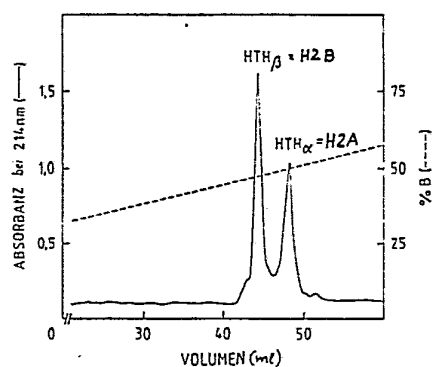



 INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁴ : A61K 37/24, 37/02, 39/39 G01N 33/50	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 85/ 03003 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 18. Juli 1985 (18.07.85)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE85/00004 (22) Internationales Anmeldedatum: 10. Januar 1985 (10.01.85) (31) Prioritätsaktenzeichen: P 34 00 928.0 P 34 05 620.3 (32) Prioritätsdaten: 12. Januar 1984 (12.01.84) 16. Februar 1984 (16.02.84) (33) Prioritätsland: DE (71)(72) Anmelder und Erfinder: RUSCH, Volker [DE/DE]; Schwalbenweg 6, D-6348 Herborn (DE). (72) Erfinder;und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US) : REICHHART, Robert [DE/DE]; Uhlandstrasse 15, D-6650 Homburg/Saar (DE). ZEPPEZAUER, Michael [DE/DE]; Eichen- dorferstrasse 13, D-6601 Saarbrücken-Scheidt (DE). JÖRNVALL, Hans [SE/SE]; Ursviksvägen 1098, S- 17246 Sundbyberg (SE).		(74) Anwalt: PÄTZOLD, Herbert; Mühlthaler Strasse 102, D-8000 München 71 (DE). (81) Bestimmungsstaaten: JP, US. Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>
(54) Title: BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCE WITH HORMONAL PROPERTIES, PRODUCTION PROCESS THEREOF AND UTILIZATION OF HISTONES FOR MEDICAL PURPOSES (54) Bezeichnung: BIOLOGISCH WIRKSAME SUBSTANZ MIT HORMONELLEN EIGENSCHAFTEN, VERFAHREN ZU IHRER HERSTELLUNG UND VERWENDUNG VON HISTONEN FÜR MEDIZINISCHE ZWECKE (57) Abstract Biologically active substance with standardizable hormonal activity, containing in a physiological medium at least one histone, particularly at least one histone H2 or an active area of said histone with immune system immunostimulating and/or endocrinological properties. Utilization of histones and/or segments of histones for producing such a preparation for medical purposes. Said histones may be extracted from biological starting materials, for example calf thymus. Since H2A and H2B histones of oxen and humans are identical, ox histones may also be used for such a preparation for human medical purposes. The preparation according to the present invention may also contain only the variable evolution segments or part of at least one H2 histone. The invention is based on the fact that the biologically active area of an immunostimulating or endocrinologically active histone is located in the variable evolution histone segment. The preparation according to the present invention may also be used in immunotherapy. (57) Zusammenfassung Biologisch wirksame Substanz mit standardisierbarer hormoneller Wirkung, das in einem physiologischen Medium wenigstens ein Histon, insbesondere wenigstens ein Histon H2 oder einen wirkungsgemäss aktiven Bereich dieses Histons mit das Immunsystem immunstimulierenden und/oder endokrino-logischen Eigenschaften enthält. Damit wird auch die Verwendung von Histonen und/oder Histonabschnitten zur Herstellung eines solchen Präparates für medizinische Zwecke vorgeschlagen. Die Histone lassen sich aus biologischen Ausgangsmaterialien, z.B. aus Kalbsthymus, gewinnen. Da bekanntlich H2A- und H2B-Histone vom Rind und vom Menschen identisch sind, können Rinder-Histone für das erfindungsgemässe Präparat auch zum humanmedizinischen Gebrauch verwendet werden. Erfindungsgemässe Präparate können auch nur den evolutionär variablen Abschnitt oder einen Teil hiervon wenigstens eines H2-Histons enthalten. Der Erfindung liegt vor allem die Erkenntnis zugrunde, dass der biologisch aktive Bereich eines immunstimulierenden bzw. endokrino-logisch wirksamen Histons innerhalb des evolutionär variablen Histonabschnittes liegt. Das erfindungsgemässe Präparat ist auch zur Immuntherapie verwendbar.		



LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	KR	Republik Korea
AU	Australien	LI	Liechtenstein
BE	Belgien	LK	Sri Lanka
BG	Bulgarien	LU	Luxemburg
BR	Brasilien	MC	Monaco
CF	Zentrale Afrikanische Republik	MG	Madagaskar
CG	Kongo	MR	Mauritanien
CH	Schweiz	MW	Malawi
CM	Kamerun	NL	Niederlande
DE	Deutschland, Bundesrepublik	NO	Norwegen
DK	Dänemark	RO	Rumänien
FI	Finnland	SD	Sudan
FR	Frankreich	SE	Schweden
GA	Gabun	SN	Senegal
GB	Vereinigtes Königreich	SU	Soviet Union
HU	Ungarn	TB	Tschad
JP	Japan	TG	Togo
KP	Demokratische Volksrepublik Korea	US	Vereinigte Staaten von Amerika

Biologisch wirksame Substanz mit hormonellen
Eigenschaften, Verfahren zu ihrer Herstellung
und Verwendung von Histonen für medizinische
Zwecke

5

Es sind zahlreiche verschiedene Thymus-Präparationen bekannt. Hierzu gehört auch die Thymus-Präparation (HTH) nach Comsa & Bernardi ("Extraction, Fractionation and Testing of a Homogenous Thymic Hormone Preparation", veröffentlicht in Annals of the New York Academy of Sciences, Vol. 240, pages 402 - 403; Febr. 28, 1975).

Comsa konnte unter anderem zeigen, daß HTH das Immunsystem immunstimulierende und endokrinologisch wirksame Eigenschaften besitzt. Er vermutete, daß diese Wirkung einem speziellen Thymus-Hormon zuzuordnen ist ("Hormonal Coordination of the Immune Response", Vol. 92, Springer-Verlag, 1982). Comsa hat auch nachgewiesen, daß Thymus-Präparationen aufgrund ungeklärter Nebenwirkungen von noch nicht definierten Substanzen therapeutisch unwirksam oder abträglich sein können. Es können also in Thymus-Präparationen Fremdsubstanzen vorhanden sein, die die wirksamen Eigenschaften des vermuteten Thymus-Hormons innerhalb der Thymus-Präparation überdecken oder hemmen bzw. stören und die für den Patienten ein beträchtliches Risiko darstellen können.

Aufgabe der Erfindung ist es, eine biologisch wirksame Substanz der vorstehenden Art anzugeben, die einen eindeutigen Bezug zur gewünschten thymushormonartigen Wirkung aufweist, also im wesentlichen frei von Fremdsubstanzen

ist, die diese Wirkung negativ beeinträchtigen können. Damit wird vor allem auch das Ziel verfolgt, erstmals die Standardisierung einer solchen Präparat-Wirkung ermöglichen zu können und damit auch Wege für Herstellungsverfahren der Wirksubstanz aus biologischen Ausgangsmaterialien und die gezielte Verwendung solcher Substanzen zu eröffnen, die zu weitgehend reinen bzw. fremdstanzfreien Präparaten mit hormonähnlichen Wirkungen führen.

- 10 Die Aufgabe wird durch die in den Ansprüchen bezeichnete Erfindung gelöst.

Es war für die Erfinder überraschend, daß sie in der HTH-Thymus-Fraktion nach Comsa-Bernardi kein spezifisches
15 Thymus-Hormon lokalisieren konnten, das eindeutig immunologische und endokrinologische Eigenschaften besitzt. Bei Untersuchungen an HTH ließen sich als hormonelle Wirksubstanzen zwei reproduzierbar zu detektierende Polypeptidketten HTH_α und HTH_β darstellen, deren Aminosäuresequenzen
20 sich überraschenderweise als identisch mit Sequenzen des H2A- und H2B-Histons erwiesen. Es konnte erfinderseits damit erstmals gezeigt werden, daß Histone, die bisher nur als Zellkernproteine bekannt waren, hormonähnliche Eigenschaften mit extrazellulären und endokrinen Aktivitäten
25 besitzen müssen. Histon/Thymushormon-Strukturvergleiche zeigten, daß die hormonähnlichen, insbesondere thymushormonartigen Eigenschaften der Histone zumindest im wesentlichen durch die evolutionär variablen Teile der Histone bestimmt sind (nachfolgende Beschreibung und Fig. 3
30 (A)) und sich nicht in den evolutionär invariablen (konstanten) Histonteilen finden lassen. Die Erfinder konnten durch Strukturvergleiche in den evolutionär variablen Histonabschnitten der H2-Histone Teilsequenzen mit Hormonwirkung (aktive Histonsequenzen) lokalisieren (nachfolgende
35 Beschreibung und Fig. 3(B)), die mit Thymushormonen Ähn-

lichkeiten aufweisen. Dabei konnte auch gezeigt werden, daß Ähnlichkeiten insbesondere zu N-terminalen Histonbereichen bestehen und Wechselbeziehungen zwischen Histonen und Proteinen des Immunsystems, insbesondere Ubiquitin, vorhanden sind.

Die Erfindung offenbart damit, daß Histone, insbesondere H2A- und H2B-Histone und bestimmte Teile hiervon, hormonähnliche, insbesondere thymushormonartige Eigenschaften besitzen und nicht nur Zellkernbausteine sind. Es zeigte sich außerdem, daß die das Immunsystem immunstimulierenden und/oder die endokrinologisch wirksamen Substanzen, die in den verschiedensten bekannten Thymus-Präparationen enthalten sind, Ähnlichkeiten mit den evolutionär variablen Abschnitten der Histone aufweisen und damit möglicherweise unter einer Histon-Familie subsummierbar sind, die hinsichtlich ihrer neu entdeckten Hormon-Eigenschaften gegebenenfalls neu zu definieren sein wird.

Die Erfindung offenbart damit relativ einfache Wege zur gezielten Herstellung von das Immunsystem immunstimulierenden und/oder endokrinologisch wirksamen Präparaten mit erstmals standardisierbarer Präparat-Wirkung. So ist es nicht mehr notwendig, allein aus Thymus-Präparaten bestimmte Peptide mit der gewünschten Wirkung zu isolieren, es können auch Präparate aus anderen biologischen Ausgangsmaterialien hergestellt werden, die möglichst reich an isolierbaren Histonen, insbesondere H2A- und H2B-Histonen sind.

Da es inzwischen bekannt ist, daß H2A- und H2B-Kalbshistone identisch sind mit menschlichen H2A- und H2B-Histonen, ist es völlig unbedenklich, erfindungsgemäße Präparate für die Humanmedizin z.B. aus Kalbsthymus oder einem anderen geeigneten endokrinen Organ des Kalbes bzw. des Rindes herzustellen, das reich an H2A- und H2B-Histonen ist.

Für eine wirtschaftliche Herstellung des erfindungsgemäßen Präparates auf synthetischem Wege ist die Erkenntnis wichtig, daß die das Immunsystem immunstimulierenden und/oder endokrinologisch aktiven Eigenschaften der Histone innerhalb der evolutionär variablen Abschnitte der Histone
5 liegen. Es genügt daher, lediglich die evolutionär variablen Abschnitte der betreffenden Histone oder Teile hiervon zu synthetisieren, die die aktive Sequenz enthalten. Das gleiche gilt auch für eine gentechnologische Herstellung
10 bzw. für eine Kombination dieser Herstellungsverfahren.

Die Erfindung ist daher nicht auf die Verwendung von Histonen, insbesondere H2A- und H2B-Histonen als immunstimulierende bzw. endokrinologisch wirksame Präparate beschränkt.
15 Es können auch nur die evolutionär variablen Abschnitte bzw. die wirkungsmäßig aktiven Bereiche dieser variablen Abschnitte oder eine Kombination aus einem oder mehreren solcher Abschnitte mit einem oder mehreren Histonen verwendet werden.

20 Schließlich ist die Erfindung nicht auf die Verwendung von Histonen oder Histonabschnitten mit hormonähnlichen Eigenschaften beschränkt. So kann die Verwendung von solchen Histonen oder Histonabschnitten mit wenigstens einem
25 Protein des Immunsystems, insbesondere Ubiquitin, erfindungsgemäß besonders vorteilhaft sein.

Erfindungsgemäß ist der Begriff "Histone" aufgrund ihrer neu entdeckten hormonellen Eigenschaften weiter zu verstehen als im herkömmlichen Sinne, als man unter Histonen
30 nur Zellkernbauteile verstand.

Die erfinderseits erkannte Histon-Wirkung als immunstimulierende Substanz und als Synergist und/oder Antagonist
35 von endokrinen Drüsen (endokrinologische Wirksamkeit) setzt voraus, daß die Histone ganz oder wenigstens in Form von

Teilsequenzen, die für die neu erkannte Wirkung verantwortlich sind, in der Blutbahn und/oder im Lymphsystem zirkulieren, um ihre hormonelle Wirkung entfalten zu können. Eine derartige Wirkung war nach der bisherigen
5 Definition der Histone nicht zu erwarten.

Die der Erfindung zugrunde liegenden Erkenntnisse über neue Eigenschaften der Histone und die im Zusammenhang hiermit stehenden Untersuchungen an dem homeostatischen
10 Thymushormon (HTH) werden nachstehend näher beschrieben. Die in Klammern gesetzten Ziffern verweisen auf Literaturstellen des Literaturverzeichnis am Ende der Beschreibung, der außerdem Figuren angefügt sind, die die Untersuchungsergebnisse verdeutlichen. In den Figuren zeigt:

15 Fig. 1(A) die Reinigung der HTH-Präparation nach Bernardi und Comsa (2) mit Hilfe von HPLC an einer μ Bondapak-C18-Säule in 0,1 % Trifluoressigsäure unter Verwendung von Isopropanolgradienten (% B).
20

Innerhalb der Fig. 1(A) ist eine SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese von (a) HTH-Ausgangsmaterial und (b) Komponenten HTH_α und HTH_β der HTH-Fraktion C dargestellt;

25 Fig. 1(B) die Aufteilung der HTH-Fraktion C (Fig. 1(A)) in die zwei Komponenten HTH_α und HTH_β mit Hilfe von HPLC an einer μ Bondapak-C18-Säule in 0,1 % Trifluoressigsäure unter Verwendung von Acetonitrilgradienten (% B);
30

Fig. 2 die Ausrichtung der C-terminalen Regionen der Histone H2A, H2B und H3. Die Histone H2A und H2B stammen vom Kalb oder vom Menschen. (Kalbs- und menschliche H2-Histone sind identisch). Das
35

5 H3-Histon stammt vom Kalb. Es sind die H2A-Sequenzen 62-94, die H2B-Sequenzen 73-105 und die H3-Sequenzen 103-135 (das C-terminale Ende) einander gegenübergestellt. Identische Aminosäuren sind zwischen Linien eingeschlossen;

10 Fig. 3(A) Vergleiche von Aminosäure-Sequenzen einer ersten Gruppe von Histonen mit einer zweiten Gruppe von Thymushormonen: Histone H3 (vom Kalb (37)), H2B (vom Kalb und vom Menschen (37)), H2B P.A. (Seeigel-Sperma *Parechinus angulosus* (37)), H2A (vom Kalb und vom Menschen (37)) und H2A.Z (Variante vom Kalb (28)). FTS bezeichnet ein Thymusserum (vom Schwein (14)). Thymopoietin (vom Ochsen (13)), Thymosine α_{11} , β_4 und β_9 (vom Kalb (10-12)), Ubiquitin (vom Ochsen (16)) und Prealbumin (vom Menschen (17)). Identische Aminosäuren zwischen den beiden Gruppen sind zwischen ununterbrochenen Linien eingeschlossen. Aminosäuren, die nur innerhalb einer der beiden Gruppen identisch sind, sind zwischen gestrichelte Linien eingeschlossen. Sequenz-Unterbrechungen (gaps) sind vorgenommen worden, um die maximalen strukturellen Übereinstimmungen zu verdeutlichen.

20 In Fig. 3(A) sind im wesentlichen die evolutionär variablen Histonabschnitte der H2A- und H2B-Histone erfaßt (H2A etwa die Aminosäuren 1 bis 36, H2B etwa die Aminosäuren 1 bis 31). Innerhalb dieser Abschnitte liegen die aktiven Sequenzen, die für die Erfindung besonders wesentlich sind;

30

- Fig. 3(B) Weitere Vergleiche von Aminosäuresequenzen der zwei Proteingruppen in Fig. 3(A) mit Zelloberflächen-Antigen (von der Ratte (Thy-1)), Immunoglobulin (vom Menschen bzw. Kaninchen (IgE, IgG)), Histokompatibilitäts-Antigen (vom Menschen (HLA-B7)) und β_2 -Mikroglobulin (vom Menschen (β_2 -m)). Identische Aminosäuren befinden sich zwischen ununterbrochenen Linien.
- Die Fig. 3(B) zeigt u.a. vom H2A und H2B Abschnitte innerhalb der evolutionär variablen Histonabschnitte (H2A Aminosäuren 11 bis 23, H2B Aminosäuren 14 bis 26), die zur weiteren Lokalisierung der aktiven Sequenzen erfindungsgemäß wichtig sein können.

- Verschiedene Funktionen des Thymus sind bereits eindeutig nachgewiesen worden: Die Proliferation und Differenzierung der lymphoiden Vorläuferzellen sowie die Produktion und Ausscheidung von verschiedenen Thymushormonen. Eines dieser Hormone, das homeostatische Thymushormon (HTH), wurde, wie eingangs schon gesagt, schon früh von Comsa und Mitarbeitern (1,2) entdeckt. Über das HTH wurde berichtet, daß es vollständig die Folgen der Thymektomie unterdrückt (3), daß es die Antikörperproduktion in thymektomierten Tieren wiederherstellt (4) und daß es einen chemotaktischen Einfluß auf Lymphozyten ausübt (5). Auch konnte ein regulatorischer Einfluß des HTH auf andere endokrine Drüsen gezeigt werden (6,7). So ist HTH Antagonist des Thyroxins (6), des Adrenocorticotropen Hormons (ACTH), des Desoxycorticosterons, des Thyrotropins (TSH) und der Gonadotropine. HTH ist Synergist des Wachstumshormons (6,7). Zusätzlich wurde noch ein radioprotektiver Einfluß des HTH vorgeschlagen (8).
- HTH wurde im Thymus, in den Lymphknoten und in der Milz

von normalen Ratten vor der Pubertät gefunden. Es wurde berichtet, daß es drei Tage nach Thymektomie vollständig aus den Lymphknoten und der Milz verschwindet (5,6). Aus menschlichem Urin konnte eine dem HTH gleichende Fraktion isoliert werden, die die Folgen der Thymektomie bei Meerschweinchen verhinderte. Diese den Thymus ersetzende Fraktion fehlte im Urin eines Mädchens, dem früher der Thymus vollständig entfernt worden war (5). Somit beweisen verschiedene Tatsachen, daß das HTH sekretiert, im Körper verteilt und ausgeschieden wird.

Die Struktur des HTH konnte bisher noch nicht aufgeklärt werden. Dagegen wurden schon einige andere Polypeptide des Thymus charakterisiert, und zwar mehrere Thymosine (9-12), Thymopoietine (13) und das kleine Nonapeptid "serum thymic factor" (FIS) (14). Nach Isolierung aus dem Thymus wurde ebenfalls die Struktur des Proteins Ubiquitin bestimmt, dessen wahrscheinlicher Einfluß auf die Regulation des Proteinabbaus jetzt bekannt ist (15). Weiterhin wurde auch die Identität des "Serum-Thymushormons" mit Serumprealbumin aufgezeigt (17), das mögliche Verwandtschaften zu gastrointestinalen Hormonen besitzt (18).

Bei Berücksichtigung der verschiedenen Größen der Thymushormone, die von kleinen Polypeptiden bis zu dem Lymphozytenstimulierenden Hormon (LSH_r , M_r 80000) (19) und anderen großen Proteinen reichen, scheint es möglich zu sein, daß einige Ketten Fragmente von größeren Proteinen sind. Diese Vermutung wird durch das kürzlich gefundene Thymosin α_{11} gestärkt, das sieben Aminosäuren zusätzlich zu denen des Thymosin α_1 enthält, und durch das Prothymosin mit etwa 112 Aminosäuren, das die Sequenz des Thymosin α_1 in seinem Aminoterminal enthält (20). Weiterhin ist eine Lys-Arg-Struktur, die ein typisches Signal für die Prohormonspaltung ist (21,22), am C-terminalen Ende aller

Thymopoietine vorhanden (13). Zusammenfassend kann gesagt werden, daß außer HTH mehrere Thymushormone charakterisiert worden sind. Spaltungen der Proformen scheinen wichtig zu sein, jedoch wurden bisher nur wenige Funktionen und keine
5 strukturellen Verwandtschaften nachgewiesen.

Nachstehend wird die weitgehende Reinigung und Ausbeute von zwei Komponenten, HTH_α und HTH_β beschrieben, die sich erfinderseits als die einzigen reproduzierbar zu detektierenden Polypeptidketten der HTH-Präparate darstellten. Die
10 Aminosäuresequenzen des HTH_α und des HTH_β , deren Bestimmung erfinderseits separat beschrieben ist (23), sind erfinderseits als identisch mit den Sequenzen der Histone H2A und H2B erkannt worden. Da bisher keine extrazellulären oder
15 endokrinen Aktivitäten von Histonen bekannt geworden sind, wurde erfinderseits die Möglichkeit untersucht, ob H2A und H2B bloße Verunreinigungen in den HTH-Präparaten sind. Es zeigte sich jedoch, daß HTH_α und HTH_β die einzigen Komponenten sind, deren Anreicherung in HTH-Präparaten möglich
20 war. Im Falle, daß die beiden Komponenten nicht selbst das HTH dargestellt hätten, hätte die HTH-Aktivität von einer Komponente stammen müssen, die nur in geringsten Mengen hätte vorhanden sein dürfen und die zusammen mit den Histonen hätte gereinigt werden müssen. Wegen dieser Mög-
25 lichkeit wurde erfinderseits eine eingehende Prüfung der $\text{HTH}_\alpha/\text{H2A}$ - und $\text{HTH}_\beta/\text{H2B}$ -Strukturen durchgeführt, und zwar vor allem in Beziehung zu möglichen Spaltsignalen und Ähnlichkeiten mit anderen Thymushormonen. Aufgrund dieser Beziehungen zeigten sich neue und überraschende Histon-
30 funktionen, die auch erklären, wie HTH und vielleicht andere Thymushormone eventuell in Verbindung mit Histonen und Ubiquitin in einem regulatorischen System zusammenwirken und die den Weg zu erfindungsgemäßen Verwendungen von Histonen in Medikamenten erst eröffneten.

Reinigung von HTH (Fig. 1(A) und 1(B))

Das Homeostatische Thymushormon HTH wurde aus Kalbsthymus unter Verwendung einer fünfstufigen Reinigungsmethode isoliert, die, wie in (1) beschrieben, aus Ausfällungen eines sauren Extrakts (1 M H_2SO_4) mit Ammoniumsulfat und Ethanol und folgenden chromatographischen Auftrennungen über Sephadex G-100, Hydroxyapatit und Sephadex G-25 besteht (2). Die Reinigung wurde behindert durch proteolytische Einflüsse, bis ein Enzyminhibitor zugefügt wurde. Diese Fraktionen waren aktiv in den in der vorstehenden Einleitung beschriebenen biologischen Tests. Die endgültige Reinigung von zwei Komponenten mit M_r 15000 und 16500 wurde mit Hilfe von HPLC an einem Waters-Gerät mit einer μ Bondapak C18-Säule unter Verwendung von Isopropanol- oder Acetonitrilgradienten in 0,1 % Trifluoressigsäure durchgeführt.

Aminosäuresequenzanalyse

HTH wurde mit CNBr und mit proteolytischen Enzymen gespalten (23). Die Peptidgemische wurden über Sephadex G-50 fine in 30 % Essigsäure vorfraktioniert und für die intakten HTH-Komponenten, wie oben beschrieben, durch HPLC weiter gereinigt.

Zur manuellen Sequenzanalyse wurde die Dimethylaminoazobenzol-Methode angewandt. Der Flüssigphasen-Sequenzabbau wurde mit einem Beckman 890D-Gerät unter Anwendung eines 0,1 M Quadrol-Peptidprogramms in Anwesenheit von mit Glycin vorbehandeltem Polybrene durchgeführt. Die Phenylthiohydantoine wurden mittels HPLC identifiziert (23).

Sequenzvergleiche

Die für $HTH_\alpha/H2A$ und $HTH_\beta/H2B$ bestimmten Aminosäuresequenzen wurden mit denen des Histons H3 (24,25), der Thymosine

(9-12), der Thymopoietine (13), des FTS (14), des Ubiquitins (16) und des Prealbumins (26) verglichen. Dabei wurde ein Computerprogramm unter Verwendung verschiedener Abschnittsgrößen zur Detektion von Ähnlichkeiten benutzt, unabhängig von Sequenzlücken (gaps) und unter Anwendung von Randomstrukturen mit derselben Zusammensetzung, um so den Grad von zufällig ähnlichen Strukturen (27) abschätzen zu können.

10 Resultate der Reinigung von HTH

Bei der Isolierung ohne Proteolyse enthielt das biologisch aktive HTH-Präparat von Bernardi und Comsa (2) keine kleinen Peptide. Bei der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese in einem 7,5 % Gel unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen ergab dieses Präparat jeweils zwei konstant vorhandene Peptidbanden entsprechend M_r 15000 und M_r 16500 (Fig. 1(A)). Die Molekulargewichtsbestimmung des nativen HTH durch Ausschlußchromatographie über Sephadex ergab einen Wert von etwa 30000, was eine dimere Form für das native HTH vermuten läßt. Im Gegensatz zu Berichten, daß HTH ein Glykoprotein sein könnte (5) und mit Trifluoressigsäure (1) nicht fällbar sei, wurde erfinderseits zum einen keine Kohlenhydrate und zum anderen ein Protein gefunden, das mit Trifluoressigsäure fällbar ist.

25

Um die zwei Hauptpolypeptidketten von kleineren und variierenden Verunreinigungen zu trennen, wurden die HTH-Präparate mittels HPLC unter Verwendung eines Isopropanol-Gradienten weiter aufgetrennt. Die zwei Komponenten wurden in einem Hauptpeak eluiert, der in Fig. 1(A) mit C bezeichnet ist. Diesem gehen zwei kleinere Peaks (A und B) voraus. Letztere entsprechen mehreren Komponenten in variablen Mengen und mit elektrophoretischen Positionen (Fig. 1(A)), die identisch sind den inaktiven Komponenten aus den vorangehenden Reinigungsstufen. Die SDS-Polyacrylamidgel-

35

Elektrophorese der Proben aus der Fraktion C unter reduzierenden und nichtreduzierenden Bedingungen bestätigte das Vorhandensein von zwei Peptidhauptkomponenten (Fig. 1(A)). Die Endgruppenbestimmung mit der Dansyl-Methode zeigte
5 jedoch nur Prolin als N-terminale Aminosäure (die zweite Polypeptidkette hat einen blockierten N-terminus). HPLC unter Verwendung eines weichen Acetonitrilgradienten ergab die Auftrennung der Fraktion C in die zwei Komponenten HTH α und HTH β in reiner Form (Fig. 1(B)), wie durch SDS-
10 Polyacrylamidgel-Elektrophorese (Fig. 1(A)) bestätigt wurde. Die Aminosäuresequenzen der zwei Proteine wurden durch Sequenzabbau in Verbindung mit Fragmentierung durch CNBr und proteolytische Enzyme, wie in (23) beschrieben, bestimmt. Sie zeigten, daß HTH α identisch dem Histon H2A
15 und HTH β identisch dem Histon H2B sind. Es wurden erfinderseits keine Anzeichen für eine Modifizierung von Aminosäuren im HTH beobachtet (23).

Vergleich mit anderen Sequenzen (Fig. 3(A), 3(B))

20 Die Strukturen von HTH α /H2A und HTH β /H2B wurden auf Ähnlichkeiten hin mit den Thymosinen α_1 , α_{11} , β_4 , β_9 (9-12), den Thymopoietinen (13), den Histonen H2A, H2B, H3 und dem Untertyp H2A.Z (28), Ubiquitin (16) und Prealbumin (26) untersucht, um Proteine zu erfassen, die funktionell
25 entweder den Thymushormonen oder den Histonen verwandt sind. Ein Computerprogramm unter Verwendung variabler Fragmentgrößen (27) zeigte, daß keine auffallenden Ähnlichkeiten existieren, und daß keines der jeweils verglichenen Paare für sich allein bedeutende Ähnlichkeiten
30 besitzt. Sieben der insgesamt besten fünfzehn Fits (solche mit 6 und 7 identischen Aminosäuren pro 15 Aminosäuren) zwischen H2A-H2B, H2A-H3 und H2B-H3 richten jedoch, unabhängig voneinander, die C-terminalen Regionen dieser Histone so untereinander aus (Fig. 2), daß eine höchstmögliche
35 Übereinstimmung erhalten wird.

-13-

Versuche eines direkten Vergleichs in den N-terminalen Bereichen der Histon/HTH-Strukturen ergeben weniger Identitäten bei paarweisen Vergleichen (5 oder weniger pro 15 Aminosäuren). Bei der Einführung von Sequenzunterbrechungen (gaps) kann jedoch die Homologie zwischen den verschiedenen Vergleichspaaren erhöht werden. Der N-terminale Vergleichsbereich, der eine maximale Zahl von identischen Gruppen und eine minimale Zahl von gaps enthält, ergibt drei andere unabhängige Übereinstimmungen. Dieser Bereich ist in Fig. 3(A) gezeigt. Eine weitere Übereinstimmung besteht darin, daß dieser Teil mit nur wenigen Sequenzverschiebungen auch Ähnlichkeiten mit den untereinander ähnlichen C-terminalen Bereichen der Histone selbst zeigt (Fig. 2). Weiterhin überdeckt diese Region (Fig. 3(A)) auch die Bereiche, die an Bindungswechselwirkungen (29) beteiligt sind (Fig. 3(B)). Folglich lassen sich unabhängig voneinander vorgeschlagene funktionelle Ähnlichkeiten jetzt mit offenbar vorhandenen maximalen strukturellen Übereinstimmungen verbinden. Schließlich haben HTH_A und HTH_B bzw. H2B nahe am Ende der in Fig. 3(A) gezeigten Bereiche Lys-Arg-Paare und andere dibasische Strukturen, die als typische Signale für Proteasen gelten, die aktive Hormone aus ihren Proformen freisetzen. Solche Signalstellen in Histonen sind für die Lokalisierung der erfindungsgemäß wichtigen aktiven Sequenzen mit immunstimulierenden und/oder endokrinologischen Eigenschaften von wesentlicher Bedeutung.

Schlußfolgerungen aus der Reinigung und Charakterisierung von HTH

HTH-Präparate enthalten zwei Komponenten, die konstant bei SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese beobachtet wurden. Diese zwei Komponenten sind in hoher Ausbeute vorhanden und stimmen mit den Hormonaktivitäten der Präparate überein. Andere Komponenten konnten ebenfalls bestimmt werden,

- aber in geringer und variabler Ausbeute und verschieden von Präparation zu Präparation. Die beiden Hauptkomponenten, HTH_α und HTH_β , wurden weiter gereinigt durch HPLC-Chromatographie. Wenn HTH kein Spurenbestandteil ist,
- 5 sollten alle bisher für HTH beschriebenen biologischen Eigenschaften einer der beiden Komponenten zugeordnet werden oder aber auch beiden, wenn sie entweder synergistisch oder sich addierend agieren.
- 10 Die Strukturanalysen ergaben, daß HTH_α und HTH_β 129 bzw. 125 Aminosäuren enthalten, was eine gute Übereinstimmung mit den durch SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese geschätzten Molekulargewichtswerten von etwa 15000 ergibt. Diese Analysen zeigen ebenfalls, daß die Primärstrukturen
- 15 von HTH_α und HTH_β identisch den Histonen H2A bzw. H2B von Kalb und Mensch sind (23). Dies erklärt auch das für HTH durch Ausschlußchromatographie bestimmte Molekulargewicht von etwa 30000, da die inneren Histone in Form des dimeren H2A:H2B vorliegen. Keine Beweise für einen Aminosäureaus-
- 20 tausch oder andere Modifikationen der Histonstrukturen konnten im HTH erhalten werden (23).

Mögliche Hormoneigenschaften und neuartige Funktionen der Histone

- 25 Die Erkenntnis, daß HTH-Präparate die Histonpolypeptidketten H2A und H2B in offenbar dimerer Konfiguration als Hauptbestandteile enthalten, läßt bisher unbekannte Möglichkeiten von neuartigen Funktionen für die Histone vermuten. Deshalb wurden die Histonstrukturen auf strukturelle Ähnlichkeiten mit anderen Thymushormonen, Histonen
- 30 und in ihrer Funktion verwandten Molekülen hin untersucht. Da Peptidhormone häufig von größeren Proformen stammen, wurde dabei vor allem auf mögliche Signalstellen für Proteinspaltungen geachtet und außerdem auf Wechsel-
- 35 wirkungen mit Histonmodifikationen und anderen Eigenschaften. Obwohl die individuellen Beobachtungen jeweils

für sich allein nicht signifikant sind, werden sie im folgenden behandelt, und zwar um eine Zusammenfassung der neuen funktionellen Möglichkeiten zu erhalten.

5 Strukturelle Vergleiche

Die in den Fig. 2 und 3(A) aufgezeigten Ähnlichkeiten zeigen hohe Übereinstimmung zwischen den Histonen und den verglichenen Proteinen. Jeweils für sich selbst ist der Vergleich einzelner Paare kaum bedeutend (möglicherweise
10 außer in Fig. 2), aber die kombinierten Ähnlichkeiten stimmen mit anderen Beobachtungen überein. Verwandte Bindungswechselwirkungen (29) und andere funktionelle Eigenschaften mögen genügen, um die Ähnlichkeiten zu erklären. Im Verhältnis zu der Identität zwischen HTH und
15 den Histonen H2 und zu früheren Vergleichen (29) zeigen die strukturellen Übereinstimmungen in Fig. 3(A), daß die zwei Histone selbst eine Form von Prohormonen darstellen. Die Strukturen in Fig. 3(A) sind außerdem vereinbar mit der Existenz von Proformen der Thymosine und Thymopoietine,
20 was durch die Existenz einer Vorstufe des Thymosin α_1 (20) bekräftigt wird.

Prohormon-Analogien

Zwei Bereiche im H2B sind solchen Strukturen ähnlich, die
25 typisch sind für Spaltungsstellen von Prohormonen, z.B. eine dibasische Aminosäuresequenz meistens in der Zusammensetzung Lys-Arg (21). Eine solche Region ist Lys-Arg-Lys-Arg beginnend auf Position 28, und eine andere ist Lys-Arg beginnend auf Position 85. Bei beiden fehlt ein
30 folgendes Pro-Antisignal (22). Beide Positionen sind im Bereich von β -turns der Sekundärstruktur außerhalb einer α -Helix vorausgesagt (30) und besitzen deshalb offenbar keine Stabilisierung gegen eine proteolytische Spaltung (31,32). Dibasische Strukturen an ähnlichen Positionen sind
35 im H2A ebenfalls vorhanden. Der erste Bereich bei H2A und

H2B ist jeweils etwa am Ende der strukturellen Übereinstimmungen zwischen Histonen und Thymushormonen (Fig.3(A)). Der zweite Bereich ist im C-terminalen Teil, der in Anlehnung an Fig. 3(A) mit der Region des Prealbumins übereinstimmt, für die früher vorgeschlagen wurde, daß sie den Spaltstellen in gastrointestinalen Hormonen entspricht (18).

Es zeigte sich, daß die Histone H2A und H2B in vitro ohne vorhergehende Denaturierung nur eine begrenzte Zahl von Spaltungen zulassen. H2B wird hauptsächlich nach Lys-20 und Lys-23 (33) und H2A wird hauptsächlich nach Arg-11 und Lys-118 (34) gespalten. Folglich schützen die nativen Konformationen die Histonmoleküle gegen eine vollständige Proteolyse in einer Art, die ähnlich ist den selektiven Spaltungen in Prohormonen. Es wurden endogene Proteasen gezeigt, die in den gleichen N- und C-terminalen Regionen spalten (35,36), und die entsprechenden freigesetzten Fragmente von H2B hatten ein Molekulargewicht von ungefähr 2000, was der ursprünglich für das HTH beschriebenen Größe entspricht. Hieraus wird erfinderseits gefolgert, daß der thymushormonale aktive Teil des $\text{HTH}_g/\text{H2B}$ in der N-terminalen Region liegt (Fig. 3(A)), was für die erfindungsgemäße Verwendung bedeutsam ist. Die Existenz von Thymushormonvorläufern wird ebenfalls unterstützt durch die Lys-Arg-Struktur am C-Terminus des Thymopoietins. Aus den vorstehenden Ausführungen wird deutlich, daß die Spaltstellen der Histone für die Lokalisierung der biologisch aktiven Sequenzen erfindungsgemäß bedeutsam sind.

30 Chemische Modifikationen

Von den Histonen weiß man, daß sie in chemisch modifizierten Formen vorkommen (37). Serin-6 des Histon 2B wird in vivo leicht phosphoryliert, und Ser-32 und Ser-36 können wahrscheinlich in vitro phosphoryliert werden durch cAMP-abhängige Proteinkinase(n) (38). Diese beiden Phosphory-

lierungsstellen liegen in dem bereits besprochenen, erfindungsgemäß wesentlichen N-terminalen Histon-Bereich. Erfinderseits wird deshalb gefolgert, daß die Phosphorylierung/Dephosphorylierung nicht nur in die Regulierung
5 der konformativen Eigenschaften der Histone im Chromatin, sondern auch in die Signalregulierung an Stellen mit einbezogen ist, die für Spaltungen empfindlich sind.

Weitere Folgerungen in funktioneller Hinsicht

10 Etwa 5-15 % des H2A und einige wenige Prozent des H2B sind an Ubiquitin (39,40) gebunden. Eine Beziehung zwischen der Bindung von Ubiquitin an Proteine und die Regulierung des Proteinabbaus wurde beobachtet (15). Abgesehen von den angenommenen Funktionen des Ubiquitins bei der Chromatin-
15 kondensation oder bei der Genexpression im Nucleus könnte deshalb das Ubiquitin auch als ein Signal für das Auffalten und die folgende selektive Spaltung des HTH bzw. des H2A, H2B fungieren. Da das Ubiquitin in den Nuclei nahezu aller Zelltypen zu finden ist, sind möglicherweise für das
20 Thymusgewebe spezifische Proteasen und chemische Modifikationen notwendig für die Spaltungen und Aktivitäten des HTH (H2A, H2B). Ein Einfluß auf den Proteinkatabolismus und die Ubiquitinfunktionen würde ebenfalls eine direkte Beziehung mit mehreren Effekten des HTH (H2A, H2B) auf das
25 regulierende System zeigen.

Erfinderseits konnten damit erstmals zusätzliche Funktionen des H2A und H2B, außer ihren Eigenschaften als Strukturproteine des Chromatins, aufgezeigt werden, und zwar aufgrund ihrer bedeutend höheren Bindungs- und Abbauraten im
30 Vergleich zu H3, H4 und DNA (41) und aufgrund einer möglichen totalen Rekonstitution der nativen core-Histonzusammensetzung nach Entfernung des H2A und H2B (42).

Wechselbeziehungen mit einer Bindungsregion

Die Homologie eines Bereichs im Thymopoietin mit den Bindungsregionen von Molekülen mit einer ähnlich den Immunglobulinen gefalteten Struktur ist bereits vorgeschlagen worden (29). Dieser frühere Vergleich wurde erfinderseits unter Verwendung der vorhandenen Strukturen (Fig. 3(A) und 3(B)) erweitert. Erfinderseits wurde gefunden, daß für H2B dieser Bereich eine interne Wiederholung (Region 16-20 und 116-120 sind identisch) in derselben Art enthält, wie Immunglobulinstrukturen sich mit etwa dem gleichen Abstand wiederholen. Eine solche strukturelle Ähnlichkeit ist auch vereinbar mit den bekannten Kreuzreaktionen der Antihiston-Antikörper mit dem Fc-Abschnitt der schweren Ketten der Immunglobuline (43) oder mit einem Zelloberflächenprotein auf menschlichen Leukozyten (44).

Schlußfolgerungen

Aufgrund der erfinderseits aufgezeigten Übereinstimmungen zwischen aktiven Eigenschaften des HTH und der Histone H2A und H2B können jetzt bisher unbekannte Funktionen der Histone erklärt werden. Die erfinderseitigen Beobachtungen von Thymushormon/Histon-Ähnlichkeiten lassen auf neue Wechselbeziehungen mit Ubiquitin schließen, die möglicherweise einen molekularen Mechanismus für die HTH/Histon-Funktion bei der Regulierung des Proteinabbaus andeuten.

Schließlich erlauben die erfinderseitigen Beobachtungen Rückschlüsse auf die Evolution. Eine angestammte Verbindung zwischen den zu dem betrachteten Bereich gehörenden Molekülen könnte eine Erklärung für die beobachteten Ähnlichkeiten sein, die sich auf frühere Vorschläge einer "Überfamilie" (45) ausweiten läßt. Da es Anzeichen für bevorzugte Bindungsregionen gibt und biologische Aktivitäten von HTH/Histonen durch Ubiquitin oder andere gewöhnliche Proteine freigesetzt werden könnten, werden die Ähn-

lichkeiten durch konvergierende Evolution erklärbar. Was auch immer der Ursprung dieser erfinderseits erkannten verwandtschaftlichen Beziehungen ist, so liefern sie doch neue Möglichkeiten zum Verständnis der Wechselwirkungen zwischen

5 HTH, Histonen und Ubiquitin und damit zur Schaffung von erfindungsgemäßen biologischen Wirksubstanzen mit thymushormonartigen Eigenschaften bzw. zur Angabe erfindungsgemäßer Verfahren zur Herstellung solcher Wirksubstanzen und zur Verwendung von Histonen oder deren aktiven Sequen-

10 zen in medizinischen bzw. pharmazeutischen Präparaten mit standardisierter Präparatwirkung.

Wesentliche Teile der Anmeldung sind zur Veröffentlichung von den Erfindern in Proceedings of the National Academy

15 of Sciences, U.S.A., angemeldet.

Literaturverzeichnis

1. Bezssonoff, N.A. & Comsa, J. (1958) Ann. Endocr. 19, 222-227.
2. Bernardi, G. & Comsa, J. (1965) Experientia 21, 416-417.
3. Comsa, J. (1965) Am. J. Med. Sci. 250, 79-85.
4. Comsa, J. & Filipp, G. (1966) Ann. Institut. Pasteur 110, 365-372.
- 5 5. Comsa, J. (1973) in Thymic Hormones, ed. Luckey, T.D.,
(University Press, Baltimore), pp. 39-58.
6. Comsa, J. (1973) in Thymic Hormones, ed. Luckey, T.D.,
(University Press, Baltimore), pp. 59-96.
7. Comsa, J., Leonhardt, H. & Wekerle, H. (1982) Rev. Physiol.
10 Biochem. Pharmacol. 92, 115-191.
8. Comsa, J., Baumann, B., Zeppezauer, M., Leonhardt, H. & Weber, N.
(1979) C.R. Acad. Sc. Paris 288, 185-187.
9. Low, T.L.K. & Goldstein, A.L. (1979) J. Biol. Chem. 254, 987-995.
10. Caldarella, J., Goodall, G.J., Felix, A.M., Heimer, E.P., Salvin,
15 S.B. & Horecker, B.L. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80,
7424-7427.
11. Low, T.L.K., Hu, S.-K. & Goldstein, A.L. (1981) Proc. Natl. Acad.
Sci. USA 78, 1162-1166.
12. Hannappel, E., Davoust, S. & Horecker, B.L. (1982) Proc. Natl.
20 Acad. Sci. USA 79, 1708-1711.
13. Audhya, T., Schlesinger, D.H. & Goldstein, G. (1981) Biochemistry
20, 6195-6200.
14. Pleau, J.-M., Dardenne, M., Blouquit, Y. & Bach, J.-F. (1977) J.
Biol. Chem. 252, 8045-8047.
- 25 15. Hershko, A. (1983) Cell 34, 11-12.
16. Schlesinger, D.H., Goldstein, G. & Niall, H.D. (1975) Biochemistry
14, 2214-2218.

17. Burton, P., Iden, S., Mitchell, K. & White, A. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 823-827.
18. Jörnvall, H., Carlström, A., Pettersson, T., Jacobsson, B., Persson, M. & Mutt, V. (1981) Nature 291, 261-263.
- 5 19. Robey, G., Campbell, B.J. & Luckey, T.D. (1972) Infection & Immunity 6, 682-688.
20. Haritos, A.A., Goodall, G.J. & Horecker, B.L. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 1008-1011.
21. Pradayrol, L., Jörnvall, H., Mutt, V. & Ribet, A. (1980) FEBS Lett. 109, 55-58.
- 10 22. Jörnvall, H. & Persson, B. (1983) Biosci. Rep. 3, 225-232.
23. Reichhart, R., Jörnvall, H. & Zeppezauer, M. (1984) FEBS Lett., in Druck.
24. DeLange, R.J., Hooper, J.A. & Smith, E.L. (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 882-884.
- 15 25. Olson, M.O.J., Jordan, J. & Busch, H. (1972) Biochem. Biophys. Res. Commun. 46, 50-55.
26. Kanda, Y., Goodmann, D.S., Canfield, R.E. & Morgan, F.J. (1974) J. Biol. Chem. 249, 6796-6805.
- 20 27. Jörnvall, H., Mutt, V. & Persson, M. (1982) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 363, 475-483.
28. Ball, D.J., Slaughter, C.A., Hensley, P. & Garrard, W.T. (1983) FEBS Lett. 154, 166-170.
29. Hahn, G.S. & Hamburger, R.N. (1981) J. Immunol. 126, 459-462.
- 25 30. Moss, T., Cary, D.P., Abercrombie, B.D., Crane-Robinson, C. & Bradbury, E.M. (1976) Eur. J. Biochem. 71, 337-350.

31. Geisow, M.J. & Smyth, D.G. (1980) in The Enzymology of Post-translational Modification of Proteins, Vol. 1 (Ed.: Freedman, R.B. & Hawkins, H.C.) Academic Press, London, pp. 259-287.
- 5 32. Jörnvall, H., Ekman, R., Carlquist, M. & Persson, B. (1984) in Biogenetics of Neurohormonal Peptides (Eds.: Håkanson, R. & Thorell, J.) Academic Press, London, in press.
33. Böhm, L., Briand, G., Sautière, P. & Crane-Robinson, C. (1982) Eur. J. Biochem. 123, 299-303.
- 10 34. Böhm, L., Crane-Robinson, C. & Sautière, P. (1980) Eur. J. Biochem. 106, 525-530.
35. Rill, R.L. & Oosterhof, D.K. (1982) J. Biol. Chem. 257, 14875-14880.
36. Eickbush, T.H., Watson, D.K. & Moudrianakis, E.N. (1976) Cell 9, 785-792.
- 15 37. Isenberg, I. (1979) Ann. Rev. Biochem. 48, 159-191.
38. Yeaman, S.J., Cohen, P., Watson, D.C. & Dixon, G.H. (1977) Biochem. J. 162, 411-421.
39. Busch, H., Ballal, N.R., Busch, R.K., Choi, Y.C., Davis, F., Goldknopf, I.L., Matsui, S.I. Rao, M.S. & Rothblum, L.J. (1978) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 42, 665-683.
- 20 40. West, M.H.P. & Bonner, W.M. (1980) Nucl. Acids Res. 8, 4671-4680.
41. Grove, G.W. & Zweidler, A., (1984) Biochemistry 23, 4436-4443
- 25 42. Jordano, J., Montero, F. & Palacian, E. (1984) Biochemistry 23, 4280.

43. Hannestad, K. & Stollar, B.D. (1978) Nature 275, 671-673.
44. Rekvig, O.P. & Hannestad, K. (1980) J. Exp. Med. 152,
1720-1733.
45. Williams, A.F. (1984) Nature 308, 12-13.

Patentansprüche

1. Biologisch wirksame Substanz mit hormonellen Eigenschaften, dadurch gekennzeichnet, daß die Substanz aus
5 wenigstens einem Histon und/oder wenigstens einem
hormonelle Eigenschaften aufweisenden Histonabschnitt
bzw. Histonfragment besteht.
2. Biologisch wirksame Substanz mit hormonellen Eigen-
10 schaften, dadurch gekennzeichnet, daß die Substanz
wenigstens ein Histon und/oder wenigstens einen
hormonelle Eigenschaften aufweisenden Histonabschnitt
bzw. Histonfragment enthält.
- 15 3. Biologisch wirksame Substanz nach Anspruch 1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet, daß es sich um H2A- und/oder
H2B-Histon handelt.
4. Biologisch wirksame Substanz nach Anspruch 1 oder 2,
20 dadurch gekennzeichnet, daß der Histonabschnitt im
wesentlichen durch den evolutionär variablen Histon-
bereich oder durch einen Teil hiervon bestimmt ist.
5. Biologisch wirksame Substanz nach Anspruch 4, dadurch
25 gekennzeichnet, daß der Histonabschnitt im wesentlichen
durch den N-terminalen Bereich eines Histons bestimmt
ist.
6. Biologisch wirksame Substanz nach einem der vorstehen-
30 den Ansprüche in einem oder als ein medizinisches oder
pharmazeutisches Präparat.
7. Biologisch wirksame Substanz nach einem der vorstehen-
35 den Ansprüche für diagnostische Zwecke bzw. für diagno-
stische Verfahren.

8. Biologisch wirksame Substanz nach einem der Ansprüche 1 bis 7 mit thymushormonartigen Eigenschaften.
- 5 9. Biologisch wirksame Substanz nach Anspruch 6 oder 7 mit das Immunsystem stimulierenden und/oder endokrinologischen Eigenschaften.
- 10 10. Biologisch wirksame Substanz nach Anspruch 6 oder 7 zur Immuntherapie, zur Behandlung bei Immunschwächen (z.B. Fehlernährung) und bei Immundefekten.
- 15 11. Biologisch wirksame Substanz nach Anspruch 6 oder 7 zur Behandlung der Folgen der Thymektomie und nach massiver Bestrahlung des Thymus zur Verhinderung von strahleninduzierter Leukämie.
- 20 12. Biologisch wirksame Substanz nach Anspruch 6 oder 7 als Antagonist (des Thyroxins, des adrenocorticotropen Hormons (ACTH), des Desoxycorticosterons, des Thyrotropins (TSH), des Gonadotropins) und/oder als Synergist (des Wachstumshormons).
- 25 13. Biologisch wirksame Substanz nach einem oder mehreren der vorstehenden Ansprüche in Verbindung oder in Kombination mit wenigstens einem Protein des Immunsystems, insbesondere Ubiquitin.
- 30 14. Verfahren zur Herstellung der biologisch wirksamen Substanz nach einem oder mehreren der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß wenigstens ein Histon (insbesondere H2A-, H2B-Histon) und/oder wenigstens ein Histonabschnitt bzw. Histonfragment mit hormonellen Eigenschaften gewonnen und einem physiologischen Medium zugesetzt wird.

15. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet,
daß ein Histonabschnitt (Histonfragment) gewonnen
wird, der die evolutionär variable Teilsequenz oder
Teile hiervon umfaßt.
- 5
16. Verfahren nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet,
daß der N-terminale Bereich wenigstens eines Histons
oder eines Teiles hiervon gewonnen wird.
- 10
17. Verwendung wenigstens eines Histons (insbesondere
H2A- und/oder H2B-Histon) und/oder wenigstens eines
Histonabschnittes bzw. Histonfragmentes mit hormon-
ähnlichen Eigenschaften (insbesondere der N-terminale
Histonbereich) in einem medizinischen bzw. pharmazeu-
15 tischen Präparat oder als ein solches Präparat mit
hormonellen Eigenschaften.
18. Verwendung wenigstens eines Histons und/oder wenig-
stens eines Histonabschnittes bzw. Histonfragmentes
20 mit hormonähnlichen Eigenschaften für diagnostische
Zwecke bzw. für diagnostische Verfahren.
19. Verwendung nach Anspruch 17 oder 18 in Verbindung mit
wenigstens einem Protein des Immunsystems, insbeson-
25 dere Ubiquitin.
20. Histon (insbesondere H2A- und/oder H2B-Histon), das
synthetisch oder gentechnologisch hergestellt oder
aus einem endokrinen Organ (z.B. Kalbsthymus) isoliert
30 worden ist, und/oder Histonabschnitte hiervon mit
hormonähnlicher (thymushormonartiger) Wirksamkeit
(insbesondere N-terminale Histonbereiche) zur Her-
stellung von Medikamenten mit hormonellen Eigen-
schaften oder für diagnostische Zwecke.

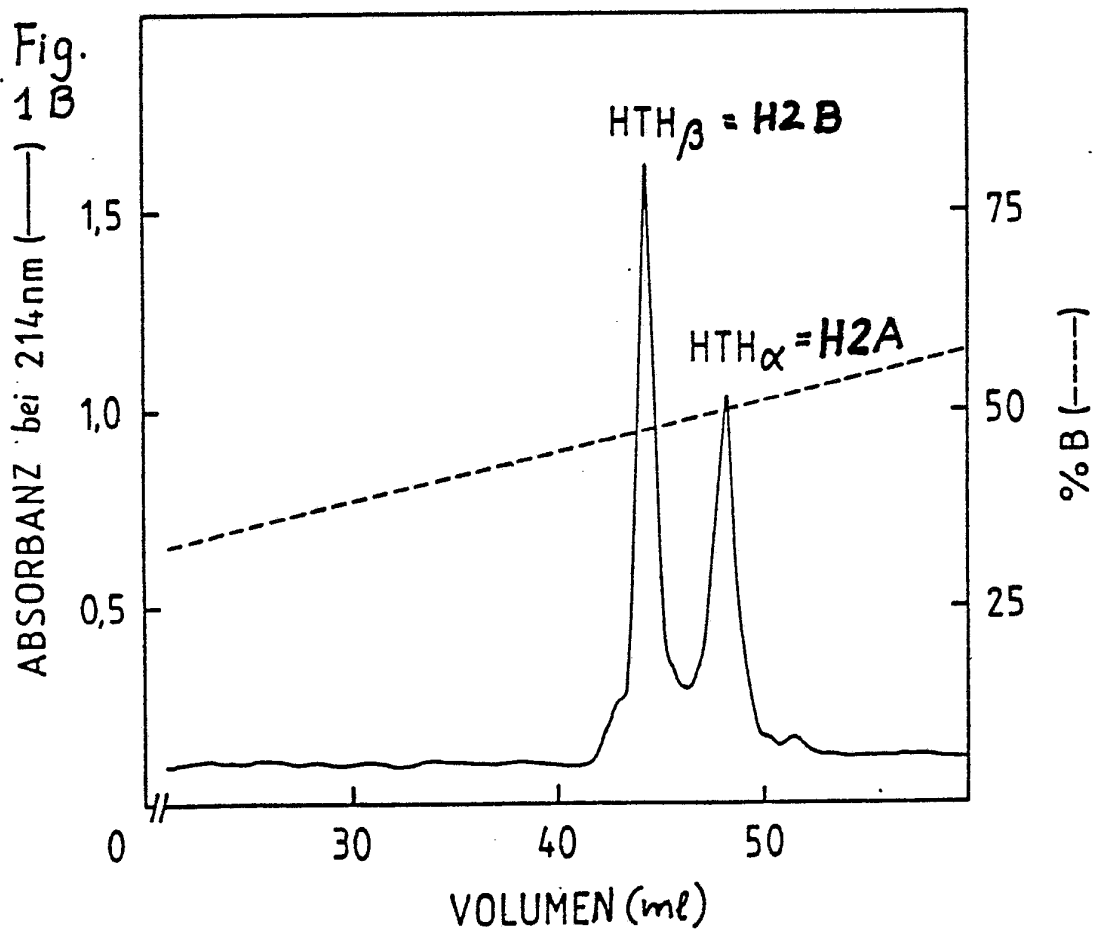
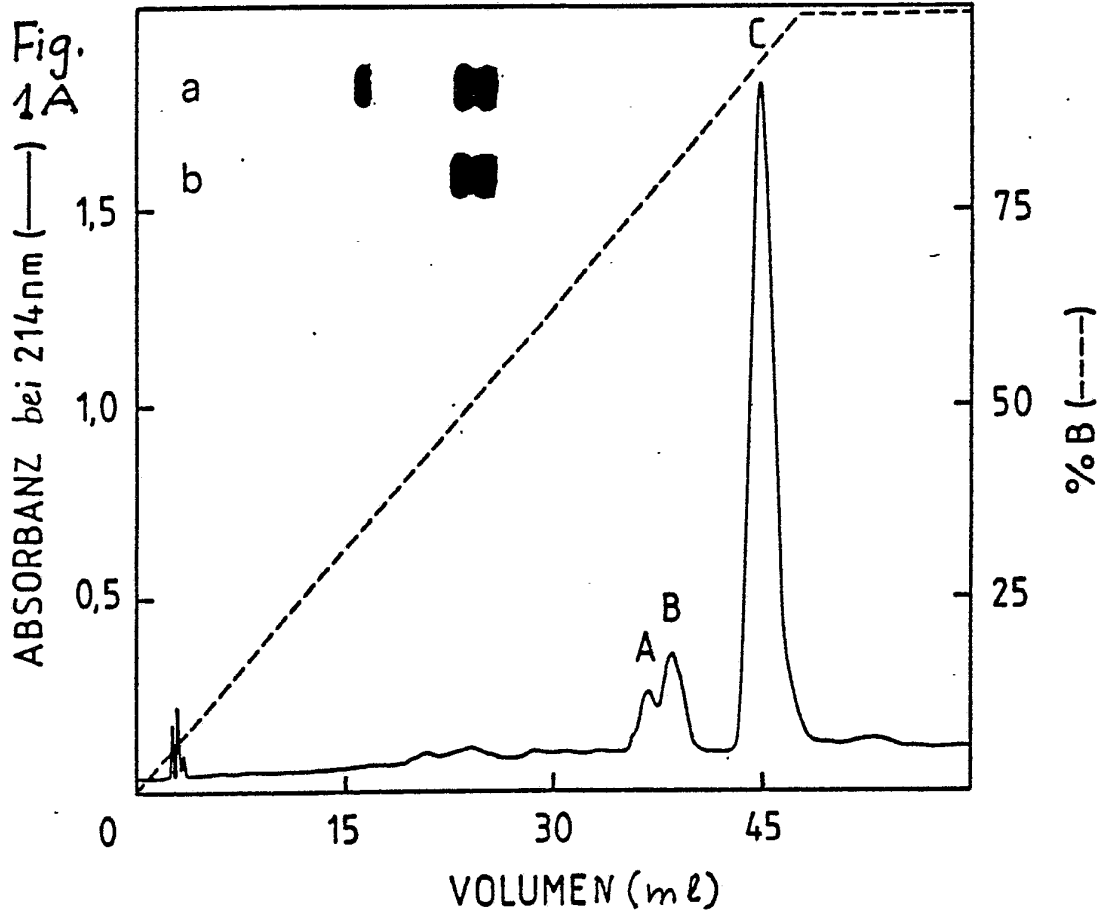


Fig. 2

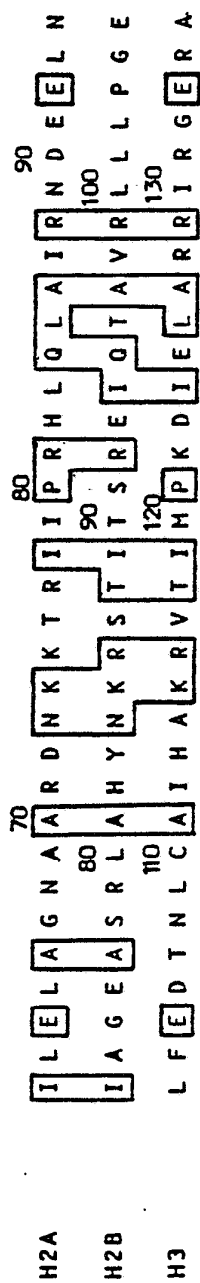


Fig. 3A

Proteine	Segmente	Aminosäuresequenzen
H3	3-34	T K Q T A R K S - T G G K A P - - R K Q L A T K A - - - A R K S A P A T G G
H2B	1-31	P E P A - K S A P A P K - - K G S K K A V T K A - - - Q K K D G K K R K R
H2B P.A.	17-50	T K R S P Q K G G K G G K G A K R G G K A G - K R - - - R R G V Q V K R R R
H2A	1-28	A c S G R G K Q G G K A - - - R A K A K T R S - - - S R A G L Q F P V G
H2A.Z.	1-30	A G G K A G K D S G K A K T K A V S X Q R A G L Q F P V G
FTS	1-9	E A - K S - Q G G S N
Thymopoietin	6-40	D P S V L T K - E K L K S - E L V - A N N V T L P A G E Q R K D V Y V E L Y
Thymosin α_{11}	2-35	D A A V D T S S E I T T K D L K E K K E V V E E A - E N G R E A P A N
Thymosin β_4	10-42	E K - F D - K S - K L K K T E T - Q E K N - P L P S K E T I E Q E K Q A G E
Thymosin β_9	9-41	I N S F D - K A - K L K K T E T - Q E K N - T L P T K E T I E Q E K Q A K
Ubiquitin	1-27	H Q I F V K T I L T - G K T I T L - E V E - P S D T I E N V K
Prealbumin	34-70	R K A A D D T W E P U G K T S E S G E L H G - L T T Z Z Q F V - E G I Y K V

Fig. 3B

Proteine	Segmente	Aminosäuresequenzen
H3	17-29	R K Q L A T K A - - - A R K S A
H2B	14-26	S K K A V T K A - - - Q K K D G
H2A	11-23	R A K A K T R S - - - S R A G L
H2A.Z.	9-25	S G K A K T K A V S X Q R A G L
Thymopoietin	21-35	- A N N V T L P A G E Q R K D V
Thymosin α_{11}	19-33	K K E V V E E A - E N G R E A P
Thymosin β_9	23-37	Q E K N - T L P T K E T I E Q E
Ubiquitin	10-22	- G K T I T L - E V E - P S D T
Thy-1	66-80	F I K V L T L A - N F T T K D E
IgE	497-511	S R L E V T R A - E W Q E K D E
IgG	408-422	S K L S Y P T S - E W Q R G D V
HLA	245-259	A A V V V P S G - E E Q R Y T C
β_2 -m	64-78	L L Y S Y T E F - T P T E K D E

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/DE85/00004

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (if several classification symbols apply, indicate all) ³ According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC Int.Cl. ⁴ : A61K 37/24; A61K 37/02; A61K 39/39; G01N 33/50																							
II. FIELDS SEARCHED Minimum Documentation Searched ⁴ <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th style="width: 25%; border-bottom: 1px solid black;">Classification System</th> <th style="border-bottom: 1px solid black;">Classification Symbols</th> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;">Int.Cl. ⁴</td> <td style="padding: 5px;">A61K</td> </tr> </table> Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched ⁵			Classification System	Classification Symbols	Int.Cl. ⁴	A61K																	
Classification System	Classification Symbols																						
Int.Cl. ⁴	A61K																						
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ¹⁴ <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 10%; padding: 5px;">Category *</th> <th style="width: 60%; padding: 5px;">Citation of Document, ¹⁶ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹⁷</th> <th style="width: 30%; padding: 5px;">Relevant to Claim No. ¹⁸</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">Y</td> <td style="padding: 5px;">FR, A, 2265404 (BACH J.F. et al.), 24 October 1975, see pages 2 to 8, example 1 ---</td> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">1-6,8,9</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">Y</td> <td style="padding: 5px;">DE, A, 2732587 (BACH J.F. et al.), 23 March 1978, see page 10, lines 22-28 ---</td> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">1-6,8,9</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">Y</td> <td style="padding: 5px;">FR, A, 2305191 (SYNTEX (USA) INC.), 22 October 1976, see page 2, line 38 to page 7, line 17 ---</td> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">1-9,14-18</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">Y</td> <td style="padding: 5px;">FR, A, 2315943 (YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO. LTD.), 28 January 1977, see page 4, line 35 to page 10, line 26 ---</td> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">1-9,14-18</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">Y,P</td> <td style="padding: 5px;">EP, A, 0101063 (HOECHST AG), 22 February 1984, see page 10, line 11 to page 14, line 31 ---</td> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">1-9,14-18</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">A</td> <td style="padding: 5px;">Biological Abstracts, Vol. 73, 1973, Philadelphia, PA (US), H. Busch et al.: "Ubiquitin-protein conjugates", see abstract 80609, Moll Cell Biochem 40(3) 173-188, 1981 -----</td> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">13,19</td> </tr> </tbody> </table>			Category *	Citation of Document, ¹⁶ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹⁷	Relevant to Claim No. ¹⁸	Y	FR, A, 2265404 (BACH J.F. et al.), 24 October 1975, see pages 2 to 8, example 1 ---	1-6,8,9	Y	DE, A, 2732587 (BACH J.F. et al.), 23 March 1978, see page 10, lines 22-28 ---	1-6,8,9	Y	FR, A, 2305191 (SYNTEX (USA) INC.), 22 October 1976, see page 2, line 38 to page 7, line 17 ---	1-9,14-18	Y	FR, A, 2315943 (YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO. LTD.), 28 January 1977, see page 4, line 35 to page 10, line 26 ---	1-9,14-18	Y,P	EP, A, 0101063 (HOECHST AG), 22 February 1984, see page 10, line 11 to page 14, line 31 ---	1-9,14-18	A	Biological Abstracts, Vol. 73, 1973, Philadelphia, PA (US), H. Busch et al.: "Ubiquitin-protein conjugates", see abstract 80609, Moll Cell Biochem 40(3) 173-188, 1981 -----	13,19
Category *	Citation of Document, ¹⁶ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹⁷	Relevant to Claim No. ¹⁸																					
Y	FR, A, 2265404 (BACH J.F. et al.), 24 October 1975, see pages 2 to 8, example 1 ---	1-6,8,9																					
Y	DE, A, 2732587 (BACH J.F. et al.), 23 March 1978, see page 10, lines 22-28 ---	1-6,8,9																					
Y	FR, A, 2305191 (SYNTEX (USA) INC.), 22 October 1976, see page 2, line 38 to page 7, line 17 ---	1-9,14-18																					
Y	FR, A, 2315943 (YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO. LTD.), 28 January 1977, see page 4, line 35 to page 10, line 26 ---	1-9,14-18																					
Y,P	EP, A, 0101063 (HOECHST AG), 22 February 1984, see page 10, line 11 to page 14, line 31 ---	1-9,14-18																					
A	Biological Abstracts, Vol. 73, 1973, Philadelphia, PA (US), H. Busch et al.: "Ubiquitin-protein conjugates", see abstract 80609, Moll Cell Biochem 40(3) 173-188, 1981 -----	13,19																					
* Special categories of cited documents: ¹⁵ "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family																							
IV. CERTIFICATION <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%; border-bottom: 1px solid black; padding: 5px;"> Date of the Actual Completion of the International Search ² 11 April 1985 (11.04.85) </td> <td style="width: 50%; border-bottom: 1px solid black; padding: 5px;"> Date of Mailing of this International Search Report ² 2 May 1985 (02.05.85) </td> </tr> <tr> <td style="border-bottom: 1px solid black; padding: 5px;"> International Searching Authority ¹ European Patent Office </td> <td style="border-bottom: 1px solid black; padding: 5px;"> Signature of Authorized Officer ²⁰ </td> </tr> </table>			Date of the Actual Completion of the International Search ² 11 April 1985 (11.04.85)	Date of Mailing of this International Search Report ² 2 May 1985 (02.05.85)	International Searching Authority ¹ European Patent Office	Signature of Authorized Officer ²⁰																	
Date of the Actual Completion of the International Search ² 11 April 1985 (11.04.85)	Date of Mailing of this International Search Report ² 2 May 1985 (02.05.85)																						
International Searching Authority ¹ European Patent Office	Signature of Authorized Officer ²⁰																						

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM THE SECOND SHEET

V. ☒ OBSERVATIONS WHERE CERTAIN CLAIMS WERE FOUND UNSEARCHABLE ¹⁰

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2) (a) for the following reasons:

1. ☒ Claim numbers 10, because they relate to subject matter ¹² not required to be searched by this Authority, namely:
- 11

.PCT Rule 39.1.iv) Methods for treatment of the human or animal body by surgery or therapy, as well as diagnostic methods.

2. ☐ Claim numbers _____, because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out ¹³, specifically:

VI. ☐ OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING ¹¹

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims of the international application.
2. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims of the international application for which fees were paid, specifically claims:
3. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claim numbers:
4. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, the International Searching Authority did not invite payment of any additional fee.

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT ON

INTERNATIONAL APPLICATION NO. PCT/DE 8500004 (SA 8681)

This Annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 19/04/85

The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR-A- 2265404	24/10/75	NL-A- 7502830	29/09/75
		DE-A- 2512975	09/10/75
		GB-A- 1483837	24/08/77
		US-A- 4133804	09/01/79
DE-A- 2732587	23/03/78	FR-A, B 2365347	21/04/78
		US-A- 4148886	10/04/79
FR-A- 2305191	22/10/76	NL-A- 7603020	28/09/76
		BE-A- 839872	22/09/76
		DE-A- 2612015	14/10/76
		AU-A- 1230876	29/09/77
		GB-A- 1511602	24/05/78
		CA-A- 1056305	12/06/79
		JP-A- 51118822	19/10/76
		AU-B- 509024	17/04/80
		SE-A- 7603556	22/10/76
		US-A- 4046877	06/09/77
FR-A- 2315943	28/01/77	DE-A- 2628914	27/01/77
		AU-A- 1549076	05/01/78
		GB-A- 1541275	28/02/79
		JP-A- 52031816	10/03/77
		CA-A- 1065759	06/11/79
		US-A- 4250084	10/02/81
		AU-B- 513340	27/11/80
EP-A- 0101063	22/02/84	DE-A- 3230151	16/02/84
		AU-A- 1795783	16/02/84
		JP-A- 59048422	19/03/84
		US-A- 4500450	19/02/85

For more details about this annex :
see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/82

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen **PCT/DE 85/00004**

I. KLASSEFIZKATION DES ANMELDUNGS-GE-GENSTANDS (bei mehreren Klassefizierungssymbolen sind alle anzugeben): Nach der internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassefizierung und der IPC Int.Kl. ⁴ A 61 K 37/24; A 61 K 37/02; A 61 K 39/39; G 01 N 33/50																				
II. RECHERCHIERTE SACHGEBIETE Recherchierter Mindestprüfstoff* <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 30%; border: 1px solid black; padding: 2px;">Klassefizierungssystem</td> <td style="border: 1px solid black; padding: 2px;">Klassefizierungssymbole</td> </tr> <tr> <td style="border: 1px solid black; padding: 2px;">Int.Kl.⁴</td> <td style="border: 1px solid black; padding: 2px; text-align: center;">A 61 K</td> </tr> </table> Recherchierte nicht zum Mindestprüfstoff gehorende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen²			Klassefizierungssystem	Klassefizierungssymbole	Int.Kl. ⁴	A 61 K														
Klassefizierungssystem	Klassefizierungssymbole																			
Int.Kl. ⁴	A 61 K																			
III. EINSCHLAGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN ³ <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th style="width: 10%; border: 1px solid black; padding: 2px;">Art*</th> <th style="width: 70%; border: 1px solid black; padding: 2px;">Kennzeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der Maßgeblichen Teile</th> <th style="width: 20%; border: 1px solid black; padding: 2px;">Betr. Anspruch Nr. ⁴</th> </tr> <tr> <td style="border: 1px solid black; text-align: center; padding: 2px;">Y</td> <td style="border: 1px solid black; padding: 2px;">FR, A, 2265404 (BACH J.F. et al.) 24. Oktober 1975, siehe Seiten 2 bis 8; Beispiel 1 --</td> <td style="border: 1px solid black; text-align: center; padding: 2px;">1-6,8,9</td> </tr> <tr> <td style="border: 1px solid black; text-align: center; padding: 2px;">Y</td> <td style="border: 1px solid black; padding: 2px;">DE, A, 2732587 (BACH J.F. et al.) 23. März 1978, siehe Seite 10, Zeilen 22-28 --</td> <td style="border: 1px solid black; text-align: center; padding: 2px;">1-6,8,9</td> </tr> <tr> <td style="border: 1px solid black; text-align: center; padding: 2px;">Y</td> <td style="border: 1px solid black; padding: 2px;">FR, A, 2305191 (SYNTEX (USA) INC.) 22. Oktober 1976, siehe Seite 2, Zeile 38 bis Seite 7, Zeile 17 --</td> <td style="border: 1px solid black; text-align: center; padding: 2px;">1-9,14-18</td> </tr> <tr> <td style="border: 1px solid black; text-align: center; padding: 2px;">Y</td> <td style="border: 1px solid black; padding: 2px;">FR, A, 2315943 (YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO.LTD.) 28. Januar 1977, siehe Seite 4, Zeile 35 bis Seite 10, Zeile 26 --</td> <td style="border: 1px solid black; text-align: center; padding: 2px;">1-9,14-18</td> </tr> <tr> <td style="border: 1px solid black; text-align: center; padding: 2px;">Y,P</td> <td style="border: 1px solid black; padding: 2px;">EP, A, 0101063 (HOECHST AG) 22. Februar 1984, siehe Seite 10, Zeile 11 bis Seite 14, Zeile 31 --</td> <td style="border: 1px solid black; text-align: center; padding: 2px;">1-9,14-18</td> </tr> </table>			Art*	Kennzeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der Maßgeblichen Teile	Betr. Anspruch Nr. ⁴	Y	FR, A, 2265404 (BACH J.F. et al.) 24. Oktober 1975, siehe Seiten 2 bis 8; Beispiel 1 --	1-6,8,9	Y	DE, A, 2732587 (BACH J.F. et al.) 23. März 1978, siehe Seite 10, Zeilen 22-28 --	1-6,8,9	Y	FR, A, 2305191 (SYNTEX (USA) INC.) 22. Oktober 1976, siehe Seite 2, Zeile 38 bis Seite 7, Zeile 17 --	1-9,14-18	Y	FR, A, 2315943 (YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO.LTD.) 28. Januar 1977, siehe Seite 4, Zeile 35 bis Seite 10, Zeile 26 --	1-9,14-18	Y,P	EP, A, 0101063 (HOECHST AG) 22. Februar 1984, siehe Seite 10, Zeile 11 bis Seite 14, Zeile 31 --	1-9,14-18
Art*	Kennzeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der Maßgeblichen Teile	Betr. Anspruch Nr. ⁴																		
Y	FR, A, 2265404 (BACH J.F. et al.) 24. Oktober 1975, siehe Seiten 2 bis 8; Beispiel 1 --	1-6,8,9																		
Y	DE, A, 2732587 (BACH J.F. et al.) 23. März 1978, siehe Seite 10, Zeilen 22-28 --	1-6,8,9																		
Y	FR, A, 2305191 (SYNTEX (USA) INC.) 22. Oktober 1976, siehe Seite 2, Zeile 38 bis Seite 7, Zeile 17 --	1-9,14-18																		
Y	FR, A, 2315943 (YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO.LTD.) 28. Januar 1977, siehe Seite 4, Zeile 35 bis Seite 10, Zeile 26 --	1-9,14-18																		
Y,P	EP, A, 0101063 (HOECHST AG) 22. Februar 1984, siehe Seite 10, Zeile 11 bis Seite 14, Zeile 31 --	1-9,14-18																		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen ⁵: "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: die beanspruchte Erfindung kann nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nahelegend ist "G" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist																				
IV. BESCHEINIGUNG <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%; border: 1px solid black; padding: 2px;"> Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 11. April 1985 </td> <td style="width: 50%; border: 1px solid black; padding: 2px;"> Absendedatum des internationalen Recherchenberichts 02 MAI 1985 </td> </tr> <tr> <td style="border: 1px solid black; padding: 2px;"> Internationale Recherchenbehörde EUROPÄISCHES PATENTAMT </td> <td style="border: 1px solid black; padding: 2px;"> Unterschrift des bevollmächtigten Bediensteten G.L.M. Krüdyenberg </td> </tr> </table>			Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 11. April 1985	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts 02 MAI 1985	Internationale Recherchenbehörde EUROPÄISCHES PATENTAMT	Unterschrift des bevollmächtigten Bediensteten G.L.M. Krüdyenberg														
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 11. April 1985	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts 02 MAI 1985																			
Internationale Recherchenbehörde EUROPÄISCHES PATENTAMT	Unterschrift des bevollmächtigten Bediensteten G.L.M. Krüdyenberg																			

III. EINSCHLÄGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN (FORTSETZUNG VON BLATT 2)		
Art*	ennzeichnung der Veröffentlichung ⁶ soweit erf. rderlich nter Angabe der maßgeb. hen Teile ¹⁷	Bet. Anspruch Nr. ¹⁸
A	Biological Abstracts, Band 73, 1973, Philadelphia, PA (US) H. Busch et al.: "Ubiquitin-protein conjugates", siehe Zusammenfassung 80609, Moll Cell Biochem 40(3) 173-188, 1981 -----	- 13,19

WEITERE ANGABEN ZU BLATT 2

V. ☒ BEMERKUNGEN ZU DEN ANSPRÜCHEN, DIE SICH ALS NICHT RECHERCHIERBAR ERWIESEN HABEN ¹⁰

Gemäß Artikel 17 Absatz 2 Buchstabe a sind bestimmte Ansprüche aus folgenden Gründen nicht Gegenstand der internationalen Recherche gewesen:

1. ☒ Ansprüche Nr. 10, 11, weil sie sich auf Gegenstände ¹² beziehen, die zu recherchieren die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich

PCT Regel 39.1.iv) Verfahren zur chirurgischen oder therapeutischen Behandlung des menschlichen oder tierischen Körpers sowie Diagnostizierverfahren

2. ☐ Ansprüche Nr., weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann ¹³, nämlich

VI. ☐ BEMERKUNGEN BEI MANGELNDER EINHEITLICHKEIT DER ERFINDUNG ¹¹

Die Internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich der internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche der internationalen Anmeldung.
 2. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich der internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche der internationalen Anmeldung, für die Gebühren gezahlt worden sind, nämlich

3. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; sie ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

4. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche eine Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Internationale Recherchenbehörde eine solche Gebühr nicht verlangt.

Bemerkung hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
☐ Die Zahlung zusätzlicher Gebühren erfolgte ohne Widerspruch.

ANHANG ZUM INTERNATIONALEN RECHERCHENBERICHT ÜBER DIE

INTERNATIONALE PATENTANMELDUNG NR. PCT/DE 8500004 (SA 8681)

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten internationalen Recherchenbericht angeführten Patentedokumente angegeben. Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am 19/04/85

Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
FR-A- 2265404	24/10/75	NL-A- 7502830	29/09/75
		DE-A- 2512975	09/10/75
		GB-A- 1483837	24/08/77
		US-A- 4133804	09/01/79
DE-A- 2732587	23/03/78	FR-A,B 2365347	21/04/78
		US-A- 4148886	10/04/79
FR-A- 2305191	22/10/76	NL-A- 7603020	28/09/76
		BE-A- 839872	22/09/76
		DE-A- 2612015	14/10/76
		AU-A- 1230876	29/09/77
		GB-A- 1511602	24/05/78
		CA-A- 1056305	12/06/79
		JP-A- 51118822	19/10/76
		AU-B- 509024	17/04/80
		SE-A- 7603556	22/10/76
		US-A- 4046877	06/09/77
FR-A- 2315943	28/01/77	DE-A- 2628914	27/01/77
		AU-A- 1549076	05/01/78
		GB-A- 1541275	28/02/79
		JP-A- 52031816	10/03/77
		CA-A- 1065759	06/11/79
		US-A- 4250084	10/02/81
		AU-B- 513340	27/11/80
EP-A- 0101063	22/02/84	DE-A- 3230151	16/02/84
		AU-A- 1795783	16/02/84
		JP-A- 59048422	19/03/84
		US-A- 4500450	19/02/85

Für nähere Einzelheiten zu diesem Anhang :
siehe Amtsblatt des Europäischen Patentamts, Nr. 12/82