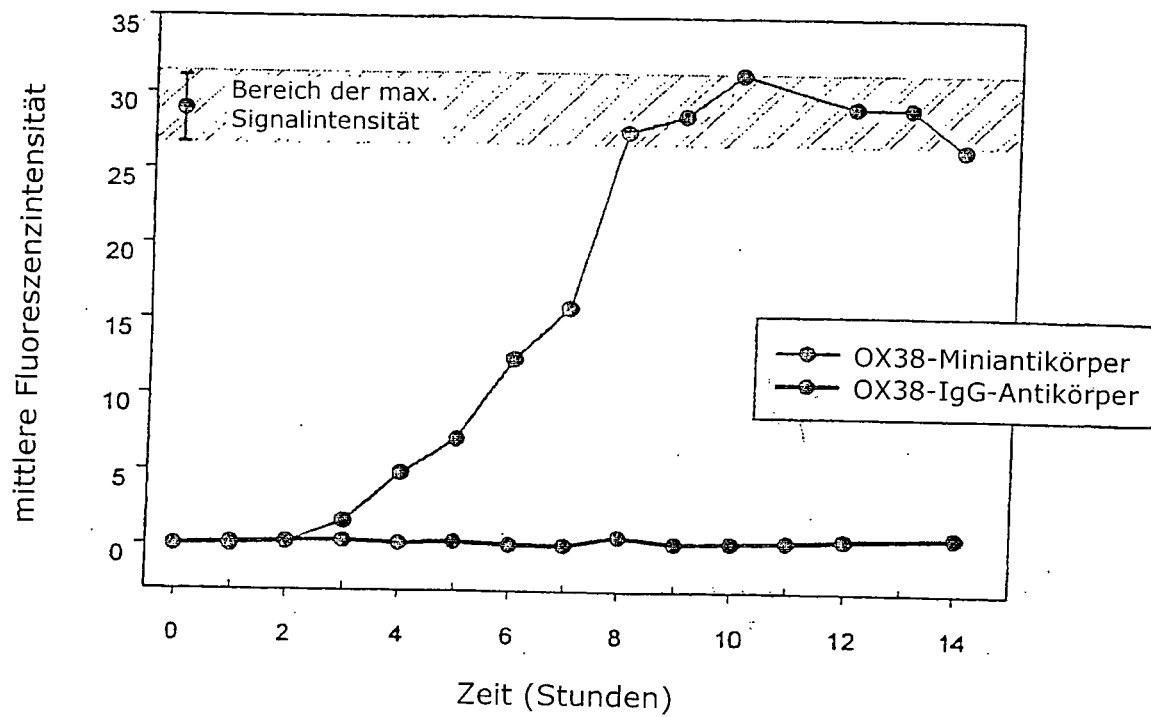
FIGUR 8



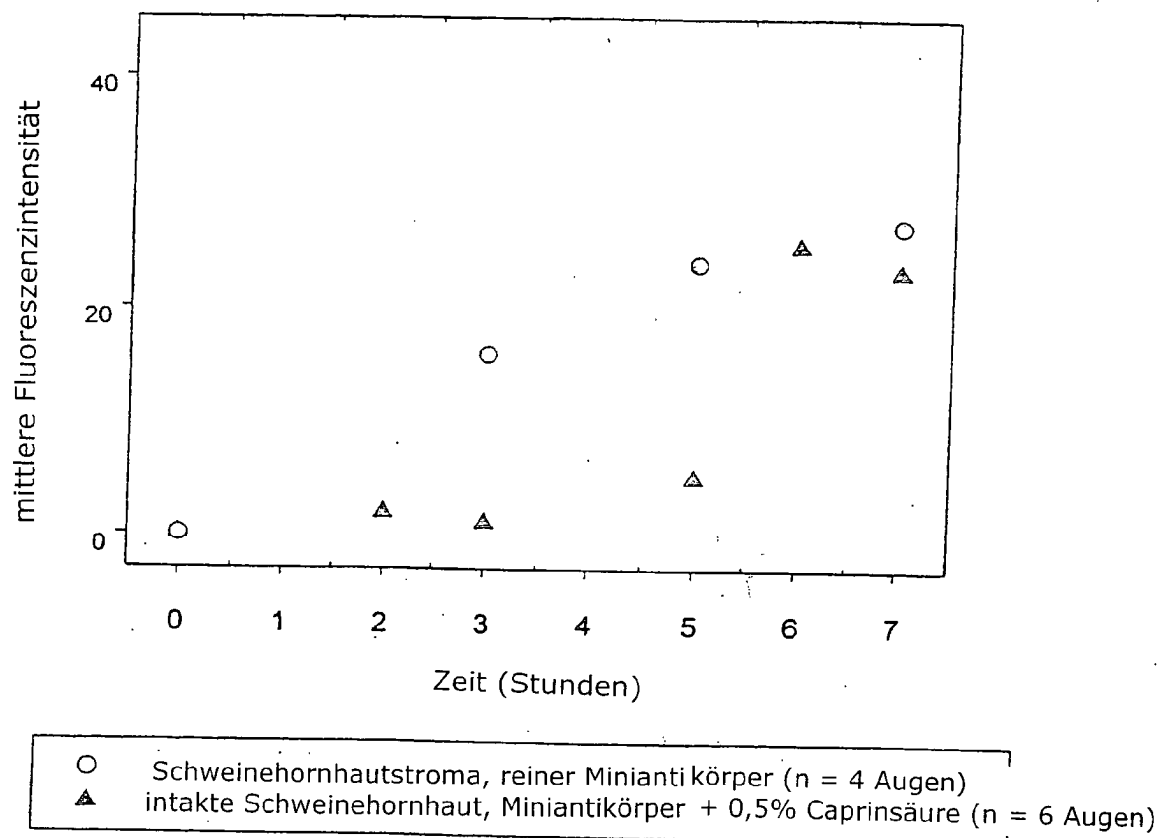
FIGUR 9



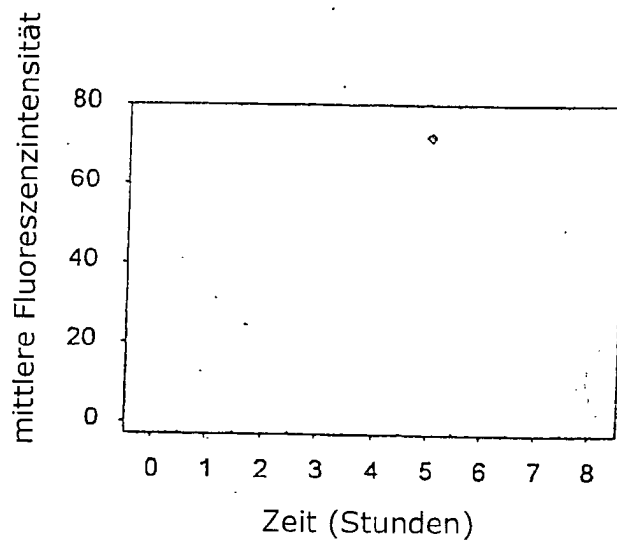
FIGUR 10



FIGUR 11

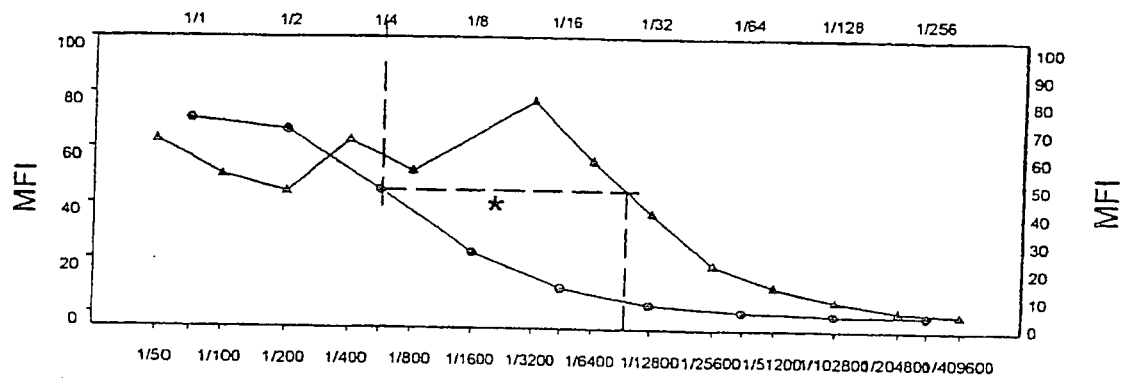


FIGUR 12

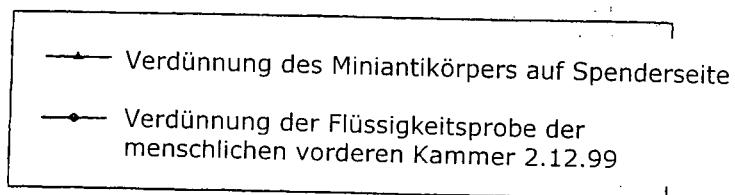


♦ intakte menschliche Hornhaut, Miniantikörper 1,8 mg/ml + 0,5% Caprinsäure
(n = 1 Auge)

FIGUR 13



Verdünnung des Spenderminiantikörpers



* 1/4 der intraokulären Bindungsaktivität gleich $\sim 1/9600 \times 1,8 \text{ mg/ml}$ Miniantikörper
 1/1 der intraokulären Bindungsaktivität gleich $0,8 \text{ } \mu\text{g/ml}$ Miniantikörper

FIGUR 14