Antikörper- und Chemokinkonstrukte und ihre Verwendung in der Behandlung von Autoimmunkrankheiten

Die vorliegende Erfindung betrifft Antikörper- und Chemokinkonstrukte gegen Chemokinrezeptor exprimierende Zellen, insbesondere gegen den Chemokinrezeptor CCR5 exprimierende Monozyten/Makrophagen und $CCR5^+$ T-Zellen. Weiter betrifft die Erfindung die Verwendung von Antikörper- und Chemokinkonstrukte zur Zerstörung von Chemokinrezeptor exprimierenden Zellen zur Behandlung von Autoimmunkrankheiten und allergischen Erkrankungen, insbesondere zur Behandlung von chronisch entzündlichen Gelenkserkrankungen. Der erfindungsgemäßen Antikörper- und Chemokinkonstrukte ermöglichen die gezielte Depletion von Chemokinrezptoren exprimierenden Zellen und somit eine gezielte immunsuppressive Therapie von Autoimmunkrankheiten.

In Deutschland leiden ca. 1% der Bevölkerung an Rheumatoider Arthritis. Hinzu kommen noch eine Reihe weiterer Erkrankungen aus dem rheumatischen Formenkreis, die ebenfalls zu Gelenksentzündungen führen. Für die Behandlung entzündlicher Gelenkserkrankungen werden gegenwärtig drei Gruppen von Medikamenten eingesetzt: Nichtsteroidale Antirheumatika, Kortisonpräparate, Basistherapeutika und TNFα-Blockade. Bisheriger Therapieschwerpunkt ist die lokale Injektion von Kortisonpräparaten zusammen mit einer systemischen Gabe von Antiphlogistika oder Basistherapeutika.

Nichtsteroidale Antirheumatika entfalten eine milde schmerzlindernde und entzündungs-hemmende Wirkung, zeichnen sich aber bei häufiger Anwendung durch eine hohe Nebenwirkungsrate aus (z.B. Magengeschwüre, Nierenschädigungen). Kortisonpräparate wirken in hoher Dosierung stark abschwellend und schmerzlindernd, wobei es jedoch nach Absetzen zu einem schnellen Rezidiv kommt. Zudem können Kortisonpräparate den Zerstörungsprozeß der Gelenkserkrankung nicht aufhalten. Eine langfristige Therapie mit Kortison ist in der

Regel mit schwerwiegenden Nebenwirkungen verbunden (Infektionen, Cushing-Phänomen, Osteoporose, Pergamenthaut, Stoffwechsel- und Hormonstörungen). Auch die lokale Kortisoninjektion hat den wesentlichen Nachteil, daß die eingewanderten weißen Blutkörperchen nur in ihrer Aktivität gedämpft und nicht zerstört sind, weshalb es nach Absetzen der Behandlung zu einem schnellen Rezidiv kommt, was wie oben erwähnt auch für die systemische Anwendung gilt. Selten tritt nach der Kortisoninjektion ein Aufflammen der Entzündung aufgrund der irritierenden Wirkung von Kortisonkristallen auf. Die Wirkungsdauer einer Kortisoninjektion ist sehr variabel und reicht von primärer Wirkungslosigkeit bis zu einer Wirkung für mehrere Wochen.

Basistherapeutika werden in der Rheumatologie angewandt, um eine langfristige Unterdrückung der Entzündung und Einsparung von Kortisonpräparaten zu bewirken. Aufgrund erheblicher Toxizität (Allergien, Infekte, maligne Erkrankungen, Nierenfunktionsverschlechterung, Blutdruckkrisen, Lungenerkrankungen) ist eine engmaschige fachärztliche Betreuung der Patienten notwendig. Mit einem Wirkungseintritt ist nicht vor 3 Monaten nach Beginn der Behandlung zu rechnen. Zur Verfügung stehen derzeit 4 bis 5 verschiedene Basistherapeutika, die zunächst einzeln eingesetzt oder bei Therapieversagung kombiniert werden. Über den Wirkungsmechanismus der Basistherapeutika ist meist nur wenig bekannt. Ob eine Gelenksdestruktion durch Anwendung von Basistherapeutika vermindert werden kann, ist nicht endgültig geklärt. In den letzten Jahren wurde eine neue Substanzgruppe in die Therapie der rheumatoiden Arthritis eingeführt, die auf der Blockade von Zellbotenstoffen (insbesondere TNFα) mittels monoklonaler Antikörper oder löslicher Rezeptorkonstrukte beruht.

Darüber hinaus sprechen immer wieder Patienten nicht auf die derzeit verfügbaren Therapien an; in anderen Fällen muß die herkömmliche Behandlung aufgrund von intolerablen Nebenwirkungen abgebrochen werden.

Es besteht somit ein Bedürfnis für ein neues therapeutisches Prinzip für die Behandlung chronisch entzündlicher Gelenkserkrankungen bzw. von rheumatischen Erkrankungen allgemein und anderen Autoimmunerkrankungen.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es demnach, neue therapeutische Wirkstoffe zur Behandlung von entzündlichen Gelenkserkrankungen und anderen Autoimmunkrankheiten sowie allergischen Erkrankungen bereitzustellen, die die Nachteile des Standes der Technik überwinden.

Zur Lösung dieser Aufgabe dienen die Merkmale der unabhängigen Schutzansprüche.

Vorteilhafte Ausgestaltungen sind in den jeweiligen Unteransprüchen definiert.

Die Aufgabe wird gelöst durch Antikörper- oder Chemokinkonstrukte, die in der Lage sind, an einen Chemokinrezeptor auf der Oberfläche einer Targetzelle zu binden, wobei die Bindung des Konstrukts an den Chemokinrezeptor in der Zerstörung der Targetzelle resultiert. Die erfindungsgemäßen Antikörper- und Chemokinkonstrukte bewirken eine selektive Zerstörung von Chemokinrezeptor exprimierenden Targetzellen, insbesondere Leukozyten. Die erfindungsgemäßen Konstrukte umfassen bispezifische Antikörper, Antikörperkonstrukte, Chemokinkonstrukte, murine, chimärisierte oder humanisierte Antikörper und binden entweder sowohl an eine Chemokinrezeptor exprimierende Targetzelle und an ein Antigen auf der Oberfläche von Effektorzellen, insbesondere ein CD3-Antigen, oder enthalten ein Toxin. Bei den Effektorzellen handelt es sich vorzugsweise um Leukozyten, insbesondere Monozyten/Makrophagen oder T-Zellen, oder dendritische Zellen.

In einer Studie an über 40 Patienten mit verschiedenen Gelenkerkrankungen wurde gefun-den, daß es im entzündeten Gelenk zu einer sehr starken Anreichung von den Chemokin-rezeptor CCR5 exprimierenden Monozyten/Makrophagen und T-Lymphozyten kommt. Im Gelenk exprimieren über 90% der Monozyten und T-Lymphozyten den Chemokinrezeptor CCR5, während dies im Blut nur etwa 10% bzw. 20% sind. Aufgrund dieses Expressionsmusters sind der Chemokinrezeptor CCR5 bzw. Chemokinrezeptoren allgemein hervorragend als Ziel für eine zelldepletive Therapie geeignet. Von einer CCR5-Depletion wären im Gelenk somit fast alle Monozyten und T-Lymphozyten betroffen, während in der Blutbahn nur ein kleiner Teil dieser Zellen depletiert würde. Monozyten und T-Lympho-zyten sind die dominierenden Zelltypen bei chronischen Gelenksentzündungen, wobei Monozyten insbesondere für die Gelenksdestruktion verantwortlich sind.

Überraschenderweise konnte jetzt gezeigt werden, daß mit Hilfe von neu entwickelten Antikörper- und Chemokinkonstrukten gezielt Chemokinrezeptor exprimierende, insbe-sondere CCR5 exprimierende, Leukozyten zerstört werden können.

Während gegenwärtige Behandlungsstrategien im wesentlichen eine symptomatische Therapie darstellen und den Verlauf der Gelenkserkrankung und die Gelenkdestruktion nur wenig beeinflussen können und z.B. Basistherapeutika ihre Wirkung erst nach mehreren Monaten entfalten und zudem wie die übrigen verwendeten Medikamente eine erhebliche Toxizität bei längerer Einnahme aufweisen, bewirken die erfindungsgemäßen Konstrukte innerhalb weniger Stunden im Gelenk eine fast vollständige Depletion von Chemokin-rezeptoren exprimierenden, insbesondere von $CCR5^+$ Monozyten/Makrophagen und T-Lymphozyten. Diese Zelltypen sind für die chronische Entzündung und Gelenksdestruktion verantwortlich. Aufgrund der Depletion kann eine langanhaltende Wirkung erzielt werden. Da Monozyten sehr effektiv eliminiert

werden, ermöglicht der Einsatz des erfindungsgemäßen Antikörpers eine günstige Beeinflussung der Gelenksdestruktionen. Aufgrund der nicht-selektiven Hemmung des Immunsystems durch etablierte Basistherapeutika und TNFα-Blockade besteht der Verdacht auf eine erhöhte Neigung zu Infekten und Tumorbildung. Aufgrund der Verteilung von Chemokinrezeptoren exprimierenden Zellen, insbesondere von CCR5 exprimierenden Leukozyten, können im Gegensatz dazu ganz überwiegend die am Entzündungsprozeß beteiligten Leukozyten ausgeschaltet werden, ohne die Immunabwehr insgesamt wesentlich zu beeinflussen. Insgesamt ermöglicht der erfindungsgemäße Antikörper eine Therapie mit einem geringeren Nebenwirkungsspektrum, bei gleichzeitiger Verbesserung des Verlaufs der Gelenkserkrankung und Verhinderung von Gelenkdestruktionen.

In einer bevorzugten Ausgestaltung handelt es sich bei dem Konstrukt um einen bispezifischen Antikörper, der mit einer Spezifität gegen einen Chemokinrezeptor, vorzugsweise gegen einen humanen Chemokinrezeptor und besonders vorzugsweise gegen den humanen Chemokinrezeptor CCR5, und mit der anderen Spezifität gegen ein Antigen auf der Oberfläche einer Effektorzelle, vorzugsweise gegen CD3 auf der Oberfläche einer T-Zelle, gerichtet ist. Auch Antikörperkonstrukte mit einer identischen oder ähnlichen Epitop-Spezifität sind von der Erfindung umfaßt.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei dem bispezifischen Antikörper um einen single-chain-Antikörper.

In einer weiteren bevorzugten Ausgestaltung handelt es sich bei dem Antikörperkonstrukt um einen bispezifischen Antikörper, der mit einer Spezifität gegen einen Chemokinrezeptor, vorzugsweise gegen einen humanen Chemokinrezeptor und besonders vorzugsweise gegen den humanen Chemokinrezeptor 5 (CCR5), und mit der anderen Spezifität gegen ein Toxin gerichtet ist. Auch in diesem Fall handelt es sich in einer besonders bevorzugten

Ausführungsform bei dem bispezifischen Antikörper um einen single-chain-Antikörper.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung handelt es sich bei dem Konstrukt um ein Chemokinkonstrukt in Form eines Chemokintoxins, das aus der Fusion eines modifizierten oder unmodifizierten Chemokins mit einem modifizierten oder unmodifizierten Toxin entsteht. Besonders bevorzugt sind Chemokintoxine, die an CCR5 binden, wie z.B. Konstrukte mit MIP 1β, MIP 1α, MCP-2, MCP-3 und RANTES.

Bei dem Chemokinkonstrukt gemäß der Erfindung kann das Chemokin kovalent mit einem Toxin verbunden sein, die Verbindung zwischen Chemokin und Toxin kann aber auch auf andere Weise entstehen. So kann das Chemokin auch über eine Multimerisierungsdomäne mit einem Antikörper verbunden werden, der neben einer kompatiblen Multimerisierungsdomäne eine Spezifität gegen ein Antigen auf der Oberfläche einer Effektorzelle, vorzugsweise gegen CD3 auf der Oberfläche einer T-Zelle, und/oder gegen ein Toxin aufweist. Ebenso kann das Chemokin über eine Multimerisierungsdomäne mit einem Toxin mit kompatibler Multimerisierungsdomäne verbunden werden. Weiter kann das Chemokin kovalent mit einem Antikörper verbunden sein, der eine Spezifität gegen ein Antigen auf der Oberfläche einer Effektorzelle, vorzugsweise gegen CD3 auf der Oberfläche einer T-Zelle, und/oder gegen ein Toxin aufweist. Des weiteren kann das Chemokin über eine Multimerisierungsdomäne mit einem Toxin über eine mit dem Toxin verbundene, kompatible Multimerisierungsdomäne verbunden werden. Die Verbindung über Multimerisierungsdomänen kann in vitro oder in vitro stattfinden.

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung handelt es sich bei dem Antikörper-konstrukt um einen Antikörper gegen einen Chemokinrezeptor, vorzugsweise gegen CCR5, der mit einem Toxin kovalent verbunden ist. Hierbei

handelt es sich um sog. Immunotoxine.

Als Toxine eignen sich insbesondere trunkiertes Pseudomonastoxin, trunkiertes Diphterietoxin und ähnliche Toxine.

Die Erfindung umfaßt auch Antikörperkonstrukte, die einen Antikörper gegen einen Chemokinrezeptor, vorzugsweise gegen CCR5, umfassen, der über eine Multimerisierungsdomäne in Homo-/Heterodimere mit einem zweiten, gegen ein Antigen auf einer Effektorzelle, vorzugsweise gegen CD3, und/oder gegen ein Toxin gerichteten Antikörper in vitro und/oder in vivo verbunden werden können.

Des weiteren sind auch Antikörperkonstrukte umfaßt, in denen ein Antikörper gegen einen Chemokinrezeptor, vorzugsweise gegen CCR5, über eine Multimerisierungsdomäne mit einem Toxin mit kompatibler Multimerisierungsdomäne in vitro und/oder in vivo verbunden werden kann.

Allgemein handelt es sich bei den Antikörperkonstrukten, Chemokinkonstrukten und murinen, chimärisierten oder humanisierten Antikörpern gemäß der Erfindung um Substanzen, die in der Lage sind, Chemokinrezeptor exprimierende Zellen, insbesondere Leukozyten, zu zerstören, wobei diese selektive Zerstörung zur Behandlung von entzündlichen Erkrankungen (Autoimmunerkrankungen, allergische Erkrankungen u.ä.) eingesetzt wird.

Unter den Begriff Antikörper bzw. Antikörperkonstrukt fallen im Zusammenhang mit der Erfindung auch Antikörperfragmente, die die Spezifität(en) des erfindungsgemäßen Antikörpers bzw. -konstrukts, aufweisen, sog. aktive Fragmente.

Bispezfische Antikörper können wie unten beschrieben oder nach bekannten Methoden hergestellt werden; zu nennen sind hier beispielhaft chemisch gekoppelte

Antikörper oder Antikörperfragmente, die Herstellung mittels der Hybridhybridon-Technik, die Herstellung als bispezifische single-chain-Antikörper, Diabodies und die Herstellung durch Zusammenlagerung von 2 Antikörpern über Multimerisierungsdomänen.

Bevorzugt handelt es sich bei den bispezifischen Antikörpern um single-chain-Antikörper. Dabei können die verschiedenen Teilbereiche dieser Antikörper mittels konventioneller Methoden zusammengefügt oder als „contiguous" Protein mittels rekombinanter DNA-Technologie hergestellt werden, z.B. derart, daß ein für eine chimäre oder humanisierte Antikörperkette kodierendes Nukleinsäuremolekül exprimiert wird, um eine contiguous Protein zu produzieren (siehe z.B. Mack et al. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 92, pp7021-7025).

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform handelt es sich um einen single chain-Antikörper mit folgenden Fv-Fragmenten: sc-Fv-Fragment eines monoklonalen Antikörpers gegen den Chemokinrezeptor, vorzugsweise gegen CCR5, sowie ein sc-Fv-Fragment eines monoklonalen Antikörpers gegen CD3. Hierbei kann das Fv-Fragment gegen den Chemokinrezeptor als auch das Fv-Fragment gegen CD3 an N-terminaler Position stehen. Bevorzugt steht das Fv-Fragment gegen CCR5 an N-terminaler Position. Die Anordnung der VL und VH Antikörperdomänen kann in beiden Konstrukten variabel sein, bevorzugt besitzt das Fv-Fragment gegen CCR5 die Anordnung VL-VH und das Fv-Fragment gegen CD3 die Anordnung VH-VL. Die Verbindungslinker zwischen den variablen Domänen sowie zwischen beiden Fv-Fragmenten bestehen aus Peptidlinkern, bevorzugt aus einem hydrophilen flexiblen Glycin- und Serinhaltigen Linker aus 0-25 Aminosäuren. Eine zusätzliche Histidinkette aus 6xHis am C- oder N-terminaler Position kann zur leichteren Aufreinigung und Detektion verwendet werden.

Bispezifische single-chain-Antikörper weisen im Vergleich zu konventionellen bispezifischen Antikörpern den Vorteil auf, daß sie nur aus einer Proteinkette bestehen und daher in ihrer Zusammensetzung genau definiert sind. Sie besitzen ein kleines Molekulargewicht von in der Regel <60 kD und lassen sich einfach und in großen Mengen rekombinant in geeigneten Zellinien, bspw. in CHO-Zellen herstellen. Der wesentlichste Vorteil besteht allerdings darin, daß sie keine konstanten Antikörperdomänen besitzen und somit nur dann T-Lymphozyten zur Lyse aktivieren, wenn diese an ihre Zielzellen, also Chemokinrezep-toren exprimierende Zellen, gebunden sind. Single chain-Antikörper sind konventionellen bispezifischen Antikörper daher häufig deshalb überlegen, weil ihr klinischer Einsatz mit weniger bzw. geringeren Nebenwirkungen verbunden ist.

Die Erfindung betrifft weiter eine Zelle eukaryontischen oder prokaryontischen Ursprungs, die ein erfindungsgemäßes Antikörperkonstrukt, insbesondere einen erfindungsgemäßen bispezifischen Antikörper, produziert, oder ein in vitro-Verfahren zur Proteinherstellung.

Die durch Verbindung eines Chemokins mit einem Toxin entstehenden Chemokintoxine gemäß der Erfindung können z.B. durch chemische Kopplung, durch Herstellung eines Fusionsproteins aus einem Chemokin und einem modifizierten oder unmodifizierten prokaryontischen oder eukaryontischen Toxin und durch Zusammenlagerung eines Chemokins und eines Toxins über zusätzliche Mulitmerisierungsdomänen hergestellt werden.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform handelt es sich um rekombinant hergestelltes Fusionsprotein aus einem Chemokin, das an den humanen Chemokinrezeptor CCR5 bindet (MIP 1β, MIP 1α, RANTES, MCP-2, MCP-3), und einer trunkierten Version des Pseudomonas Exotoxin A (z.B. PE38, PE40). Hierbei wird das Chemokin mittels eines kurzen Peptidlinkers mit dem Pseudomonas-Toxin

verbunden. Der Linker besteht bevorzugt aus einer flexiblen und hydrophilen Aminosäuresequenz, insbesondere aus Glycinen und Serinen und hat eine Länge von 0-20 Aminosäuren.

Die Aufgabe der Erfindung wird des weiteren durch eine pharmazeutische Zusammen-setzung gelöst, umfassend mindestens ein erfindungsgemäßes Antikörper- oder Chemokinkonstrukt, insbesondere umfassend mindestens einen bispezfischen Antikörper, in einer ausreichenden Menge, um Chemokinrezeptoren exprimierende Zellen zu zerstören, und ggf. einen pharmazeutisch annehmbaren Träger.

Pharmazeutische Zusammensetzungen umfassend den erfindungsgemäßen bispezifischen Antikörper sind für parenterale Verabreichung geeignet, d.h. subcutan, intramuskulös, intravenös, intraartikulär, intraperitoneal, wobei die Zusammensetzungen für parenterale Verabreichung üblicherweise eine Lösung des Antikörpers oder einen Cocktail davon, gelöst in einem annehmbaren Träger, vorzugsweise einen wäßrigen Träger, umfassen. Als wäßriger Träger eignen sich beispielsweise Wasser, NaCl-Lösung und Glycin. Die Zusammensetzungen können darüber hinaus übliche pharmazeutisch annehmbare Hilfsstoffe enthalten, wie sie z.B. zur Einstellung eines bestimmten pH-Werts, als Puffersubstanz oder ähnlichem eingesetzt werden.

Die Konzentration des bispezifischen Antikörpers in der Zusammensetzung kann sehr variieren, d.h. von weniger als etwa 10^{-7} Gew.-% bis 1 Gew.-%. Bevorzugt beträgt die Konzentration von 10^{-4} Gew.-% bis 10^{-1} Gew.-%. Im Falle der intraartikulären Applikation sollte die Dosis des bispezifischen Antikörpers von 1 mg bis 0,001 mg und besonders bevorzugt ca. 0,02 mg des bispezifischen single chain-Antikörpers betragen.

So wäre z.B. für die intraartikuläre Applikation, z.B. in ein Kniegelenk, eine Zusammensetzung, umfassend etwa 20 µg des erfindungsgemäßen bispezifischen Antikörpers oder Chemokintoxins, gelöst in ca. 2-5 ml steriler Kochsalzlösung, z.B. gepuffert mit Phosphat oder Tris, geeignet. Ebenso wäre eine intravenöse Injektion als Applikationsform geeignet.

Eine weitere Aufgabe der Erfindung besteht darin, neue Verwendungsmöglichkeiten für den erfindungsgemäßen Antikörper aufzuzeigen.

Diese Aufgabe wird durch die Verwendung von mindestens einem erfindungsgemäßen Antikörper oder Chemokintoxin zur Depletion von Chemokinrezeptor exprimierenden Zellen gelöst. In einer bevorzugten Ausführungsform wird der erfindungsgemäße Antikörper bzw. das erfindungsgemäße Chemokintoxin zur Zubereitung einer pharmazeutischen Zusammensetzung für die Behandlung von chronischen Gelenksentzündungen und anderen Autoimmunkrankheiten oder von allergischen Erkrankungen eingesetzt.

Die selektive Chemokinrezeptor-Depletion, insbesondere die CCR5-Depletion hat im Vergleich zu bisherigen immunsuppressiven Therapien (wie z.B. Kortison, Methotrexat, Zytokinblockade) zwei wesentliche Vorteile: Erstens zielen bisherige Therapien nicht auf eine Depletion der infiltrierenden Leukozyten ab, sondern bewirken nur eine Unterdrückung der Aktivität. Dies führt dazu, daß es nach Absetzen der Behandlung rasch zu Rezidiven kommt und eine kontinuierliche Immunsuppression notwendig ist. Im Gegensatz dazu besteht bei einer Depletion der verantwortlichen Leukozyten im Gelenk die Hoffnung, daß bereits nach einer oder wenigen Behandlung eine langanhaltende Remission erzielt wird. Der zweite Vorteil einer Chemokinrezeptor-Depletion besteht darin, daß aufgrund der Verteilung von Chemokinrezeptor, insbesondere CCR5-, exprimierenden Zellen nur die am Entzündungsprozeß beteiligten Zellen ausgeschaltet werden und die übrigen Zellen

weitgehend verschont bleiben.

Der Wirkmechanismus des erfindungsgemäßen, bispezifischen Antikörpers, der mit einer Spezifität gegen einen Chemokinrezeptor und mit der anderen Spezifität gegen ein Antigen auf der Oberfläche von T-Zellen als Effektorzellen gerichtet ist, ist in Abbildung 1 (oben) und in Abbildung 2 anhand einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung verdeutlicht. Wie in Abbildung 1 (oben) gezeigt, bindet ein bispezifischer Antikörper mit seinen beiden Armen an zwei verschiedenen Antigene. Dies sind in einer bevorzugten Ausgestaltung der Chemokinrezeptor CCR5 und das Oberflächenmolekül CD3 auf T-Lymphozyten. Wie in Abbildung 2 dargestellt, führt der bispezifische Antikörper zu einer Vernetzung von T-Lymphozyten und CCR5 expimierenden Zellen. Die Quervernetzung bewirkt daß T-Lymphozyten zur Lyse aktiviert werden und die mit ihnen verbundenen $CCR5^+$ Zellen zerstört werden. Eine Lyse von $CCR5^+$ Zellen findet also nur statt, wenn auch T-Lymphozyten anwesend sind. Diese sind bei allen Formen der chronischen Gelenkentzündung in großer Zahl vorhanden. Auf diese Weise ist es insbesondere möglich, durch Injektion des bispezifischen Antikörpers in das entzündete Gelenk die für die Entzündung verantwortlichen Zellen gezielt zu elimineren.

Weitere Ausführungsformen der Erfindung und ihre Wirkungsweise sind in den beigefügten Abbildungen 1 bis 9 veranschaulicht.

Aufgrund der Möglichkeit, Chemokinrezeptoren exprimierende Zellen gezielt zu depletieren, bietet sich das erfinderische Konzept nicht nur für chronische Gelenksentzündungen, sondern auch für rheumatische Erkrankungen und andere Autoimmunerkrankungen an, bei denen eine ähnlich starke Anreicherung von Chemokinrzeptoren exprimierenden, insbesondere von CCR5 exprimierenden, Zellen gefunden wurde.

Während über mögliche Anwendungsgebiete von bispezifischen Antikörpern im Bereich der Tumortherapie bereits berichtet worden ist (z.B. in Kroesen, B.J. et al. (1993) Cancer Immunol. Immunother. 37:400-7; Nitta, T. et al. (1990) Lancet 335:368-71; Bolhuis, R.L. et al. (1992) Int J Cancer Suppl, 7:78-81; Canevari, S. et al. (1995) J. Natl. Cancer Inst. 87:1463-9; De Gast, G. et al. (1995) J. Hematother. 4:433-437; Kroesen, B.J. et al. (1994) Br. J. Cancer, 70:652-61; Tibben, J.G. et al. (1993) J. Natl. Cancer Inst. 85:1003-4), ist der Einsatz von bispezifischen Antikörpern zur Immunsuppression bislang noch nicht beschrieben worden.

Beschreibung der Abbildungen:

Abbildung 1 veranschaulicht erfindungsgemäße Antikörper- und Chemokinkonstrukte, die eine Vernetzung von Targetzellen, hier CCR5 exprimierenden Zellen, und Effektorzelle, hier T-Zellen mit CD3 auf der Oberfläche, bewirken. Oben: bispezifischer Antikörper mit Spezifitäten sowohl gegen CCR5 als auch gegen CD3, Mitte: Chemokinkonstrukt bestehend aus einem Chemokin und einem Antikörper gegen CD3, Unten: Chemokin-konstrukt, bei dem ein Chemokin mit Multimerisierungsdomäne mit einem gegen CD3 gerichteten Antikörper über eine kompatible Multimerisierungsdomäne verbunden werden kann.

Die Quervernetzung führt, wie in Abbildung 2 schematisch dargestellt, daß T-Lympho-zyten zur Lyse aktiviert werden und die mit ihnen vernetzten CCR5 positiven Zellen zerstört werden.

Abbildung 3 zeigt erfindungsgemäße Antikörper- und Chemokinkonstrukte, die eine Verbindung zwischen Targetzellen, hier CCR5 exprimierenden Zellen, und einem Toxin herbeiführen. Oben: bispezifischer Antikörper mit Spezifitäten sowohl gegen CCR5 als auch gegen ein Toxin, Unten: Chemokinkonstrukt bestehend aus einem Chemokin und einem Antikörper gegen ein Toxin.

Die Vernetzung von Targetzelle und Toxin bewirkt, wie in Abbildung 4 veranschaulicht, den Zelltod der CCR5 positiven Targetzelle.

Abbildung 5 zeigt, ähnlich Abbildung 3, Antikörper- und Chemokinkonstrukte, die eine Verbindung zwischen einer Targetzelle und einem Toxin herbeiführen, wobei allerdings hier das Toxin nicht über die Spezifität eines gegen das Toxin gerichteten Antikörpers gebunden wird, sondern entweder kovalent mit einem gegen den

Chemokinrezeptor, vorzugsweise gegen CCR5, gerichteten Antikörper (Abbildung 5, Oben) oder mit einem

Chemokin (Abbildung 5, Mitte) verbunden ist oder über eine Multimerisierungsdomäne mit einem gegen einen Chemokinrezeptor gerichteten Antikörper mit kompatibler Multimerisierungsdomäne verbindbar ist (Abbildung 5, Unten).

Auch in diesem Fall führt, wie in Abbildung 6 skizziert, die Verbindung von Targetzelle und Toxin zum Zelltod der Targetzelle.

Abbildung 7 zeigt das Ergebnis einer FACS-Analyse (durchgeführt wie beschrieben in Mack et al. (1998) J. Exp. Med. 187, pp. 1215-1224), das die Depletion von CCR5 positiven T-Zellen und Monozyten aus der entzündeten synovialen Gelenkflüssigkeit von einem Patienten mit chronischer Polyarthritis bzw. von kultivierten peripheren Blutleukozyten (PBMC) verdeutlicht.

Abbildung 8 zeigt die Zytotoxizität des Chemokintoxins Ra-PE38, genauer gesagt die Zerstörung von CCR5 exprimierenden CHO-Zellen durch das Chemokintoxin Ra-PE38 (10 ng/ml) nach 24 Stunden Inkubation (unten rechts). CHO-Zellen, die statt CCR5 den Chemokinrezeptor CXCR4 exprimieren, werden durch Ra-PE38 nicht zerstört (oben), da RANTES nicht an CXCR4 bindet. Inkubation mit Medium bewirkt keine Zerstörung von CHO-Zellen. Ra-PE38 – Fusionsprotein aus RANTES und einem trunkierten Pseudomonasexotoxin mit einem Molekulargewicht von 38 kD.

Abbildung 8 veranschaulicht somit den in Abbildung 5, Mitte, skizzierten Ansatz.

Abbildung 9 gibt die Inkubation von Synovialflüssigkeit mit CD3-CCR5 bispezifischen Antikörpern über 48 Stunden wieder. Abbildung 9 ist somit im Zusammenhang mit Abbildung 7, oben, zu lesen. Es erfolgt eine konzentrationsabhängige Depletion der T-Lymphozyten und Monozyten. Bei einer Antikörperkonzentration von 125 ng/ml zeigte sich eine Reduktion der Monozyten und T-Lymphozyten um 96% bzw. 97,5%.

Die nachfolgenden Beispiele dienen der Veranschaulichung der Erfindung und stellen keine Einschränkung auf bestimmte Ausführungsformen bzw. Anwendungsbereiche dar. Vielmehr kann man sich eine Vielzahl weiterer Anwendungsmöglichkeiten der vorliegenden Erfindung vorstellen.

Beispiele

Beispiel 1: Herstellung eines bispezifischen Antikörpers

Für die Herstellung bispezifischer Antikörper kann bspw. die single-chain Technologie verwendet werden (Mack et al. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 92:7021-7025; Mack et al. (1997) J. Immunol. 158:3965-3970). Dazu werden, wie in den Abbildungen 1 (oben) und 3 (oben) schematisch dargestellt, die variablen Domänen der leichten (VL) und schweren (VH) Immunglobulin-kette von zwei verschiedenen Antikörpern in einer bestimmten Reihenfolge miteinander fusioniert und ggf. zusätzlich eine Histidinkette aus 6xHis angehängt. Die Fusion findet auf DNA-Ebene statt, so daß nach Expression eine Proteinkette mit vier verschiedenen variablen Domänen entsteht (vgl. Abbildungen 1 (oben) und 3 (oben)). Die angefügte Histidinkette ermöglicht eine einfache und effiziente Reinigung in einem Schritt über immobilisierte Ni-Ionen. Abbildung 1 (oben) zeigt eine bevorzugte Ausführungsform

des bispezifischen Antikörpers, der an das CD3-Antigen auf der Oberfläche der Effektorzelle und an den humanen CCR5 auf der Oberfläche von Leukozyten als Targetzellen bindet.

Mittels RT-PCR werden die variablen Antikörperdomänen aus den Hybridomzellen, die den gewünschten Antikörper produzieren, amplifiziert. Die so gewonnenen PCR-Fragmente werden in einen Vektor kloniert und sequenziert. Anschließend wird mittels Fusions-PCR ein single-chain Antikörper für eine Spezifität generiert, indem zwischen den beiden variablen Antikörperdomänen ein Linker aus $(Gly_4Ser_1)_3$ eingefügt wird. In einer weiteren Fusions-PCR wird das Antikörperfragment gegen CCR5 mit dem bereits publizierten Antikörperfragment gegen CD3 fusioniert, wobei ein Linker bestehend aus Gly_4Ser_1 eingefügt wird (siehe Mack et al., supra). Die Anordnung der Domänen wird dabei folgendermaßen gewählt: VL(1)-VH(1)-VH(2)-VL(2) , wobei (1) die Spezifität gegen CCR5 und (2) die Spezifität gegen CD3 bedeutet.

Beispiel 2: Expression und Aufreinigung des bispezifischen Antikörpers aus Beispiel 1

Zur Expression des bispezifischen Antikörpers wird die entsprechende DNA-Sequenz in einen eukaryontischen Expressionsvektor (z.B. PEF-DHFR, Mack et al. (1995) PNAS, supra) subkloniert und mittels Elektroporation in DHFR-defiziente CHO-Zellen transfiziert. Aus dem Überstand stabil transfizierter CHO-Zellen wird der bispezifische Antikörper mittles Affinitätschromatographie an Ni-NTA gereinigt, wobei die Elution mit pH-Erniedrigung stattfindet. Anschließend wird eine pH-Einstellung vorgenommen und das Protein auf eine geeignete Konzentration eingestellt.

Beispiel 3: In vitro-Tests an Blutleukozyten und an Leukozyten an entzündeten Gelenken

Für in vitro-Tests wird Gelenkergußflüssigkeit inclusive der enthaltenen Zellen mit dem bispezifischen Antikörper für ein oder mehrere Tage inkubiert. Bereits nach 24 Stunden ist ein fast vollständiges Verschwinden der CCR5 positiven Lymphozyten und Monozyten sichtbar. Nach längerer Inkubation findet bei der Mediumkontrolle eine Differenzierung der Monozyten in Makrophagen statt, die am Boden der Kulturflasche sichtbar sind. Bei entsprechender Inkubation mit dem bispezifischen Antikörper sind keine Makrophagen sichtbar.

Ein entsprechendes Ergebnis erhält man, wenn kultivierte PBMC mit dem bispezifischen Antikörper inkubiert werden. Hierbei tritt eine vollständige Depletion von CCR5 positiven Monozyten und eine weitgehende Depletion CCR5 positiver T-Lymphozyten ein. Die Depletion von CCR5 positiven T-Zellen und Monozyten in Abbildung 7 gezeigt.

Die Ergebnisse zeigen, daß das erfindungsgemäße Konstrukt gemäß Beispiel 1 in der Lage ist, CCR5 positive Monzyten vollständig zu zerstören. Dies gilt sowohl für Monozyten aus dem Gelenkpunktat als auch für Blutmonozyten, die bei ihrer Differenzierung zu Makrophagen CCR5 exprimieren. Die Depletion der Monozyten/Makrophagen findet innerhalb weniger Stunden (<24 h) statt. Besonders die Depletion der Monozyten/Makrophagen im Gelenk bietet einen wesentlichen therapeutischen Nutzen, da diese Zellen für die Gelenkdestruktion verantwortlich sind. Darüber hinaus ist auch für eine Aktivierung von T-Lymphozyten ein Zusammenspiel mit Makrophagen notwendig, so daß gleichzeitig eine Unterdrückung der T-Lymphozytenfunktion stattfindet.

Zusätzlich zur Depletion von Monozyten/Makrophagen konnte eine deutliche Reduktion in der Zahl der CCR5 positiven T-Lymphozyten beobachtet werden.

ANSPRÜCHE

1. Antikörper- oder Chemokinkonstrukt, das in der Lage ist, an einen Chemokinrezeptor auf der Oberfläche einer Targetzelle zu binden, wobei die Bindung des Konstrukts an den Chemokinrezeptor in der Zerstörung der Targetzelle resultiert, und aktive Fragmente der Konstrukte.

2. Antikörper- oder Chemokinkonstrukt nach Anspruch 1, wobei der Chemokinrezeptor ein humaner Chemokinrezeptor ist.

3. Antikörper- oder Chemokinkonstrukt nach Anspruch 1 oder 2, wobei es sich bei dem Chemokinrezeptor um den Chemokinrezeptor 5 (CCR5) handelt.

4. Antikörperkonstrukt nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei es sich bei dem Konstrukt um einen bispezifischen Antikörper handelt, der in der Lage ist, an einen Chemokinrezeptor als erstes Antigen und an ein CD3-Antigen auf der Oberfläche einer Effektorzelle als zweites Antigen zu binden.

5. Antikörperkonstrukt nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei es sich bei dem Konstrukt um einen bispezifischen Antikörper handelt, der in der Lage ist, an einen Chemokinrezeptor als erstes Antigen und an ein Toxin als zweites Antigen zu binden.

6. Antikörperkonstrukt nach einem der Ansprüche 1 bis 3, das mit einem Toxin kovalent verbunden ist.

7. Antikörperkonstrukt nach einem der Ansprüche 1 bis 3, das über eine Multimerisierungsdomäne mit einem zweiten Antikörperkonstrukt, das in der Lage

ist, an ein CD3-Antigen auf der Oberfläche einer Effektorzelle und/oder ein Toxin zu binden, oder mit einem Toxin über eine kompatible Multimerisierungsdomäne in vitro und/oder in vivo verbunden werden kann.

8. Chemokinkonstrukt nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei es sich um ein Fusionskonstrukt eines modifizierten oder unmodifizierten Chemokins mit einem modifizierten oder unmodifizierten Toxin handelt.

9. Chemokinkonstrukt nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei das Chemokinkonstrukt über eine Multimerisierungsdomäne mit einem Antikörperkonstrukt, das in der Lage ist, an ein CD3-Antigen auf der Oberfläche einer Effektorzelle und/oder ein Toxin zu binden, oder mit einem Toxin über eine kompatible Multimerisierungsdomäne in vitro und/oder in vivo verbunden werden kann.

10. Chemokinkonstrukt nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei das Chemokin kovalent mit einem Antikörperkonstrukt verbunden ist, welches in der Lage ist, an ein CD3-Antigen auf der Oberfläche einer Effektorzelle und/oder ein Toxin zu binden.

11. Chemokin- oder Antikörperkonstrukt nach einem der Ansprüche 4, 7, 9 oder 10, wobei die Effektorzelle ein Leukozyt, insbesondere ein Monozyt/Makrophage oder eine T-Zelle, oder eine dendritische Zelle ist.

12. Antikörperkonstrukt nach einem der Ansprüche 1 bis 7 oder 9 bis 11, bei dem es sich um ein single-chain-Konstrukt handelt.

13. Zelle eukaryontischen oder prokaryontischen Ursprungs, die ein Antikörper- oder Chemokinkonstrukt nach einem der vorangehenden Ansprüche produziert.

14. Pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend mindestens ein Antikörper- oder Chemokinkonstrukt nach einem der Ansprüche 1 bis 12 in einer ausreichenden Menge, um Chemokinrezeptor exprimierende Zellen zu zerstören, und ggf. einen pharmazeutisch annehmbaren Träger.

15. Verwendung von mindestens einem Antikörper- oder Chemokinkonstrukt nach einem der Ansprüche 1 bis 12 zur Depletion von Chemokinrezeptor exprimierenden Zellen.

16. Verwendung von mindestens einem Antikörper- oder Chemokinkonstrukt nach einem der Ansprüche 1 bis 12 zur Behandlung von chronischen Gelenksentzündungen und anderen Autoimmunkrankheiten und allergischen Erkrankungen.

17. Verwendung von mindestens einem Antikörper- oder Chemokinkonstrukt nach einem der Ansprüche 1 bis 12 zur Zubereitung einer pharmazeutischen Zusammensetzung für die Behandlung von chronischen Gelenksentzündungen und anderen Autoimmunkrankheiten und allergischen Erkrankungen.