



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 698 28 614 T2 2006.02.09**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 996 460 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **698 28 614.6**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US98/16439**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **98 939 278.2**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 99/007405**

(86) PCT-Anmeldetag: **07.08.1998**

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: **18.02.1999**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **03.05.2000**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **12.01.2005**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **09.02.2006**

(51) Int Cl.⁸: **A61K 38/16 (2006.01)**

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

C07H 21/04 (2006.01)

C07K 14/435 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

55060 P 08.08.1997 US

(73) Patentinhaber:

**The Regents of the University of California,
Oakland, Calif., US**

(74) Vertreter:

**WUESTHOFF & WUESTHOFF Patent- und
Rechtsanwälte, 81541 München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

**HUANG, Xiaozhu, San Francisco, US; SHEPPARD,
Dean, Oakland, US; PYTELA, Robert, San
Francisco, US**

(54) Bezeichnung: **Behandlung von Nierenfibrose durch Antikörper gegen integrin alpha-v-beta 6**

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

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

Beschreibung

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0001] Integrine sind heterodimere Zelladhäsions-Rezeptoren, die aus zwei Untereinheiten, α und β , bestehen. Das Integrin $\alpha\beta6$ ist ein Fibronectin- und Tenascin-Rezeptor, der hauptsächlich durch Epithel-Zellen exprimiert wird. In gesundem adulten Primaten-Gewebe sind $\beta6$ mRNA und Protein kaum nachzuweisen, obwohl $\beta6$ während der fötalen Entwicklung, Wundheilung und in einigen Epithel-Tumoren exprimiert wird. Wenn die $\beta6$ -Untereinheit in einer Kolonkarzinom-Zelllinie, in der sie normalerweise nicht vorhanden ist, exprimiert wird, führt die Expression der Untereinheit zu einer verstärkten Fähigkeit zur Proliferation. Ein COOH-terminaler 11 Aminosäure-Bereich, der für die Untereinheit einzigartig ist, ist für die die Proliferation verstärkende Wirkung des $\alpha\beta6$ Integrins erforderlich (Agrez et al., J.Cell.Biol. 127, 547-556 (1994)). Die $\beta6$ Expression wird in Typ II Aveolar-Epithelzellen während einer Verletzung exprimiert, die durch die Injektion lebender Bakterien verursacht wird, und $\beta6$ Expression wird an fokalen Stellen einer subklinischen Entzündung beobachtet, sowie bei einer Vielfalt von klinischen Proben von Patienten mit chronischer oder akuter Entzündung der Lungen oder Nieren (Breuss et al., J.Cell.Sci. 108, 2241-2251 (1995)).

[0002] Huang et al., (J.Cell.Biol. 133, 921-928 (1996)) beschreiben, dass Mäuse, die für eine Nullmutation in dem die $\beta6$ Untereinheit kodierenden Gen homozygot sind, juvenile Haarlosigkeit, verbunden mit einer Infiltration von Makrophagen in die Haut aufwiesen, sowie aktivierte Lymphozyten um die leitenden Luftwege in den Lungen akkumulierten.

[0003] Lungenfibrose ist eine bekannte Krankheit, von der angenommen wird, dass sie auf zerstörenden Wirkungen von Produkten beruht, die von Leukozyten freigesetzt werden (s. z.B. Marshall et al., Int.J.Biochem.Cell.Bio. 29, 107-120 (1997)). Durch Bleomycin induzierte Lungenschäden und Lungenfibrose sind damit verbunden und können von der Rekrutierung und Aktivierung von Lymphozyten abhängen (Schrier, D.J. et al., Am.J.Pathol. 116, 270-278 (1984)). Von den angegebenen Therapien für parenchyme Lungenschäden und Lungenfibrose ist die Anwendung von "Antizytokin" ein therapeutischer Weg (Coker et al., Thorax 52, (2), 294-296 (1997)).

[0004] Gängige Therapien für akute Lungenschäden und Lungenfibrose sind jedoch weitgehend nicht adäquat (s. z.B. King et al., "Isiopathic Pulmonary Fibrosis and other Interstitial Lung Diseases of Unknown Etiology" in Textbook of Respiratory Medicine, Murray und Nadel, Hrsg., W.B. Saunders, Philadelphia, PA, S. 1827-1839 (1994)).

[0005] Griffiths et al., Molecular Biology of the Cell, Bethesda, MD, US, Bd. 7, 1996, S. 166A beschreiben, dass die Desaktivierung des $\beta6$ Integrin-Untereinheit-Gens gegen durch Bleomycin induzierte Lungenfibrose schützt.

[0006] Es besteht Bedarf an Therapien für Fibrose. Auf diesen Bedarf ist die vorliegende Erfindung gerichtet.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0007] Ein Aspekt der Erfindung betrifft die Verwendung eines Antikörpers, der spezifisch an Integrin $\alpha\beta6$ bindet und die Bindung eines Liganden an Integrin $\alpha\beta6$ blockiert, zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Nierenfibrose bei einem Patienten.

[0008] Ein anderer Aspekt der Erfindung betrifft einen monoklonalen Antikörper, der durch das Hybridom ATCC HB 12382 gebildet worden ist.

[0009] Ein anderer Aspekt der Erfindung betrifft das Hybridom ATCC HB 12382.

KURZE BESCHREIBUNG DER FIGUREN

[0010] [Fig. 1A](#) ist eine Grafik, in der der Hydroxyprolin-Gehalt der Lunge von Mäusen, die eine Nullmutation des die $\beta6$ -Untereinheit-Gens exprimieren, mit demjenigen von Kontrollmäusen in Gegenwart von Bleomycin (blm) oder Salzlösung (sal) verglichen wird.

[0011] [Fig. 1B](#) ist eine Fotografie einer Trichrom-Anfärbung von Lungenbereichen zeigt, die die dichte Ansammlung von kollagener extrazellulärer Matrix in Lungen von mit Bleomycin behandelten Wildtyp ($\beta+/+$) aber nicht $\beta6-/-$ Mäusen 30 Tage nach der Behandlung zeigt.

[0012] [Fig. 2](#) ist eine Grafik, in der die Zunahme von Lungenwasser bei Wildtyp ($\beta+/+$) Mäusen mit derjenigen von $\beta6-/-$ Mäusen in Gegenwart von Bleomycin (blm) oder Salzlösung (sal) verglichen wird.

[0013] [Fig. 3](#) ist eine Grafik, in der die Rekrutierung von Lymphozyten bei Wildtyp ($\beta+/+$) mit derjenigen von $\beta6-/-$ Mäusen nach Verabreichung von Bleomycin (blm) oder Salzlösung (sal) verglichen wird.

DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0014] Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf die Herstellung von Mitteln zur Behandlung von Nierenfibrose.

[0015] Derartige Mittel können prophylaktisch oder

therapeutisch an einen Patienten verabreicht werden, der Symptome von Fibrose aufweist, oder bei dem ein Risiko dafür besteht. Typischerweise werden die erfindungsgemäßen Mittel auf täglicher Basis über mindestens 1 bis 5 Tage lang verabreicht. Wie der Ausdruck hier verwendet wird, ist eine "therapeutische Dosis" eine Dosis, die die Schwere der Symptome bei einem Patienten verhindert, mildert, lindert oder auf andere Weise verringert.

[0016] Die Antikörper in der Zusammensetzung binden spezifisch an ein $\alpha\beta 6$. Antikörper können synthetisch, monoklonal oder polyklonal sein und können nach bekannten Verfahren gebildet werden. Bei einer bevorzugten Ausführungsform erkennt der Antikörper spezifisch den Zytoplasmabereich der $\beta 6$ Untereinheit (s. z.B. Weinacker et al., *Biol.Chem.* 269, 1-9 (1994)). Für therapeutische Anwendungen sind monoklonale Antikörper vom Menschen mit konstanten menschlichen und variablen Bereichen häufig bevorzugt, um die Immunantwort eines Patienten gegen den Antikörper möglichst gering zu halten. Derartige Antikörper können gebildet werden durch immunisieren von transgenen Tieren, die menschliche Immunoglobulin Gene enthalten. S. Jakobovits et al., *Ann.NY Acad.Sci.* 764, 525-535 (1995)). Im Zusammenhang mit synthetischen und halb-synthetischen Antikörpern sind solche Ausdrücke so zu verstehen, dass sie Antikörper-Fragmente, isotope Schalter-Antikörper, humanisierte Antikörper (z.B. Maus-Mensch, Mensch-Maus u.ä.), Hybride, Antikörper mit mehreren Spezifitäten, vollsynthetische antikörperartige Moleküle u.ä. umfassen, aber nicht darauf beschränkt sind.

[0017] Wie unten diskutiert, können Antikörper auf ihre Fähigkeit, die Bindung eines Liganden an das $\alpha\beta 6$ zu blockieren und/oder auf andere Eigenschaften, wie die Fähigkeit, in vivo gegen Bleomycin-induzierte Fibrose zu schützen, abgesehen werden. Ein beispielhafter monoklonaler Anti- $\beta 6$ -Antikörper ist 10D5 (ATCC Hinterlegungs-Nr. 12382, hinterlegt am 6.8.1997).

[0018] Möglicherweise geeignete Antikörper gegen $\alpha\beta 6$ können auf ihre Wirkung durch eine Vielfalt von bekannten und/oder in der vorliegenden Anmeldung angegebenen Techniken abgesehen werden, wie dem Schutz gegen Bleomycin-induzierte Fibrose im Mäuse-Modell, Hemmung der Proliferation von Tumorzellen (Agrez et al., *J.Cell.Bio.*, 127, 547-556 (1994)) und Hemmung der Zellmigration und/oder Hemmung der Zelladhäsion (s. Abschnitt Versuchsbeispiele).

[0019] Eine Vielfalt von geeigneten Zubereitungen der Antikörper findet sich in der Formulary, die allen pharmazeutischen Chemikern bekannt ist: Remington's Pharmaceutical Sciences (15. Aufl., Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania (1975)), be-

sonders Kapitel 87 von Blaug, Seymour. Diese Zubereitungen umfassen z.B. Pulver, Pasten, Salben, Gelees, Wachse, Öle, Lipide, wasserfreie Absorptions-Grundlagen, Öl-in-Wasser- oder Wasser-in-Öl-Emulsionen, Emulsionen mit Carbowax (Polyethylenglykole mit einer Vielfalt von Molekulargewichten) halb-feste Gele und halb-feste Gemische, umfassend Carbowax.

[0020] Die Mengen an Wirkstoff, die für eine effektive Therapie erforderlich sind, hängen von vielen unterschiedlichen Faktoren ab, einschließlich der Art der Verabreichung, der Zielstelle, dem physiologischen Zustand des Patienten und anderen verabreichten Medikamenten. So sollte die Behandlungsdosis so bestimmt werden, dass die Sicherheit und Effizienz optimiert werden. Typischerweise können in vitro angewandte Dosen eine geeignete Leitlinie für die für die in situ (in vivo) Verabreichung des Wirkstoffs ergeben. Tierversuche mit wirksamen Dosen zur Behandlung von speziellen Störungen ergeben ebenfalls eine Vorhersage für die Dosis beim Menschen. Verschiedene Überlegungen sind z.B. angegeben in Goodman und Gilman's the *Pharmacological Basis of Therapeutics*, 7. Aufl. (1985), MacMillan Publishing Company, New York und Remington's *Pharmaceutical Sciences* 18. Aufl. (1990), Mack Publishing Co., Easton, Penn. Methoden zur Verabreichung werden dort diskutiert, einschließlich der oralen, intravenösen, intraperitonealen, intramuskulären, transdermalen, nasalen, ionophoren Verabreichung u.ä..

[0021] Die Zusammensetzungen nach der Erfindung können in einer Vielfalt von Einheits-Dosierungsformen verabreicht werden, abhängig von der Verabreichungsmethode. Z.B. umfassen Einheits-Dosierungsformen, die zur oralen Verabreichung geeignet sind, feste Dosierungsformen, wie Pulver, Tabletten, Pillen, Kapseln und Dragees, und flüssige Dosierungsformen, wie Elixiere, Sirups und Suspensionen. Die Wirkstoffe können auch parenteral in sterilen flüssigen Dosierungsformen verabreicht werden. Gelatine-kapseln enthalten den Wirkstoff und als inaktive Bestandteile pulverförmige Träger, wie Glucose, Lactose, Saccharose, Mannitol, Stärke, Cellulose oder Cellulose-Derivate, Magnesium-stearat, Stearinsäure, Natrium-saccharin, Talkum, Magnesium-carbonat u.ä.. Beispiele für zusätzliche inaktive Bestandteile, die zugesetzt werden können, um die gewünschte Farbe, Geschmack, Stabilität, Pufferfähigkeit, Dispersion oder andere bekannte erwünschte Merkmale zu verleihen, sind rotes Eisenoxid, Silicagel, Natriumlauryl-sulfat, Titan-dioxid, Lebensmittelweiß u.ä. Ähnlich können Verdünnungsmittel verwendet werden, um gepresste Tabletten herzustellen. Sowohl Tabletten als auch Kapseln können als Produkte mit verzögerter Freisetzung hergestellt werden, um eine kontinuierliche Freisetzung des Arzneimittels über einen Zeitraum von Stunden

zu erzielen. Gepresste Tabletten können mit Zucker oder mit einem Film überzogen werden, um einen unangenehmen Geschmack zu maskieren und die Tablette vor der Atmosphäre zu schützen, oder mit einem enteralen (darmlöslichen) Überzug für ein selektives Zerfallen im Magen/Darm-Trakt. Flüssige Dosierungsformen zur oralen Verabreichung können Farb- und Geschmacksstoffe enthalten, um die Akzeptanz durch den Patienten zu erhöhen.

[0022] Die Konzentration der erfindungsgemäßen Mittel in den pharmazeutischen Zubereitungen kann in weiten Grenzen variieren, d.h. von weniger als etwa 0,1 %, üblicherweise bei oder zumindest etwa 2%, bis zu so viel wie 20 bis 50% oder mehr, bezogen auf das Gewicht, und wird in erster Linie ausgewählt durch Flüssigkeitsvolumina, Viskositäten usw., in Übereinstimmung mit der speziellen ausgewählten Verabreichungsrouten.

[0023] Die erfindungsgemäßen Mittel können auch mit Hilfe von Liposomen verabreicht werden. Liposome umfassen Emulsionen, Schäume, Micellen, unlösliche Monoschichten, Flüssigkristalle, Phospholipid-Dispersionen, laminare Schichten u.ä.. Bei diesen Zubereitungen ist das abzugebende erfindungsgemäße Mittel als Teil eines Liposoms, allein oder zusammen mit einem Molekül, das an ein gewünschtes Ziel, wie einen Antikörper, bindet, oder mit anderen therapeutischen oder immunogenen Mitteln eingebaut. Solche Liposome, die entweder mit einem erfindungsgemäßen Mittel gefüllt oder "verziert" sind, können systemisch abgegeben werden oder sie können auf ein interessierendes Gewebe gerichtet werden, wo die Liposome dann die ausgewählten therapeutischen/immunogenen Peptid-Zusammensetzungen abgeben.

[0024] Liposome zur Verwendung im Rahmen der Erfindung werden gebildet aus üblichen Bläschen bildenden Lipiden, die allgemein neutrale und negativ geladene Phospholipide und ein Sterol, wie Cholesterin, umfassen. Die Auswahl an Lipiden wird im allgemeinen bestimmt durch Überlegungen z.B. bezüglich der Liposom-Größe, Säure-Empfindlichkeit und Stabilität der Liposome im Blutstrom. Es steht eine Vielfalt von Methoden zur Herstellung von Liposomen zur Verfügung, wie z.B. beschrieben von Szoka et al., Ann.Rev.Biophys.Bioeng. 9, 467 (1980), US-PS 4 235 871, 4 501 728, 4 837 028 und 5 019 369.

[0025] Eine Liposom-Suspension, die ein erfindungsgemäßes Mittel enthält, kann intravenös, lokal, topisch usw. in einer Dosis verabreicht werden, die u.a. nach der Art der Verabreichung, dem abzugebenden erfindungsgemäßen Mittel und dem Zustand der zu behandelnden Krankheit variiert.

[0026] Für feste Zusammensetzungen können übliche nicht-toxische feste Träger verwendet werden,

die z.B. pharmazeutisch geeignetes Mannitol, Lactose, Stärke, Magnesium-stearat, Natrium-saccharin, Talkum, Cellulose, Glukose, Saccharose, Magnesiumcarbonat u.ä. umfassen. Zur oralen Verabreichung wird ein pharmazeutisch annehmbares nicht-toxisches Mittel hergestellt durch Einbau von irgendeinem der üblicherweise angewandten Exzipientien, wie den oben genannten Trägern, und im allgemeinen 10 bis 95% Wirkstoff, d.h. einem oder mehreren der erfindungsgemäßen Mittel und insbesondere in einer Konzentration von 25 bis 75%.

[0027] Zur Verabreichung als Aerosol werden die erfindungsgemäßen Mittel vorzugsweise in feinteiliger Form zusammen mit einem grenzflächenaktiven Mittel und einem Treibmittel geliefert. Typische Prozentsätze an erfindungsgemäßigem Mittel sind 0,01 bis 20 Gew.%, vorzugsweise 1 bis 10%. Das grenzflächenaktive Mittel muss natürlich nichttoxisch und vorzugsweise in dem Treibmittel löslich sein. Repräsentativ für solche Mittel sind die Ester oder Teilester von Fettsäuren mit 6 bis 22 Kohlenstoffatomen, wie Capron-, Octan-, Laurin-, Palmitin-, Stearin-, Linol-, Linolen-, Oleosterin- und Ölsäuren mit einem aliphatischen mehrwertigen Alkohol oder seinem cyclischen Anhydrid. Gemischte Ester, wie gemischte oder natürliche Glyceride können angewandt werden. Das grenzflächenaktive Mittel kann 0,1 bis 20 Gew.%, vorzugsweise 0,25 bis 5%, des Mittels ausmachen. Der Rest dieser Zusammensetzung ist üblicherweise Treibmittel. Ein Träger kann, wenn gewünscht, ebenfalls zugesetzt werden, wie z.B. Lecithin zur intranasalen Abgabe.

[0028] Die erfindungsgemäßen Produkte können außerdem in einem depotartigen System, in verkapselter Form oder als Implantat nach bekannten Verfahren abgegeben werden. Ähnlich können die Produkte über eine Pumpe an ein interessierendes Gewebe abgegeben werden.

[0029] Irgendeine der oben angegebenen Zubereitungen kann zur Behandlung und Therapie gemäß der Erfindung geeignet sein, mit der Maßgabe, dass der Wirkstoff in der Zubereitung nicht durch die Zubereitung inaktiviert ist und die Zubereitung physiologisch verträglich ist.

[0030] Die folgenden Beispiele sind angegeben, um bestimmte Aspekte der vorliegenden Erfindung zu erläutern und sollen deren Gegenstand nicht einschränken.

VERSUCHSBEISPIELE

I. Einführung

[0031] Lungenfibrose ist eine übliche Krankheit, von der angenommen wird, dass sie auf schädigenden Wirkungen von Produkten beruht, die von Leukozy-

ten freigesetzt werden. Obwohl das Atmungs-Epithel während der Entwicklung von Fibrose geschädigt wird, wurde bisher nicht gezeigt, dass Epithelzellen selbst zu diesem Prozess beitragen. Im Rahmen der Erforschung wurden die Wirkungen von Bleomycin, einem Wirkstoff, von dem bekannt ist, dass er zu Lungenfibrose führt, an Mäusen untersucht, die eine Nullmutation eines einzigen Integrin-Untereinheit-($\beta 6$)-Gens exprimieren, das vollständig auf Epithelzellen beschränkt ist. $\beta 6$ - Mäuse waren sehr stark vor Bleomycin induzierter Fibrose geschützt. Therapien, die auf dieses Integrin zielen, könnten daher neue Wege zur Behandlung dieser weitgehend unbehandelbaren Krankheit ergeben.

[0032] Das Integrin $\alpha v \beta 6$ wird ausschließlich auf Epithelzellen, hauptsächlich während der Organogenese und als Reaktion auf eine Verletzung exprimiert. $\beta 6$ - Mäuse zeigen überstarke Entzündungs-Reaktionen auf Verletzungen der Haut und der Luftwege, aber entwickeln und reproduzieren sich normal (Huang, X.Z. et al., J.Cell.Biol.133, 921-928(1996)).

II. Inaktivierung des $\beta 6$ -Integrin-Untereinheit-Gens schützt Mäuse gegen Bleomycin induzierte Lungenfibrose

[0033] Die Lungen-Toxizität von Bleomycin (0,03 Einheiten (E) in 60 μ l Salzlösung) oder Salzlösung allein (60 μ l), verabreicht durch intratracheale Injektion, wurde bei in Alter und Geschlecht passenden Wildtyp ($\beta 6^{+/+}$) und $\beta 6$ - Mäusen vom 129SVEMS/ter Stamm untersucht. Lungenfibrose wurde 15, 30 und 60 Tage nach der Behandlung durch Untersuchung der Lungenmorphologie und durch Messung des Hydroxyprolin-Gehalts, ein Index für die Collagen-Abscheidung, bestimmt. Fibrose war bei Bleomycin behandelten Wildtyp Mäusen nach 30 Tagen deutlich und schritt bis 60 Tage fort ([Fig. 1A](#) – [Fig. 1B](#)). Im Gegensatz dazu blieb bei $\beta 6$ - Mäusen die Lungen-Morphologie während des Versuchs nahezu normal mit nur kleinen Fibrose-Flecken und der Hydroxyprolin-Gehalts der Lunge unterschied sich zu jedem Zeitpunkt nicht deutlich von dem bei mit Salz behandelten Tieren gemessenen. Diese Feststellung war nicht einzigartig bei reinen 129 Mäusen, da ähnliche Ergebnisse bei Nachkommen von Kreuzungen von 129 mit C57B1/6 erhalten wurden. Diese unerwarteten Ergebnisse zeigen, dass die Expression des Integrins $\alpha v \beta 6$ erforderlich ist zur Induktion von Lungenfibrose.

[0034] Um die Rolle von $\alpha v \beta 6$ in frühen Stadien von Bleomycin induzierter Fibrose zu bestimmen, wurde der Gehalt an Lungenwasser, ein Zeichen für Lungenödem, das von einer erhöhten Gefäßdurchlässigkeit kommt, 1, 5 und 15 Tage nach der Verabreichung von Bleomycin oder Salzlösung gemessen. Bei Wildtyp-Mäusen war das Lungenwasser 5 Tage maximal erhöht und blieb bis zu 15 Tage nach der Bleomy-

cin-Verabreichung erhöht ([Fig. 2](#)). Wie bei der Lungenfibrose waren $\beta 6$ - Mäuse weitgehend vor dieser frühen Bleomycin-Wirkung geschützt, was die Rolle von Epithel $\alpha v \beta 6$ vor der Entwicklung von Bleomycin induzierter Gefäßdurchlässigkeit zeigt.

[0035] Die Anmelderin hat früher berichtet, dass $\beta 6$ - Mäuse überstarke Entzündungsreaktionen einkerniger Zellen in der Haut und den Luftwegen zeigen (Huang et al., J.Cell.Biol. 133, 921-928 (1996)). Bleomycin induzierte Lungenschäden und Lungenfibrose sind verbunden und können abhängen von der Rekrutierung und Aktivierung von Lymphozyten (Schrier, D.J. et al., Am.J.Pathol. 116, 270-278 (1984)). Um zu bestimmen, ob die Widerstandsfähigkeit von $\beta 6$ - Mäusen gegen Bleomycin induzierte Lungenschäden und Fibrose auf der veränderten Lymphozyten-Rekrutierung oder -Aktivierung beruht, wurden CD4+ und CD8+ Lymphozyten gezählt und die Lymphozyten-Aktivierung bestimmt durch Messen der Expression des Interleukin-2-Rezeptors (CD25) in Zellen, die von feinzerriebenen Lungen von mit Salzlösung oder Bleomycin behandelten Mäusen 5 und 15 Tage nach der Behandlung gewonnen worden waren. In Übereinstimmung mit dem früheren Bericht waren mehr CD4+, CD8+ und CD25+ Zellen in den Lungen von $\beta 6$ - Mäusen vorhanden als bei Wildtyp-Tieren. Bleomycin führte zu einer starken Zunahme der Anzahl von CD4 und CD8 exprimierenden Lymphozyten und einer deutlichen Zunahme des Prozentsatzes an Lymphozyten, die CD25 exprimieren ([Fig. 3](#)), sowohl bei Wildtyp als auch bei $\beta 6$ - Mäusen. Sowohl bei Wildtyp als auch bei $\beta 6$ - Mäusen war die Rekrutierung und Aktivierung von Lungen-Lymphozyten 5 Tage nach der Bleomycin-Verabreichung maximal und begann nach 15 Tagen abzunehmen. Ohne an irgendeine Theorie gebunden werden zu wollen, legen diese Daten nahe, dass ein Versagen der Lymphozyten-Rekrutierung und -Aktivierung bei $\beta 6$ - Mäusen wahrscheinlich nicht zu ihrem Schutz vor den lungenschädigenden Wirkungen von Bleomycin führt.

[0036] Die Wechselwirkung von Integrinen mit ihren Matrix-Liganden moduliert verschiedene wichtige Zellfunktionen, einschließlich der Proliferation (Agrez et al., J.Cell.Biol. 127, 547-556 (1994)), dem Überleben (Lukacs, N.W. et al., Eur.J.Immunol. 25, 245-251 (1995)) und der Expression von Cytokinen (Miyake, S. et al., J.Exp.Med. 177, 863-868 (1993)) und Metallproteinasen (Werb, Z. et al., J.Cell.Biol. 109, 877-889 (1989)). Von der $\beta 6$ Untereinheit wird nur berichtet, dass sie ein einziges Integrin-Heterodimer, $\alpha v \beta 6$ bildet und auf Epithelzellen beschränkt ist. Parallel zu der schnellen Einleitung der $\alpha v \beta 6$ Expression nach einer Epithel-Verletzung nehmen die lokalen Konzentrationen von mindestens zwei Liganden für dieses Integrin (Fibronectin und Tenascin) zu. Die Anmelderin hat früher berichtet, dass die Expression von $\alpha v \beta 6$ eine Rolle spielt bei der Beendigung von

Entzündungsreaktionen einkerniger Zellen in der Haut und den leitenden Luftwegen in der Lunge. (Huang et al., J.Cell.Biol. 133, 921-928 (1996)). Die hier berichteten Ergebnisse zeigten, dass dieses Integrin auch eine kritische Rolle spielt bei der Induktion von Lungenschäden und Lungenfibrose als Reaktion auf Bleomycin.

[0037] Es wurde lange angenommen, dass Epithelzellen der Atmungsorgane prinzipiell Komponenten einer passiven Barriere wären, die andere Lungenzellen vor den potentiell toxischen Bestandteilen der eingeatmeten Luft abtrennen. An dieser Grenzfläche befinden sich diese Zellen jedoch in einer guten Stellung, um lokale Reaktionen auf eine Verletzung zu initiieren und zu modulieren. Jüngste Feststellungen legen nahe, dass Epithelzellen der Atmungsorgane die Fähigkeit besitzen, eine Anzahl von Proteinen zu synthetisieren und zu sekretieren, die die Reaktionen auf eine Verletzung initiieren und modulieren können, einschließlich Chemokinen (z.B. Interleukin-8, GRO α , GRO γ , RAN-TES, GMCSF, MIP-1 α und MCP-1), anderen Cytokinen (z.B. IL-6, IL-11 und IL-15) und Wachstumsfaktoren (z.B. TGF β). Ohne an irgendeine Theorie gebunden werden zu wollen, ist ein möglicher Mechanismus, durch den Epithel $\alpha\beta 6$ zur Entwicklung von Lungenschäden und Lungenfibrose beitragen könnte, das Modulieren der Expression von einem oder mehreren dieser Proteine.

[0038] Derzeitige Therapien von Lungenfibrose sind weitgehend inadäquat. Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung zeigen, dass Epithelzellen der Atmungsorgane und das Epithel-Integrin $\alpha\beta 6$ eine wichtige Rolle bei der Pathogenese von Parenchym Lungenschäden und Lungenfibrose spielen, und dass Therapien, die speziell dafür vorgesehen sind, die Funktion dieses Integrins zu stören, geeignet sind zur Behandlung dieser weitgehend unbehandelbaren Lungenkrankheiten.

III. Erzeugung eines blockierenden Antikörpers

A. Erzeugung von monoklonalem Antikörper

[0039] Um Antikörper gegen $\alpha\beta 6$ zu erzeugen, wurden $\beta 6$ -/- Mäuse entweder mit Keratinozyten, die von Wildtyp Mäusen erhalten worden waren, oder mit sekretiertem menschlichem Rekombinations $\alpha\beta 6$ (Weinacker et al., Biol.Chem. 269, 6940-6948 (1994)) in Freund's Adjuvans immunisiert. Mäuse Splenozyten wurden geerntet und mit SP2/0 Mäuse-Myelom-Zellen nach Standardverfahren verschmolzen. $\beta 6$ - und mocktransfizierte SW480 Zellen wurden zum Absuchen des erhaltenen Überstands durch Strömungs-Cytometrie verwendet. Antikörper, von denen es sich zeigte, dass sie $\beta 6$ -transfizierte, aber nicht mock-transfizierte SW480 Zellen erkennen, wurden für spätere Versuche verwendet.

B. Charakterisierung von monoklonalen Antikörpern

[0040] Um Antikörper gegen Mäuse $\alpha\beta 6$ zu erzeugen, wurden sekretiertes menschliches $\alpha\beta 6$ und Mäuse-Keratinozyten als Immunogene in 129/C57 Hintergrund $\beta 6$ -/-Mäusen verwendet. Die Überstände von den gebildeten Hybridomen wurden auf unterschiedliche Anfärbungen von mock- und R6-transfizierten SW480 Zellen abgesucht. Die erhaltenen Antikörper CS $\beta 6$ und 10D5 färbten sowohl auf SW480 Zellen exprimiertes menschliches $\beta 6$ als auch Mäuse $\beta 6$ auf Wildtyp Keratinozyten. CS $\beta 6$ wurde ferner charakterisiert durch Immunopräzipitation von (³⁵S)-markiertem Mäuse Keratinozyten Lysat. Dieser Antikörper fällte Heterodimere der entsprechenden Molekularmasse die $\alpha\beta 6$ war, von $\beta 6$ +/+ Keratinozyten aber nicht von $\beta 6$ -/- Keratinozyten aus, was zeigt, dass diese Antikörper spezifisch für das Integrin $\alpha\beta 6$ sind.

[0041] Es wurden auch sowohl Cs $\beta 6$ als auch 10D5 auf ihre Blockierungs-Aktivität untersucht durch Durchführen von Adhäsions-Assays mit $\beta 6$ -transfizierten SW480 Zellen und Mäuse-Keratinozyten auf Fibronectin. Nur 10D5 zeigte jedoch Blockierungs-Aktivität auf Mäuse-Zellen. 10D5 hemmte die Migration von Wildtyp Keratinozyten auf Fibronectin in einem identischen Ausmaß wie bei $\beta 6$ -/- Keratinozyten beobachtet.

C. Zell-Adhäsions-Assay

[0042] Mikrotiter-Platten mit 96 Vertiefungen zur Nicht-Gewebe-Kultur aus behandeltem Polystyrol (Linbro/Titertek, Flow Laboratories, McLean, VA) wurden mit Vitronectin, Fibronectin oder Collagen überzogen. 100 μ l einer Lösung, enthaltend unterschiedliche Mengen an Matrix, wurden in die Vertiefungen gegeben und 1 h bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Vertiefungen mit PBS gewaschen, dann 30 min mit 1% BSA in serumfreiem DMEM bei 37°C blockiert. Kontroll-Vertiefungen wurden mit 1 BSA in DMEM gefüllt. Die Zellen wurden auf die gleiche Weise wie für das Migrations-Assay geerntet und wieder in serumfreiem KGM suspendiert und dann in Gegenwart oder Abwesenheit von PMA in jede mit Protein überzogene Vertiefung gegeben. Für Blockierungs-Versuche wurden die Zellen vor dem Plattieren 5 min bei 4°C mit Antikörpern inkubiert. Die Platten wurden mit 10 \times g 5 min vor der Inkubation 1 h bei 34°C in feuchtem 7% CO₂ zentrifugiert (Oberseite nach oben). Nicht anhaftende Zellen wurden durch 5 min langes Zentrifugieren mit der Oberseite nach unten mit 48 \times g entfernt. Die anhaftenden Zellen wurden mit 1 % Formaldehyd fixiert und mit 0,5% Kristallviolett angefärbt und dann wurden die Vertiefungen mit PBS gewaschen. Die relative Anzahl an Zellen in jeder Vertiefung wurde berechnet durch Messung der Absorption bei 595 nm in einem Microplate Reader (Bio-Rad).

Patentansprüche

1. Verwendung eines Antikörpers, welcher spezifisch an Integrin $\alpha\beta6$ bindet und Bindung eines Ligandens an Integrin $\alpha\beta6$ blockiert zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Nierenfibrose in einem Patienten.

2. Die Verwendung gemäß Anspruch 1, worin der Antikörper ein monoklonaler Antikörper ist.

3. Die Verwendung gemäß Anspruch 1 oder 2, worin der Antikörper therapeutisch verabreicht wird.

4. Die Verwendung gemäß Anspruch 1 oder 2, worin der Antikörper prophylaktisch verabreicht wird.

5. Ein monoklonaler Antikörper hergestellt durch das Hybridom ATCC HB12382.

6. Das Hybridom ATCC HB12382.

Es folgen 3 Blatt Zeichnungen

FIG. 1A

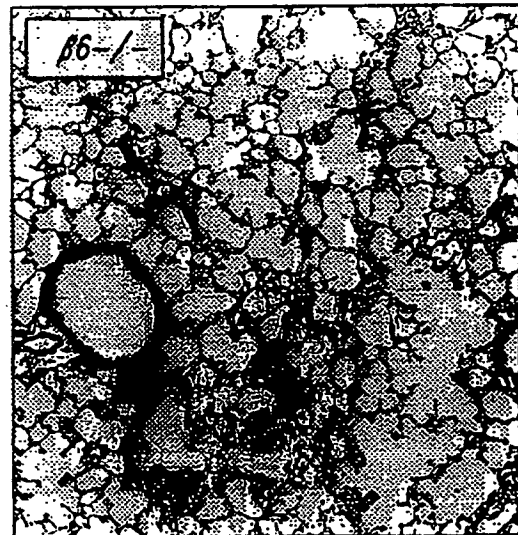
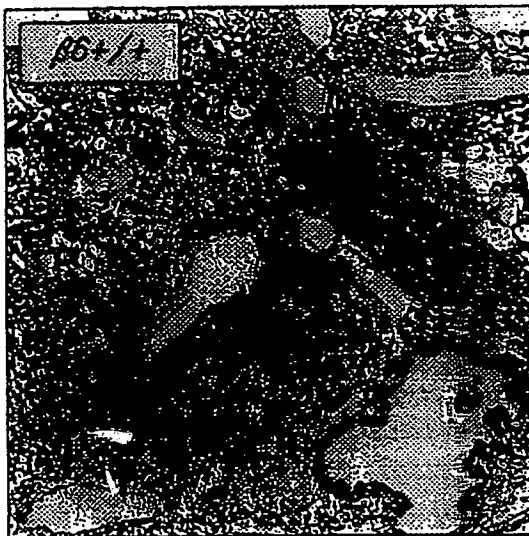
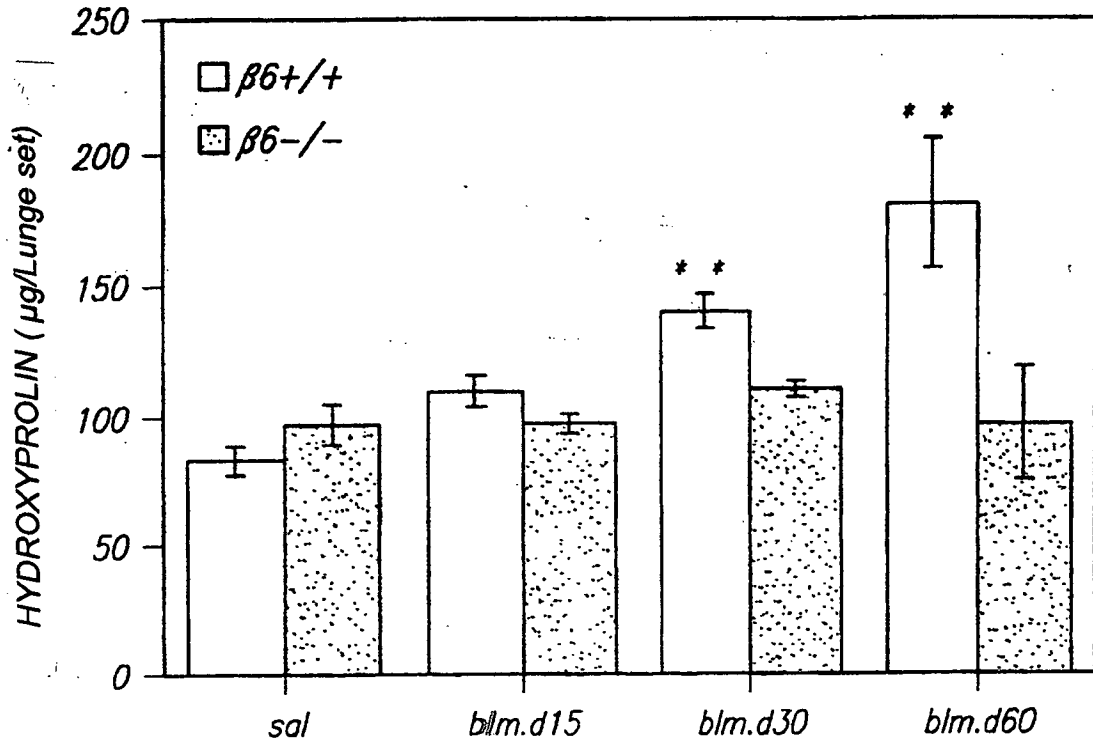


FIG. 1B

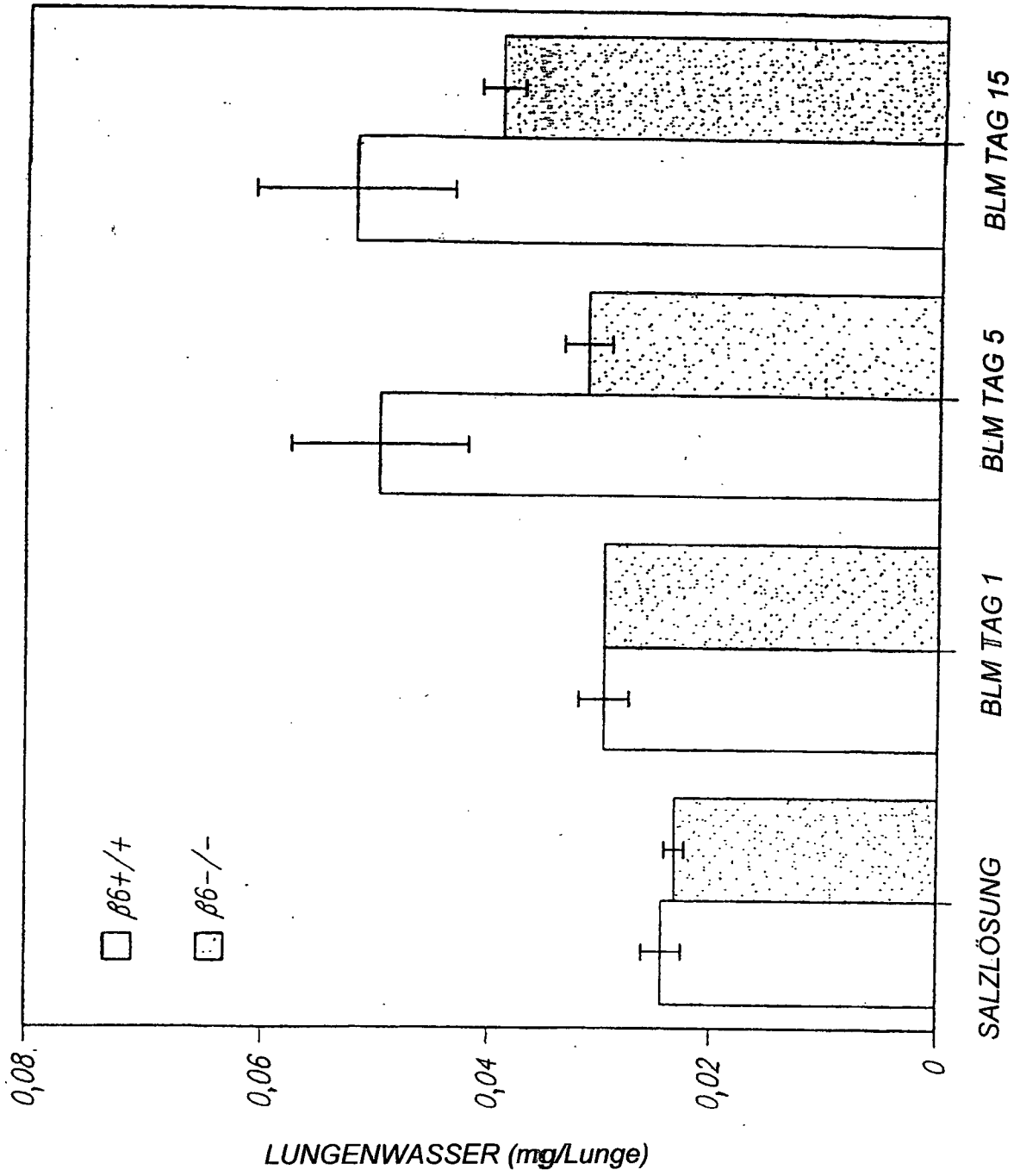


FIG. 2

FIG. 3

