



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 602 13 596 T2 2007.09.13**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 397 154 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **602 13 596.6**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/EP02/07154**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **02 751 083.3**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2003/000280**

(86) PCT-Anmeldetag: **20.06.2002**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **03.01.2003**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **17.03.2004**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **02.08.2006**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **13.09.2007**

(51) Int Cl.⁸: **A61K 38/17 (2006.01)**

A61K 38/16 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61P 1/16 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

01202414 22.06.2001 EP

(73) Patentinhaber:

**Vlaams Interuniversitair Instituut voor
Biotechnologie vzw., Zwijnaarde, BE**

(74) Vertreter:

Huber & Schüssler, 81825 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

**BEYAERT, Rudi, B-9750 Zingem, BE; WIELOCKX,
Ben, B-9000 Gent, BE; VAN HUFFEL, Sofie, B-9630
Zwalm, BE; DELAEI, Filip, B-9051
Sint-Denijs-Westrem, BE; LIBERT, Claude, B-9700
Oudenaarde, BE**

(54) Bezeichnung: **ABIN ZUM SCHUTZ GEGEN HEPATITIS**

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

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

Beschreibung

Gebiet der Erfindung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung des A20-bindenden Inhibitors der NF- κ B Aktivierung (ABIN) zum Schutz vor einem mit TNF induzierten Leberversagen, wie beispielsweise einer viralen Hepatitis und einer alkoholischen Lebererkrankung. Insbesondere betrifft sie die Verhinderung der toxischen Wirkungen der Erkrankungen, einschließlich der Letalität, durch überexprimierendes ABIN.

Hintergrund der Erfindung

[0002] Ein akutes Leberversagen ist ein klinisches Syndrom, das aus einer massiven Nekrose und Apoptose von Leberzellen resultiert, was zu einer hepatischen Enzephalopathie und einer ernstesten Beeinträchtigung der Leberfunktion führt. Es wird durch unterschiedliche Krankheitsarten, wie beispielsweise einer viralen Hepatitis (A, B, C, ...), Medikamente, einer Intoxikation, autoimmunen Hepatitis usw. hervorgerufen. In vielen Studien wurde gezeigt, dass TNF bei einer Lebererkrankung eine zentrale Rolle spielt. TNF wird hauptsächlich durch aktivierte Makrophagen erzeugt, aber auch in kleineren Mengen durch mehrere andere Zellarten hergestellt. TNF übt eine Vielfalt von Wirkungen auf verschiedene Zellarten aus und ist als wichtiger Vermittler an verschiedenen physiologischen und pathophysiologischen Erkrankungen beteiligt. Darüber hinaus ist deutlich geworden, dass TNF ein wichtiger Vermittler bei der Apoptose (programmierter Zelltod) ist. TNF erhielt ursprünglich seine Bezeichnung aufgrund seiner Fähigkeit, hämorrhagische Nekrose von Tumoren bei Mäusen zu induzieren. Versuche, TNF für die systemische Antikrebstherapie zu verwenden, sind aufgrund des Auftretens von ernstesten Nebenwirkungen vor dem Erreichen von therapeutischen Dosen fehlgeschlagen. Eine der Nebenwirkungen einer TNF Behandlung war eine Erhöhung der Serumsniveaus von Transaminasen und Billirubin-niveaus, was eine direkte zytotoxische Wirkung von FNA auf humane Hepatozyten zeigt. In anschließenden Studien wurde gezeigt, dass TNF an einer viralen Hepatitis, alkoholischen Lebererkrankung und einem fulminanten Leberversagen beteiligt sein kann (Muto u.a., 1988; Bird u.a., 1990; Gonzalez-Amaro u.a., 1994; Diehl u.a., 1994; Larrea u.a., 1996). TNF Serumsniveaus sind bei Patienten mit fulminanter Hepatitis deutlich erhöht (Muto u.a., 1988). Darüber hinaus wurde festgestellt, dass TNF Serumsniveaus bei Patienten, die starben, signifikant höher waren als bei Patienten, die überlebten (Bird u.a., 1990).

[0003] Auf die Rolle von TNF bei der Pathogenese von chronischer viraler Hepatitis B und C Infektion ist hingewiesen worden. Beide Viren induzieren die TNF Expression in der humanen Leber und den humanen Hepatoma-Zelllinien (Gonzalez-Amaro u.a., 1994). Patienten mit chronischer Hepatitis B haben erhöhte Plasma-TNF-Niveaus und ihre peripheren mononukleären Blutzellen zeigen eine erhöhte TNF Produktion in vitro. Außerdem wurde bei chronischen, mit Hepatitis B infizierten Patienten, die sich einer Interferonbehandlung unterzogen, ein massiver Anstieg der spontanen TNF Produktion durch mononukleäre Blutzellen zur Zeit einer erfolgreichen Antigen-Serokonversion beobachtet (Diehl u.a., 1994), was nahe legt, dass die erhöhten TNF Niveaus an einer Hepatitis B Virus-Beseitigung beteiligt sein können. Weiterhin sind die Serumsniveaus von löslichem TNF-R1 und TNF-R2 bei einer chronischen Hepatitis-B-Infektion signifikant erhöht. Die Serumsniveaus von löslichem TNF-R2 korrelieren eng mit dem Umfang der Entzündung und dem Hepatozytentod in der Leber. Während der Interferontherapie stehen die Reaktion und der Anstieg der Transaminasen mit einer Erhöhung der löslichen TNF-R2 Serumsniveaus in Verbindung. Bei Hepatitis C Patienten beseitigt die Interferonbehandlung das Virus und reduziert die TNF Niveaus bei reagierenden Patienten auf normal (Larrea u.a., 1996). Interessanterweise waren die Vorbehandlungsniveaus von TNF bei nicht reagierenden Patienten im Vergleich zu reagierenden höher (Larrea u.a., 1996). Hepatitis C Proteine wechselwirken mit dem TNF-Rezeptor, obwohl nicht klar ist, ob diese Wechselwirkung die Apoptose fördert oder verhindert (Ray u.a., 1998). Vor kurzem ist eine Wechselwirkung zwischen dem Hepatitis-C-Virus NS5A Protein und den TNF-Rezeptor-assoziierten Proteinen TRADD und TRAF2 festgestellt worden (Majumder u.a., 2002; Park u.a., 2002). Park und Mitarbeiter haben gezeigt, dass NS5A die TNF-vermittelte hepatische Apoptose beeinträchtigt, indem die Verbindung zwischen TRADD und FADD verhindert wird. Darüber hinaus haben beide Gruppen auch gezeigt, dass NS5A die TRADD und TRAF2-vermittelte NF- κ B Aktivierung verhindert.

[0004] TNF Serumsniveaus sind bei Patienten mit alkoholischer Hepatitis erhöht, und die Niveaus korrelieren invers mit dem Überleben der Patienten. Die TNF Konzentrationen waren bei Patienten, die eine Episode einer akuten alkoholischen Hepatitis nicht überlebten, signifikant höher (Bird u.a., 1990).

[0005] Monozyten, die aus Patienten mit alkoholischer Hepatitis isoliert wurden, erzeugten spontan höhere Mengen an TNF im Vergleich zu gesunden Kontrollen. Monozyten, die von Patienten mit alkoholischer Hepatitis stammten, erzeugten in Ansprechnung auf LPS auch signifikant mehr TNF als normale Monozyten. Es sind

mehrere Hypothesen entwickelt worden, um erhöhte TNF Niveaus bei Patienten mit chronischer Ethanolexposition zu erklären. Eine chronische Ethanolzufuhr erhöht die Permeabilität des Darms für bakterielle Produkte, wie beispielsweise LPS, das potentiell die TNF Produktion in Makrophagen induziert (McClain, 1991). Darüber hinaus haben Studien, in denen der Promotorpolymorphismus bei Patienten mit alkoholischer Steatohepatitis untersucht wurde, gezeigt, dass Patienten mit alkoholischer Steatohepatitis eine Mutation im TNF Promotor aufwiesen, was zu einer Erhöhung der Aktivität führt (Grove u.a., 1997). Daher können genetische Faktoren an der erhöhten TNF Produktion bei Patienten mit alkoholischer Hepatitis beteiligt sein.

[0006] Die Rolle von TNF bei einer Leberschädigung ist in mehreren Tiermodellen untersucht worden. Durch die Neutralisation der anti-TNF Antikörper oder Knockout-Mäuse für TNF, TNF-R1 oder TNF-R2 hat sich gezeigt, dass TNF eine Apoptose und/oder Nekrose von Hepatozyten in vivo auslöst. Bei unterschiedlichen Tiermodellen einer Leberschädigung spielt TNF eine zentrale oder ergänzende Rolle bei der Pathogenese einer akuten Leberschädigung. Wir verwendeten in diesem Fall das TNF/Galactosamin (GAIN) Modell. Bei diesem Modell wird TNF in Kombination mit D-(+)-Galactosamin (GalN), einem Hepatotoxin, verabreicht, das selektiv die Transkription in Hepatozyten durch verringerte Uridinnukleotide blockiert (Dekker und Keppler, 1974), wodurch Letalität, eine Aktivierung von Caspasen und anschließende Hepatozytenapoptose induziert wird (Leist u.a., 1995; Van Molle u.a., 1999; Tiegs u.a., 1989). Die TNF-R1 Knockout-Mäuse sind gegenüber einer TNF/GalN Behandlung resistent, was die wesentliche Rolle von TNF-R1 bei diesem Apoptosemodell zeigt (Leist u.a., 1995). Die sensibilisierende Wirkung von GalN legt nahe, dass der mittels GalN induzierte Transkriptionsblock die Synthese von antiapoptotischen Proteinen hemmt. Vor kurzem ist gezeigt worden, dass der Transkriptionsfaktor NF- κ B die Expression einer Anzahl von antiapoptotischen Proteinen reguliert.

[0007] NF- κ B ist ein wesentlicher Transkriptionsfaktor, der in allen Zellarten allgegenwärtig exprimiert ist und dessen Aktivität durch eine breite Palette von Induktoren, einschließlich Cytokinen und bakteriellen und viralen Produkten, moduliert wird. Viele der NF- κ B-reaktiven Gene spielen eine Schlüsselrolle bei der Regulation von Entzündungs- und Immunreaktionen. Eine Deregulation der NF- κ B Aktivität wird oft bei einzelnen chronischen entzündlichen Erkrankungen, wie beispielsweise rheumatischer Arthritis, Asthma und entzündlicher Darmerkrankung, sowie bei akuten Erkrankungen, wie beispielsweise septischem Schock, beobachtet. Weiterhin dient NF- κ B dazu, vor Apoptose zu schützen, und es unterstützt die Zellzyklusprogression. Das erste Anzeichen, dass eine NF- κ B Aktivierung Hepatozytenreaktionen, die für eine Leberschädigung relevant sind, modulieren kann, war der Befund, dass Knockout-Mäuse mit einer unzureichenden p65/Rel-A Untereinheit von NF- κ B aufgrund einer massiven Hepatozytenapoptose während der Embryogenese nicht lebensfähig waren (Beg u.a., 1995). Neuere Berichte aus mehreren Laboratorien haben jetzt gezeigt, dass eine NF- κ B Aktivierung die Hepatozytenproliferation und Apoptose in vivo und in vitro reguliert. Bei Ratten, die einer teilweisen Hepatektomie ausgesetzt wurden, beeinträchtigte die Hemmung der NF- κ B Aktivierung eine anschließende Leberregeneration und löste eine Hepatozytenapoptose aus (Iimuro u.a., 1998). Diese Befunde legen eine kritische Rolle für die NF- κ B Aktivierung in Hepatozyten im Anschluss an einen mitogenen Impuls nahe, obwohl der Mechanismus, durch den die Hemmung der NF- κ B Aktivierung die Proliferation blockierte, unklar ist. Eine Apoptose kann aus einem Zellzyklusblock oder aus einer Sensibilisierung gegenüber TNF, das nach einer partiellen Hepatektomie erzeugt wurde, resultieren. Eine wesentliche Rolle bei der NF- κ B Aktivierung während einer Hepatozytenproliferation wird auch durch den Befund gestützt, dass eine Hemmung der NF- κ B Aktivität bei einer exponential wachsenden Maus-Hepatozyten-Zelllinie zu einer Apoptose führte (Bellas u.a., 1997). Allerdings haben andere Studien mit konfluenten Ratten-Hepatozytenkulturen gezeigt, dass eine NF- κ B Hemmung an sich nicht zu einem Zelltod führte (Xu u.a., 1998). Bei diesen Zellen wandelte die NF- κ B Hemmung die hepatozelluläre Reaktion auf den mitogenen Stimulus von TNF von einer Proliferation zu einer Apoptose um (Xu u.a., 1998). Der Mechanismus, durch den die NF- κ B Inaktivierung in diesen Studien die TNF induzierte Apoptose auslöste, umfasste die Aktivierung der Caspase-Kaskade, und der Zelltod konnte durch eine Caspasehemmung oder NO verhindert werden (Xu u.a., 1998).

[0008] Das/die NF- κ B-abhängige(n) Genprodukt(e), die die Hepatozyten vor einer TNF-induzierten Schädigung schützen, bleibt noch zu identifizieren. Mögliche Kandidatengene sind iNOS und Interleukin-6, da sie durch NF- κ B reguliert werden und ihre Genprodukte hepatoprotektive Wirkungen haben können. Es ist auch noch zu bestimmen, ob eine NF- κ B Aktivierung eine Hepatotoxizität von schädlichen Erregern, die nicht TNF sind, hemmt. Bei der Hepatoma-Zelllinie Hep G2 schützte eine Behandlung mit einer nicht toxischen Konzentration des Superoxidgenerators Menadion durch einen NF- κ B abhängigen Mechanismus vor anschließenden toxischen Dosen an Menadion oder H₂O₂ (Chen und Cederbaum, 1997). Allerdings haben Studien mit einer Ratten-Hepatozyten-Zelllinie gezeigt, dass eine Hemmung der NF- κ B Aktivität die Zellen nicht gegenüber einem Tod durch H₂O₂ oder Kupfer sensibilisierte, obwohl H₂O₂ und Kupfer eine NF- κ B Aktivierung induzierten und in toxischen Konzentrationen eine Apoptose bewirkten (Xu u.a., 1998). Eine NF- κ B Aktivierung kann daher einen Abwehrmechanismus stimulieren, der für den TNF-Todespfad spezifisch ist.

[0009] Die Möglichkeit, dass eine NF- κ B Aktivierung bei Hepatozyten nach einer Leberschädigung schützend ist, deutet auf die Komplexität von Fällen im Anschluss an eine allgemeine Aktivierung von NF- κ B in allen Zellarten in der Leber hin. Es ist bekannt, dass nach einem toxischen Stimulus die Aktivierung von NF- κ B in hepatischen Makrophagen zur Erzeugung von schädlichen Produkten, wie beispielsweise Zytokinen und reaktiven Sauerstoff-Zwischenprodukten, führt. Eine Hemmung der hepatischen NF- κ B Aktivierung wurde daher als potentielle Therapie für eine Leberschädigung angesehen. Es scheint nun, dass eine NF- κ B Signalisierung ein problematisches therapeutisches Ziel darstellt, da eine umfassende Hemmung der hepatischen NF- κ B Aktivierung sowohl zu günstigen als auch zu schädlichen Wirkungen führen kann.

[0010] Kürzlich ist ein beträchtlicher Fortschritt im Hinblick auf das Verstehen der Einzelheiten der Signalisierungswege, die eine NF- κ B Aktivierung in Ansprechung auf TNF und IL-1 regulieren und vermitteln, erzielt worden. Diese Zytokine wirken dahingehend, dass sie an spezifische Zelloberflächenrezeptoren binden, die wiederum die Rekrutierung einer Anzahl von spezifischen Adapterproteinen und die Aktivierung eines Kinasekomplexes einleiten, der den NF- κ B Hemmer I κ B phosphoryliert. Letzterer hält NF- κ B im Zytoplasma in einer inaktiven dimeren Form zurück. Wenn I κ B einmal phosphoryliert ist, ist es für eine Ubiquitinierung und einen anschließenden Abbau durch das Proteasom bestimmt, was die nukleäre Translokation von NF- κ B ermöglicht. Während Mitglieder der I κ B Familie als direkte Inhibitoren von NF- κ B umfassend untersucht wurden, ist berichtet worden, dass eine Anzahl anderer Proteine die von NF- κ B abhängige Genexpression negativ regulieren. Wir und andere haben bereits gezeigt, dass das Zinkfingerprotein A20 ein potenter Inhibitor der NF- κ B Aktivierung in Ansprechung auf TNF, IL-1, LPS und CD-40 ist (in Beyaert u.a., 2000 besprochen). Darüber hinaus übt A20 bei einer Anzahl von Zelllinien auch eine antiapoptotische Funktion aus. A20 wird nur nach einer NF- κ B Aktivierung exprimiert und ist an der negativen Rückkopplungsregulation der NF- κ B Aktivierung beteiligt. Es wurde vor kurzem gezeigt, dass A20-defiziente Mäuse eine gestörte Beendigung der NF- κ B Aktivierung aufweisen, was zu starken entzündlichen Reaktionen und einer Kachexie führt (Lee u.a., 2000). Die zugrunde liegenden Mechanismen, die für die Hemmung der NF- κ B abhängigen Genexpression durch A20 verantwortlich sind, sind noch unklar. A20 wechselwirkt mit dem I κ B Kinasekomplex sowie mit TRAF2 und TRAF6, die ein Teil der durch TNF bzw. IL-1/LPS eingeleiteten I κ B Kinaseaktivierungskaskade sind. Darüber hinaus wurden vor kurzem drei neue A20 Bindungsproteine (ABIN, ABIN-2 und ABIN-3) isoliert. Es wurde gezeigt, dass nach einer Überexpression in Zelllinien diese Proteine die NF- κ B-abhängige Genexpression in Ansprechung auf TNF oder IL-1 hemmen (Beyaert u.a., 2000; Heyninck u.a., 1999; Van Huffel u.a., 2001, Van Huffel u.a., nicht veröffentlicht; AJ 320534).

[0011] Die vorliegende Erfindung betrifft den überraschenden Befund, dass die Überexpression von ABIN eine TNF-induzierte letale Hepatitis bei Mäusen verhindert.

Kurze Beschreibung der Figuren

[0012] Fig. 1: Wirkung von AdABIN auf den TNF/GaIN-stimulierten Abbau von I κ B (oberes Bild) und die DNA Bindung von NF- κ B (unteres Bild) in vivo. Es wurde Mäusen $2,5 \times 10^9$ pfu Ad-ABIN, Ad-I κ B^S (= I κ B Superrepressor) oder AdRR5 (= leere Viruskontrolle) (i.v.) injiziert, die nach drei Tagen mit einer Injektion mit einer letalen TNF Dosis (0,3 μ g)/GaIN (20 mg), verdünnt in PBS, konfrontiert wurden. PBS als solches diente als Kontrolle. Die Mäuse wurden zu unterschiedlichen Zeiten nach der TNF/GaIN Behandlung getötet und es wurden Leberhomogenate hergestellt. Die I κ B α Expression wurde mittels SDS-PAGE und Immunoblotting mit polyklonalem anti-I κ B α Antikörper (oberes Bild) analysiert. Die NF- κ B DNA-Bindung wurde durch Inkubation von 10 μ g nukleärem Extrakt mit radiomarkierter Sonde analysiert und sich auf einem nativen Gel ausbreiten gelassen. Die Bindung von NF- κ B an die DNA-Sonde wurde durch Belichtung eines Röntgenfilms gezeigt (unteres Bild).

[0013] Fig. 2: Die Wirkung von AdABIN auf den TNF-vermittelten Zelltod in vitro. AdABIN, AdRR5 oder scheininfizierte BWTG3 Zellen wurden in 96er Platten gegeben und mit einer seriellen mTNF Verdünnung in Abwesenheit (oberes) oder Gegenwart von CHX (unteres) 8 Stunden lang stimuliert. Der Zelltod wurde nach Inkubation mit MTT analysiert.

[0014] Fig. 3: Die Wirkung von AdABIN auf TNF/GaIN induzierte bei Mäusen einen Körpertemperaturabfall. Die Mäuse erhielten $2,5 \cdot 10^9$ pfu AdABIN (n = 8) oder AdRR5 (= Kontrolle) (n = 9) (i.v.) injiziert und wurden 3 Tage danach mit 0,3 μ g TNF + 20 mg GaIN konfrontiert. Die Temperatur ($^{\circ}$ C) wurde jede Stunde bis 18 Stunden nach dem Konfrontieren gemessen.

[0015] Fig. 4: Die Wirkung von AdABIN auf die TNF/GaIN-induzierte Letalität. Die Mäuse erhielten $2,5 \cdot 10^9$ pfu AdABIN (n = 8) oder AdRR5 (= Kontrolle) (n = 9) (i.v.) injiziert und wurden 3 Tage danach mit 0,3 μ g TNF + 20

mg GAIN konfrontiert. Die Letalität wurde über einen Zeitraum von 72 h gemessen (es traten keine weiteren Todesfälle auf).

[0016] Fig. 5: Die Wirkung von AdABIN auf eine TNF/GaIN induzierte Freisetzung von Alanin-Aminotransferase (ALT) im Serum. Mit AdABIN oder AdRR5 infizierte Mäuse, die mit einer letalen Dosis von TNF/GaIN konfrontiert wurden, wurden 8 Stunden nach der Injektion ausbluten gelassen. Es wurde ein Serum hergestellt und die Serum ALT Werte gemessen (in U/L).

[0017] Fig. 6: Die Wirkung von AdABIN auf eine TNF/GaIN induzierte DNA-Fragmentierung in der Leber. Die Leber von mit AdABIN oder AdRR5 infizierten Mäusen wurde 8 Stunden nach deren Konfrontieren mit einer letalen Dosis von TNF/GaIN isoliert. Die DNA Fragmentierung wurde mittels ELISA gemessen und ist als % der Kontrollmäuse ausgedrückt (AdRR5).

[0018] Fig. 7: Die Wirkung von AdABIN auf eine TNF/GaIN induzierte Caspaseaktivität in Leberhomogenaten. Mit AdABIN oder AdRR5 infizierte Mäuse (jeweils n = 5) wurden 8 Stunden lang mit TNF + GaIN behandelt. 30 µg Leberhomogenat wurde auf seine proteolytische Aktivität auf Ac-DEVD.AMC getestet. Die proteolytische Aktivität ist als Steigerung der AMC Fluoreszenz als Funktion der Zeit ($\Delta F/\text{min}$) ausgedrückt.

[0019] Fig. 8: Die Wirkung von AdABIN auf die TNF/GaIN induzierte Spaltung von Caspase-3 in Leberhomogenaten. Mit AdABIN oder AdRR5 infizierte Mäuse wurden unbehandelt (n = 4) gelassen oder ihnen wurde 8 Stunden lang TNF + GAIN injiziert. Es wurden Leberhomogenate hergestellt, Proteine durch 15 % SDS-PAGE getrennt und mittels eines polyklonalen anti-Caspase-3 Antikörpers immungeblottet. Inaktive pro-Caspase-3 sowie die p20 Untereinheit von Caspase-3, die proteolytisch freigesetzt wird, sind mit einem Pfeil angegeben.

[0020] Fig. 9: Vergleich von AdABIN und AdIkBs auf die TNF/GaIN-induzierte Letalität. Die Mäuse erhielten $2,5 \cdot 10^9$ pfu AdABIN (n = 5), AdIkBs^s (n = 5) oder AdRR5 (= Kontrolle) (n = 9) (i.v.) injiziert und wurden 3 Tage danach mit 0,3 µg TNF + 20 mg GaIN konfrontiert. Die Letalität wurde über einen Zeitraum von 7 Tagen gemessen.

[0021] Fig. 10: Die Wirkung von AdABIN auf die anti-Fas induzierte Letalität. Die Mäuse erhielten $2,5 \cdot 10^9$ pfu AdABIN (n = 3) oder AdRR5 (= Kontrolle) (n = 3) (i.v.) injiziert und wurden 3 Tage danach mit 10 µg anti-Fas konfrontiert. Die Letalität wurde über einen Zeitraum von 5 h gemessen.

[0022] Fig. 11: Die Wirkung von AdABIN auf die TNF/ActD-induzierte Letalität. Die Mäuse erhielten $2,5 \cdot 10^9$ pfu AdABIN (n = 5) oder AdRR5 (= Kontrolle) (n = 5) (i.v.) injiziert und wurden 3 Tage danach mit 0,3 µg TNF + 20 µg ActD (Actinomycin D) konfrontiert. Die Letalität wurde über einen Zeitraum von 35 h gemessen.

Ausführliche Beschreibung der Erfindung

[0023] Ein erster Aspekt der Erfindung betrifft die Verwendung von ABIN, wie in SEQ ID N°2 dargestellt, oder einem funktionellen Fragment oder einer Variante davon zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung eines mittels TNF induzierten Leberversagens. Der Begriff „ABIN“ betrifft ABIN, ABIN-2 und ABIN-3, wie in Beyaert u.a., 2000; Heyninck u.a., 1999; Van Huffel u.a., 2001, Van Huffel u.a. (nicht veröffentlicht; AJ 320534) und WO 99/57133 offenbart. Insbesondere betrifft der Begriff ABIN jedes Polypeptid, das die Konsensusaminosäuresequenz(en) umfasst, wie in SEQ ID N° 4 und/oder SEQ ID N° 5 gezeigt, die auch in der hier durch Bezugnahme mit aufgenommene WO 99/57133 offenbart sind. Ein zweiter Aspekt der Erfindung betrifft die Verwendung von eine Nukleotidsequenz kodierendem ABIN, wie in SEQ ID N° 1 dargestellt, oder einem funktionellen Fragment oder einer Variante davon zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung eines TNF-induzierten Leberversagens. Ein funktionelles Fragment von ABIN ist ein Polypeptid, das noch in der Lage ist, mit Protein A20 wechselzuwirken, und/oder in der Lage ist, die NF-κB Aktivierung zu modulieren. Vorzugsweise handelt es sich bei dieser Modulation um eine Hemmung der NF-κB Aktivierung. Funktionelle Fragmente sind als nicht beschränkendes Beispiel Fragmente, die mindestens die Aminosäuren 420-647 von SEQ ID N° 2, vorzugsweise mindestens die Aminosäuren 390-647, besonders bevorzugt mindestens 54-647 (SEQ ID N° 3), umfassen. Bevorzugt besteht das Fragment im Wesentlichen mindestens aus den Aminosäuren 420-647 von SEQ ID N° 2, vorzugsweise mindestens aus den Aminosäuren 390-647, besonders bevorzugt mindestens aus 54-647 (SEQ ID N° 3). Varianten sind Polypeptide mit mindestens 65 % Identität auf dem Aminosäureniveau, bevorzugt 70 % Identität, wie mittels BLAST gemessen (Altschul u.a., 1997). Varianten haben gemeinsame Charakteristika, wie beispielsweise die biologische Aktivität, immunologische Reaktivität, Konformation usw. Als nicht beschränkendes Beispiel werden Naf1 alpha Protein (AJ 011895), Naf1 beta Protein (AJ 011896) und virion-assoziiertes nukleäres pendelndes Protein (AY 012155) als Varianten in Betracht gezogen.

[0024] Ein weiterer Aspekt ist die Verwendung von Phytohämagglutinin (PHA), einer ABIN induzierenden Verbindung (Gupta u.a., 2000), zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von TNF-induziertem Leberversagen.

[0025] Das TNF-induzierte Leberversagen ist als nicht beschränkendes Beispiel eine virale Hepatitis, wie beispielsweise Hepatitis A, B oder C, eine fulminante Hepatitis und/oder eine alkoholische Lebererkrankung. Im Fall der Verwendung einer Nukleinsäure ist das Medikament für eine Gentherapiebehandlung vorzugsweise zur Abgabe der Nukleinsäure in die Zelle gedacht. Eine große Zahl von Abgabeverfahren ist dem Fachmann bekannt. Vorzugsweise werden die Nukleinsäuren für in vivo oder ex vivo Gentherapie Zwecke verabreicht. Nicht virale Vektorabgabesysteme umfassen DNA Plasmide, nackte Nukleinsäure und mit einem Abgabeträger, wie beispielsweise einem Liposom, komplexierte Nukleinsäure. Virale Vektorabgabesysteme umfassen DNA und RNA Viren, die nach der Abgabe an die Zelle entweder episomale oder integrierte Genome aufweisen. Verfahren der nicht viralen Abgabe von Nukleinsäuren umfassen die Lipofektion, Mikroinjektion, Biolistik, Virosome, Liposome, Immunoliposome, Polykation oder Lipid: Nukleinsäurekonjugate, nackte DNA, künstliche Virionen und die mittels Agenzien verstärkte DNA-Aufnahme. Die Lipofektion ist zum Beispiel im US-Patent Nr. 5,049,386, US-Patent Nr. 4,946,787 und im US-Patent Nr. 4,897,355 beschrieben und die Lipofektionsreagenzien werden kommerziell vertrieben (z.B. Transfectam™ und Lipofectin™). Kationische und neutrale Lipide, die für die wirksame Rezeptor-Erkennungs-Lipofektion von Polynukleotiden geeignet sind, umfassen die von Flegner, WO 91/17424, WO 91/6024. Die Abgabe kann an Zellen (ex vivo Verabreichung) oder Zielgewebe (in vivo Verabreichung) erfolgen. Die Lipidherstellung: Nukleinsäurekomplexe, einschließlich Zielliposome, wie beispielsweise Immunolipidkomplexe, ist dem Fachmann bekannt (siehe z.B. Crystal, 1995; Blaese u.a., 1995; Behr, 1994; Remy u.a., 1994; Gao und Huang, 1995; US-Patent Nr. 4,186,183, 4,217,344, 4,235,871, 4,261,975, 4,485,054, 4,501,728, 4,774,085, 4,837,028 und 4,946,787). Die Verwendung von Systemen auf RNA oder DNA Virusbasis zur Abgabe von Nukleinsäuren nutzen die hoch entwickelten Verfahren zum Richten eines Virus auf bestimmte Zellen im Körper und zum Übertragen der viralen Ladung auf den Kern aus. Virale Vektoren können den Patienten direkt verabreicht werden (in vivo) oder sie können dazu verwendet werden, Zellen in vitro zu behandeln, und die modifizierten Zellen werden an die Patienten verabreicht (ex vivo). Herkömmliche Systeme auf Virusbasis zur Abgabe von Nukleinsäuren könnten retrovirale, lentivirale, adenovirale oder adenoassozierte und Herpes simplex Virus-Vektoren für den Gentransfer aufweisen. Virale Vektoren sind gegenwärtig das wirksamste und vielseitigste Verfahren eines Gentransfers in Zielzellen und -geweben. Eine Integration in dem Wirtsgenom ist mit retroviralen, lentiviralen und adenoassozierten Virusgentransferverfahren möglich, was oft zu einer langfristigen Expression des eingeführten Transgens führt. Außerdem sind bei vielen unterschiedlichen Zellarten und Zielgeweben hohe Transduktionswirksamkeiten beobachtet worden.

[0026] In den Fällen, in denen die transiente Expression der Nukleinsäure bevorzugt ist, werden typischerweise Systeme auf Adenovirusbasis, einschließlich replikationsdefiziente Adenovirusvektoren, verwendet. Vektoren auf Adenovirusbasis sind bei vielen Zelltypen zu einer sehr hohen Transduktionseffizienz in der Lage und verlangen keine Zellteilung. Mit solchen Vektoren werden ein hoher Titer und Expressionsniveaus erhalten. Dieser Vektor kann in großen Mengen in einem relativ einfachen System erzeugt werden. Adenoassozierte Virus („AAV“) Vektoren, einschließlich rekombinante adenoassozierte Virusvektoren, werden auch dazu verwendet, um Zellen mit Zielnukleinsäuren, z.B. bei der in vitro Produktion von Nukleinsäuren und Peptiden und für die in vivo und ex vivo Gentherapieverfahren, zu transduzieren (siehe z.B. US-Patent Nr. 4,797-368; WO 93/24641; Kotin, 1994; Muzyczka. Die Konstruktion von rekombinanten AAV-Vektoren wird in einer Anzahl von Publikationen beschrieben, einschließlich dem US-Patent Nr. 5,173,414; Hermonat & Muszyczka, 1984; Samulski u.a., 1989).

[0027] Die Gentherapievektoren können in vivo durch Verabreichung an einen einzelnen Patienten abgegeben werden, typischerweise durch systemische Verabreichung (z.B. intravenös, intraperitoneal, intramuskulär, subdermal oder intrakranielle Infusion) oder topische Anwendung. Alternativ können Vektoren ex vivo an Zellen abgegeben werden, zum Beispiel aus einem einzelnen Patienten explantierte Zellen (z.B. Lymphozyten, Knochenmarksaspiraten, Gewebebiopsie) oder universelle hämatopoetische Donor-Stammzellen, und anschließend die Zellen dem Patienten, gewöhnlich nach einer Selektion auf Zellen, die den Vektor aufgenommen haben, reimplantiert werden. Eine ex vivo Zelltransfektion für die Diagnostik, Forschung oder für die Gentherapie (z.B. über Re-Infusion der transfizierten Zellen in den Wirtorganismus) ist dem Fachmann bekannt. In einer bevorzugten Ausführungsform werden die Zellen vom vorliegenden Organismus isoliert, mit einer Nukleinsäure (Gen oder cDNA) transfiziert und wieder in den vorliegenden Organismus (z.B. Patient) infundiert. Dem Fachmann sind verschiedene Zellarten, die für eine ex vivo Transfektion geeignet sind, bekannt (siehe z.B. Freshney u.a., 1994 und die hier angegebenen Bezugnahmen zur Erörterung, wie Zellen aus Patienten zu isolieren und zu kultivieren sind).

[0028] In einer weiteren Ausführungsform stellt die Erfindung ein Verfahren zur Erzeugung oder Herstellung eines Medikaments oder einer pharmazeutischen Zusammensetzung, umfassend ABIN oder ein funktionelles Fragment oder eine Variante davon, und weiterhin das Mischen des Polypeptids mit einem pharmazeutisch annehmbaren Träger zur Verfügung.

[0029] Die Verabreichung der pharmazeutischen Zusammensetzung kann über die orale, inhalierte oder parenterale Verabreichung erfolgen. Die aktive Verbindung kann allein verabreicht werden oder vorzugsweise als pharmazeutische Zusammensetzung formuliert sein. Eine Doseinheit enthält normalerweise 0,01 bis 50 mg, zum Beispiel 0,01 bis 10 mg, oder 0,05 bis 2 mg, Verbindung oder ein pharmazeutisch annehmbares Salz davon. Doseinheiten werden normalerweise einmal oder mehr als einmal täglich, zum Beispiel 2-, 3- oder 4-mal täglich, üblicherweise 1- bis 3-mal täglich, verabreicht, so dass die tägliche Gesamtdosis normalerweise im Bereich von 0,0001 bis 1 mg/kg liegt; daher ist die geeignete tägliche Gesamtdosis für einen 70 kg schweren Erwachsenen 0,01 bis 50 mg, zum Beispiel 0,01 bis 10 mg oder üblicherweise 0,05 bis 10 mg. Es ist ganz besonders bevorzugt, dass die Verbindung oder ein pharmazeutisch annehmbares Salz davon in Form einer Doseinheitszusammensetzung, wie beispielsweise einer oralen, parenteralen oder inhalierten Doseinheitszusammensetzung, verabreicht wird. Solche Zusammensetzungen werden durch Mischen hergestellt und sind für die orale, inhalierte oder parenterale Verabreichung in geeigneter Weise angepasst und können als solches in Form von Tabletten, Kapseln, oralen flüssigen Präparaten, Pulvern, Granulat, Pastillen, rekonstituierbaren Pulvern, injizierbaren und infusionsfähigen Lösungen oder Suspensionen oder Suppositorien oder Aerosolen vorliegen. Tabletten und Kapseln für die orale Verabreichung liegen gewöhnlich in einer Doseinheit vor und enthalten übliche Hilfsstoffe, wie beispielsweise Bindemittel, Füllstoffe, Verdünnungsmittel, Tablettierungsmittel, Gleitmittel, Abbaumittel, Farbstoffe, Geschmacksstoffe und Netzmittel. Die Tabletten können gemäß auf dem Fachgebiet weithin bekannter Verfahren überzogen werden. Geeignete verwendbare Füllstoffe umfassen Cellulose, Mannit, Lactose und andere ähnliche Agenzien. Geeignete Abbaumittel beinhalten Stärke, Polyvinylpyrrolidon und Stärkederivate, wie beispielsweise Natriumstärkeglycollat. Geeignete Gleitmittel umfassen zum Beispiel Magnesiumstearat. Geeignete pharmazeutisch annehmbare Netzmittel umfassen Natriumlaurylsulfat. Diese festen oralen Zusammensetzungen können durch herkömmliche Verfahren des Mischens, Füllens, Tablettierens oder dergleichen hergestellt werden. Es können wiederholte Mischvorgänge angewendet werden, um den Wirkstoff über die Zusammensetzungen zu verteilen, die große Mengen an Füllstoffen verwenden. Solche Vorgänge sind natürlich auf dem Fachgebiet üblich. Orale flüssige Präparate können zum Beispiel in Form von wässrigen oder öligen Suspensionen, Lösungen, Emulsionen, Sirupen oder Elixieren vorliegen oder können als Trockenprodukt zur Rekonstitution mit Wasser oder einem anderen geeigneten Träger vor der Verwendung dargeboten werden. Solche flüssigen Präparate können herkömmliche Additive, wie beispielsweise Suspendierungsmittel, zum Beispiel Sorbit, Sirup, Methylcellulose, Gelatine, Hydroxyethylcellulose, Carboxymethylcellulose, Aluminiumstearatgel oder hydrierte essbare Fette, Emulgiermittel, zum Beispiel Lecithin, Sorbitmonooleat, oder Akazia; nicht wässrige Träger (wie essbare Öle aufweisen könne) zum Beispiel Mandelöl, fraktioniertes Kokosnussöl, ölige Ester, wie beispielsweise Ester von Glycerin, Propylenglycol oder Ethylalkohol; Konservierungsstoffe, zum Beispiel Methyl- oder Propyl-p-hydroxybenzoat oder Sorbinsäure, und gewünschtenfalls herkömmliche Geschmacks- und Farbstoffe enthalten. Orale Formulierungen weisen auch herkömmliche Formulierungen mit anhaltender Freisetzung, wie beispielsweise Tabletten oder Granulat mit einem enterischen Überzug, auf. Vorzugsweise werden Inhalationszusammensetzungen zur Verabreichung an die Atemwege zum Schnupftabak oder als Aerosol oder Lösung für einen Vernebler oder als mikrofeines Pulver für die Insufflation allein oder in Kombination mit einem inerten Träger, wie beispielsweise Lactose, dargeboten. In einem solchen Fall haben die Partikel der Wirkverbindung geeigneterweise einen Durchmesser von unter 50 µm, vorzugsweise unter 10 µm, zum Beispiel zwischen 1 und 5 µm, wie beispielsweise 2 und 5 µm. Eine bevorzugte Inhalationsdosis liegt im Bereich von 0,05 bis 2 mg, zum Beispiel 0,05 bis 0,5 mg, 0,1 bis 1 mg oder 0,5 bis 2 mg. Für die parenterale Verabreichung werden fluide Doseinheitsformen hergestellt, die eine Verbindung der vorliegenden Erfindung und einen sterilen Träger enthalten. Die Wirkverbindung kann abhängig von dem Träger und der Konzentration entweder suspendiert oder gelöst sein. Parenterale Lösungen werden normalerweise durch Lösen der Verbindung in einem Träger und Sterilfiltrieren vor dem Füllen in eine geeignete Phiole oder Ampulle und Versiegeln hergestellt. Vorteilhafterweise werden Hilfsstoffe, wie beispielsweise ein Lokalanästhetikum, Konservierungsstoffe und Puffermittel, auch in dem Träger gelöst. Um die Stabilität zu erhöhen, kann die Zusammensetzung nach dem Füllen in die Phiole gefroren und das Wasser im Vakuum entfernt werden. Parenterale Suspensionen werden im Wesentlichen auf dieselbe Weise hergestellt, mit der Ausnahme, dass die Verbindung im Träger suspendiert anstatt durch Einwirkung von Ethylenoxid vor dem Suspendieren im sterilen Träger gelöst und sterilisiert wird. Vorteilhafterweise umfasst die Zusammensetzung eine oberflächenwirksame Substanz oder ein Netzmittel, um die gleichförmige Verteilung der Wirkverbindung zu erleichtern. Gegebenenfalls können kleine Mengen an Bronchodilatoren, zum Beispiel sympathomimetische Amine, wie beispielsweise Isoprenalin, Isoetharin, Salbutamol, Phenylephrin und Ephedrin, Xanthinderivate, wie beispielsweise Theophyllin und Aminophyllin, und Corticosteroide, wie beispielsweise

Prednisolon, und adrenale Stimulanzen, wie beispielsweise ACTH, enthalten sein. Üblicherweise werden den Zusammensetzungen normalerweise schriftliche oder gedruckte Anleitungen zur Verwendung bei der betreffenden medizinischen Behandlung beigelegt.

[0030] Im Hinblick auf die Proteintransduktion mit ABIN oder ABIN Fragmenten in Zielzellen ist gezeigt worden, dass eine Reihe von kleinen Proteindomänen, die Proteintransduktionsdomänen (PTD) genannt werden, biologische Membranen wirksam und unabhängig von Transportern oder bestimmten Rezeptoren durchqueren und die Abgabe von Peptiden und Proteinen in die Zellen fördern. Zum Beispiel ist das TAT Protein des humanen Immundefektvirus (HIV-1) in der Lage, biologisch aktive Proteine in vivo abzugeben. In ähnlicher Weise fördern die dritte alpha-Helix der Antennapedia Homeodomäne und das VP22 Protein des Herpes simplex Virus die Abgabe von kovalent gebundenen Peptiden oder Proteinen in die Zellen (besprochen in Ford u.a. 2001). Die Proteinabgabe beruht auf einem kurzen amphipathischen Peptidträger, Pep-1, und ist für die Abgabe einer Vielzahl von Peptiden und Proteinen in mehrere Zelllinien in einer vollständig biologisch aktiven Form wirksam, ohne dass die Notwendigkeit nach einer vorherigen chemischen kovalenten Bindung besteht (Morris u.a., 2001). Die Fähigkeit von chimären VP22 Proteinen, sich von der primären transduzierten Zelle zu den umgebenden Zellen auszubreiten, kann die Gentherapieansätze verbessern (Zender u.a., 2002).

[0031] Das Protein kann auch über Liposome abgegeben werden. Liposome werden als Träger für die Medikamentenabgabe und Gentherapie verwendet und es wurde gezeigt, dass sie ein beträchtliches Potential beim Anvisieren auf bestimmte Zellarten der Leber haben. Daher kann die Verwendung von Liposomen die Zielwirksamkeit bei der Behandlung einer Vielzahl von Lebererkrankungen verbessern (Wu und Zerm, 1999).

Definitionen

[0032] Die Nukleotidsequenz, wie hier verwendet, betrifft eine polymere Form von Nukleotiden jeder Länge, entweder Ribonukleotide oder Desoxyribonukleotide. Dieser Begriff betrifft nur die primäre Struktur des Moleküls. Daher weist dieser Begriff doppel- und einsträngige DNA und RNA auf. Er umfasst auch bekannte Modifikationsarten, zum Beispiel die Methylierung, die „caps“ Substitution von einem oder mehr der natürlich auftretenden Nukleotiden mit einem Analog. Die Überexpression, wie sie hier verwendet wird, bedeutet, dass die transformierten Zellen tatsächlich mehr von dem überexprimierten Protein erzeugen, als die nicht transformierte Kontrolle, wenn sie bei denselben Bedingungen gehalten werden. Vorzugsweise wird eine Überexpression durch Platzieren der kodierenden Sequenz stromabwärts von einem konstitutiven Promotor erhalten.

[0033] Eine kodierende Sequenz ist eine Nukleotidsequenz, die in die mRNA transkribiert und/oder in ein Polypeptid translatiert wird, wenn sie unter die Kontrolle von geeigneten regulatorischen Sequenzen gestellt wird. Die Grenzen der kodierenden Sequenz werden durch ein Translationsstartkodon am 5' Terminus und ein Translationsstoppkodon am 3'-Terminus festgelegt. Eine kodierende Sequenz kann mRNA, cDNA, rekombinante Nukleotidsequenzen oder genomische DNA aufweisen, ist aber nicht darauf beschränkt, während unter bestimmten Umständen auch Introns vorhanden sein können.

[0034] Protein A20 (A20') steht für das TNF induzierte Zinkfingerprotein, das von Dixit u.a., 1990; Opipari u.a., 1990 und Tewari u.a., 1995 beschrieben ist, oder ein aktives Fragment davon, wie beispielsweise der Zinkfinger enthaltende Teil (Aminosäuren 387-790 von humanem A20, Aminosäuren 369-775 von Maus A20).

[0035] Die Begriffe Protein und Polypeptid, wie sie in der vorliegenden Anmeldung verwendet werden, sind austauschbar. Polypeptid betrifft ein Polymer von Aminosäuren und bezieht sich nicht auf eine spezifische Länge des Moleküls: Dieser Ausdruck umfasst auch posttranslationale Modifikationen des Polypeptids, wie beispielsweise die Glycosylierung, Phosphorylierung und Acetylierung.

[0036] I κ B Superrepressor (I κ B^{sr}) steht für eine nicht abbaubare Mutantenform von I κ B- α mit S32A und S36A Mutationen, die NF- κ B in einem cytosolischen Proteinkomplex einschließt, wodurch die nukleäre Wirkung verhindert wird.

Beispiele

Beispiel 1: Erzeugung des ABIN Adenovirus

[0037] Die Maus ABIN cDNA, die N-terminal an ein E-t fusioniert war, wurde mittels PCR mit Vorwärtsprimern (5'cgggatccgcatgggtgcccgtgcc3') und Rückwärtsprimern (5'ccccaagcttaaatgaccactgcagcc3') amplifiziert, die Restriktionsstellen für BamHI bzw. HindIII enthielten. Das sich ergebende Fragment wurde in einen mit

BamHI und HindIII geöffneten pLpA.CMV Shuttle-Vektor kloniert (Gomez-Foix u.a., 1992) und mit pJM17 (McGroarty u.a., 1988) durch DNA/Calciumphosphat-Kopräzipitation in 911 Retinazellen kotransfiziert. Die in vivo Rekombination des Shuttle-Vektors, der das ABIN Transgen exprimiert, mit dem pJM17 Gerüst führte zur Herstellung eines replikationsdefizienten E1-deletierten Adenovirus vom Typ 5 (AdABIN). Ein Kontrollvirus (AdRR5), das kein Transgen exprimiert, wurde auf eine ähnliche Weise erzeugt: Nach der Rekombination wurde rekombinante Plaque isoliert, extrahierte DNA mittels PCR verifiziert und die Expression des passenden Transgens mittels Western Blotting bestätigt. Hochtitrige Virusbestände wurden in HEK293 Zellen erzeugt und über eine CsCl Bändelung gereinigt. Der infektiöse Einheitstiter wurde in einem Plaque-Assay bestimmt, der auf konfluenten HEK293 Zellen mit unterschiedlichen Virusverdünnungen durchgeführt wurde. Die Plaque von lysierten Zellen wurde gezählt und als Plaque bildende Einheiten (pfu) pro ml Virusbestand berechnet.

Beispiel 2: Expression von ABIN in vitro nach Infektion mit AdABIN

[0038] AdABIN wurde auf Expression des Transgens in der BWTG3 Hepatoma-Zelllinie getestet (Szpirer und Szpirer, 1975). Eine Infektion mit AdABIN wurde bei der Multiplizität der Infektion (mol) 100:1 durchgeführt. Die Zellen wurden mit dem Virus in einem minimalen Volumen an serumfreiem Medium 2 Stunden lang inkubiert, wonach das Serum enthaltende Medium für eine Inkubation über Nacht zugesetzt wurde. Zum Kontrollieren der Expression von ABIN wurden die Zellen 24 Stunden nach der Infektion lysiert und mittels SDS-PAGE und Immunoblotting mit HRP-gekoppelten anti E-tag Antikörpern (Amersham) analysiert. Eine Infektion mit AdABIN führte zu einer klaren Expression von ABIN (Daten nicht gezeigt).

[0039] Die Wirksamkeit der Infektion und des subzellulären Expressionsmusters von ABIN wurde durch Immunfluoreszenz analysiert. In diesem Fall wurden Zellen aufgespaltet und 24 Stunden nach der Infektion auf die Deckgläschen ausgesät. Weitere 24 Stunden später wurden die Zellen gewaschen, mit 100 % Methanol bei -20°C 10 Minuten lang fixiert und mit 1 % Triton X-100 10 Minuten lang bei Raumtemperatur permeabilisiert. Nach dem Blockieren mit 0,5 % BAS für 30 Minuten wurden die Zellen mit einer Verdünnung von monoklonalem anti-E-tag Antikörper (Amersham) von 1/3000 90 Minuten lang und mit einer Verdünnung von Alexa Fluor 488 Ziegen anti-Maus IgG (molekulare Sonden) Antikörper von 1/600 90 Minuten lang inkubiert. Nach dem nukleären DAPI Färben wurden Deckgläschen mit Vectashield (Vector Laboratories) angebracht und mit einem Leica DM-IL Mikroskop analysiert. Dies zeigte, dass die Wirksamkeit der Infektion über 90 % lag und dass ABIN ausschließlich im Zytoplasma lokalisiert war (Daten nicht gezeigt).

Beispiel 3: Hemmung der TNF-induzierten NF κ B-abhängigen Genexpression in vitro durch AdABIN

[0040] Um die Wirkung von ABIN auf die NF- κ B-abhängige Genexpression zu analysieren, wurden Zellen mit pNFconluc 24 Stunden nach der Infektion transfiziert. Letzterer trägt ein Luciferase-Reportergen, dem ein minimaler Promotor und drei NF- κ B Bindungsstellen vorausgehen (Kimura u.a., 1986). Die Transfektion wurde mittels des FuGene Transfektionsreagens gemäß den Anweisungen des Herstellers (Roche Biochemicals) durchgeführt. Es wurde ein FuGene: DNA-Verhältnis von 6:1 verwendet und FuGene: DNA-Gemische wurden 45 min vor der Zugabe zu den Zellen für 24 Stunden in frischem komplettem Medium vorinkubiert. Die Zellen wurden auf 24er Platten ausgesät und 24 Stunden lang inkubiert. Dann wurden die Zellen entweder unbehandelt gelassen oder mit 1000 IE/ml bzw. IE/ml TNF stimuliert. Nach sechs Stunden wurden alle Zellen in 100 μ l Lysepuffer (25 mM Tris-Phosphat, pH 7,8, 2 mM DTT, 2 mM CDTA, 10 % Glycerin und 1 % Triton X-100) lysiert. Die Luc und Gal Aktivitäten wurden wie zuvor beschrieben (De Valck u.a., 1996) analysiert. Die Luc Werte wurden gegenüber den Gal Werten standardisiert, um Unterschiede bei der Transfektionswirksamkeit auszugleichen (aufgetragen als luc/gal). Die AdABIN Infektion verhinderte eine NF- κ B-abhängige Luciferase-Expression in Ansprehung auf TNF, während die AdRR5-Infektion keine Wirkung hatte.

[0041] Die Beobachtung, dass I κ B Niveaus nach einer ABIN Expression nicht geändert wurden, legt nahe, dass ABIN die nukleäre Translokation des NF- κ B Dimers nicht beeinflusst. Um die Wirkung von ABIN auf das Vorhandensein von nukleärem NF- κ B und die Bindung an eine NF- κ B spezifische DNA Sonde zu analysieren, wurden Zellen unbehandelt gelassen oder 24 h nach der Infektion 30 min lang mit 1000 IE/ml mTNF behandelt. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen, von der Platte gekratzt und zum Sammeln der Zellen 30 sec lang bei 12000x zentrifugiert.

Beispiel 4: ABIN hemmt den TNF-vermittelten Zelltod nicht signifikant.

[0042] Um zu untersuchen, ob ABIN eine Wirkung auf den TNF-vermittelten Zelltod hatte, wurden AdABIN, AdRR5 oder scheininfizierte BWTG3-Zellen mit TNF oder Kombinationen von TNF und Cycloheximid (CHX) inkubiert. Insbesondere wurden 24 Stunden nach der Infektion Zellen in 96er Platten bei einer Dichte von $4 \times$

10^4 Zellen pro Vertiefung ausgesät. Weitere 24 Stunden später wurden Zellen mit Verdünnungen von mTNF allein oder mit einer Verdünnungskombination von TNF und einer konstanten Konzentration (10 µg/ml) CHX stimuliert. Der Zelltod wurde mikroskopisch beobachtet und durch Inkubation der Zellen mit 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) quantitativ bestimmt (Tada u.a., 1986). Nach dem Lösen der gebildeten Kristalle wurde das Absorptionsvermögen in einem Immunoleser (Biorad) bei einer Wellenlänge von 595 nm bestimmt, wobei 655 nm als Referenzwellenlänge diente. TNF allein hatte keine zytotoxische Wirkung auf BWTG3 Zellen, während eine TNF + CHX Behandlung den Zelltod durch Apoptose bewirkte. Eine Infektion mit AdABIN allein lieferte einen begrenzten Schutz vor niedrigen TNF Dosen, während es überhaupt keinen Schutz bei höheren TNF Dosen gab ([Fig. 2](#)).

Beispiel 5: Expression von ABIN in der Leber von AdABIN infizierten Mäusen

[0043] AdABIN wurde auf Expression des Transgens und seine biologische Aktivität in vivo durch Injektion von C57BU6 Mäusen mit $2,5 \times 10^9$ pfu AdABIN in die Schwanzvene getestet. 1 bis 6 Tage nach der Infektion wurden die Mäuse geopfert und die Leber isoliert. Ein Drittel der Leber wurde in kleine Stücke geschnitten und durch Douncen in Lysepuffer (1 % NP-40, 200 mM NaCl, 10 mM Tris-Cl, pH 7,5, 5 mM EDTA, 10 % Glycerin), ergänzt mit 0,1 mM Aprotinin, 1 mM PMSF und 1 mM Gluthation, homogenisiert. Nach 20 minütiger Inkubation auf Eis wurden die Homogenate 30 min lang bei maximaler Drehzahl in einer Tisch-Zentrifuge bei 4°C zentrifugiert. Die Proteinkonzentrationen wurden mittels Bradford-Analyse (Biorad) bestimmt. 50 µg Protein wurde einer SDS-PAGE unterworfen und mit HRP gekoppelten anti E-tag Antikörper (Amersham) immungeblottet. Die Signale wurden mittels ECL (Amersham) deutlich gemacht. Eine ABIN Expression erfolgte maximal 3 Tage nach der Infektion und blieb mindestens 6 Tage lang hoch (Daten nicht gezeigt).

Beispiel 6: Hemmung von TNF/GalN-induzierter NF-κB Aktivierung in vivo durch AdABIN und durch Ad-IκB^s

[0044] Um die Wirkung von AdABIN auf TNF/GalN-induzierte NF-κB Aktivierung in der Leber zu analysieren, haben wir die Wirkung der AdABIN Infektion auf TNF/GalN-induzierten IκBα Abbau mittels Western Blotting getestet. Parallel dazu wurden dieselben Proben auch in einem Gelshift-Assay auf Vorhandensein von aktivem NF-κB in nukleären Zellextrakten der Leber analysiert. Mäuse erhielten $2,5 \times 10^9$ pfu Ad-ABIN, Ad-IκB^s (= IκB Superrepressor) oder AdRR5 (= leere Viruskontrolle) (i.v.) injiziert und wurden nach drei Tagen durch Injektion mit einer letalen TNF Dosis (0,3 µg)/GalN (20 mg), verdünnt in PBS, konfrontiert. PBS als solches diente als Kontrolle. Zu unterschiedlichen Zeiten nach der TNF/GalN Behandlung wurden die Mäuse getötet und Leberhomogenate hergestellt. Die IκBα Expression wurde mittels SDS-PAGE und Immunoblotting mit polyklonalem anti-IκBα Antikörper analysiert (Santa Cruz) ([Fig. 1](#), oberes Bild). IκBα war nach einer 0,5 h Behandlung mit TNF/GalN fast vollständig abgebaut und tauchte nach 1,5 h wieder auf. Dieses Wiederauftreten erfolgt höchstwahrscheinlich aufgrund der neuen Synthese von IκBα in Ansprecherung auf TNF. Starke IκBα Signale waren in den mit AdIκBs infizierten Mäusen sichtbar, bei denen die Expression des Transgens die Expression des endogenen Gens maskierte. Ganz besonders wichtig war im Fall der mit AdABIN infizierten Tiere der IκBα Abbau im Vergleich zu den AdRR5 Kontrollmäusen stark verzögert. Diese Ergebnisse zeigen, dass ABIN die NF-κB Aktivierung in der Leber von mit AdABIN infizierten Mäusen hemmt. Die NF-κB Aktivierung wurde weiter in einem Gelshift-Assay von nukleären Zellextrakten von Mäuseleber analysiert. Stücke der Mäuseleber wurden durch Douncen in 1 ml Quellpuffer homogenisiert (10 mM Hepes, pH 7,5, 10 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 5 % Glycerin, 0,5 mM EDTA, pH 7,5, 0,1 mM EGTA, pH 7,5, 2 mM Pefablock, 0,5 mM DTT, 0,15 IE/ml Aprotinin). Nach einer 15 minütigen Inkubation auf Eis wurde 65 µl einer 10 %igen NP-40 Lösung zugesetzt und anschließend bei maximaler Drehzahl in einer Eppendorff Zentrifuge 15 min lang zentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 µl nukleärem Extraktionspuffer (20 mM Hepes, pH 7,5 1 % NP-40, 1 mM MgCl₂, 400 mM NaCl, 10 mM KCl, 20 % Glycerin, 0,5 mM EDTA, pH 7,5, 0,1 mM EGTA, pH 7,5, 2 mM Pefabloc, 0,5 mM DTT, 0,15 IE/ml Aprotinin) erneut suspendiert. Nach einem 15 Minuten dauernden Zentrifugieren bei maximaler Drehzahl in einer Eppendorff Zentrifuge wurden die Überstände bei -70 bis zu ihrer Verwendung gelagert. 10 µl nukleäres Lysat wurde bei Raumtemperatur 30 min lang mit einer ³²P markierten NF-κκB spezifischen DNA-Sonde (agctagaggggasccttccgagagg) im folgenden Puffer inkubiert: 4 % Ficoll 400, 20 mM Hepes, pH 7,5, 60 mM KCl, 2 mM DTT, 100 µg/ml poly d(1-C), 1 mg/ml acetyliertes BSA.

[0045] Die Extrakte wurden dann auf einem 4 % nativen Polyacrylamidgel sich ausbreiten gelassen. Die Radioaktivität wurde durch das Belichten von Röntgenfilmen sichtbar gemacht. Dies zeigte, dass AdABIN sowie AdIκB^s die mittels TNF/GalN induzierte nukleäre Translokation und DNA Bindung von NF-κB stark hemmte ([Fig. 1](#), unteres Bild). Daraus können wir schließen, dass eine adenovirale Infektion mit AdABIN oder AdIκBα die NF-κB TNF/GalN induzierte NF-κB Aktivierung in der Mäuseleber hemmt.

Beispiel 7: Hemmung von TNF/GaIN induzierter letaler Hepatitis durch ABIN

[0046] Um die Wirkung von ABIN auf die TNF/GaIN induzierte Letalität zu analysieren, wurde C57BL/6 Mäusen intravenös (i.v.) $2,5 \times 10^9$ pfu von AdABIN (n = 8) oder AdRR5 (n = 9) injiziert. Drei Tage später erhielten alle Mäuse eine letale Dosis von TNG/GaIN. Jede Stunde wurde die Körpertemperatur gemessen und die Letalität bewertet. Die Kontrollmäuse zeigten bereits 6 Stunden nach der Injektion ein drastisches Abfallen der Körpertemperatur ([Fig. 3](#)), während ABIN exprimierende Mäuse über das gesamte Experiment hinweg eine normale Körpertemperatur zeigten (analysiert bis 18 Tage nach der Injektion). Ganz besonders wichtig war, dass die ABIN exprimierenden Mäuse alle überlebten und keine Anzeichen einer Erkrankung zeigten, wohingegen alle Kontrollmäuse über einen Zeitraum von 36 Stunden starben ([Fig. 4](#)).

[0047] Um die Wirkung von ABIN auf die Lebertoxizität zu analysieren, wurde Mäusen AdABIN (n = 5) oder AdRR5 (n = 5) wie oben beschrieben injiziert und nach drei Tagen dann eine letale Dosis von TNG/GaIN injiziert. Zu der Zeit, als die AdRR5 Mäuse einen starken Abfall der Körpertemperatur zeigten, wurden die Tiere für die Histologie- und Biochemiestudien geopfert. Es wurde von den AdRR5 und AdABIN Mäusen Blut gesammelt und die Leber für eine weitere Analyse präpariert. Die Konzentration von Alaninaminotransferase (ALT) im Blut nach der TNF/GaIN Injektion wurde mittels eines enzymatischen/kolorimetrischen Kits (Sigma) bestimmt und diente als Parameter für eine Lebernekrose (Reutter u.a., 1968). Es wurde vom retroorbitalen Plexus unter leichter Etheranästhesie Blut genommen, das für 30 min bei $3,7^\circ\text{C}$ und 1 h bei 4°C koagulieren gelassen wurde, und anschließend bei $16.000 \times g$ zentrifugiert. Das Serum wurde bei -20°C gelagert. ALT Niveaus waren bei mit AdABIN infizierten Mäusen im Vergleich zu den Kontrollmäusen signifikant verringert ([Fig. 5](#)). Die DNA Fragmentierung und Caspaseaktivierung wurden als Parameter für die Apoptose analysiert. Die DNA Fragmentierung wurde durch immunochemische Bestimmung von Histon-komplexierten DNA Fragmenten in einer Mikrotiterplatte gemessen (Salgame u.a., 1997). Kurz erläutert, wurden die Platten mit einem Antikörper [Ab], der gegen Histon H2B gerichtet war, überzogen. Nach dem Blockieren wurden Leberhomogenate zugesetzt und ein biotinylierter Detektions-Ab, der für das Nukleosom-Subpartikel der Histone H2A, H2B und DNA spezifisch war, wurde verabreicht. Die Detektion erfolgte mit Alkaliphosphatase-konjugiertem Streptavidin (Sanvertech, Boeichout, Belgien) und Substrat (Sigma). Signale, die mit Proben von mit TNG/GaIN behandelten Mäusen erhalten wurden, wurden als 100 % eingesetzt. Diese Versuche zeigen, dass die mit TNG/GaIN induzierte DNA Fragmentierung bei AdABIN infizierten Tieren deutlich reduziert ist ([Fig. 6](#)). Die Caspaseaktivierung wurde durch die Hydrolyse von AcDEVD-amc nach Inkubation mit Leberzellextrakten gezeigt. 30 µg Leberhomogenat wurde in 200 µl zellfreiem Systempuffer (10 mM HEPES, pH 7,5 220 mM Mannit, 68 mM Saccharose, 2 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 2,5 mM KH₂PO₄, 10 mM DTT) in Gegenwart von 50 µM Ac-DEVD-amc (Peptide Institute; Osaka, Japan) für 60 min bei 30 Grad inkubiert. Die Freisetzung von 7-Amino-4-methylcumarin (AMC) wurde über 60 min hinweg in einem Fluormeter (CytoFluor; PerSeptive Biosystems; Cambridge MA, USA) bei einer Erregungswellenlänge von 360 nm und einer Emissionswellenlänge von 409 nm überwacht. Die Daten sind als Steigerung der Fluoreszenz als Funktion der Zeit ausgedrückt (ΔF/min). Die Hydrolyse von Ac-DEVD-AMC nach Inkubation mit Leberhomogenaten von mit TNF/GaIN behandelten Mäusen war bei mit AdABIN infizierten Tieren signifikant reduziert ([Fig. 7](#)). In ähnlicher Weise wurde eine Hemmung von mit TNF/GaIN induzierter Caspaseaktivierung nach einer AdABIN Infektion auch durch eine Hemmung der proteolytischen Reifung von Caspase-3 demonstriert, wie durch SDS-PAGE und Immunoblotting mit Caspase-3 spezifischen polyklonalen Antikörpern gezeigt ([Fig. 8](#)).

[0048] Wie durch die Histologie gezeigt ist, steht die mit TNF/GaIN induzierte letale Hepatitis mit der totalen Gewebeerstörung der parenchymalen Gewebes, dem Einfließen von Erythrozyten (Blutung) an der Stelle der Sinusoide und der Apoptose und Nekrose der Hepatozyten in Verbindung. Darüber hinaus kann ein massives Einfließen von Makrophagen und Neutrophilen in die Leber beobachtet werden. Die Leber von mit AdABIN vorbehandelten Mäusen zeigt einer bessere Konservierung der Gewebeunversehrtheit und fast keine Blutung. Im Gegensatz zum vollständigen Schutz vor mittels TNF/GaIN induzierter Letalität, Hepatozytenzelltod und Blutung, wurde eine Infiltration von weißen Blutzellen nur teilweise durch eine in vivo Expression von ABIN reduziert.

[0049] Wie zuvor erwähnt, kann eine pauschale Hemmung der hepatischen NF-κB Aktivierung sowohl zu günstigen als auch schädlichen Wirkungen führen. Tatsächlich schützt die adenovirale Verabreichung eines dominanten IκBα Superrepressors nicht vor einer durch TNF/GaIN induzierter Letalität. In demselben Experiment schützte die adenovirale Verabreichung von ABIN die Mäuse vollständig ([Fig. 9](#)). Im Augenblick kann eine klare Erklärung für die unterschiedliche Wirkung von ABIN und IκB^s nicht gegeben werden. Allerdings ist zu erwähnen, dass ABIN im Gegensatz zu IκBα die NF-κB Aktivierung stromaufwärts vom IKK Komplex hemmt. Weil stimulusspezifische Unterschiede der NF-κB Signalisierung stromaufwärts vom IKK Komplex gezeigt wurden, ist es nicht unwahrscheinlich, dass eine ABIN vermittelte Hemmung der NF-κB abhängigen Ge-

nexpression auf eine Auswahl von auf NF- κ B reagierenden Genen beschränkt ist. Eine solche mögliche selektive Hemmung der von NF- κ B abhängigen Gene könnte ein Gleichgewicht zwischen sensibilisierenden und schützenden Proteinen verschieben, was zu einer Nettoschutzwirkung für diesen Inhibitor führen könnte. Alternativ können wir die von NF- κ B unabhängigen Wirkungen von ABIN zum Schutz vor mit TNF induziertem Leberversagen nicht ausschließen.

[0050] Fas ist ein Apoptose signalisierendes Zelloberflächenmolekül, das nach einer spezifischen Ligand- oder Antikörperbindung den Zelltod auslöst. Die Behandlung von Mäusen mit einem anti-Fas Antikörper bewirkt ein fulminantes Leberversagen aufgrund einer massiven Apoptose (Ogasawara u.a., 1993). Im Gegensatz zu TNF/GalN führt anti-Fas nicht zu einer NF- κ B Aktivierung und einer entzündlichen Reaktion in der Leber, sondern induziert vielmehr eine direkte apoptotische Reaktion. Um die Empfindlichkeit von AdABIN infizierten Mäusen gegenüber einer mit anti-Fas vermittelten Letalität zu untersuchen, wurde den Mäusen AdRR5 oder AdABIN wie oben beschrieben injiziert und drei Tage später 10 μ g anti-Fas (Pharmingen) (i.v.) injiziert. Sowohl mit AdRR5 als auch AdABIN vorbehandelte Mäuse starben innerhalb von 3 -5 Stunden nach der Verabreichung von anti-Fas ([Fig. 10](#)). Dies zeigt, dass ABIN nicht signifikant den Signalweg einer mit Fas vermittelten Apoptose beeinflusst. Um weiter zu untersuchen, ob der Unterschied des Schutzes im TNF/GalN gegenüber dem anti-fas induzierten Leberversagen vom Unterschied der Rezeptorbeteiligung (TNF Rezeptor gegenüber Fas) herrührt oder einen Unterschied in der Rolle der Apoptose und der genabhängigen Wirkungen reflektiert, haben wir auch die Wirkung von AdABIN auf die TNF induzierte Letalität bei mit Actinomycin D sensibilisierten Mäusen analysiert. Actinomycin D blockiert die zelluläre Transkription und sensibilisiert Zellen im Hinblick auf die direkte apoptotische Wirkung von TNF, ohne dass eine entzündliche Komponente beteiligt ist. Daher wurde Mäusen AdRR5 oder AdABIN wie oben beschrieben injiziert und drei Tage später 0,3 μ g TNF und 20 μ g Actinomycin D (i.v.) injiziert. Sowohl mit AdRR5 als auch mit AdABIN vorbehandelte Mäuse starben innerhalb von 20-35 Stunden nach der Verabreichung von TNF/ActD ([Fig. 11](#)). Zusammen genommen legen diese Ergebnisse nahe, dass an einem durch ABIN vermittelten Schutz vor einem durch TNF/GalN induzierten Leberversagen ein transkriptionsabhängiges Ereignis beteiligt ist.

Literaturhinweise

- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. And Lipman, D.J. (1997) *Nucleic Acids Res* 25, 3389-3402.
- Arvelo, M.B., Cooper, J.T., Longo, C., Daniel, S., Grey, S.T., Mahiou, J., Czismadia, E., Abu-Jawdeh, G., and Ferran, C., (2002) *Hepatology* 35, 535-543.
- Beg, A. A., Sha, W. C., Bronson, R. T., Ghosh, S., and Baltimore, D. (1995) *Nature* 376, 167-170.
- Behr, J. P. (1994) *Bioconjugate Chem.* 5, 382-389,
- Bellas, R. E., FitzGerald, M. J., Fausto, N., and Sonenshein, G. E. (1997) *American Journal of Pathology* 151, 891-896.
- Beyaert, R., Neyninc, K., and Van Nuffel, S. (2000) *Biochem Pharmacol* 60(8), 1143-1151.
- Bird, G., Sheron, N., Goka, A., Alexander, G., and Williams, R. (1990) *Ann Intern Med* 112, 917-20.
- Blaese, R. M., Culver, K. M., Miller, A. D., Carter, C. S., Fleisher, T., Clerici, M., Shearer, G., Chang, L., Tolstoshev, P., et al. (1995) *Cancer Gene Ther.* 2, 291-197.
- Chen, Q., and Cederbaum, A. (1997) *Molecular Pharmacology* 52, 648-657.
- Crystal, J. (1995) *Science* 270, 404-410.
- Decker, K., and Keppler, D. (1974) *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 71, 77-106.
- De Valck, D., Neyninc, K., Van Crielinge, W., Contreras, R., Beyaert, R., and Fiers, W. (1996) *Febs Letters* 384(1), 61-64.
- Diehl, A., Yin, M., Fleckenstein, J., Yang, S., Lin, H., Brenner, D. A., Westwick, J., Bagby, G., and S, N. (1994) *Am J Physiol* 267 (Gastrointest. Liver Physiol. 30), G552-G561.
- Dixit V.M., Green, S., Sarma, V., Holzman, L.B., Wolf, F.W., O'Rourke, K., Ward, P.A., Prochownik, E.V. and Marks, R.M. (1990) *J Biol Chem* 265, 2973-2978.
- Freshney et al., *Culture of Animal Cells, A Manual of Basic Technique* (3rd ed. 1994)
- Ford, K.G., Souberbielle, B.E., darling, D., and Farzanch, F. (2001) *Gene Ther.* 8, 1-4.
- Gao, X. and Huang, L. (1995) *Gene Therapy* 2, 710-722
- Gomez-Foix, A., Coats, W., Baque, S., Alam, T., Gerard, R., and Newgard, C. (1992) *Journal of Biological Chemistry* 267, 25129.
- Gonzalez-Amaro, R., Garcia-Monzon, C., Garcia-Buey, L., Moreno-Otero, R., Alonso, J., Yague, E., Pivel, J., Lopez-Cabrera, M., Fernandez-Ruiz, E., and Sanchez-Madrid, F. (1994) *Journal of Experimental Medicine* 179, 841-848.
- Grove, J., Daly, A. K., Bassendine, M. F., and Day, C. (1997) *Hepatology* 26, 143-146.
- Gupta, K., Ott, D., Hope, T.J., Siliciano, R.F. and Boecker, J.D. (2000) *J Virol* 74, 11811-11824.

- Hermonat, and Muzyczka. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 6466-6470.
- Heyninck, K., De Valck, D., Vanden Berghe, W., Van Crielinge, W., Contreras, R., Fiers, W., Haegeman, G., and Beyaert, R. (1999) *J Cell Biol* 145(7), 1471-1482.
- Iimuro, Y., Nishiura, T., Hellerbrand, C., Behrns, K. E., Schoonoven, R., Grisham, J. W., and Brenner, D. A. (1998) *Journal of Clinical Investigation* 101, 802-811.
- Kimura, A., Israel, A., Le Bail, O., and Kourilsky, P. (1986) *Cel* 144, 261.
- Kotin, R. M. (1994) *Human Gene Therapy* 5, 793-801.
- Larrea, E., Garcia, N., Qian, C., Civeira, M., and Prieto, J. (1996) *Hepatology* 23, 210-217.
- Lee, E. G., Boone, D. L., Chai, S., Libby, S. L., Chien, M., Lodolce, J. P., and Ma, A. (2000) *Science* 289, 2350-2354.
- Leist, M., Gantner, F., Jilg, S., and Wendel, A. (1995) *Journal of Immunology* 154, 1307-1316.
- Majumder, M., Ghosh, A.K., Steele, R., Zhou, X.Y., Philips, N.J., Ray, R., and Ray, R.B. (2002) *Virology* 294, 94-105.
- McClain, C. (1991) *Hepatology* 14, 394-396.
- McGrory, W., Bautista, D., and Graham, F. (1988) *Virology* 163, 614.
- Morris, M.C., Depolier, J., Mery, J., Heitz, F., Divita, G. (2001) *Nat. Biotechnol.* 19, 1173-1176.
- Muto, Y., Nouri-Aria, K., Meager, A., Alexander, G., Eddleston, A., and Williams, R. (1988) *Lancet* 2, 72-74.
- Ogasawara, J., Watanabe-Fukunaga, R., Adachi, M., Matsuzawa, A., Kasugai, T., Kitamura, Y., Itoh, N., Suda, T., and Nagata, S. (1993) *Nature* 364, 806-809.
- Opiari, A.W., Boguski, M.S. and Dixit, V.M. (1990) *J Biol Chem* 265, 14705-14708.
- Park, K.-J., Cho, S.-H., Lee, S.Y., Hwang, S.B., and Lai, M.M.C. (2002) *J. Biol. Chem.* 277, 13122-13128.
- Ray, R. B., Meyer, K., Steele, R., Shrivastava, A., Aggarwal, B. B., and Ray, R. (1998) *Journal of Biological Chemistry* 273, 2256-2259.
- Remy, J.S., Seerlin, C., Vierling, P. and Behr, J. P. (1994) *Bioconjugate Chem.* 5, 647-654.
- Reutter, W., Lesch, R., Keppler, D., and Decker, K. (1968) *Naturwissenschaften* 55, 497.
- Salgame, P., Varadhachary, A. S., Primiano, L. L., Fincke, J. E., Muller, S., and Monestier, M. (1997) *Nucleic Acids Research* 25, 680.
- Samulski, R. J., Chang, L. S. and Shenk, T. (1989) *J. Virol.* 63, 3822-3828.
- Szpirer, C., and Szpirer, J. (1975) *Differentiation* 4(2), 85-91.
- Tada, H., Shiho, O., Kuroshima, K., Koyama, M., and Tsukamoto, K. (1986) *J Immunol Methods* 6, 157-165.
- Tewari, M., Wolf, F.W., Seldin, M.F., O'Shea, K.S., Dixit, V.M. and Turka, L.A. (1995) *J Immunol* 154, 1699-1706.
- Tiegs, G., Wolter, M., and Wendel, A. (1989) *Biochem Pharmacol* 38, 627-631.
- Van Huffel, S., Delaei, F., Heyninck, K., De Valck, D., and Beyaert, R. (2001) *Journal of Biological Chemistry* 276, 30216-30223.
- Van Molle, W., Denecker, G., Rodriguez, I., Brouckaert, P., Vandenabeele, P., and Libert, C. (1999) *Journal of Immunology* 163, 5235-5241.
- Wu, J, and Zern, M.A. (1999) *Front. Biosci.* 4, D520-D527.
- Xu, Y., Bialik, S., Jones, B. E., Iimuro, Y., Kitsis, R., Srinivasan, A., Brenner, D. A., and Czaja, M. (1998) *American Journal of Physiology* 275, C1058-C1066.
- Zender, L., Kuhnel, F., Kock, R., Manns, M., Kubicka, S. (2002) *Cancer Gene Ther.* 9, 489-496.

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Vlaams Interuniversitair Instituut voor Biotechnol

<120> ABIN ZUM SCHUTZ GEGEN HEPATITIS

<130> RBE/AB2/V091

<140>

<141>

<150> EP01202414.7

<151> 2001-06-22

<160> 8

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 2812

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (117)..(2060)

<220>

<221> CDS

<222> (276)..(2060)

<220>

<221> intron

<222> (81)..(252)

<400> 1

cacagggagg catggccgca ctcaactgggc acatcttcag atcacctcgt gcattctcgg 60

atgagtgacc tgggctgaag ctaggcggcc gtcacggcag gggttgagcc accctc atg 119
Met

1

gaa ggg aga gga ccc tac cgg atc tac gac cca ggg ggc agc acg cct 167
Glu Gly Arg Gly Pro Tyr Arg Ile Tyr Asp Pro Gly Gly Ser Thr Pro

5

10

15

ctg gga gag gtg tcc gca gct ttt gaa cgt cta gtg gag gag aat act 215
Leu Gly Glu Val Ser Ala Ala Phe Glu Arg Leu Val Glu Glu Asn Thr

20	25	30	
ctg ctg aag gga aaa atg caa ggg ata aag atg tta ggg gag ctt ctg			263
Arg Leu Lys Gly Lys Met Gln Gly Ile Lys Met Leu Gly Glu Leu Leu			
35	40	45	
gag gag tct cag atg gaa gcg tcc aga ctc cgg cag aag gca gag gag			311
Glu Glu Ser Gln Met Glu Ala Ser Arg Leu Arg Gln Lys Ala Glu Glu			
50	55	60	65
ctg gtc aag gac agc gag ctg tca cca ccg aca tct gcc ccc tcc ttg			359
Leu Val Lys Asp Ser Glu Leu Ser Pro Pro Thr Ser Ala Pro Ser Leu			
70	75	80	
gtc tcc ttt gat gac ctg got gag ctc aca gga cag gat aca aag gtc			407
Val Ser Phe Asp Asp Leu Ala Glu Leu Thr Gly Gln Asp Thr Lys Val			
85	90	95	
cag gta cat cct gct acc agc act gcc gcc acc acc acc gcc acc gcc			455
Gln Val His Pro Ala Thr Ser Thr Ala Ala Thr Thr Thr Ala Thr Ala			
100	105	110	
acc acg gga aac tcc atg gag aag ccc gag cca gcc tcc aaa tct ccg			503
Thr Thr Gly Asn Ser Met Glu Lys Pro Glu Pro Ala Ser Lys Ser Pro			
115	120	125	
tcc aat ggc gcc tcc tcg gac ttt gaa gtg gtc cct act gag gag cag			551
Ser Asn Gly Ala Ser Ser Asp Phe Glu Val Val Pro Thr Glu Glu Gln			
130	135	140	145
aat tca ccc gaa act ggc agc cac cct acg aac atg atg gac ctg ggg			599
Asn Ser Pro Glu Thr Gly Ser His Pro Thr Asn Met Met Asp Leu Gly			
150	155	160	
ccc cca ccc cca gag gac agc aac ctg aag ctc cac ctg cag cgc ctg			647
Pro Pro Pro Pro Glu Asp Ser Asn Leu Lys Leu His Leu Gln Arg Leu			
165	170	175	
gag acc acc ctt agc gtg tgt gca gag gag cca gac cac agc cag ctc			695
Glu Thr Thr Leu Ser Val Cys Ala Glu Glu Pro Asp His Ser Gln Leu			
180	185	190	
ttc acc cac ctg ggc cgc atg gcc ctc gag ttc aac agg ttg gcc tcc			743
Phe Thr His Leu Gly Arg Met Ala Leu Glu Phe Asn Arg Leu Ala Ser			
195	200	205	
aaa gtg cat aaa aat gag cag cgc acc tcc atc ctg cag acc tta tgt			791
Lys Val His Lys Asn Glu Gln Arg Thr Ser Ile Leu Gln Thr Leu Cys			

DE 602 13 596 T2 2007.09.13

210	215	220	225	
gag cag ctg cgc cag gag aat gaa gcc ctg aag gcc aag ctg gac aag				839
Glu Gln Leu Arg Gln	Glu Asn Glu Ala Leu Lys	Ala Lys Leu Asp Lys		
	230	235	240	
ggc ctg gaa cag cgg gat ctg gct gct gag agg ctg cgg gag gaa aac				887
Gly Leu Glu Gln Arg Asp	Leu Ala Ala Glu Arg	Leu Arg Glu Glu Asn		
	245	250	255	
acg gag ctc aag aaa ctg ttg atg aac agc agc tgc aaa gag gga ctc				935
Thr Glu Leu Lys Lys Leu Leu	Met Asn Ser Ser Cys Lys	Glu Gly Leu		
	260	265	270	
tgt ggg cag ccc agc tcc cca aag cca gag ggt gct ggc aag aag ggc				983
Cys Gly Gln Pro Ser Ser	Pro Lys Pro Glu Gly Ala	Gly Lys Lys Gly		
	275	280	285	
gtg gct gga cag cag cag gcc agt gtg atg gcg agt aaa gtc cct gaa				1031
Val Ala Gly Gln Gln Gln	Ala Ser Val Met Ala Ser	Lys Val Pro Glu		
	290	295	300	305
gcg ggg gcc ttt gga gca gct gag aag aaa gtg aag ttg cta gaa cag				1079
Ala Gly Ala Phe Gly Ala Ala	Glu Lys Lys Val Lys Leu Leu	Glu Gln		
	310	315	320	
caa cgc atg gag ctg ctg gaa gtg aac aag cag tgg gac cag cat ttc				1127
Gln Arg Met Glu Leu Leu Glu	Val Asn Lys Gln Trp Asp	Gln His Phe		
	325	330	335	
cgg tcc atg aag cag cag tat gag cag aag atc aca gag ctt cgc cag				1175
Arg Ser Met Lys Gln Gln Tyr	Glu Gln Lys Ile Thr Glu Leu	Arg Gln		
	340	345	350	
aag ctg gtg gac ctg cag aaa cag gta act gag ctg gag gcc gaa cgg				1223
Lys Leu Val Asp Leu Gln Lys	Gln Val Thr Glu Leu Glu Ala	Glu Arg		
	355	360	365	
gag cag aag cag cgt gac ttt gac cgg aaa ctc ctc ctg gcc aaa tcg				1271
Glu Gln Lys Gln Arg Asp Phe	Asp Arg Lys Leu Leu Leu Ala	Lys Ser		
	370	375	380	385
aag ata gag atg gaa gag acc gac aag gag cag ctg aca gca gag gcc				1319
Lys Ile Glu Met Glu Glu Thr	Asp Lys Glu Gln Leu Thr Ala	Glu Ala		
	390	395	400	
aag gaa ctg cgc cag aag gtc agg tac cta cag gat cag ctg agc ccg				1367
Lys Glu Leu Arg Gln Lys Val	Arg Tyr Leu Gln Asp Gln Leu	Ser Pro		

405	410	415	
ctc aca agg caa cga gaa tac cag gag aag gag atc cag cgg ctc aat			1415
Leu Thr Arg Gln Arg Glu Tyr Gln Glu Lys Glu Ile Gln Arg Leu Asn			
420	425	430	
aag gcc ctg gag gag gcc ctc agc atc cag gcc tct cca tca tct cgg			1463
Lys Ala Leu Glu Glu Ala Leu Ser Ile Gln Ala Ser Pro Ser Ser Pro			
435	440	445	
cct gca gct ttt ggg agt cca gaa ggc gtt ggg ggc cat ctg agg aag			1511
Pro Ala Ala Phe Gly Ser Pro Glu Gly Val Gly Gly His Leu Arg Lys			
450	455	460	465
cag gaa cta gtg aca cag aat gag ttg ctg aaa cag cag gta aag atc			1559
Gln Glu Leu Val Thr Gln Asn Glu Leu Leu Lys Gln Gln Val Lys Ile			
470	475	480	
ttt gaa gag gac ttc cag agg gaa cgg agt gac cgt gaa cgc atg aat			1607
Phe Glu Glu Asp Phe Gln Arg Glu Arg Ser Asp Arg Glu Arg Met Asn			
485	490	495	
gaa gag aag gag gag ctg aag aag caa gta gag aag ctg cag gcc cag			1655
Glu Glu Lys Glu Glu Leu Lys Lys Gln Val Glu Lys Leu Gln Ala Gln			
500	505	510	
gtc acc ctg act aat gcc cag ctc aaa act ctc aaa gag gag gag aag			1703
Val Thr Leu Thr Asn Ala Gln Leu Lys Thr Leu Lys Glu Glu Glu Lys			
515	520	525	
gcc aag gaa gcc ctc aaa cag cag aag agg aaa gca aag gct tcg gga			1751
Ala Lys Glu Ala Leu Lys Gln Gln Lys Arg Lys Ala Lys Ala Ser Gly			
530	535	540	545
gag cgc tac cac atg gaa ccc cac cct gag cac gtc tgc ggc gcc tat			1799
Glu Arg Tyr His Met Glu Pro His Pro Glu His Val Cys Gly Ala Tyr			
550	555	560	
ccc tat gcc tac cca ccc atg cca gcc atg gta cct cac cat gcc tac			1847
Pro Tyr Ala Tyr Pro Pro Met Pro Ala Met Val Pro His His Ala Tyr			
565	570	575	
aag gac tgg tcc cag atc cga tac cct cca ccc cct gtg ccc atg gag			1895
Lys Asp Trp Ser Gln Ile Arg Tyr Pro Pro Pro Pro Val Pro Met Glu			
580	585	590	
cac cgg ccc cca cac ccc aac tct cgc ctc ttc cat ctg cgg gag tac			1943
His Pro Pro Pro His Pro Asn Ser Arg Leu Phe His Leu Pro Glu Tyr			

DE 602 13 596 T2 2007.09.13

595	600	605	
acc tgg cgt cca ccc tgt gca ggg att cgg aat cag agc tct caa gtg			1991
Thr Trp Arg Pro Pro Cys Ala Gly Ile Arg Asn Gln Ser Ser Gln Val			
610	615	620	625
atg gac ccg ccc cca gac agg cct gca gag cca gag tct gca gac aat			2039
Met Asp Pro Pro Pro Asp Arg Pro Ala Glu Pro Glu Ser Ala Asp Asn			
	630	635	640
gac tgt gat ggg ccc cag tga ggctgcagtg ggtcatttgg ttccaccttc			2090
Asp Cys Asp Gly Pro Gln			
	645		
atctttcaga gccagctgac ctccagattgc caaaagtttg aaggccatgt gcatgttctg			2150
tgtgacccaa gccttggcag aggagaggct gggatgggta gctggctcac atccccagcc			2210
aagcctcgaa ctgttgacaa gaccagggag aatccacca tgggcgcca ccaggttctt			2270
atggatgcaa gcaggagaag ctcaacacct gcctcttgc caagacaagg aagcctcacc			2330
tggctttgac ctgccatccg ttgctgaggc cactggcttc catcctaaga atgaggtgca			2390
acaagacccc attctcacag aacctcaaag acttggttcc aggtctcca gagaccatac			2450
ccaactcatg tgcattgtgc gtttttgctt caagctcagt agcaggacct gccccgagcc			2510
ccctgctcct tgcccctctg tgaggagtta cggagagggc tttgtctcta gagcagaaga			2570
gaatgatggg acggcctgat gctgtcatgc totccactgc acctgtggca gcctcctgag			2630
agccaccaag atctgggatg aaggccacac cagccatgtc tgctgaaggg ccccagactg			2690
agatgactcc ggctccaca gttagatggt tatggtgcca gaggtctata ttaaggtagc			2750
tgtctgttgc taggcagccg tttgcacaaa tcttgacat aaatccaact tgaagatcaa			2810
aa			2812

<210> 2

<211> 647

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

Met Glu Gly Arg Gly Pro Tyr Arg Ile Tyr Asp Pro Gly Gly Ser Thr

1	5	10	15
Pro Leu Gly Glu Val Ser Ala Ala Phe Glu Arg Leu Val Glu Glu Asn			
	20	25	30
Thr Arg Leu Lys Gly Lys Met Gln Gly Ile Lys Met Leu Gly Glu Leu			
	35	40	45
Leu Glu Glu Ser Gln Met Glu Ala Ser Arg Leu Arg Gln Lys Ala Glu			
	50	55	60
Glu Leu Val Lys Asp Ser Glu Leu Ser Pro Pro Thr Ser Ala Pro Ser			
	65	70	75
Leu Val Ser Phe Asp Asp Leu Ala Glu Leu Thr Gly Gln Asp Thr Lys			
	85	90	95
Val Gln Val His Pro Ala Thr Ser Thr Ala Ala Thr Thr Thr Ala Thr			
	100	105	110
Ala Thr Thr Gly Asn Ser Met Glu Lys Pro Glu Pro Ala Ser Lys Ser			
	115	120	125
Pro Ser Asn Gly Ala Ser Ser Asp Phe Glu Val Val Pro Thr Glu Glu			
	130	135	140
Gln Asn Ser Pro Glu Thr Gly Ser His Pro Thr Asn Met Met Asp Leu			
	145	150	155
Gly Pro Pro Pro Pro Glu Asp Ser Asn Leu Lys Leu His Leu Gln Arg			
	165	170	175
Leu Glu Thr Thr Leu Ser Val Cys Ala Glu Glu Pro Asp His Ser Gln			
	180	185	190
Leu Phe Thr His Leu Gly Arg Met Ala Leu Glu Phe Asn Arg Leu Ala			
	195	200	205
Ser Lys Val His Lys Asn Glu Gln Arg Thr Ser Ile Leu Gln Thr Leu			
	210	215	220
Cys Glu Gln Leu Arg Gln Glu Asn Glu Ala Leu Lys Ala Lys Leu Asp			
	225	230	235
Lys Gly Leu Glu Gln Arg Asp Leu Ala Ala Glu Arg Leu Arg Glu Glu			
	245	250	255
Asn Thr Glu Leu Lys Lys Leu Leu Met Asn Ser Ser Cys Lys Glu Gly			
	260	265	270
Leu Cys Gly Gln Pro Ser Ser Pro Lys Pro Glu Gly Ala Gly Lys Lys			
	275	280	285
Gly Val Ala Gly Gln Gln Gln Ala Ser Val Met Ala Ser Lys Val Pro			
	290	295	300
Glu Ala Gly Ala Phe Gly Ala Ala Glu Lys Lys Val Lys Leu Leu Glu			
	305	310	315
Gln Gln Arg Met Glu Leu Leu Glu Val Asn Lys Gln Trp Asp Gln His			
	325	330	335
Phe Arg Ser Met Lys Gln Gln Tyr Glu Gln Lys Ile Thr Glu Leu Arg			
	340	345	350
Gln Lys Leu Val Asp Leu Gln Lys Gln Val Thr Glu Leu Glu Ala Glu			
	355	360	365
Arg Glu Gln Lys Gln Arg Asp Phe Asp Arg Lys Leu Leu Leu Ala Lys			
	370	375	380
Ser Lys Ile Glu Met Glu Glu Thr Asp Lys Glu Gln Leu Thr Ala Glu			

50	55	60
Ser Met Glu Lys Pro Glu Pro Ala Ser Lys Ser Pro Ser Asn Gly Ala		
65	70	75
Ser Ser Asp Phe Glu Val Val Pro Thr Glu Glu Gln Asn Ser Pro Glu		
	85	90
Thr Gly Ser His Pro Thr Asn Met Met Asp Leu Gly Pro Pro Pro Pro		
	100	105
Glu Asp Ser Asn Leu Lys Leu His Leu Gln Arg Leu Glu Thr Thr Leu		
	115	120
Ser Val Cys Ala Glu Glu Pro Asp His Ser Gln Leu Phe Thr His Leu		
	130	135
Gly Arg Met Ala Leu Glu Phe Asn Arg Leu Ala Ser Lys Val His Lys		
	145	150
Asn Glu Gln Arg Thr Ser Ile Leu Gln Thr Leu Cys Glu Gln Leu Arg		
	165	170
Gln Glu Asn Glu Ala Leu Lys Ala Lys Leu Asp Lys Gly Leu Glu Gln		
	180	185
Arg Asp Leu Ala Ala Glu Arg Leu Arg Glu Glu Asn Thr Glu Leu Lys		
	195	200
Lys Leu Leu Met Asn Ser Ser Cys Lys Glu Gly Leu Cys Gly Gln Pro		
	210	215
Ser Ser Pro Lys Pro Glu Gly Ala Gly Lys Lys Gly Val Ala Gly Gln		
	225	230
Gln Gln Ala Ser Val Met Ala Ser Lys Val Pro Glu Ala Gly Ala Phe		
	245	250
Gly Ala Ala Glu Lys Lys Val Lys Leu Leu Glu Gln Gln Arg Met Glu		
	260	265
Leu Leu Glu Val Asn Lys Gln Trp Asp Gln His Phe Arg Ser Met Lys		
	275	280
Gln Gln Tyr Glu Gln Lys Ile Thr Glu Leu Arg Gln Lys Leu Val Asp		
	290	295
Leu Gln Lys Gln Val Thr Glu Leu Glu Ala Glu Arg Glu Gln Lys Gln		
	305	310
Arg Asp Phe Asp Arg Lys Leu Leu Leu Ala Lys Ser Lys Ile Glu Met		
	325	330
Glu Glu Thr Asp Lys Glu Gln Leu Thr Ala Glu Ala Lys Glu Leu Arg		
	340	345
Gln Lys Val Arg Tyr Leu Gln Asp Gln Leu Ser Pro Leu Thr Arg Gln		
	355	360
Arg Glu Tyr Gln Glu Lys Glu Ile Gln Arg Leu Asn Lys Ala Leu Glu		
	370	375
Glu Ala Leu Ser Ile Gln Ala Ser Pro Ser Ser Pro Pro Ala Ala Phe		
	385	390
Gly Ser Pro Glu Gly Val Gly Gly His Leu Arg Lys Gln Glu Leu Val		
	405	410
Thr Gln Asn Glu Leu Leu Lys Gln Gln Val Lys Ile Phe Glu Glu Asp		
	420	425
Phe Gln Arg Glu Arg Ser Asp Arg Glu Arg Met Asn Glu Glu Lys Glu		
	430	

<400> 5

Leu Xaa Gln Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asp Phe Xaa Xaa Glu Arg
1 5 10 15

Xaa Asp Arg Glu Arg
20

<210> 6

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: forward
primer: amplification of murine ABIN cDNA

<400> 6

cgggatccgc catgggtgcg ccggtgcc 28

<210> 7

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: reverse
primer: amplification of murine ABIN cDNA

<400> 7

ccccaaagctt aaatgaccca ctgcagcc 28

<210> 8

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: labelled DNA
probe

<400> 8

agctagaggg gasctttccg agagg 25

Patentansprüche

1. Die Verwendung von ABIN, oder eines funktionellen Fragments oder einer Variante davon für die Herstellung eines Medikaments für die Behandlung von TNF-induziertem Leberversagen.

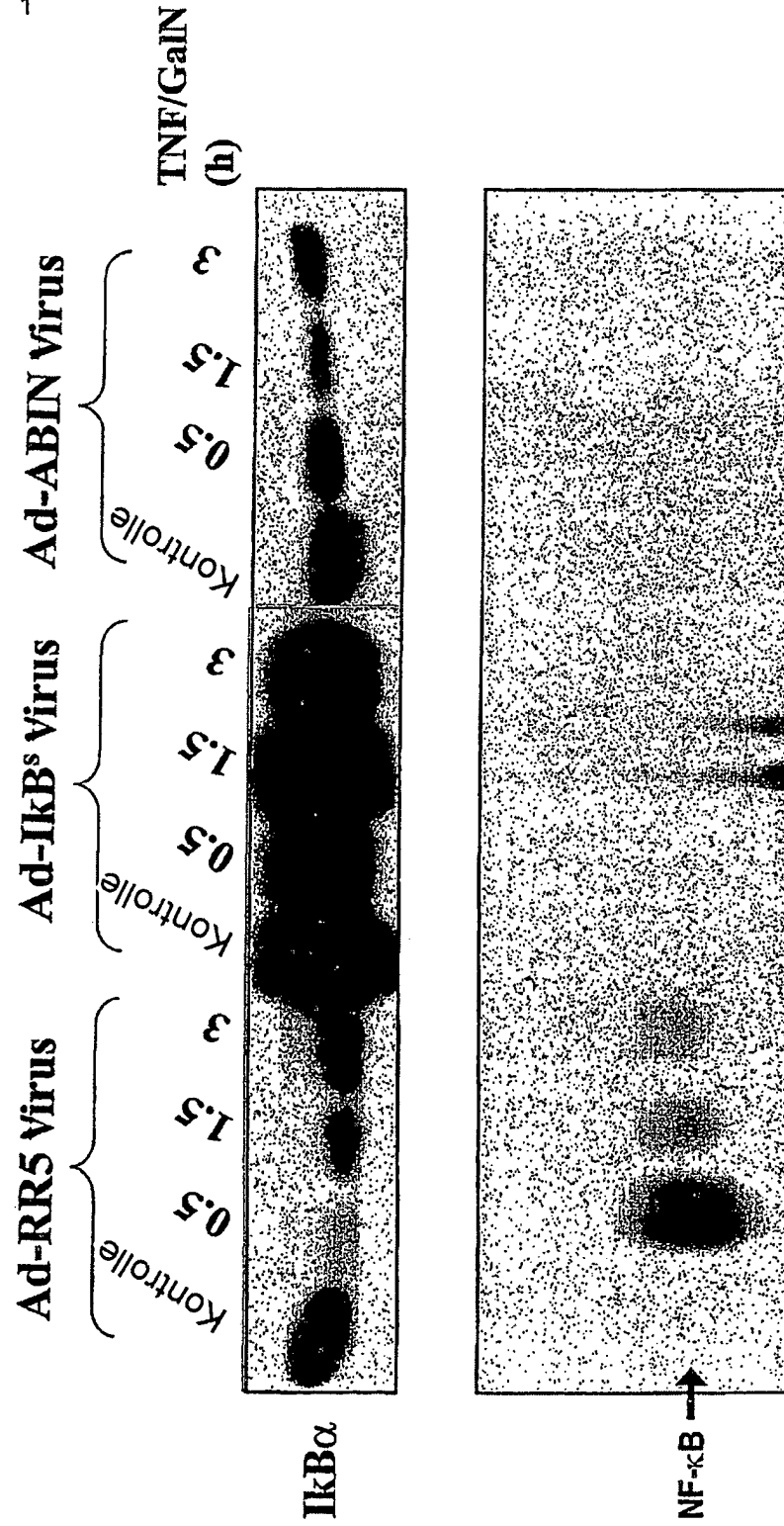
2. Die Verwendung nach Anspruch 1, wobei das ABIN die in SEQ ID N° 4 und/oder SEQ ID N° 5 dargestellte Konsensusamino-säuresequenz umfasst.

3. Verwendung nach Anspruch 1, wobei das funktionelle Fragment ein Fragment ist, das die in SEQ ID N° 3 dargestellte Aminosäuresequenz umfasst und das mit dem Protein A20 wechselwirkt.
4. Die Verwendung nach Anspruch 1, wobei das funktionelle Fragment ein Fragment ist, das die Aminosäuren 420-647 von SEQ ID N° 2 umfasst und das mit dem Protein A20 wechselwirkt.
5. Verwendung nach Anspruch 1, wobei die Variante ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus Naf1 Alpha-Protein, Naf1 Beta-Protein und Virion-assoziiertem nukleärem Shuttling-Protein.
6. Verwendung einer Nukleotidsequenz, die für ABIN, oder für ein funktionelles Fragment davon oder für eine Variante davon kodiert, für die Herstellung eines Medikaments für die Behandlung von TNF-induziertem Leberversagen.
7. Die Verwendung von Phytohämagglutinin (PHA) für die Herstellung eines Medikaments für die Behandlung von TNF-induziertem Leberversagen.
8. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei das TNF-induzierte Leberversagen virale Hepatitis, fulminante Hepatitis und/oder alkoholische Lebererkrankung ist.
9. Verwendung nach Anspruch 6, wobei das Medikament ein Gentherapie-Vektor ist.

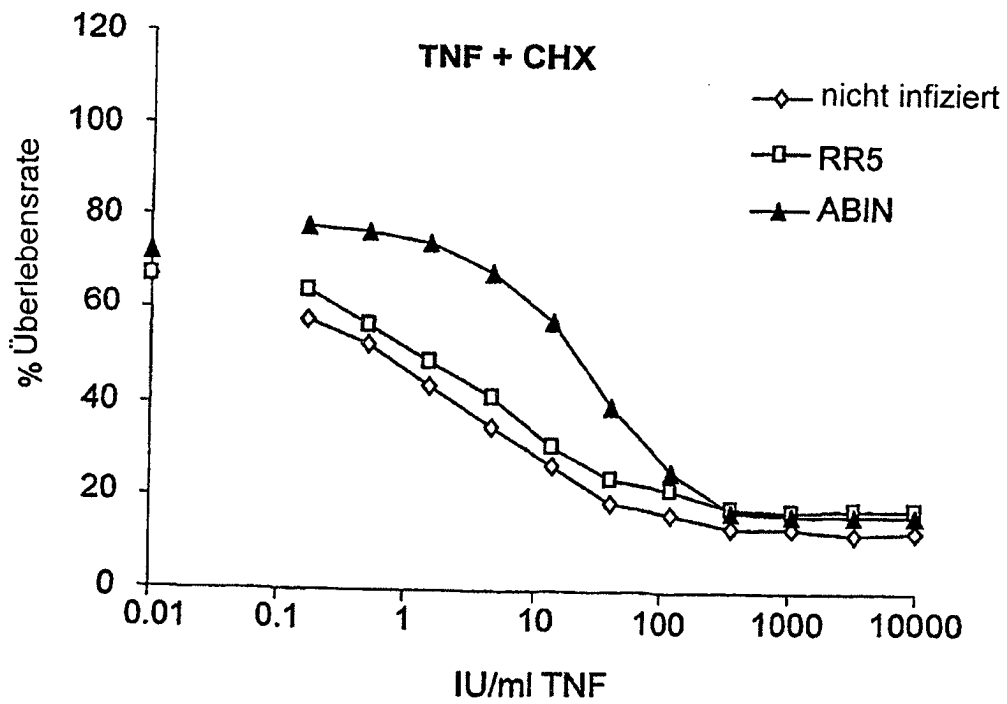
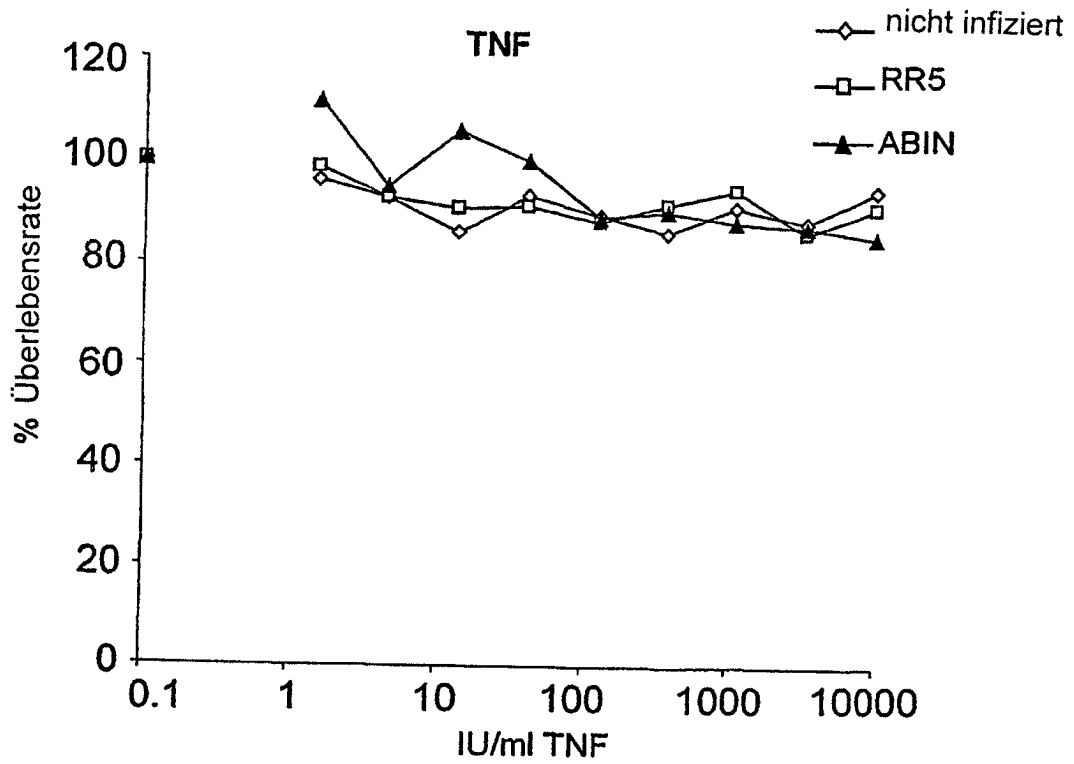
Es folgen 6 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

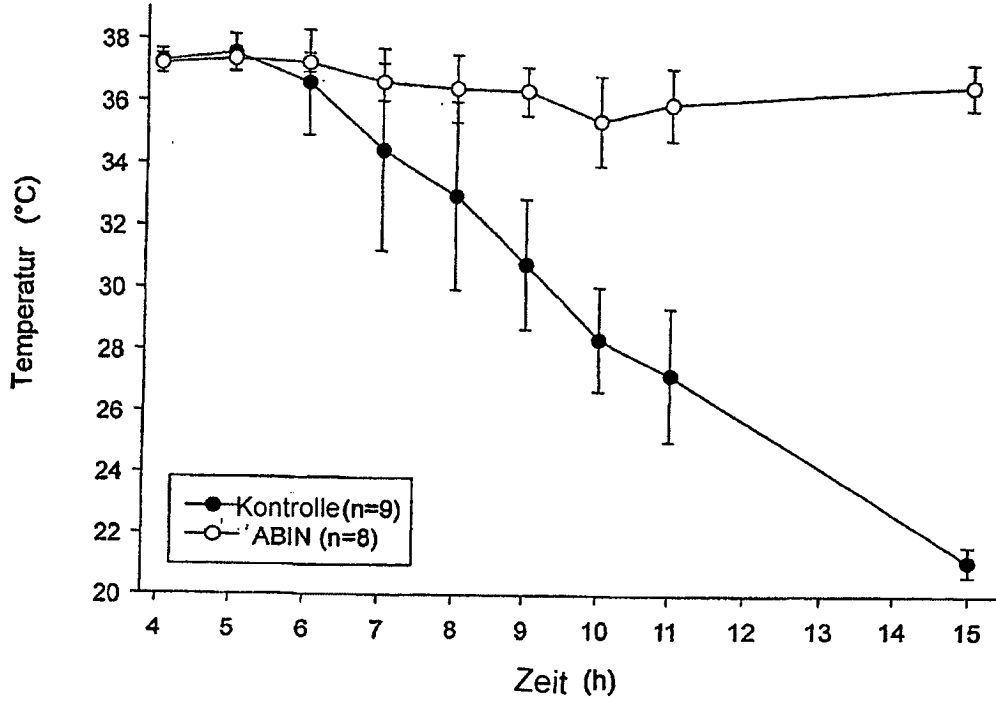
Figur 1



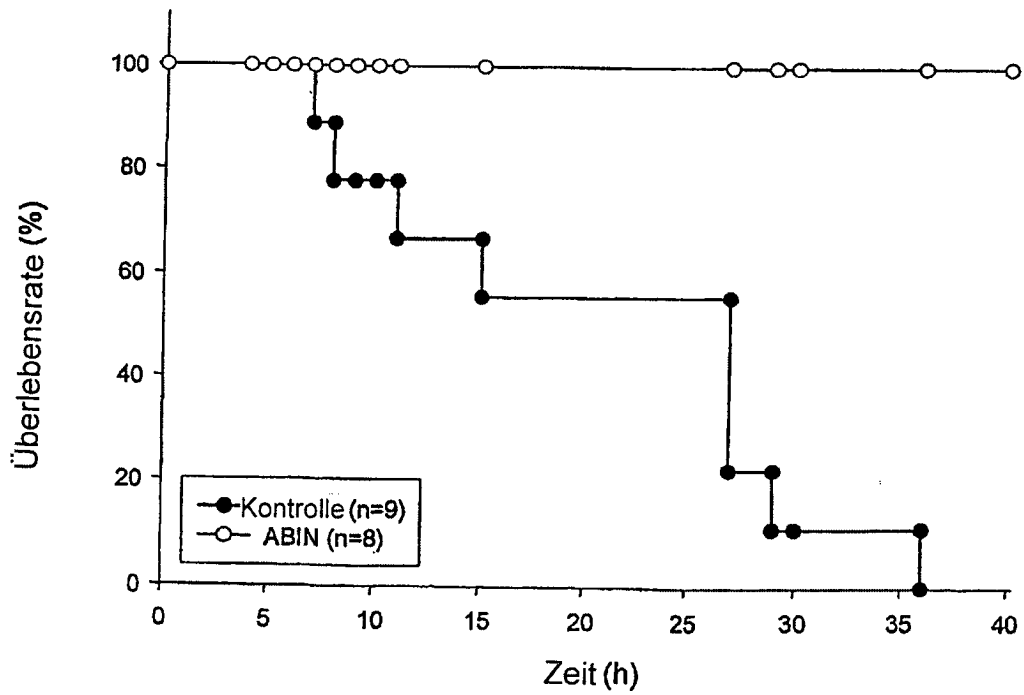
Figur 2



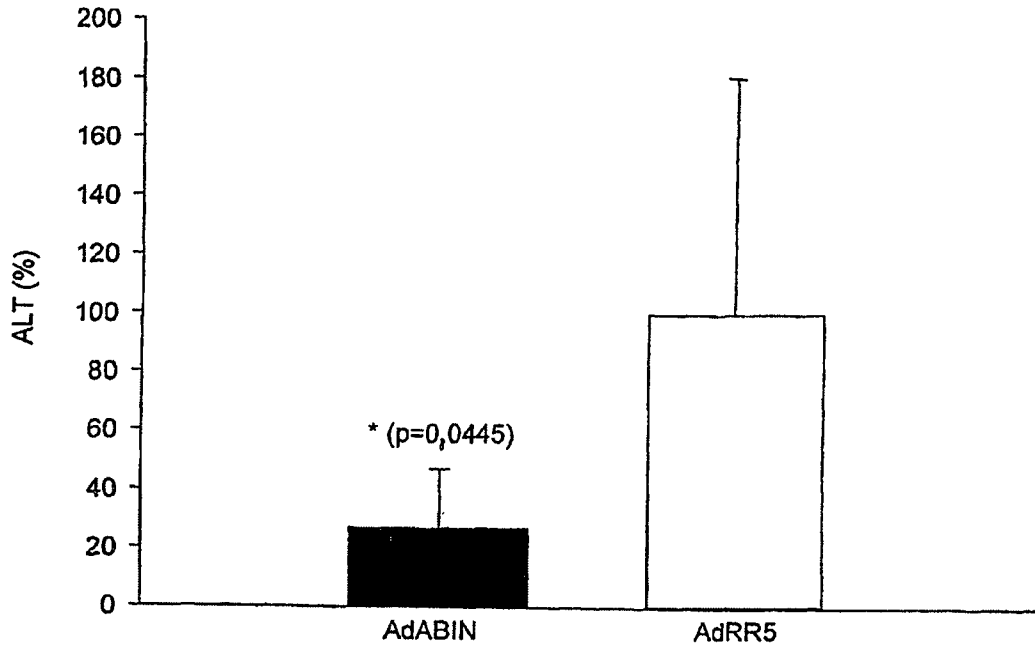
Figur 3



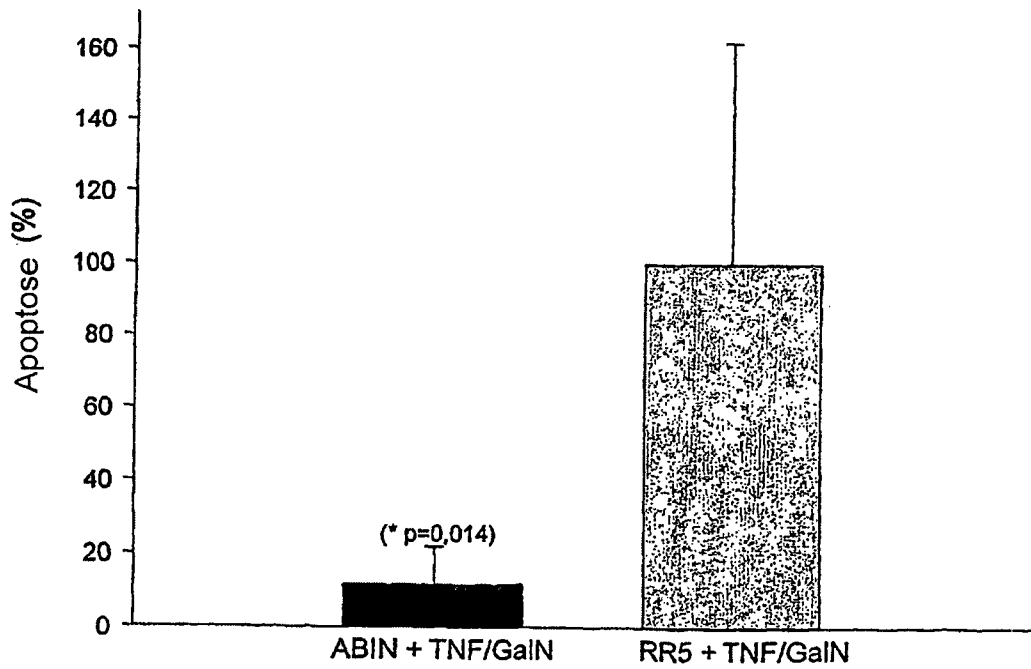
Figur 4

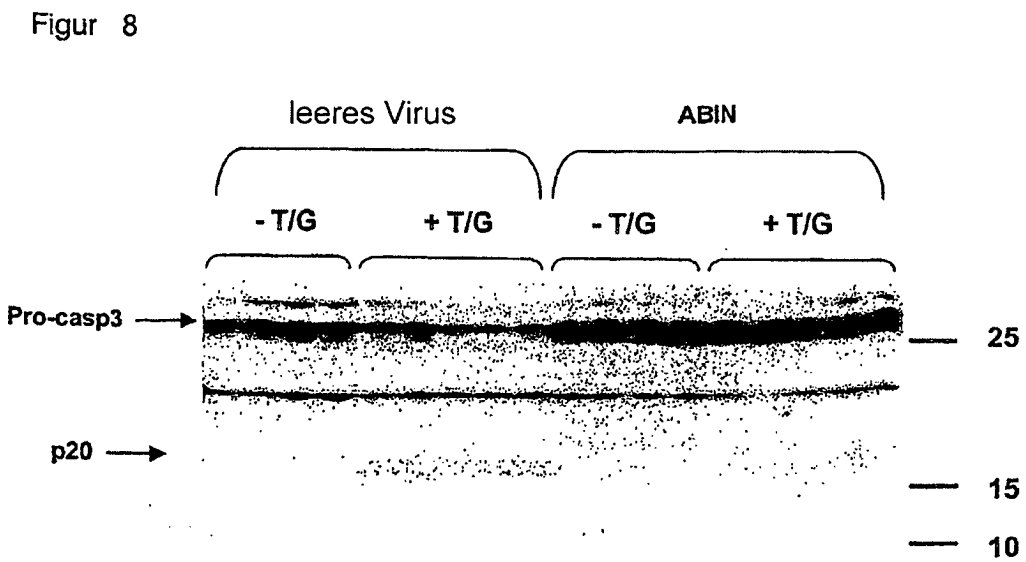
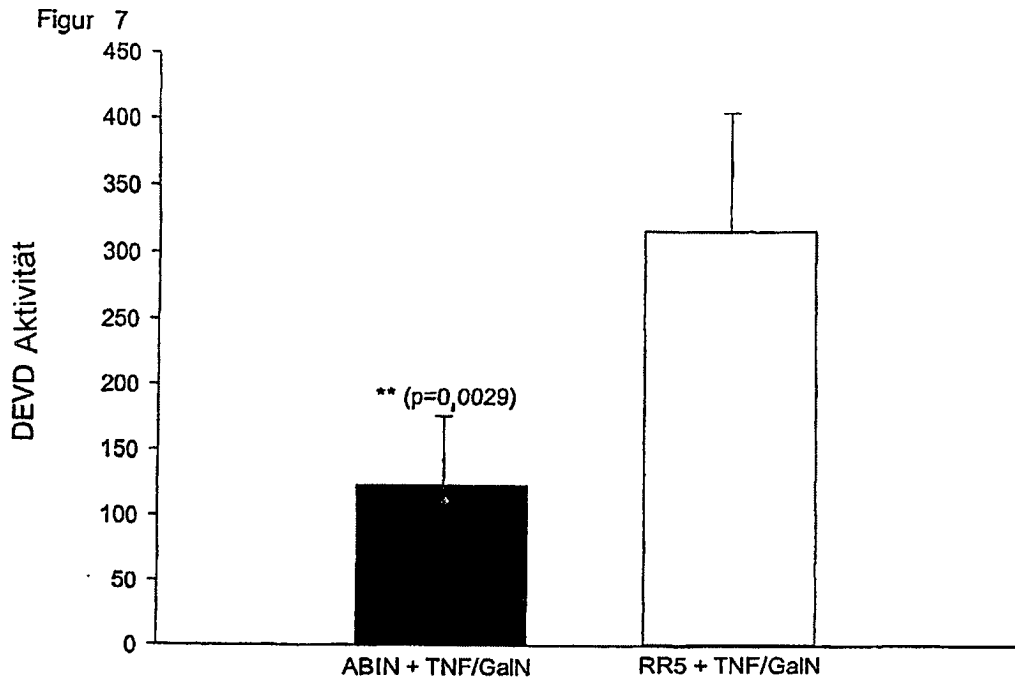


Figur 5

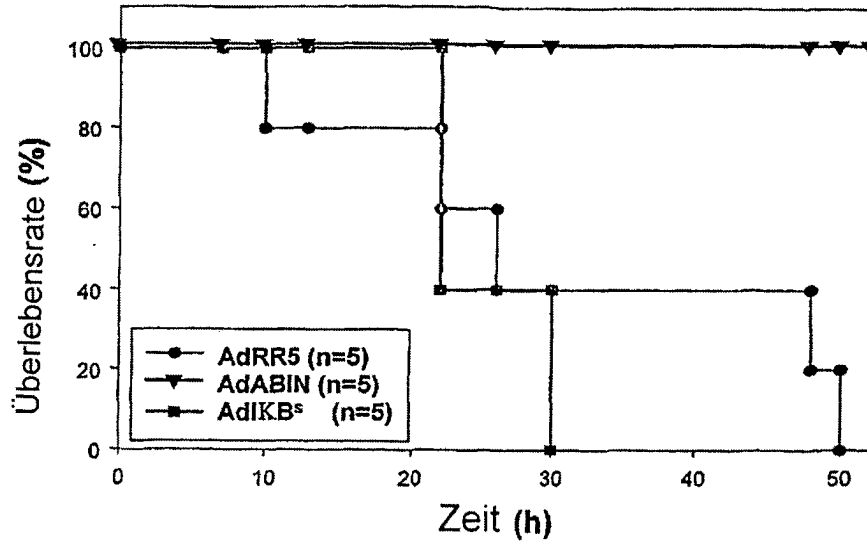


Figur 6

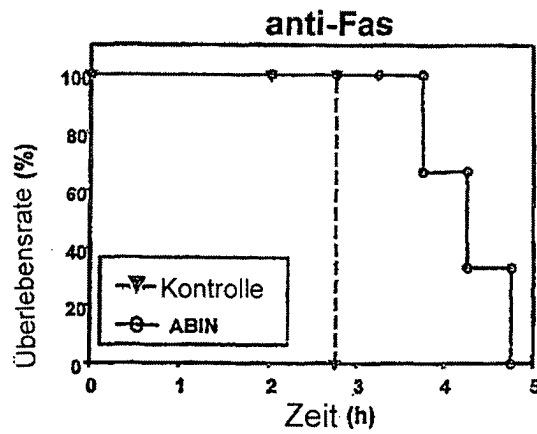




Figur 9



Figur 10



Figur 11

