



(12) PATENTSKRIFT

Patent- og
Varemærkestyrelsen

(51) Int.Cl.: **A 61 K 38/17** **C 07 K 14/705**

(21) Patentansøgning nr: **PA 1989 04312**

(22) Indleveringsdag: **1989-08-31**

(24) Løbedag: **1989-08-31**

(41) Alm. tilgængelig: **1990-03-02**

(45) Patentets meddelelse bkg. den: **2002-06-10**

(30) Prioritet: **1988-09-01 US 239571** **1988-10-25 US 262428** **1989-08-10 US 390662**

(73) Patenthaver: **Bayer Corporation, One Mellon Center, 500 Grant St., Pittsburgh, PA 15219-2502, USA**

(72) Opfinder: **Jeffrey Greve, 64 Wildwood Drive, Branford, CT 06405, USA**
Alan McClelland, 300 Schoolhouse Road, Old Saybrook, CT 06475, USA
Gary Davis, 42 Holbrook Street, Milford, CT 06460, USA

(74) Fuldmægtig: **Budde, Schou & Ostenfeld A/S, Vester Søgade 10, 1601 København V, Danmark**

(54) Benævnelse: **Anvendelse af et humant rhinovirus (HRV)-hovedreceptorpræparat til fremstilling af et lægemiddel til inhibering af initieringen eller spredningen af rhino-virusinfektion**

(56) Fremdragne publikationer:
Ingen

(57) Sammendrag:

En vandopløselig humant-rhinovirus-(HRV)-hovedreceptortilberedning omfatter fra dyreceller isoleret detergentkompleksbundet glycoprotein, som udtrykker hoved-HRV-receptor, og som udviser evne til at bindes til HRV-capsider og i det væsentlige reducere virussets smitteevne.

Den foreliggende opfindelse angår anvendelsen af et humant rhinovirus (HRV)-hovedreceptorpræparat til fremstilling af et lægemiddel til inhibering af initieringen eller spredningen af rhinovirusinfektion.

5 Det har vist sig, at man kan isolere af HRV-receptorproteiner, som kan bindes til HRV og derved blokere virusens smittevne. Denne egenskab kan fungere som basis for at inhibere initieringen eller spredningen af HRV-infektion, bedre kendt som almindelig forkølelse.

10 For at inficere værtsceller skal vira nødvendigvis bindes til og derpå trænge ind i celler for at påbegynde en infektion. Siden 1959 har der i litteraturen samlet sig beviser på, at tilstedeværelsen af specifikke bindingssteder (receptorer) på værtsceller kunne være en overvejende determinant for visse virus vævstropisme [J.J. Holland og L.C. McLaren, The Mammalian Cell-Virus Relationship. II. Absorption, Reception, and Eclipse of Poliovirus by HeLa-Cells, J. Exp. Med. 109, 487-504 (1959); J.J. Holland, Receptor Affinities as Major Determinants of Enterovirus Tissue Tropisms in Humans, Virology 15, 321-326 (1961)]. Blandt picornavira, såsom poliovirus, coxsacchie-virus og rhinovira er specifik binding til værtsceller blevet påvist. Ved konkurrenceforsøg er det blevet påvist, at nogle af disse receptorer kan skelnes fra hinanden derved, at mætningen af én virus' receptor ikke havde nogen virkning på bindingen af en anden virus. [K. Lonberg-Holm, R.L. Crowell og L. Philipson, Unrelated Animal Viruses Share Receptors, Nature 259, 679-681 (1976)].

Rhinovira udgør den største familie af picornavira med 115 særskilte serotyper identificeret til dato. En stor fraktion af rhinovira (skønnes at være 80%) synes at bindes til en fælles receptor på humane celler. (G. Abraham og R.J. Colonno, Many Rhinovirus Serotypes Share the Same Cellular Receptor, J. of Virology 51, 340-345 (1984)]. I 1985 er isoleringen af et monoklont antistof beskrevet, som synes at være rettet mod den overvejende rhinovirus-receptor.

[W.J. Colonno, P.L. Callahan og W.J. Long, Isolation of a Monoclonal Antibody that Blocks Attachment of the Major Group of Human Rhinoviruses, *J. of Virology* 57, 7-12 (1986)]. Det inhiberer infektion af celler med de pågældende serotyper af rhinovirus, og det inhiberer binding af radiomærket rhinovirus til celler. Denne gruppe rapporterer derefter, at det monoklone antistof bindes til et protein med en tilsyneladende molekylvægt på 90.000 dalton. (J.E. Tomassini og R.J. Colonno, Isolation of a Receptor Protein Involved in Attachment of Human Rhinoviruses, *J. of Virology* 58, 290-295 (1986)]. Dette monoklone antistof er blevet anvendt til kliniske prøver med primater og mennesker og menes at tilvejebringe en vis beskyttelse mod rhinovirus-infektion.

Der findes adskillige andre rapporter om forsøg med terapeutisk indgriben i rhinovirus-infektioner. Intranasal indgift af interferon hos mennesker har været forsøgt. [R.M. Douglas m.fl., Prophylactic Efficacy of Intranasal α -2-Interferon against Rhinovirus Infections in the Family Setting, *The New England J. of Medicine*, 314, 65-75 (1986)]. I dette tilfælde fandt man signifikant reduktion af infektionens sværhedsgrad, selv om der blev observeret næseblod som en bivirkning. Der er ligeledes blevet afprøvet flere disoxaril-analoge ("Win"-forbindelser), som reducerer smitteevnen hos en række picornavira (med stærkt varierende effektivitet, afhængig af serotypen), i vævskultur og i nogle dyremodeller. [M.P. Fox, M.J. Otto og M.A. McKinlay, *Antimicrob. Ag. and Chemotherapy* 30, 110-116 (1986)]. Disse forbindelser synes at inhibere replikation på et trin efter receptorbinding, sandsynligvis i et eller andet trin i virusafdækning. Atomcoordinaterne for disse forbindelsers bindesteder inden for serotype HRV14's virale capsid er blevet konstateret ved hjælp af røntgen-krystallografi og er placeret i en hydrofobisk lomme, der forekommer i hver protomer enhed i capsidet. [T.J. Smith m.fl., *The Site of Attachment in Human Rhinovirus 14 for Antiviral Agents that Inhibit Uncoating*, *Science* 233, 1286-1293 (1986)]. Bindingslommens særlige

funktion, hvis der er nogen, kendes ikke, men præparat-resistente mutanter med ombytninger af en enkelt aminosyre i denne region forekommer med stor frekvens og er levedygtige. [J. Badger m.fl., Structural Analyses of a Series of Antiviral Agents Complexed with Human Rhinovirus 14, PNAS 5 85, 3304-3308 (1988)]. Dette resultat sætter spørgsmålstegn ved sådanne forbindelsers effektivitet som lægemiddel. Der findes rapporter om produktion af anti-peptid-antistoffer i kaniner ved brug af peptider afledt fra aminosyresekvensen i det virale capsids proteiner, som ordner "receptor canyon"- 10 en i HRV14. [J. McCary og G. Werner, Different Rhinovirus Serotypes Neutralized by Antipeptide Antibodies", Nature 329, 736-738 (1987)]. Selvom disse seras titre er ret lave, påvises kryds-serotype-beskyttelse af celler i vævskultur 15 fra rhinovirus-infektion, hvilket stiller muligheden for en vaccine i udsigt.

Det har vist sig, at man kan isolere et HRV-receptor-protein fra celler med den egenskab, at de blokerer HRV-infektion. I betragtning af den høje affinitet, som virusset 20 har for receptoren, er den hypotese blevet fremsat, at et terapeutisk middel, der er effektivt mod HRV-infektion, kunne være selve receptoren, eller især receptorens virusbindende domæne. Et protein, proteinfragment eller peptid, som omfatter det virus-bindende domæne, kunne blokere virus' 25 evne til at bindes til værtsceller ved at besætte (blokere) den receptor-bindende spalte på virusset. Eftersom endvidere et sådant molekyle ville udgøre nogle eller alle de molekylekontakter med viruscapsidet, som receptoren har, ville virusmutationer, som negativt påvirker molekylets binding af 30 receptoren, negativt påvirke receptorens binding og ville således være skadelige eller dødelige for virusset; derfor ville sandsynligheden for præparat-resistente mutanter være meget ringe. Endvidere ville et sådant molekyle være humant, hvilket reducerer sandsynligheden for, at det er antigen 35 hos mennesker.

Det har nu vist sig, at den overvejende humane rhi-

novirus-(HRV)-receptor kan isoleres som en vandopløselig tilberedning, der udviser den ønskede egenskab, at den bindes til HRV-capsider og i væsentlig grad reducerer virussets smitteevne. Tilberedningen foreligger i form af detergent-

5 kompleksbundet glycoprotein isoleret fra dyreceller, fortrinsvis pattedyreceller, som udtrykker hoved-HRV-receptoren. Det rensede receptorprotein kan karakteriseres på følgende måde. Det er et glycoprotein med en tilsyneladende molekylvægt på 95.000 dalton og omfatter bindingsstedet for

10 HRV. Glycoproteinet indeholder 6-7 asparaginforbundne oligosaccharid-kæder og foreligger i tilberedningen i form af et detergent-micelle-bundet protein.

Opfindelsen angår således anvendelsen af et humant rhinovirus (HRV)-hovedreceptorpræparat indeholdende ICAM-1-

15 monomer af funktionelle domæner, fragmenter eller analoger omfattende det test-Ig-lignende domæne af ICAM-1, som udviser evne til binding til HRV-capsider, til fremstilling af et lægemiddel til inhibering af initieringen eller spredningen af rhinovirusinfektion, og opfindelsen angår tillige anvendelsen af et humant rhinovirus (HRV)-hovedreceptorpræparat

20 indeholdende en forbindelse fra gruppen: det hele ekstracellulære domæne af ICAM-1, aminosyrerne 1-200, tICAM (1-453), tICAM (1-283), tICAM (1-184) eller tICAM (1-88), som udviser evne til binding til HRV-capsider, til fremstilling af et

25 lægemiddel til behandling af rhinovirusinfektion.

Generelt kan hoved-HRV-receptor-tilberedningen fås ved ekstraktion af passende dyreceller, som man véd udtrykker hoved-HRV-receptoren, med et ikke-ionisk detergent, efterfulgt af immunrensning. Mange humane cellelinier udtrykker

30 receptoren, såsom HeLa og WI38. En hvilken som helst af disse humane HRV-receptor-kilder kan ekstraheres. Særlig anvendelige er HeLa-celler. Desuden kendes transficierende ikke-humane pattedyrecellelinier, som udtrykker HRV-receptoren, eller de kan fremstilles, hvilket udgør en anden

35 anvendelig receptorkilde. Især udgør transficierende cellelinier, der er beskrevet i offentliggjort Europa-patent-

ansøgning nr. 0.319.815, en nærliggende receptorkilde, især sådanne sekundære transfektanter, som er blevet udvalgt for receptoroverekspression. Andre dyreceller, som er kendt på området eller senere er blevet udviklet, såsom insektvævs-
5 kulturceller, som er blevet transficeret med genet og udtrykker receptoren, kan også anvendes.

Hovedsagelig et hvilket som helst ikke-ionisk detergent kan anvendes til ekstraktion, forudsat at proteinreceptorens oprindelige konformation ikke ødelægges. Denaturering
10 af receptoren kan bestemmes ved at overvåge det ekstraherede proteins evne til at inhibere virusmitteevne eller følsomhed over for proteolyse. Det er blevet konstateret, at receptoren kan denatureres ved opvarmning ved 60°C i 30 min. eller ved behandling med 1% SDS, hvilket viser, at man må sørge for
15 at bibeholde HRV-bindingsstedets oprindelige konformation. Eksempler på anvendelige ikke-ioniske detergenter er alkylpolyoxyethylenethere (såsom Brij), alkylphenylpolyoxyethylenethere (såsom Triton X-100 og Nonidet P-40), acylpolyoxyethylensorbitanestere (såsom Tween), og β -D-alkylglucosider,
20 idet Triton X-100 anses for særlig foretrukket.

Nøgletrinnet i rensningen af receptoren er fraktionering med stærkt selektivt anti-receptor-antistof. Den nemmeste måde til opnåelse af et sådant antistof er monoklone metoder. Det foretrækkes især at fremstille monoklone
25 muse-antistoffer ved dannelse af hybridomcellelinier ud fra fusionering af muse-myelomceller og muse-transficerende celler, der udtrykker HRV-receptoren. Yderligere enkeltheder findes i offentliggjort Europa-patentansøgning nr. 0.319.815. Efter at detergent/glycoprotein-komplekserne, der fås fra
30 celleekstrakten, er bundet til det valgte monoklone antistof, adskilles komplekser, der er bundet til antistof, fra det øvrige af blandingen. Derefter dissocieres detergent/receptor-komplekser bundet til antistof, idet man atter sørger for at forhindre denaturering, og den opnåede vandopløselige
35 receptortilberedning isoleres. Passende betingelser til dissociering af detergent/receptor-komplekser fra antistoffet

kan konstateres empirisk og kan forventes at variere noget fra antistof til antistof. Dissociering ved at hæve pH har i nogle tilfælde vist sig at være mest effektiv ved lavt pH eller højt saltindhold, betingelser, der fungerer, men
5 som giver lavere proteinudbytter.

Det foretrækkes at udføre en mellemliggende rensning før rensning med antistof. Sådanne mellemliggende trin omfatter adsorbering af de detergent-ekstraherede proteinkomplekser på en lectin, der kan binde HRV-receptor, fraskillelse af absorberede komplekser fra resten af blandingen og
10 dissociering af sådanne komplekser til efterfølgende behandling med antistof. Valget af lectin og dissocieringsbetingelser er i reglen empirisk. Det har vist sig, at HRV-receptoren bindes på passende måde til hvedekimagglutininlectin og dissocieres effektivt ved vask med en opløsning af N-acetylglucosamin. Da oligosacchariderne på receptorproteinet
15 ikke er fuldstændig karakteriserede, og fordi receptorproteinet kan glycosyleres forskelligt på forskellige celletyper (f.eks. musecelletransfektanter), kan det forventes, at også andre lectiner er egnede. Valg af et passende alternativ til hvedekimagglutinin og/eller elueringsmiddel kan overlades til fagfolk på området.

Den opnåede tilberedning kan behandles med proteolytiske midler, såsom proteaser, f.eks. trypsin, til fremstilling af mindre glycoproteinfragmenter, som bibeholder evnen
25 til at binde og reducere HRV's smitteevne. Således kan peptidfragmenter spaltes fra den endestillede region i glycoproteinet, f.eks. C-endestillingen, hvilket giver glycoproteinfragmenter, som bibeholder HRV-binding. Sådanne glycoproteinfragmenter kan f.eks. have en tilsyneladende molekylvægt mellem ca. 80.000 og ca. 95.000 dalton. Mindre fragmenter, som bibeholder receptorens HRV-bindingsdomæne, anses
30 også for at være omfattet af den foreliggende opfindelsesomfang.

35 Receptor-tilberedningen har vist sig at inhibere virussets smitteevne, formodentlig ved at bindes til HRV-

capsidet, så at dets evne til at binde og inficere humane celler blokeres. En sådan iagttagelse viser, at receptortilberedningen vil være anvendelig til at reducere infektionen af humane værtsceller in vivo ved at bringe virusset i kontakt med tilberedningen under betingelser, der er egnede til binding med virusset. En terapeutisk form vil være en vandig opløsning af receptoren i nærvær af ikke-ionisk detergent for at bibeholde receptoren i opløsning og i dens oprindelige konformation. Detergenter med lavere kritiske micelle-koncentrationer, såsom alkylpolyoxyethylenethere Brij 58, vil være at foretrække for at reducere koncentrationen af detergent i den terapeutiske opløsning. Receptortilberedningen kan indgives in vivo ved passende kontakt med de områder af kroppen, der kan inficeres med HRV, f.eks. ved hjælp af intranasal spray.

Opfindelsen vil i det følgende blive belyst ved hjælp af nedenstående eksempler, som dog ikke skal fortolkes begrænsende.

20 Fremstilling af rensset human rhinovirus-receptor-(HRR)-protein

(1) Humane celler (f.eks. HeLa) eller muse-L-celletransfektanter (f.eks. cellelinierne, der er beskrevet i offentliggjort Europa-patentansøgning nr. 0.319.815), dyrkes op i store antal som cellulære monolag i standard-vævskulturmedium (Dulbecco's modificerede essentielle medium indeholdende 10% kalvefosterserum; transficerende celler holdes i samme medium indeholdende HAT (hypoxanthanin/aminopterin/thymidin) for at opretholde selektive tryk for udvælgelsesmarkøren (Herpes TK). Celler opløses i én time ved 4°C i en fysiologisk puffer (phosphatpuffret saltopløsning) indeholdende en ikke-ionisk detergent f.eks. Triton X-100) (T-puffer) og en blanding af protease-inhibitorer (aprotinin, leupeprin ved 10 µg/ml, EDTA ved 1 mM) for at forhindre proteolytisk nedbrydning af receptoren. Uopløseligt materiale fjernes ved filtrering gennem et 0,22 µ filter.

(2) Ekstrakten absorberes på en affinitetsharpiks, der indeholder hvedekimagglutinin (WGA), (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), tværbindes til Sepharose i 18 timer ved 4°C under forsigtig blanding (2 ml pakket harpiks indeholdende 5 mg WGA/ml harpiks, pr. 10^9 celler). Affinitetsharpiksen vaskes derpå omhyggeligt med puffer for at fjerne ubundne glycoproteiner og elueres med det konkurrerende monosaccharid N-acetylglucosamin (0,3 M N-acetylglucosamin i T-puffer) i én time ved stuetemperatur.

10 (3) WGA-Sepharose-elueringsmidlet absorberes derpå til en affinitetsharpiks, hvortil der er koblet rensset monoklont antistof mod HRR (f.eks. ATCC HB 9a594, der omtales i offentliggjort Europa-patentansøgning nr. 0.319.815. Det monoklone antistof IgG renses ved ammoniumsulfat-fældning [P. Parham, Meth. Enzymol. 92, 110-138 (1983)] efterfulgt af affinitetschromatografi på enten protein A-Sepharose [P.L. Ey m.fl., Immunochem. 15, 429-436 (1978)] eller en Abx-kolonne (J.T. Baker Co., Phillipsburg, NJ, USA) ved at følge fabrikantens anvisninger. Monoklont IgG-affinitetsharpiks fremstilles ved at koble IgG til cyanogenbromid-aktiveret Sepharose (P. Parham, supra).

Efter at der er tilsat 10 μ g/ml humant transferrin for at blokere adsorption af transferrin-receptor til harpiksen, inkuberes elueringsmidlet ved 4°C i 18 timer med harpiksen under blanding (40-200 μ l harpiks indeholdende 5 mg IgG/ml harpiks, pr. 10^9 celler), vaskes udtømmende med T-puffer for at fjerne ubundne proteiner og elueres derpå under ikke-denaturerende betingelser med en høj-pH-puffer [0,05 M diethanolamin (pH 11,5) med 0,1% Triton X-100] i én time ved stuetemperatur. Elueringsmidlet fjernes, neutraliseres ved tilsætning af 0,2 volumendele 1 M HEPES (pH 7,2) og dialyseres mod tre skift af en fysiologisk puffer indeholdende en smule ikke-ionisk detergent for at opretholde receptorens opløselighed (0,01 HEPES, 0,150 M NaCl, 0,001 M CaCl_2 , 0,1% Triton X-100, pH 7,5).

35 Receptoren kan renses yderligere ved hastighedssedi-

mentation ved hjælp af saccharose-gradienten for at fjerne en gruppe mindre forureninger med høj molekylvægt (>200.000 dalton). Receptortilberedningen lejres foroven på en 15-35% saccharose-gradient (samlet volumen ca 4,5 ml) og centrifugeres ved 300.000 x G i 18 timer ved 4°C. Fraktioner opsamles fra gradienten, og fraktioner, der indeholder rhinovirus-receptor, der sedimenterer ca. 1/3 ned ad gradienten, slås sammen, inddampes (om nødvendigt) og dialyseres.

(4) Den opnåede tilberedning ud fra HeLa-celler viser sig at indeholde et glycoprotein med en tilsyneladende molekylvægt på 95.000 dalton. Ud fra muse-transfektant-celler isoleres et protein med samme molekylvægt, men med større heterogeneitet (efter analyse ved SDS-PAGE). Det isolerede protein har vist sig at omfatte rhinovirus-receptoren ved:

(a) Immunfældning ud fra med ^{125}I overflademærkede HeLa-celler og musetransfektanter, der udtrykker den humane rhinovirus-receptor med et monoklont antistof, som inhiberer rhinovirus' binding til celler.

(b) Immunfældning af rensset med ^{125}I mærket receptor med monoklont ATCC HB 9594 antistof.

(5) Der fremstilles et tryptisk fragment ved at fordøje receptoren med 1% (vægt E/vægt receptorprotein) trypsin i én time ved 37°C. Reaktionsblandingen påføres på en GF-450 gelfiltreringskolonne (Dupont), der er bragt i ligevægt i N-puffer, og det proteolytiske fragment adskilles fra enzymet. Analyse af de opnåede fragmenter ved hjælp af SDS-PAGE viser en blanding af et receptorfragment på 90.000 dalton og et receptorfragment på 83.000 dalton. Disse fragmenter elueres i samme position på en gelfiltreringskolonne som intakt receptor, hvilket tyder på, at de er bundet til en detergent-micelle. Aminosyre-sekvensbestemmelse af fragmenterne giver ingen sekvens, hvilket viser, at de ligesom den intakte receptor har en blokeret N-endestilling, og endvidere, at peptider, der mistes fra 90.000- og 83.000 dalton-fragmenterne, er fra proteinets C-endestilling.

Karakterisering af tilberedningen

(1) Receptortilberedningens renhed bedømmes ved hjælp af SDS-PAGE ved sølvfarvning. Mængdebestemmelse af protein foretages ved at sammenligne sølvfarvet protein med en række
5 standard-proteiner med kendt mængde på SDS-PAGE og bekræftes ved hjælp af aminosyre-analyse, idet man går ud fra en protein-molekylvægt på 50.000 dalton (sker ved at bestemme den tilsyneladende molekylvægt på SDS-PAGE for deglycosyleret receptor).

10 (2) Proteinet viser sig ved fordøjelse af kerne-glycosyleret receptor med endoglycosidase H at være et glycoprotein, der indeholder 6-7 asparagin-bundne oligosaccharidkæder. Efter gelfiltrering elueres receptoren med et volumen, der svarer til en protein-molekylvægt på 250.000 dalton.
15 Denne oplysning sammen med bevis fra kemiske tværbindingsforsøg, der viser, at receptoren er en monomer, stemmer overens med receptoren, der opfører sig som et protein bundet til en detergentmicelle.

(3) Det rensede receptor-protein viser sig at bindes
20 til rhinovirus in vitro. Når med ^{125}I mærket og med ^{35}S -cystein metabolisk mærket HRR inkuberes i 30 min. ved 34°C med $1\ \mu\text{g/ml}$ HRV14 eller HRV3, viser det sig at associere med virus ved sedimentering i saccharose-gradienter eller ved pelletering i en centrifuge med høj hastighed. Det kan på-
25 vises, at denne binding er specifik ved at lade bindingen med radiomærket receptor konkurrere med umærket receptor. Reaktionen in vitro har samme temperaturafhængighed som in vivo: receptor bindes til virusset ved 37°C , men ikke ved 4°C .

30 (4) Receptoren viser sig at inhibere rhinovirus' smitteevne, når man inkuberer HRR med virus (under de samme betingelser som beskrevet ovenfor, hvor binding kan påvises) og derpå afprøver de opnåede blandinger med hensyn til smitteevne ved en begrænsende standard-fortyndingssmitteevneprø-
35 ve. Der fremstilles en HeLa-celle-suspension ved frigørelse med 0,03% EDTA/PBS i 10 min., og cellerne vaskes i 2% FBS/-

DMEM (I medium) med 10 mM HEPES og justeres til en koncentration på $1,1 \times 10^7$ celler/ml. Virus eller virus/receptorblandinger fortyndes serievis i I medium, og 20 μ l virus blandes med 180 μ l celler og inkuberes i 60 min. ved stuetemperatur. Blandingen fortyndes derpå med 9 volumendele I medium og udstryges i 8-10 fordybninger på en vævskulturplade med 96 fordybninger (ca. 200 μ l/fordybning) og dyrkes ved 34°C i 5 dage. Kulturerne får derpå point efter CPE (cytopatisk virkning), og titeren af den oprindelige beholdning bestemmes ved hjælp af følgende formel:

$$\text{antal døde fordybninger}/10 \times 50 \times \text{fortyndingsfaktor} = \text{PFU/ml}$$

Resultaterne ses i nedenstående tabel.

15

TABEL

	<u>Virus</u>	<u>HRR (M/L)</u>	<u>Virustiter (PFV/ml)</u>
	HRV14	0	2 x 10 ⁷
20	"	6,6 x 10 ⁻⁹	3,5 x 10 ⁶
	"	2 x 10 ⁻⁸	4,5 x 10 ⁶
	"	6,6 x 10 ⁻⁸	2 x 10 ⁶
	"	2 x 10 ⁻⁷	3 x 10 ⁴
	HRV3	0	2,5 x 10 ⁶
25	"	6,6 x 10 ⁻⁹	3 x 10 ⁵
	"	2 x 10 ⁻⁸	3,5 x 10 ⁵
	"	6,6 x 10 ⁻⁸	3,5 x 10 ⁴
	"	2 x 10 ⁻⁷	5 x 10 ³

30 Der afprøves yderligere HRV-serotyper. HRV4, -11-, -17- og -89-serotyper (hovedklasse) inhiberes af virusset, hvorimod HRV 1a og 2 (mindre klasse) ikke inhiberes.

De ovenfor beskrevne resultater viser, at det rensede HRR kan blokere smitteevnen hos rhinovira, der hører til hovedreceptorklassen af rhinovira. Receptorproteinets inhiberende egenskab på smitteevnen har forbindelse med dets

35

evne til at bindes til virusset og formodes at virke blokerende på receptorbindingssstedet på virusset. Denne egenskab hos receptoren kommer til udtryk ved lave koncentrationer af receptorproteinet og viser en høj affinitet hos receptoren for virusset. Betydningen af disse resultater er, at den rensede opløselige receptor kan anvendes til at inhibere igangsætningen af spredningen af rhinovirus-infektioner in vivo. Det rensede protein udgør også en kilde til materiale, hvorfra mindre proteinfragmenter og peptider kan derivatiseres, der har samme aktivitet som den intakte receptor.

På tegningens fig. 1 ses ICAM's aminosyresekvens (minus signalsekvens). Sekvenser, der fås fra peptidfragmenter i HRR, vises med punkterede eller stiplede linier under ICAM's tilsvarende sekvens; stiplet betyder sikkert angivne peptidsekvenser, punkteret betyder tvivlsomme angivelser, og xx betyder ukorrekte bestemmelser af tvivlsomme angivelser. Tallene under peptidsekvenser viser kodenavnet på proteinsekvensbestemmelsesforsøget.

Derpå underkastes rensset protein begrænset eller komplet proteolytisk nedbrydning, peptider renses enten ved omvendt-fase-chromatografi, gelfiltrering eller SDS-PAGE og underkastes derpå automatiseret proteinsekvensbestemmelse. Disse sekvenser anvendes til at søge i proteinsekvens- (NRFB og MIPSX) og DNA-sekvensdatabaser (genbank). Der foretages en matchning af alle kendte peptidsekvenser bestemt ud fra HRR-protein.

[Intercellular Adhesion Molecule-1, Simmons m.fl., "ICAM, An Adhesion Ligand of LFA-1, Is homologous To The Neural Cell Adhesion Molecule of NCAM", Nature 331, 624-627 (1988)]. ICAM undersøges af andre forskere på grund af sin rolle med hensyn til T-lymphocytters adhæsion til en række forskellige celletyper. Man har fremsat den hypotese, at ICAM (der forekommer på fibroblaster, epithelceller, leukocytter og endothelceller) samvirker med en struktur kaldet LFA-1 (med lymphocyt-funktion associeret antigen-1), der forekommer på T-lymphocytters overflade, og derved er an-

svarlig for adhæsionen til disse celletyper.

Man har nu bestemt sekvensen i 106 aminosyrer i rhinovirusreceptoren, og alle 106 passer nøjagtig til sekvensen i ICAM (ud af ialt 507 aminosyrer, der er forudsagt for ICAM-sekvensen). Andre biokemiske informationer understøtter HRR's identitet med ICAM. For det første har det primære mRNA-translationsprodukt, der er syntetiseret i et in vitro-translationssystem, en tilsyneladende molekylvægt på 55.000 dalton, hvilket er den samme som ICAM's. For det andet har den HRR-proteintype, der findes i celler forgiftet med tunicamycin, der er en specifik inhibitor af asparagin-bundet glycosylering, en tilsyneladende molekylvægt på 54.000 dalton, hvilket passer med fjernelsen af en signalsekvens fra proteinets N-endestilling. For det tredje viser delvis for-
døjelse af kerne-glycosyleret HRR-protein tilstedeværelse af 7 asparagin-bundne carbonhydrat-grupper, hvilket stemmer med tilstedeværelsen af 8 mulige carbonhydrat-acceptorsekvenser (N-S/T) i ICAM's aminosyresekvens. Endelig bestemmes HRR's chromosomkortposition til at være humant chromosom 19, identisk med, hvad der er konstateret for ICAM.

Eftersom det komplette nucleotid og aminosyresekvensen i ICAM er blevet bestemt, og der er væsentlige, om ikke overvældende tegn på, at ICAM og HRR er de samme eller meget lignende molekyler, kendes nu rhinovirusreceptorens komplette aminosyresekvens. Bestemmelsen af denne aminosyresekvens, som er dette molekyles partielle kemiske struktur, giver mulighed for at udforme og producere en stor mængde receptorprotein, fragmenter, funktionelle domæner og afkortede versioner samt receptorproteinanaloge og peptider, som har inhiberende aktivitet over for rhinovirus- og coxsackie A-virusinfektion. Den komplette aminosyresekvens giver også oplysninger, der er nødvendige for biofysiske og biokemiske undersøgelser af rhinovirus/receptor-samspil, som vil føre til identifikationen af afgørende molekylære kontakter, som kan anvendes til udformningen af hidtil ukendte inhiberende molekyler.

Eftersom ICAM-molekylet er et medlem af immunglobulin-supergen-familien [Eur. J. Immunol. 15, 103-106 (1984)], og eftersom andre picornavira, såsom poliovirus og coxsackievirus, bindes til receptorer, hvis gener er anbragt på kromosom 19, er det muligt, at ICAM kan anvendes som basis for udviklingen af terapeutica til modvirkning af infektioner også af andre picornavira. Det er muligt, at ICAM eller fragmenter deraf er anvendelige direkte som terapeutica til andre virus- og inflammationssygdomme. Alternativt vil kendskabet til ICAM-struktur være anvendeligt til identifikation af sådanne virus receptorer. Endvidere er ICAM-1 nært beslægtet med to adhæsionsproteiner i det voksne nervesystem, neuralt celleadhæsionsmolekyle (NCAM) og myelin-associeret glycoprotein (MAG) og en familie af epithelcellemolekyler, herunder CEA, NCA, TM-CEA og de graviditets-specifikke B1-glycoproteiner. NCAM, MAG og ICAM-1 har hver 5 immunglobulinlignende domæner, jfr. Dustin m.fl., "Supergene Families Meet In The Immunesystem", Commentary, Elsevier Publications, Cambridge (1988). Slægtskabet mellem picornavira og supergenfamilien bestående af ICAM, NCAM og MAG danner basis for udviklingen af proteiner, proteinfragmenter, funktionelle domæner, analoge og blandinger deraf til inhibering af smitteevnen hos denne virusklasse.

Kendskab til aminosyresekvensen og oplysninger om ICAM-proteinet sammen med kendskabet til HHR og rhinovirus danner basis for de følgende forslag til udformning af proteinfragmenter og analoge til behandling af rhinovirusinfektion og til behandling af inflammation.

Opløselige former af biologisk aktivt vartscelleprotein kan anvendes til at inhibere virusinfektion i modsætning til det cellemembran-bundne receptorprotein, som i reglen letter infektionen. Opløselige former af biologisk aktivt receptorprotein, proteinfragmenter, funktionelle domæner eller analoge kan omfatte anvendelsen af detergenter som beskrevet ovenfor. Alternativt kan eliminering af C-endsstillingen gøre proteinet(rne) opløseligt(e). Et biologisk

aktivt tryptisk fragment er en blanding af to arter, én med en tilsyneladende molekylvægt på 83.000 dalton og én på 90.000 dalton (i forhold til HRR på 95 Kd). N-endestillingen i begge arter blokeres, hvilket viser, at de begynder fra rest 1 i det intakte HRR-molekyle, og peptider fjernes fra C-endestillingen: Det størst mulige fragment vil gå fra rest 1 til rest 488. En nedadgående ændring i tilsyneladende molekylvægt i forhold til intakt HRR viser et tab på >5.000 dalton eller 45 aminosyrerester, hvilket vil anbringe de nye fragment-C-endestillinger i stillinger proximalt (N-endestillet) til transmembransegmentet.

Eksempler på opløselige fragmenter kan omfatte hele det ekstracellulære domæne (op til a.a. 480) eller kan omfatte én eller begge adskilte dele i det ekstracellulære domæne (a.a. 1-200; 200-460) i receptorproteinets aminosyresekvens. Det forventes endvidere, at mindre peptidfragmenter kan udgøre biologisk aktive analoge til inhibering af virusinfektion.

En cDNA-klon med fuld længde af HRR isoleres fra et cDNA-bibliotek over HeL- eller andre celler, der udtrykker receptoren, ved at screene med oligonucleotider fremstillet ud fra den offentliggjorte ICAM-1-sekvens. Konstruktion og ekspression af domænefragmenter af HRR opnås ved anvendelse af etablerede rekombinant-DNA-metoder [Fisher m.fl., Nature 331, 76-78 (1988); Hussey m.fl., Nature 331, 78-81 (1988); og Deen m.fl., Nature 331, 82-86 (1988)]. Et opløseligt ekstracellulært domæne fremstilles ved i HRR at spalte en cDNA-klon, der koder sekvensen, med *ThaI*, som skærer i position 37 i signalpeptidregionen og i position 1415, 12 aminosyrer før begyndelsen af det transmembrane domæne. Syntetiske oligonucleotid-forbindelsesstykker tilføjes trinvis på molekylets 5'- og 3'-ender for at genoprette signalpeptidet og initiator ATG ved N-endestillingen og for at indføre et ramme-translationsstopcodon ved C-endestillingen. Stopcodonets position kan varieres, så at der fremstilles alternative afkortede former af molekylet. På lignende måde

anvendes forskellige sjældne skærerestriktionsenzymmer til at indsætte stopcodoner i andre regioner af molekylet. Restriktionsenzymsteder medtages i enderne af forbindelsesstykkerne for at tillade styret kloning til en række forskellige ekspressionsvektorer. Oligonucleotidsteds-dirigeret mutagenese ved hjælp af gængse metoder anvendes til at indføre restriktionsenzymsteder, når der ikke findes passende naturligt forekommende steder. Yderligere anvendes polymerase-kædereaktions-(PCA)-metoden til at fremstille særlige DNA-fragmenter, der koder domæner og andre underregioner i molekylet.

De ovennævnte løsninger anvendes også til fremstilling af yderligere underfragmenter af receptoren, såsom de 5 immunglobulin-lignende domæner (resterne 1-88, 89-185, 186-284, 285-385 og 386-453), Staunton m.fl., Cell 52, 925-933 (1988). I dette tilfælde medtages der passende signalsekvenser til styring af proteinudskillelse til det ekspressionssystem, der anvendes. Der anvendes forskellige ekspressionssystemer, herunder virale promotorer i pattedyrceller [Cate m.fl., Cell 45, 685-698 (1986)]; insektceller [Smith m.fl., Proc. Acad. Sci. USA 82, 8404-84-8 (1985)]; og E.coli [Skerra og Pluckthun, Science 240, 1038-1041 (1988)]. Underfragmenter af receptoren, der fremstilles på ovennævnte måde, afprøves for deres evne til at binde overvejende rhinovirus-serotyper og til at reducere virus' smitteevne. Ekspression af det ekstracellulære domæne som beskrevet ovenfor anvendes ligeledes til at aflede tilstrækkelig mængder af den opløselige receptor til strukturundersøgelser, såsom røntgenkrystallografi.

Strukturundersøgelser ved hjælp af enzymatisk og kemisk fragmentering af ureduceret ICAM-1 har kortlagt tre disulfidbindinger af ialt 7 potentielle par og har forsøgsvis kortlagt yderligere to disulfidbindinger. Disse resultater viser disulfidbindinger mellem C108 og C159, mellem C210 og C263 og mellem C305 og C344; spaltning ved M64 med CNBr viser, at C21 og C25 danner par med C65 og C69, og modelop-

bygning baseret på den Ig-lignende foldning viser pardannelse af C21 til C65 og C25 til C69. Disse data bidrager til at støtte en strukturmodel af ICAM-1 med tre N-endestillede Ig-lignende domæner (jfr. tegningens fig. 2).

5 Ud fra ICAM-1 cDNA konstrueres en række cDNA'er (tICAM'er eller forkortede ICAM'er), så at de indeholder præmature stopcodoner ved aminosyrepositionerne 454, 284 og 185 i det modne protein til fremstilling udskilte proteiner, der progressivt afkortes fra C-endestillingen. Afkortningernes positioner udvælges på basis af de forudsagte grænser for transmembrandomænet [tICAM(1-453)], immunglobulin-lignende domæner 1+2+3 (tICAM)1-283) og immunglobulin-lignende domæner 1+2 (tICAM1-183)) og immunglobulinlignende domæne 1 (tICAM(1-88)). Proteinprodukterne af disse gener findes i diagram i fig. 2 på tegningen. De konstrueres ved hjælp af polymerasekædereaktioner (PCR) ved hjælp af 5'- og 3'-oligonucleotid-igangsættere, som overlapper ICAM-2-kodningssekvensen og indeholder restriktionsenzymsteder; 5'-igangsætteren indeholder et yderligere EcoRI-sted, og 3'-igangsætterne indeholder et yderligere translationsstopcodon og et BamI-sted. Disse DNA'er klones i korrekt retning ind i Bluescript-SK-vektoren (Stratagene), der er udskåret ved en HindIII/Xba-fordøjelse. Disse gener og en kontrol-ICAM-1 cDNA med fuld længde klones derpå i korrekt retning ind i ekspressionsvektoren CDM8 (Seed m.fl.) ved hjælp af HindIII-stedet i genets 25 5'-ende og Xba-stedet i 3'enden. Disse plasmider transficeres ind i COS-celler ved hjælp af DEAE-dekstran-metoden, og cellerne dyrkes i 72 timer før afprøvning. Overfladeekspression overvåges ved hjælp af FACS ved brug af indirekte immunfluorescens og et monoklont antistof, der er specifikt for ICAM-1. Udskillelse af ICAM-1 i mediet overvåges ved 30 metabolisk mærkning af celler i 7 timer med 35 S-cystein efterfulgt af immunabsorption af kulturoverfaserne med en monoklon anti-ICAM-1-sepharosepharpiks. Facs-analysen viser tydeligt overfladeekspression af ICAM-1 i celler transficeret 35 med IBAM-1 i fuld længde; celler transficeret med CMS8-vek-

toren alene eller med tICAM (1-453) udviser ingen overflade-
ekspression. Når materialet, der er isoleret fra de metabo-
lisk mærkede kulturoverfaser, bliver analyseret ved hjælp af
SDS-PAGE efterfulgt af fluorgrafi, iagttages ingen ICAM-1 i
5 kontrol- eller fuld-længde-ICAM-1-transfektanter, og der
udskilles et protein på 80.000 dalton af tICAM (1-453)-trans-
fektanter, et protein på 65.000 dalton af tICAM (1-283(-
transfektanter og et protein på 43.000 dalton af tICAM)1-
184)-transfektanter. Når det samme materiale farves for
10 protein ved sølvfarvning, er det klart, at tICAM(1-453) i
det væsentlige er rent. Stabile transfektanter dannes ved
at transficere de samme cDNA'er blandet med genet for en
markør, der kan udvælges (thymidin-kinase til muse-L-celler,
dihydrofolatreductase til CHO-celler), ind i muse-Ltk-celler
15 eller hamster-CHO(dhfr-)-celler og underkastes præparatud-
vælgelse (HAT-udvælgelse til Ltk-celler og methatrexat til
CHO(dhfr-)-celler). Overlevende celler klones, og kulturo-
verfaser fra disse celler screenes ved hjælp af en radioim-
munprøve, hvor MAb c78,5 absorberes på mikrotiterskåle,
20 renses ICAM-1 eller kulturoverfaser inkuberet med de MAb-
overtrukne skåle, og derefter påvises bundet ICAM-1 ved
inkubation med 125-mærket MAb c78.4. Der fås adskillige L-
celletransfektanter og én CHO-celletransfektant, der udskil-
ler tICAM(1-453) og L-celler, som udtrykker tICAM(1-183).
25 Ekspression bekræftes ved hjælp af metabolisk mærkning af
celler efterfulgt af immunabsorption af kulturoverfaser som
beskrevet ovenfor.

tICAM(1-88) er blevet udtrykt i E.coli ved hjælp af
OmpA-sekretionsvektor fra Inoue. I dette system fusioneres
30 OmpA-signalpeptidet med modent ICAM-1-proteins N-endestil-
ling. tICAM(1-88) og tICAM(1-183) anbringes i OmpA-vektoren;
E.coli, der er transformeret med disse vektorer, udtrykker
proteinprodukter af den forventede størrelse som påvist ved
Western-aftryk af SDS-PAGE-geler af celleekstrakter med
35 anti-peptid-antistoffer mod en sekvens inden for domæne 1 i
ICAM-1.

Blokeringsundersøgelser med et panel af 6 MAb'er mod ICAM-1 (som alle inhiberer virusbinding til ICAM-1) viser, at der findes to adskilte epitoper, der defineres af disse antistoffer, én defineret af c78.4 (indeholdende c78.1, 5 c78.2, c92.1 og c92.5). Immunfældningsundersøgelser med proteolytiske fragmenter af ICAM-1 og med in vitro-translationer af afkortede ICAM-1-cDNA'er viser, at begge disse epitoper indeholdes i det første Ig-lignende domæne.

In vitro-virusbindings-undersøgelser, ved hvilke der 10 anvendes radiomærket tICAM(1-453) og rensat rhinovirus har vist, at det kan bindes til rhinovirus i opløsning.

Yderligere biologisk aktive fragmenter bedømmes ved hjælp af overlappende sæt af syntetiske peptider på 10-20 rester svarende til en del af eller alt HRR-proteinet. Pep- 15 tiderne fremstilles og afprøves individuelt for deres evne til at inhibere virusbinding til receptoren.

Disse peptidfragmenter kan være direkte kopier af en del af rhinovirus-receptoren eller kan indeholde sekvenser fra ikke-tilgrænsende regioner i receptoren.

20 Man har på basis af homologi med NCAM forudsagt, at ICAM er et medlem af immunglobulin-gen-superfamilien. Man skulle forvente, at immunglobulin-lignende domæner i ICAM ville have den grundlæggende "immunglobulin-fold", som den er blevet påvist for to andre medlemmer af familien, β -2- 25 mikroglobulin og HLA-A2- α -3-domænet. Denne fold består af en " β -barrel" udformning bestående af to antiparallele β -foldede plader, én sammensat af tre og én sammensat af fire β -strenger; en disulfidbinding mellem to cystein-rester (adskilt af ca. 60 aminosyrer langs kæden) forbinder de to 30 plader [A.F. Williams, Immun. Today 8, 298-303 (1987)]. To af disulfidbindingerne, dem, der svarer til domæne 2 (C110-C161) og 3 (C212-C265), er blevet bestemt forsøgsmæssigt af ansøgerne og støtter modellen. Denne strukturmodel danner basis for udformning af unike analoge, som kan efterligne 35 virusbindingsstedet og være anvendelige som receptorblokeringsmidler. Hvert par antiparallele β -strenger i " β -barrel"

forbindes ved hjælp af et hårnålesving med variabel størrelse; et sådant sving eller løkke, som rager ud fra sekundære strukturer, viser sig ofte af spille en rolle ved genkendelsen af ligander [Lezczynski og Rose, Science 224, 849-855
5 (1986)]. Sådanne udadragende strukturer kan være af en særlig interesse i rhinovirus-receptoren, eftersom det foreslås, at receptorbindingsstedet på viruscapsidet ligger i en tilbagetrukket hulhed. Ved hjælp af HRR-sekvensen kan sådanne sving og løkker forudsiges på basis af en " β -barrel"-struktur
10 og fremstilles som syntetiske peptider med tilføjelse af nye cysteinrester i peptidernes N- og C-endestilling; en disulfidbinding dannes derpå mellem sådanne rester på det samme peptid for at lukke løkken covalent (i modsætning til det oprindelige protein, hvor løkken lukkes ved ikke-covalent
15 samspil mellem tilstødende β -strengene). Sådanne peptider har en konformation, der er mere analog med konformationen i det oprindelige protein end et enkelt lineært peptids og afprøves for virus-bindende aktivitet.

Fremgangsmåde til lokalisering af den region eller det
20 domæne i molekylet, der er ansvarligt for virusbindende aktivitet. Stedsdirigerede antistoffer rettet mod en særlig del af HRR (forudsagt ud fra en arbejdsmodel baseret på en immunglobulinfold) kan fremstilles ved at fremstille syntetiske peptider svarende til udvalgte regioner i proteinet,
25 koble sådanne peptider til større bærerproteiner og immunisere kaniner eller andre dyr med sådanne konjugater ved standardmetoder. Sådanne antistoffer kan afprøves for deres evne til at inhibere virusbinding; inhibering med en delmængde af sådanne antistoffer vil rette opmærksomheden mod
30 særlige domæner eller dele af domæner.

Specifikke reaktive grupper på nogle aminosyrerester på receptorproteinet kan modificeres kemisk under ikke-denaturerende betingelser. Som følge af modifikationen af visse rester kan den virus-bindende evne gå tabt. Ved hjælp af
35 radioaktive sporstoffer i modificeringsreagenset kan modifikationen af nogle aminosyrerester koordineres med tab af

bindingsaktivitet, hvilket implicerer disse grupper i genkendelsen. Herved henledes opmærksomheden på en særlig del af molekylet eller en særlig aminosyrerest for at spille en bestemt rolle ved virusbinding. Sådanne rester kan derpå
5 forsøgsvis modificeres ved mutageneseforsøg in vitro. Det har eksempelvis vist sig, at når man mærker HRR med radioaktivt Bolton/Hunter-reagens (en N-hydroxysuccinimid-ester, som specifikt modificerer N-endestillinger og lysinrester), reduceres dets evne til at bindes til rhinovirus væsentligt.
10 Bestemmelse af den tredimensionale struktur af det virus-bindende domæne i HRR ved hjælp af røntgen-krystallografi og/eller kernemagnetisk resonans. Ved hjælp af tredimensionale HRV14-koordinater (fra Brookhaven Data Bank) findes de to molekylers optimale "docking" ved hjælp af
15 grafisk computermetodologi. Det "docked" kompleks' struktur kan derpå anvendes til at raffinere og forbedre egenskaberne hos proteinet eller receptorens peptidfragment. Eksempler på sådanne forbedringer kan være: (1) forøgelse af en virusbindende reaktions affinitet; (2) fremstilling af et mindre
20 molekyle; og (3) udeladelse eller beskadigelse af andre regioner i molekylet, såsom det, der er nødvendigt for binding til LFA-1. Hvis bindingsstedet for LFA-1 sidder på et andet domæne, kan domænet udelades. Alternativt, dersom bindingsstedet for LFA-1 sidder på det virus-bindende domæne,
25 kan der benyttes stedsdirigeret mutagenese af særlige aminosyrer for at inhibere bindingsevnen.

Receptorens nøglerester, der er involveret i virusbinding, bestemmes af oligonucleotidsteds-dirigeret mutagenese. Således screenes mutantpuljer fremstillet ved mæt-
30 ningsmutagenese ved hjælp af den af Peterson og Seed i Cell 54 beskrevne metode, 65-67 (1988), ved anvendelse af enten HRV14 eller monoklont antistof/komplementaflivning som negativ udvælgelse og et kanin-polyklont antistof som den positive udvælgelse. Syntetiske peptider svarende til regi-
35 oner på molekylet, der er identificeret på denne måde, fremstilles og afprøves med hensyn til virusbinding og evnen

til at reducere smitteevne.

Farmaceutiske tilberedninger af proteiner, protein-fragmenter, funktionelle domæner og analoge finder anvendelse ved mange sygdomme. Med den viden, at HRV og LFA-1 begge
5 bindes til ICAM, forventes det, at der kan udformes ICAM-analoge, som bindes til rhinovirus og derved inhiberer rhinovirusinfektion, men som ikke afbryder samspillet mellem ICAM og LFA-1. Alternativt foretages mutagenese af udvalgte rester (aminosyrer) på basis af strukturelle forudsigelser
10 og biokemisk struktur.

Det forventes endvidere ud fra den viden, at ICAM og HRR er det samme molekyle, at det kan anvendes i fragmenter, funktionelle domæner eller LFA-1-analoge til at afbryde samspillet mellem HRR og rhinovirus og derved til
15 behandling af rhinovirusinfektioner.

HRR eller fragmenter deraf kan finde anvendelse ved afbrydelsen af samspil mellem ICAM og LFA-1, hvilket kan anvendes til behandling af inflammation.

Peptider afledt fra de kendte capsid-proteiner i
20 rhinovirus kan anvendes til afbrydelse af samspil mellem ICAM og LFA-1, hvilket kan anvendes til behandling af inflammation. Carbonhydratgrupper, som ikke er "nec" med hensyn til biologisk aktivitet, kan fjernes for at forøge produktionen af peptider i bakterier.

25 Stedsdirigeret mutagenese af cystiner kan anvendes til at begrænse genfoldning til biologisk aktive konformationer.

P a t e n t k r a v .

1. Anvendelse af humant rhinovirus (HRV)-hovedreceptorpræparat indeholdende ICAM-1-monomer af funktionelle domæner, fragmenter eller analoger omfattende det test-Ig-
5 lignende domæne af ICAM-1, som udviser evne til binding til HRV-capsider, til fremstilling af et lægemiddel til inhibering af initieringen eller spredningen af rhinovirusinfektion.

2. Anvendelse af et humant rhinovirus (HRV)-hovedreceptorpræparat indeholdende en forbindelse fra gruppen: det
10 hele ekstracellulære domæne af ICAM-1, aminosyrerne 1-200, tICAM (1-453), tICAM (1-283), tICAM (1-184) eller tICAM (1-88), som udviser evne til binding til HRV-capsider, til fremstilling af et lægemiddel til behandling af rhinovirus-
15 infektion.

Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)

```

10
Asn Ala Gln Thr Ser Val Ser Pro Ser Lys Val Ile Leu Phe Arg Gly Gly Ser Val Leu Val Thr Cys Ser Thr Ser Cys Asp Gln Pro
-----94-----
40
Lys Leu Leu Gly Ile (Iu Thr Pro Leu Pro Ty Tyr Glu Leu Leu Leu Phe Gly Asn Arg Tyr Val Tyr Glu Leu Ser Asn Val (In
-----94296-----)
50
Glu Asp Ser Gln Phe Met Cys Tyr Ser Asn Cys Pro Asp Gly Gln Ser Thr Ala Lys Thr Phe Leu Thr Val Tyr Trp Thr Pro Glu Arg
-----
60
Val Glu Leu Ala Phe Leu Pro Ser Trp Gln Pro Val Gly Lys Asn Leu Thr Leu Arg Cys Gln Val Glu Gly Gly Ala Pro Arg Ala Asn
-----
70
Leu Thr Val Val Leu Leu Arg Gly Glu Lys Glu Leu Lys Arg Glu Pro Ala Val Gly Glu Pro Ala Glu Val Thr Thr Thr Val Leu Val
-----135
130
Arg Arg Asp His His Gly Ala Asn Phe Ser Cys Arg Thr Glu Leu Asp Leu Arg Pro Gln Gly Leu Glu Leu Phe Glu Asn Thr Ser Ala
-----
140
Pro Tyr Gln Leu Gln Thr Phe Val Leu Pro Ala Thr Pro Pro Gln Leu Val Ser Pro Arg Val Leu Glu Val Asp Thr Gln Gly Thr Val
-----110
150
Val Cys Ser Leu Asp Gly Leu Phe Pro Val Ser Glu Ala Gln Val His Leu Ala Leu Glu Gly Asp Gln Arg Leu Asn Pro Thr Val Thr Tyr
-----
160
-----
170
-----
180
-----
190
-----
200
-----
210
-----
220
-----
230
-----
240
-----

```

FIG 1a

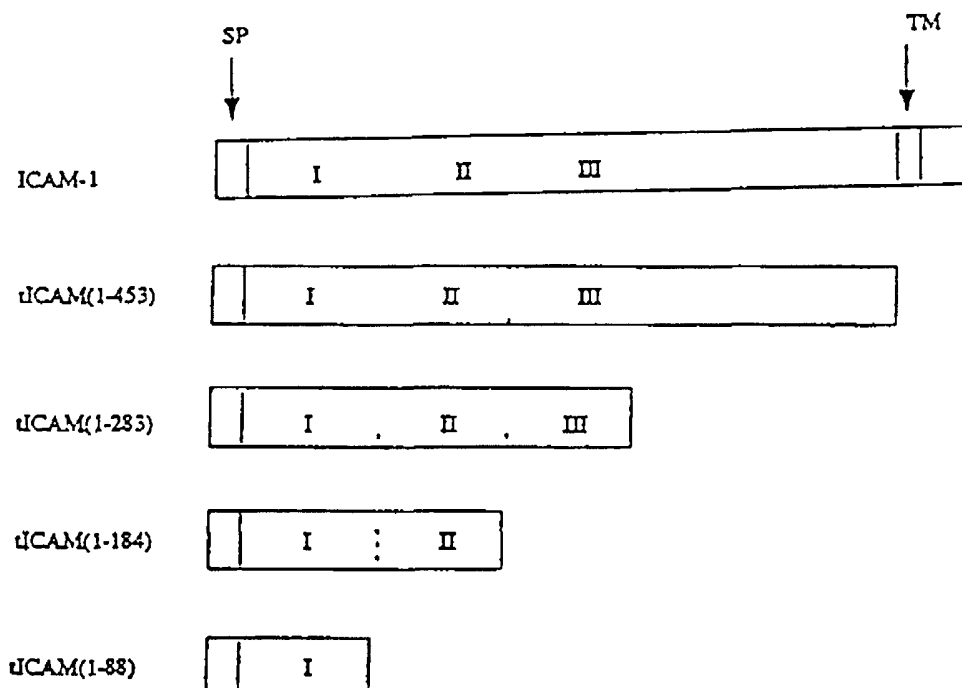


FIG 2