(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 600 03 038 T2** 2004.04.08

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 1 200 112 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **600 03 038.5**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/GB00/02748**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **00 946 128.6**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 01/005480**
(86) PCT-Anmeldetag: **17.07.2000**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **25.01.2001**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **02.05.2002**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **28.05.2003**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **08.04.2004**

(51) Int Cl.[7]: **A61K 38/16**
C07K 19/00, C12N 15/62, A61P 31/12, A61P 37/02, G01N 33/68

(30) Unionspriorität:
9916703 16.07.1999 GB

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

(73) Patentinhaber:
Cambridge University Technical Services Ltd., Cambridge, GB; Efstathiou, Stacey, Cambridge, GB; Alcami, Antonio, Little Shelford, Cambridge, GB; Parry, Christopher Marc, Cambridge, GB

(74) Vertreter:
LEINWEBER & ZIMMERMANN, 80331 München

(72) Erfinder:
EFSTATHIOU, Stacey, Cambridge CB2 1NE, GB; ALCAMI, Antonio, Little Shelford, Cambridge CB2 5HJ, GB; PARRY, Marc, Christopher, Cambridge CB1 3SD, GB; SMITH, Vincent Peter, Chesterton, Cambridge CB4 1NS, GB; MONTEIRO E LOURO MACHADO DE SIMAS, Pedro, Jo o, P-1250 Lisboa, PT

(54) Bezeichnung: **CHEMOKIN BINDENDES PROTEIN VON GAMMAHERPESVIRUS 68 UND VERFAHREN ZU SEINER VERWENDUNG**

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] Diese Erfindung betrifft die Verwendung von Virusproteinen und Analoga davon als Bindungspartner für Immunsystemkomponenten und Analoga davon, und betrifft Zusammensetzungen und Verfahren, beispielsweise pharmazeutische Zusammensetzungen und Verfahren, und Detektions- oder Testreagenzien sowie Sets und Verfahren.

Hintergrund der Erfindung:

[0002] Unter den bekannten Herpesvirus-Proteinen gibt es ein Protein, das vom Gen M3 des Maus-Gammaherpesvirus 68 (MHV68) (V. van Berkel et al., J. Virol. 73(5), 4524–4529 (1999)) kodiert wird.

[0003] Protein M3 von MHV68 ist als sekretiertes Protein beschrieben worden. Es ist vorgeschlagen worden, dass dieses Protein die Wirtsimmunantwort auf Infektion durch das Virus modulieren könnte.

[0004] Die vorliegende Erfindung entspringt einer neuen Entdeckung von speziellen Bindungseigenschaften des M3-Proteins von MHV68.

Zusammenfassung und Beschreibung der Erfindung:

[0005] Gemäß einem Aspekt der vorliegenden Erfindung können M3-Protein und dessen funktionelle Homologe, einschließlich Derivate und Fragmente, dazu verwendet werden, Chemokine des Immunsystems und ihre Analoga zu binden und die Bindung von Chemokinen an entsprechende Zelloberflächenrezeptoren zu blockieren. M3 kann beispielsweise als zweckdienliches Immunsuppressivum agieren. Einzelheiten dieser Bindungswirkungen des M3-Proteins werden hierin weiter unten beschrieben.

[0006] Homologe des M3-Proteins können z. B. durch Mutation einer für M3 kodierenden Nucleotidsequenz und Expression aus der mutierten Sequenz und/oder durch Verwendung oder Herleitung von verwandten Gensequenzen erhalten werden, z. B. aus Herpesvirus von Crocidura russula (Bowden, Cambridge University Doktorarbeit (1997) und Chastel et al., Acta Virologica 38, 309 (1994)). Alternativ dazu können sie z. B. durch Identifizieren von Gensequenzen, die zu M3 homolog sind, durch Screening von Datenbanken erhalten werden, die entweder Proteinsequenzen oder für Proteine kodierende Nucleotidsequenzen enthalten, beispielsweise durch Screening der Swissport-Datenbank, in der die Homologie unter Anwendung des Blast-Programms ermittelt werden kann, indem z. B. irgendwelche der möglichen Algorithmen verwendet werden. Ein annehmbarer Grad an Homologie über die gesamte Sequenz ist zumindest ungefähr 20%, z. B. ungefähr 30%. Die Homologie eines funktionellen Fragments von M3 mit anderen Proteinen kann niedriger als dieser Wert sein, z. B. ungefähr 10%.

[0007] Funktionelle Homologe, einschließlich Derivate oder Fragmente von M3 können auf ihre Fähigkeit hin überprüft werden, and irgendwelche oder alle der unten erwähnten Chemokine mittels Entsprechungen der hierin beschriebenen Vernetzungstests zu binden, wobei beispielsweise radiomarkierte Chemokine verwendet werden. Andere, z. B. mit MHV 68 verwandte Proteine, beispielsweise das M1-Protein von MHV 68, können ebenfalls nützliche Chemokin-Bindungseigenschaften aufweisen. Dies kann beispielsweise durch hierin beschriebene Vernetzungstests oder geeignete, davon leicht herzuleitende Entsprechungen beurteilt werden.

[0008] Das Protein kann beispielsweise verwendet werden, um entweder Chemokine und ihre Analoga tierischer Herkunft oder Spezifität zu binden, die dem Wirtsbereich des Stammvirus entsprechen, von dem das Protein herrührt, und/oder Chemokine und ihre Analoga humaner Herkunft und/oder Spezifität.

[0009] M3-Protein kann beispielsweise verwendet werden, um C-Chemokine, CC-Chemokine, CXC-Chemokine oder CX3C-Chemokine, beispielsweise die folgenden zu binden: RANTES, MIP-1-Alpha, MCP-1, MCP-4 (CC-Chemokine); IL-8, Maus-KC, Maus-MIP2, Maus-LIX, Human-GCP2, Human-IP10 (CXC-Chemokine); und Fraktalkine (CX3C-Chemokin).

[0010] Gemäß einem Aspekt der Erfindung können M3-Protein und seine Homologe, einschließlich Derivate und Fragmente verwendet werden, um die Bindung solcher Chemokine an ihre Rezeptoren, ob in vitro, z. B. in biologischen Proben, oder in vivo zu hemmen.

[0011] Diese Wirkung kann beispielsweise in spezifischen Bindungstests unter Verwendung markierter Reaktanden, z. B. für diagnostische und Messzwecke verwertet werden. Der markierte Reaktand kann je nach Konfiguration des Tests für die vorliegenden gewünschten Zwecke entweder das M3-Protein oder das Chemokin oder der Chemokin-Rezeptor sein,

[0012] Die Testkonfiguration und die entsprechende Form und Zusammensetzung der Reagenzien kann aus bekannten spezifischen Bindungstestkonfigurationen gewählt werden: z. B. ELISA-Tests; Entsprechungen der ursprünglichen Hormon-Radioimmuntest-Konfiguration von Yalow und Berson usw. Im Allgemeinen umfasst die Testkonfiguration das Kontaktieren einer biologischen Probe mit einer markierten und/oder immobilisierten Form eines Materials mit Chemokin-Wertigkeit und/oder einem Chemokin-bindenden Mittel, worin das Material mit Chemokin-Wertigkeit normalerweise aus den hierin oben aufgezählten Chemokinen gewählt wird, und Verbindungen, welche die Bindung eines solchen Chemokins an seinen Rezeptor stören können, um eine Substanz mit Chemokin-Wertigkeit oder seinen Rezeptor zu detektieren oder zu testen, der möglicherweise in der Probe enthalten ist.

[0013] Demgemäß liegt ein Aspekt der Erfindung auch in Zusammensetzungen zur Durchführung sol-

cher Tests, z. B. das Markierungsprodukt des M3-Proteins oder eines Homologs, z. B. eines Derivats oder Fragments; kalibrierte Testaliquote von einem von diesen; das Produkt der Bindung von M3-Protein oder eines Homologs an eine Festphase, das zur Mitwirkung in einem hierin erwähnten, spezifischen Bindungstest geeignet ist; kalibrierte Testaliquote von einem der Bindungspartner in der Reaktion; und Testsets, die zwei oder mehrere solcher Reagenzien vereinigen.

[0014] Der Test kann beispielsweise ein Test auf ein Chemokin oder auf einen Chemokin-Rezeptor sein. Beispiele solcher Tests können unter Verwendung von Varianten der unten ausführlich beschriebenen Testverfahren zusammengestellt werden.

[0015] Die Bindungswirkung kann auch bei der Hemmung von Wirkungen verwertet werden, die durch Chemokine vermittelt werden, die an das M3-Protein oder seine Homologe binden können.

[0016] Beispielsweise ist bekannt, dass IL8 bei Psoriasis ein Vermittler pathologischer Wirkungen in der Haut ist. Die hier beschriebene Bindungswirkung kann entweder in diagnostischen Verfahren verwendet werden, um den Grad der Abhängigkeit von Hautwirkungen durch IL8 in einem gegebenen Fall zu beurteilen, oder um ein brauchbares Ausmaß der Hemmung solcher Wirkungen hervorzurufen.

[0017] In einem solchen diagnostischen Verfahren kann getestetes Probenmaterial aus Hautgewebe einem oben bezeichneten Test unterzogen werden, um die Gegenwart von und/ oder Menge an Chemokin, wie z. B. IL-8 zu beurteilen.

[0018] In einem Hemmbehandlungsverfahren kann Protein M3 oder ein Analogon davon, z. B. ein Derivat oder Fragment, entweder lokal oder systemisch auf Hautgewebe aufgetragen werden, um die Wechselwirkung zwischen Chemokin und seinen Rezeptor im Gewebe zu modulieren.

[0019] Gemäß einem weiteren Aspekt der Erfindung kann eine pharmazeutische Zusammensetzung M3-Protein oder ein Homolog davon, z. B. ein Derivat oder Fragment wie oben erwähnt, umfassen, und zwar zur Verwendung als entzündungshemmendes Mittel in geeigneter therapeutischer (entzündungshemmender) Menge.

[0020] Gemäß einem weiteren Aspekt der Erfindung kann ein für M3 oder ein Homolog davon, z. B. ein Derivat oder Fragment kodierendes Gen insertiert werden, und zwar unter Kontrolle eines geeigneten Promotors, z. B. eines starken gewebespezifischen oder konstitutiven Promotors, wie z. B. dem HCMV-IE-Promotor in einem Genzuführungssystem, z. B. zur Verwendung bei der Genzuführung in vivo. Das Genzuführungssystem kann ein virales oder nicht-virales Vektorsystem sein. Ein solcher Vektor kann verwendet werden, um einer transfektierten Target-Zelle die Fähigkeit zu verleihen, M3-Protein oder ein Homolog davon, z. B. ein Derivat oder Fragment z. B. für entzündungshemmende Zwecke zu produzieren, wenn die Target-Zelle sich in vivo in einem Wirt befindet, der Gegenstand der Behandlung ist. Solche entzündungshemmende Zwecke können beispielsweise die Verwendung zur Hemmung von Wirkungen umfassen, die von Chemokinen vermittelt werden, z. B. von Chemokinen, die eine Erkrankung fördern oder mit ihr assoziiert sind, beispielsweise einer entzündlichen Erkrankung, wie z. B. Psoriasis oder primärchronischer Polyarthritis. Entzündungshemmende Zwecke umfassen auch die Verminderung der Wirtsimmunantwort gegen Elemente des Vektorzuführungssystems und/ oder gegen andere Genprodukte, die in der Target-Zelle nach der Genzuführung durch ein Vektorsystem exprimiert werden, ob sie nun vom selben Vektor wie jener, der das M3-Gen zuführt, oder von einem gesonderten Zuführungsvektor für ein solches weiteres zugeführtes Gen herrühren.

[0021] Unter den im Schutzumfang der Erfindung liegenden M3-Derivaten sind Polypeptide, die durch Deletion oder Substitution modifizierte M3-Sequenzen aufweisen, die die Chemokin-bindende Eigenschaft von M3 beibehalten. Es kann beispielsweise zweckdienlich sein, jegliche immunogenen Aminosäuremotive, beispielsweise alle die an MHC-Moleküle binden, zu deletieren oder solche Motive durch eine weniger immunogene Aminosäuresequenz zu ersetzen. Beispiele immunogenen Motive sind in M.-F. Guercio et al., J. Immunol. 154, 685–693 (1995), beschrieben. Alternativ dazu kann in die M3-Sequenz eine Modifizierung eingeführt werden, welche Immuntoleranz in einem Wirt induzieren kann.

[0022] M3-Protein, z. B. gereinigtes rekombinantes M3-Protein, kann mit kompatiblen, an sich herkömmlichen pharmazeutischen Exzipienten für die Zufuhr an einen zu behandelnden Patienten formuliert werden.

[0023] M3-Protein oder M3 exprimierende Vektoren könne Zellen in vivo verabreicht werden, beispielsweise über jeden geeigneten Zufuhrweg. Alternativ dazu kann die Verabreichung zielgerichtet erfolgen, z. B. durch direkte Injektion, wie z. B. durch intravenöse Injektion an oder nahe der Stelle der Target-Zellen und/oder der der Entzündungsstelle des zu behandelnden Patienten. M3-Proteinmengen, die zweckdienlich verabreicht können, liegen im Bereich von ungefähr zumindest 1 Mikrogramm pro kg (Gewicht des zu behandelnden Patienten). Wenn die Behandlung durch Verwendung eines Vektors durchgeführt wird, der M3 exprimieren kann, z. B. ein Herpesvirus, kann es zweckdienlich sein, einen solchen Vektor in einer Dosis im Bereich von ungefähr 1×10^3 bis ungefähr 10^{13} pfu Virus, z. B. im Bereich von ungefähr 1×10^3 bis ungefähr 1×10^8 pfu Virus zu verabreichen.

[0024] Das M3 oder ein Homolog davon kann auch auf andere Weisen verabreicht werden, z. B. intravenös in einer deaggregierten Form, beispielsweise als einzelne Untereinheit. Verabreichungsformen können gewählt werden, um die Immunantwort des Wirts

auf M3 einzuschränken. Beispielsweise kann M3-Protein oder der M3 exprimierende Vektor mit einem anderen Immunsuppressivum (das nicht M3 selbst ist) oder mit einer anderen entzündungshemmenden Substanz zugeführt werden, beispielsweise mit einem Corticosteroid, Methotrexat oder mit einem Derivat des OX40-Rezeptors, z. B. einem Fusionsprotein, das eine an eine Konstantdomäne eines IgG-Moleküls fusionierte Sequenz aus OX40 umfasst, wie es z. B. in WO 95/12673 (Stanford University und Becton Dickinson: W. Godfrey et al.) beschrieben wird.

[0025] Die Immunogenität von nativem und/oder modifiziertem M3-Protein kann durch Injektion des M3-Proteins in ein Tier, z. B. in eine Maus, gefolgt von der Messung der resultierenden Immunantwort beurteilt werden, z. B. durch Messung der vom Antikörper sowie T-Zellen vermittelten Antworten unter Anwendung von Standardverfahren.

[0026] In weiteren Beispielen der Erfindung können M3-Protein und Homologe davon, einschließlich Derivate und Fragmente mit anderen Substanzen entweder kovalent oder nichtkovalent gekoppelt werden. Ein geeigneter Kopplungspartner ist zum Beispiel Polyethylenglykol (PEG). Andere Kopplungsprodukte können Fusionsproteine sein, wie z. B. Fusionsproteine, die Ig-Konstantdomänensequenzen enthalten. Ein M3-Homolog kann zum Beispiel als Fusionsprotein hergestellt werden, worin M3 oder eine trunkierte M3-Sequenz an ihrem C-Terminus an den N-Terminus von zumindest einer Konstantdomäne eines IgG-Moleküls fusioniert ist, und zwar durch Verfahren analog zu jenen, die im US-Patent 5.428.130 (Genentech) beschrieben sind. Solche gekoppelten Produkte können wünschenswerte pharmakokinetische Eigenschaften aufweisen, wie z. B. verlängerte Halbwertszeit in vivo. Fusionsproteine können ferner eine verbesserte Avidität des M3-Elements für dessen Bindungs-Target aufweisen und können auch, wie im Falle von Ig-Fusionen, eine zusätzliche nützliche Effektorfunktion bereitstellen.

[0027] Für gewisse Zwecke können Kopplungspartner an M3 oder dessen Homologe durch bekannte chemische Kopplungsverfahren gekoppelt werden, beispielsweise Biotinylierung eines Partners und Derivatisierung des anderen mit einem Bindungspartner von Biotin, wie z. B. Avidin.

[0028] In bestimmten Ausführungsformen der Erfindung kann ein funktionell aktives trunkiertes M3-Protein, d. h. ein M3-Proteinhomolog mit einer trunkierten Sequenz verwendet werden, z. B. in vivo. Trunkierte Proteine können im Vergleich zum nativen M3 eine erhöhte Fähigkeit besitzen, Gewebe z. B. an Entzündungsstellen zu durchdringen.

[0029] In weiteren Ausführungsformen der Erfindung können M3-Protein und Homologe davon, einschließlich Derivate und Fragmente auf weitere Arten zweckdienlich modifiziert werden, zum Beispiel durch Fusion von M3 mit anderen Chemokin-bindende Proteinen (oder mit aktiven Fragmenten oder Derivaten davon), z. B. an das Chemokin-bindende Protein Serp 1. Solche modifizierten Proteine können veränderte Bindungsspezifität für Chemokine aufweisen, zum Beispiel derart, dass die modifizierte M3-Form mit bezüglich der unmodifizierten M3-Form höherer oder niedrigerer Affinität an bestimmte Klassen von Chemokinen binden kann.

[0030] Solche modifizierten M3-Proteine mit veränderter Bindungsspezifität bezüglich des nativen M3 können insbesondere nützlich zur Behandlung bestimmter entzündlicher Störungen oder Erkrankungen sein, die durch Aktivität von bestimmten Chemokin-Typen charakterisiert sind, z. B. ist IL-8 mit Psoriasis assoziiert.

[0031] Die Bindungsaktivität von solchen gekoppelten, trunkierten oder modifizierten M3-Proteinen können im Allgemeinen unter Verwendung geeigneter Entsprechungen der hierin beschriebenen Vernetzungstests überprüft werden, indem beispielsweise ein radiomarkiertes Chemokin verwendet wird.

[0032] Die Erfindung erstreckt sich auf Nucleotidsequenzen (z. B. DNA-Kassetten, die geeignete Promotoren enthalten, die für M3-Protein und dessen modifizierte Formen, einschließlich Homologe, wie z. B. Fragmente oder ihre Fusionsprodukte mit anderen Polypeptiden, kodieren, wie z. B. oben beschrieben wurde) und solche Expressionskassetten, die in geeigneten Plasmiden oder anderen Vektoren, z. B. viralen Vektoren umfasst sind.

[0033] Die Erfindung und die zur Durchführung ihrer Ausführungsformen anwendbaren Materialien und Verfahren werden weiter erläutert, jedoch ohne die Absicht, ihren Schutzumfang einzuschränken, und zwar durch die folgende Beschreibung und die begleitenden Abbildungen, die weiter unten ausführlicher beschrieben sind und von denen:

[0034] **Fig.** 1 Autoradiogramme der SDS-PAGE-Analyse mit Molekülmassen in kDa aus Experimenten zeigt, in denen lösliche Chemokin-Bindungsaktivität durch MHV68 hervorgebracht wird.

[0035] **Fig.** 2 ein weiteres Autoradiogramm einer weiteren SDS-PAGE-Analyse aus einem Experiment zeigt, um die Bindungsspezifität des löslichen, Chemokin bindenden Proteins zu zeigen, das vom MHV68 M3-ORF kodiert wird.

[0036] **Fig.** 3 eine Grafik ist, die die Bindung von [^{125}I]-RANTES an Test- (U937-) Zellen in Gegenwart verschiedener Mengen MHV68-infizierter Zellüberstände, ausgedrückt in Zelläquivalenten zeigt.

[0037] **Fig.** 4 zwei Grafiken (4(a) und 4(b)) umfasst, die die Bindung von MIP-1-Alpha und IL-8 an U937-Zellen zeigt.

[0038] **Fig.** 5 ein Autoradiogramm von SDS-PAGE-Analysenexperimenten ist, das die Bindung von M3 an MIP-1-Alpha und IL-8 zeigt.

[0039] die **Fig.** 6 und 7 Grafiken sind, die die Ergebnisse von Hemmexperimenten mit M3, kultivierten Zellen und Chemokinen zeigen.

[0040] **Fig.** 8 eine Grafik ist, die Ergebnisse von In-vivo-Experimenten zur Wirkung von M3 auf Ent-

zündungsreaktionen in Mäusen zeigt.

[0041] Bezug nehmend auf die Abbildungen und auf die Beschreibungen der unten angegebenen Materialien und Verfahren:

[0042] Die Erfinder haben wie hierin beschrieben verifiziert, dass MHV68 für ein lösliches, Chemokin-bindendes Protein mit breiter Spezifität kodiert. Erstens ist eine solche Aktivität in MHV68-infizierten Zellkulturüberständen detektiert worden. Die Analyse des MHV68-Genoms hat darauf hingewiesen, dass für ein einzigartiges ORF, M3, vorhergesagt werden konnte, dass es für ein sekretiertes Protein um 40 kDa kodiert. Das M3-ORF ist vom MHV68-Genom deletiert worden, um zu überprüfen, ob das M3-ORF für die Chemokin-Bindungsaktivität kodiert. Eine Virus-Revertante, in dem das M3-ORF wieder in das Virus-Genom insertiert war, wurde ebenfalls konstruiert, um auf Wechselwirkungen anderswo im Virus-Genom zu prüfen. Die Überstände aus MHV68 der Wildform und die M3-Revertanteninfektionen bildeten einen Komplex mit [^{125}I]-RANTES nach Vernetzung, während die Überstände aus der M3-Deletionsinfektion und Mockinfektion keinen Komplex bildeten (siehe **Fig.** 1).

[0043] **Fig.** 1 zeigt durch MHV68 hervorgerufene lösliche Chemokin-Bindungsaktivität. Für die Spuren 1–4 wurden Medien aus mit MHV68 nicht infizierten (Mock) oder infizierten Kulturen mit [^{125}I]-RANTES inkubiert und mit dem Vernetzer BS 3 behandelt. Die verwendete Mediumsmenge entsprach 5 × 10^2 Zellen. Für die Spuren 5 und 6 wurden Mock-Baculovirus- oder Baculovirus/M3-infizierte Zellen mit [^{125}I]-IL-8 inkubiert und mit dem Vernetzer BS3 behandelt. Autoradiogramme der SDS-PAGE-Analyse mit Molekülmassen in kDa sind gezeigt. Die Positionen von RANTES (R), IL-8 und Liganden-Rezeptor-Komplexen (eckige Klammern) sind bezeichnet. Spur 1: MHV68 der Wildform, Spur 2: MHV68-M3-Revertante, Spur 3: MHV68-M3-Deletion, Spur 4: Mock, Spur 5: Baculovirus AcB15R, Spur 6: Baculovirus/M3.

[0044] Bindungstests mit [^{125}I]-IL-8 (CXC-Chemokin), [^{125}I]-RANTES und [^{125}I]-MIP-1α (CC-Chemokine) und [^{125}I]-Fractalkin (CX3C-Chemokin) wurden mit MHV68-infizierten Zellüberständen, gefolgt von chemischer Vernetzung mit BS3 durchgeführt. Komplexe wurden mit allen drei getesteten Chemokin-Klassen detektiert; die Mock-Infektionen produzierten keinerlei Komplexe (**Fig.** 1 und andere, in den Figuren nicht gezeigte Daten). Die Größe des Komplexes war in allen Fällen um 40 kDa, was auf ein MHV68-Chemokin-Bindungsprotein der Größe von ungefähr 40 kDa nach Subtraktion der Größe des radiomarkierten Liganden hinweist. Bindung wurde mit einem repräsentativen Mitglied der CXC- und CC- und dem einzelnen Mitglied der CX3C-Unterfamilien von Chemokinen detektiert, was auf eine breit gestreute Bindungsspezifität hinweist.

[0045] Um überdies nachzuweisen, dass das von M3 kodierte Protein zur Bindung von Chemokinen fähig war, wurde ein rekombinanter Baculovirus konstruiert, der das M3-ORF als Protein exprimiert. Es wurde gefunden das die Überstände aus mit diesem rekombinanten Baculovirus/M3 infizierten Insektenzellen einen Komplex mit [^{125}I]-IL-8 bilden (**Fig.** 1), der eine ähnliche Größe wie jene aufweist, die mit MHV68-infizierten Zellüberständen beobachtet wurde. Daher schließen die Erfinder, dass die Chemokin-Bindungsaktivität der MHV68-infizierten Zellüberstände dem Produkt des M3-ORF zuzuschreiben ist.

[0046] Um die Bindungsspezifität des Produkts des M3-ORF zu ermitteln, wurden Vernetzungsexperimente mit einem 2000fachen molaren Überschuss unmarkierter Chemokin-Verdränger durchgeführt. Die Bindung an [^{125}I]-RANTES wurde in gewissem Ausmaß von allen getesteten unmarkierten Chemokin-Verdrängern verdrängt, die Mitglieder aus allen vier der Unterfamilien (CXC, CC, C und CX3C) und Beispiele von Human- und Maus-Chemokinen umfassten (**Fig.** 2). Die unterschiedlichen Bandenintensitäten wiesen auf unterschiedliche Affinitäten des M3-Proteins für unterschiedliche Chemokine hin. Weitere Exprimente wiesen darauf hin, dass die an IL-8 und MIP-1α bindendes M3 auch mit Exodus-2 (auch als sekundäres Lymphgewebe-Chemokin SLC bekannt) sowie den in **Fig.** 2 aufgezählten Chemokinen verdrängt werden konnte.

[0047] **Fig.** 2 zeigt die Bindungsspezifität des löslichen, vom MHV68-M3-ORF kodierten Chemokin-Bindungsproteins durch Vernetzung von 0,4 nM Human-[^{125}I]-RANTES mit BS3 an Medium aus nicht infizierten (Mock) und infizierten Kulturen in Abwesenheit (Spur 2) und Anwesenheit eines 2000fachen Überschusses unmarkierten Chemokine aus verschiedenen Spezies (Spuren 3–18). Die Mediumsmenge entsprach 5 × 10^2 infizierten Zellen. Ein Liganden-Rezeptor-Komplexe zeigendes Autoradiogramm der SDS-PAGE-Analyse ist gezeigt. Spur 1: Mock-infizierte Zellen, Spur 2: MHV68-infizierte Zellen, nicht verdrängt, Spur 3: Human-RANTES, Spur 4: Maus-RANTES, Spur 5: Human-MIP-1α, Spur 6: Maus-MIP-1α, Spur 7: Virus-MIP-2, Spur 8: MCP-1, Spur 9: MCP-4, Spur 10: Maus-KC, Spur 11: Human-GROα, Spur 12: Human-IL-8, Spur 13: Maus-MIP-2, Spur 14: Maus-LIX, Spur 15: Human-GCP-2, Spur 16: IP-10, Spur 17: Human-Lymphotactin, Spur 18: Fractalkin.

[0048] Es ist weiters gezeigt worden, dass das lösliche MHV68-Chemokin-Bindungsprotein M3 die Bindung von Chemokinen an Oberflächenrezeptoren blockieren kann.

[0049] Folglich wurde eine biologische Aktivität von M3 für CC-Chemokine durch die Fähigkeit von Überständen aus MHV68-infizierten Zellen gezeigt, die Bindung von [125I]-RANTES an Zellrezeptoren zu hemmen. Die Bindung von [125I]-RANTES an U937-Zellen wurde in dosisabhängiger Weise durch MHV68-infizierte Zellüberstände gehemmt (**Fig.** 3). Diese Ergebnisse wiesen darauf hin, dass das vom M3-ORF kodierte lösliche Protein die Bindung von

Chemokinen an ihre hochaffinen Zellrezeptoren blockiert. Dies stand im Einklang mit einer hochaffinen Wechselwirkung von RANTES und anderen Chemokinen mit dem M3-Protein und lässt darauf schließen, dass dieses virale Chemokin-bindende Protein ein potenter Hemmstoff der biologischen Aktivität von Chemokinen ist, die durch die Wechselwirkung mit ihren Zellrezeptoren vermittelt wird.

[0050] **Fig.** 3 stellt die Bindung von [125I]-RANTES an U937-Zellen in Gegenwart verschiedener Mengen MHV68-infizierter Zellüberstände, ausgedrückt als Zelläquivalente dar. Ein einzelner Punkt ist für Mock-infizierte Überstände (20.000 Zelläquivalente) gezeigt und ein einzelner Punkt, der einen 100fachen Überschuss von unmarkiertem RANTES darstellt. Mittelwerte aus Doppelproben sind als Prozentanteile der Auszählungen ausgedrückt, die in Abwesenheit eines Konkurrenten binden.

[0051] **Fig.** 4a bzw. 4b stellen die Bindung von [125I]-MIP-1-Alpha und [125I]-IL-8 an U937-Zellen in Gegenwart verschiedener Mengen von rekombinantem, in Baculovirus produziertem M3 dar. Überstände von mit Baculovirus infizierten Zellen, die M3 nicht exprimieren, bzw. unmarkiertes MIP-1-Alpha oder IL-8 sind als Kontrolle wie für **Fig.** 3 gezeigt. **Fig.** 4, Teile (a) bzw. (b) zeigen, dass M3 die Bindung von MIP-1-Alpha und IL-8 an ihre natürlichen, an U937-Zellen exprimierten Rezeptoren hemmt.

[0052] Die Tatsache, dass M3 die Bindung von Chemokinen an hochaffine Chemokin-Rezeptoren in U937-Zellen blockiert, wird als Hinweis angesehen, das die Affinität von M3 für Chemokine ähnlich oder besser ist als jene, die für zelluläre Chemokin-Rezeptoren berichtet wurden.

[0053] Die Hemmung der Chemokin-Bindung an Zellen, wie sie hierin beschrieben wird, kann mit sehr niedrigen M3-Dosen erzielt werden, was auch einen Hinweis darauf liefert, das es ein potenter Hemmstoff der Chemokin-Rezeptorbindung ist.

[0054] Die Hemmung der Chemokin-Bindung an Zellen durch M3 schien für Human-IL-8 stärker als für die anderen getesteten Chemokine zu sein. Dies könnte auf einen gewissen Grad an Spezifität der M3-Bindung an bestimmte Chemokine hindeuten.

[0055] **Fig.** 5 stellt dar, dass M3 nicht an das GAG-Motiv von Proteinen bindet. Vorinkubation mit Heparin oder Heparinsulfat (die beide ein GAG-Motiv enthalten) hatte keine Wirkung auf die Bindung von IL-8 oder MIP-1-Alpha an M3, d. h. Heparin und Heparinsulfat stören nicht die Fähigkeit von M3, an radiomarkiertes IL-8 oder MIP-1-Alpha zu binden.

[0056] **Fig.** 6 stellt die Hemmung des Calciumflusses durch variierende Mengen von gereinigtem M3-Protein in mit 50 ng/ml RANTES stimulierten einkernigen Peripherblutzellen (PBMCs) dar. Die gezeigte Kontrolle sind mit RANTES und Ovalbumin stimulierte PBMCs. Die Ergebnisse zeigen, dass M3 den RANTES-induzierten Calciumfluss in Human-PBMCs auf dosisabhängige Weise hemmt.

[0057] **Fig.** 7, Teile (a) bzw. (b) stellen die Hemmung der Migration von THP-1-Zellen in 50 ng/ ml MCP-1 ausgesetzten Zellen (Teil (a)) und der Migration von Neutrophil-Zellen in 50 ng/ml IL-8 ausgesetzten Zellen (Teil (b)) durch variierende Mengen von gereinigtem M3-Protein dar. Gezeigte Kontrollen sind: Entweder mit Chemokin oder M3 alleine inkubierte Zellen und mit Chemokin inkubierte Zellen und weiters ein Kontrollprotein, das VP22 oder Ovalbumin ist. Die Ergebnisse zeigen, dass M3 die von MCP-1 induzierte Migration von THP-1-Zellen und die IL-8-Migration von Neutrophilen auf dosisabhängige Weise hemmt.

[0058] **Fig.** 8 stellt die Wirkung von gereinigtem M3-Protein auf die Berührungsempfindlichkeits-Entzündungsreaktion in vivo in einem Maus-Modell dar. Das Ausmaß der Reaktion wird durch Messen des Unterschieds der Maus-Ohrdicke in sensibilisierten Tieren durch Vergleich zwischen exponiertem und nicht exponiertem Ohr desselben Tiers ermittelt. M3 vermindert nachweislich die Ohrenentzündung in mit Oxazolon exponierten Mäusen. Die in **Fig.** 8 gezeigten Werte stellen Mittelwerte der Ohrdicke unter Kontroll- und exponierten Ohren plus oder minus S.D. dar. Es wurde eine statistische Analyse zwischen M3-behandelten Gruppen (10 und 100 Mikrogramm/Injektion) und der Ovalbumin- (OVA-) Kontrollgruppe unter Anwendung des Student T-Test (*p < 0,05) durchgeführt.

Materialien und Verfahren

Viren und infizierte Zellüberstände

[0059] Viren wurden an BHK 21-Zellen gezüchtet und getestet. Überstände wurden aus mit 5 pfu je Zelle infizierten BHK-Zellen hergestellt; das Inokulum wurde nach 2 Stunden entfernt und infizierte Zellen mit nach Glasgow modifiziertem Eagles-Medium (GMEM) überschichtet. Zwei Tage nach der Infektion wurden die Überstände gesammelt, Zelltrümmer mittels Zentrifugation entfernt und HEPES-Puffer (pH 7,5) auf eine Endkonzentration von 20 mM zugesetzt. Die Überstände wurden mit 4,5',8-Trimethylpsoralen und UV-Licht inaktiviert (Tsung et al. (1996)).

Reagenzien

[0060] Radioiodiertes rekombinantes Human-IL-8, RANTES und MIP-1α (2.000 Ci/mmol) wurden von Amersham (Little Chalfont, UK) erhalten. Rekombinantes Human-RANTES wurde von R&D Systems (Minneapolis, MN) erhalten. Rekombinantes Human-Makrophagen-Enzündungsprotein-1α (MIP-1α), virales MIP-2 aus Human-Herpesvirus-8, Monozyten-chemisches-Attraktans-Protein (MCP)-1, MCP-4, Human-Interleukin-8 (IL-8), GRO-α, IFN-γ-induzierbares Protein 10 (IP-10), GCP-2, Lymphotactin, Fractalkin und Maus-RAN-TES, Maus-MIP-1α, Maus-KC, Maus-MIP2 und Maus-Lipopolysaccharid-induziertes CXC-Chemokin (LIX) wurden von PeproTech(Rocky

Hill, NJ) erhalten.

Bindungstests

[0061] Das Bindungsmedium war RMPI 1640, das 20 mM HEPES (pH 7,4) und 0,1% BSA enthielt. Vernetzungsexperimente mit Bis(sulfosuccinimidyl)suberat (BS3) (50 µM) an [^{125}I]-Chemokine (0,4 nM) wurden in 25 µl wie beschrieben durchgeführt (Alcami & Smith (1995), Upton et al. (1992)). Proben wurden mit 12%igen Acrylamid-SDS-PAGE-Gelen analysiert. In den Verdrängungstests mit U937-Zellen wurden Überstände mit 100 pM [^{125}I]-Chemokin in 100 µl für 1 Stunde bei 4°C vorinkubiert. Anschließend wurden 2,5 × 10^6 U937-Zellen in 50 µl zugesetzt und für 2 Stunden bei 4°C inkubiert. Gebundenes [^{125}I]-Chemokin wurde mittels Phthalatöl-Zentrifugation wie beschrieben bestimmt (Alcami & Smith (1992)).

Konstruktion von rekombinantem Baculovirus

[0062] Das MHV68-M3-ORF wurde aus infizierter Zell-DNA mittels PCR unter Verwendung der Oligonucleotide 5'-CGCGAATTCATGGCCTTCCTATCCACATCG-3', das eine EcoRI-Stelle insertiert, und 5'-GGTGCGGCCGCATGATCCCCAAAATACTCCAGC-3', das eine NotI-Stelle insertiert, amplifiziert. Das Produkt von 1.238 Basenpaaren wurde mit EcoRI und NotI verdaut, bevor es in EcoRI- und NotI-verdautes pBAC-1(Novagen) ligiert wurde, um pBACM3 zu erzeugen. Das ORF wurde mittels Sequenzierung bestätigt, bevor rekombinante Baculoviren wie beschrieben hergestellt wurden (Alcami & Smith (1995)). Eine C-terminale 6-Histidin-Markierung wurde in mit rekombinantem Baculovirus infizierten sf21-Insektenzellen hergestellt. Der den löslichen IL-1β-Rezeptor des Vaccnia-Virus exprimierende rekombinante Baculovirus AcB15R ist beschrieben worden (Alcami & Smith (1992)).

[0063] Gelegentlich hat es sich als zweckdienlich erwiesen, das die Histidin-Markierung enthaltende rekombinante M3 zu reinigen, indem der das Protein enthaltende Überstand zunächst mittels Membranfiltration konzentriert und dann das Konzentrat gegen phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) dialysiert und das Dialyseprodukt danach an einer Nickel-NTA-Säule (Quiagen) auf an sich bekannt Weise gereinigt wurde.

[0064] Gereinigtes rekombinantes Proteinprodukt ist zum Beispiel wie folgt verwendet worden:

Zur Emittlung, ob M3 an das GAG-Bindungsmotiv von Chemokinen bindet

[0065] Bindungstests wurden wie oben beschrieben durchgeführt mit der Ausnahme, dass radiomarkiertes IL-8 und MIP-1-Alpha mit überladenden Mengen Heparin und Heparinsulfat vor Zugabe von M3 enthaltenden MHV-68-Überständen vorinkubiert wurden.

Herstellung von einkernigen Peripherblutzellen (PBMCs) zur Verwendung im Calciumflusstest

[0066] PBMCs wurde aus Gesamtblut mittels Standardverfahren isoliert, wie z. B. jenen, die in Current Protocols in Immunology, Bd. 2, R. Coico (Hrsg.), Wiley and Sons, USA, beschrieben sind.

[0067] Isolierte Zellen wurden dann in 1% Fetalkälberserum enthaltender, Hanks' gepufferter Salzlösung (HBSS, Gibco, UK) gewaschen, gefolgt von Resuspendierung (auf eine Konzentration von 1 × 10^7 Zellen/ml) in HBSS, dem Calcium- und Magnesiumsalze fehlte (Gibco, UK). Die Zellen wurden dann mit Fluo-4AM- (4 Mikromolare Endkonzentration, bezogen von Molecular Probes) und Pluronic-F-127-Markern (0,02% Endkonzentration, bezogen von Molecular Probes) gemischt. Dem folgte die Inkubation der Zellen (20 Minuten, 37°C), Die markierten Zellen wurden dann in 1% Fetalkälberserum enthaltendem HBSS verdünnt (1 zu 5) und für 40 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden in HEPES-gepufferter Salzlösung gewaschen und resuspendiert (1,1 × 10^6 Zellen/ml) und für 10 Minuten bei 37°C inkubiert. 950 Mikroliter der Zellsuspension wurden dann in ein FACS-Röhrchen überführt und für den Calciumflusstest bei 37°C gehalten.

Calciumflusstest

[0068] RANTES-Protein (PeproTech) und gereinigtes M3-Protein (wie oben beschrieben in rekombinantem Baculovirus hergestellt) wurden vor der Verwendung in gepufferter Salzlösung verdünnt. Je dreißig Mikroliter RANTES (2 Mikrogramm/ml) und M3 (variierende Konzentrationen im Bereich von 10 Mikrogramm/ml bis 0,16 Mikrogramm/ml) wurden miteinander gemischt und für 6 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Fünfzig Mikroliter des Gemisches wurden dann zu 950 Mikrolitern PBMCs (wie oben beschrieben erhalten) zugegeben. Kontrollen waren mit RANTES alleine stimulierte PBMCs und auch mit einem Gemisch aus RANTES und Ovalbumin (in einer Endkonzentration von 250 ng/ml) stimulierte Zellen. Der Calciumfluss der Zellen wurde durch Bestimmung der Zellfluoreszenz unter Verwendung einer FACS-Sortiermaschine (Becton Dickinson) und des Cell-Quest-Programms gemessen.

[0069] Die prozentuelle Hemmung des Calciumflusses wurde wie folgt ermittelt: % Hemmung = ((Fluoreszenz der RANTES-Kontrolle – Fluoreszenz von RANTES und M3)/Fluoreszenz der RANTES-Kontrolle) × 100.

Züchtung von THP-1-Zellen und Neutrophilen zur Verwendung im Zellmigrationstest

[0070] THP-1-Zellen (erhalten von der Europäischen Kultursammlung (ECACC)) wurden in 10% hit-

zeinaktiviertes Fetalkälberserum (Sigma), Penicillin (100 International Units/ml) und Streptomycin (100 mg/ml) enthaltendem RPMI-1540-Medium (Sigma) gezüchtet (37°C in 5% Kohlendioxid enthaltender, befeuchteter Atmosphäre). Vor dem Zellmigrationstest wurden die Zellen in 1% Human-Serumalbumin enthaltendem HBSS gewaschen und in Gewebekulturnäpfen in einer Konzentration von 1×10^7 Zellen pro ml resuspendiert.

[0071] Neutrophile wurden aus Human-Gesamtblut unter Anwendung von Standardverfahren isoliert, beispielsweise jenen, die in Current Protocols in Immunology, Bd. 2, Coico (Hrsg.), Wiley and Sons, USA, beschrieben sind.

Zellmigrationstest

[0072] Je fünfundsiebzig Mikroliter MCP-1 (100 ng/ml in HEPES und 1% Human-Serumalbumin enthaltend) sowie M3 (variierende Konzentrationen im Bereich von 1.000 ng/ml bis 31 ng/ml) wurden bemischt und für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Am Ende der Inkubation wurden 29 Mikroliter des Gemisches dem unteren Napf einer Transwell-Migrationskammer (ChemoTX™, Receptor Technologies, Oxon, UK) zugegeben und Human-Monozyten ($2{,}5 \times 10^5$ je Napf) wurden dem oberen Napf zugegeben. Eine Polycarbonatmembran (5 Mikrometer Porengröße) trennte die beiden Näpfe. Die Kammer wurde dann für 2 Stunden bei 37°C in 5% Kohlendioxid enthaltender, befeuchteter Atmosphäre inkubiert. Am Ende dieser Inkubationszeitdauer wurden Zellen, die sich innerhalb der Membran befanden, entfernt und dem unteren Napf durch Inkubation der Membran mit EDTA, gefolgt von Zentrifugation, zugegeben. Die Anzahl von Zellen, die migriert sind, wurde durch Auszählen der Zellen im unteren Napf mit einem Hämozytometer bestimmt. Kontrollen waren Puffer alleine im unteren Napf und auch Chemokin alleine im unteren Napf.

[0073] Die Migration von Neutrophilen in Gegenwart von IL-8 und M3 wurde wie oben für die Migration von THP-1-Zellen beschrieben bestimmt mit der Ausnahme des Folgenden: IL-8 wurde in einer Konzentration von 200 ng/m) verwendet und wurde in 0,5% Fetalkälberserum enthaltendem RPMI verdünnt. Neutrophile wurden dem oberen Napf der Kammer in einer Konzentration von 5×10^4 Zellen/Napf zugegeben. Eine Membran mit einer Porengröße von 3 Mikrometern wurde in den Experimenten verwendet und die Kammer für 1 Stunde inkubiert.

In-vivo-Berührungsempfindlichkeitstest

[0074] Berührungsempfindlichkeit in der Maus ist ein bekanntes Tiermodell der Entzündung. Mäuse (6 je Gruppe) wurden gegen Oxazolon (Sigma), einem bekannten Sensibilisierungsmittel sensibilisiert und über einen Zeitraum wie folgt behandelt: Am Tag 0 wurden 25 Mikroliter Oxazolon (3%ige Lösung in Aceton (4 Teile) und Olivenöl (1 Teil)) auf den Bauch der Mäuse aufgestrichen und 5 Mikroliter auf jede Hinterpfote. Am Tag 5 wurden 10 Mikroliter 0,6% Oxazolon auf die rechten Ohren von Mäusen und als Kontrollen 10 Mikroliter Aceton/Olivenöl auf die linken Ohren aufgestrichen. An Tagen –1, 0, 1, 4 und 5 wurde den Mäusen intraperitoneal 100 Mikroliter gereinigtes M3-Protein (0,1 Mikrogramm bis 100 Mikrogramm M3) injiziert und Ovalbumin wurde als Kontrolle verwendet. Am Tag 6 wurde die Ohrdicke mit einer Schublehre gemessen. Ein Maß für die Entzündungsreaktion war der Unterschied der Ohrdicke zwischen den rechten und linken Ohren der Mäuse.

[0075] Weitere im Verfahrensabschnitt hierin zitierte Literaturstellen sind die Folgenden:

[0076] A. Alcami und G. L. Smith, "A soluble receptor for interleukin-1β encoded by vaccinia virus: a novel mechanism of virus modulation of the host response to infection", Cell 71, 153–167 (1992).

[0077] A. Alcami und G. L. Smith, "Vaccinia cowpox and camelpox viruses encode interferon-γ receptors with novel broad species specificity", J. Virol. 69, 4633–4639 (1995).

[0078] T. M. Engeman, A. V. Gorbachev, R. P. Galgue, P. S. Heeger und R. Fairchild, "Inhibition of functional T cell priming and contact hypersensitivity responses by treatment with anti-secondary lymphoid chemokine antibody during hamster sensitisation", J. Immunol. 164, 5207–5214 (2000).

[0079] K. Tsung, J. H. Kim, W. Marti, R. M. L. Buller und J. A. Norton, "Gene expression and cytopathic effect of vaccinia virus inactivated by psoralen and long-wave UV light", J. Virol. 70, 165–171 (1996).

[0080] C. Upton, K. Mossman und G. McFadden, "Encoding of a homolog of the IFN-gamma receptor by myxoma virus", Science 258, 1369–1372 (1992).

[0081] Die vorliegende Erfindung kann auch auf die Wechselwirkung von Viren, wie z. B. den Human-Immundefizienzvirus und Parasiten, wie z. B. Plasmodium vivax mit Anheftung von Proteinen an der Oberfläche der Target-Zellen, die sie infizieren, angewendet werden.

[0082] Diese Anwendung umfasst Verfahren der Hemmung der Infektion von Zellen, die für Viren, wie z. B. den Human-Immundefizienzvirus und Parasiten, wie z. B. Plasmodium vivax anfällig sind.

[0083] Da das M3-Protein Chemokine in Lösung bindet und folglich die Wechselwirkung von Chemokinen mit zellulären Chemokin-Rezeptoren nachahmt, kann erwartet werden, dass das M3-Protein mit dem Vorgang der HIV- oder P. vivax-Infektion wechselwirkt.

[0084] Insbesondere wird erwartet, dass M3-Protein an das Anheftungsprotein von HIV oder Plasmodium vivax binden und folglich die Bindung von HIV oder P. vivax an Chemokin-Rezeptoren in der Wirtszelle und/oder das anschließende Eindringen in Zellen verhindern kann. M3-Protein kann folglich verwendet werden, um die Infektion von Target-Zellen durch diese Pathogene zu unterdrücken oder zu verhindern

und kann folglich ein Individuum vor HIV- oder P. vivax-Infektion schützen oder den Schutz fördern. M3-Protein kann auch verwendet werden, um die Wechselwirkung von HIV und P. vivax mit ihren Target-Zellen zu untersuchen.

[0085] Chemokin-Rezeptoren spielen bekanntermaßen eine entscheidende Rolle bei der Übertragung und Verbreitung von HIV, indem sie als ein Cofaktor wirken, der gemeinsam mit CD4 für Viruseintritt und Infektion erforderlich ist (Faicu, Nature 384, 529 (1996)). Die Bedeutung des Chemokin-Rezeptors CCR5 in vivo wird durch den Befund nachgewiesen, dass für eine Mutantenversion des CCR5-Gens homozygote Individuen gegen HIV-Infektion resistent sind. Bindung von Chemokinen oder mutierten Chemokin-Antagonisten an Chemokin-Rezeptoren kann die HIV-Infektion blockieren, was das Potential der Blockierung der HIV-Chemokin-Rezeptor-Wechselwirkung als eine präventive und therapeutische Strategie gegen HIV veranschaulicht.

[0086] Der Malariaparasit Plasmodium vivax verwendet bekanntermaßen einen Chemokin-Rezeptor unbekannter Funktion (Duffy-Antigen) um in Erythrozyten einzudringen und diese zu infizieren (Horuk et al., Science 261, 1182 (1993)). Ähnlich zu HIV-Infektionen blockiert die Bindung von Chemokinen an das Duffy-Antigen die Infektion von Erythrozyten durch P. vivax und Individuen, denen das Duffy-Antigen an ihren roten Blutkörperchen fehlt, sind gegen P. vivax-Malaria resistent. Folglich kann von der Blockade der Wechselwirkung des Malariaparasiten mit Duffy-Antigen durch M3 oder Homologen erwartet werden, im Zusammenhang mit der P. vivax-Infektion zweckdienlich zu sein, ob zur Intervention, Untersuchung oder zur Entwicklung von Medikamenten gegen P. vivax.

[0087] Ein Hemmstoff der Virus- oder Parasitenwechselwirkung mit einem Chemokin-Rezeptor kann verwendet werden, um Infektion nach Übertragung zu verhindern oder zu unterdrücken, z. B. in Fällen der versehentlichen Injektion mit HIV-kontaminiertem Material. Das M3-Protein kann auch in Kombination mit anderen Anti-HIV-Therapien verwendet werden (keine davon ist zu 100% effektiv).

[0088] Die natürlichen Liganden von M3 sind Chemokine. Da gp120 von HIV bekanntermaßen Chemokine nachahmt und mit Chemokin-Rezeptoren wechselwirkt, kann von M3 erwartet werden, dass es mit HIV gp120 in Wechselwirkung tritt, insbesondere da es wie hierin gezeigt eine derartig breite Bindungsspezifität für Chemokine aufweist. jedoch ist die Affinität von M3 für gp120 möglicherweise nicht so hoch wie für dessen Chemokine, die die natürlichen Liganden von M3 sind.

[0089] Gemäß einem der Aspekte der Erfindung kann daher In-vitro-DNA-Mutagenese auf Basis des M3-Gens angewendet werden, um modifizierte M3-Formen zu erzeugen, wobei aus diesen Mutanten jene gewählt werden können, die besser an das gp120 von HIV binden (oder an das Anheftungsprotein in P. vivax). (Mit Ausnahme eines Pockenvirus-35K-Chemokin-Bindungsprotein ist M3 das einzige lösliche Protein, das bekanntermaßen an Chemokine bindet. Daher kann M3-Protein als ein günstiger Ausgangspunkt verwendet werden, um solche Bindungsmittel/Hemmstoffe zu entwickeln).

[0090] Folglich kann das M3-Protein als Anfangsmaterial für Mutationsarbeiten mit der Absicht verwendet werden, lösliche Proteine zu erlangen, die mit höherer Affinität als M3 selbst an die Domäne von HIV-gp120 binden können, die mit dem zellulären Chemokin-Rezeptor wechselwirkt, um die Blockierung der HIV-Infektion im Frühstadium zu erleichtern. Das M3-Protein kann auch als Ausgangsmaterial für Mutationsarbeiten mit der Absicht verwendet werden, Mittel zu Erlangen, um die Anheftung von P. vivax an das Duffy-Antigen an Erythrozyten und die Initiierung der Infektion zu blockieren.

Patentansprüche

1. Pharmazeutische Zusammensetzung, die von Virus MHV 68 kodiertes M3-Protein oder ein Homolog des M3-Proteins umfasst, zur Verwendung bei der Bindung an ein Chemokin oder ein Chemokin-Analog in vivo, oder zur Blockierung der Bindung eines Chemokins an einen entsprechenden Zelloberflächenrezeptor in vivo, um immunmodulierende Wirkung zu erzielen.

2. Zusammensetzung nach Anspruch 1 zur Verwendung bei der Erzielung einer entzündungshemmenden Wirkung.

3. Pharmazeutische Zusammensetzung, die von Virus MHV 68 kodiertes M3-Protein oder ein Homolog des M3-Proteins umfasst, zur Verwendung bei der Bindung an ein in einem Virus oder Parasiten vorhandenes Chemokin-Analog, um das Eindringen des Virus oder Parasiten in Zellen zu blockieren.

4. Zusammensetzung nach einem der vorangegangenen Ansprüche, die zusätzlich ein Immunsuppressivum oder einen Entzündungshemmer umfasst.

5. Testset, das M3-Protein oder ein Homolog davon und einen markierten oder immobilisierten Reaktanden umfasst, zum Detektieren oder Messen eines Chemokins, Chemokin-Analogs oder Chemokin-Rezeptors in vitro.

6. Testset nach Anspruch 5, das M3-Protein oder ein Homolog davon umfasst, das mit einer detektierbaren Markierung markiert ist.

7. Testset nach Anspruch 5, worin das M3-Protein oder dessen Homolog auf einem festen Träger immobilisiert ist.

8. Zusammensetzung, die ein Polypeptid-Homo-

log von M3-Protein (mit Ausnahme von M3-Protein selbst) umfasst, das sich an ein Chemokin oder Chemokin-Analog binden kann.

9. Zusammensetzung nach Anspruch 8, umfassend ein Produkt der Kupplung von M3-Protein oder eines Homologs davon mit einer weiteren Substanz oder ein Fusionsprotein, das eine M3-Polypeptidsequenz oder ein Homolog davon, fusioniert an eine Polypeptidsequenz anderen Ursprungs, umfasst.

10. Zusammensetzung nach Anspruch 8 oder 9, worin das M3-Protein oder Homolog davon an eine detektierbare Markierung gekuppelt ist.

11. Polynucleotid, das eine Sequenz aufweist, die entweder für (a) ein Homolog von M3 oder (b) ein Fusionspolypeptid kodiert, das M3-Protein oder ein Homolog davon, fusioniert an eine Polypeptidsequenz anderen Ursprungs, umfasst.

12. Polynucleotid nach Anspruch 11, das eine Expressionskassette umfasst, worin die für (a) oder (b) kodierende Sequenz mit einem Gewebe-spezifischen oder konstitutiven Promotor operabel verbunden ist.

13. Polynucleotid nach Anspruch 11 oder 12, worin die für (a) oder (b) kodierende Sequenz Teil eines viralen Vektors oder eines Expressionsplasmids ist.

14. Verwendung von von Virus MHV 68 kodiertem M3-Protein oder eines Homologs dieses Proteins oder eines Expressionsvektors, der das Protein oder Protein-Homolog exprimiert, bei der Herstellung eines Medikaments zur Verabreichung an einen Patienten, um entzündungshemmende Wirkung zu erzielen.

15. Verwendung von von Virus MHV 68 kodiertem M3-Protein oder eines Homologs dieses Proteins oder eines Expressionsvektors, der das Protein oder Protein-Homolog exprimiert, bei der Herstellung eines Medikaments zur Verabreichung an einen Patienten, um ein in einem Virus oder Parasiten vorhandenes Chemokin-Analog zu binden, um das Eindringen des Virus oder Parasiten in Zellen zu blockieren.

16. Verfahren zum Detektieren einer Substanz, die ein Chemokin oder Chemokin-Analog umfasst, welches das Kontaktieren einer Probe, die möglicherweise die zu testende Substanz umfasst, mit einem Reagens umfasst, das von Virus MHV 68 kodiertes M3-Protein oder ein Homolog des M3-Proteins umfasst, um dadurch das Chemokin oder Chemokin-Analog zu binden.

Es folgen 9 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

FIG. 1

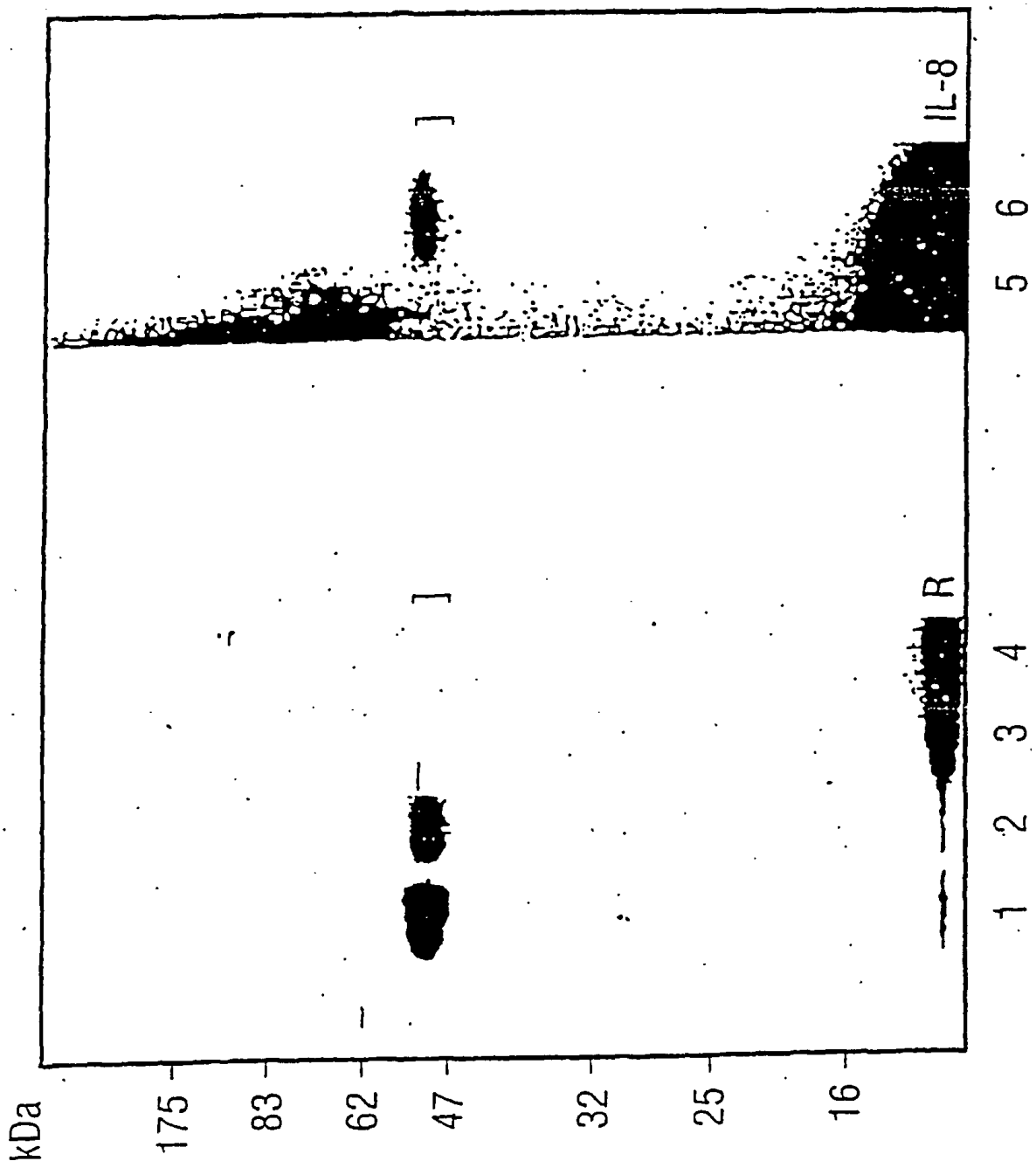
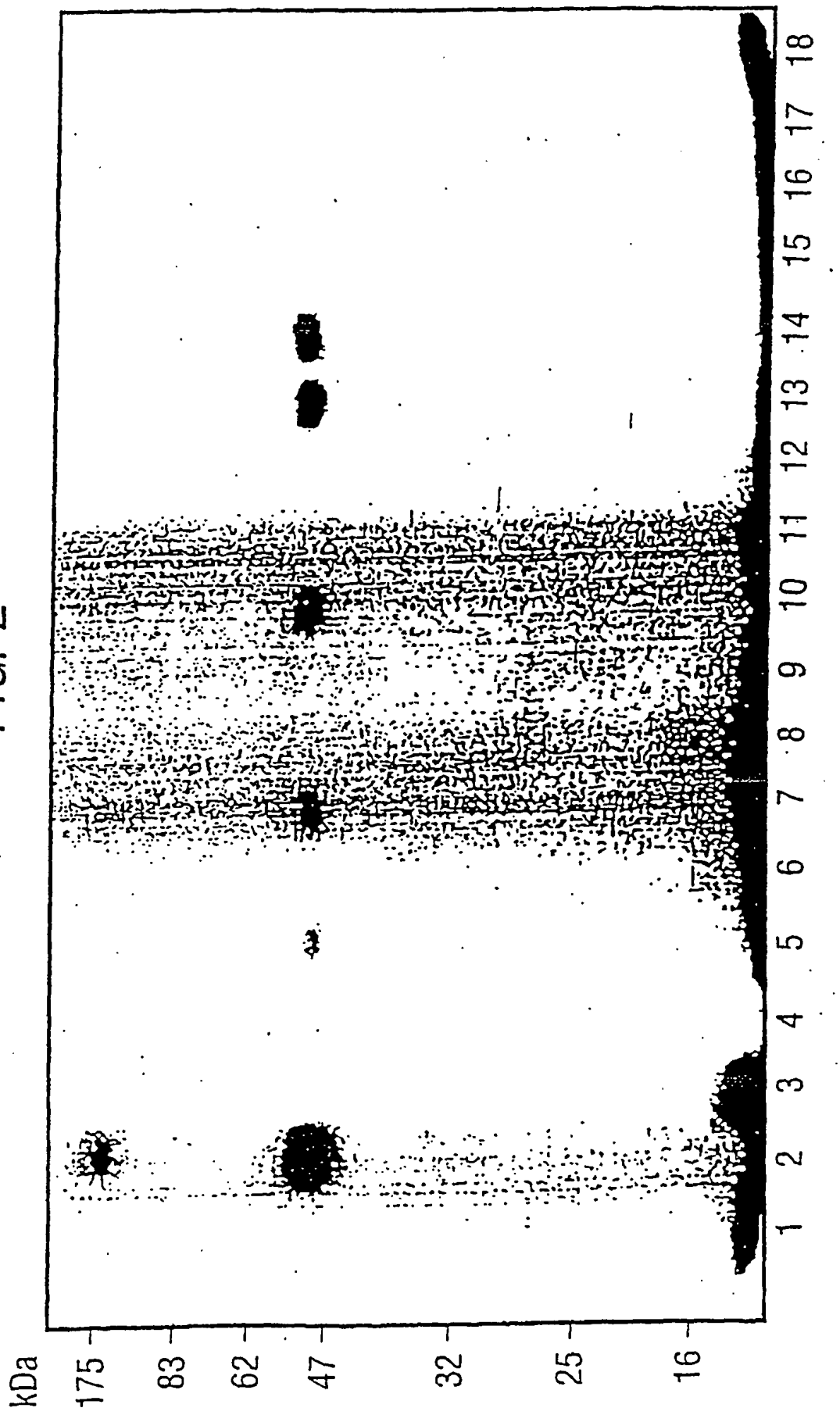


FIG. 2



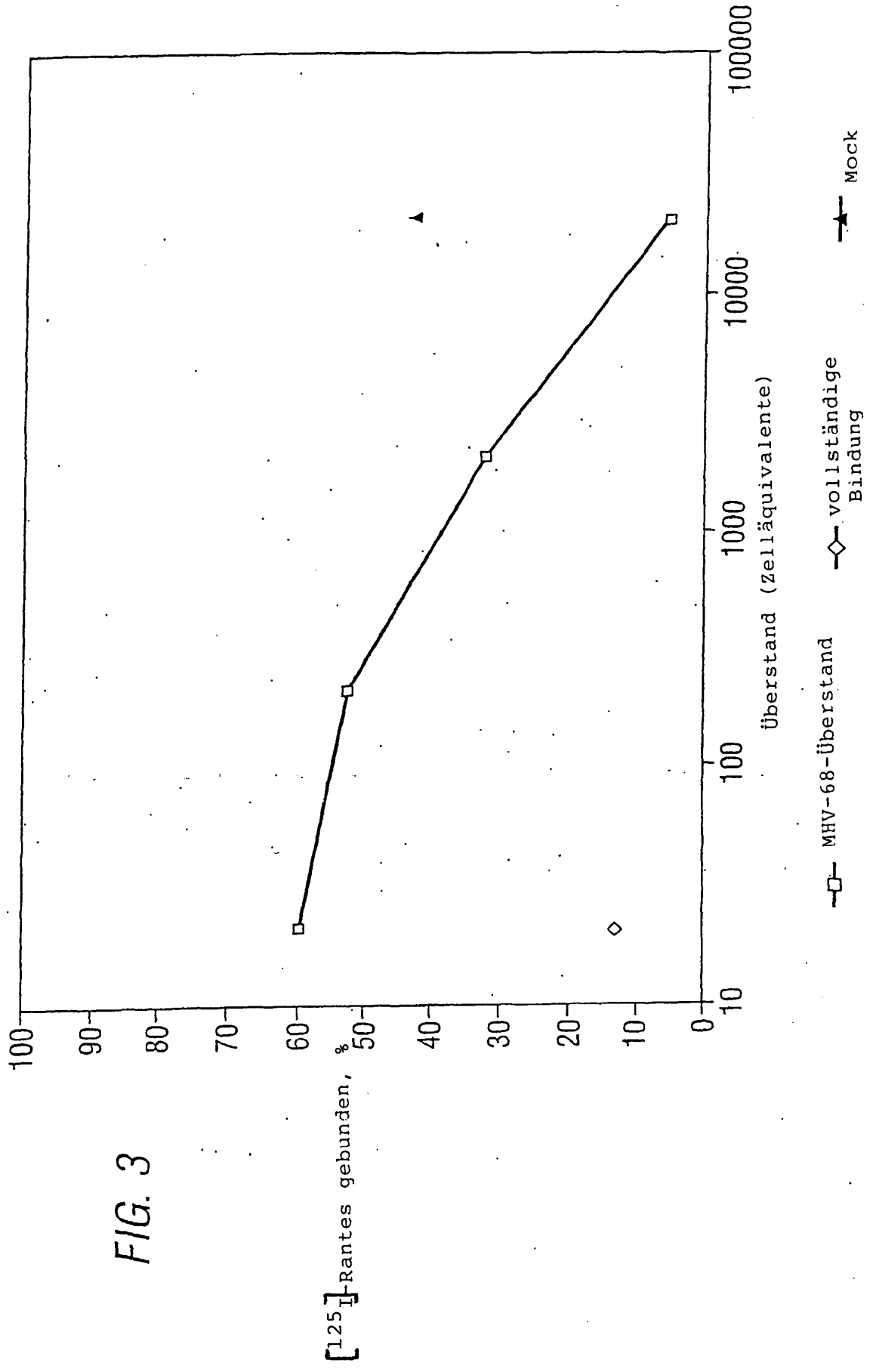

100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
10
100
1000
10000
100000
[125I]-Rantes gebunden, %
Überstand (Zelläquivalente)
MHV-68-Überstand
vollständige Bindung
Mock

FIG. 3

M3 hemmt die Bindung von (a) MIP-1α und (b) IL-8 an ihre natürlichen, an U937-Zellen exprimierten Rezeptoren

FIG. 4(a)

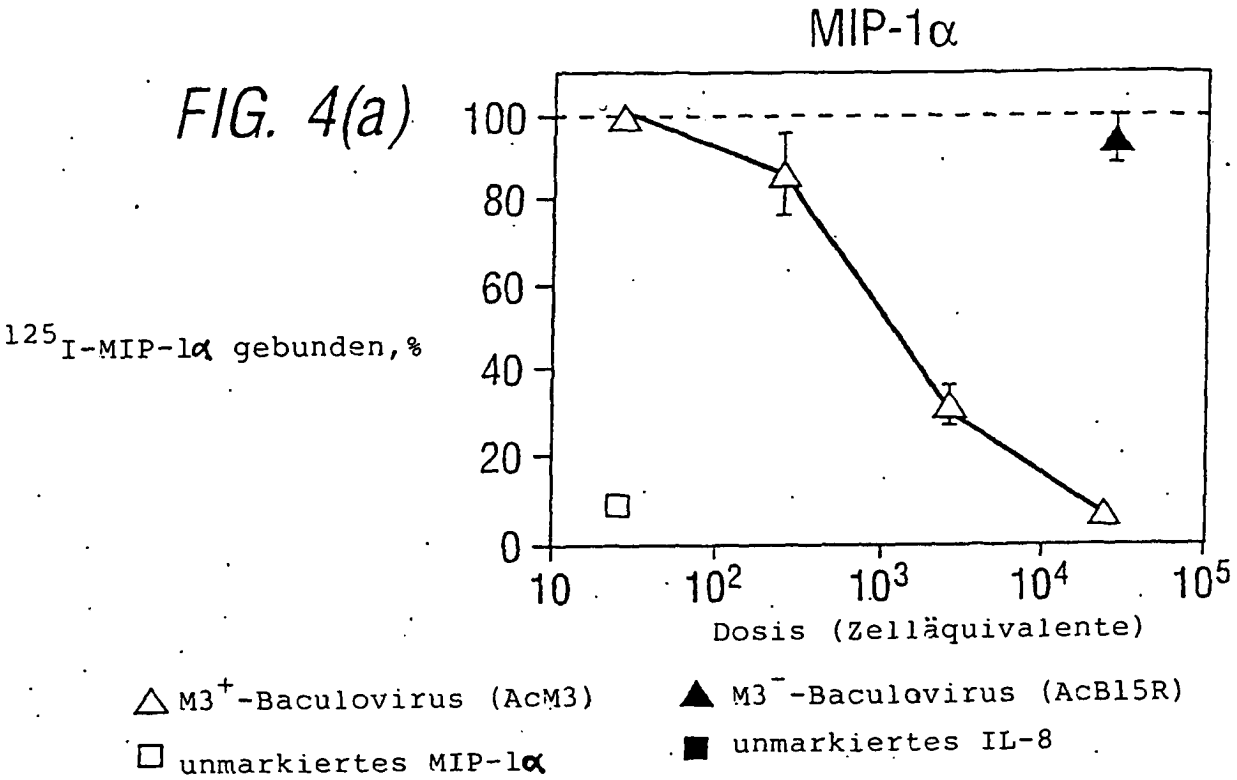


FIG. 4(b)

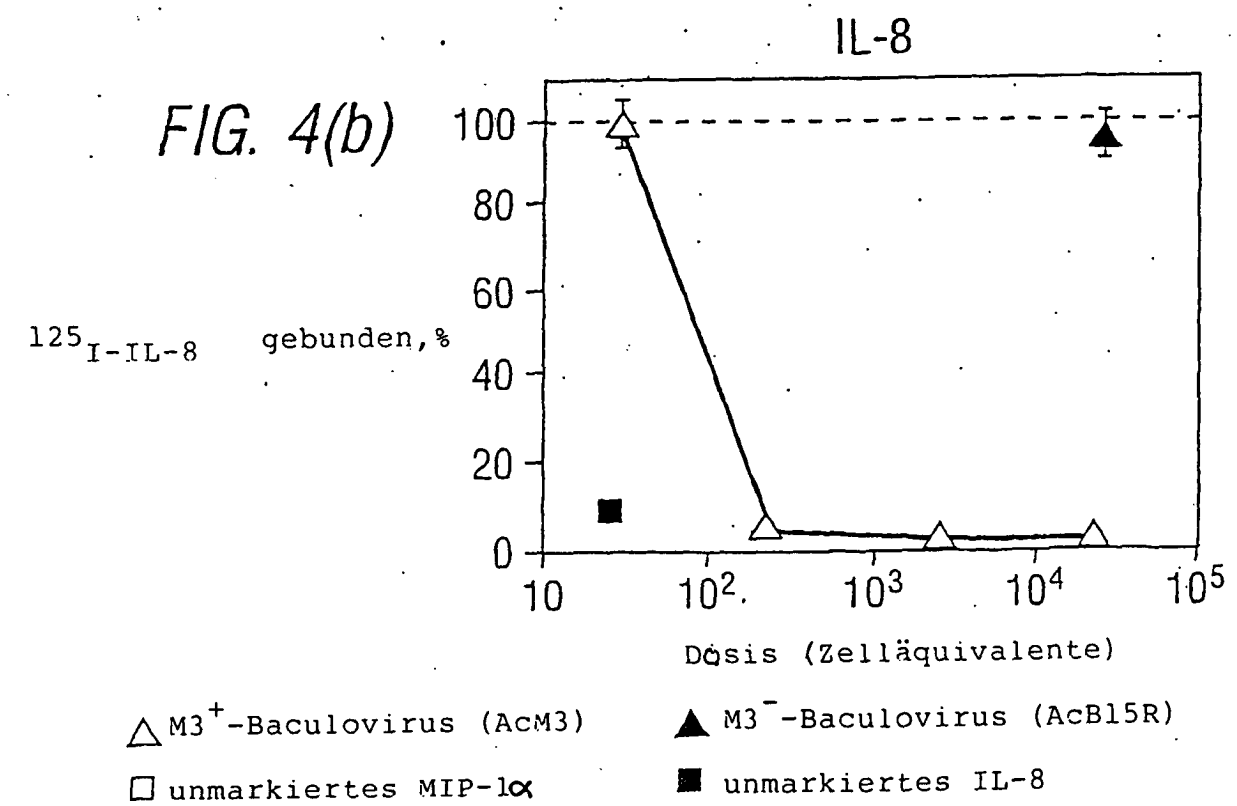


FIG. 5

Heparin und Heparinsulfat stören nicht die Fähigkeit von M3, an radiomarkiertes IL-8 oder MIP-1α zu binden

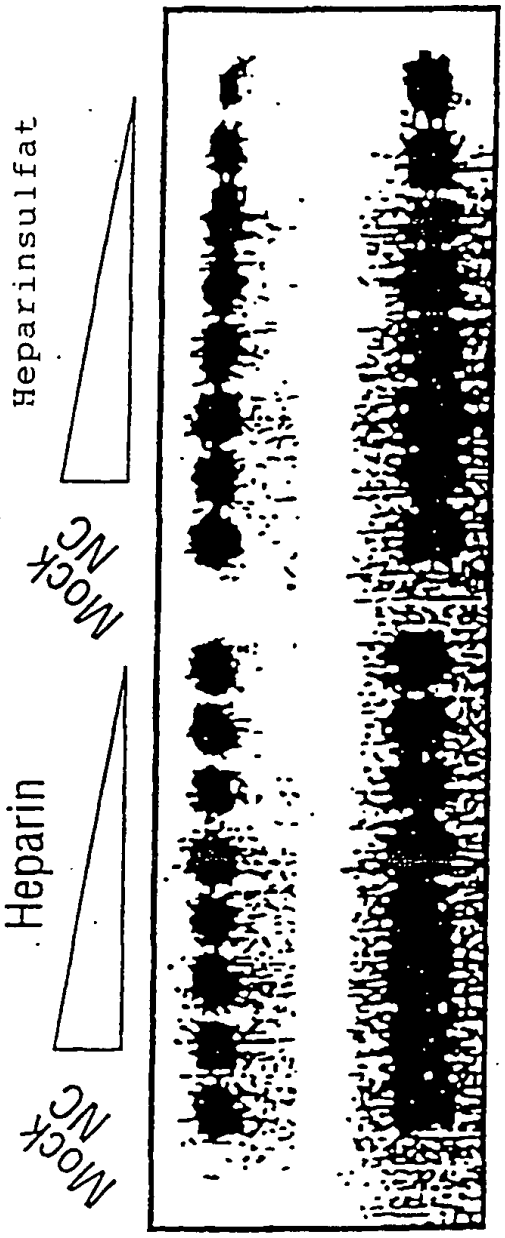


FIG. 6

M3 hemmt den RANTES-induzierten Calciumfluss in Human-PBMCs in dosisabhängiger Weise

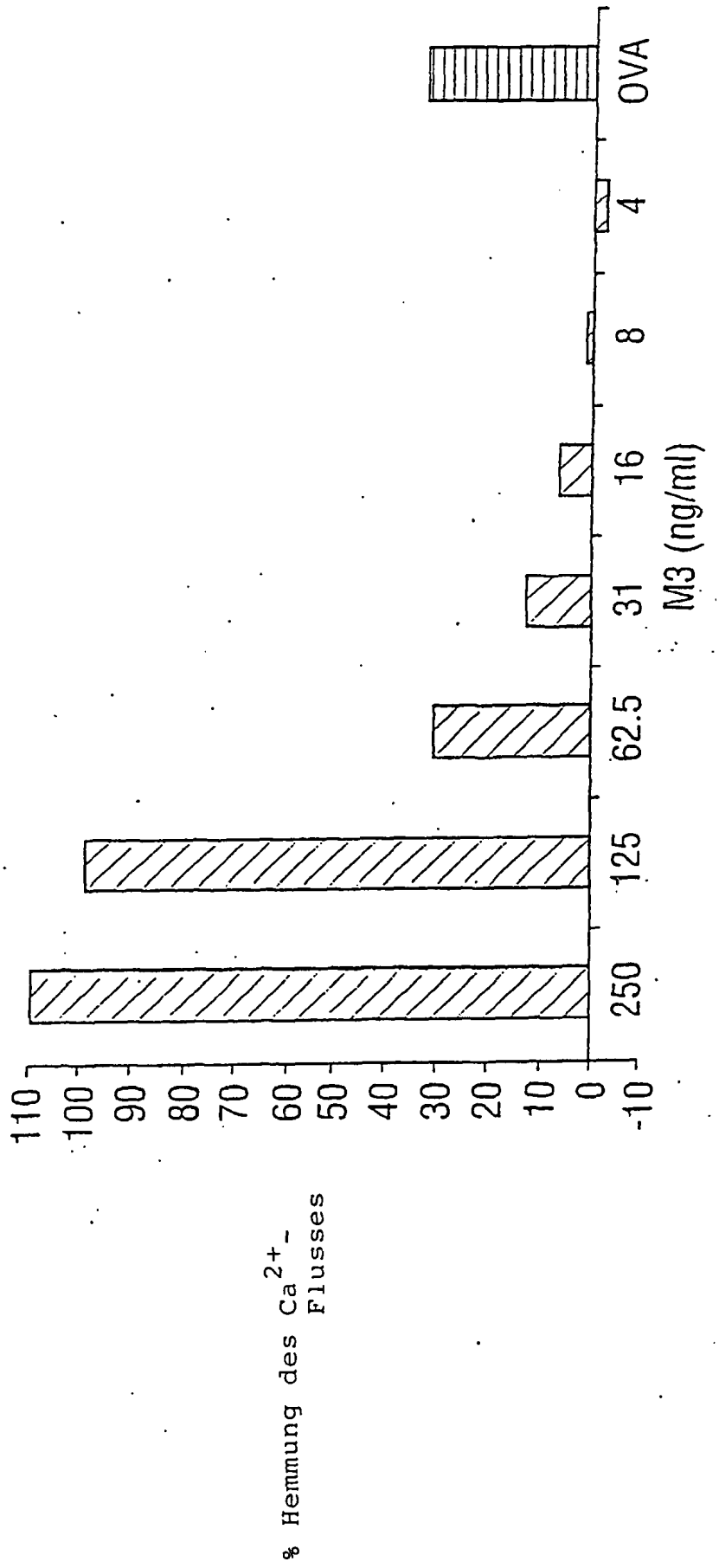


FIG. 7(a)

M3 hemmt die (a) MCP-1-induzierte Migration von THP-1-Zellen und (b) IL-8-induzierte Migration Neutrophiler in dosisabhängiger Weise

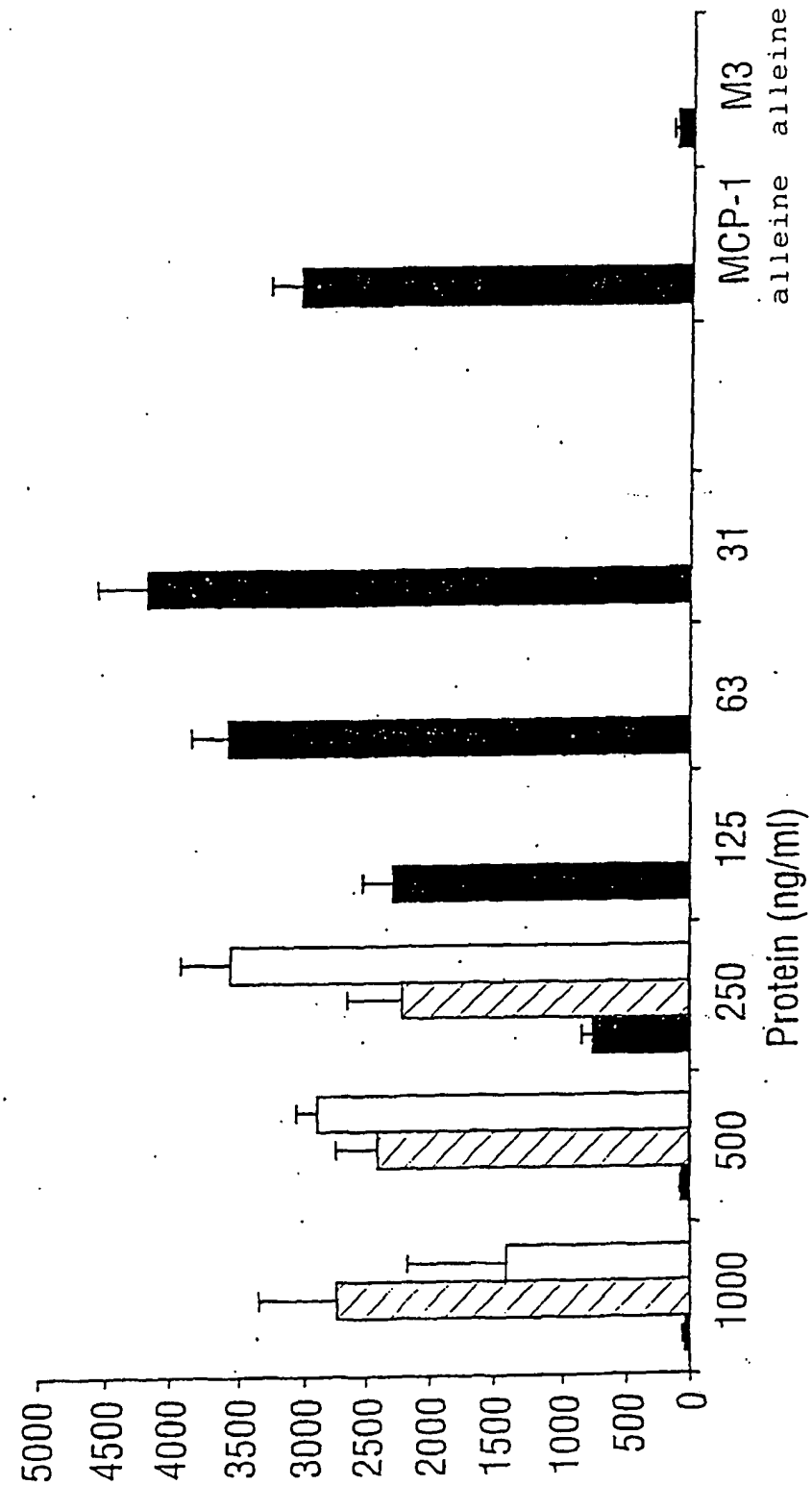


FIG. 7(b)

M3 hemmt die (a) MCP-1-induzierte Migration von THP-1-Zellen und (b) IL-8-induzierte Migration Neutrophiler in dosisabhängiger Weise

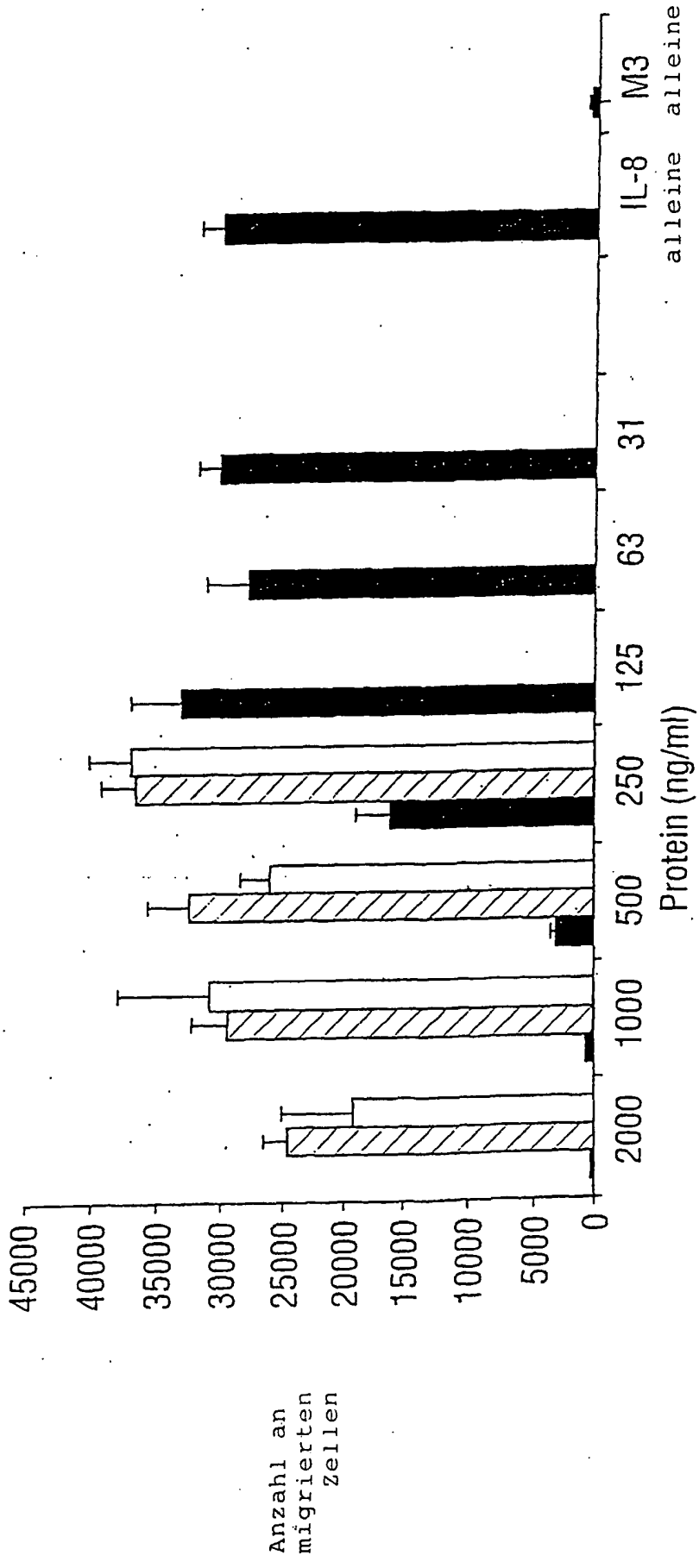
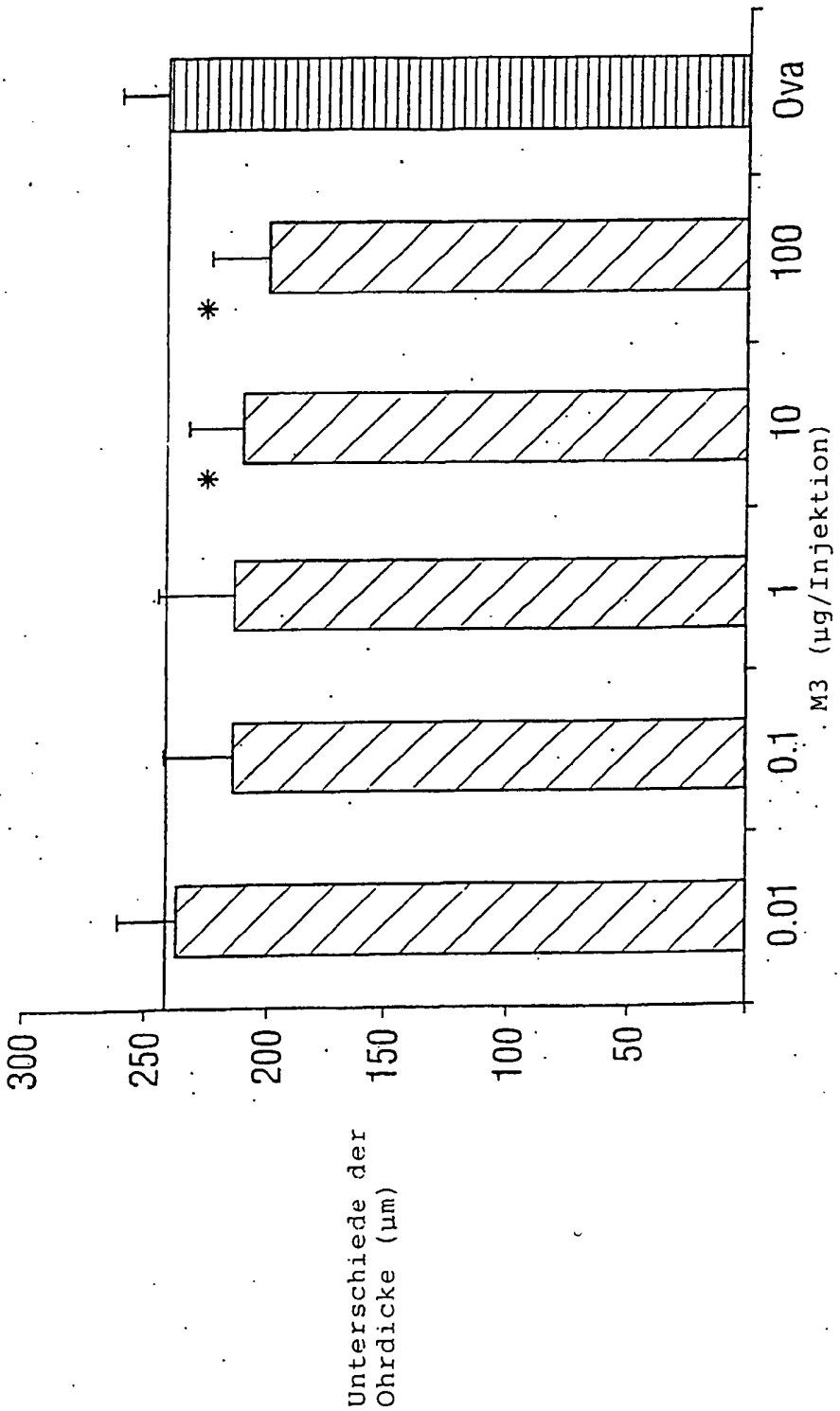


FIG. 8

Wirkung von M3 auf Berührungsempfindlichkeits-Entzündungsreaktion in Mäusen



Die Werte stellen den mittleren Unterschied der Ohrdicke zwischen Kontrolle und exponierten Ohren +/- SD dar. Eine statistische Analyse wurde zwischen M3-behandelten Gruppen (10 und 100 µg/Injektion) und der Ovalbumin- (Ova) Kontrollgruppe (100 µg/Injektion) mittels Student T-Test (*p > 0,05) durchgeführt.