(19) Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 694 34 878 T3** 2014.07.17

(12) # Übersetzung der geänderten europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 719 331 B2**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **694 34 878.3**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/GB94/02006**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **94 92 6324.8**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1995/007985**
(86) PCT-Anmeldetag: **14.09.1994**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **23.03.1995**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **03.07.1996**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **02.11.2006**
(97) Veröffentlichungstag des geänderten Patents beim EPA: **26.02.2014**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **17.07.2014**

(51) Int Cl.: ***C12N 15/19*** (2006.01)
C07K 14/52 (2006.01)
C07K 16/24 (2006.01)
A61K 38/19 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

Patentschrift wurde im Einspruchsverfahren geändert

(30) Unionspriorität:

9318984	**14.09.1993**	**GB**
9408602	**29.04.1994**	**GB**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:
Imperial Innovations Ltd., London, GB

(74) Vertreter:
WSL Patentanwälte Partnerschaft mbB, 65185, Wiesbaden, DE

(72) Erfinder:
WILLIAMS, Timothy John, London SW3 6LY, GB; JOSE, Peter John National Heart & Lung Ins, London SW3 6LY, GB; GRIFFITHS-JOHNSON, David A., London SW3 6LY, GB; HSUAN, John Justin, 153-155 Regent Street London W1R 7FD, GB

(54) Bezeichnung: **EOTAXIN = EOSINOPHIL CHEMOTAKTISCHES CYTOKIN**

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

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein chemotaktisches Cytokin.

[0002] Die Akkumulation von eosinophilen Leukozyten ist ein charakteristisches Merkmal von durch IgE vermittelten allergischen Reaktionen, wie z. B. allergische(s) Asthma, Rhinitis und Ekzeme. Die Eosinophilakkumulation tritt auch bei nicht-allergischem Asthma auf. Die unmittelbare Bronchokonstriktion als Antwort auf einen herausfordernden Stimulus bei einem Patienten mit Asthma schließt die Mastzellaktivierung und die Freisetzung von Konstriktormediatoren ein. Dies wird bei einigen Individuen nach mehreren Stunden gefolgt von einer späten Bronchokonstriktorantwort, die mit einem massiven Einströmen von Eosinophilen (1) einhergeht. Wiederholte Herausforderung führt zu chronischer Entzündung in den Atemwegen und zu einer ausgeprägten Hyper-Sensibilität gegenüber Konstriktormediatoren. Die Höhe von sowohl der späten Antwort als auch der chronischen Hyper-Sensibilität korreliert mit der Anzahl der Eosinophilen, die in der Lunge vorliegen (2, 3).

[0003] Die vorliegende Erfindung stellt ein chemoattraktives Protein bereit, welches in der Lage ist, Eosinophile anzuziehen und eine Eosinophilakkumulation in vitro und in vivo zu induzieren. Das chemoattraktive Protein der vorliegenden Erfindung wird als „Eotaxin" bezeichnet.

[0004] Etwas genauer wird gemäß einem Aspekt der vorliegenden Erfindung ein isoliertes chemoattraktives Protein bereitgestellt, welches in der Lage ist, Eosinophile anzuziehen und Eosinophilakkumulation in vitro und in vivo zu induzieren, und welches im wesentlichen keine anziehende Wirkung auf Neutrophile in vivo zeigt, bestehend aus einer oder umfassend eine Aminosäuresequenz, wie sie in SEQ ID NO: 1 dargestellt ist, oder ein Fragment des chemoattraktiven Proteins, welches seine Biologische Aktivität beibehält.

[0005] Eotaxine sind Proteine des C-C-Zweiges der Plättchenfaktor-4-Superfamilie der chemotaktischen Cytokine. Innerhalb des C-C-Zweiges der Plättchenfaktor-4-Superfamilie der chemotaktischen Cytokine oder Chemokine haben bestimmte Mitglieder die Fähigkeit Eosinophile in vitro anzuziehen, und manche können die Eosinophilakkumulation in vivo induzieren. Beispielsweise ziehen die Chemokine RANTES und MIP-1α Eosinophile in vitro an, während MCP-1 und MIP-1β dies nicht tun. („RANTES" bedeutet Regulated an Activation in Normal T cells Expressed and cecreted, "MIP" bezeichnet Makrophagen-Entzündungsprotein und „MCP" bezeichnet Monocyten-chemoattraktives Protein.)

[0006] Natürlich vorkommende Cytokine innerhalb der Plättchenfaktor-4-Superfamilie der chemotaktischen Cytokine können deutliche inter- in der Aminosäuresequenz des Proteins aufweisen und in den Kohlenwasserstoffmodifikationen des Proteins, während sie die gleichen charakteristischen funktionellen Eigenschaften beibehalten. Ähnliche Variationen der Struktur können bei Cytokinen auftreten, die aus verschiedenen Individuen innerhalb der gleichen Art erhalten wurden. Viele Chemokine innerhalb des C-C-Zweiges der Plättchenfaktor-4-Superfamilie zeigen Promiskuität bei der Rezeptorbindung, und die Fähigkeit verschiedener Chemokine an den gleichen Rezeptor zu binden, hängt nicht notwendigerweise von einem hohen Homologiegrad auf dem Aminosäureniveau ab. Dementsprechend werden sowohl interspezifische als auch intraspezifische Variationen in Proteinlänge, Aminosäuresequenz und Kohlenwasserstoffmodifikation für Eotaxine allgemein erwartet.

[0007] Die Fähigkeit Eosinophile anzuziehen und die Eosinophilakkumulation und/oder -aktivierung in vitro und in vivo zu induzieren, ist eine charakteristische Eigenschaft von Eotaxinen. Darüber hinaus zeigen Eotaxine allgemein im wesentlichen keine anziehende Wirkung für Neutrophile in vivo. Die chemoattraktive Wirkung für Eosinophile kann eine interspezifische Wirkung sein, z. B. scheint das Meerschweinchen-Eotaxin dazu in der Lage zu sein, die Chemotaxis von humanen Eosinophilen in vitro zu induzieren.

[0008] Obwohl dies nicht Bestandteil der vorliegenden Erfindung ist, kann ein Eotaxin aus einer geeigneten Körperflüssigkeit erhalten werden, z. B. aus einem bronchoalveolärem Spülfluid, dass aus einem menschlichen oder nicht-menschlichen Subjekt erhalten wurde, insbesondere aus einem allergischen Subjekt nach der Herausforderung mit einem Allergen, was entweder experimentell induziert wurde oder natürlich auftrat. Weitere Quellen für Eotaxine sind z. B. inflammatorische Exsudatsflüssigkeiten und in vitro-Kulturen von Makrophagen, Lymphozyten, Neutrophilen, Mastzellen, Atemwegsepithelzellen, Bindegewebszellen, Gefäßendothelzellen und Eosinophile selbst.

[0009] Zum Beispiel kann aus einem empfindlich gemachten Meerschweinchen nach Herausforderung mit Allergen ein Eotaxin erhalten werden. Die Meerschweinchenmodelle sind geeignet, da sie viele gemeinsame Merkmale mit der asthmatischen Antwort im Menschen teilen. Das Eotaxine, das aus dem bronchoalveolärem

Spülfluid eines empfindlich gemachten Meerschweinchens durch sequentielle HPLC-Aufreinigung erhältlich ist, weist im allgemeinen ein Molekulargewicht in dem Bereich von 6–16 kDa auf.

[0010] (Wie oben angegeben werden intraspezifische Molekulargewichtsvariationen dieser Größenordnung bei Mitgliedern der Plättchenfaktor-4-Superfamilie beobachtet.)

[0011] Gemäß einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung wird ein Verfahren zur Herstellung eines chemoattraktiven Proteins der vorliegenden Erfindung bereitgestellt, welches das kultivieren in vitro von Makrophagen, Lymphozyten, Mastzellen, Atemwegsepithelzellen, Bindegewebszellen und das Isolieren einer Fraktion, die eine chemoattraktive Wirkung auf Eosinophile in vitro und in vivo zeigt, und die im wesentlichen keine anziehende Wirkung auf Neutrophile in vivo zeigt, aus den Zellen oder aus der Zellkulturflüssigkeit umfasst.

[0012] Die Aminosäuresequenz eines Meerschweinchen-Eotaxins wird in SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2 und in **Fig.** 7 und **Fig.** 8 der begleitenden Figuren angegeben. Andere Meerschweinchen-Eotaxine werden im allgemeinen auf dem Aminosäureniveau eine Gesamthomologie von wenigstens 40% oder 50% mit der Sequenzliste, die in SEQ ID NO. 1 (**Fig.** 7) gezeigt ist, aufweisen. Die Homologie kann wenigstens 60%, z. B. wenigstens 70%, z. B. wenigstens 80%, mit der Sequenz, die in SEQ ID NO. 1 und in **Fig.** 7 angegeben ist, betragen.

[0013] Die prozentuale Homologie in dem vorliegenden Fall wird auf der Basis der Aminosäuren berechnet, die in entsprechenden Positionen in den zwei untersuchten Sequenzen identisch sind. Konservative Substitutionen werden nicht berücksichtigt. Bei der Berechnung der prozentualen Homologie eines untersuchten putativen Eotaxinmoleküls mit der in SEQ ID NO. 1 (**Fig.** 7) oder mit der in SEQ ID NO. 2 (**Fig.** 8) dargestellten Sequenz wird die Berechnung auf die Aminosäuren in dem Anteil des untersuchten Moleküls bezogen, der mit der in SEQ ID NO. 1 (**Fig.** 7) oder SEQ ID NO. 2 (**Fig.** 8) dargestellten Sequenz überlappt, wenn das untersuchte Molekül eine andere Länge aufweist als das Eotaxin, das in SEQ ID NO. 1 oder SEQ ID NO. 2 (**Fig.** 7 oder **Fig.** 8) angegeben ist. Für die Anordnung von Aminosäuresequenzen und die Berechnung der Homologie sind im Handel Softwarepakete erhältlich, z. B. das „Bestfit"-Programm, das erhältlich ist von Genetics Computer Group Sequence Analysis Software, Madison, Wisconsin, USA.

[0014] Sofern nichts anderes angegeben ist, wurden die spezifischen Werte der prozentualen Homologie zwischen Eotaxin und anderen chemotaktischen Cytokinen, die in der vorliegenden Beschreibung angegeben werden, auf der Basis des in SEQ ID NO. 1 (**Fig.** 7) angegebenen Eotaxin berechnet. Wie oben angegeben werden Eotaxine, die aus anderen Arten als Meerschweinchen erhältlich sind, z. B. aus Menschen, interspezifische Unterschiede von der Sorte aufweisen, wie sie auch von anderen Mitgliedern des C-C-Zweiges der Plättchenfaktor-4-Superfamilie der Chemokine gezeigt werden, z. B. Unterschiede in Proteinlänge, Aminosäuresequenz und Kohlenwasserstoffmodifikationen. Z. B. kann es Variationen in den C- und/oder N-terminal Resten geben. Beispielsweise ist zu erwarten, dass das Molekulargewicht eines E-otaxins aus einer vom Meerschweinchen verschiedenen Spezies im allgemeinen in den Bereich von 6 kDa bis 16 kDa fallen wird, in manchen Fällen kann ein Eotaxin jedoch ein Molekulargewicht von weniger als 6 kDa oder mehr als 16 kDa aufweisen.

[0015] Gleichsam ist zu erwarten, dass im allgemeinen ein Eotaxin aus einer anderen Spezies als dem Meerschweinchen wenigstens 40% Gesamthomologie mit der Sequenz, die in SEQ ID NO. 1 und in **Fig.** 7 angegeben ist, aufweist. Die Homologie kann wenigstens 50%, z. B. wenigstens 60%, z. B. wenigstens 70%, z. B. wenigstens 80%, mit in der in SEQ ID NO. 1 und in **Fig.** 7 angegebenen Sequenz betragen. Es kann jedoch Eotaxine aus anderen Spezies als dem Meerschweinchen geben, die weniger als 40% Homologie mit SEQ ID NO. 1 (**Fig.** 7) aufweisen.

[0016] Eotaxine können nach einem oder mehreren der oben angegebenen Merkmale identifiziert werden, insbesondere anhand ihrer Fähigkeit Eosinophile in vitro anzuziehen und/oder zu aktivieren und deren Akkumulation und/oder Aktivierung in vivo zu bewirken. Eine Eigenschaft, die bei der Identifizierung eines Moleküls als ein Eotaxin hilft, ist das Fehlen einer anziehenden Wirkung auf Neutrophile.

[0017] Wir stellen ein Verfahren bereit zur Bestimmung der Fähigkeit einer Substanz die Eosinophilakkumulation in vivo zu induzieren, d. h. sozusagen ein Testverfahren für putative Eotaxine, bei welchem man die Substanz im allgemeinen intradermal einem Versuchstier verabreicht, welches zuvor mit markierten, z. B. ^{111}In-markierten, Eosinophilen behandelt wurde, und anschließend die Anzahl der markierten Eosinophilen an einer Hautstelle bestimmt.

[0018] Ein in-vitro-Verfahren, dass verwendet werden kann, um ein putatives Eotaxin auf die Fähigkeit, Eosinophile in vitro anzuziehen und/oder zu aktivieren, zu testen, ist die Fähigkeit der Substanz, die intrazellulären

Calciumgehalte von Eosinophilen zu erhöhen. Andere allgemeine Verfahren zur Bestimmung der chemotaktischen Aktivität in vitro können verwendet werden, um putative Eotaxine in vitro zu untersuchen.

[0019] Die Bestätigung dafür, dass ein Attraktionsmittel für Eosinophile ein Eotaxin ist, kann auch durch die Berücksichtigung der Sequenzhomologie dieses Proteins mit der in SEQ ID NO. 1 (**Fig.** 7) angegebenen Sequenz und/oder mit der in SEQ ID NO. 2 (**Fig.** 8) angegebenen Sequenz erreicht werden und/oder durch Berücksichtigung der strukturellen Verwandtschaft zwischen dem Protein und dem Meerschweinchen-Eotaxin.

[0020] Wie zuvor bereits erwähnt sind RANTES und MIP-1α beide Eosinophilaktivatoren. Eotaxin weist mit RANTES und MIP-1α funktionelle Ähnlichkeiten auf, jedoch geringe strukturelle Homologie (31% Homologie mit MIP-1α auf dem Aminosäurenniveau, berechnet auf der Grundlage von SEQ ID NO. 1 (**Fig.** 7); 32% Homologie, wenn sie auf der Grundlage der überlappenden Sequenzen berechnet wird, und 26% Homologie mit RANTES auf dem Aminosäureniveau, berechnet auf der Grundlage von SEQ ID NO. 1 (**Fig.** 7); 27% Homologie, wenn Sie auf der Grundlage der überlappenden Sequenzen berechnet wird). Ein Eotaxin kann von RANTES und MIP-1α nicht nur anhand des Homologiegrades unterschieden werden, sondern auch anhand der Gesamtunterschiede in Sequenz und Struktur.

[0021] Zusätzlich zu dem Eotaxinmolekül mit vollständiger Länge stellt die vorliegende Erfindung auch Moleküle bereit, die weniger als die vollständige Eotaxinsequenz umfassen. Solche Moleküle (hier als „Fragmente" bezeichnet) können Polypeptide oder Peptide sein. Für die Verwendung als ein Eotaxinsubstitut sollte ein Fragment eine oder mehrere der biologischen Aktivitäten des Muttermoleküls beibehalten.

[0022] Eosinophile enthalten ein Arsenal an chemischen Stoffen, die erforderlich sind, um Parasiten abzutöten. Diese chemischen Stoffe wurden in Zusammenhang gebracht mit der Beschädigung des Atemwegsepithels, die bei Asthma auftritt, und können eine Beziehung zu den beobachteten Veränderungen der Atemwegsfunktion (26, 27) haben. Unsere Untersuchungen deuten darauf hin, dass Eotaxine als bedeutende Mediatoren der Eosinophilakkumulation in vivo berücksichtigt werden sollten. Makrophagen, Lymphozyten, Neutrophile, Mastzellen, Atemwegsepithelzellen, Bindegewebszellen, Gefäßendothelzellen und Eosinophile selbst sind wahrscheinliche Kandidaten als Quelle für die Eosinophil-chemoattraktive Aktivität, die in der Lunge erzeugt wird. Die Plättchen können auch eine Rolle spielen, da gezeigt wurde, dass sie C-C-Chemokine (22) freisetzen können. Darüber hinaus kann eine frühe Plättchenabscheidung bei der anschließenden Eosinophilakkumulation in vivo involviert sein (28, 29), und es gibt Nachweise dafür, dass der blutklätchenaktivierende Faktor die Synthese eines nicht identifizierten Eosinophil-Chemoattraktionsmittel in vivo synthetisiert (30). In dieser Hinsicht ist interessant, dass der aus Blutplättchen gewonnene Wachstumsfaktor die Genexpresion vom C-C-Chemokinen in Fibroblasten induzieren kann (31). Darüber hinaus wurden die C-C-Chemokine mit der Wundheilung in Verbindung gebracht (18). Dies kann bedeutend sein für die Subepitheliale Basismembranfibrose, die ein hervorstechendes Merkmal der asthmatischen Lunge ist. Demzufolge können Eotaxine sowohl bei der Eosinophilakkumulation als auch bei chronischen Strukturveränderungen in der Lunge involviert sein.

[0023] Die Eotaxine können bei Asthma eine bedeutende Rolle spielen sowie bei anderen Krankheiten, die eine entzündliche Komponente aufweisen, bei der die Eosinophilakkumulation und/oder -aktivierung ein auffälliges Merkmal ist, z. B. bei Rhinitis und Ekzemen, insbesondere bei allergischen Ekzemen. Dementsprechend sind solch Mittel, die die Produktion, Freisetzung oder Wirkung von Eotaxinen hemmen oder in anderer Weise einschränken, potentielle selektive therapeutische Mittel. Diese Mittel und deren therapeutische Verwendung werden hierin beschrieben.

[0024] Diese Mittel umfassen Inhibitoren, die die Wechselwirkung eines Eotaxins mit Eotaxinrezeptoren beeinflussen, z. B. in dem sie an ein Eotaxin oder an einen Eotaxinrezeptor binden. Ein Beispiel für solch einen Inhibitor sind die Rezeptoren selbst, die bei Verabreichung ein Eotaxin binden können und dessen Wechselwirkung mit natürlich vorkommenden Rezeptoren verhindern können. Solche hemmenden Rezeptoren können löslich oder unlöslich sein. Rezeptoren, die bei der Zellaktivierung nicht involviert sind, können an Zellen gebunden werden oder auf ihnen induziert werden. Solche Rezeptoren können auch verwendet werden, um endogenes Eotaxin zu entfernen.

[0025] Weitere Beispiele für Mittel, die die Wechselwirkung von Eotaxinen mit Eotaxinrezeptoren beeinflussen, sind Rezeptorantagonisten und Antikörper, und zwar sowohl Antikörper, die gegen ein Eotaxin gerichtet sind (in der Lage mit diesen zu binden), als auch Antikörper, die gegen einen Eotaxinrezeptor gerichtet sind, insbesondere monoklonale Antikörper. Jedes andere Mittel, dass die Bindung eines Eotaxins an einen Eotaxinrezeptor inhibiert oder in anderer Weise verhindert, hat auch ein therapeutisches Potential, z. B. jedes an-

dere Mittel, dass an ein Eotaxin oder an einen Eotaxinrezeptor bindet. Weitere Mittel, die ein therapeutisches Potential haben, sind diejenigen, die die Aktivierung von Eotaxinrezeptoren verhindern oder reduzieren.

[0026] Demzufolge wird gemäß einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung ein Antikörper bereitgestellt, der spezifisch an das chemoattraktive Protein gemäß der Erfindung bindet.

[0027] Gemäß einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung wird die Verwendung eines Antikörpers gemäß der Erfindung für die Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Asthma oder einer anderen entzündlichen Krankheit bereitgestellt.

[0028] Gemäß einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung wird ein pharmazeutisches Präparat bereitgestellt, welches als aktiven Bestandteil einen Antikörper gemäß der Erfindung im Gemisch oder zusammen mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger umfasst.

[0029] Weitere Mittel, die die Wirkung von Eotaxinen hemmen oder in anderer Weise einschränken, sind diejenigen, die die Struktur eines Eotaxins so verändern, dass es nicht länger in der Lage ist, an einen Eotaxinrezeptor zu binden, z. B. ein Enzym oder ein anderes Mittel, dass Eotaxin spezifisch umwandelt.

[0030] Unter den Chemokinen ist Rezeptorpromiskuität üblich, so dass der Rezeptor nicht notwendigerweise eotaxinspezifisch sein muss, wenngleich es wesentlich ist, dass ein Rezeptor in der Lage ist ein Eotaxin zu binden. Z. B. kann ein Rezeptor MIP-1α, RANTES und/oder andere eosinophilattraktive Chemokine sowie ein Eotaxin binden.

[0031] Wie oben angegeben umfassen die Möglichkeiten für einen therapeutischen Eingriff die Verwendung eines Rezeptors, an dem ein Eotaxin bindet, insbesondere eines löslichen Rezeptors. Es kann vorteilhaft sein, einen eotaxinspezifischen Rezeptor zu verwenden. Weiter Möglichkeiten für einen therapeutischen Eingriff umfassen Rezeptorantagonisten, z. B. auf der Grundlage von drei-dimensionalen Strukturen oder den Aminosäuresequenzen von Eotaxinen und/oder von Eotaxinrezeptoren, und Mittel, für die festgestellt wurde, dass sie Eotaxin oder andere Agonisten, die an Eotaxinrezeptoren binden oder diese aktivieren, hemmen. Beispielsweise kann ein Rezeptorantagonist oder ein Agonisten-Inhibitor ein Polypeptid sein, bei dem die Sequenz eines natürlich vorkommenden vollständigen Eotaxins modifiziert wurde, z. B. durch Aminosäuresubstitution, oder kann ein Fragment eines Eotaxins sein (d. h. sozusagen ein Polypeptid oder kleines Peptid, dass einen Teil der Aminosäuresequenz eines natürlich vorkommenden Eotaxins aufweist), oder ein modifiziertes Fragment eines Eotaxins, z. B. durch Aminosäuresubstitutionen modifiziert.

[0032] Darüber hinaus liefert die Kenntnis von der Sequenz und/oder Struktur von Eotaxinen entweder für sich oder in Kombination mit der Kenntnis der Sequenz und/oder Struktur von anderen Chemokinen, die an den/die gleichen Rezeptor(en) wie Eotaxine binden, wertvolle Informationen für die Entwicklung von therapeutischen Mitteln.

[0033] Mittel die die Eotaxinsynthese oder -freisetzung verhindern oder inhibieren können ebenfalls therapeutisch verwendet werden. Diese Mittel und deren Verwendung werden hier auch beschrieben.

[0034] Es werden hierin alle Inhibitoren der Eotaxinaktivität, -synthese und -freisetzung beschrieben, einschließlich lösliche Rezeptoren, Antikörper, Antagonisten und Inhibitoren der Agonistenbindung.

[0035] Dem gemäß beschreiben wir ein Mittel, dass die Produktion, Freisetzung oder Wirkung eines Eotaxins inhibiert oder in anderer Weise behindert, insbesondere ein wie oben beschriebenes Mittel für die Verwendung als ein Medikament. Obwohl dies nicht Bestandteil der vorliegenden Erfindung ist, stellen wir auch die Verwendung eines Mittels bereit, dass die Produktion, Freisetzung oder Wirkung eines Eotaxins inhibiert oder in anderer Weise behindert, insbesondere eines wie oben beschrieben Mittels, bei der Herstellung eines Medikaments für die Behandlung von Asthma oder anderen Erkrankungen, die eine entzündliche Komponente aufweisen, insbesondere mit Akkumulation von Eosinophilen, z. B. Rhinitis oder Ekzeme, insbesondere allergische Ekzeme.

[0036] Die Verwendung der Struktur- und Sequenzinformation bezüglich der Eotaxine bei der Entwicklung von therapeutisch und diagnostisch verwendbaren Mitteln, z. B. bei der Computergestützten Entwicklung auf der Grundlage der drei-dimensionalen Struktur der Eotaxine, ist Teil der vorliegenden Erfindung.

[0037] Putative Inhibitoren der Eotaxinaktivität können gescreent werden, indem in vivo- und in vitro-Assays, die auf der Hemmung der Chemoattraktion und/oder Akkumulation und/oder Aktivierung von Eosinophilen durch Eotaxin basieren, verwendet. Einige allgemeine Verfahren zur Testung der Aktivität einer Verbindung auf eine inhibierende Wirkung auf die Aktivität eines Chemoattraktiven Cytokins in vitro sind bekannt. Solche Assays können verwendet werden, um die inhibitorische Wirkung eines putativen Inhibitors auf die in-vitro-Wirkungen zu bestimmen, die in Eosinophilen durch Eotaxine induziert werden.

[0038] Assays, die für das Screening auf putative Eotaxin-Inhibitoren geeignet sind, umfassen z. B. die Hemmung der Erhöhung der intrazellulären Calciumgehalte in vitro, die in Zellen durch Eotaxin induziert wird. Das Verfahren zur Bestimmung der Fähigkeit einer Substanz, die Eosinophilakkumulation in vivo zu induzieren, d. h. ein Verfahren zur Testung putativer Eotaxine, kann auch verwendet werden, um die Fähigkeit einer Substanz zu bestimmen, die Eosinophilakkumulation zu inhibieren, die in vivo durch ein Eotaxin induziert wird: Ein Tier wird mit markierten Eosinophilen vorbehandelt, ein Eotaxin und ein putativer Inhibitor werden verabreicht und die Anzahl der markierten Eosinophilen an einer Hautstelle wird anschließend bestimmt. Das Eotaxin wird im allgemeinen intradermal verabreicht, und der putative Inhibitor kann über den gleichen Weg oder über einen anderen Weg, z. B. systemisch verabreicht werden.

[0039] Es werden hierin Beispiele von in-vitro- und in-vivo-Assays sowohl für die Bestimmung der Eotaxinaktivität als auch für die Bestimmung der Eotaxin-hemmenden Aktivität beschrieben. Beispiel 1 gibt beispielsweise ein ausführliches Protokoll für das in-vivo-Assay der vorliegenden Erfindung an, und Beispiel 4 gibt ausführliche Protokolle für verschiedene Assays an. Die hier beschriebenen Assays können als solche angewendet werden oder können erforderlichenfalls modifiziert werden. Die Assays können für sich angewendet werden oder in Kombination, um Eotaxin und Eotaxin-hemmende Aktivität zu ermitteln. Ein putativer Inhibitor kann jede beliebige der oben beschriebenen Molekühlsorten sein, einschließlich Rezeptoren, z. B. lösliche Rezeptoren, Antikörper und Antagonisten und Inhibitoren der Agonistenbindung. Die Verfahren zur Testung putativer Inhibitoren der Eotaxine werden ebenfalls bereitgestellt.

[0040] Etwas genauer wird gemäß der vorliegenden Erfindung ein Verfahren zum Testen einer Verbindung hinsichtlich einer inhibitorischen Wirkung auf die Aktivität eines chemoattraktiven Cytokins in vitro bereitgestellt, dadurch gekennzeichnet, dass das chemoattraktive Cytokin ein chemoattraktives Protein gemäß der Erfindung ist.

[0041] Wir beschreiben auch ein pharmazeutisches Präparat, welches als aktiven Bestandteil ein Mittel enthält, dass die Produktion, Freisetzung oder Wirkung eines Eotaxins inhibiert oder in anderer Weise behindert, im Gemisch oder zusammen mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger. Solche Mittel werden oben beschrieben und umfassen z. B. einen Inhibitor der Eotaxinsynthese oder -freisetzung, einen löslichen Eotaxinrezeptor, einen Eotaxinrezeptor-Antagonisten oder einen Inhibitor eines Eotaxinrezeptor-Agonisten, einen Antikörper gegen Eotaxin oder einen Antikörper gegen einen Eotaxin-Rezeptor.

[0042] Wir beschreiben auch ein Verfahren zur Behandlung von Asthma und anderen inflammatorischen Erkrankungen, welches die Verabreichung einer wirksamen Menge eines Mittels umfasst, dass die Produktion, Freisetzung oder Wirkung eines Eotaxins inhibiert oder in anderer Weise behindert. Das Mittel kann wie oben beschrieben sein, beispielsweise ein Inhibitor der Eotaxinsynthese oder -freisetzung, ein löslicher Eotaxin-Rezeptor, ein Eotaxinrezeptor-Antagonist oder ein Inhibitor eines Eotaxinrezeptor-Agonisten oder ein Antikörper gegen Eotaxin oder gegen einen Eotaxin-Rezeptor.

[0043] Wir beschreiben außerdem Assays für Eotaxine und Anti-Eotaxin-Antikörper, insbesondere Immunoassays und besonders ELISAs (enzyme-linked immunosorbent assays). Die Erfindung stellt beispielsweise ein Immunoassay für ein Antigen bereit, dass dadurch gekennzeichnet ist, dass das Antigen ein Eotaxin gemäß der Erfindung ist, und stellt weiterhin ein Immunoassay für einen Antikörper bereit, dadurch gekennzeichnet, dass der Antikörper einen Komplex mit einem chemoattraktiven Protein gemäß der Erfindung bildet.

[0044] Wir beschreiben auch Assays für Eotaxine, die analog zu den Immunoassays für Eotaxine sind, außer dass ein spezifisch bindender Partner verwendet wird, der anders als ein Antikörper ist. Bei solchen Assays mit spezifisch bindendem Partner kann ein Eotaxin-Rezeptor anstelle eines Anti-Eotaxin-Antikörpers verwendet werden.

[0045] Bei einem Immunoassays kann beispielsweise ein Anti-Eotaxin-Antikörper auf eine feste Oberfläche geschichtet werden, um das Einfangen und damit die Erfassung von Eotaxin zu ermöglichen. Ein Anti-Eotaxin-Antikörper kann in einem Assay für die Erfassung von Antikörpern gegen Eotaxin verwendet werden, z. B.

in einem kompetitiven Antikörper-Assay. Ein markiertes Eotaxin oder ein Derivat davon, beispielsweise ein rekombinates Eotaxin oder ein synthetisches Peptid, dass einen Teil der Aminosäuresequenz eines Eotaxins enthält, kann in einem kompetitiven Antigen-Assay auf Eotaxin verwendet werden oder kann verwendet werden, um eine feste Oberfläche in einem Assay zum Einfangen von Antikörpern gegen Eotaxin zu beschichten. Die vielen verschiedenen Arten von Assayformaten sind in der Literatur auf dem Gebiet gut beschrieben, siehe z. B. „ELISA and other colid Phase Immunoassays, Theoretical and Practical Aspects" Hrsg. Kemeny D. M. & Challacombe S. J., John Wiley, 1988 (36). Assays, die einen Eotaxin-Rezeptor anstelle eines Anti-Eotaxin-Antikörpers verwenden, können analog durchgeführt werden.

[0046] Wie zuvor erwähnt stellen wir ein Verfahren zur Herstellung eines Eotaxins bereit, welches das Gewinnen eines bronchoalveolären Spülfluids umfasst, dass aus einem Menschen oder einem nicht-menschlichen Tier erhalten wird, welches mit einem Herausfordernden Stimulus herausgefordert wurde, z. B. aus einem Menschen, der unter allergischem oder nicht-allergischem Asthma oder einer anderen Lungenerkrankung leidet, oder aus einem Meerschweinchen, dass mit einem fremden Protein empfindlich gemacht wurde, sowie das Isolieren einer Fraktion die Eosinophil-chemoattraktive Aktivität aufzeigt. Ein Verfahren zur Isolierung einer Eotaxin-enthaltenden Fraktion des bronchoalveolären Spülfluids umfasst aufeinanderfolgen Kationen-Austausch, Größenausschluss und HPLC-Systeme mit reverser Phase. Die gewünschte Fraktion enthält im allgemeinen eine Polypeptid, welches ein Molekulargewicht in dem Bereich von 6–16 kDa aufweist. Die Reinheit kann durch SDS-PAGE verifiziert werden. Falls gewünscht kann die Authentizität der erhaltenen Substanz durch Vergleich von deren Aminosäuresequenz mit der Aminosäuresequenz, die in SEQ. ID. NO. 1 oder SEQ. ID. NO. 2 (**Fig.** 7 oder **Fig.** 8) angegeben ist, bestimmt werden.

[0047] Die Eotaxine können nach dem obigen Verfahren aus anderen Quellen erhalten werden, z. B. aus inflammatorischen Exsudatfluiden, oder aus in-vitro-Kulturen von Makrophagen, Lymphozyten, Neutrophilen, Mastzellen, Atemwegsepithelzellen, Bindegewebszellen, Gefäßendothelzellen und Eosinophilen selbst.

[0048] Alternativ kann ein vollständiges Eotaxin oder ein Teil (Fragment) eines Eotaxins, z. B. ein Polypeptid- oder Peptid-Fragment, durch chemische Synthese hergestellt werden, z. B. nach dem Merryfield-Verfahren. Ein weiteres Verfahren zur Herstellung eines vollständigen Eotaxins oder eines Teils davon ist die rekombinante-DNA-Technik. Alle Verfahren zur Herstellung von Eotaxin sind Teil der vorliegenden Erfindung.

[0049] Um ein vollständiges Eotaxinpolypeptid oder ein Polypeptid-(oder Peptid-)Fragment durch rekombinante-DNA-Technik herzustellen, wird eine Nukleinsäuresequenz, die das Polypeptid codiert, in einen Expressionsvektor unter der Kontrolle von geeigneten Kontrollsequenzen eingefügt. Ein rekombinantes Polypeptid kann dann unter Verwendung eines prokaryotischen Expressionssystems exprimiert werden, z. B. in E. coli, oder unter Verwendung eines eukaryotischen Zellsystems, wobei in diesem Fall die hieraus hervorgehenden Polypeptide glykosyliert sein können. Solche Verfahren sind Standard, siehe z. B. Sambrook, J., Fritisch, E. F. und Maniatis T., Molecular Cloning a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 (37).

[0050] Eine Nukleinsäure, die ein Eotaxinpolypeptid vollständig oder teilweise kodiert, kann erhalten werden, in dem man eine Bibliothek durchsucht, die aus geeigneten Zellen erstellt wurde, z. B. mit Zellen aus der Lunge von mit Allergen herausgefordertem Meerschweinchen oder Menschen. Das Screening kann durchgeführt werden, in dem man eine Sonde verwendet, die eine Sequenz enthält, die für ein Eotaxin charakteristisch ist, insbesondere eine Sequenz, die das Eotaxin von anderen verwandten Cytokinen, wie z. B. RANTES und MIP-1α, unterscheiden. Es kann bevorzugt sein, eine lange Sonde zu verwenden, z. B. eine Sonde, die eine Nukleinsäuresequenz umfasst, welche ein vollständiges Eotaxin-Polypeptid kodiert.

[0051] Alternativ kann die Polypeptidsequenz eines Eotaxins verwendet werden, um Oligonukleotidprimer zu entwickeln, z. B. degenerierte Primer. Die Primer können z. B. Basen umfassen, die in ihrer Wechselwirkung weniger spezifisch sind als die natürlich vorkommenden Basen, z. B. kann Inosin verwendet werden. Beispiele für die Primer sind die Sense-Sequenz
5' TGC TGT TTC CGI GTI ACI AAC AAA (SEQ. ID. NO. 3), die auf der Aminosäurensequenz CCFRVTNK basiert, und die Anti-Sense-sequenz
5' CAT CTT GTC IGG CTT IAT TTC (SEQ. ID. NO. 4), die auf der Aminosäurensequenz EIKPDKM basiert. Solche Primer können für die Amplifizierung von revers transribierter mRNA mit der Polymerase-Ketten-Reaktion verwendet werden. Dies liefert cDNA-Sonden für das Durchsuchen von Bibliotheken, z. B. um, wie oben beschrieben, vollständige Eotaxinklone zu isolieren. Die Primer können Codons umfassen, die vor dem Hintergrund der für die Spezies bekannten Vorzüge ausgewählt werden.

[0052] Wie oben angegeben sind auch die Derivate der natürlich vorkommenden Eotaxine Teil der vorliegenden Erfindung. Solche Derivate umfassen Polypeptide, die eine oder mehrere der folgenden Modifizierungen im Vergleich zu einem natürlich vorkommenden Eotaxin aufweisen:

(i) Verlängerung oder Verkürzung am C-Terminus,
(ii) Verlängerung oder Verkürzung am N-Terminus,
(iii) Deletion und/oder Insertion von internen Sequenzen,
(iv) Aminosäuresubstitutionen, z. B. am C- und/oder N-Terminus, und
(v) ein abweichendes Glycosylierungsmuster. (Beispielsweise gibt es am Rest 70 eine potentielle Stelle für eine O-Glycosylierung.)

[0053] Solche Derivate können als Agonisten für Untersuchungen der Struktur-/Wirkungsbeziehungen fungieren oder als Rezeptor-Antagonisten.

[0054] Anti-Eotaxin-Antikörper und Anti-Eotaxin-Rezeptor-Antikörper, sowohl polyklonal als auch monoklonal, können nach Standardverfahren hergestellt werden, z. B. Kohler & Milstein (38). Ein vollständiges Eotaxin kann als Antigen verwendet werden, oder es kann bevorzugt sein, ein Fragment eines Eotaxins zu verwenden, um einen Antikörper gegen eine spezifische antigene Determinante zu erzeugen. Ein natürlich vorkommendes Eotaxin kann als Antigen verwendet werden. Alternativ kann ein rekombinantes oder synthetisches Eotaxin oder Eotaxin-Polypeptid oder -Peptid verwendet werden. Demnach wird gemäß einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung ein Verfahren zur Herstellung eines Antikörpers gemäß der Erfindung bereitgestellt, welches die Verwendung eines chemoattraktiven Proteins gemäß der Erfindung umfasst.

[0055] Die **Fig.** 1 bis **Fig.** 18 der begleitenden Figuren stellen die vorliegende Erfindung beispielhaft dar. Es folgt eine kurze Beschreibung der Figuren. Eine etwas ausführlichere Beschreibung der Figuren erfolgt weiter unten und im Beispiel-Abschnitt dieser Beschreibung.

[0056] **Fig.** 1: Protokoll für die Erzeugung und Untersuchung von Eosinophil-chemoattraktiver Aktivität in vivo.

[0057] **Fig.** 2: Zeitverlauf der Erzeugung von Eosinophil-chemoattraktiver Aktivität in den Lungen von empfindlich gemachten Meerschweinchen nach Herausforderung mit Antigen.

[0058] **Fig.** 3, **Fig.** 4, **Fig.** 5 betreffen sämtlich die Aufreinigung von Eotaxin aus bronchoalveolärem Spülfluids (BAL):

[0059] **Fig.** 3: Finales HPLC-Profil an reverser Phase, welches die Absorbtion bei 214 hm zeigt und den Acetonitril-Gradienten.

[0060] **Fig.** 4: Messungen der ^{111}In-Eosinophil-chemoattraktiven Aktivität von den bei der HPLC-Chromatographie erhaltenen Fraktionen.

[0061] **Fig.** 5: Messung der ^{111}In-neutrophil-chemoattraktiven Aktivität, es wurde das Fehlen von signifikanter Aktivität beobachtet.

[0062] **Fig.** 6: SDS-PAGE-Analyse der C18-reverse-Phase HPLC-Fraktionen 50–56.

[0063] **Fig.** 7 und **Fig.** 8: Aminosäuresequenzen eines isolierten Meerschweinchen-Eotaxins.

[0064] **Fig.** 9: Vergleich der Eotaxinsequenz von **Fig.** 7 mit humanen MCP-1, MCP-2, MCP-3 (21), Meerschweinchen-MOP-1 (24), humanen MIP-1α, MIP-1β und RANTES (18) konservierte Reste (schattiert) aufzeigend.

[0065] **Fig.** 10: Vergleich der ^{111}In-Eosinophilakkumulation in vivo unter Verwendung von Meerschweinchen-Eotaxin und den rekombinanten humanen Proteinen RANTES, MIP-1α und MCP-1.

[0066] **Fig.** 11 (eingefügt). Hemmung der Bindung von ^{125}I-RANTES zu Meerschweinchen-Eosinophilen in vitro, induziert durch Eotaxin und RANTES, nicht jedoch durch ein Mitglied des C-X-C-Zweigs der Chemokine, IL-8.

[0067] Die **Fig.** 12, **Fig.** 13 und **Fig.** 14 stellen das Potential zum Blockieren der Antwort auf Meerschweinchen-Eotaxin dar. Dies macht sich die Tatsache zunutze, dass humanes RANTES die Meerschweinchen-Eosinophilen nicht aktiviert, während es mit Eotaxin um die Bindungsstellen konkurriert.

[0068] **Fig.** 12: Erhöhung der intrazellulären Calciumgehalte in humanen Eosinophilen in vitro, induziert durch Eotaxin, RANTES und lediglich durch hohe Konzentrationen an MCP-1.

[0069] **Fig.** 13: Erhöhung der intrazellulären Calciumgehalte in Meerschweinchen-Eosinophilen in vitro induziert durch Eotaxin, nicht jedoch durch humane RANTES und MCP-1.

[0070] **Fig.** 14: Repräsentative Spuren, die die Hemmung der durch Meerschweinchen-Eotaxin induzierten Erhöhung der intrazellulären Calciumgehalte in Meerschweinchen-Eosinophilen in vitro durch die vorherige Exponierung der gleichen Zellen zu humanen RANTES aufzeigen. Einfügung:

[0071] **Fig.** 15: Werte (Mittel ± Standardabweichung) für 4 separate Eosinophilpräparate.

[0072] **Fig.** 16: Dosis-Wirkungs-Kurve, die die Hemmung der durch Meerschweinchen-Eotaxin induzierten Erhöhung der intrazellulären Calciumgehalte in Meerschweinchen-Eosinophilen in vitro durch die vorherige Exponierung der gleichen Zellen gegenüber humanen RANTES aufzeigt.

[0073] **Fig.** 17: Histogramm, dass den Vergleich der in-vivo-Antwort von Meerschweinchen-Eosinophilen gegenüber Eotaxin, RANTES und RANTES plus Eotaxin, welche intradermal coinjiziert wurden, darstellt.

[0074] **Fig.** 18: Histogram, dass die Zahl der Eosinophilen und Neutrophilen in dem bronchoalveolärem Spülfluid (BAL) nach der Verabreichung von Meerschweinchen-Eotaxin als ein Aerosol über die Meerschweinchenatemwege darstellt.

[0075] Wie bei Patienten mit allergischem Asthma führt die Exponierung von empfindlich gemachten Meerschweinchen zu in Aerosolform überführtem Antigen zu einer unmittelbaren Phase der Bronchokonstriktion mit damit verbundenem Ausstoß von Granulat durch die Mastzellen, bei manchen Individuen gefolgt von einer späten Phase der Bronchokonstriktion und Atemwegs-Hyperreaktivität (4–7). Obwohl selbstverständlich kein Modell alle Merkmale der menschlichen Erkrankung Nachahmen kann, teilt das Meerschweinchenmodell mit der asthmatischen Reaktion in einem Menschen alle üblichen Merkmale, und es wurde umfassend verwendet, um die möglichen Mechanismen zu untersuchen (7). Insbesondere löst sowohl beim Meerschweinchen als auch beim Menschen die unmittelbare Antwort auf ein Allergen die nachfolgende Akkumulation von einer hohen Anzahl von Eosinophilen in der Lunge aus. Es wurden Versuche entworfen, um das Auftreten von chemoattraktiven Mitteln in der Lunge zu erfassen, die für die Akkumulation von Eosinophilen verantwortlich sein können. Es wurde eine Strategie eingesetzt, die zuvor für die Identifizierung von Neutrophil-chemoattraktiven Mitteln in inflammatorischen Exsudaten angewendet wurden (8–10).

[0076] Meerschweinchen wurden mit intraperitonealem Ovalbumin am Tag 1 empfindlich gemacht, gefolgt von einer kurzen Exponierung ihrer Lungen zu in Aerosolform überführtem Ovalbumin am Tag 8. Am Tag 15–21 wurden die Tiere mit in Aerosolform überführtem Ovalbumin herausgefordert und unter Verwendung einer Barbiturat-Überdosis zu verschiedenen Intervallen getötet. Unmittelbar nach ihrem Tod wurden die Atemwege mit Salzlösung gespült. Das bronchoalveoläre Spülfluid (BAL) wurde zentrifugiert, um die Zellen zu entfernen, und die Überstände wurden entweder bei –20°C für das Assay gelagert oder einer Aufreinigung unterworfen. Die Eosinophil-chemoattraktive Aktivität in den BAL-Fluid-Proben oder HPLC-Fraktionen wurde untersucht, in dem man diese intradermal in Test-Meerschweinchen injizierte, denen zuvor intravenöse Injektionen von ^{111}In-Eosinophilen verabreicht wurden (11, 12). Nach einem Intervall von 2 oder 4 Stunden wurden die Versuchstiere getötet und die herausgestochenen Hautstellen wurden in einem Gamma-Zähler ausgezählt (**Fig.** 1).

[0077] **Fig.** 2 zeigt den Zeitverlauf des Auftretens von Eosinophil-chemoattraktiver Aktivität in dem BAL-Fluid. Eine signifikante Aktivität wurde 30 Minuten nach der Herausforderung mit Antigen beobachtet. Die Aktivität erhöhte sich bis zu 3 Stunden, verblieb bei 6 Stunden hoch, war jedoch in 24 Stunden-Proben nicht signifikant. Die Kontrollproben (BAL-Fluid aus shamempfindlichgemachten/herausgeforderten oder empfindlichgemachten/sham-herausgeforderten Meerschweinchen) die bei 3 Stunden genommen wurden, wiesen keine signifikante Aktivität auf.

[0078] Die Eosinophil-chemoattraktive Aktivität, die wir als Eotaxin bezeichneten, wurde aus dem BAL-Fluid bei 3 Stunden aufgereinigt durch aufeinanderfolgenden Kationenaustausch, Größenausschluss und HPLC an

reverser Phase, wobei das in-vivo-^{111}In-Eosinophilakkumulationsassay verwendet wurde, um die Aktivität der Fraktionen durchgängig zu messen. Eotaxin eluierte als eine einzelne diskrete Bande mit Bioaktivität sowohl bei den Stufen des Kationenaustauschs als auch beim Größenausschluss, was auf ein stark kationisches Protein mit 7–14 kDa hindeutete. Die Chromatographie an reverser Phase trennte die Eosinophil-chemoattraktive Aktivität in zwei Banden (Fraktionen 51 + 52 und Fraktion 54), welche mit diskreten Banden an Proteinabsorption einhergingen (**Fig.** 3 und **Fig.** 4). Die Selektivität für Eosinophile wurde auch gezeigt durch das Fehlen signifikanter Neutrophil-chemoattraktiver Aktivität in diesen Fraktionen, wie es gemessen wurde anhand der Akkumulation von ^{111}In-Neutrophilen im Hautassay (**Fig.** 5). Die histologische Untersuchung der Haut, in die Eotaxin (2 pmol) injiziert wurde, zeigte eine Eosinophilakkumulation bei 4 und 24 Stunden, insbesondere um die kleinen Blutgefäße herum (Hämatoxylin- und Eosinfärbungen).

[0079] Die Analyse mit SDS-PAGE ergab eine einzelne Proteinbande in jeder der Fraktionen 51, 52 und 54 (**Fig.** 6). Das Protein in den Fraktionen 51 und 52 war geringfügig größer als das in Fraktion 54. Dies wurde bestätigt durch die Analyse der Masse, bei der die Hauptsignale jeweils bei ungefähr 8,81 und 8,38 kDa lagen (siehe Beispiel 3). Die N-terminale Sequenzierung der Fraktionen 51, 52 und 54 ergab identische Aminosäuresequenzen (siehe **Fig.** 7). Die Sequenz des Eotaxins, wie sie in SEQ. ID. NR. 1 und **Fig.** 7 angegeben ist, von N-Terminal bis zum Rest 37 zeigt 57% Homologie mit dem humanen Monozyten-chemotaktischen Protein (MCP-1 (13), dass ansonsten als MCAF (14) und JE (15) bekannt ist). Auch die tryptischen Peptide der Fraktion 54 wurden sequenziert und einfach ausgerichtet durch Vergleich mit humanem MCP-1, was die nahezu vollständige Sequenz des Eotaxins ergab mit einer Gesamthomologie von 53%, siehe **Fig.** 7. Es ist wahrscheinlich, dass die Abweichungen im Molekulargewicht unterschiedliche Glycosylierungen Wiederspiegeln, da die 4 erhaltenen Massensignale (2 große und 2 kleine, siehe Beispiel 3) sich untereinander jeweils durch Vielfache von ungefähr 220 Masseneinheiten unterscheiden. Die Sequenz enthält keine N-Glycosylierungsstellen, allerdings wurde in Position 70 eine potentielle Stelle für die O-Glycosylierung identifiziert (siehe Beispiel 3). Auch humanes MCP-1 zeigt aufgrund von Unterschieden in der O-verknüpften Kohlenwasserstoffmodifikation bei SDS-PAGE Heterogenität (16).

[0080] Die Plättchenfaktor-4-Superfamilie der chemotaktischen Cytokine oder der Chemokine ist gekennzeichnet durch 4 konservierte Cysteine. Die relative Position der 2 N-terminalen Cysteine erlaubt die Unterteilung dieser Superfamilie in C-X-C-Chemokine (z. B. IL-8 (17)) welche vorwiegend Neutrophil-chemoattraktive Mittel sind, und die C-C-Chemokine (z. B. MCP-1, RANTES, MIP-1α und MIP-1β (18)), welche für Leukozyten, die von Neutrophilen verschieden sind, chemotaktisch sind. Eotaxin ist ein Mitglied des C-C-Zweigs der Chemokine. Die größte Homologie (53%) besteht mit humanem MCP-1, welches in den wenigen bisher vorhandenen in-vitro-Studien als inaktiv für humane Eosinophile beschrieben wurde (19, 20), und mit den kürzlich beschriebenen humanen MCP-2 (54%) und MCP-3 (51% Homologie berechnet auf der Grundlage der SEQ. ID. NR. 1 (**Fig.** 7); 54% Homologie, wenn auf der Grundlage der überlappenden Sequenzen berechnet wird) (21). Die Homologie mit anderen humanen C-C-Chemokinen (**Fig.** 9) beträgt: MIP-1β (37%, berechnet auf der Grundlage der SEQ. ID. NR. 1 (**Fig.** 7); 39%, wenn sie auf der Grundlage der überlappenden Sequenzen berechnet wird), MIP-1α (31% berechnet auf der Grundlage der SEQ. ID. NR. 1 (**Fig.** 7); 32%, wenn sie auf der Basis der überlappenden Sequenzen berechnet wird) und RANTES (26%, berechnet auf der Grundlage der SEQ. ID. NR. 1 (**Fig.** 7); 27%, wenn sie auf der Grundlage der überlappenden Sequenzen berechnet wird). Für die beiden letzten Proteine konnte kürzlich gezeigt werden, dass sie potente Eosinophil-Aktivatoren in vitro sind (20, 22), wohingegen MIP-1β Lymphozyten in vitro aktiviert (23), anscheinbar jedoch nicht Eosinophile (20). Eotaxin weist die größte strukturelle Homologie mit humanem MCP-1, MCP-2 und MCP-3 auf. Eotaxin hat funktionelle Ähnlichkeiten, jedoch relativ geringe Homologie, wenn es mit dem RANTES und MIP-1α verglichen wird. Eotaxin ist eindeutig ein vom Meerschweinchen-MCP-1 verschiedenes Molekül. Letzteres wurde kürzlich kloniert (24), und es weist mit der Eotaxinsequenz lediglich eine Homologie von 43% auf, siehe **Fig.** 9. Für das Meerschweinchen-MCP1 wurde gezeigt, dass es für Monocyten chemotaktisch ist, es wurde jedoch nicht auf Eosinophile untersucht (24). Interessanterweise weist Eotaxin eine Homologie von 41% mit einem C-C-Protein auf, dessen Gen in Mastzellen von Mäusen exprimiert wird und 2 Stunden nach der Wechselwirkung zwischen IgE und dem Antigen hochreguliert wird (25). Für dieses Protein wurde keine funktionelle Aktivität berichtet, es ist jedoch von dem Maus-MCP-1/JE verschieden (51% Homologie) (25). Das Meerschweinchen-Eotaxin war sehr potent bei der Induzierung von Eosinophilakkumulation in vivo: 1–2 pmol/Hautstelle lieferten eine Antwort von 730 ± 140% (Mittel ± Standardabweichung, n = 18 Tiere) im Vergleich zu Stellen, an denen Salzlösung injiziert wurde. Des Weiteren wurde eine deutliche Eosinophilakkumulation innerhalb von 30 min. nach der intradermalen Injektion beobachtet (**Fig.** 10). Dies wird durch in-vitro-Versuche gestützt. Die Wirkung von Eotaxin auf Eosinophile in vitro wurde gezeigt durch (i) Hemmung der Bindung von ^{125}I-RANTES an Meerschweinchenzellen (**Fig.** 11), (ii) die Erhöhung von cytoplasmatischem Calcium in humanen und Meerschweinchen-Zellen (**Fig.** 12 und **Fig.** 13) und (iii) die Chemotaxis von humanen Eosinophilen in einem Kammersystem nach Boyden: Die chemotaktischen Antworten auf Eotaxin und RANTES waren von ähnlicher Stärke über den

Bereich von 0,1–3,0 nM. Im Gegensatz zu Eotaxin induzierten humanes rekombinantes MCP-1 und RANTES nicht die Meerschweinchen-Eosinophil-Antworten in vivo oder in vitro (**Fig.** 10 und **Fig.** 13). Dies mag einen Artunterschied Wiederspiegeln, obwohl RANTES an Meerschweinchen-Eosinophileband, ohne die Aktivierung zu induzieren (**Fig.** 11, Einfügung in **Fig.** 10). Eotaxin weist gegenüber RANTES eine vergleichbare Wirksamkeit auf humane Eosinophile auf, wohingegen MCP-1 entweder inaktiv ist (20) oder lediglich bei hohen Dosierungen aktiv (**Fig.** 12) demzufolge hat Eotaxin eine starke unmittelbare Wirkung auf sowohl humane als auch auf Meerschweinchen-Eosinophile.

[0081] Die Antworten von Meerschweinchen-Eosinophilen auf Meerschweinchen-Eotaxin in vitro und in vivo kann durch humane RANTES inhibiert werden. Die **Fig.** 14, **Fig.** 15 und **Fig.** 16 zeigen die Antwort von mit FURA-2 beladenen Meerschweinchen-Eosinophilen auf Meerschweinchen-Eotaxin vor und nach der Zugabe von humanen RANTES. Die Eotaxin-induzierte Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration wird um einen wesentlichen Grad verringert, wenn die Zellen zunächst humanen RANTES ausgesetzt werden, welches selbst nicht dazu in der Lage ist, eine Antwort zu induzieren. **Fig.** 17 zeigt, dass humane RANTES die Akkumulation von Meerschweinchen-Eosinophilen, die durch Eotaxin in der Meerschweinchenhaut in vivo induziert werden, reduziert, wenn es mit Eotaxin-injiziert wird. Die Ergebnisse stützen unsere Beobachtungen, dass Eotaxin eine kompetitive Bindung mit radioaktiv markierten humanen RANTES auf Meerschweinchen-Eosinophilen aufzeigt, und das Eotaxin ein potentes funktioneller Stimulus ist, wohingegen RANTES dies nicht ist. Dementsprechend scheint RANTES als ein Rezeptor-Antagonist für Eotaxin auf Meerschweinchen-Eosinophilen zu wirken.

[0082] Fig. 18 zeigt, dass sich Eosinophile in den Meerschweinchenatemwegen in vivo innerhalb von 24 Stunden nach der Verabreichung von in Aerosolform überführtem Meerschweinchen-Eotaxin akkumulieren, wohingegen im Wesentlichen keine Akkumulation von Neutrophilen beobachtet wird. Die folgenden Beispiele stellen die vorliegende Erfindung beispielhaft dar.

BEISPIEL 1

Herstellung und Untersuchung von bronchoalveolärem Spülfluid

[0083] VERFAHREN: Menschliche Dunkin-Hartley-Meerschweinchen (300 bis 400 g) wurden mit intraperitonealem Ovalbumin (OA, 1 mg) am Tag 1 empfindlich gemacht, gefolgt von der Exponierung gegenüber in Aerosolform überführtem Antigen (2% OA für 5 min. unter Verwendung eines Ultraschallverneblers) am Tag 8 (6). An den Tagen 15–21 wurden die Tiere mit einem Antihistaminikum vorbehandelt, um akute Todesfälle zu vermeiden (Pyrilamin, 10 mg × kg^{-1}, i. p.) und durch Exponierung gegenüber in Aerosolform überführtem Antigen herausgefordert (1% OA für 20 min.). Zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Antigenherausforderung wurden die Tiere mit Atropin (0,06 mg × kg^{-1}, i. p.) behandelt, um Bronchokonstriktion zu verhindern und wurden mit einer Barbiturat-Überdosis getötet. Es wurde eine bronchoalveoläre Spülung mit 4 ml Salzlösung durchgeführt. Die Proben wurden zentrifugiert, um Zellen zu entfernen, und der Überstand wurde bei –20°C vor dem Assay gelagert. Die BAL-Proben wurden getestet durch intradermale Injektion (0,1 ml) in Meerschweinchen, denen zuvor intravenöse Injektionen gegeben wurden von 5 × 10^6 ^{111}In-Eosinophilen (hervorgerufen in Donortieren durch wiederholte intraperitonealen Injektionen von Pferdeserum und aufgereinigt über diskontinuierliche Percoll-Gradienten, > 94 Reinheit) (11, 12). Nach 4 Stunden wurden die Versuchstiere getötet und die Hautstellen wurden für die Gammazählung ausgestanzt. Die Daten werden präsentiert als das Mittel ± Standardabweichung und wurden mit der Einweg-Varianz-Analyse getestet. Ein p-Wert < 0,05 wurde als statistisch signifikant betrachtet.

[0084] ERGEBNISSE: **Fig.** 1 zeigt schematisch Verfahren für die Erzeugung und Messung von Eosinophil-chemoattraktiver Aktivität in vivo. **Fig.** 2 zeigt den Zeitverlauf der Erzeugung von Eosinophil-chemoattraktiver Aktivität in Lungen von empfindlichgemachten Meerschweinchen nach Antigen-Herforderung dar (ausgefüllte Quadrate, n = 4–10). Die Aktivität wurde gemessen in einem in-vivo-Hautassay der ^{111}In-Eosinophilakkumulation in nicht empfindlich gemachten Meerschweinchen (3 Versuchstiere pro BAL-Probe). In den bronchoalveolären Spülproben, die 0,5, 1,5, 3 und 6 Stunden nach der Antigen-Herausforderung genommen wurden, wurde signifikante Aktivität beobachtet (im Vergleich zu den Antworten auf intradermale Salzlösung, dargestellt als gepunktete Linie). Keine signifikante Aktivität wurde in den 24 h-Proben beobachtet. Keine Aktivität wurde in den Spülproben beobachtet, die 3 h nach sham-(Salzlösung)Herausforderung von empfindlich gemachten Tieren erhalten wurden (ausgefüllte Kreise, n = 5) oder nach Antigen-Herausforderungen mit sham (Salzlösung) empfindlich gemachten Tieren (ausgefüllte Rauten, n = 5).

BEISPIEL 2

Aufreinigung von Eotaxin aus bronchoalveolären Spülfluids

[0085] VERFAHREN: bronchoalveoläres Spülfluid (BAL), das aus 25 empfindlich gemachten Meerschweinchen (jedes wurde mit 4 ml Salzlösung gespült, gefolgt von 2 × 10 ml Salzlösung) 3 Stunden nach Herausforderung mit Antigen (1% OA, 5 min. Exposition) gesammelt wurde, wurde auf einer Kationenaustausch-HPLC-Säule (Ultropac TSK535CM, 7,5 × 150 mm) aufgebracht. Die Aktivität wurde bei ungefähr 1,4 M Ammoniumacetat, pH 5,5, eluiert und für die Größenausschluss-HPLC (Ulropac-TSK-Säulen SWP, 7,5 × 75 mm, G4000 SW, 7,5 × 600 mm und G2000SW, 7,5 × 600 mm in Reihe und mit 0,08% TFA equilibriert) lyophilisiert. Die Aktivität eluierte bei ungefähr 7–14 kDa. Diese wurde auf eine großporige (300 A) Vydac-C18-reverse-Phase-HPLC-Säule (4 × 250 mm) in 0,08% TFA aufgebracht, mit einem linearen Gradienten an Acetonitril (0–80% ACN in 0,08% TFA, über 80 min., bei 1 ml × min^{-1}) eluiert, und es wurden Fraktionen von 0,5 min. gesammelt. Die Aliquots (4%) von jeder Fraktion wurden in Anwesenheit von Trägerprotein (BSA, < 0,1 ng Endotoxin × mg^{-1}) lyophilisiert und in 0,8 ml Salzlösung wiedergelöst für die Testung in den Hautbioassays auf die ^{111}In-Eosinophil- und ^{111}In-Neutrophilakkumulation über 2 Stunden (n = 4). Die Eosinophilen (99%, 0,5% Neutrophile) wurden mit wiederholten intraperitonealen Injektionen von Pferdeserum hervorgerufen (11, 12), und die Neutrophilen (99,4%, 0,6% Eosinophile) wurden mit einer einzelnen intraperitonealen Injektion von Casein (5% m/V, 15 ml) 17 Stunden vor der Aufreinigung über diskontinuierliche Percoll-Gradienten und Markierung mit ^{111}In hervorgerufen.

[0086] ERGEBNISSE: Die Ergebnisse sind in den **Fig.** 3, **Fig.** 4 und **Fig.** 5 wiedergegeben. **Fig.** 3 zeigt das finale HPLC-Profil an reverser Phase, welches die Absorption bei 214 nm zeigt, sowie den Acetonitrilgradienten. **Fig.** 4 zeigt, dass die Eosinophil-chemoattraktive Aktivität in 2 Banden zu beobachten war, die mit den Fraktionen 51 + 52 und der Fraktion 54 korrespondieren, welche mit diskreten Absorbtionsbanden korrespondieren. **Fig.** 5 zeigt, dass in diesen Fraktionen keine signifikante Neutrophil-chemoattraktive Aktivität ermittelt wurde. Im Gegensatz dazu induzierte Meerschweinchen-C5a des Arg (30% Zymosan-aktiviertes Plasma (11), ungefähr 10 pmol/Stelle) die Akkumulation von sowohl ^{111}In-Eosinophilen (5211 ± 893) als auch von Neutrophilen (9872 ± 473). Die Fraktionen 50, 53, 55 und 56 ergaben durchgängig wenig oder keine Aktivität in den Meerschweinchenhaut-Bioassays für die Leukozyten-Akkumulation. In dem Rückstand des Gradienten (bis zu 80% Acetonitril) wurde keine signifikante Proteinabsorption detektiert.

BEISPIEL 3

Reinheit, Analyse der Masse und Proteinsequenz von Eotaxin

[0087] VERFAHREN: Aliquots von 2% jeder Fraktion wurden lyophilisiert, in 10 µl SDS-Puffer wiedergelöst, erwärmt (95°C, 5 min.) und 0,3 µl davon ließ man auf 8–25%-Gradientengelen in einem Pharmacia-Phast-System laufen. Die Gele wurden durch Silberfärbung optisch entwickelt. Mit den Fraktionen 51, 52 und 54 wurde unter Verwendung eines Finnigan MAT Lasermat eine Massenanalyse mit α-Cyano-4-Hydroxyzimtsäure- und Sinapinsäurematrices durchgeführt. Die Massenmessungen wurden intern unter Verwendung von Proteinstandards kalibriert. 5%-Aliquots jeder bioaktiven Fraktion (51, 52 und 54) wurden unmittelbar einer automatisierten N-terminalen Sequenzanalyse unter Verwendung von schnellen Zyklen auf einem Applied Biosystems 477A unterworfen, welches eine im wesentlichen bereits beschriebene Mikropatrone enthält (32). Die aminoterminalen Reste 37, 35 und 29 wurden jeweils für die Fraktionen 51, 52 und 54 erhalten. Es wurden keine Unterschiede zwischen den entsprechenden Positionen gefunden. Die offensichtlichen Anfangsgehalte dieser 3 Analysen betrugen alle ungefähr 7–8 pmol. Demzufolge enthielten die Fraktionen 51, 52 und 54 jeweils ungefähr 200 pmol, wenn man 70–80% Sequenzausbeuten unterstellt. In den Positionen 8, 9 und 33 wurden Lücken gefunden, die mit dem Vorliegen von Cysteinresten an diesen Positionen übereinstimmten. Ungefähr 30 pmol der Fraktion 54 wurden reduziert und durch aufeinanderfolgende Behandlung mit 1 mM wie Dithiothreitol für 5 min. bei 50°C und dann 10 mM Acrylamid für 30 min. bei 37°C alkyliert, vor dem Verdau mit alkyliertem Trypsin (Promega) in 20 mM Tris/HCl, pH 8,8, enthaltend 0,5% Thesit. Die Peptide wurden getrennt unter Verwendung einer Reliasil-C18-Säule (300 A, 5 µm), (1 × 150 mm) mit einem linearen Acetonitrilkonzentrationsgradienten in 0,08% Trifluoressigsäure bei 50 µl/min auf einem Microm-HPLC-System entwickelt. Die aufgereinigten Peptide wurden einer N-terminalen Sequenzanalyse wie oben unterworfen, wobei jedoch alle 4 Cysteinreste positiv als das PTH-cys-S-β-Propionamidderivat identifiziert wurden (33). Die Position 70 ergab kein PTH-Derivat bei den Peptiden T6 und T7 und ist eine mögliche Position für eine O-Glykosylierung.

[0088] ERGEBNISSE: Die Ergebnisse sind in den **Fig.** 6, **Fig.** 7, **Fig.** 8 und **Fig.** 9 wiedergegeben. **Fig.** 6 ist eine Fotografie des SDS-PAGE-Gels. Zum Vergleich wurde in den Bahnen A, B und C (12, 2,4 und 0,5 ng/0,

3 µl/Bahn jeweils) humanes IL-8 (72 Aminosäuren, ungefähr 8 kDa) laufengelassen. Die Laser-Desorptions-Flugzeit-Massenanalyse ergab Signale bei 8,81 kDa (Haupt) und 9,03 kDa (Neben) für jede der Fraktionen 51 und 52. Die Fraktion 54 ergab Signale bei 8,38 kDa (Haupt) und 8,15 kDa (Neben).

[0089] Die **Fig.** 7 und die SEQ. ID. Nr. 1 zeigen die Aminosäuresequenz von Eotaxin, welche bestimmt wurde durch das Sequenzieren des intakten Moleküls sowie von Peptiden, die aus dem Verdau mit Trypsin (T) abgeleitet wurden. Die N-terminalen Analysen zeigten die größte Homologie mit humanem MCP-1 (57%), und die tryptischen Peptide wurden leicht angeordnet durch Vergleich mit der humanen MCP-1-Sequenz. **Fig.** 8 zeigt die Aminosäuresequenzen wie sie durch Nukleinsäuresequenzierung bestätigt wurde. **Fig.** 9 ist ein Vergleich der Eotaxin-Sequenz mit humanem MCP-1, MCP-2, MCP-3 (21), mit Meerschweinchen-MCP-1 (24), humanem MIP-1α, MIP-1β und RANTES (18), welche konservierte Reste aufzeigen (schattiert).

BEISPIEL 4

Untersuchung von Eotaxin in vitro und in vivo

VERFAHREN:

(i) Eotaxin war ein Pool von beiden Bioaktivitätsbanden (Fraktionen 51 + 52 und Fraktion 54) aus der finalen HPLC-Trennung an reverser Phase, die in Beispiel 2 beschrieben wurde (siehe **Fig.** 3, **Fig.** 4 und **Fig.** 5). Die ^{111}In-Eosinophilakkumulation in Meerschweinchenhaut wurde über vier Stunden wie in Beispiel 1 gemessen (siehe **Fig.** 1 und **Fig.** 2). In den gleichen Tieren (n = 4) wurde an zusätzlichen Stellen Eotaxin 30 Minuten vor dem Abtöten injiziert.
(ii) Für die Untersuchungen der Bindung wurden 4 × 10^5 Eosinophile mit 0,1 nM ^{125}I-RANTES und mit verschiedenen Konzentrationen an kaltem Liganden (50 µl bei 0°C für zwei Stunden) inkubiert. Die Hanks-gepufferte Salzlösung enthielt 30 mM HEPES, 10 mM EDTA, 0,1% Natriumazid und 1% BSA bei pH 7,5. Die Ergebnisse sind das Mittel von zwei Assays, von denen jedes in drei Parallelen durchgeführt wurde.
(iii) Für die Messung der intrazellulären Kalziumgehalte wurden humane und Meerschweinchen-Eosinophile (10 Zellen/ml in Ca^{2+}/Mg^{2+}-freiem PBS + 0,1% BSA) mit Fura-2-Acetoxymethylester beladen (2,5 µM, 30 Minuten bei 37°C). Nach zwei Waschgängen wurden die Zellen resuspendiert mit 10^6 Zellen/ml in Ca^{2+}/Mg^{2+}-freiem PBS, welches 10 mM HEPES, 0,25% BSA und 10 mM Glukose (pH 7,4) enthielt. Es wurden Aliquots in Quarzcuvetten verteilt und externes [Ca^{2+}] wurde mit $CaCl_2$ auf 1 mM eingestellt. Die Veränderungen der Fluoreszenz wurden bei 37°C unter Verwendung eines Spektrophotometers vom Typ Perkin Elmer LS50 bei den Anregungswellenlängen 340 nm und 380 nm und der Emissionswellenlänge 510 nm beobachtet. Die $[Ca^{2+}]_i$-Gehalte wurden, wie zuvor beschrieben (34), unter Verwendung des Verhältnisses der zwei Fluoreszenzwerte und eines Kd für die Ca^{2+}-Bindung bei 37°C bei 224 nM berechnet. Periphere humane Eosinophile wurden, wie zuvor beschrieben (35), durch Dichte-Zentrifugation auf Percoll, gefolgt von immunomagnetischer Entfernung von $CD16^+$-Neutrophilen unter Verwendung des MACS-Systems hergestellt. Meerschweinchen-Eosinophile wurden wie in Beispiel 1 beschrieben hergestellt (11, 12).
(iv) Um die Supression der Eosinophilakkumulation in vivo unter Verwendung von humanem RANTES zu untersuchen, wurde die Akkumulation von ^{111}-markierten Meerschweinchen-Eosinophilen in Hautstellen wie oben beschrieben gemessen. Den Meerschweinchen wurde injiziert 1,8 pmol Eotaxin (n = 2), 100 pmol RANTES (n = 1) oder sowohl 1,8 pmol Eotaxin als auch 100 pmol RANTES (n = 2). Als Kontrolle wurde intradermale Salzlösung verwendet.
(v) Für die Testung der Rezeptor-Antagonist-Aktivität wurden mit Fura-2-Acetoxymethylester beladene Meerschweinchen-Eosinophile mit 3 nM Eotaxin mit oder ohne Vorbehandlung mit humanem RANTES stimuliert.
(vi) Um die Wirkung der Aerosolexposition von Meerschweinchen gegenüber Eotaxin zu untersuchen, wurden unbehandelte Meerschweinchen einem Aerosol von entweder Eotaxin oder einem Kontrollmedium ausgesetzt (n = 8 pro Gruppe). Die Exposition wurde durchgeführt, indem man zwei Tiere in einer einzelnen Kammer unterbrachte und 24 pmol Eotaxin, welches in 10 ml PBS gelöst war, das BSA-Trägerprotein mit 80 µg/ml enthielt, über einen Zeitraum von 35–40 Minuten vernebelte. Die Kontrolltiere erhielten in Aerosolform überführtes PBS/BSA auf die gleiche Weise. Die Tiere wurden 20 Stunden nach der Exposition gegenüber Eotaxin oder Kontrollmedium getötet. Es wurde BAL-Fluid (5 × 10 ml HBSS, 10 mM EDTA, pH 7,35) gewonnen und zentrifugiert (300 g, 20 min., 4°C). Es wurde die Gesamt-BAL-Zellzahl durch ein Hämozytometer bestimmt und durch differentielle Zellzählungen, die auf gefärbten (DiffQuick) Cytospin-Präparaten (3 pro Tier, Zellzahl 400 pro Träger) ausgeführt werden.
ERGEBNISSE: Die Ergebnisse sind in den **Fig.** 10, **Fig.** 11, **Fig.** 12, **Fig.** 13, **Fig.** 14, **Fig.** 15, **Fig.** 16, **Fig.** 17 und **Fig.** 18 wiedergegeben.

[0090] **Fig.** 10 zeigt, daß das Meerschweinchen-Eotaxin (1,6 pmol) signifikant die ^{111}In-Eosinophilakkumulation in vivo 30 Minuten (nicht ausgefüllte Quadrate, $p < 0,01$) und vier Stunden (ausgefüllte Quadrate, $p < 0,01$) nach der intradermalen Injektion induziert. Im Gegensatz dazu waren die rekombinanten humanen Proteine RANTES, MIP-1α und MCP-1 bei Dosen von bis zu 100 pmol über vier Stunden ohne Wirkung. Die eingefügte **Fig.** 11 zeigt, dass Eotaxin und RANTES, nicht jedoch das C-X-C-Chemokin IL-8, die Bindung von ^{125}I-RANTES (B_0 = 14,4%) an Meerschweinchen-Eosinophile in vitro hemmen. **Fig.** 17 zeigt (a), dass humanes RANTES die Eosinophilakkumulation nicht signifikant induziert und (b) dass humanes RANTES bis zu einem wesentlichen Grad die Eosinophilakkumulation, die durch Eotaxin induziert wird, hemmt, was zu der Annahme führt, dass RANTES als ein Rezeptor-Antagonist für Eotaxin in vivo wirkt.

[0091] **Fig.** 12 zeigt, dass Eotaxin, RANTES und, lediglich bei einer hohen Konzentration MCP-1 die Erhöhung von intrazellulären Calciumgehalten in humanen Eosinophilen in vitro induzieren. Es gibt Spuren von Eosinophilen aus einem Donor. Bei zwei anderen Donoren ergaben 2 nM Eotaxin eine mittlere Calciumerhöhung von 61 nM. Bei den drei Donoren (97,3 ± 1,2% Eosinophile) betrugen die Antworten auf 10 nM RANTES 194 ± 74 nM $[Ca^{2+}]_i$ und die Antworten auf 100 nM MCP-1 betrugen 93 ± 38 nM $[Ca^{2+}]_i$. **Fig.** 13 zeigt, dass Meerschweinchen-Eotaxin, nicht jedoch humanes RANTES oder MCP-1, die intrazellulären Kalziumgehalte in Meerschweinchen-Eosinophilen in vitro erhöht. In den Zellen gibt es Spuren von einem Donor. Bei drei Donoren (97,5 ± 0,8% Eosinophile) waren die Antworten: 2 nM Eotaxin, 90 ± 13 nM $[Ca^{2+}]_i$; 100 nM RANTES, 2,0 ± 1,7 nM $[Ca^{2+}]_i$, 100 nM MCP-1, 3,3 ± 0,7 nM $[Ca^{2+}]_i$.

[0092] **Fig.** 14 und die eingefügte **Fig.** 15 zeigen, dass die Vorbehandlung der Meerschweinchen-Eosinophilen mit RANTES (100 nM) die Erhöhung der intrazellulären Gehalte an freiem Calcium, die zu sehen ist, wenn die Eosinophilen mit Eotaxin (3 nM) alleine behandelt werden, hemmt. RANTES scheint als ein Rezeptor-Antagonist in Meerschweinchen-Eosinophilen zu wirken. Die **Fig.** 16 ist eine Dosis-Wirkungs-Kurve unter Verwendung von 3 nM Eotaxin und zunehmenden Mengen an RANTES. **Fig.** 18 zeigt, dass Meerschweinchen-Eotaxin, welches als ein Aerosol verabreicht wurde, die Eosinophilakkumulation in Meerschweinchen-Atemwegen in vivo induziert, wohingegen im wesentlichen keine Akkumulation an Neutrophilen zu beobachten ist.

REFERENZEN

1. de Monchy, J. G. R., Kauffman, H. F., Venge, P., et al. Am. Rev. Respir. Dis. 131, 373–376 (1985).
2. Bousquet, J., Chanez, P., Lacoste, J. Y., et al. N. Engl. J. Med. 323, 1033–1039 (1990).
3. Bradley, B. L., Azzawi, M., Jacobson, M., et al. J. Allergy Clin. Immunol. 88, 661–674 (1991).
4. Dunn, C. J., Elliott, G. A., Oostveen, J. A. & Richards, I. M. Am. Rev. Respir. Dis. 137, 541–547 (1988).
5. Sanjar, S., Aoki, S., Kristersson, A., Smith, D. & Morley, J. Br. J. Pharmacol. 99, 679–686 (1990).
6. Griffiths-Johnson, D. A. & Karol, M. H. Toxicology 65, 283–294 (1991).
7. Campos, M. G. & Church, M. K. Clin. Exp. Allergy 22, 665–666 (1992).
8. Collins, P. D., Jose, P. J. & Williams, T. J. J. Immunol. 146, 677–684 (1991).
9. Beaubien, B. C., Collins, P. D., Jose, P. J., et al. Biochem. J. 271, 797–801 (1990).
10. Jose, P. J., Collins, P. D., Perkins, J. A., et al. Biochem. J. 278, 493–497 (1991).
11. Faccioli, L. H., Nourshargh, S., Moqbel, R., et al. Immunology 73, 222–227 (1991).
12. Weg, V. B., Williams, T. J., Lobb, R. R. & Nourshargh, S. J. Exp. Med. 177, 561–566 (1993).
13. Yoshimura, T., Yuhki, N., Moore, S. K., Appella, E., Lerman, M. I. & Leonard, E. J. FEBS Letts. 244, 487–493 (1989).
14. Furutani, Y., Nomura, H., Notake, M., et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 159, 249–255 (1989).
15. Rollins, B. J., Morrison, E. D. & Stiles, C. D. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 3738–3742 (1988).
16. Jiang, Y., Valente, A. J., Williamson, M. J., Zhang, L. & Graves, D. T. J. Biol. Chem. 265, 18318–18321 (1990).
17. Jiang, Y., Valente, A. J., Williamson, M. J., Zhang, L. & Graves, D. T. J. Biol. Chem. 26518318–18321 (1990).
18. Schall, T. J. Cytokine 3, 165–183 (1991).
19. Leonard, E. J. & Yoshimura, T. Immunology Today 11, 97–101 (1990).
20. Rot, A., Krieger, M., Brunner, T., Bischoff, S. C., Schall, T. J. & Dahinden, C. A. J. Exp. Med. 176, 1489–1495 (1992).
21. Van Damme, J., Proost, P., Lenaerts, J-P. & Opdenakker, G. J. Exp. Med. 176, 59–65 (1992).
22. Kameyoshi, Y., Dorschner, A., Mallet, A. I., Christophers, E. & Schroder, J-M. J. Exp. Med. 176, 587–592 (1992).
23. Tanaka, Y., Adams, D. H., Hubscher, S., Hirano, H., Siebenlist, U. & Shaw, S. Nature 361, 79–82 (1993).
24. Yoshimura, T. J. Immunol. 150, 5025–5032 (1993).

25. Kulmburg, P. A., Huber, N. E., Scheer, B. J., Wrann, M. & Baumruker, T. J. Exp. Med. 176, 1773–1778 (1992).
26. Frigas, E. & Gleich, G. J. J. Allergy Clin. Immunol. 77, 527–537 (1986).
27. Wegner, C. D., Gundel, R. H., Reilly, P., Haynes, N., Letts, L. G. & Rothlein, R. Science 247, 456–459 (1990).
28. Lellouch-Tubiana, A., Lefort, J., Simon, M-T., Pfister, A. & Vargaftig, B. B. Am. Rev. Respir. Dis. 137, 948–954 (1988).
29. Coyle, A. J., Page, C. P., Atkinson, L., Flanagan, R. & Metzger, W. J. Am. Rev. Respir. Dis. 142, 587–593 (1990).
30. Silva, P. M. R., Martins, M. A., Castro-Faria-Neto, H. C., Cordeiro, R. S. B. & Vargaftig, B. B. J. Pharmacol. Exp. Ther. 257, 1039 (1991).
31. Cochran, B. H., Reffel, A. C. & Stiles, C. D. Cell 33, 939–947 (1983).
32. Totty, N. F., Waterfield, M. D. & Hsuan, J. J. Protein-Science 1, 1215–1224 (1992).
33. Brune, D. C. Anal. Biochem. 207, 285–290 (1992).
34. Grynkiewicz, G., Poenie, M. & Tsien, R. Y. J. Biol. Chem. 260, 3440–3450 (1985).
35. Anwar, A. R. F., Moqbel, R., Walsh, G. M., Kay, A. B. & Wardlaw, A. J. J. Exp. Med. 177, 839–843 (1993).
36. ”ELISA and Other Solid Phase Immunoassays, Theoretical and Practical Aspects”, Hrsg. Kemeny D. M. & Challacombe S. J., John Wiley, 1988.
37. Sambrook, J., Fritisch, E. F. und Maniatis T., Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
38. Kohler & Milstein, Nature 256, 495–497 (1975).

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

(A) NAME: National Heart & Lung Institute

(B) STRASSE: Dovehouse Street

(C) ORT: London

(E) LAND: England

(F) POSTLEITZAHL: SW3 6LY

(G) TELEFON: 071 352 8121

(H) TELEFAX: 071 376 3442

(A) NAME: Ludwig Institute for Cancer Research

(B) STRASSE: Hedges House, 153-155 Regent Street

(C) ORT: London

(E) LAND: England

(F) POSTLEITZAHL: W1R 7FD

(G) TELEFON: 071 494 0025

(H) TELEFAX: 071 494 1404

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: CHEMOTAKTISCHES CYTOKIN

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 4

(iv) COMPUTERLESBARE FASSUNG:

(A) DATENTRÄGER: Diskette

(B) COMPUTER: IBM PC kompatibel

(C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS

(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (EPO)

(vi) DATEN DER VORANMELDUNG:

(A) ANMELDENUMMER: GB 9318984

(B) ANMELDETAG: 14. September 1993

(vi) DATEN DER VORANMELDUNG:

(A) ANMELDENUMMER: GB 9408602

(B) ANMELDETAG: 29. April 1994

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 73 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: Protein

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(iv) URSPRÜNGLICHE QUELLE:

(A) ORGANISM: Cavia porcellus

(D) ENTWICKLUNGSSTADIUM: adult

(F) GEWEBETYP: bronchoalveoläres Spülfluid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

His Pro Gly Ile Pro Ser Ala Cys Cys Phe Arg Val Thr Asn Lys Lys
1 5 10 15

Ile Ser Phe Gln Arg Leu Lys Ser Tyr Lys Ile Ile Thr Ser Ser Lys
20 25 30

Cys Pro Gln Thr Ala Ile Val Phe Glu Ile Lys Pro Asp Lys Met Ile
35 40 45

Cys Ala Asp Pro Lys Xaa Xaa Trp Val Gln Asp Ala Lys Lys Tyr Leu
50 55 60

Asp Gln Ile Ser Gln Xaa Thr Lys Pro
65 70

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 73 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: Protein

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(iv) URSPRÜNGLICHE QUELLE:

(A) ORGANISM: Cavia cobaya

(F) GEWEBETYP: bronchiales Spülfluid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

His Pro Gly Ile Pro Ser Ala Cys Cys Phe Arg Val Thr Asn Lys Lys
1 5 10 15

Ile Ser Phe Gln Arg Leu Lys Ser Tyr Lys Ile Ile Thr Ser Ser Lys
20 25 30

Cys Pro Gln Thr Ala Ile Val Phe Glu Ile Lys Pro Asp Lys Met Ile
35 40 45

Cys Ala Asp Pro Lys Lys Lys Trp Val Gln Asp Ala Lys Lys Tyr Leu
50 55 60

Asp Gln Ile Ser Gln Thr Thr Lys Pro
65 70

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 24 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(C) STRANGFORM: einzeln

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: DNA (Primer)

(iii) HYPOTHETISCH: ja

(iii) ANTI-SENSE: nein

(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte_Base: N ist Inosin
(B) ORT: 12
(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte_Base: N ist Inosin
(B) ORT: 15
(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte_Base: N ist Inosin
(B) ORT: 18
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

TGCTGTTTCC GNGTNACNAA CAAA

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:
(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 21 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: einzeln
(D) TOPOLOGIE: linear
(ii) MOLEKÜLART: DNA (Primer)
(iii) HYPOTHETISCH: ja
(iii) ANTI-SENSE: ja
(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte_Base: N ist Inosin
(B) ORT: 10
(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte_Base: N ist Inosin
(B) ORT: 16
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

CATCTTGTCN GGCTTNATTT C

Patentansprüche

1. Isoliertes chemoattraktives Protein, welches in der Lage ist, Eosinophile anzuziehen und eine Eosinophilakkumulation in vitro und in vivo zu induzieren, und welches im wesentlichen keine anziehende Wirkung auf Neutrophile in vivo zeigt, bestehend aus einer oder umfassend eine Aminosäuresequenz, wie sie in SEQ ID NO: 1 dargestellt ist, oder ein Fragment des chemoattraktiven Proteins, welches seine biologische Aktivität beibehält.

2. Chemoattraktives Protein nach Anspruch 1, bestehend aus einer oder umfassend eine Aminosäuresequenz, wie sie in SEQ ID NO: 1 dargestellt ist.

3. Verfahren zur Herstellung eines chemoattraktiven Proteins nach einem der Ansprüche 1 oder 2, welches das Kultivieren in vitro von Makrophagen, Lymphozyten, Mastzellen, Atemwegsepithelzellen oder Bindege-

webszellen und das Isolieren einer Fraktion, die eine chemoattraktive Wirkung auf Eosinophile in vitro und in vivo zeigt und die im wesentlichen keine anziehende Wirkung auf Neutrophile in vivo zeigt, aus den Zellen oder aus der Zellkulturflüssigkeit umfaßt.

4. Antikörper, der spezifisch an das chemoattraktive Protein nach einem der Ansprüche 1 oder 2 bindet.

5. Antikörper nach Anspruch 4, wobei der Antikörper ein monoklonaler Antikörper ist.

6. Antikörper nach einem der Ansprüche 4 oder 5 zur Verwendung als ein Medikament oder bei der Diagnose.

7. Verwendung eines Antikörpers nach einem der Ansprüche 4 oder 5 bei der Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Asthma oder einer anderen entzündlichen Krankheit.

8. Verwendung nach Anspruch 7 zur Behandlung von Rhinitis oder Ekzem.

9. Pharmazeutisches Präparat, welches als aktiven Bestandteil einen Antikörper nach einem der Ansprüche 4 oder 5 im Gemisch oder zusammen mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger umfaßt.

10. Immunoassay für ein Antigen, **dadurch gekennzeichnet,** daß das Antigen ein chemoattraktives Protein nach einem der Ansprüche 1 oder 2 ist.

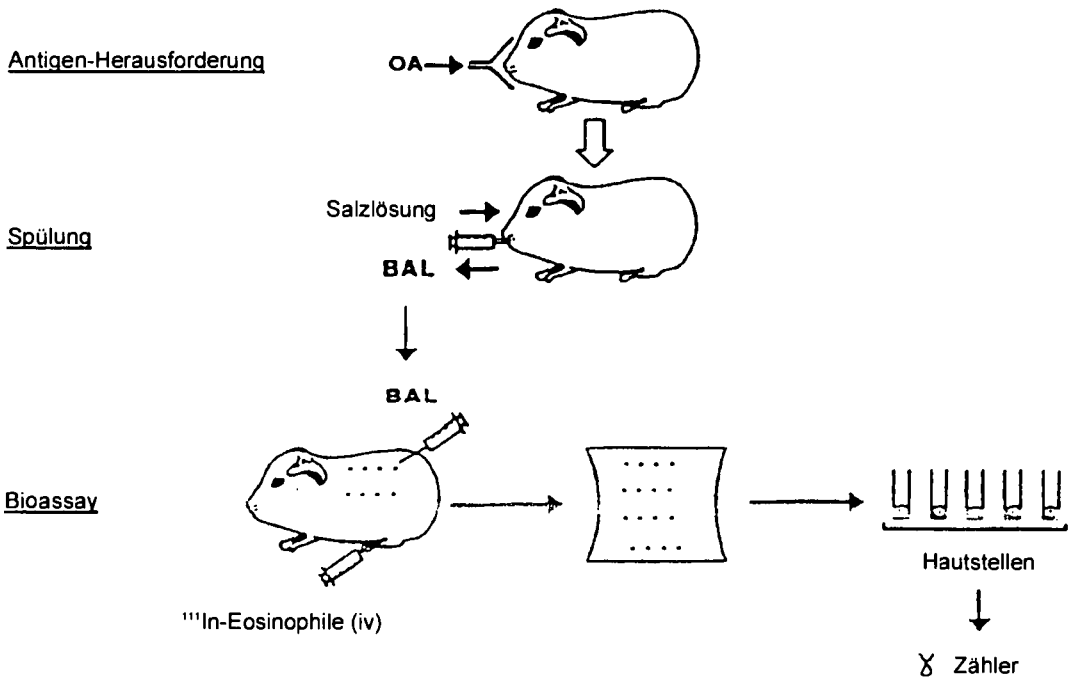
11. Immunoassay für einen Antikörper, **dadurch gekennzeichnet,** daß der Antikörper ein Antikörper ist, der mit einem chemoattraktiven Protein nach einem der Ansprüche 1 oder 2 einen Komplex bildet.

12. Verfahren zum Testen einer Verbindung hinsichtlich einer inhibitorischen Wirkung auf die Aktivität eines chemoattraktiven Zytokins in vitro, **dadurch gekennzeichnet,** daß das chemoattraktive Zytokin ein chemoattraktives Protein nach einem der Ansprüche 1 oder 2 ist.

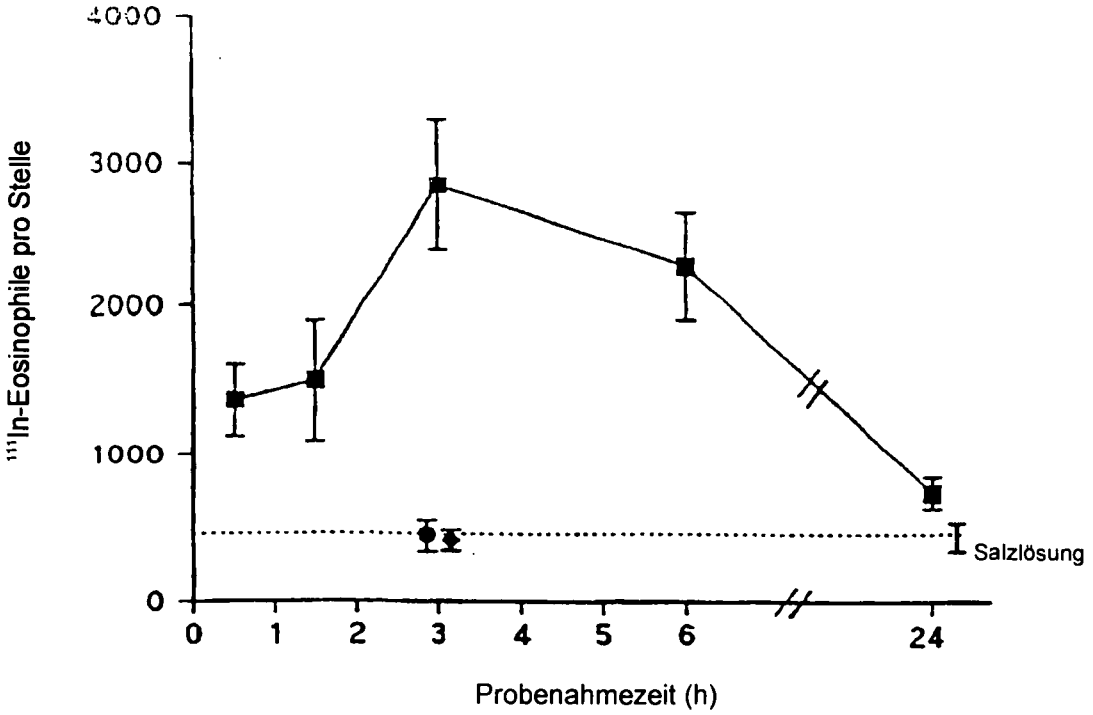
13. Verfahren zur Herstellung eines Antikörpers nach einem der Ansprüche 4 oder 5, welches die Verwendung eines chemoattraktiven Proteins nach einem der Ansprüche 1 oder 2 umfaßt.

Es folgen 7 Seiten Zeichnungen

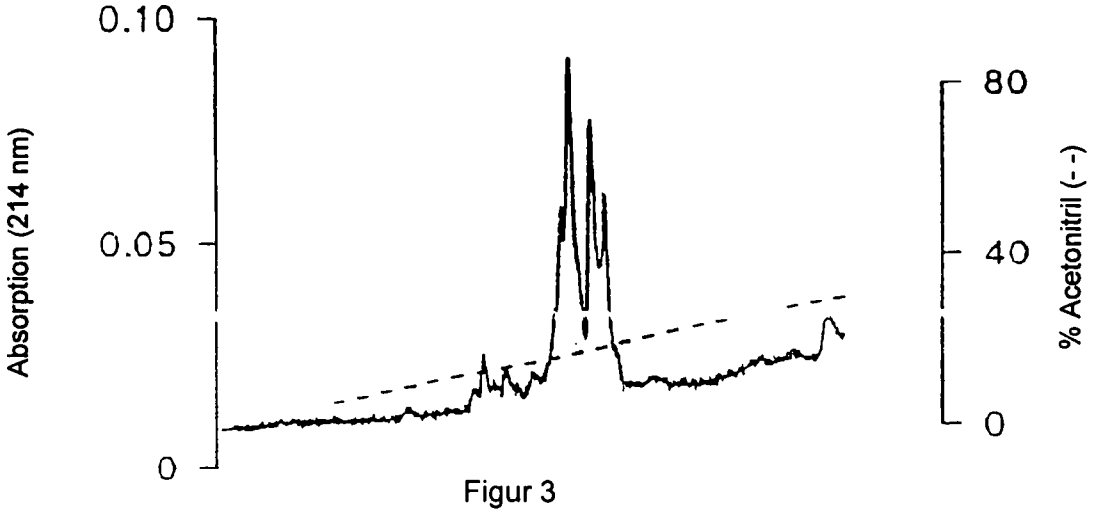
Anhängende Zeichnungen



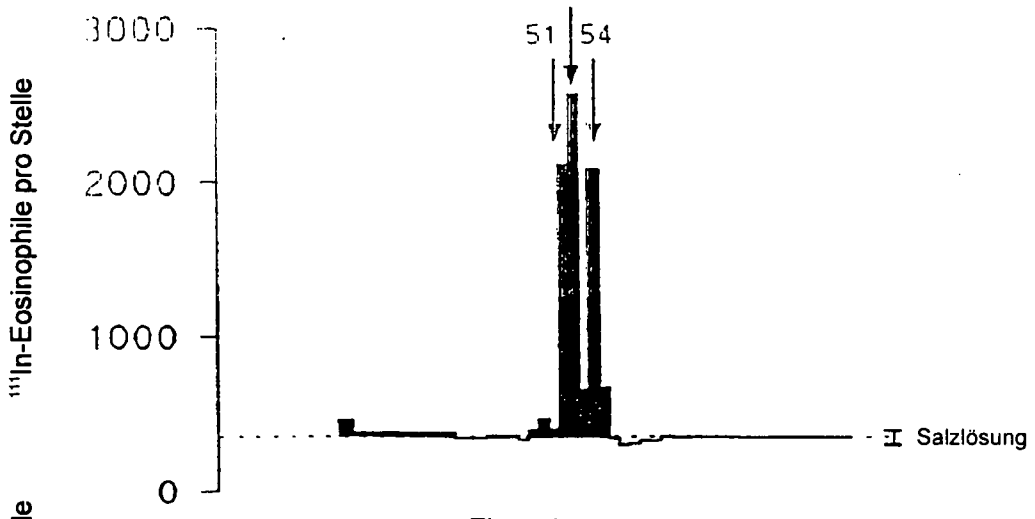
Figur 1



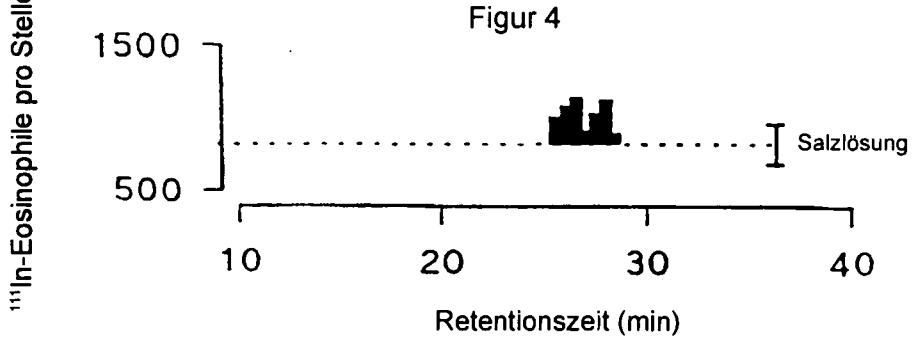
Figur 2



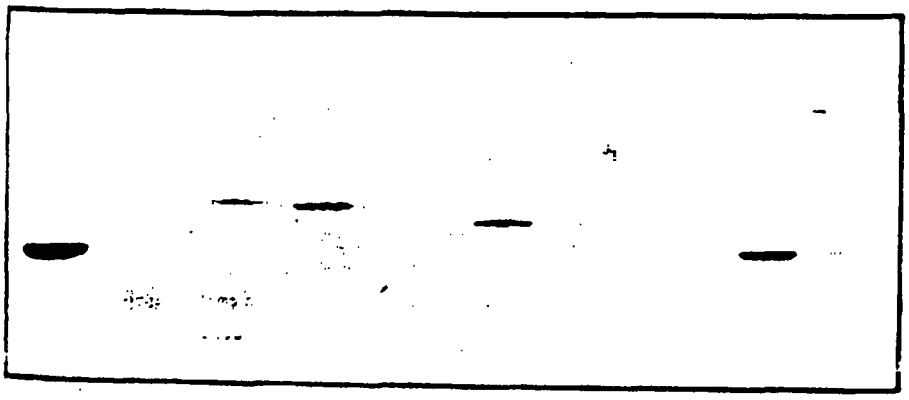
Figur 3



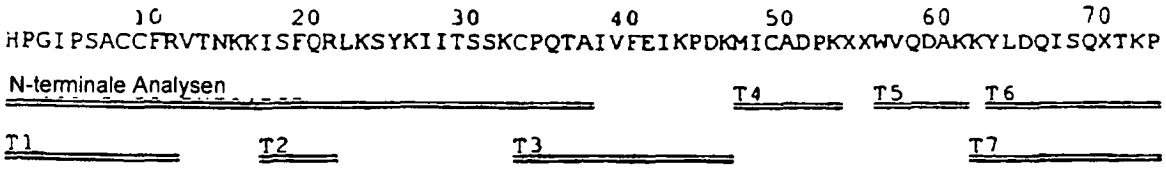
Figur 4



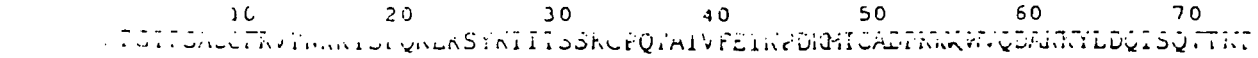
Figur 5



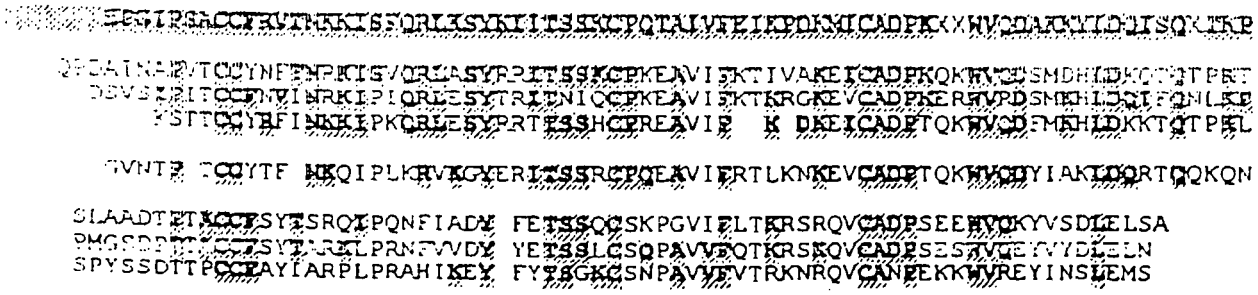
Figur 6



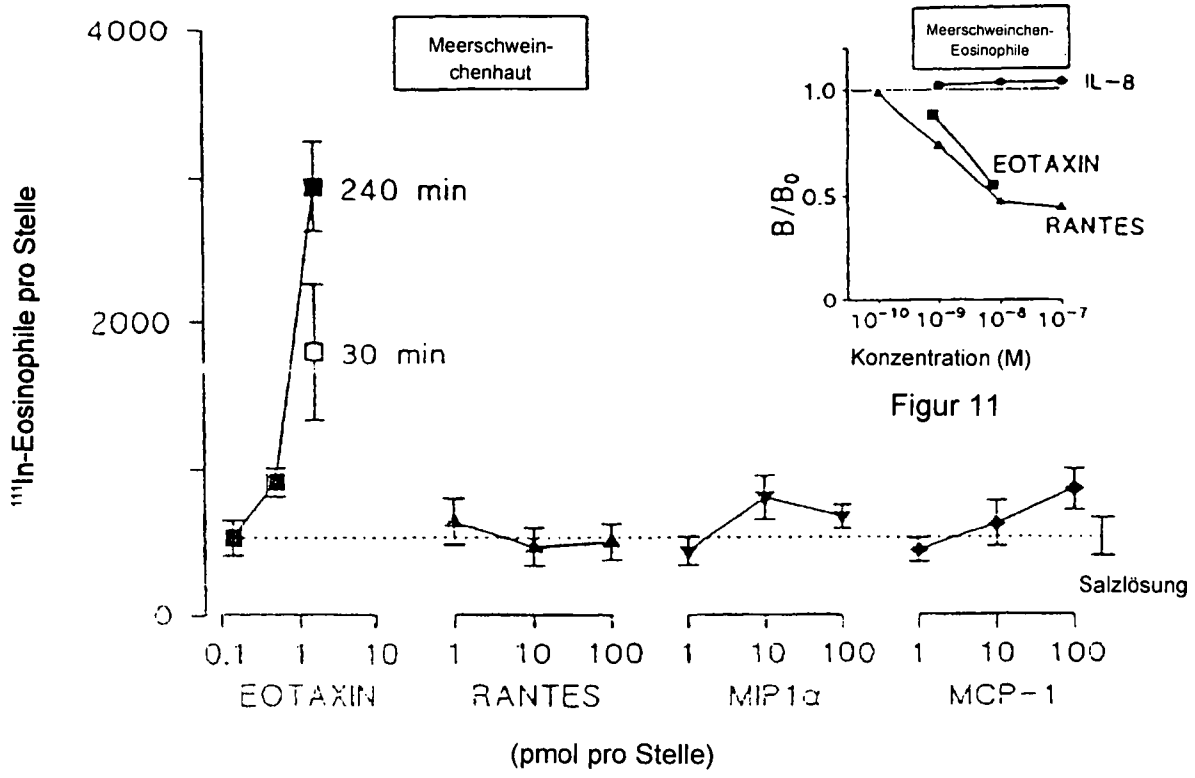
Figur 7



Figur 8

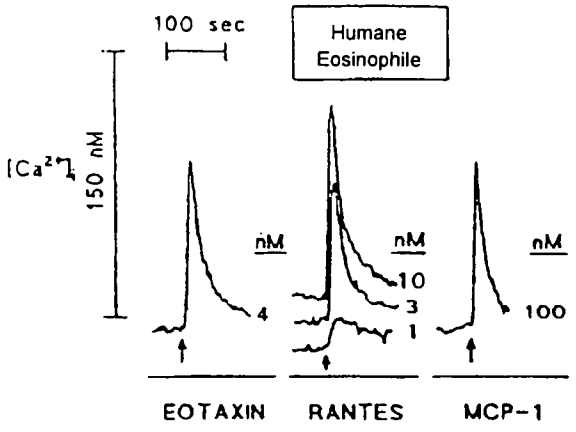


Figur 9

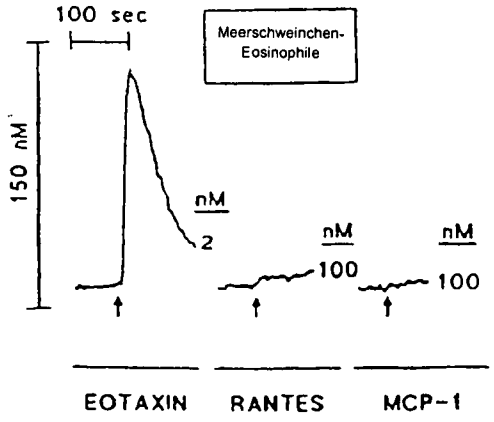


Figur 11

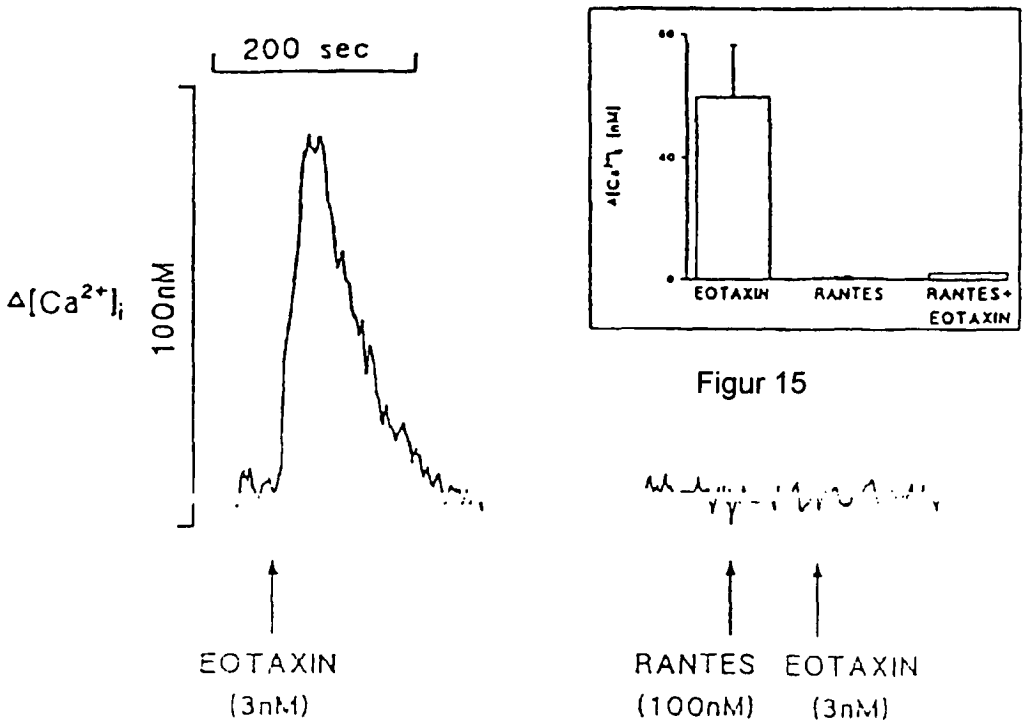
Figur 10



Figur 12

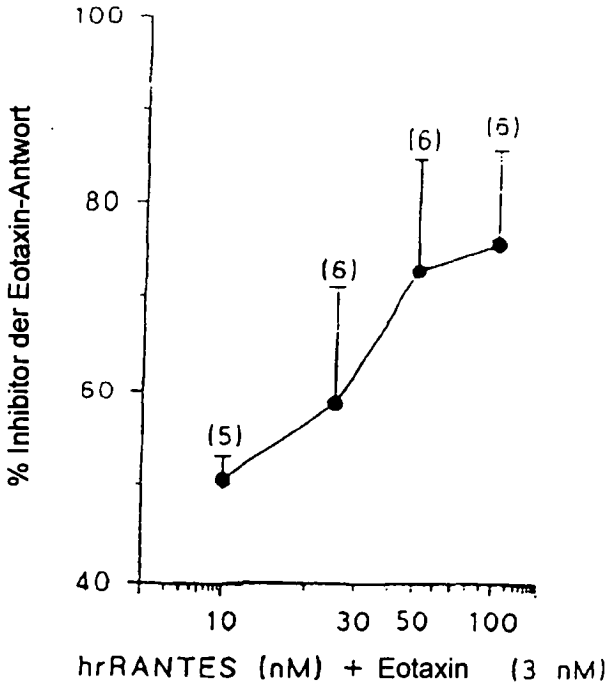


Figur 13

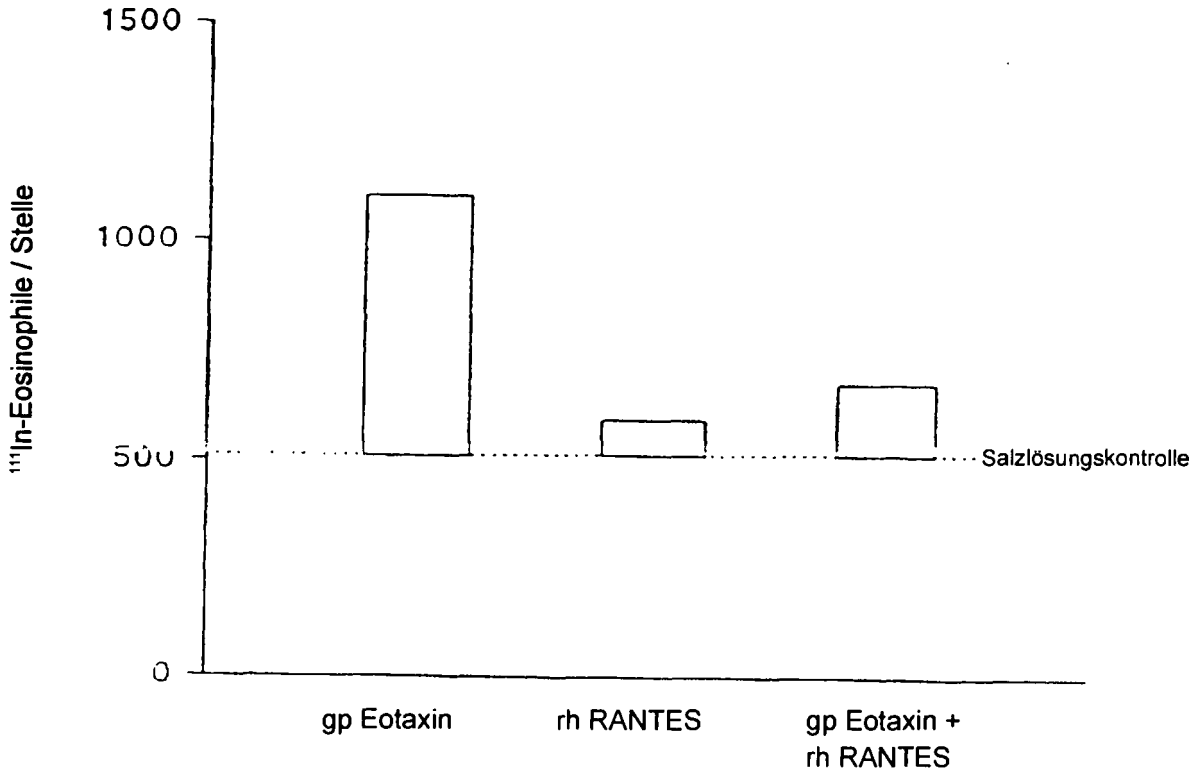


Figur 15

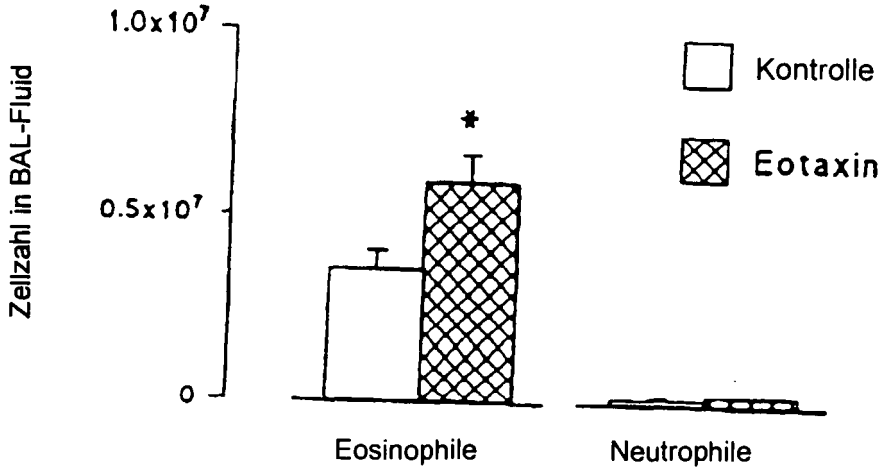
Figur 14



Figur 16



Figur 17



Figur 18