



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 696 35 346 T4** 2007.11.08

(12) **Berichtigte Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 837 932 B2**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **696 35 346.6**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US96/08867**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **96 921 279.4**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1996/040903**

(86) PCT-Anmeldetag: **05.06.1996**

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: **19.12.1996**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **29.04.1998**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **26.10.2005**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **08.11.2007**

(51) Int Cl.⁸: **C12N 15/10** (2006.01)

C07K 14/435 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

C12Q 1/34 (2006.01)

G01N 33/573 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

C12N 15/86 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

478121 **07.06.1995** **US**

618485 **19.03.1996** **US**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, IE, IT, LI, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:

Yamamoto, Nobuto, Philadelphia, Pa., US

(72) Erfinder:

Antrag auf Nichtnennung

(74) Vertreter:

v. Bezold & Partner, 80799 München

(54) Bezeichnung: **VON KLONIERTEM, VITAMIN-D BINDENDEN PROTEIN ABGELEITETE MAKROPHAGEN-AKTIVIERENDE FAKTOREN**

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

Die berichtigte Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 4 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

[0001] Diese Erfindung betrifft wirksame Makrophagenaktivierungsfaktoren, hergestellt durch Oligosaccharid-Verdauung der klonierten Domäne III eines Vitamin-D-Bindungsproteins, und die Verwendung dieser Makrophagenaktivierungsfaktoren bei verschiedenen Krebsarten, HIV-Infektion und Osteoporose und als Adjuvans für die Immunisierung und Impfung.

TABELLE VON BEGRIFFEN

Gc-Protein	Vitamin D ₃ -Bindungsprotein
MAF	Makrophagenaktivierungsfaktor
GcMAF	von Gc-Protein abgeleitetes Makrophagenaktivierungsprotein
GcMAFc	von kloniertem Gc-Protein abgeleiteter Makrophagenaktivierungsfaktor
Gc-Domäne III	Domäne-III-Region des Gc-Proteins
CdMAF	von klonierter Domäne III abgeleiteter Makrophagenaktivierungsfaktor
NagAg	α -N-Acetylgalactosaminidase als Antigen

[0002] Die kleine Domäne des Vitamin-D-Bindungsproteins (Gc-Proteins) (etwa 18 % der Länge des Gc-Peptids, auch bekannt als Domäne III) wurde mit Hilfe eines Baculovirus-Vektors kloniert. Das Peptid der klonierten Domäne (Cd) wurde mit immobilisierter β -Galactosidase und Sialidase behandelt, um einen Makrophagenaktivierungsfaktor, CdMAF, zu ergeben. Der klonierte Makrophagenaktivierungsfaktor und GcMAF ist für die Anwendung in der Krebstherapie, bei HIV-Infektion und Osteoporose vorgesehen und kann auch als Adjuvans für die Immunisierung und Impfung eingesetzt werden.

[0003] Andere Aufgaben und viele begleitende Merkmale dieser Erfindung werden unschwer ersichtlich mit dem besseren Verständnis der Erfindung durch Heranziehung der folgenden detaillierten Beschreibung in Verbindung mit den Begleitzeichnungen, worin:

[0004] [Fig. 1a](#) eine schematische Darstellung der Bildung von Makrophagenaktivierungsfaktor (MAF) ist;

[0005] [Fig. 1b](#) eine schematische Darstellung der Deglycosylierung von Gc-Protein im Blutkreislauf eines Patienten mit Krebs oder HIV-Infektion ist;

[0006] [Fig. 2](#) die Aminosäuresequenz von kloniertem GcMAF zeigt, welche SEQ-ID-Nr. 1 ist, die das gesamte klonierte Gc-Protein darstellt (und kein Bestandteil der vorliegenden Erfindung ist);

[0007] [Fig. 3](#) die Konstruktion des DNA-Fragments zeigt, welches für die Leadersequenz des EcoR1-Fragments E1 und die Domäne-III-Regionen des Gc-Proteins codiert; A, die gesamte cDNA für Gc-Protein; B, das Konstrukt, welches in den Nicht-Fusionsvektor inseriert werden soll; der schraffierte Bereich zeigt die komprimierten Regionen von etwa 1000 Basenpaaren (bp) an;

[0008] [Fig. 4](#) die 89-Aminosäuresequenz, SEQ-ID-Nr. 2, der klonierten Domäne m (CdMAF₁) unter Verwendung des Nicht-Fusionsvektors zeigt;

[0009] [Fig. 5](#) den Baculovirus-Fusionsvektor zur Klonierung der Domäne III von Gc-Protein zeigt;

[0010] [Fig. 6](#) die 94-Aminosäuresequenz, SEQ-ID-Nr. 3, der klonierten Domäne III (CdMAF₂) unter Verwendung des Fusionsvektors zeigt;

[0011] [Fig. 7](#) die Korrelation zwischen Plasma- α -N-Acetylgalactosaminidase-Aktivität und Tumorbeltung (gesamte Zellzahlen) in der Peritonealhöhle von Ehrlich-Aszites-Tumor zeigt;

[0012] [Fig. 8A](#) die therapeutische Wirkung von GcMAF gemäß der vorliegenden Erfindung auf erwachsene Personen, die unter Prostatakrebs leiden, zeigt;

[0013] [Fig. 8B](#) die therapeutische Wirkung von GcMAF gemäß der vorliegenden Erfindung auf erwachsene Personen, die unter Brustkrebs leiden, zeigt;

[0014] [Fig. 8C](#) die therapeutische Wirkung von GcMAF gemäß der vorliegenden Erfindung auf erwachsene Personen, die unter Dickdarmkrebs leiden, zeigt.

A. Eine Entzündungsreaktion führt zur Aktivierung von Makrophagen

[0015] Eine Entzündung resultiert in der Aktivierung von Makrophagen. Entzündete Läsionen setzen Lyso-phospholipide frei. Die Verabreichung von kleinen Dosen (5-20 tg/Maus) von Lysophosphatidylcholin (Lyso-Pc) und anderen Lysophospholipiden an Mäuse induzierte eine stark erhöhte phagozytische Kapazität und Superoxidbildungskapazität von Makrophagen (Ngwenya und Yamamoto, Proc. Soc. Exp. Biol. Med 193:118, 1990; Yamamoto u.a., Inf. Imm 61:5388, 1993; Yamamoto u.a., Inflammation 18:311, 1994).

[0016] Diese Makrophagenaktivierung erfordert die Beteiligung von Bund T-Lymphozyten und Serum-Vitamin-D-Bindungsprotein (DBP; humanes DBP ist als Gc-Protein bekannt). Die in vitro-Aktivierung von peritonealen Maus-Makrophagen durch Lyso-Pc erfordert die schrittweise Modifikation von Gc-Protein durch β -Galactosidase von Lyso-Pc-behandelten B-Zellen und Sialidase von T-Zellen, um den Makrophagenaktivierungsfaktor (MAF), ein Protein mit N-Acetylgalactosamin als verbleibender Zuckergruppierung, zu bilden ([Fig. 1a](#), Yamamoto u.a., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8539, 1991; Yamamoto u.a., J. Immunol. 151:2794, 1993; Naraparaju und Yamamoto, Immunol. Lett. 43:143, 1994). Somit ist das Gc-Protein ein Vorläufer für MAF.

[0017] Die Inkubation von Gc-Protein mit immobilisierter β -Galactosidase und Sialidase erzeugt einen MAF mit bemerkenswert hohem Titer (GcMAF) (Yamamoto u.a., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8539, 1991; Yamamoto u.a., J. Immunol., 151:2794, 1993; Naraparaju und Yamamoto, Immunol. Lett. 43:143, 1994; US-Patent Nr. 5,177,002; US-Patent Nr. 5,326,749). Die Verabreichung einer sehr kleinen Menge (10 pg/Maus; 100 ng/Mensch) von GcMRF resultierte in einer stark erhöhten phagozytischen Kapazität und Superoxidbildungskapazität von Makrophagen.

[0018] Als periphere Blutmonozyten/Makrophagen (hier im Folgenden als Makrophagen bezeichnet) von 326 Patienten, die verschiedene Arten von Krebs aufwiesen, in vitro mit 100 pg GcMAF/ml behandelt wurden, wurden die Makrophagen aller Krebspatienten bezüglich ihrer phagozytischen Kapazität und Superoxidbildungskapazität aktiviert. Diese Beobachtung weist darauf hin, dass die Makrophagen eines Krebspatienten aktiviert werden können. Jedoch ging die MAP-Vorläufer-Aktivität von Plasma-Gc-Protein bei etwa 70 % dieser Krebspatientenpopulation verloren oder wurde verringert. Es wurde festgestellt, dass die verlorene oder verringerte Vorläufer-Aktivität von Gc-Protein auf die Deglycosylierung von Plasma-Gc-Protein durch eine α -N-Acetylgalactosaminidase, die im Blutkreislauf des Krebspatienten nachgewiesen wurde, zurückzuführen war. Deglycosyliertes Gc-Protein kann nicht in MAF überführt werden ([Fig. 1b](#)). Somit verhindert der Verlust der MAF-Vorläufer-Aktivität von Gc-Protein die Bildung von MAF. Deshalb kann sich bei bestimmten Krebspatienten keine Makrophagenaktivierung entwickeln. Nachdem eine Makrophagenaktivierung der erste Schritt bei der Immunentwicklungskaskade ist, werden solche Patienten immunsupprimiert. Dies kann mindestens teilweise erklären, warum Krebspatienten an einer sich durchsetzenden Infektion sterben.

[0019] Gleichermaßen wurden, als periphere Blutmakrophagen von 196 HIV-infizierten/AIDS-Patienten in vitro mit 100 pg GcMAF/ml behandelt wurden, die Makrophagen aller Patienten hinsichtlich phagozytischer Kapazität und Superoxidbildungskapazität aktiviert. Jedoch war die MAF-Vorläufer-Aktivität von Plasma-Gc-Protein bei etwa 35 % der HIV-infizierten Patientenpopulation niedrig. Wie bei Krebspatienten, wird das Plasma-Gc-Protein dieser Patienten durch eine α -N-Acetylgalactosaminidase deglycosyliert, die in HIV-infizierten Patienten nachgewiesen wurde. Dieser Mechanismus erklärt, warum Patienten mit fortgeschrittener HIV-Infektion (AIDS) schwer immunsupprimiert sind.

[0020] Sowohl Krebspatienten als auch HIV-infizierte Patienten, die eine stark verringerte Vorläufer-Aktivität von Plasma-Gc-Protein aufwiesen, wiesen große Mengen an α -N-Acetylgalactosaminidase auf, während Patienten mit mäßig verringerter Vorläufer-Aktivität mäßige Niveaus an Plasma- α -N-Acetylgalactosaminidase-Aktivitäten aufwiesen. Patienten mit hoher Vorläufer-Aktivität, einschließlich HIV-infizierter Patienten ohne Symptome, hatten geringe, jedoch signifikante Niveaus an Plasma- α -N-Acetylgalactosaminidase-Aktivität. Nachdem eine große Menge (260 pg) an Gc-Protein im Blutkreislauf vorliegt, beeinflusst ein niedriger Spiegel des Enzyms die Vorläufer-Aktivität nicht. Nichtsdestoweniger wurde α -N-Acetylgalactosaminidase-Aktivität im Plasma aller Krebspatienten und HIV-infizierter Patienten gefunden und zeigte eine inverse Korrelation zur Vorläufer-Aktivität ihres Plasma-Gc-Proteins. Somit ist die Zunahme der α -N-Acetylgalactosaminidase-Aktivität im Patientenserum oder -plasma verantwortlich für die Abnahme der Vorläufer-Aktivität von Plasma-Gc-Protein. Diese Beobachtungen führten mich zur Hypothese, dass Serum- oder Plasma- α -N-Acetylgalactosaminidase eine Rolle bei der Immunsuppression von Krebspatienten und HIV-infizierten/AIDS-Patienten

spielt. Somit kann die α -N-Acetylgalactosaminidase-Aktivität von Patientenserum oder -plasma als diagnostisches und prognostisches Indiz dienen.

B. Ein Defekt in der Makrophagenaktivierungskaskade ruft Osteoporose hervor

[0021] Der entzündungsinduzierte Makrophagenaktivierungsprozess scheint die hauptsächliche Makrophagenaktivierungskaskade zu sein, die von anderen Phagozyten wie Osteoklasten und Monozyten geteilt wird. Ein Defekt in der induzierbaren β -Galactosidase von B-Lymphozyten in der Makrophagenaktivierungskaskade verursacht funktionsgestörte Osteoklasten, was zur Manifestation von Osteoporose führt (Yamamoto u.a., J. Immunol. 152:5100, 1994), fehlender oder verzögerter Knochenmarkbildung bei Neugeborenen.

[0022] Autosomale rezessive Osteoporose ist gekennzeichnet durch eine übermäßige Anhäufung von Knochen im ganzen Skelett als Ergebnis funktionsgestörter Osteoklasten, was zu einer verringerten Knochenresorption führt (Marks, Clin. Orthop. 189:239, 1984). In Tiermodellen von Osteoporose ist, abhängig vom Grad der Osteoklasten-Dysfunktion, die Entwicklung der Markhöhle und der Zahndurchbruch entweder verzögert oder, häufiger, fehlt (Marks, Am. J. Med. Genet. 34:43, 1989). Bei humaner infantiler Osteoporose tritt der Tod innerhalb des ersten Lebensjahrzehnts ein, gewöhnlich aufgrund einer sich durchsetzenden Infektion (Reeves, Pediatrics 64:242, 1979), was eine Immunsuppression anzeigt. Die angesammelten Befunde legen nahe, dass fehlende oder funktionsgestörte Osteoklasten in Säugern mit Osteoporose, einschließlich Menschen, oft von einem Mangel an oder Fehlfunktionen von Makrophagen begleitet sind. Die Studien des Erfinders der vorliegenden Erfindung hinsichtlich der Aktivierung sowohl von Osteoklasten als auch Makrophagen bei Osteoporose-Mutationen offenbarte, dass Osteoklasten und Makrophagen durch einen gemeinsamen Signalfaktor, den Makrophagenaktivierungsfaktor, aktiviert werden können, und dass ein Defekt in der β -Galactosidase von B-Zellen den Bildungsprozess des Makrophagenaktivierungsfaktors unterbricht (Yamamoto u.a., J. Immunol. 152:5100, 1994). Nachdem GcMAF und dessen klonierte Derivate die Funktionen von Lymphozyten und Gc-Protein umgehen und direkt auf Makrophagen und Osteoklasten einwirken, sollte die Verabreichung dieser Faktoren an Empfänger mit Osteoporose die Knochenerkrankung beheben. In der Tat fand der Erfinder der vorliegenden Erfindung kürzlich, dass vier Verabreichungen von GcMAF oder kloniertem Makrophagenaktivierungsfaktor (GcMAFc) (100 pg/Woche) an die Mutantenmäuse, beginnend bei der Geburt für vier Wochen, zur Aktivierung von sowohl Makrophagen als auch Osteoklasten und zu einer anschließenden Resorption der überschüssigen Skelettmatrix und gesteigerten Größe der Markhöhle führte.

C. Therapeutische Anwendung von GcMAF und dessen kloniertem Derivat bei Krebs

[0023] Trotz Defekte bei der Makrophagenaktivierungskaskade bei Patienten mit Krebs, HIV-Infektion und Osteoporose umgeht GcMAF die Funktionen von Lymphozyten und Gc-Protein und wirkt für die Aktivierung direkt auf Makrophagen (oder Osteoklasten) ein. Makrophagen haben ein Potential zur Eliminierung von Krebszellen und HIV-infizierten Zellen, wenn sie aktiviert werden. Als Krebspatienten mit 100 ng GcMAF/Patient wöchentlich für mehrere Monate behandelt wurden, zeigte GcMAF unterschiedslos bemerkenswerte Heilwirkungen auf eine Vielfalt von humanen Krebsarten.

[0024] Statt GcMAF aus einer humanen Blutquelle zu erhalten, kann er aus dem klonierten Gc-Protein oder seiner kleinen Domäne, verantwortlich für die Makrophagenaktivierung, erhalten werden. Das klonierte Gc-Protein erfordert einen eukaryotischen Vektor/Wirt, der zur Glycosylierung der klonierten Produkte in der Lage ist. Das Gc-Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 52000 und 458 Aminosäureresten ist ein multifunktionelles Protein und trägt drei verschiedene Domänen (Cooke und Haddad, Endocrine Rev. 10:294, 1989).

[0025] Die Domäne I wechselwirkt mit Vitamin D, während die Domäne III mit Actin wechselwirkt (Haddad u.a., Biochem. 31:7174, 1992). Chemisch und proteolytisch fragmentiertes Gc-Protein ermöglichte mir den Beweis, dass die kleinste Domäne, Domäne III, 80 Aminosäurereste, einschließlich der Stelle für die Glycosylierung, ein essentielles Peptid für die Makrophagenaktivierung, enthält. Dementsprechend klonierte ich das gesamte Domäne-III-Peptid unter Verwendung eines Baculovirus-Vektors und eines Insektenwirts und behandelte es mit immobilisierter β -Galactosidase und Sialidase, um einen wirksamen Makrophagenaktivierungsfaktor mit der Bezeichnung CdMAF zu erhalten. Wie GcMAF scheint der klonierte CdMAF bemerkenswerte Heilwirkungen auf eine Vielfalt von Krebsarten aufzuweisen.

D. Eine wirksame Adjuvans-Aktivität von GcMAF für die Immunisierung mit Antigenen oder Vakzinen

[0026] Makrophagen sind Antigen-präsentierende Zellen. Makrophagen, welche durch GcMAF aktiviert wur-

den, phagozytieren schnell Zielantigene oder Zellen und präsentieren die prozessierten Antigene gegenüber Antikörper-produzierenden Zellen. Ich beobachtete eine schnelle Entwicklung einer großen Menge von Antikörper-sekretierenden Zellen unmittelbar (1 bis 4 Tage) nach Impfung einer kleinen Menge an Gc-MAF (100 pg(Maus) und Schaferythrozyten (SRBC). Dieser Befund deutet darauf hin, dass GcMAF und sein kloniertes Derivat CdMAF als wirksames Adjuvans zur Immunisierung und Impfung dienen sollte.

BESCHREIBUNG DER VERFAHREN FÜR DIE GENKLONIERUNG VON MAKROPHAGENAKTIVIERUNGS-AFAKTOREN

A. Klonierung der cDNA von Gc-Protein in ein Insektenvirus

[0027] Eine Volllängen-cDNA, codierend für das humane Gc-Protein, wurde aus einer humanen Leber-cDNA-Bank im Bakteriophagen λ gt11 (Clontech, Palo Alto, CA) mit Hilfe eines "pico Blue™"-Immunscreeningkits, erhältlich von Stratagene, La Jolla, CA, isoliert. Das Baculovirus-Expressionssystem in den Insektenzellen nutzt mehrere Tatsachen über das Polyhedron-Protein: (a) es wird in sehr hohen Niveaus in infizierten Zellen exprimiert, wo es mehr als die Hälfte des gesamten zellulären Proteins im späten Infektionszyklus ausmacht; (b) es ist für die Infektion oder Replikation des Virus nicht essentiell, was bedeutet, dass das rekombinante Virus keine Helferfunktion benötigt; (c), Viren, denen das Polyhedron-Gen fehlt, haben eine andere Plaque-Morphologie als Viren, welche das klonierte Gen enthalten; und (d) im Gegensatz zu Bakterienzellen, glycosyliert die Insektenzelle die klonierten Genprodukte effizient.

[0028] Eine der Attraktionen dieses Expressionssystems ist ein visueller Screen, welcher die Unterscheidung und quantitative Bestimmung von rekombinanten Viren ermöglicht. Das Polyhedron-Gen wird in sehr hohen Niveaus in den Kernen infizierter Zellen spät im viralen Infektionszyklus produziert. Akkumuliertes Polyhedron-Protein bildet Einschlusskörper, welche auch eingebettete Viruspartikel enthalten. Diese Einschlusskörper, bis zu 15 μ m Größe, haben einen hohen Brechungsindex, was ihnen ein hell strahlendes Erscheinungsbild gibt, das unter einem Lichtmikroskop leicht zu beobachten ist. Zellen, die mit rekombinanten Viren infiziert wurden, fehlen Einschlusskörper. Zur Unterscheidung des rekombinanten Virus von einem Wildtyp-Virus wird der Transfektionsüberstand (Rekombinante enthaltendes Viruslysate) auf einer Monoschicht von Insektenzellen ausplattiert. Plaques werden dann unter einem Lichtmikroskop hinsichtlich der Anwesenheit (Anzeichen für Wildtyp-Virus) oder Abwesenheit (Anzeichen für rekombinantes Virus) von Einschlusskörpern untersucht.

[0029] Darüber hinaus wird bei dem Baculovirus-Expressionssystem ein Helfer-unabhängiges Virus verwendet, welches in hohen Titern in Insektenzellen vermehrt werden kann, die für das Wachstum in Suspensionskulturen adaptiert sind, was es möglich macht, große Mengen an rekombinantem Protein mit relativer Leichtigkeit zu erhalten. Die Hauptmenge des überproduzierten Proteins bleibt in Insektenzellen löslich, im Gegensatz zu den unlöslichen Proteinen, die oft aus Bakterien erhalten werden. Ferner ist das virale Genom groß (130 kbp) und kann somit große Segmente fremder DNA aufnehmen.

1) Wahl des Baculovirus-Vektors

[0030] Alle erhältlichen Baculovirus-Vektoren basieren auf pUC und verleihen Ampicillinresistenz. Jeder enthält den Polyhedron-Gen-Promotor, variable Längen von Polyhedron-codierender Sequenz und (eine) Insertionsstelle(n) zur Klonierung des fremden Gens von Interesse, flankiert von viralen Sequenzen, welche 5' des Promotors und 3' des Fremdgen-Inserts liegen. Diese flankierenden Sequenzen erleichtern eine homologe Rekombination zwischen dem Vektor und Wildtyp-Baculovirus-DNA (Ausubel u.a.; Current Protocols in Mol. Biol., 1990). Die Hauptüberlegung bei der Wahl des geeigneten Baculovirus-Expressionsvektors ist, ob das rekombinante Protein als Fusionsprotein oder Nicht-Fusionsprotein exprimiert werden soll. Nachdem die Glycosylierung des Gc-Peptids eine Leader-Signalsequenz für den Transfer des Peptids in das endoplasmatische Retikulum erfordert, sollte die cDNA, welche das Initiationscodon (-16 Met) über die Leadersequenz bis zu der +1 Aminosäure (Leu) des nativen Gc-Proteins enthält, in den Nicht-Fusionsvektor mit einem Polylinker, welcher die EcoRI-Stelle trägt, pLV1393 (Invitrogen, San Diego, CA), eingeführt werden.

[0031] Während der partiellen Verdauung der cDNA für das Gc-Protein in λ gt11 mit dem Enzym EcoRI wurde eine Volllängen-Gc-cDNA mit EcoRI-Termini elektrophoretisch isoliert, mit EcoRI-gespaltenem pVL1393 gemischt und mit T4-Ligase ligiert. Dieses Konstrukt in der richtigen Orientierung sollte das gesamte Gc-Peptid, insgesamt 458 Aminosäuren ([Fig. 2](#)), exprimieren. Zum Erhalt der korrekten Konstruktion wurden kompetente E.coli-HB101-Zellen mit dem pVL-Vektor transformiert und hinsichtlich Transformanten auf LB („Luria Broth“)-Agarplatten, enthaltend Ampicillin (LB/Ampicillin-Platten), selektioniert. Die DNA wurde für die Sequenzierungsprozedur vorbereitet, um festzustellen, welche Kolonie das Insert oder Gen mit der richtigen Leseori-

entierung enthält, indem zuerst nach der 3'-Poly-A-Folge gesucht wurde. Die Klone mit 3'-Poly A (vom Poly-A-Ende von mRNA) wurden dann vom 5'-Ende aus sequenziert, um die korrekte Orientierung der Vollängen-DNA für das Gc-Peptid zu bestätigen.

2) Cotransfektion von Insektenzellen mit der klonierten Plasmid-DNA und Wildtyp-Virus-DNA

[0032] Eine Monoschicht ($2,5 \times 10^6$ Zellen in jeweils einem 25-cm²-Gefäß) von *Spodoptera frugiperda* (Sf9)-Zellen wurde mit einer klonierten Plasmid(Vektor)-DNA (2 µg) und einer Wildtyp(Ac. MNPV)-Baculovirus-DNA (10 µg) 950 µl Transfektionspuffer cotransfiziert (Ausubel u.a., Curr. Protocols in Mol. Biol. 1990). Wenn die Zellen 4 oder 5 Tage kultiviert wurden, enthielt der Transfektionsüberstand rekombinante Viren.

3) Identifizierung von rekombinantem Baculovirus

[0033] Die Cotransfektionslysate wurden 10^4 , 10^5 oder 10^6 verdünnt und auf Sf9-Zellen für die Kultivierung für 4 bis 6 Tage ausplattiert. Nachdem die Plaques gut ausgebildet waren, wurden Plaques, die Einschluss-negative Zellen enthielten, mit einer Häufigkeit von 1,3 % identifiziert. Mehrere mutmaßliche rekombinante Virusplaques wurden isoliert und zur Reinigung zweimal neu plaqüiert. Reine rekombinante Virusplaque-Klone wurden isoliert.

B. Analyse von Protein von Interesse aus rekombinantem Baculovirus

1) Herstellung von rekombinantem Viruslysat

[0034] Eine Insektenzell-Sf9-Monoschicht ($2,5 \times 10^6$ Zellen in jeweils einem 25-cm²-Gefäß) wurde mit einem rekombinanten Viruskлон infiziert und in 5 ml serumfreiem GIBCO-Medium (von GIBCO Biochemicals, Rockville, MD) oder Medium, das mit 0,1 % Eialbumin ergänzt war, um eine Kontaminierung von Rinderserum-Vitamin D-Bindungsprotein zu vermeiden, kultiviert. Die Kulturgefäße wurden bei 27° C inkubiert und täglich auf Infektionszeichen überprüft. Nach 4 bis 5 Tagen wurden die Zellen geerntet, indem sie sanft aus dem Gefäß entfernt wurden, und die Zellen und das Kulturmedium wurden in Zentrifugenröhrchen überführt und 10 Minuten lang bei $1000 \times g$, 4° C, zentrifugiert. Zur Maximierung der Infektion für die Produktion an rekombinantem Protein wurden Sf9-Zellen in einem 100-ml-Spinner-Suspensionskulturgefäß mit 50 ml vollständigem Medium bis zu etwa 2×10^6 Zellen/ml gezüchtet. Die Zellen wurden geerntet, 10 Minuten lang bei $1000 \times g$ zentrifugiert und in 10 bis 20 ml serumfreiem Medium, enthaltend rekombinantes Virus mit einer Multiplizität der Infektion (MOI) von 10, resuspendiert. Nach 1 Stunde Inkubation bei Raumtemperatur wurden die infizierten Zellen in ein 200-ml-Spinnergefäß, enthaltend 100 ml serumfreies Medium, überführt und 40 Stunden lang inkubiert. Mehr als 40 % des sekretierten Proteins war das Protein von Interesse. Das Protein im Überstand wurde isoliert.

2. Qualitative Abschätzung des Proteins von Interesse

[0035] Coomassieblau-Anfärbung des SDS-Polyacrylamidgels, wobei 20 bis 40 µg Gesamtzellprotein pro Spur aufgetragen wurden, wurde zur Abschätzung der Menge an exprimiertem Protein verwendet. Nachdem die Proben zelluläre Proteine enthalten, wurde das rekombinante Protein unschwer durch Vergleich mit zellulären Proteinen ohne Infektion nachgewiesen.

3. Enzymatische Überführung des klonierten Gc-Proteins in Makrophagenaktivierungsfaktor (GcMAFc)

[0036] Das klonierte Gc-Protein (2 µg) mit einem Molekulargewicht von 52000 und 458 Aminosäureresten ([Fig. 2](#)) wurde mittels einer Vitamin-D-Affinitätssäule (Zink u.a., Anal. Biochem. 157:282, 1986) isoliert und mit immobilisierter β -Galactosidase und Sialidase behandelt. Der resultierende klonierte Makrophagenaktivierungsfaktor (GcMAFc) wurde zu Maus- und Human-Makrophagen zugegeben und hinsichtlich phagozytischer Kapazität und Superoxidbildungskapazität einem Assay unterworfen. Die Inkubation von Makrophagen mit 10 pg GcMAFc/ml für 3 Stunden führte zu einer 5-fach erhöhten phagozytischen Aktivität und einer 15-fachen Erhöhung der Superoxidbildungskapazität von Makrophagen.

C. Subklonierung einer Domäne, die für die Makrophagenaktivierung erforderlich ist

I. Klonierungsprozedur 2: Nicht-Fusionsvektor

1) Klonierung der für die Makrophagenaktivierung verantwortlichen Domäne (CdMAF)

[0037] Die gesamte cDNA-Sequenz für das Gc-Protein in λ gt11, einschließlich 76 bp der stromaufwärts gelegenen 5'-flankierenden Region und 204 bp der 3'-flankierenden Folge, wurde mittels EcoRI fragmentiert, um vier Restriktionsfragmente mit der Bezeichnung E1, 120; E2, 314; E3, 482 bzw. E4, 748 bp, zu ergeben. Jedes wurde in die EcoRI-Stelle des Plasmids pSP65 von Promega (Madison, WI) nach dem Verfahren von Cooke und David (J. Clin. Invest. 76:2420, 1985) kloniert. Obwohl ich feststellte, dass eine Region von weniger als der Hälfte der Domäne HI für die Makrophagenaktivierung verantwortlich war, können kleine Segmente von weniger als 40 Aminosäureresten in den Insektenzellen nicht exprimiert werden. Darüber hinaus werden kurze Peptide durch Proteasen in humanem Plasma schnell abgebaut und sind somit klinisch nicht brauchbar. Dementsprechend sollte die gesamte Domäne III (etwa 80 Aminosäurereste) in ein Insektenvirus subkloniert werden, wo ich eine effiziente Produktion und Glycosylierung des Peptids in den infizierten Zellen erwarte.

2) Subklonierung eines cDNA-Fragments in das Polyhedronen von Baculovirus

[0038] Nachdem die Glycosylierung eines Peptids eine Leader-Signalsequenz für den Transfer des Peptids in das endoplasmatische Retikulum erfordert, sollte das DNA-Fragment von E1, enthaltend das Initiationscodon (-16 Met) über die Leadersequenz bis zu der +1 Aminosäure (Leu) des nativen Gc-Proteins, in den Vektor eingeführt werden. Nachdem dieses Segment das Initiationscodon für das Gc-Protein trägt, wurde ein Nicht-Fusionsvektor, pVL1393 (Invitrogen, San Diego, CA), verwendet. Ein Segment, welches die Initiationscodon-Leadersequenz des cDNA-Klons E1 enthielt und ein cDNA-Segment, codierend für 85 C-terminale Aminosäuren (die gesamte Domäne III) plus die 3'-nicht-codierende Folge des cDNA-Klons E4, wurden miteinander ligiert und in die EcoRI-Stelle des Insektenvirus-Vektors pVL kloniert. Um dieses Konstrukt zu erhalten, wurde sowohl E1- als auch E4-DNA mit HaeIII fragmentiert, um jeweils zwei Fragmente zu ergeben: E1hl (87 pb), E1hs (33 bp) und E4hs (298 bp) bzw. E4hl (450 bp). Die beiden größeren Fragmente E1hl und E4hl wurden elektrophoretisch isoliert, mit EcoRI-gespaltenem pVL gemischt und mit T4 Ligase ligiert, wie in [Fig. 3](#) gezeigt. Dieses Konstrukt in der richtigen Orientierung sollte die gesamte Domäne III, insgesamt 89 Aminosäuren, einschließlich der 4 Aminosäuren von E1hl, hier auch als CdMAF bezeichnet, wie in [Fig. 4](#) gezeigt, exprimieren. Um das korrekte Konstrukt zu erhalten, werden kompetente E.coli-HB101-Zellen mit dem pVL-Vektor transformiert und hinsichtlich Transformanten auf LB/Ampicillin-Platten selektioniert. DNA wurde für Sequenzierungsverfahren vorbereitet, um festzustellen, welche Kolonie das Konstrukt mit der richtigen Leseorientierung enthält, indem zuerst nach der 3'-Poly-dA-Folge gesucht wurde. Diejenigen Klone mit 3'-Poly-dA (vom Poly-A-Ende von mRNA) wurden dann vom 5'-Ende aus sequenziert, um die korrekte Orientierung des E1hl-Fragments zu bestätigen.

[0039] Ich stellte fest, dass der Vektor das gesamte Konstrukt (Domäne III) in der korrekten Orientierung enthält.

3. Isolierung von rekombinantem Baculovirus, Reinigung des Peptids der klonierten Domäne (Cd) und enzymatische Erzeugung des klonierten Makrophagenaktivierungsfaktors (CdMAF)

[0040] Monoschichten ($2,5 \times 10^6$ Zellen in jeweils einem 25-cm²-Gefäß) von *Spodoptera frugiperda* (Sf9)-Zellen wurden mit klonierter Plasmid-DNA (2 µg) und Wildtyp-(AcMNPV)-Baculovirus-DNA (10 µg) in 950 ml Transfektionspuffer cotransfiziert. Rekombinante Baculovirus-Plaques wurden isoliert und zur Produktion des Gc-Domäne-III-Peptids in Insektenzellen verwendet. Diese klonierte Domäne mit einem Molekulargewicht (MG) von 10000 und 89 Aminosäuren, wie in [Fig. 4](#) gezeigt, wurde mit einer Aktin-Affinitätssäule (Haddad u.a., J. Biochemistry 31:7174, 1992) gereinigt. 2 µg des Peptids der klonierten Domäne (Cd₁) wurden mit immobilisierter β -Galactosidase und Sialidase behandelt, um einen klonierten Makrophagenaktivierungsfaktor, als CdMAF bezeichnet, zu ergeben.

II. Klonierungsverfahren 22: Fusionsvektor

1) Klonierung der Domäne, welche für die Makrophagenaktivierung verantwortlich ist (CdMAF)

[0041] Ein Baculovirus-Fusionsvektor, Vektor pPbac (Stratagene, La Jolla, CA), enthält sekretorische Signalsequenzen von humaner alkalischer Plazenta-Phosphatase, welche das naszierende klonierte Peptid zum se-

retorischen Stoffwechselweg der Zellen dirigiert, was zur Sekretion in das Kulturmedium führt. Die Signalsequenz wird durch Signalsequenz-Peptidase abgespalten, wenn das naszierende klonierte Peptid zu dem sekretorischen Stoffwechselweg der Wirtsinsektenzellen geleitet wird, was zur Sekretion des Peptids der klonierten Domäne (Cd) führt.

[0042] [Fig. 5](#) zeigt, dass der Vektor das Füllfragment für die Gensubstitution und das lacZ-Gen zur Identifizierung der Geninsertion trägt.

[0043] Das Füllfragment des Vektors pPbac wurde durch Verdauung der Vektor-DNA mit den Restriktionsenzymen SmaI und BamHI ausgeschnitten und wurde durch Elektroelution entfernt. Das E4-cDNA-Fragment des Gc-Proteins wurde mit HaeIII und BamHI verdaut, was ein Fragment ergab, das praktisch das gleiche wie E4hl war (siehe [Fig. 3](#)). Dieses Fragment wurde mit dem obigen pPbac-Vektor gemischt und mit T4-Ligase ligiert. Diese Strategie legt nicht nur die Orientierung der Ligierung fest, sondern fusioniert das Fragment auch mit dem Leserahmen. Die E.coli-DH5aF-Zellen wurden mit der Reaktionsmischung transformiert. Das klonierte DNA-Insert wurde aus einer Reihe von Kolonien nach Verdauung mit HaeIII und BamEL isoliert. Das Insert wurde durch Sequenzierung bestätigt. Die Sequenz bestätigte die korrekte Orientierung.

2) Isolierung von rekombinantem Baculovirus durch Transfektion von Sf9-Insektenzellen mit dem Wildtyp-Baculovirus und dem klonierten DNA-Insert

[0044] Zur Transfektion von Insektenzellen (*Spodoptera frugiperda*, Sf9) wurden lineare Wildtyp(AcMN-PV)-Baculovirus-DNA und Insektin-Liposomen (Invitrogen, San Diego, CA) verwendet. Liposomen-vermittelte Transfektion von Insektenzellen ist das effizienteste Transfektionsverfahren, das zur Verfügung steht. Für die Transfektion einer Monoschicht von Sf9-Zellen (2×10^6) in einer 60-mm-Schale wurde eine Mischung des Folgenden vorsichtig zugegeben:

3 µg klonierte Plasmid-DNR
10 µl lineare Wildtyp-Baculovirus(AcMNPV)-DNA
(0,1 µg/µl)
1 ml Medium
29 µl Insektin-Liposomen.

[0045] Die Schalen wurden bei Raumtemperatur 4 Stunden lang unter langsamem Schütteln inkubiert. Nach der Transfektion wurde 1 ml Medium zugegeben und bei 27° C in einer angefeuchteten Umgebung 48 Stunden lang inkubiert. Das resultierende Transfektionslysate wurde einem Plaque-Assay unterworfen. Reinigung von rekombinantem Virus, Isolierung des Peptids der klonierten Domäne (Cd₂) und enzymatische Erzeugung des klonierten Makrophagenaktivierungsfaktors mit der Bezeichnung CdMAF₂ erfolgten wie im Klonierungsverfahren I beschrieben. Dieser CdMAF besteht aus 94 Aminosäureresten, wie in [Fig. 6](#) gezeigt, einschließlich 9 Aminosäuren von dem Fusionsvektor und wird hier als CdMAF₂ bezeichnet. Obwohl CdMAF₂ fünf Aminosäuren mehr als das CdMAF₁-Peptid aufweist, das von dem Nicht-Fusionsvektor stammt, zeigten sie dieselben biologischen Aktivitäten.

ERGÄNZENDE BEOBACHTUNGEN

A. Wirkungen der klonierten Makrophagenaktivierungsfaktoren GcMAFc und CdMAF auf kultivierte Phagozyten (Makrophagen und Osteoklasten)

[0046] Eine dreistündige Behandlung von humanen Makrophagen und Osteoklasten mit Pikogramm-Mengen (pg) der klonierten Makrophagenaktivierungsfaktoren GcMAFc und CdMAF resultierte in einer stark erhöhten Superoxidbildungskapazität dieser Phagozyten, wie in Tabelle 1 gezeigt. Die Niveaus der Phagozytenaktivierung sind ähnlich derjenigen der Makrophagenaktivierung durch GcMAF (Yamamoto u.a., AIDS Res. Human Ret., 11:1373, 1995).

Tabelle 1. Aktivierung von Phagozyten durch in vitro-Behandlung mit GcMAF und seinen klonierten Derivaten

Konz. (pg/ml)		produzierte nMol an Superoxid/ min/10 ⁶ Phagozyten		
		Humane Makrophagen	Peritoneale Maus- Makrophagen	Humane Osteo- klasten
GcMAFc	0	0,07	0,06	0,03
	10	3,20	3,46	2,56
	100	5,18	5,08	4,22
CdMAF	0	0,01	0,02	0,08
	10	2,96	2,87	2,43
	100	4,26	4,53	4,09

*periphere Blutmonozyten/Makrophagen von Krebspatienten. Ähnliche Ergebnisse wurden auch beobachtet, wenn diejenigen von HIV-infizierten Patienten verwendet wurden.

B. Aktivierung von peritonealen Maus-Makrophagen durch Verabreichung der klonierten Makrophagenaktivierungsfaktoren GcMAFc und CdMAF

[0047] Einen Tag nach Verabreichung einer Pikogramm-Menge (10 und 100 pg/Maus) von GcMAFc oder CdMAF an BALB/c-Mäuse wurden peritoneale Makrophagen isoliert und hinsichtlich Superoxidbildungskapazität untersucht. Wie in Tabelle 2 gezeigt, wurden die Makrophagen effizient aktiviert. Diese Ergebnisse sind ähnlich denjenigen der Makrophagenaktivierung mit GcMAF (Naraparaju und Yamamoto, Immunol. Lett. 43:143, 1994).

Tabelle 2. Aktivierung von peritonealen Maus-Makrophagen durch Verabreichung klonierter GcMAF-Derivate

Dosierung (pg/Maus)		produzierte nMol Superoxid/min/10 ⁶ Phagozyten Peritoneale Maus-Makrophagen
GcMAFc	0	0,05
	10	3,18
	100	5,23
CdMAF	0	0,03
	10	2,54
	100	4,23

C. Therapeutische Wirkungen von GcMAF, GcMAFc oder CdMAF auf tumortragende Mäuse und Mäuse mit Osteoporose

1) Therapeutische Wirkungen von GcMAF, GcMAFc oder CdMAF auf Mäuse, die einen Ehrlich-Aszites-Tumor tragen

[0048] Wenn BALB/c-Mäusen GcMAF, GcMAFc oder CdMAF (100 pg/Maus) verabreicht wurde und sie 10⁵-Ehrlich-Aszites-Tumorzellen/Maus erhielten, überlebten sie mindestens 5 Wochen. Alle Kontrollmäuse er-

hielten nur den Aszites-Tumor und starben in etwa 2 Wochen. Wenn den Mäusen zusätzlich GcMAF, GcMAFc oder CdMAF (100 pg/Maus) 4 Tage nach der Transplantation verabreicht wurde, wurden die Tumorzellen vollständig eliminiert. (Tabelle 3).

Tabelle 3. Therapeutische Wirkungen von GcMAF und klonierter Derivate auf Mäuse, die einen Ehrlich-Aszites-Tumor tragen

Gruppe	Anzahl der Mäuse	Behandlung nach der Transplantation ^a	Anzahl der überlebenden Mäuse/ Zeitraum
Gruppe 1	6 Mäuse	Unbehandelte Kontrolle	6/13 ± 3 Tage
	10 Mäuse	Tag 0, 100 pg GcMAF/Maus	10/36 ± 7 Tage
Gruppe 2	6 Mäuse	unbehandelte Kontrolle	6/14 ± 4 Tage
	10 Mäuse	Tag 0, 100 pg GcMAFc/Maus	10/35 ± 6 Tage
Gruppe 3	6 Mäuse	unbehandelte Kontrolle	6/14 ± 5 Tage
	10 Mäuse	Tag 0, 100 pg CdMAF/Maus	10/34 ± 3 Tage
Gruppe 4	8 Mäuse	unbehandelte Kontrolle	8/15 ± 5 Tage
	12 Mäuse	Tag 0, 100 pg GcMAF/Maus Tag 4, 100 pg GcMAF/Maus	12/>65 Tage
Gruppe 5	8 Mäuse	unbehandelte Kontrolle	8/14 ± 5 Tage
	12 Mäuse	Tag 0, 100 pg GcMAFc/Maus Tag 4, 100 pg GcMAFc/Maus	12/>65 Tage
Gruppe 6	8 Mäuse	unbehandelte Kontrolle	8/14 ± 5 Tage
	12 Mäuse	Tag 0, 100 pg CdMAF/Maus Tag 4, 100 pg CdMAF/Maus	12/>65 Tage

^aGcMAF, GcMAFc und CdMAF wurden intramuskulär (systemisch) verabreicht und Mäuse in allen Gruppen erhalten Tumorzellen/Maus.

2) Therapeutische Wirkungen von GcMAF und klonierten GcMAF-Derivaten (GcMAFc und CdMAF) auf osteoporotische Mäuse

[0049] Die Verabreichung von GcMAFc oder CdMAF an neugeborene Junge der osteoporotischen op/op-Maus wurde durch wöchentliche Injektion von 100 Pikogramm für vier Wochen, beginnend einen Tag nach der Geburt, durchgeführt. Die Mäuse wurden nach 28 Tagen getötet. Die Tibiae wurden aus den behandelten Mäusen und unbehandelten Kontrollmäusen entnommen, der Länge nach aufgeschnitten und unter einem Präpariermikroskop untersucht, um die Größe der Markhöhle zu messen. Die Hohlraumgröße wurde ausgedrückt als Prozentsatz der Entfernung zwischen den Epiphysenplatten der Tibia. Die unbehandelte Mausgruppe bildete Knochenmark mit 30 % der Gesamtlänge der Tibia. Die behandelte Mausgruppe erfuhr eine um 20 % erhöhte Knochenmarksbildung gegenüber derjenigen der unbehandelten Mausgruppe. Diese erhöhte Markhöhlenbildung ist ein Anzeichen von Osteoklasten-aktivierung und erhöhter osteoklastischer Knochenresorption.

D. Der Ursprung der Immunsuppression in Krebspatienten und HIV-infizierten Patienten

[0050] Die Quelle der Plasma- α -N-Acetylgalactosaminidase in Krebspatienten schienen Krebszellen zu sein. Hohe α -N-Acetylgalactosaminidase-Aktivitäten wurden in Tumorgewebehomogenaten verschiedener Organe, einschließlich elf verschiedener Tumorgewebe, die 4 Lungen-, 3 Brust-, 3 Dickdarmtumore und einen Gebä-

mutterhalstumor einschlossen, nachgewiesen, obwohl die α -N-Acetylgalactosaminidase-Aktivität von 15,9 bis 50,8 nMol/mg/min variierte. Eine chirurgische Entfernung malignanter Läsionen bei humanem Krebs führte zur leichten Abnahme der Plasma- α -N-Acetylgalactosaminidase-Aktivität bei gleichzeitiger Erhöhung der Vorläufer-Aktivität, insbesondere wenn malignante Zellen lokalisiert wurden.

[0051] In einem vorklinischen Maus-Tumormodell wurde BALB/c-Mäusen 5×10^5 -Ehrlich-Aszites-Tumorzellen/Maus in die Peritonealhöhle transplantiert und hinsichtlich Serum- α -N-Acetylgalactosaminidase-Aktivität analysiert. Wurden die Serum-Enzym Spiegel gemessen, wenn der transplantierte Ehrlich-Aszites-Tumor in der Peritonealhöhle der Maus wuchs, war die Enzymaktivität direkt proportional zur Tumorbelastrung (Gesamtzellzahlen in der Peritonealhöhle), wie in [Fig. 7](#) gezeigt. Dies wurde auch bestätigt mit nackten Mäusen, denen KB-Zellen (humane Mundhöhlen-Plattenepithelkarzinomlinie) transplantiert wurden. Serum- α -N-Acetylgalactosaminidase-Aktivität nahm mit zunehmender Tumorgroße (gemessen nach Gewicht) des festen Tumors zu. Daher verwendete ich Plasma- α -N-Acetylgalactosaminidase-Aktivität als prognostischen Index zur Überprüfung des Therapiefortschritts.

[0052] Eine Strahlungs-therapie von humanem Krebs verringerte die Plasma- α -N-Acetylgalactosaminidase-Aktivität mit einer begleitenden Erhöhung der Vorläufer-Aktivität. Dies impliziert, dass die Strahlungs-therapie die Anzahl der Krebszellen verringert, welche zur Sekretion von α -N-Acetylgalactosaminidase in der Lage sind. Diese Ergebnisse bestätigten auch, dass Plasma- α -N-Acetylgalactosaminidase-Aktivität eine umgekehrte Korrelation zur MAF-Vorläufer-Aktivität von Gc-Protein aufweist. Selbst nach chirurgischer Entfernung von Tumorkläsionen in Krebspatienten trugen die meisten post-operativen Patienten signifikante Mengen von α -N-Acetylgalactosaminidase-Aktivität in ihrem Blutkreislauf. Die verbleibenden Krebsläsionen in diesen post-operativen Patienten können nicht durch irgendwelche anderen Verfahren, wie z.B. Röntgen, Szintigraphie etc., nachgewiesen werden. Ich verwendete diesen höchst empfindlichen Enzym-Assay als prognostischen Index während des Verlaufs der GcMAF-Therapie.

[0053] HIV-infizierte Zellen schienen α -N-Acetylgalactosaminidase in den Blutkreislauf zu sekretieren. Als periphere mononukleäre Blutzellen (PBMC) von HIV-infizierten Patienten kultiviert und mit Mitomycin als Provirus-Induktionsmittel behandelt wurden (Sato, Arch. Virol. 54:333, 1977), wurde α -N-Acetylgalactosaminidase in das Kulturmedium sekretiert. Diese Ergebnisse veranlassten mich zu postulieren, dass α -N-Acetylgalactosaminidase ein Virus-codiertes Produkt ist. In der Tat scheint das HIV-Hüllprotein gp120 die α -N-Acetylgalactosaminidase-Aktivität zu tragen.

E. Therapeutische Wirkungen von GcMAF, GcMAFc und CdMAF auf humane Krebspatienten und Virus-infizierte Patienten

1. Krebspatienten: Therapeutische Wirkung von GcMAF auf Patienten mit Prostata-, Brust- und Dickdarmkrebs und erwachsene Patienten mit Leukämie

[0054] Die Verabreichung von GcMAF (100 und 500 ng/Mensch) an gesunde Freiwillige resultierte in einer stark erhöhten Aktivierung von Makrophagen, wie gemessen durch die 7-fach erhöhte phagozytische Kapazität und die 15-fache Superoxidbildungskapazität von Makrophagen. Die Verabreichung von GcMAF zeigte keine Anzeichen irgendwelcher Nebenwirkungen auf die Empfänger. Die Verabreichung verschiedener Dosen (100 pg bis 10 ng/Maus) an eine Anzahl von Mäusen ergab weder Krankheitswirkungen noch histologische Veränderungen in verschiedenen Organen, einschließlich Leber, Lunge, Niere, Milz, Gehirn etc. Wenn Patienten mit verschiedenen Arten von Krebs mit GcMAF (100 ng/Woche) behandelt wurden, wurden bemerkenswerte Heilwirkungen auf verschiedene Arten von Krebs beobachtet. Die therapeutische Wirksamkeit von GcMAF bei Patienten, die verschiedene Arten von Krebs trugen, wurde durch tumorspezifische Serum- α -N-Acetylgalactosaminidase-Aktivität beurteilt, da der Serum-Enzym Spiegel proportional zur Gesamtmenge an Krebszellen (Tumorbelastrung) ist. Die Heilwirkungen von GcMAF auf Prostata-, Brust- und Dickdarmkrebs sind in [Fig. 8a](#) bis [Fig. 8c](#) illustriert. Nach 25 wöchentlichen Verabreichungen von 100 ng GcMAF zeigte die Mehrheit (>90 %) von Prostata- und Brustkrebspatienten unerheblich niedrige Spiegel des Serum-Enzyms. Ein ähnliches Ergebnis wurde auch nach 35 GcMRF-Verabreichungen an Dickdarmkrebspatienten beobachtet. Ähnliche Heilwirkungen von GcMAF auf Lungen-, Leber-, Magen-, Gehirn-, Blasen-, Nieren-, Uterus-, Eierstock-, Kehlkopf-, Speiseröhren-, Mundhöhlen- und Hautkrebs wurden beobachtet. Somit schien GcMAF ohne Unterschied bei einer Vielfalt von Krebsarten wirksam zu sein. Jedoch zeigte GcMAF keine Befunde von Nebenwirkungen bei Patienten nach mehr als 6 Monaten Therapie. Dies wurde auch durch das Blutzellzählungsprofil, die Leber- und Nierenfunktionen etc. bestätigt.

[0055] Wenn GcMAFc (100 ng/Woche) und CdMAF (100 ng/Woche) jeweils an zwei Prostatakrebspatienten

verabreicht wurden, wurden ähnliche Heilwirkungen wie diejenigen von GcMAF beobachtet.

2. Virus-infizierte Patienten

[0056] Die Behandlung von peripheren Blut-Makrophagen von HIV-infizierten/AIDS-Patienten mit 100 pg GcMAF/ml resultierte in einer stark erhöhten Makrophagenaktivierung (Yamamoto u.a., AIDS Res. Human Ret. 11:1373, 1995). HIV-infizierte Patienten tragen Anti-HIV-Antikörper. HIV-infizierte Zellen exprimieren die viralen Antigene auf der Zelloberfläche. Somit haben Makrophagen das Potential zur Eliminierung der infizierten Zellen über eine Fc-Rezeptor-vermittelte Zellabtötung/Aufnahme, wenn sie aktiviert werden.

[0057] Gleichermaßen resultierte die Behandlung von peripheren Blut-Makrophagen von Patienten, die chronisch mit Epstein-Barr-Virus (EBV) und mit Herpes zoster infiziert waren, mit 100 ng GcMAF/ml in einer stark erhöhten Makrophagenaktivierung. Wie HIV infiziert EBV Lymphozyten (B-Zellen). Nachdem diese umhüllten Viren für α -N-Acetylgalactosaminidase codieren und infizierte Zellen diese in den Blutkreislauf sekretieren, kann diese Enzymaktivität in Patientenseren als prognostischer Index während der Therapie verwendet werden. Nach etwa 25 Verabreichungen von GcMAF (100 ng/Woche) an Patienten, die chronisch mit EBV und mit Herpes zoster infiziert waren, nahm die Enzymaktivität auf diejenige der Niveaus von gesunden Kontrollen ab. Wenn GcMAFc (100 ng/Woche) und CdMAF (100 ng/Woche) EBV-infizierten Patienten verabreicht wurden, wurden ähnliche Heilwirkungen wie die von GcMAF beobachtet.

F. Adjuvans-Aktivitäten von GcMAF, GcMAFc und CdMAF für die Immunisierung und Impfungen: Rapide Erhöhung der Anzahl Antikörpersekretierender Zellen (IPFC) in Mäusen nach Verabreichung von GcMAF und Schaferthozyten

[0058] BRLB/c-Mäuse wurden mit SRBC 6 Stunden nach der intraperitonealen Verabreichung von 50 pg GcMAF/Maus geimpft. In verschiedenen Intervallen (1-5 Tage) nach der Immunisierung wurden IgM-Antikörpersekretierende Zellen in der Milz mit Hilfe des Jerne-Plaque-Assays (Jerne u.a., Cell-bound antibodies, Wistar Institute Press, 1963) bestimmt. Ein Tag nach Verabreichung von GcMAF und SRBC ergab $1,35 \times 10^4$ PFC/Milz. Zwei Tage nach Verabreichung von GcMAF und SRBC hatte die Anzahl der Antikörpersekretierenden Zellen auf $8,2 \times 10^4$ PFC/Milz zugenommen. Am vierten Tag erreichte die Anzahl von Antikörpersekretierenden Zellen das maximale Niveau (etwa $23,6 \times 10^4$ PFC/Milz), wie in Tabelle 4 gezeigt. Im Gegensatz dazu produzierten Mäuse, die eine Injektion von SRBC allein erhielten, etwa $3,8 \times 10^4$ PFC/Milz 4 Tage nach der SRBC-Injektion.

[0059] Zur Bestätigung der Dosisreaktion wurde Mäusen SRBC 6 Stunden nach Verabreichung verschiedener Dosen von GcMAF im Bereich von 1 bis 50 pg/Maus injiziert. Am vierten Tag nach Verabreichung von GcMAF und SRBC wurde die Anzahl der Antikörpersekretierenden Zellen pro Milz mit dem Jerne-Plaque-Assay bestimmt. Am vierten Tag nach der Verabreichung gab es eine proportionale Erhöhung der Anzahl plaquebildender Zellen, wenn die Konzentration an GcMAF über 1 pg pro Maus erhöht wurde. Bei einer GcMAF-Dosis von 5, 10 und 50 pg/Maus wies ich $12,6 \times 10^4$, $20,2 \times 10^4$ bzw. $24,3 \times 10^4$ PFC/Milz nach. Somit ist GcMAF ein potentes Adjuvans für die Immunisierung.

Tabelle 4. Zeitverlaufstudien hinsichtlich der Entwicklung von Zellen, die Antikörper gegen Schaferythrozyten (SRBC) sekretieren, in BALB/c-Mäusen nach Verabreichung von GcMAF und SRBC^a

Nach SRBC-Immunisierung (Tage)	Antikörper-sekretierende Zellen/Milz ($\times 10^4$)	
	nur SRBC	GcMAF + SRBC
1	0,01 $\pm$ 0,002	1,35 $\pm$ 0,21
2	0,08 $\pm$ 0,02	8,28,01 $\pm$ 1,26
3	1,18 $\pm$ 0,42	14,42 $\pm$ 2,32
4	3,86 $\pm$ 0,95	23,68 $\pm$ 6,05
5	2,15 $\pm$ 0,63	18,63 $\pm$ 3,43

^aMäuse wurden mit SRBC (10^8 Zellen) 6 Stunden nach Verabreichung von GcMAF (50 pg/Maus) geimpft. Die Anzahl der Plaques (IgM-sekretierende Zellen) wurde mikroskopisch an verschiedenen Tagen nach der SRBC-Injektion quantitativ bestimmt. Die Anzahl der Plaquebildenden Einheiten (PFC) pro Milz wird als Mittelwert von Dreifach-Assays $\pm$ SEM ausgedrückt.

Zitierte Referenzen

[0060] Die folgenden Referenzen werden zitiert und ihr gesamter Text ist hier vollständig eingeschlossen, wie alle oben in der Patentbeschreibung angegebenen Referenzen.

US-Patentdokumente

[0061] US-Patente Nr. 5,177,001; 5,177,002 und 5,32b,749 (Yamamoto)

Weitere Publikationen

1. Jerne N. K., Nordin, A. A., und Henry, C., The agar plaque technique for recognizing antibody producing cells, in Amos and Koprowski (Herausgeber), Cell-bound Antibody, Wistar Institute Press, Philadelphia, PA (1963).
2. Sato, M., Tanaka, H., Yamada, T., und Yamamoto, N., Persistent infection of BHK/WI-2 cells with rubella virus and characterization of rubella variants, Arch. Virology 54:333-343 (1977).
3. Reeves, J. D., August, C. S., Humbert, J. R., Weston, W. L., Host defense in infantile osteoporosis, Pediatrics, 64:202 (1979).
4. Marks, S. C., Jr., Congenital osteopetrotic mutations as probes of the origin, structure and function of osteoclasts, Clin. Orthop. 189:239 (1984).
5. Link, R. P., Perlman, K. L., Pierce, E. A., Schnoes, H. K., DeLuca, H. F., Purification of human serum vitamin D-binding protein by 25-hydroxyvitamin D₃-Sepharose chromatography, Anal. Biochem. 157:262-269 (1986).
6. Cooke, N. E., und Haddad, J.G., Vitamin D binding protein (Gc-globulin), Endocrine Rev. 10:294-307 (1989).
7. Marks, S. C., Jr., Osteoclast biology: Lessons from mammalian mutations, Am. J. Med. Genet. 34:43-54 (1989).
8. Ngwenya, B. Z., und Yamamoto, N., Contribution of lysophosphatidylcholine treated nonadherent cells to mechanism of macrophage stimulation, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 193:118-124 (1990).
9. Ausubel, F. A., Brent R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., und Struhl, K. (Herausgeber), Expression of proteins in insect cells using baculoviral vectors, Current Protocols in Molecular Biology, Abschnitte 16.8.1-16.11.7, Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York (1990).
10. Yamamoto, N., und Homma, S., Vitamin D₃ binding protein (group-specific component, Gc) is a precursor for the macrophage activating signal from lysophosphatidylcholine-treated lymphocytes, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:8539-8543 (1991).
11. Cooke, N. E., und David, E. V., Serum vitamin D-binding protein is a third member of the albumin and al-

phafetoprotein gene family, J. Clin. Invest., 76:2420-2424 (1985).

12. Haddad, J. G., Hu, Y. Z., Kowalski, M. A., Laramore, C., Ray, K., Robzyk, P., und Cooke, N. E., Identification of the sterol- and actin-binding domains of plasma vitamin D binding protein (Gc-globulin), Biochemistry 31:7174-7181 (1992).

13. Yamamoto, N., und Kumashiro, R., Conversion of vitamin D₃ binding protein (Group-specific component) to a macrophage activating factor by stepwise action of β -galactosidase of B cells and sialidase of T cells, J. Immunol. 151:2794-2902 (1993).

14. Yamamoto, N., Kumashiro R., Yamamoto, M., Willett, N.P., und Lindsay, D. D., Regulation of inflammation-primed activation of macrophages by two serum factors, vitamin D₃-binding protein and albumin, Inf. Imm. 61:5388-5391 (1993).

15. Yamamoto, N., Lindsay, D. D., Naraparaju, V. R., Ireland, R. A., und Popoff, S. M., A defect in the inflammation-primed macrophage activation cascade in osteopetrotic (op) rats, J. Immunol., 152:5100-5107 (1994).

16. Yamamoto, N., Willett, N. P., und Lindsay, D. D., Participation of serum proteins in the inflammation-primed activation of macrophages, Inflammation, 18:311-322 (1994).

17. Naraparaju, V. R., und Yamamoto, N., Roles of β -galactosidase of B lymphocytes and sialidase of T lymphocytes in inflammation-primed activation of macrophages, Immunol. Lett. 43:143-148 (1994).

18. Yamamoto, N., Naraparaju, V. R., und Srinivasula, S. M., Structural modification of serum vitamin D₃-binding protein and immunosuppression in HIV-infected patients, AIDS Res. Human. Ret. 11:1373-1378 (1995).

Patentansprüche

1. Verfahren zur Klonierung der Domäne III eines Vitamin-D₃-Bindungsproteins in ein Baculovirus, umfassend den Schritt der Selektion und Verwendung eines Baculovirus-Vektors, um die Domäne III des Vitamin-D₃-Bindungsproteins zu klonieren:

(a) Isolierung von einer Initiations-Leadersequenz plus 4 Aminosäuren des 5'-terminalen Endes der Gc-Protein-DNA und der Gc-Protein-Domäne-III-DNA durch Verdauung der Gc-Protein-DNA mit den Enzymen EcoRI und HaeIII und Insertion in die EcoRI-Stelle eines Nicht-Fusions-Baculovirus-Vektors mittels Ligase oder Isolierung der Gc-Protein-Domäne-III-cDNA unter Verwendung der Enzyme HaeIII und BamHI und Insertion in einen Fusions-Baculovirus-Vektor pPbac durch Substitution eines SmaI-BamHI-Füllfragments stromabwärts der Signalsequenz mittels Ligase;

(b) Isolierung von rekombinantem Baculovirus, welches die Domäne III der Gc-Protein-cDNA trägt, durch Cotransfektion der Insektenzellen mit Vektor-DNA und Wildtyp-Baculovirus-DNA; und

(c) Vermehrung des rekombinanten Baculovirus in Insektenzellen und Reinigung des klonierten Domänenproteins.

2. Verfahren zur Herstellung eines klonierten Makrophagenaktivierungsfaktors, umfassend das Kontaktieren von klonierter Gc-Domäne III in vitro mit immobilisierter β -Galactosidase und Sialidase und Erhalt des klonierten Makrophagenaktivierungsfaktors.

3. Makrophagenaktivierungsfaktor mit der Aminosäuresequenz von SEQ-ID-Nr. 2 oder SEQ-ID-Nr. 3, hergestellt mit dem Verfahren nach Anspruch 2.

4. Makrophagenaktivierungsfaktor mit der Aminosäuresequenz von SEQ-ID-Nr. 2 oder SEQ-ID-Nr. 3 zur Verwendung bei der Behandlung von Krebs und Human-Immunschwächevirus.

5. Adjuvans, umfassend einen mit dem Verfahren nach Anspruch 2 erhaltenen Makrophagenaktivierungsfaktor.

6. Klonierte Domäne III eines Vitamin-D₃-Bindungsproteins mit der Aminosäuresequenz von SEQ-ID-Nr. 2.

7. Klonierte Domäne III eines Vitamin-D₃-Bindungsproteins mit der Aminosäuresequenz von SEQ-ID-Nr. 3.

Es folgen 10 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

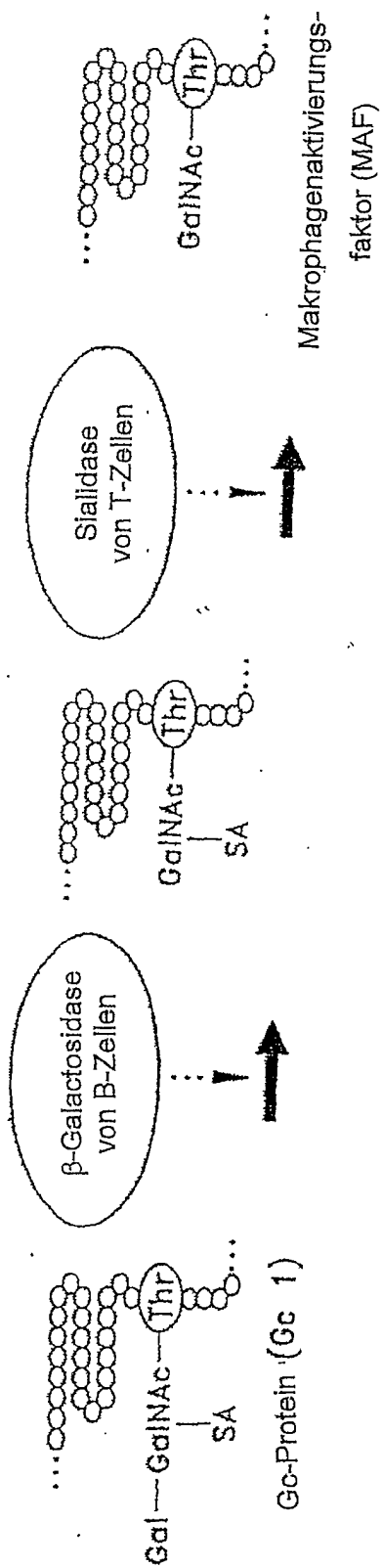


FIG. 1A

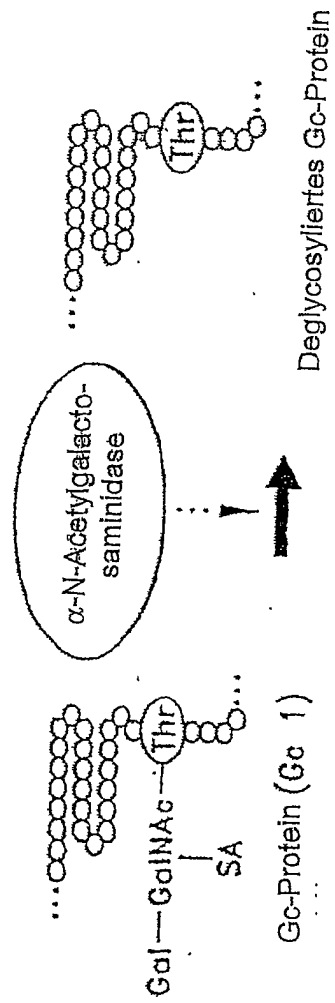
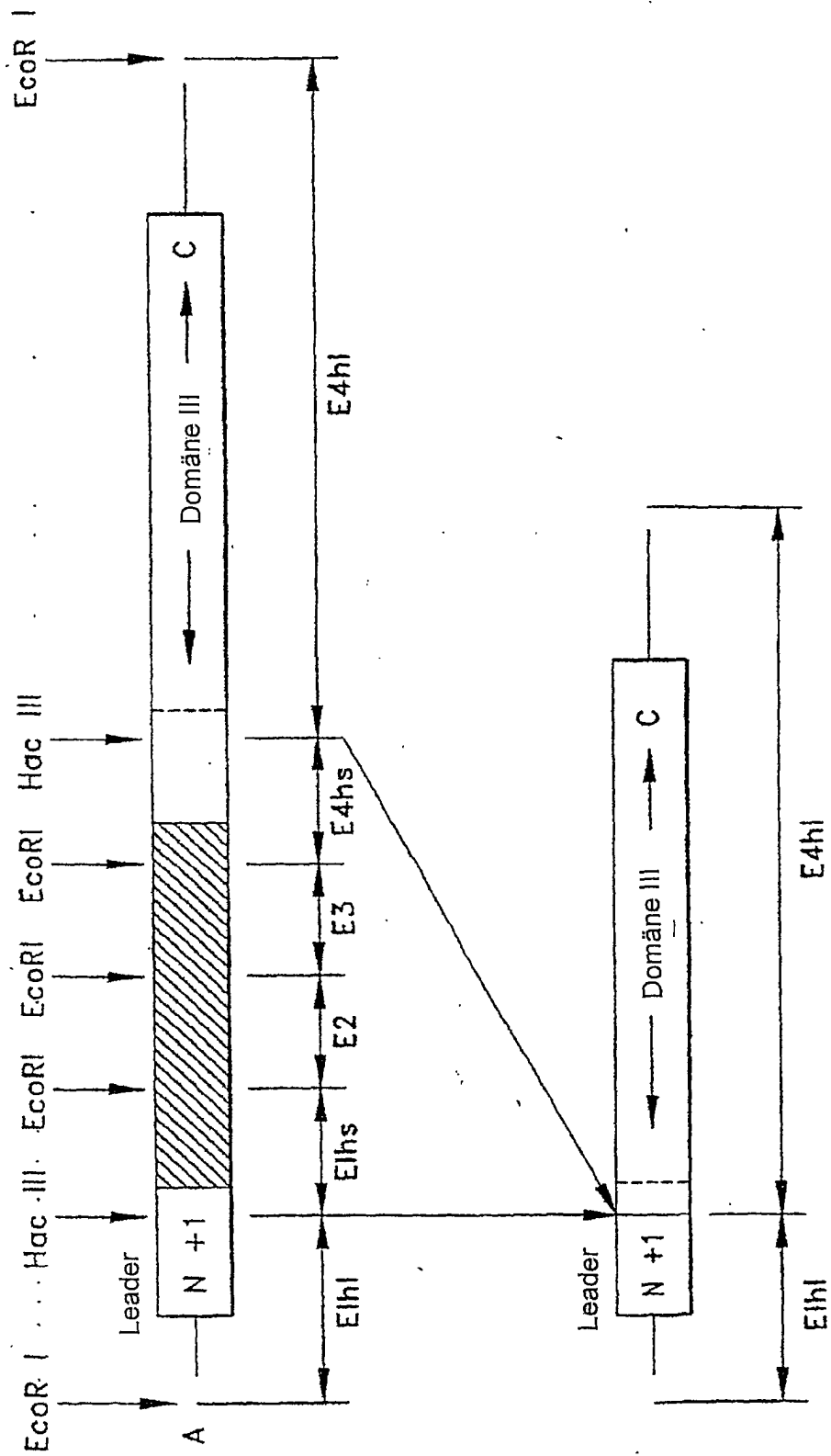


FIG. 1B

Leu	Glu	Arg	Gly	Arg	Asp	Tyr	Glu	Lys	Asn	Lys	Val	Cys	Lys	Glu	Phe	Ser	His	Leu	Gly	10	20
Lys	Glu	Asp	phe	Thr	Ser	Leu	Ser	Leu	Val	Leu	Tyr	Ser	Arg	Lys	Phe	Pro	Ser	Gly	Thr	30	40
Phe	Glu	Gln	Val	Ser	Gln	Leu	Val	Lys	Glu	Val	Val	Ser	Leu	Thr	Glu	Ala	Cys	Cys	Ala	50	60
Glu	Gly	Ala	Asp	Pro	Asp	Cys	Tyr	Asp	Thr	Arg	Thr	Ser	Ala	Leu	Ser	Ala	Lys	Ser	Cys	70	80
Glu	Ser	Asn	Ser	Pro	Phe	Pro	Val	His	Pro	Gly	Thr	Ala	Glu	Cys	Cys	Thr	Lys	Glu	Gly	90	100
Leu	Glu	Arg	Lys	Leu	Cys	Met	Ala	Ala	Leu	Lys	His	Gln	Pro	Gln	Glu	Phe	Pro	Thr	Tyr	110	120
Val	Glu	Pro	Thr	Asn	Asp	Glu	Ile	Cys	Glu	Ala	Phe	Arg	Lys	Asp	Pro	Lys	Glu	Tyr	Ala	130	140
Asn	Gln	Phe	Met	Trp	Glu	Tyr	Ser	Thr	Asn	Tyr	Glu	Gln	Ala	Pro	Leu	Ser	Leu	Leu	Val	150	160
Ser	Tyr	Thr	Lys	Ser	Tyr	Leu	Ser	Met	Val	Gly	Ser	Cys	Cys	Thr	Ser	Ala	Ser	Pro	Thr	170	180
Val	Cys	Phe	Leu	Lys	Glu	Arg	Leu	Gln	Leu	Lys	His	Leu	Ser	Leu	Leu	Thr	Thr	Leu	Ser	190	200
Asn	Arg	Val	Cys	Ser	Gln	Tyr	Ala	Ala	Tyr	Gly	Glu	Lys	Lys	Ser	Arg	Leu	Ser	Asn	Leu	210	220
Ile	Lys	Leu	Ala	Gln	Lys	Val	Pro	Thr	Ala	Asp	Leu	Glu	Asp	Val	Leu	Pro	Leu	Ala	Glu	230	240
Asp	Ile	Thr	Asn	Ile	Leu	Ser	Lys	Cys	Cys	Glu	Ser	Ala	Ser	Glu	Asp	Cys	Met	Ala	Lys	250	260
Glu	Leu	Pro	Glu	His	Thr	Val	Lys	Leu	Cys	Asp	Asn	Leu	Ser	Thr	Lys	Asn	Ser	Lys	Phe	270	280
Glu	Asp	Cys	Cys	Gln	Glu	Lys	Thr	Ala	Met	Asp	Val	Phe	Val	Cys	Thr	Tyr	Phe	Met	Pro	290	300
Ala	Ala	Gln	Leu	Pro	Glu	Leu	Pro	Asp	Val	Arg	Leu	Pro	Thr	Asn	Lys	Asp	Val	Cys	Asp	310	320
Pro	Gly	Asn	Thr	Lys	Val	Met	Asp	Lys	Tyr	Thr	Phe	Glu	Leu	Ser	Arg	Arg	Thr	His	Leu	330	340
Pro	Glu	Val	Phe	Leu	Ser	Lys	Val	Leu	Glu	Pro	Thr	Leu	Lys	Ser	Leu	Gly	Glu	Cys	Cys	350	360
Asp	Val	Glu	Asp	Ser	Thr	Thr	Cys	phe	Asn	Ala	Lys	Gly	Pro	Leu	Leu	Lys	Lys	Glu	Leu	370	380
Ser	Ser	Phe	Ile	Asp	Lys	Gly	Gln	Glu	Leu	Cys	Ala	Asp	Tyr	Ser	Glu	Asn	Thr	Phe	Thr	390	400
Glu	Tyr	Lys	Lys	Lys	Leu	Ala	Glu	Arg	Leu	Lys	Ala	Lys	Leu	Pro	Glu	Ala	Thr	Pro	Thr	410	420
Glu	Leu	Ala	Lys	Leu	Val	Asn	Lys	Arg	Ser	Asp	Phe	Ala	Ser	Asn	Cys	Cys	Ser	Ile	Asn	430	440
Ser	Pro	Pro	Leu	Tyr	Cys	Asp	Ser	Glu	Ile	Asp	Ala	Glu	Leu	Lys	Asn	Ile	Leu			450	458

FIG. 2



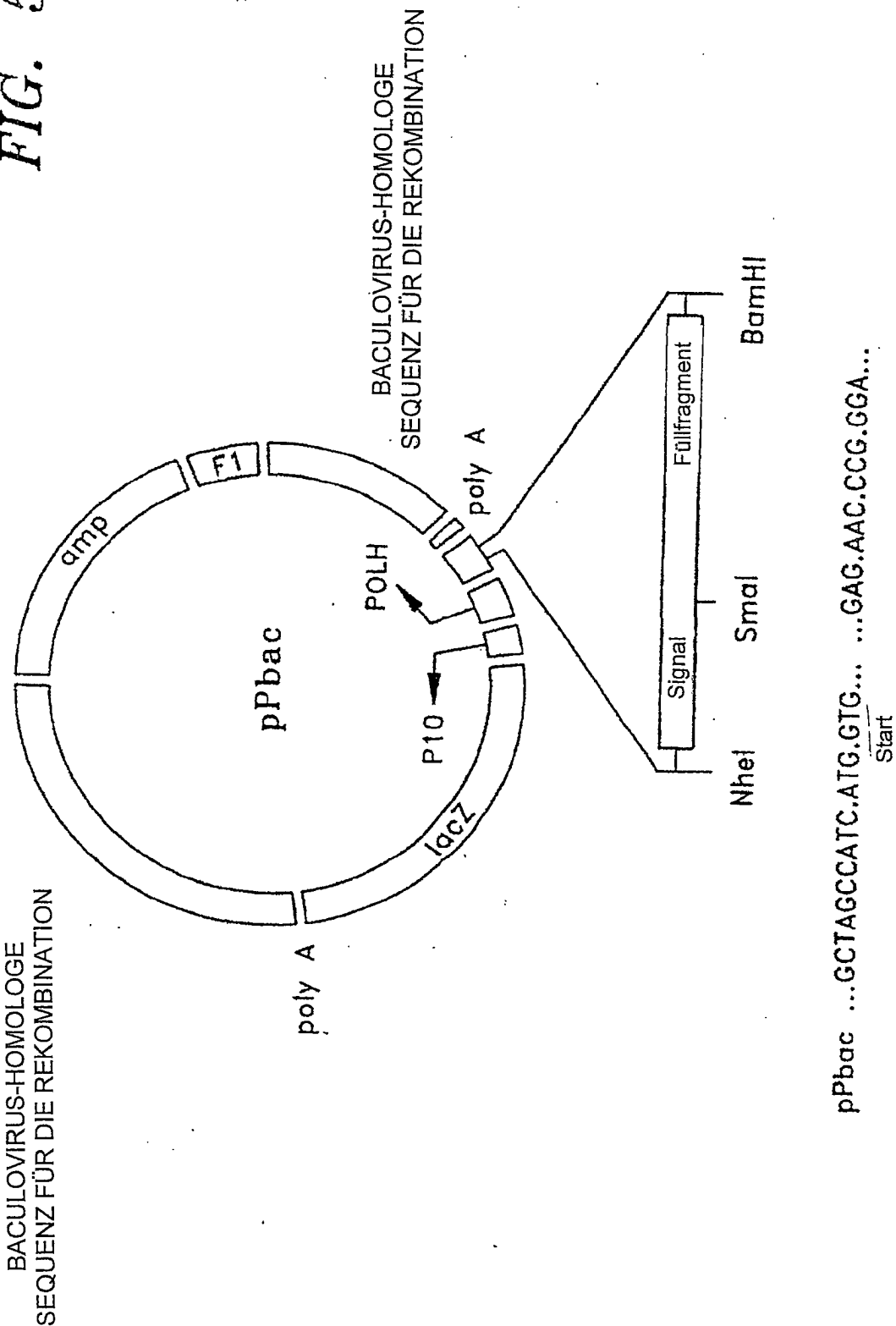
A. Ge-cDNA B. Endkonstrukt

FIG. 3

Leu	Glu	Arg	Gly	Pro	Leu	Leu	Lys	Lys	Glu	Leu	Ser	Ser	Phe	Ile	Asp	Lys	Gly	Gln	Glu
									¹⁰	³⁰									²⁰
Leu	Cys	Ala	Asp	Tyr	Ser	Glu	Asn	Thr	Phe	Thr	Glu	Tyr	Lys	Lys	Lys	Leu	Ala	Glu	Arg
									⁴⁰	⁵⁰									⁴⁰
Leu	Lys	Ala	Lys	Leu	Pro	Glu	Ala	Thr	Pro	Thr	Glu	Leu	Ala	Lys	Leu	Val	Asn	Lys	Arg
									⁶⁰	⁷⁰									⁶⁰
Ser	Asp	Phe	Ala	Ser	Asn	Cys	Cys	Ser	Ile	Asn	Ser	Pro	Pro	Leu	Tyr	Cys	Asp	Ser	Glu
								⁸⁹											⁸⁰
Ile	Asp	Ala	Glu	Leu	Lys	Asn	Ile	Leu											

FIG. 4

FIG. 5



Ile Ile Pro Val Glu Glu Glu Asn Pro Pro Leu Leu Lys Lys Glu Leu Ser Ser Phe Ile
 Asp Lys Gly Gln Glu Leu Cys Ala Asp Tyr Ser Glu Asn Thr Phe Thr Glu Tyr Lys Lys
 Lys Leu Ala Glu Arg Leu Lys Ala Lys Leu Pro Glu Ala Thr Pro Thr Glu Leu Ala Lys
 Leu Val Asn Lys Arg Ser Asp Phe Ala Ser Asn Cys Cys Ser Ile Asn Ser Pro Pro Leu
 Tyr Cys Asp Ser Glu Ile Asp Ala Glu Leu Lys Asn Ile Leu

FIG. 6

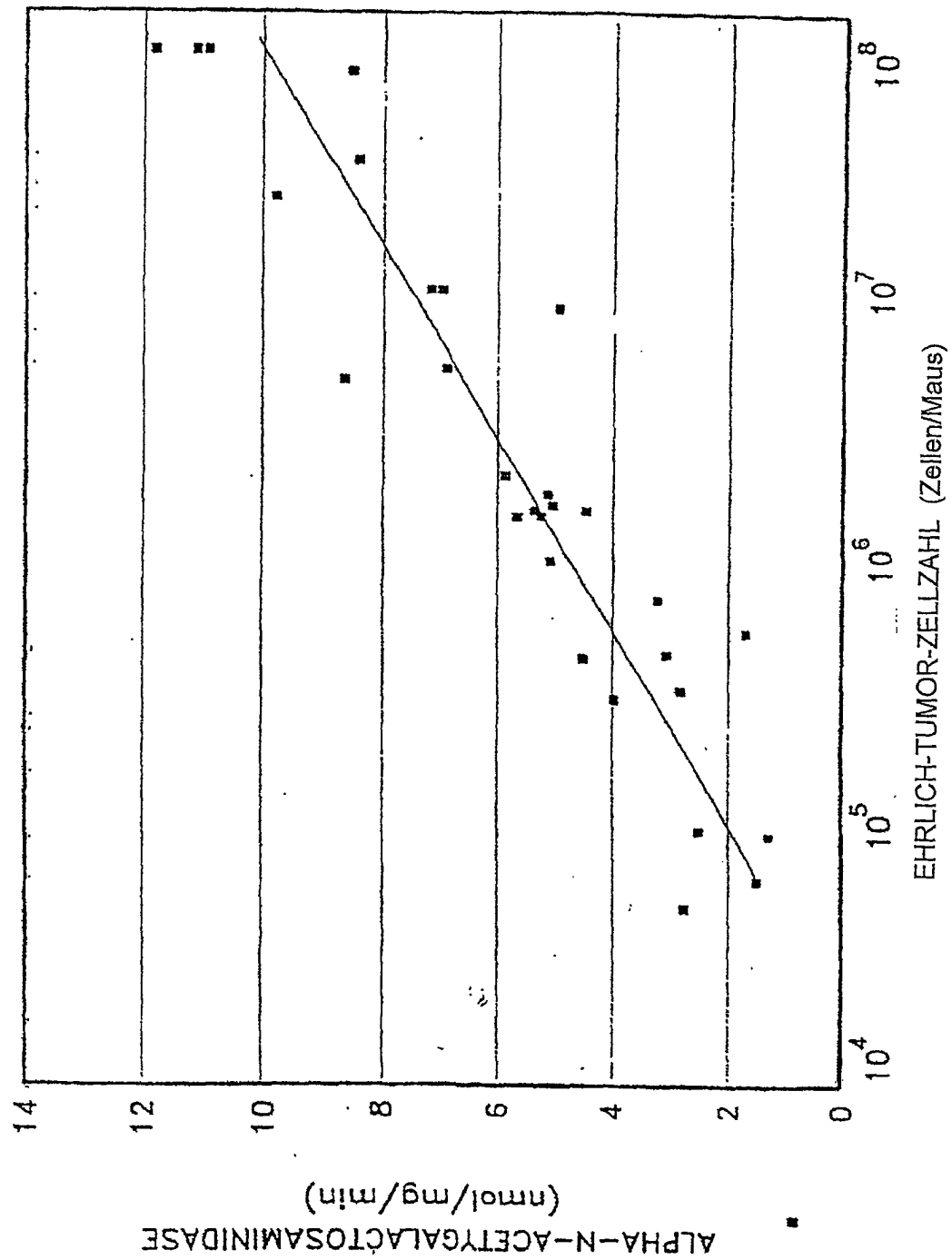


FIG. 7

FIG. 8A

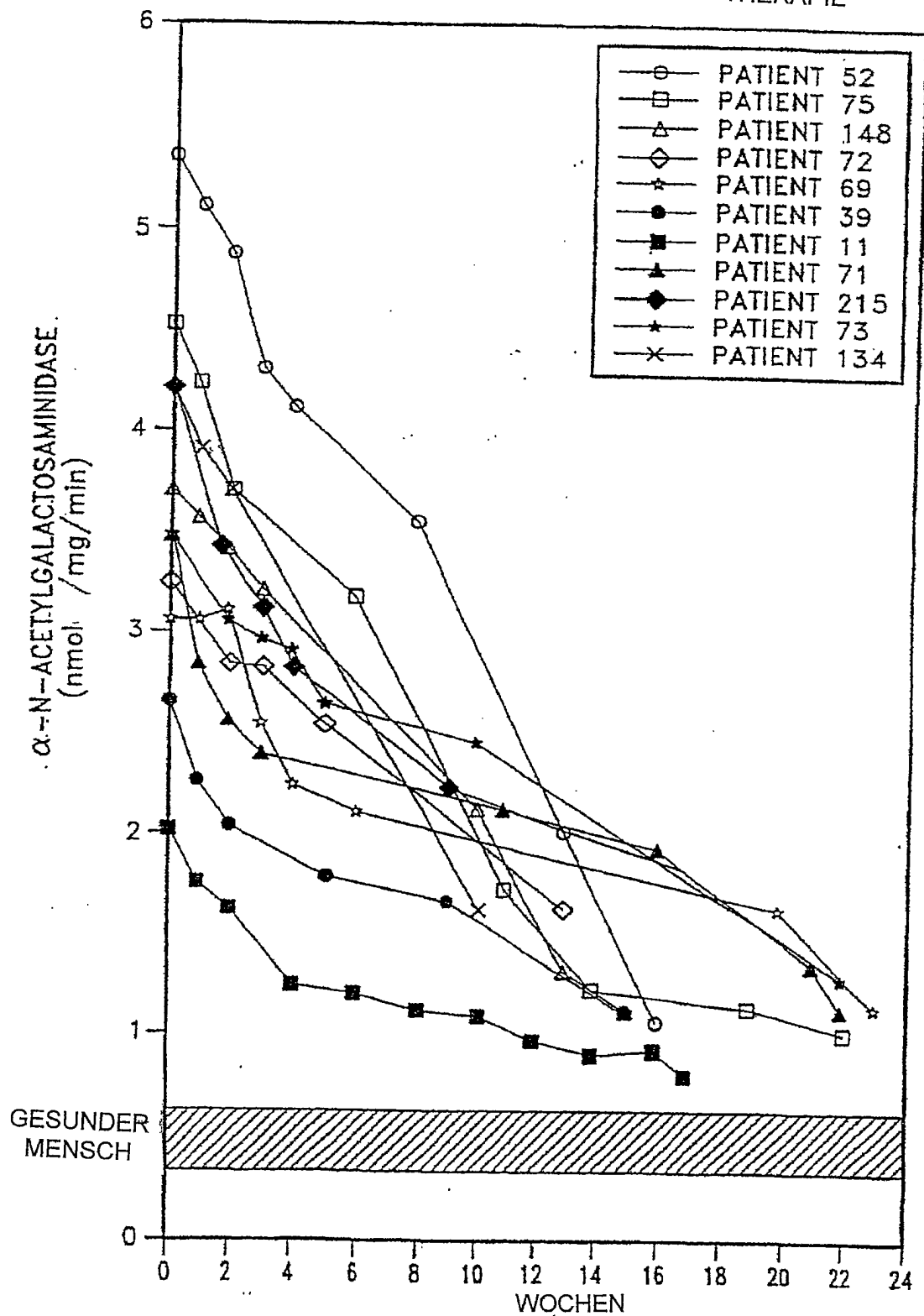
PROSTATAKREBS
GcMAF-THERAPIE

FIG. 8B

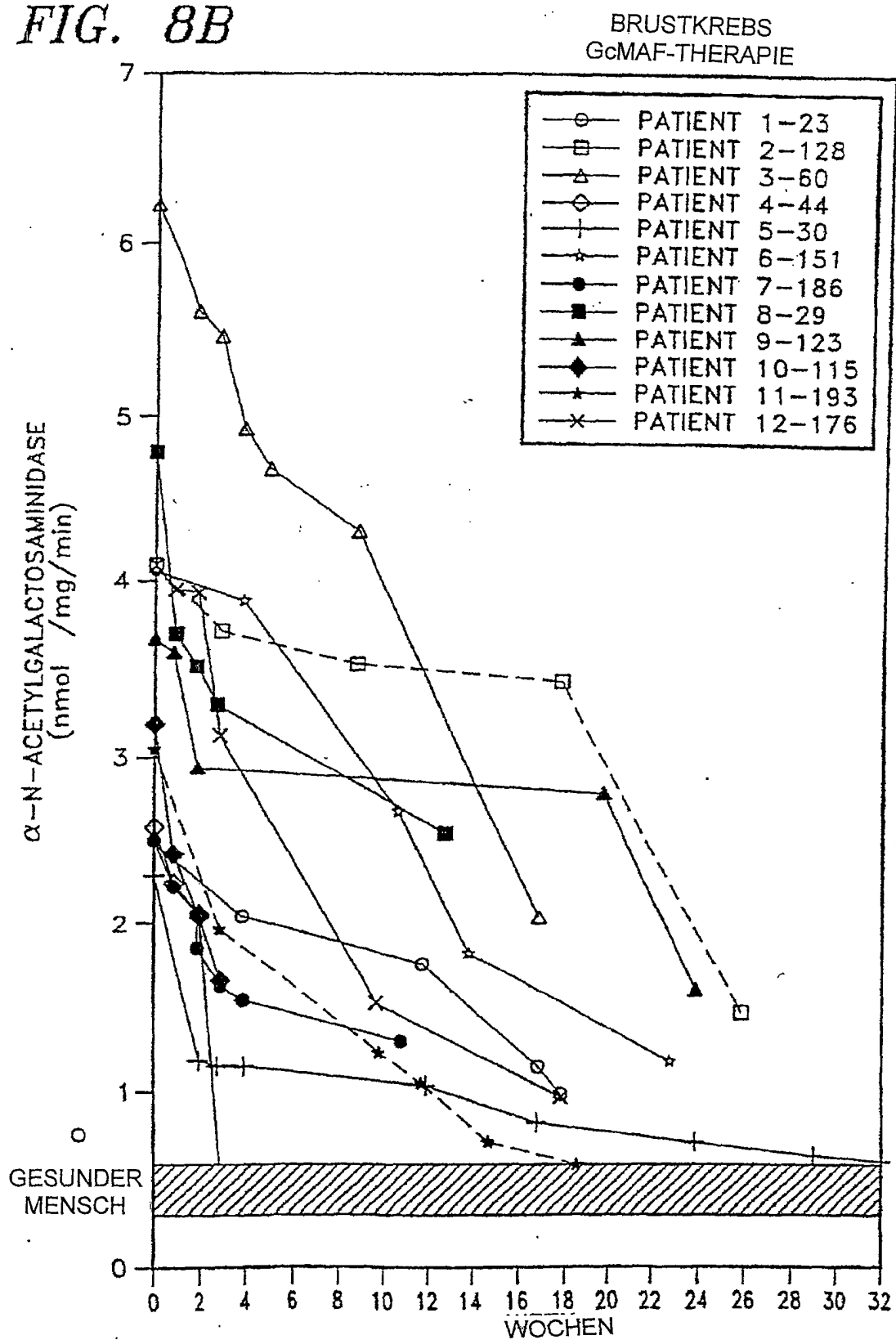


FIG. 8C

DICKDARMKREBS
GcMAF-THERAPIE