



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 600 31 963 T2** 2007.06.14

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 163 522 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **600 31 963.6**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/FR00/00691**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **00 912 720.0**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2000/057185**

(86) PCT-Anmeldetag: **20.03.2000**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **28.09.2000**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **19.12.2001**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **22.11.2006**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **14.06.2007**

(51) Int Cl.⁸: **G01N 33/569** (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/564 (2006.01)

G01N 33/566 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

9903622 **19.03.1999** **FR**

9913755 **28.10.1999** **FR**

(73) Patentinhaber:

Bio Merieux, Marcy l'Etoile, FR

(74) Vertreter:

Loesenbeck und Kollegen, 33602 Bielefeld

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

**PERRON, Herve, F-69005 Lyon, FR; LAFONT,
Monique, F-75015 Paris, FR**

(54) Bezeichnung: **Verfahren zum Nachweis von Multipler Sklerose oder einer Prädisposition für die Entwicklung von Multipler Sklerose in einer biologischen Probe**

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

[0001] Multiple Sklerose (MS) ist eine chronische Erkrankung des zentralen Nervensystems bei Menschen, die sich durch Aufeinanderfolge von Remissions- und Schubphasen gemäß einer regelmäßigen Progression entwickelt, deren anatomisch-pathologisches Merkmal aus der Bildung gut abgegrenzter Demyelinisierungszonen in der weißen Substanz des Gehirns und im Rückenmark besteht.

[0002] Auf histologischer Ebene zeigen diese Zonen im Frühstadium des Läsionsprozesses einen Abbau des periaxonalen Myelins in Verbindung mit einer Schädigung auf die für diese Demyelinisierung verantwortlichen Gliazellen. Eine Aktivierung inflammatorischer Makrophagen unter Beteiligung von Mikrogliazellen (in zentralen Nervensystem residenten Gewebsmakrophagen) sowie wahrscheinlich aus infiltrierten Blutmonozyten stammenden Makrophagen geht mit diesen Demyelinisierungsprozess einher und trägt zur Zerstörung der Myelinscheiden bei. Im Zentrum der demyelinisierten Zone findet man eine relative Verarmung an Gliazellen, während sich an der Peripherie eine Proliferation von Astrozyten entwickelt und in den demyelinisierten Plaque einwandern und dort einen fibrösen oder gliotischen Plaque erzeugen kann. Diese sklerotischen Strukturen sind der Ursprung für den Namen, den die Erkrankung erhielt.

[0003] Ein weiteres Merkmal dieser Plaques ist ihre praktisch systemische Verbindung mit einem Gefäßelement, um das sie sich entwickeln.

[0004] Auf histologischer Ebene beobachtet man eine häufige Veränderung der Blut-Hirn-Schranke (BHS), die aus Kapillarendothel besteht. Eines der bestimmenden Elemente bei der Aufrechterhaltung der BHS besteht aus der darunter liegenden Anwesenheit cytoplasmatischer Ausläufer der Astrozyten, die als Astrozytenendfüße bezeichnet werden. Die Astrozytenendfüße induzieren wahrscheinlich die Bildung oder gestatten die Erhaltung von Tight-Junction-Strukturen, die die Kohäsion der Kapillarendothelschranke, die die BHS bildet, gewährleisten. Folglich beziehen sich verschiedene Pathologiemodelle auf die Veränderung der BHS und eine Verarmung an Astrozytenendfüßen.

[0005] Ferner trägt beim Läsionsprozess der MS die Veränderung der BHS zu einer Verstärkung der damit einhergehenden Entzündungsreaktion durch Zustrom aus dem Blutkreislauf stammender Lymphzellen bei. Der Beitrag der mit den Immunzellen zusammenhängenden Entzündung ist bei MS erheblich und am Läsionsprozess beteiligt.

[0006] Die Ätiologie von MS ist der Ursprung einer derzeitigen Debatte, weil die Erkrankung mehrere Ursachen haben kann. Es wurden Argumente zur Unterstützung einer bakteriellen, viralen oder autoimmunen Hypothese vorgebracht.

[0007] Retroviren sind potenziell interessante Kandidaten für eine Untersuchung der Ätiologie der Multiplen Sklerose in Analogie zu einer der MS sehr ähnlichen Erkrankung von Schafen, die beim Schaf durch ein exogenes Retrovirus, das MAEDI-VISNA-Virus, induziert wird. Die experimentelle Infektion von Schafen mittels intraventrikulärer Beimpfung mit neurovirulenten Stämmen des VISNA-Virus ermöglichte es, die Verantwortlichkeit dieses Virus bei der Genese der demyelinisierenden Infektion beim Schaf festzustellen.

[0008] Es wurden zahlreiche Studien durchgeführt, um die Hypothese einer viralen Ätiologie der Erkrankung zu stützen, und die Entdeckung, dass HTLV-1, ein Onkovirus, mit einer chronischen und progressiven Myelopathie, der Tropischen Spastischen Paraparese (TSP), in Zusammenhang steht, hat erneut das Interesse an den Viren angefangen, ohne dass man einen kausalen Zusammenhang zwischen Virus und Multipler Sklerose feststellen konnte.

[0009] Vor kurzem gestatteten es die Arbeiten von H. Perron et al. (Res. Virol. 1989; 140, 551–561; "Current Concepts in Multiple Sclerosis" Wiethöler et al., Hrsg. Amsterdam, Elsevier, 1991, 111–116 und The Lancet 1991; 337, 862–863) ausgehend von einer Lumbalpunktion von Zerebrospinalflüssigkeit eines MS-Patienten eine nicht-immortalisierte Nicht-Lymphzelllinie zu isolieren und das Vorhandensein eines Virus zu zeigen, das die Eigenschaften eines Retrovirus zeigt und insbesondere einen Peak, der einer Reversen Transkriptase-Aktivität entspricht, im Kulturüberstand dieser Linie aufweist. Vor noch kürzerer Zeit haben die gleichen Autoren ausgehend von diesem Reverse-Transkriptase-Aktivitätspeak eine komplementäre DNA erhalten, die dem pol-Gen entspricht, welches das RT-Enzym (Reverse Transkriptase) codiert. Dieses von den Autoren als MSRV bezeichnete Retrovirus wurde auf genomischer Ebene insbesondere in der PCT-Patentanmeldung WO 99/02666 charakterisiert. Durch phylogenetische Analyse durch Vergleich der Sequenz der pol-Region von MSRV mit anderen in Datenbanken verfügbaren pol-Sequenzen konnte gezeigt werden, dass MSRV nahe mit

der ERV-9-(Endogenes Retrovirus-9)-Familie verwandt ist. Ferner offenbaren Perron et al. (J. Neuroimmunol. 1998; 90, 68, Poster-Abstract 380) die Kenntnis, dass das MSRV-Retrovirus eine mit Multipler Sklerose zusammenhängende Superantigen-Aktivität haben kann.

[0010] Außerdem haben F. Beseme et al. in der PCT-Patentanmeldung WO 99/02696 eine cDNA-Bank unter Verwendung einer Ppol-MSRV-Sonde gescreent und überlappende Klone entdeckt, die es ihnen gestatteten, ein putatives RNA-Genom von 7582 Nukleotiden zu rekonstruieren. Dieses RNA-Genom zeigt eine für Retroviren charakteristischen R-U5-gag-pol-env-U3-R-Struktur, und mit einer Durchsichtung mehrerer Datenbanken ließ sich zeigen, dass es eine erhebliche Anzahl an verwandten genomischen (DNA-)Sequenzen im menschlichen Genom gibt, die auf mehrere Chromosomen verteilt sind. So haben die Autoren die Existenz partieller Strukturen des retroviralen Typs im menschlichen Genom gezeigt und ihre potenzielle Rolle bei Autoimmunerkrankungen, wie Multipler Sklerose, in Betracht gezogen. Diese neue Familie endogener Retroviren wurde aufgrund ihrer strukturellen Eigenschaften als HERV-W bezeichnet. Die phylogenetische Analyse in der pol-Region hat gezeigt, dass die HERV-W-Familie phylogenetisch nahe mit den ERV-9- und RTVL-H-Familien verwandt ist und somit zur Familie endogener Retroviren des Typs I gehört. Außerdem zeigt die phylogenetische Analyse des offenen Leserahmens von env, dass es näher mit Affen-Retroviren des Typs D und Vogel-Retikuloendotheliose-Retroviren als mit Säuger-Retroviren des Typs C verwandt ist, was eine chimäre C/D-Genomstruktur nahe legt. Die Analysen von Stammbäumen zeigen, dass die ERV-9- und HERV-W-Familien aus zwei unabhängigen Insertionswellen stammen.

[0011] Das vom MSRV-1-env-Gen und seinen Varianten codierte MSRV-1-Envelop-Protein zeigt eine sehr starke Homologie zu dem env-Protein von HERV-W, das von der in der menschlichen Plazenta exprimierten RNA exprimiert wird, wie in der Patentanmeldung WO-99/02696 im Namen der Anmelderin beschrieben ist.

[0012] Das MSRV-Retrovirus ist mit der HERV-W-Familie genetisch verwandt.

[0013] Die Varianten von MSRV-1 haben ein env-Gen, das vorteilhafterweise mindestens 90%, vorzugsweise mindestens 95% oder sogar 98% Homologie zu demjenigen von MSRV-1 aufweist.

[0014] Alle diese Elemente sprechen dafür, dass retrovirale Elemente bei der Multiplen Sklerose impliziert sind.

[0015] Ferner scheint es inzwischen möglich, dass die Autoimmunmanifestationen durch die Expression von Superantigenen (SAGs) induziert werden.

[0016] Superantigene sind Moleküle, die an Moleküle der Klasse II des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC) und an für bestimmte T-Zell-Rezeptorfamilien (V β) charakteristische Peptid-Sequenzen binden können. Diese Superantigene aktivieren eine große Zahl von T-Klonen unabhängig von dem antigenen Peptid, das von ihrem TCR (T-Zell-Rezeptor) in Verbindung mit dem MHC der antigenpräsentierenden Zelle erkannt wird. Die Folge dieser Aktivierung ist eine polyklonale Proliferation oder eine Induktion von Anergie oder sogar Apoptose in der T-Lymphozyten-Population, die dieses V β trägt. Superantigene sind die Expressionsprodukte von Mikroorganismen, wie Bakterien und exogenen oder endogenen Retroviren.

[0017] Bestimmte Moleküle mit ähnlichen Eigenschaften wie bestimmte, für Superantigene bekannte Wirkungen können auch für größere immunpathologische Prozesse verantwortlich sein und werden als superantigenähnlich bezeichnet. Im Folgenden der vorliegenden Beschreibung sind sie im Begriff "Superantigen" mit eingeschlossen.

[0018] Der T-Rezeptor (TCR), der an der Oberfläche von Lymphozyten vorliegt und bei der Erkennung eines Antigens oder Superantigens impliziert ist, besteht aus zwei Ketten, einer α -Kette von 40 bis 50 kDa und einer β -Kette von 35 bis 47 kDa, die miteinander über eine Disulfidgruppe verbunden sind. Jede Polypeptidkette umfasst zwei Domänen von etwa 110 Aminosäuren, die wie die Domänen der Immunglobuline organisiert sind. Sie sind in der Plasmamembran durch ein Transmembranpeptid verankert und besitzen einen kurzen cytoplasmatischen Schwanz. Der Unterschied im Molekulargewicht zwischen den beiden α - und β -Ketten ist auf das Vorliegen einer Kohlenhydratkette an der N-terminalen Position der α -Kette zurückzuführen. Die Aminosäuresequenzvariabilität ist in der N-terminalen Domäne jedes zu den variablen Domänen der Immunglobuline homologen α - und β -Polypeptids zu finden. Jede Domäne wird durch Umlagerung der Gene V, D und J für die β -Kette und V und J für die α -Kette codiert. Die Sequenzanalyse dieser verschiedenen TCR-V-Domänen zeigt eine große Variabilität, die den hypervariablen Regionen der Immunglobuline (CDRs) entspricht. (Roitt I. et al., Immunology 3. Aufl., Mosby, England).

[0019] Die Umlagerung der TCR-Gene erfolgt ähnlich wie bei den Immunglobulinen. Die Diversität der TCR geht aus einer genetischen Rekombination zwischen den Segmenten V, D und J hervor. Die V β -Gene, einschließlich der Gene D, J und C, sind mit Ausnahme von V β 14, das sich am 3'-Ende des Locus befindet, zusammen gruppiert. Bei den Umlagerungsprozessen der V-D-J, aber auch der V-J- und V-D-D-J-Regionen wird eine starke Diversität erzeugt.

[0020] Ein Superantigen ist im Gegensatz zu einem Antigen in der Lage, T-Lymphozyten unspezifisch zu aktivieren. Ein Superantigen ist in der Lage, gleichzeitig an die MHCII-Moleküle, die auf der Oberfläche der antigenpräsentierenden Zellen vorliegen, und an die V β -Moleküle des T-Zell-Rezeptors zu binden, die auf der Oberfläche der T-Zellen vorliegen. Die V β -Kette des TCR fixiert das Superantigen außerhalb der antigenspezifischen Stelle des TCR, aber dies reicht zur Aktivierung der T-Zelle aus. Diese Bindung zieht eine Induktion intrazellulärer Signale in der T-Zelle nach sich. Diese intrazellulären Signalkaskaden induzieren entweder die Proliferation der T-Zelle, die das V β von Interesse trägt, oder eine Anergie oder Apoptose der Zelle. So kann je nach den experimentellen Bedingungen die Wirkung auf die aktivierte T-Lymphozyten-Subpopulation eine Proliferations-, Anergie- oder polyklonale Apoptosewirkung sein. Im Gegensatz zu der T-Antwort auf ein klassisches Antigen ist die T-Lymphozyten-Stimulation somit polykonal und nicht oligoklonal oder sogar monoklonal (Scherer et al., 1993, Annu. Rev. Cell Biology 9: 101–128). Diese Induktion der Zellproliferation, -anergie oder -apoptose hängt von mehreren zusammenwirkenden Parametern ab. Sie hängt insbesondere von der Konzentration des Superantigens und von dem Vorliegen vorheriger Zusammentreffen mit analogen Stimulationen, die das gleiche V β ansteuern, durch das Immunsystem des T-Lymphozyten-Spenders ab. Das Versetzen in Anergie oder Apoptose kann u.a. auf eine längere Stimulation oder Aktivierung der T-Zellen folgen. So hat ein Superantigen die Wirkung einer Induktion einer positiven oder negativen Variation einer T-Zell-Subpopulation mit definiertem V β "x". Ein Superantigen, das eine gegebene antigene V β -"x"-Determinante ansteuert, interagiert mit der gesamten Lymphozyten-Subpopulation, die dieses V β trägt. Die von dieser Wechselwirkung induzierte Wirkung, gekoppelt mit derjenigen, die den MHCII der antigenpräsentierenden Zellen (APC) ansteuert, besteht in einer signifikanten Variation der Prozent an V β -"x"-Lymphozyten, bezogen auf die anderen V β -Nicht-"x"-T-Lymphozyten. Diese Variation ist üblicherweise entweder eine Proliferation oder eine Verarmung (Bernal A et al., 1999, J Clin Immunol 19: 149; Li H et al., 1999, Annu Rev Immunol 17: 435; Girgis et al., 1999, J Exp Med 189: 265; Lavoie et al., Immunol Rev 1999 168: 257; Cornwell WD und Rigers TJ, Immunology 1999 96: 193; Wang ZQ et al., Immunology 1998 94: 331; Maier CC et al., PNAS 1998 95: 4499; Michie CA und Cohen J, Trends Microbiol 1998 6: 61; La Bon A et al., Int Immunol 1999 11: 373; Shen X und König R, Int Immunol 1998 10: 247; Noble A et al., J Immunol 1998 160: 559; Yang Y et al., Int Immunol 1998 10: 175; Renno T et al., J Immunol 1999 162: 6312; Roitt I et al., Immunology dritte Auflage, Mosby).

[0021] Wenn das für ein gegebenes Superantigen codierende Mittel mit T-Lymphozyten und nicht nur mit dem gereinigten Molekül, das die Superantigen-Aktivität trägt, zusammengebracht wird, entspricht die sich ergebende immunologische Wirkung außerdem der Überlagerung von einer Superantigenwirkung und variablen Antigenstimulationen, die durch die anderen Antigene des gesamten Mittels hervorgerufen werden. Es sollte beachtet werden, dass sich die Letzteren im Gegensatz zu der Superantigen-Stimulation je nach dem Klasse-II-HLA des Lymphozytendonors oder des Patienten in einem pathologischen Kontext unterscheiden können. Dies hat zur Folge, dass die V β -"x"-T-Proliferation oder -Verarmung mit einem Reaktivitätsprofil (Proliferation oder Hemmung) anderer V β -Nicht-"x"-Subpopulationen einhergeht, die eventuell im HLAII variabel sind, wobei dieses Profil von der Art der mit dem Mittel oder mit mehreren Mitteln (im Fall einer Kaskade, die zur Aktivierung eines endogenen Retrovirus führt, der für das unter diesen Bedingungen exprimierte Superantigen codiert) verbundenen Antigene bestimmt wird. Im letzteren Fall können zwei Superantigene exprimiert werden, wenn der Induktor eines davon produziert und wenn die Infektion einer Zielzelle durch dieses ein endogenes Retrovirus reaktiviert, dass dann ein zweites produziert. Diese Daten bestätigen somit die Notwendigkeit, ein vollständiges Profil der T-Antwort in Abhängigkeit von dem V β zu untersuchen, wenn ein "natürlicher" Infektions-/Reaktivierungszusammenhang und kein gereinigtes Superantigenmolekül außerhalb des Zusammenhangs untersucht wird.

[0022] Die Anmelderin hat jetzt gezeigt, dass die Expression eines Superantigens oder eines Proteins mit bestimmten Wirkungen des Superantigentyps (superantigenähnlich) mit einem pathologischen Zustand, beispielsweise einem Zustand in Verbindung mit Multipler Sklerose, zusammenhängt.

[0023] Die Superantigen-Aktivität wird direkt oder indirekt durch einen Effektor, wie ein Protein oder einen Mikroorganismus oder ein Pathogen, insbesondere ein Retrovirus (MSRV-1) und/oder ein Pathogen (MSRV-2), und insbesondere ein Epitop, das in einem env-Protein eines MSRV-1-Retrovirus enthalten ist, induziert.

[0024] Ferner hat die Anmelderin auch eine stimulierte Produktion von Cytokinen, wie IL-6, in mononukleären

Blutzellen, die von gesunden Spendern stammen und mit einem Extrakt des Überstands oder einer Fraktion eines Extrakts eines Überstands einer MS-Zellkultur in Kontakt gebracht werden, gezeigt.

[0025] Die Anmelderin hat zudem ein T-Zell-Antwortprofil in Abhängigkeit von den V β auf ein oder mehrere Mittel gezeigt, das/die mit der Expression eines Moleküls des Superantigentyps einhergeht/einhergehen.

[0026] Schließlich hat die Anmelderin beobachtet, dass die gleichen Extrakte, die von MS-Patienten und/oder von mit dem MSRV-1-Retrovirus infizierten Patienten stammen, einen signifikant erhöhten Zelltod durch Apoptose in den gleichen mononukleären Blutzellen bewirken.

[0027] Die Anmelderin hat daher ein Verfahren entwickelt, mit dem sich die vorstehend genannten Wirkungen in einer biologischen Probe nachweisen lassen.

[0028] Die erforderlichen Kriterien, um festzustellen, dass ein Protein oder ein Mikroorganismus ein Superantigen oder ein Protein mit bestimmten Wirkungen des Superantigentyps ist oder enthält, sind:

- (i) die Fähigkeit des Proteins oder des Mikroorganismus, eine Vermehrung oder einen Verlust bestimmter Lymphozytenfamilien, die an ihrem TCR eine bestimmte V β -Kette tragen, zu induzieren, und
- (ii) eine vom MHC-Klasse-II-Haplotyp unabhängige V β -Aktivierung.

[0029] Es sollte beachtet werden, dass, wenn bei der vorliegenden Erfindung von Superantigen-Aktivität die Rede ist, dies gleichermaßen die Expression eines Superantigens oder eines Proteins mit bestimmten superantigenähnlichen Wirkungen (SAg-ähnlich) betrifft.

[0030] Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis von Multipler Sklerose oder einer Prädisposition für die Entwicklung von Multipler Sklerose in einer biologischen Probe, wobei bei dem Verfahren eine Superantigen-Aktivität nachgewiesen wird, die durch das Produkt der Expression des MSRV-1-env-Gens oder eines Fragments des MSRV-1-env-Gens induziert wird, wobei das MSRV-1-env-Gen die in SEQ ID NR: 1 dargestellte Sequenz umfasst oder daraus besteht, oder eine Superantigen-Aktivität nachgewiesen wird, die durch das Produkt der Expression des env-Gens einer Variante von MSRV-1 oder eines Fragments des env-Gens der Variante induziert wird, wobei das env-Gen der Variante eine Homologie von mindestens 90% mit dem MSRV-1-env-Gen besitzt, indem eine Vermehrung oder ein Verlust von Lymphozyten nachgewiesen wird, die aus Lymphozyten mit einer V β 16- und/oder V β 17-Determinante und Lymphozyten mit einer V β 7-Determinante ausgewählt sind, wobei die Vermehrung oder der Verlust mindestens 31% beträgt.

[0031] Gemäß einer vorteilhaften Variante wird eine Vermehrung von Lymphozyten mit einer V β 16-Determinante nachgewiesen.

[0032] Gemäß einer vorteilhaften Variante wird ein Vermehrungsprofil von Lymphozyten mit einer V β 16-Determinante und eine gleichzeitige Vermehrung von Lymphozyten mit einem V β , ausgewählt aus mindestens einem von V β 2, 3, 7, 8, 12, 14, 17 und 22 und vorzugsweise V β 3 und 12, nachgewiesen.

[0033] Gemäß einer anderen vorteilhaften Variante wird ein Verlust von Lymphozyten mit einer V β 16-Determinante nachgewiesen.

[0034] Gemäß einer vorteilhaften Variante wird ein Verlust von Lymphozyten mit einer V β 16-Determinante und ein gleichzeitiger Verlust von Lymphozyten mit einem V β , ausgewählt aus mindestens einem von V β 2, 3, 7, 8, 12, 14, 17 und 22, vorzugsweise aus mindestens einem von V β 7, 14 und 17 und vorteilhafterweise V β 7 und 17, nachgewiesen.

[0035] Der Nachweis der Vermehrung und gegebenenfalls der gleichzeitigen Vermehrung oder des Verlusts und gegebenenfalls des gleichzeitigen Verlusts erfolgt, indem membranständige V β -Moleküle nachgewiesen werden, die mit mononukleären Blutzellen verbunden sind, die vorzugsweise T-Lymphozyten sind. Anschließend wird die prozentuale Variation der V β -Moleküle, die nachgewiesen wurden und ganz oder teilweise aus dem Kulturüberstand von an MS leidenden Patienten stammen, in Bezug auf die Anzahl an V β -Molekülen, die in dem gesamten oder einem Teil des Kulturüberstands, der von einem gesunden Donor stammt, nachgewiesen werden, berechnet. Es ist auch möglich, ein Gemisch von Kulturüberständen, die von gesunden Donoren stammen, bereitzustellen.

[0036] Die Gesamtheit der V β -Moleküle wird als V β -Repertoire der T-Lymphozyten bezeichnet. Die verschie-

denen V β -Moleküle werden spezifisch unter Verwendung mindestens einer der nachstehend beschriebenen Techniken nachgewiesen:

(a) entweder unter Verwendung mindestens eines Liganden, d.h. jedes Moleküls, das in der Lage ist, das nachzuweisende V β spezifisch zu erkennen, beispielsweise eines monoklonalen oder polyklonalen Anti-V β -Antikörpers oder eines Fragments eines monoklonalen oder polyklonalen Antikörpers oder eines Moleküls, das die Funktion des betreffenden V β hemmt. Die Prozent V β -Moleküle des Repertoires werden dann auf die Prozent Zellen bezogen, die das CD3-Molekül auf ihrer Oberfläche aufweisen, wobei Letztere unter Verwendung mindestens eines Liganden ebenfalls spezifisch nachgewiesen werden. Unter Ligand wird insbesondere ein monoklonaler oder polyklonaler Antikörper oder ein Fragment dieser Antikörper, vorzugsweise ein monoklonaler Antikörper, verstanden. Die gegen ein V β von Interesse gerichteten monoklonalen Antikörper werden mit herkömmlichen Techniken hergestellt, die zur Produktion von Antikörpern gegen Oberflächenantigene verwendet werden. Mäuse oder Kaninchen werden (i) entweder mit dem natürlichen oder rekombinanten Protein (ii) oder mit einem immunogenen Peptid oder (iii) mit Mäuszellen, die das Protein oder Peptid von Interesse und MHCII-Moleküle exprimieren, immunisiert. Die Balb/c-Mauslinie wird am häufigsten verwendet. Das Immunogen kann auch ein Peptid sein, das aus Peptiden ausgewählt ist, die anhand der Primärsequenzen des V β von Interesse definiert werden. Die Proteine oder Peptide werden für ihre Verwendung bei der Immunisierung an Keyhole-Limpet-Hämocyanin (Peptid-KLH) als Träger oder mit humanem Serumalbumin (Peptid-HSA) gekuppelt. Die Tiere werden einer Injektion mit Peptid-KLH oder Peptid-HSA unter Verwendung von komplettem Freundschens Adjuvans (IFA) unterzogen. Die Seren und Überstände der Hybridomkultur, die von den mit jedem Peptid immunisierten Tieren stammen, werden auf das Vorliegen von Antikörpern mit einem ELISA-Test unter Verwendung der Ursprungsmoleküle analysiert. Die Milzzellen dieser Mäuse werden gewonnen und mit Myelomzellen fusioniert. Polyethylenglycol (PEG) ist das am häufigsten verwendete Fusionsmittel. Die Hybridome, die die spezifischsten und sensitivsten Antikörper produzieren, werden selektiert. Die monoklonalen Antikörper können in vitro durch Zellkultur der produzierten Hybridome oder durch Gewinnung von muriner Ascitesflüssigkeit nach intraperitonealer Injektion der Hybridome in Mäuse erzeugt werden. Sowohl bei der Art der Produktion im Überstand als auch in Ascites müssen die monoklonalen Antikörper anschließend unbedingt gereinigt werden. Die verwendeten Reinigungsverfahren sind im Wesentlichen Filtration über Ionenaustauschergel oder durch Ausschlusschromatographie oder sogar Immunpräzipitation. Für jeden Antikörper muss das Verfahren gewählt werden, das es gestattet, die beste Ausbeute zu erhalten. Eine ausreichende Zahl an Antikörpern wird in funktionellen Tests gescreent, um die leistungsfähigsten Antikörper zur Bindung der Moleküls von Interesse und/oder zur Blockierung der Aktivität des Moleküls von Interesse zu identifizieren. Die selektierten monoklonalen Antikörper werden durch Standard-"CDR-Pfropfungs"-Verfahren (von vielen Firmen als Dienstleistung durchgeführtes Protokoll) humanisiert. Diese humanisierten Antikörper können im Patienten klinisch getestet werden. Die Wirksamkeit dieser Antikörper kann anhand klinischer Parameter verfolgt werden. Die In-vitro-Produktion von Antikörpern, Antikörperfragmenten oder Antikörperderivaten, wie humanisierten oder nicht-humanisierten chimären Antikörpern, die mittels genetischer Rekombination in Eukaryotenzellen produziert werden, ist beschrieben worden (EP 120 694 oder EP 125 023) und auch auf die vorliegende Erfindung anwendbar;

(b) oder durch Molekularbiologie nach Extraktion der Nukleinsäuren von mononukleären Blutzellen, u.a. T-Lymphozyten, die mit MS-Kulturüberstand oder einer Fraktion von MS-Kulturüberstand und mit Referenzkulturüberstand oder einer Fraktion von Referenzkulturüberstand zusammengebracht wurden, Amplifikation ihrer transkribierten V β -RNAs mittels RT-PCR, Untersuchen des Profils der Amplifikationsprodukte auf einem Gel und/oder Sequenzieren und/oder Elektrophorese. Für den RT-PCR-Schritt und/oder um die Amplifikationsprodukte spezifisch nachzuweisen, werden DNA- und/oder RNA-Fragmente verwendet, die die untersuchte V β -Determinante oder ein Fragment dieser Determinante codieren, und/oder DNA- und/oder RNA-Fragmente, die an die für die untersuchte V β -Determinante codierenden Nukleinsäurefragmente aufgrund von Nukleinsäurebasenkomplementarität hybridisieren und diese amplifizieren können. Das Profil der amplifizierten Fragmente, deren Größe in Abhängigkeit von der Umlagerung der für jeden Klon spezifischen Ketten variiert, wird durch elektrophoretische Analyse bestimmt und gestattet es, Polyklonalität nachzuweisen. Der Nachweis der amplifizierten DNA- und/oder RNA-Fragmente, die die untersuchte V β -Determinante codieren, kann auch mittels Nukleotidhybridisierung gemäß Techniken durchgeführt werden, die dem Fachmann bekannt sind (Southern-Blot, Northern-Blot, ELOSA "Enzyme-Linked-Oligosorbent-Assay" (Katz JB et al., Am. J. Vet. Res. 1993 Dezember; 54 (12): 2021-6 und François Mallet et al., Journal of Clinical Microbiology, Juni 1993, S. 1444-1449)).

[0037] Eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist außerdem ein vorteilhaftes Verfahren, um die vorstehend genannte Superantigen-Aktivität nachzuweisen, das die folgenden Schritte umfasst:

(i) Entnahme eines Kulturüberstands von mononukleären Blutzellen oder Plexus-choroidei-Zellen oder Lep-tomeninx-Zellen, wobei diese Zellen von Patienten stammen, die von Multipler Sklerose betroffen sind oder

von denen angenommen wird, dass sie eine Prädisposition für die Entwicklung von Multipler Sklerose haben, oder von einer etablierten Zelllinie, wie Zellen der Zelllinien PLI-2, hinterlegt bei der ECACC am 22. Juli 1992 unter der Nummer 92072201, und LM7PC, hinterlegt bei der ECACC am 8. Januar 1993 unter der Nummer 93010817 kraft des Budapester Vertrags;

(ii) In-Kontakt-Bringen des Kulturüberstands oder eines Teils des Kulturüberstands mit einer Reihe von, vorzugsweise mindestens drei, Kulturen von mononukleären Blutzellen, die von gesunden Spendern stammen, und

(iii) Nachweisen der Vermehrung und gegebenenfalls einer gleichzeitigen Vermehrung oder des Verlusts und gegebenenfalls einer gleichzeitigen Verringerung der mononukleären Blutzellen des Schrittes (ii).

[0038] Die mononukleären Blutzellen, die Superantigenmoleküle produzieren und von an MS leidenden Patienten stammen, sind insbesondere aus B-Lymphozyten und Monozyten ausgewählt.

[0039] Die mononukleären Blutzellen, die auf die Stimulation reagieren und von gesunden Spendern stammen, sind insbesondere aus T-Lymphozyten ausgewählt.

[0040] Ein weiteres vorteilhaftes Verfahren besteht aus

(i) Entnehmen mononukleärer Blutzellen, wobei diese Zellen von Patienten, die von Multipler Sklerose betroffen sind, oder von Patienten, von denen angenommen wird, dass sie ein Risiko für die Entwicklung von Multipler Sklerose haben, und von gesunden Individuen stammen,

(ii) In-Kontakt-Bringen der von Patienten oder gesunden Individuen stammenden mononukleären Blutzellen mit Kulturüberständen oder einer Fraktion von Kulturüberstand von Zellen, die aus mononukleären Blutzellen, Plexus-choroidei-Zellen und Leptomeninx-Zellen, von etablierten Zelllinien stammenden Zellen, wie Zellen der Zelllinien PLI-2, hinterlegt bei der ECACC am 22. Juli 1992 unter der Nummer 92072201, und LM7PC, hinterlegt bei der ECACC am 8. Januar 1993 unter der Nummer 93010817 kraft des Budapester Vertrags, ausgewählt sind, und

(iii) Nachweisen der Vermehrung und gegebenenfalls gleichzeitigen Vermehrung oder des Verlusts und gegebenenfalls der gleichzeitigen Verringerung ausgehend von den mononukleären Blutzellen des Schrittes (i).

[0041] Der Nachweis dieser Vermehrung und gegebenenfalls gleichzeitigen Vermehrung oder dieses Verlusts und gegebenenfalls einer gleichzeitigen Verringerung erfolgt

(a) entweder durch Verwendung von Liganden, insbesondere eines Antikörpers und vorzugsweise eines monoklonalen Antikörpers oder eines Antikörperfragments, wobei jeder Ligand für eine aus V β 16, 2, 3, 7, 8, 12, 14, 17 und 22, vorzugsweise V β 16, 3 und 12, ausgewählte Determinante spezifisch ist, oder eines Liganden, insbesondere eines Antikörpers und vorzugsweise eines monoklonalen Antikörpers, wobei jeder Ligand für eine aus V β 16, 2, 3, 7, 8, 12, 14, 17 und 22, vorzugsweise V β 16, 7, 14 und 17 ausgewählte Determinante spezifisch ist,

(b) oder gemäß dem nachstehend beschriebenen Protokoll, wobei Folgendes durchgeführt wird:

(i) eine Extraktion von Gesamt-RNA mononukleärer Blutzellen, die mit MS-Kulturüberstand oder einer Fraktion von MS-Kulturüberstand und mit Referenzkulturüberstand oder einer Fraktion von Referenzkulturüberstand zusammengebracht wurden,

(ii) eine reverse Transkription der RNA,

(iii) eine spezifische Amplifikation jeder V β -Familie mithilfe eines bestimmten Primer-Paars,

(iv) eine Markierung der erhaltenen Amplifikationsprodukte mit jedem geeigneten Marker,

(v) eine Elektrophorese dieser Amplifikationsprodukte und eine Analyse der erhaltenen Elektrophoreseprofile mithilfe eines geeigneten Detektors.

[0042] Die Prädisposition für einen pathologischen Zustand wird untersucht, indem die immunologische Sensibilisierung eines Patienten durch Nachweisen einer hauptsächlichen Vermehrung oder eines hauptsächlichen Verlusts von Lymphozyten, die eine V β 16- und/oder 17-Determinante tragen, und gegebenenfalls einer gleichzeitigen Expression oder einer gleichzeitigen Verringerung von Lymphozyten, die V β tragen, die aus mindestens einem von V β 2, 3, 7, 8, 12, 14, 17 und 22 und vorzugsweise V β 3 und 12 oder V β 7, 14 und 17, vorzugsweise 7 und 17 ausgewählt sind, experimentell getestet wird.

[0043] Die nachgewiesene Prädisposition kann eine natürliche Prädisposition oder eine beispielsweise nach einer starken Stimulation der Lymphozyten, die die V β 16- und V β 17-, vorzugsweise V β 16-, Determinanten tragen, in einem Individuum durch Exposition des Organismus des Individuums gegenüber einem Antigen erworbene Prädisposition sein. Dieses Antigen kann beispielsweise mindestens ein Protein oder ein Peptid des Hepatitis-B-Virus sein.

[0044] Somit betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zum Nachweis von MS oder einer Prädisposition für MS, wobei:

eine hauptsächliche Vermehrung oder ein hauptsächlicher Verlust von Lymphozyten mit einer V β 16- und/oder V β 17-, vorzugsweise V β 16-, Determinante oder eine hauptsächliche Vermehrung oder ein hauptsächlicher Verlust von Lymphozyten mit einer V β 16-Determinante und eine gleichzeitige Vermehrung oder eine gleichzeitige Verringerung von Lymphozyten mit T-Lymphozyten-V β , ausgewählt aus mindestens einem von V β 2, 3, 7, 8, 12, 14, 17 und 22 und vorzugsweise V β 3 und 12 oder 7, 14 und 17, vorzugsweise V β 7 und 17, nachgewiesen wird, wobei die Vermehrung oder der Verlust mindestens 31% beträgt, die prozentuale Variation der Anzahl der V β , die bei einem von MS betroffenen Patienten nachgewiesen werden, in Bezug auf diejenigen, die mit T-Lymphozyten von einem gesunden Spender unter Bedingungen, wie vorstehend festgelegt, erhalten werden, berechnet wird.

[0045] Unterscheidet sich die prozentuale Variation in ihrem Absolutwert signifikant von 0, kann man daraus schließen, dass der Patient eine Prädisposition für die MS-Erkrankung besitzt oder die Erkrankung entwickelt. Wenn der Absolutwert dieses Prozentwertes gleich 0 ist, kann dies bedeuten, dass der Spender in dem Moment, in dem das Verfahren angewendet wird, keine Prädisposition für die MS-Erkrankung besitzt und/oder die Erkrankung nicht entwickelt hat.

[0046] Eine Aufgabe der Erfindung ist auch ein Verfahren zum Nachweis eines pathologischen Zustands oder einer Prädisposition für einen pathologischen Zustand in einer biologischen Probe, gemäß dem die folgenden Parameter nachgewiesen werden:

eine Superantigen-Aktivität, wie vorstehend definiert, und mindestens eines aus einer Stimulation der Produktion von Cytokinen, wie Interleukin-6 (IL-6), und einer Induktion der Zellapoptose.

[0047] Vorzugsweise werden die drei Parameter in Verbindung nachgewiesen.

[0048] Der pathologische Zustand steht insbesondere in Verbindung mit einer Autoimmunerkrankung, wie Multipler Sklerose.

[0049] Die gemäß den erfindungsgemäßen Verfahren nachgewiesene Superantigen-Aktivität kann insbesondere direkt oder indirekt durch einen Effektor induziert werden, der aus Proteinen, Mikroorganismen, Pathogenen und beispielsweise Bakterien und/oder Retroviren, vorzugsweise menschlichen Retroviren, wie MSRV-1, und/oder Pathogenen, wie MSRV-2, ausgewählt ist.

[0050] Insbesondere wird die Superantigen-Aktivität durch das in SEQ ID NR: 2 dargestellte Envelop-Protein von MSRV-1 oder durch ein Fragment dieses Proteins oder auch durch das in SEQ ID NR: 1 dargestellte Produkt der Expression des env-Gens von MSRV-1 oder ein Fragment dieses Gens induziert.

[0051] Für ein besseres Verständnis der Erfindung werden bestimmte Begriffe definiert:

- Ein humanes Retrovirus, insbesondere ein endogenes Retrovirus, mit Superantigen-Aktivität, die mit einer Autoimmunkrankheit in Verbindung steht, wonach das Retrovirus MSRV-1 ist und die Superantigen-Aktivität durch Expression des env-Gens von MSRV-1 oder eines Fragments dieses Gens, insbesondere eines Fragments dieses Gens, das mindestens einen Leserahmen des env-Proteins von MSRV-1 (SEQ ID NR: 2) codiert, oder auch durch das env-Protein von MSRV-1 oder ein Fragment dieses Proteins, insbesondere durch ein Fragment, das mindestens einem Leserahmen des Proteins (SEQ ID NR: 2) entspricht, induziert wird.
- Ein Nukleinsäuremolekül, das mindestens ein RNA- oder DNA-Fragment oder -Fragmente des env-Gens von MSRV-1, identifiziert durch SEQ ID NR: 1, umfasst, wobei das Fragment eine Länge von mindestens 18 Nukleotiden und vorzugsweise mindestens 24 Nukleotiden hat; insbesondere umfasst es mindestens ein Fragment, das mindestens einen Leserahmen codiert und gegebenenfalls ein Stoppcodon enthält; dieses Molekül kann eine Superantigen-Aktivität codieren.
- Ein Polypeptidmolekül, insbesondere ein Protein oder Proteinfragment, das mindestens ein Fragment oder Fragmente des durch SEQ ID NR: 2 identifizierten env-Proteins von MSRV-1 umfasst, wobei das Fragment eine Länge von mindestens 6 Aminosäuren und vorzugsweise mindestens 8 Aminosäuren hat; vorteilhafterweise umfasst das Polypeptidmolekül mindestens einen Leserahmen und besitzt gegebenenfalls eine Superantigen-Aktivität.

[0052] Gemäß einer Variante der Erfindung wird zusätzlich

- (i) ein rekombinantes Protein, wie in SEQ ID NR: 2 dargestellt, oder ein Fragment des Proteins produziert

oder synthetisiert,

- (ii) das Protein mit einer Reihe von, vorzugsweise mindestens drei, Kulturen mononukleärer Blutzellen, die von gesunden Spendern stammen, in Kontakt gebracht, und
- (iii) die Vermehrung und gegebenenfalls eine gleichzeitige Vermehrung oder der Verlust und gegebenenfalls die gleichzeitige Verringerung der mononukleären Blutzellen des Schrittes (ii) nachgewiesen.

[0053] Es werden auch

- (i) mononukleäre Blutzellen entnommen, wobei diese Zellen von Patienten, die von MS betroffen sind, oder von Patienten, von denen angenommen wird, dass sie ein Risiko für die Entwicklung von MS besitzen, und von gesunden Individuen stammen,
- (ii) die von Patienten oder gesunden Individuen stammenden mononukleären Blutzellen mit einem Polypeptid oder einem rekombinanten Protein, wie in SEQ ID NR: 2 dargestellt, oder einem Fragment des Polypeptids oder Proteins in Kontakt gebracht und
- (iii) die Vermehrung und gegebenenfalls gleichzeitige Vermehrung oder der Verlust und gegebenenfalls die gleichzeitige Verringerung ausgehend von den mononukleären Blutzellen des Schrittes (i) nachgewiesen.

[0054] Vorzugsweise wird ein erfindungsgemäßes Polypeptid, wie vorstehend definiert, verwendet. Vorteilhafterweise wird es von einem env-Gen, wie vorstehend definiert, codiert.

[0055] Die Verfahren, wie vorstehend definiert, können zur therapeutischen Überwachung von Patienten und/oder zur Untersuchung der Wirksamkeit von Molekülen zur therapeutischen Verwendung gegen die identifizierten Parameter verwendet werden.

[0056] Zur Untersuchung der Wirksamkeit von Molekülen zur therapeutischen Verwendung, d.h. eines oder mehrerer Molekül(s/e), das/die die Vermehrung oder den Verlust der T-Lymphozyten mit einem bestimmten V β hemmen kann/können, wird ein Kulturüberstand von mononukleären Blutzellen oder Plexus-choroidei-Zellen oder Leptomeninx-Zellen, wobei diese Zellen von Patienten stammen, die von einer Autoimmunkrankheit, insbesondere MS, betroffen sind, oder von Zellen, die von etablierten Zelllinien, wie Zellen der Zelllinien PLI-2 und LM7PC, stammen, entnommen,

- (i) es werden mononukleäre Blutzellen entnommen, wobei diese Zellen von gesunden Individuen stammen,
- (ii) diese mononukleären Blutzellen werden mit dem Kulturüberstand oder einer Fraktion des Kulturüberstands in Kontakt gebracht, und
- (iii) die Hemmung der Vermehrung und gegebenenfalls gleichzeitigen Vermehrung oder die Hemmung des Verlusts und gegebenenfalls der gleichzeitigen Verringerung von Lymphozyten mit mindestens einer Determinante, ausgewählt aus V β 16, 7 und 17, wird ausgehend von den mononukleären Blutzellen des Schrittes (i) in Gegenwart des Mittels oder der Zusammensetzung in festgelegten Dosen unter Verwendung eines Liganden, wie vorstehend definiert, oder einer Amplifikation in Verbindung mit einer Elektrophorese, wie vorstehend definiert, nachgewiesen.

[0057] So wird die prozentuale Variation der Anzahl der V β , die in Anwesenheit des Moleküls oder der Moleküle für die therapeutische Verwendung und in Abwesenheit eines derartigen Moleküls oder derartiger Moleküle nachgewiesen wird, berechnet.

[0058] Das Molekül oder die Moleküle für die therapeutische Verwendung werden auch in vivo gemäß einem Verfahren getestet, das aus Folgendem besteht:

Verwendung eines Kulturüberstands von mononukleären Zellen, vorzugsweise B-Lymphozyten und Monozyten, oder Plexus-choroidei-Zellen oder Leptomeninx-Zellen, wobei diese Zellen aus einer biologischen Probe eines von MS betroffenen Patienten isoliert sind, oder Verwendung des Überstands einer etablierten Zelllinie, wie der Zelllinie PLI-2 und der Zelllinie LM7PC, oder Verwendung des gesamten oder eines Teils mindestens eines Moleküls, das aus mindestens einem der zwei vorstehend genannten Überstände gewonnen wurde, In-Kontakt-Bringen des gesamten oder eines Teils mindestens eines der vorstehend genannten Kulturüberstände oder mindestens eines in einem von ihnen enthaltenen Moleküls mit einer Kultur von mononukleären Blutzellen, vorzugsweise T-Lymphozyten, die von einem Individuum und/oder einem Tier vor und nach der Verabreichung des oder der zu testenden Molekül(s/e) und parallel nach der Verabreichung eines Placebo-Mittels und/oder einer Placebo-Zusammensetzung an einen MS-Patienten und an ein Tier entnommen wurden, Nachweisen, wie vorstehend beschrieben, der Vermehrung oder des Verlusts von Lymphozyten mit der V β -Determinante vor und nach der Verabreichung des Moleküls oder der Moleküle zur therapeutischen Verwendung oder des Placebo-Mittels und/oder der Placebo-Zusammensetzung an das Individuum und/oder das Tier, Nachweisen der Vermehrung und gegebenenfalls einer gleichzeitigen Vermehrung und/oder des Verlusts und gegebenenfalls einer gleichzeitigen Verringerung von T-Lymphozyten, die an ihrer Oberfläche ein gegebenes

V β -Molekül exprimieren, unter Verwendung mindestens eines Liganden oder mittels Molekularbiologie, wie vorstehend beschrieben, und

Berechnen der Prozent (X) der Vermehrung oder des Verlusts von V β -Determinanten, die in den kultivierten mononukleären Zellen nachgewiesen werden, die von dem Individuum oder dem Tier stammen, das eine oder mehrere Verabreichungen des zu testenden Moleküls oder der zu testenden Moleküle erhalten hat, in Bezug auf die Anzahl der V β -Determinanten, die in den kultivierten Zellen nachgewiesen werden, die von dem Individuum oder dem Tier stammen, das keinerlei Verabreichung erhalten hat, und/oder von Prozent (Y) der Vermehrung oder des Verlusts der V β -Determinante, die in kultivierten mononukleären Zellen nachgewiesen werden, die von dem Individuum oder dem Tier stammen, das eine oder mehrere Verabreichungen des zu testenden Moleküls oder der zu testenden Moleküle erhalten hat, in Bezug auf die Anzahl der V β -Determinanten, die in den kultivierten Zellen nachgewiesen werden, die von dem Patienten oder dem Tier stammen, der/das eine oder mehrere Verabreichungen des (der) Molekül(s/e) und/oder einer Placebo-Zusammensetzung oder eines Placebo-Mittels erhalten hat, wobei die gleichen Verabreichungsbedingungen eingehalten werden, wie sie für das oder die zu untersuchende(n) Molekül(e) verwendet wurden.

[0059] Wenn $|X|$ und/oder $|Y|$ und/oder $|X| + |Y|$ sich signifikant von 0 unterscheiden, kann dies bedeuten, dass das Molekül oder die Moleküle die Vermehrung oder den Verlust der mononukleären Zellen mit der betreffenden V β -Determinante ganz oder teilweise hemmt/hemmen; wenn $|X|$ oder $|Y|$ oder $|X| + |Y|$ gleich oder fast 0 sind, kann dies bedeuten, dass das Mittel die Vermehrung oder den Verlust der mononukleären Zellen mit der betreffenden V β -Determinante nicht ganz oder teilweise hemmt.

[0060] Unter Placebo-Mittel und/oder -Zusammensetzung wird jedes Mittel und/oder jede Zusammensetzung verstanden, das/die keine Verringerung der mononukleären Blutzellen mit der bestimmten V β -Determinante nach sich zieht.

[0061] Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Untersuchung der Wirksamkeit eines Mittels oder einer Zusammensetzung zur Hemmung einer Superantigen-Aktivität in einer biologischen Probe, das die folgenden Schritte umfasst:

- i) Produzieren oder Synthetisieren eines Polypeptids, insbesondere eines rekombinanten Proteins, wie durch SEQ ID NR: 2 dargestellt, oder eines Fragments des Polypeptids oder Proteins,
- (ii) In-Kontakt-Bringen des rekombinanten Polypeptids oder Proteins mit einer Reihe von, vorzugsweise mindestens drei, Kulturen von mononukleären Blutzellen, die von gesunden Spendern stammen, in Gegenwart des Mittels oder der Zusammensetzung in zuvor bestimmten Dosen, und
- (iii) Nachweisen der Hemmung der Vermehrung und gegebenenfalls gleichzeitigen Vermehrung oder der Hemmung des Verlusts und gegebenenfalls der gleichzeitigen Verringerung von Lymphozyten mit mindestens einer Determinante, ausgewählt aus V β 16, 2, 3, 7, 8, 12, 14, 17 und 22, insbesondere V β 16 und/oder 17, V β 16, 3 und 12 oder V β 16, 7, 14 und 17, insbesondere V β 16, 7 und 17, unter Verwendung eines Liganden oder einer Amplifikation in Verbindung mit einer Elektrophorese, wie vorstehend beschrieben.

[0062] Die therapeutische Wirksamkeit mehrerer Mittel und/oder Zusammensetzungen kann in Kombination im gleichen Assay untersucht werden.

[0063] Ein vorteilhaftes In-vivo-Verfahren zum Testen der Wirksamkeit eines therapeutischen Mittels bei Multipler Sklerose umfasst die folgenden Schritte:

die Prozente X und Y werden bestimmt, wie vorstehend beschrieben. X und Y werden nach Verabreichen eines zu untersuchenden Mittels und/oder einer zu untersuchenden Zusammensetzung an einem von MS betroffenen Patienten bestimmt, man bestimmt ebenso X' und Y'; diese werden wie X bzw. Y bestimmt, jedoch nach Verabreichen der gleichen Verbindung an ein gesundes Individuum, die Prozente x und y mit $x = X/X'$ und $y = Y/Y'$ werden berechnet. Diese Prozentangaben spiegeln die Verringerung der Anzahl an mononukleären Blutzellen mit der V β -Determinante aufgrund der Verabreichung der zu testenden therapeutischen Verbindung bei einem von Multipler Sklerose betroffenen Patienten in Bezug auf ein gesundes Individuum wider.

[0064] Wenn $|x|$ und/oder $|y|$ und/oder $|x| + |y|$ sich signifikant von 0 unterscheiden, kann dies bedeuten, dass das Mittel und/oder die Zusammensetzung, die getestet wurden, eine therapeutische Wirkung gegen die MS-Pathologie besitzt; wenn $|x|$ und/oder $|y|$ und/oder $|x| + |y|$ gleich oder fast 0 sind, kann dies bedeuten, dass das Mittel und/oder die Zusammensetzung, die getestet wurden, keine oder eine sehr kleine therapeutische Wirkung gegen die MS-Pathologie besitzt.

[0065] Unter Zusammensetzung zur therapeutischen und/oder prophylaktischen Verwendung wird eine Zusammensetzung verstanden, die u.a. ein Therapeutikum, das in der Lage ist, eine Superantigen-Aktivität in einer biologischen Probe, direkt oder indirekt zu hemmen, wie vorstehend definiert, gegebenenfalls in Verbindung mit einem Vehikel und/oder einem Excipienten und/oder einem Adjuvans und/oder einem Verdünnungsmittel, die pharmazeutisch verträglich sind, d.h. die die Verabreichung an ein Tier oder an einen Menschen gestatten, umfasst. Alle diese Angaben sind Teil des allgemeinen Wissens eines Fachmanns (siehe beispielsweise Remington's Pharmaceutical Sciences 16. Aufl. 1980, Mack Publishing Co). Das pharmazeutisch verträgliche Vehikel ist vorzugsweise isotonisch, hypotonisch oder zeigt eine schwache Hypertonie und eine relativ kleine Ionenstärke, wie beispielsweise eine Saccharoselösung. Außerdem kann diese Zusammensetzung Lösungsmittel, wässrige oder teilweise wässrige Vehikel, wie steriles, von Pyrogenen freies Wasser, und beispielsweise Dispersionsmedien enthalten. Der pH dieser pharmazeutischen Zusammensetzungen wird gemäß herkömmlichen Techniken geeignet eingestellt und gepuffert.

[0066] Unter therapeutischer Wirksamkeit wird der klinische und biologische Nutzen, der nach Verabreichung eines Therapeutikums erhalten wird, im Hinblick auf eine Verbesserung oder sogar Heilung der Erkrankung verstanden. Dieser Nutzen zeigt sich u.a. durch eine Verringerung der klinischen, biologischen Zeichen und der pathologischen Wirkungen der Erkrankung nach einer klinischen Analyse durch den Arzt und/oder biologischen Analysen, wie Magnetresonanztomographie, Analyse oligoklonaler Banden in Zerebrospinalflüssigkeit, Potenzialanalyse usw. Diese Verringerung der klinischen Zeichen und der pathologischen Wirkungen soll einen Vorteil für den Patienten nach sich ziehen (Schwartz und Lazar, 1995, Elements de statistique médicale et biologique, Hrsg.

[0067] Flammarion; Lazar und Schwartz, 1995, Elements de statistique médicale et biologique, Hrsg. Flammarion). Die untersuchte Erkrankung ist vorzugsweise Multiple Sklerose. Diese Therapeutika können (i) die Superantigen-Aktivität, wie in der vorliegenden Erfindung beschrieben, qualitativ und/oder quantitativ beeinflussen, und/oder (ii) die Expression der in der vorliegenden Erfindung genannten V β -Determinanten modulieren und/oder hemmen. Verschiedene Therapeutika werden gemäß herkömmlichen Ansätzen, die in der Literatur oft beschrieben sind, hergestellt. Die verschiedenen Gruppen von Therapeutika, die bei der vorliegenden Erfindung in Betracht gezogen werden können, sind nachstehend beschrieben.

[0068] Wie vorstehend definiert, kann das Therapeutikum direkt oder indirekt eine Superantigen-Aktivität, wie in der vorliegenden Erfindung definiert, für ein oder mehrere bestimmte V β und/oder für ein oder mehrere MSRV-Retroviren hemmen oder verringern. Das Therapeutikum besteht aus chemischem oder biologischem Material oder aus einer Zusammensetzung, die eine therapeutische Wirkung zeigt, die gemäß den zuvor beschriebenen Verfahren nachgewiesen werden kann.

[0069] Zur vereinfachten Darstellung wird allgemein von Molekülen von Interesse für die Erfindung gesprochen, sowohl um das oder die mit der Superantigen-Aktivität in Zusammenhang stehende(n) V β als auch die MSRV-1-Proteine, insbesondere das MSRV-1-env-Protein, zu bezeichnen.

[0070] Unter Therapeutikum wird Folgendes verstanden:

- mindestens ein natürliches und/oder rekombinantes Molekül oder ihre Fragmente, deren Sequenz der gesamten oder einem Teil der Sequenz der Moleküle von Interesse entspricht, d.h.:
- mindestens ein natürliches und/oder rekombinantes Protein und/oder ein synthetisches Polypeptid, ausgewählt aus den Molekülen von Interesse für die Erfindung,
- mindestens ein natürliches und/oder synthetisches Fragment dieser Moleküle von Interesse, zum Beispiel ein immunes Fragment, das eine Immunantwort gegen ein Polypeptid induzieren kann, das von mindestens einem der Moleküle von Interesse für die Erfindung stammt,
- mindestens ein Mimotop-Peptid, das anhand der Sequenzen der Moleküle von Interesse definiert ist, oder eine Kombination von Mimotopen, die eine Immunantwort gegen ein Polypeptid induzieren kann, das von mindestens einem der Moleküle von Interesse für die Erfindung stammt,
- mindestens ein Protein oder ein Peptid, das in vivo die Transkription und/oder Translation der Moleküle von Interesse für die Erfindung und der Peptidsequenzen oder der Fragmente dieser Sequenzen steuern kann.

[0071] Die gegen ein spezifisches Antigen gerichtete Immunantwort kann in zwei verschiedene Kategorien eingeteilt werden, wobei bei einer Antikörper (Immunantwort des humoralen Typs) und bei der anderen zytotoxische Effektorzellen, wie beispielsweise Makrophagen, zytotoxische Lymphozyten (CTL) oder Killerzellen (NK) sowie T-"Helfer"-Lymphozyten, insbesondere CD4+-T-Lymphozyten, beteiligt sind (Immunantwort des zellulären Typs). Die zwei Typen der Antwort unterscheiden sich insbesondere dadurch, dass die Antikörper

Antigene in ihrer dreidimensionalen Form erkennen, während T-Lymphozyten beispielsweise Peptidanteile dieser Antigene in Verbindung mit Glykoproteinen erkennen, die von Genen des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC), insbesondere von Genen des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC) vom Typ I, codiert werden und ubiquitär auf der Oberfläche von Zellen exprimiert werden, oder von Genen des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC) vom Typ II codiert werden und spezifisch auf der Oberfläche von Zellen exprimiert werden, die an der Präsentation von Antigenen beteiligt sind (APC). 1) Unter einem ersten Aspekt ist die Immunantwort des zellulären Typs dadurch gekennzeichnet, dass die T-Zellen den CD4+-Typs (T-"Helfer"-Zellen) nach einem gut bekannten Aktivierungsphänomen (siehe eine Übersicht von Alberola-lia 1997, Annu Rev Immunol 15, 125–154) Cytokine produzieren, die ihrerseits die Proliferation von APC-Zellen, die diese Cytokine produzieren können, die zelluläre Differenzierung der B-Lymphozyten, die für das Antigen spezifische Antikörper produzieren können, und die Stimulation zytotoxischer T-Lymphozyten (CTL) induzieren. 2) Unter einem zweiten Aspekt der zellulären Immunantwort werden zytotoxische Effektorzellen, wie beispielsweise Lymphozyten des CD8+-Typs (CTL), a) nach Wechselwirkung mit den antigenen Peptiden, die an die Glykoproteine gebunden sind, die von den ubiquitären Zellen exprimiert und von den Genen des MHC-I-Systems codiert werden, und von diesen präsentiert werden, und b) gegebenenfalls durch die von den CD4+-Zellen produzierten Cytokine aktiviert.

[0072] Ausgehend von der Aminosäuresequenz der Moleküle von Interesse für die Erfindung können Peptidsequenzen dieser Moleküle oder Fragmente von Peptidsequenzen dieser Moleküle, die der ganzen oder einem Teil der Primärsequenz dieser Moleküle entsprechen, durch herkömmliche Peptidsyntheseverfahren synthetisiert oder mittels genetischer Rekombination erhalten werden.

[0073] Rekombinante Proteine, die den Molekülen von Interesse für die Erfindung entsprechen, die in einem prokaryotischen oder eukaryotischen Zellsystem produziert werden, können vom Fachmann ausgehend von der Kenntnis der Sequenzen von entsprechenden Genen, die in der Literatur beschrieben sind, und unter Berücksichtigung der Degeneration des genetischen Codes hergestellt werden. Alle in der vorliegenden Erfindung identifizierten Proteinsequenzen können somit durch genetische Rekombination erhalten werden. Die Gene werden in passende Vektoren kloniert. Verschiedene Vektoren werden zur Transformation prokaryotischer Zellen (beispielsweise E. coli) und eukaryotischer Zellen (zum Beispiel COS-Zellen, CHO-Zellen und Simliki-Zellen) verwendet. Die rekombinanten Proteine, die den Molekülen von Interesse für die Erfindung oder Fragmenten dieser Proteine entsprechen, können somit in prokaryotischen und/oder eukaryotischen Zellsystemen hergestellt werden. In E.-coli-Zellen werden die rekombinanten Proteine mit einem Polyhistidin-Schwanz hergestellt. Die unlösliche Proteinfraction wird in 8 M Harnstoff solubilisiert. Die Anreicherung des Produkts erfolgt an einem Nickelchelatharz (Qiagen). Die Säule wird mit abnehmenden Konzentrationen an Harnstoff gewaschen. Die Elution erfolgt mit Imidazol in Abwesenheit von Harnstoff. Die vollständige Sequenz des Moleküls von Interesse bei der Erfindung kann auch in ein geeignetes Plasmid kloniert und dann in das Vaccinia-Virus transfiziert werden, um ein rekombinantes Virus zu erhalten;

- mindestens ein für mindestens eines der Moleküle von Interesse für die Erfindung oder ihre Fragmente spezifischer Ligand, der an die Moleküle von Interesse oder an Rezeptoren dieser Moleküle von Interesse binden oder auch die Bindung des Moleküls von Interesse an die antigenpräsentierende Zelle stören und die Superantigen-Aktivität hemmen kann, d.h.:
- mindestens ein polyklonaler oder monoklonaler Antikörper oder ein Fragment davon, der/das für mindestens eines dieser Moleküle von Interesse für die Erfindung oder ihre Fragmente spezifisch ist. Dieser Antikörper kann neutralisierend sein oder nicht, d.h. die Aktivität des Proteins von Interesse hemmen können oder nicht. Der Ligand kann aus jedem Molekül oder Fragment eines Moleküls ausgewählt sein, das an die Moleküle von Interesse binden kann, beispielsweise Rezeptoren, Cofaktoren dieser Moleküle, polyklonale oder monoklonale Antikörper, die an die Moleküle von Interesse oder jedes beliebige Fragment binden können.

[0074] Diese Antikörper sind insbesondere sehr nützlich, um die Verwendung therapeutischer Zusammensetzungen zu ermöglichen, weil sie beispielsweise zu Immunreaktionen führen, die spezifisch gegen immundominante Epitope oder gegen Antigene gerichtet sind, die eine große Variabilität zeigen. Man verabreicht dem Patienten entweder lösliche neutralisierende Antikörper, um ihre Funktion zu hemmen, oder lösliche Antikörper, die für die Beseitigung des Peptids durch Bildung von Immunkomplexen spezifisch sind. Die Erfindung beschreibt die Verwendung von Antikörpern, die mindestens ein in der vorliegenden Erfindung beschriebenes Molekül von Interesse zur Behandlung und/oder zur therapeutischen Überwachung der Erkrankung, vorzugsweise Multipler Sklerose, spezifisch erkennen. Diese Antikörper sind polyklonal und vorzugsweise monoklonal. Vorzugsweise hemmen diese Antikörper die Funktion des Proteins, indem sie daran binden. Die Fähigkeit des Antikörpers, spezifisch an das Protein zu binden, wird durch Analyse mit beschriebenen herkömmlichen Techniken analysiert, wie zum Beispiel durch ELISA-Tests oder Western-Blots unter Verwendung des natürlichen

oder synthetischen immunogenen Moleküls oder Peptids. Dann wird der Antikörpertiter bestimmt. Die Fähigkeit des Antikörpers, die Funktion des Proteins zu neutralisieren, kann mit verschiedenen Mitteln analysiert werden, beispielsweise durch Bestimmung der Verringerung der Aktivität des Moleküls oder des immunogenen Peptids in Gegenwart des Antikörpers.

[0075] Zum Beispiel werden monoklonale Antikörper, die gegen ein erfindungsgemäßes Molekül von Interesse oder einen Teil dieses Moleküls gerichtet sind, durch herkömmliche Techniken hergestellt, die zur Herstellung von Antikörpern gegen Oberflächenantigene verwendet werden. Mäuse oder Kaninchen werden (i) entweder mit dem natürlichen oder rekombinanten Protein von Interesse oder (ii) mit jedem immunogenen Peptid dieses Proteins von Interesse oder (iii) mit Mäuszellen, die das Protein oder Peptid von Interesse und MHC-II-Zellen exprimieren, immunisiert. Die Balb/c-Mauslinie wird am häufigsten verwendet. Das Immunogen kann auch ein Peptid sein, das aus Peptiden ausgewählt ist, die anhand der Primärsequenzen der Moleküle von Interesse definiert werden. Die Proteine oder Peptide werden an Keyhole-Limpet-Hämocyanin, abgekürzt Peptid-KLH, als Träger für ihre Verwendung bei der Immunisierung oder an humanes Serumalbumin, abgekürzt Peptid-HSA, gekuppelt. Die Tiere werden einer Injektion mit Peptid-KLH oder Peptid-HSA unter Verwendung von komplettem Freundschens Adjuvans (IFA) unterzogen. Die Seren und Überstände der Hybridomkultur, die von den mit jedem Peptid immunisierten Tieren stammen, werden auf das Vorliegen von Anti-Molekül-Antikörpern mit einem ELISA-Test unter Verwendung der Ursprungsmoleküle analysiert. Die Milzzellen dieser Mäuse werden gewonnen und mit Myelomzellen fusioniert. Polyethylenglycol (PEG) ist das am häufigsten verwendeten Fusionsmittel. Die Hybridome, die die spezifischsten und sensitivsten Antikörper produzieren, werden selektiert. Die monoklonalen Antikörper können in vitro durch Zellkultur der produzierten Hybridome oder durch Gewinnung von muriner Ascitesflüssigkeit nach intraperitonealer Injektion der Hybridome in Mäuse erzeugt werden. Sowohl bei der Art der Produktion im Überstand als auch in Ascites müssen die monoklonalen Antikörper anschließend unbedingt gereinigt werden. Die verwendeten Reinigungsverfahren sind im Wesentlichen Filtration über Ionenaustauschergel oder durch Ausschlusschromatographie oder sogar Immunpräzipitation. Für jeden Antikörper muss das Verfahren gewählt werden, das es gestattet, die beste Ausbeute zu erhalten. Eine ausreichende Zahl an Anti-Protein-Antikörpern wird in funktionellen Tests gescreent, um die leistungsfähigsten Antikörper zur Bindung der Moleküls von Interesse und/oder zur Blockierung der Aktivität des Moleküls von Interesse zu identifizieren. Die selektierten monoklonalen Antikörper werden durch Standard-"CDR-Pfropfungs"-Verfahren (von vielen Firmen als Dienstleistung durchgeführtes Protokoll) humanisiert. Diese humanisierten Antikörper können im Patienten klinisch getestet werden. Die Wirksamkeit dieser Antikörper kann anhand klinischer Parameter verfolgt werden.

[0076] Die In-vitro-Produktion von Antikörpern, Antikörperfragmenten oder Antikörperderivaten, wie humanisierten oder nicht-humanisierten chimären Antikörpern, die mittels Gentechnik in Eukaryotenzellen produziert werden, ist beschrieben worden (EP 120 694 oder EP 125 023) und auch auf die vorliegende Erfindung anwendbar,

- mindestens ein Molekül, das die Funktion mindestens eines Moleküls hemmt, das aus den erfindungsgemäßen Molekülen von Interesse oder ihren Fragmenten ausgewählt ist,
- mindestens ein Molekül, das die Expression mindestens eines Moleküls reguliert, das aus den erfindungsgemäßen Molekülen von Interesse oder ihren Fragmenten ausgewählt ist, beispielsweise um die Transkription oder Translation dieser Moleküle zu blockieren,
- mindestens ein Molekül, das den Stoffwechsel mindestens eines Proteins reguliert, das aus den erfindungsgemäßen Molekülen von Interesse oder ihren Fragmenten ausgewählt ist,
- mindestens ein Molekül, das die Expression und/oder den Stoffwechsel von einem Liganden mindestens eines Proteins reguliert, das aus den erfindungsgemäßen Molekülen von Interesse oder ihren Fragmenten ausgewählt ist, beispielsweise von einem Rezeptor oder Cofaktor;
- mindestens eine Nukleinsäuresequenz, umfassend mindestens ein Gen von therapeutischem Interesse, dessen Nukleinsäuresequenz von den DNA- und RNA-Sequenzen abgeleitet ist, die für die ganzen oder einen Teil der erfindungsgemäßen Moleküle von Interesse codieren, in Verbindung mit Elementen, die die Expression des Gens von therapeutischem Interesse in vivo in Zielzellen gewährleisten, die dazu bestimmt sind, durch die Nukleinsäuresequenz des Gens von therapeutischem Interesse genetisch modifiziert zu werden. Die Gene können mutiert oder nicht-mutiert sein. Sie können auch aus Nukleinsäuren bestehen, die derart modifiziert sind, dass sie nicht mehr in das Genom der Zielzelle integrieren können, oder aus Nukleinsäuren, die mit Substanzen, wie Spermin, stabilisiert sind. Ein derartiges Gen von therapeutischem Interesse codiert insbesondere für:
- mindestens ein Protein, ausgewählt aus den bei der vorliegenden Erfindung identifizierten Molekülen von Interesse oder ihren Fragmenten, und/oder
- mindestens einen Liganden oder einen beliebigen Teil eines Liganden, der an mindestens ein Protein oder ein Proteinfragment binden kann, das aus den bei der vorliegenden Erfindung identifizierten Molekülen von

Interesse oder ihren Fragmenten ausgewählt ist, der die Funktion des Moleküls von Interesse hemmen kann oder nicht, und/oder

- mindestens den ganzen oder einen Teil eines polyklonalen oder monoklonalen Antikörpers, der an mindestens ein Protein oder ein Proteinfragment binden kann, das aus den bei der vorliegenden Erfindung identifizierten Molekülen von Interesse oder ihren Fragmenten ausgewählt ist, der die Funktion des Moleküls von Interesse hemmen kann oder nicht. Es kann sich insbesondere um einen nativen Transmembranantikörper oder ein Fragment oder Derivat eines solchen Antikörpers handeln, vorausgesetzt dass der Antikörper, das Antikörperfragment oder -derivat an der Oberfläche der genetisch modifizierten Säugerzielzellen exprimiert wird und in der Lage ist, an ein auf der Oberfläche einer zytotoxischen Effektorzellen oder einer T-"Helfer"-Lymphozyte, die am Aktivierungsprozess einer derartigen Zellen beteiligt ist, vorhandenes Polypeptid zu binden, und/oder

- mindestens ein Molekül, das mindestens ein Protein oder dessen Fragmente hemmt, wobei das Protein aus den in der vorliegenden Erfindung identifizierten Molekülen von Interesse ausgewählt ist, und die Funktion und/oder den Stoffwechsel und/oder die Bindung der Moleküle von Interesse oder ihrer Fragmente hemmen kann.

[0077] Ferner kann die Nukleinsäure mindestens zwei identische oder unterschiedliche Sequenzen, die eine Transkriptionspromotoraktivität aufweisen, und/oder mindestens zwei identische oder unterschiedliche Gene umfassen, die in Bezug zueinander ineinander übergehend, entfernt, in gleicher Richtung oder in entgegengesetzter Richtung liegen, vorausgesetzt, dass die Transkriptionspromotorfunktion oder die Transkription dieser Gene unbeeinflusst ist.

[0078] Bei diesem Typ des Nukleinsäurekonstrukts ist es ebenfalls möglich, "neutrale" Nukleinsäuresequenzen oder Introns einzubringen, die die Transkription nicht verschlechtern und nach dem Translationsschritt herausgeschnitten werden. Solche Sequenzen und ihre Verwendungen sind in der Literatur beschrieben (Bezugsstelle: PCT-Patentanmeldung WO 94/29471).

[0079] Diese Nukleinsäure kann auch Sequenzen umfassen, die für den intrazellulären Transport, für die Replikation und/oder Integration, für die Transkription und/oder Translation notwendig sind. Diese Sequenzen sind dem Fachmann bekannt.

[0080] Die erfindungsgemäß verwendbaren Nukleinsäuren können außerdem Nukleinsäuren, die derart modifiziert sind, dass sie nicht in das Genom der Zielzelle integrieren können, oder Nukleinsäuren sein, die mithilfe von Substanzen, wie beispielsweise Spermin, stabilisiert sind, die als solche keine Wirkung auf die Transfektionseffizienz haben.

[0081] Die Nukleinsäuresequenz ist vorzugsweise eine nackte DNA- oder RNA-Sequenz, d.h. frei von jeder Verbindung, die ihr Einbringen in die Zellen (Nukleinsäuresequenz-Transfer) erleichtert. Um ihr Einbringen in die Zielzellen zu begünstigen und um die erfindungsgemäßen genetisch modifizierten Zellen zu erhalten, kann diese Nukleinsäuresequenz jedoch gemäß einer zweiten Ausführungsform der Erfindung die Form eines "Vektors" und insbesondere die Form eines viralen Vektors, wie beispielsweise eines adenoviralen, retroviralen Vektors, eines von einem Pockenvirus stammenden Vektors, insbesondere eines Derivats des Vaccinia-Virus oder des Modifizierten Ankara-Virus (MVA), oder eines nicht-viralen Vektors haben, beispielsweise eines Vektors, der aus mindestens einer genannten Nukleinsäuresequenz besteht, die mit mindestens einem Trägermolekül oder mindestens einer Trägersubstanz komplexiert oder daran gebunden ist, das/die aus der Gruppe ausgewählt ist, bestehend aus einem kationischen Amphiphil, insbesondere einem kationischen Lipid, einem kationischen oder neutralen Polymer, einer polaren protischen Verbindung, die insbesondere aus Propylenglycol, Polyethylenglycol, Glycerin, Ethanol, 1-Methyl-L-2-pyrrolidon oder ihren Derivaten ausgewählt ist, und einer polaren aprotischen Verbindung, die insbesondere aus Dimethylsulfoxid (DMSO), Diethylsulfoxid, Di-n-propylsulfoxid, Dimethylsulfon, Sulfolan, Dimethylformamid, Dimethylacetamid, Tetramethylharnstoff, Acetonitril oder Derivaten davon ausgewählt ist. Die Literatur liefert eine große Zahl an Beispielen für solche viralen und nicht-viralen Vektoren.

[0082] Solche Vektoren können außerdem und vorzugsweise Zielsteuerungselemente umfassen, die es gestatten können, den Transfer der Nukleinsäuresequenz zu bestimmten Zelltypen oder bestimmten, besonderen Geweben, wie T-Helfer-Zellen, zytotoxischen T-Zellen und antigenpräsentierenden Zellen, zu steuern. Sie können es ferner auch gestatten, den Transfer eines Wirkstoffs zu verschiedenen bevorzugten intrazellulären Kompartimenten, wie zum Beispiel Kern, Mitochondrien oder Peroxisomen, zu steuern. Es kann sich außerdem um Elemente handeln, die das Eindringen in das Innere der Zelle oder die Lyse intrazellulärer Kompartimente erleichtern. Solche Zielsteuerungselemente sind in der Literatur häufig beschrieben. Es kann sich bei-

spielsweise um ganze oder einen Teil von Lektinen, Peptiden, insbesondere des JTS-1-Peptids (siehe PCT-Patentanmeldung WO 94/40958), Oligonukleotiden, Lipiden, Hormonen, Vitaminen, Antigenen, Antikörpern, für membranständige Rezeptoren spezifischen Liganden, Liganden, die mit einem Antiligand reagieren können, fusogenen Peptiden, Kernlokalisierungspeptiden oder eine Zusammensetzung solcher Verbindung handeln, oder auch

- mindestens eine Nukleinsäuresequenz, die mit einer Nukleinsäuresequenz hybridisieren kann, die die erfindungsgemäßen Moleküle von Interesse oder ihre Fragmente codiert. Die Fragmente entsprechen insbesondere Antisense- oder Ribozym-Molekülen und können mithilfe automatischer Synthesegeräte, wie den von der Firma Applied Biosystems vertriebenen, synthetisiert werden. Die Antisense-Oligonukleotide können spezifisch die Synthese eines Zielproteins von Interesse durch Hemmung der Bildung und/oder der Funktionsfähigkeit des Polysoms je nach der Position der mRNA in dem Ziel behindern. Daher zielt die häufige Auswahl der Sequenz um das Translationsinitiationscodon als Ziel für eine Hemmung durch ein Antisense-Oligonukleotid darauf ab, die Bildung des Initiationskomplexes zu verhindern. Andere Mechanismen der Hemmung durch Antisense-Oligonukleotide beinhalten eine Aktivierung der Ribonuklease H, die Antisense-Oligonukleotid/mRNA-Hybride spaltet, oder eine Störung auf Ebene der Spleißstellen durch Antisense-Oligonukleotide, deren Ziel eine mRNA-Spleißstelle ist. Die Antisense-Oligonukleotide sind auch komplementär zu DNA-Sequenzen und können daher auf Ebene der Transkription eingreifen, indem sie eine Tripelhelix bilden, wobei das Antisense-Oligonukleotid über als "Hoogsteen"-Bindungen bezeichnete Wasserstoffbindungen an die große Furche der DNA-Doppelhelix bindet. In diesem besonderen Fall spricht man, genauer gesagt, von Anti-Gen-Oligonukleotiden. Es ist selbstverständlich, dass die Antisense-Oligonukleotide mit der Ziel-DNA oder -RNA, an die sie hybridisieren sollen, streng komplementär, aber auch unter der Bedingung, dass sie mit dem Ziel hybridisieren, nicht streng komplementär sein können. Ebenso kann es sich um Antisense-Oligonukleotide handeln, die nicht-modifiziert oder in Höhe der Internukleotidbindungen modifiziert sind. Diese sämtlichen Kenntnisse sind Teil des allgemeinen Wissens des Fachmanns. Selbstverständlich können solche Antisense-Moleküle als solche Vektoren darstellen. Man kann auch Vektoren verwenden, die eine für ein Antisense codierende Nukleinsäuresequenz umfassen. Diese Nukleinsäuremoleküle können unter stringenten Bedingungen an die DNA und/oder RNA hybridisieren, die die erfindungsgemäßen Proteine oder ihr(e) Fragment(e) codieren. Charakteristische Stringenzbedingungen sind solche, die einer Kombination aus Temperatur und Salzkonzentration entsprechen, die ungefähr zwischen 12 bis 20°C unter der T_m ("Schmelztemperatur") des untersuchten Hybrids ausgewählt wird. Diese Moleküle werden synthetisiert und können unter Verwendung herkömmlicher, für Molekularsonden verwendeter Markierungsverfahren markiert werden oder können als Primer in Amplifizierungsreaktionen verwendet werden. Sequenzen, die mindestens 90% Homologie in Bezug auf eine Referenzsequenz zeigen, sind ebenfalls Teil der Erfindung, ebenso wie die Fragmente dieser Sequenzen, die mindestens 20 und vorzugsweise 30 aufeinander folgende, zu einer Referenzsequenz homologe Nukleotide aufweisen.

[0083] Die DNA- oder RNA-Moleküle oder -Nukleinsäuresequenzen bestehen aus einem doppelsträngigen oder einzelsträngigen, geraden oder ringförmigen, natürlichen und isolierten oder synthetischen DNA- und/oder RNA-Fragment, das einer modifizierten oder nicht-modifizierten genauen Nukleotidabfolge entspricht, die es gestattet, ein Fragment oder eine Region einer Nukleinsäure zu definieren, die aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus einer cDNA, einer genomischen DNA, einer Plasmid-DNA und einer Boten-RNA besteht. Die Nukleinsäuresequenzen sind von der Aminosäuresequenz der erfindungsgemäßen Moleküle von Interesse oder ihrer Fragmente unter Verwendung des genetischen Codes abgeleitet. Aufgrund der Degeneration des genetischen Codes umfasst die Erfindung auch äquivalente oder homologe Sequenzen. Diese definierten Sequenzen gestatten es dem Fachmann, geeignete Moleküle selbst zu definieren. Er kann somit auch Nukleinsäuremoleküle definieren und verwenden, die komplementär zu DNA- und/oder RNA-Sequenzen sind, die die erfindungsgemäßen Moleküle von Interesse oder ihr(e) Fragment(e) codieren.

[0084] Diese Nukleinsäuresequenzen und/oder Vektoren gestatten es, die Zellen, in denen das Protein oder Proteinfragment exprimiert wird, entweder durch Verwendung eines in den Vektor eingebrachten Zielsteuerungsmoleküls oder durch Verwendung einer besonderen Eigenschaft der Zellen anzusteuern;

- mindestens eine Säugerzelle, die nicht natürlicherweise mindestens ein erfindungsgemäßes Molekül von Interesse oder ein beliebiges Fragment dieser Moleküle oder für mindestens eines dieser erfindungsgemäßen Moleküle von Interesse oder seine Fragmente spezifische Antikörper produziert, wobei die Säugerzelle in vitro durch mindestens eine Nukleinsäuresequenz oder ein Fragment einer Nukleinsäuresequenz oder eine Verbindung von Nukleinsäuresequenzen, die Nukleinsäurefragmenten entsprechen, die vom gleichen Gen oder verschiedenen Genen stammen, genetisch modifiziert wird, wobei die Sequenz(en) von DNA- und RNA-Sequenzen abgeleitet ist/sind, die die erfindungsgemäßen Moleküle von Interesse oder ein beliebiges Fragment codieren, wobei das Gen von therapeutischem Interesse das gesamte oder einen Teil

des erfindungsgemäßen Moleküls von Interesse, eines Fragments des Moleküls oder eines für das Molekül spezifischen Antikörpers, der auf der Oberfläche der Säugerzelle exprimiert wird (Toes et al., 1997, PNAS 94: 14660–14665), codiert. So enthält diese Zelle mindestens ein Gen, das in vivo Folgendes codiert:

- mindestens ein Protein, das aus den erfindungsgemäßen Molekülen von Interesse und/oder deren Fragmenten ausgewählt ist, und/oder
- mindestens ein Peptid, das anhand der Primärsequenz mindestens eines Proteins definiert ist, das aus den erfindungsgemäßen Molekülen von Interesse und/oder deren Fragmenten ausgewählt ist, und/oder
- mindestens ein beliebiges Molekül, das die Aktivität und/oder die Bindung und/oder die Expression dieser Moleküle hemmt, und/oder
- mindestens ein Peptid, das aus der Primärsequenz mindestens eines Proteins stammt, das aus den erfindungsgemäßen Molekülen von Interesse und/oder deren Fragmenten ausgewählt ist, und das an mindestens ein MHC-I- und/oder MHC-II-Glykoprotein binden kann, und/oder
- mindestens einen Liganden und/oder einen beliebigen Antikörper und/oder einen beliebigen Teil eines Antikörpers, der an mindestens ein Protein binden kann, das aus den erfindungsgemäßen Molekülen von Interesse und/oder den Fragmenten ausgewählt ist.

[0085] Insbesondere stammt diese Zielzelle entweder von dem zu behandelnden Säuger oder von einem anderen Säuger als dem zu behandelnden. Im letzteren Fall sollte beachtet werden, dass die Zielzelle einer Behandlung unterzogen wurde, die sie mit dem zu behandelnden Säuger kompatibel macht. Unter einem bevorzugten Aspekt soll als "Säuger" ein menschlicher Säuger bezeichnet werden. Diese Zellen sind als Zelllinien etabliert und sind vorzugsweise induzierbare MHCII+ oder MHCII–, wie Lymphozyten, Monozyten, Astrozyten, Oligodendrozyten.

[0086] Die Erfindung betrifft auch die modifizierten Zellen und ein Verfahren zur Herstellung einer Zelle, wie vorstehend beschrieben, dadurch gekennzeichnet, dass in eine Säugerzelle durch jedes geeignete Mittel mindestens eine Nukleinsäuresequenz eingebracht wird, die mindestens ein Gen von therapeutischem Interesse und Elemente, die die Expression des Gens in der Zelle gewährleisten, enthält, wobei das Gen von therapeutischem Interesse eine Nukleinsäuresequenz enthält, die ein Molekül oder ein Molekülfragment in vivo codiert, wie kurz zuvor beschrieben. Genauer gesagt, betrifft sie prokaryotische Zellen, Hefezellen und Tierzellen, insbesondere Säugerzellen, die mit mindestens einer Nukleotidsequenz und/oder einem Vektor, wie vorstehend beschrieben, transformiert sind.

[0087] Gemäß einer besonderen Ausführungsform werden die Zellen (dendritische Zellen, Makrophagen, Astrozyten, CD4+-T-Lymphozyten, CD8+-T-Lymphozyten) des Patienten oder allogene Zellen mit einer gereinigten Zubereitung des Zielpolypeptids in Kontakt gebracht, wobei dieses internalisiert, prozessiert und auf der Zelloberfläche in Verbindung mit MHC-I- und/oder MHC-II-Molekülen präsentiert wird. Sie können u.a. eine spezifische Immunantwort gegen das Peptid induzieren. Die "aktivierten" Zellen werden dann dem Patienten verabreicht, in dem sie u.a. eine für die Antigene spezifische Immunantwort induzieren können (man verwendet den natürlichen Weg der Immunantwort, aber man kontrolliert, was die antigenpräsentierende Zelle präsentiert).

[0088] Gemäß einer besonderen Ausführungsform werden die antigenpräsentierenden Zellen (dendritische Zelle, Makrophage, Astrozyten usw.) in vitro dahingehend modifiziert, dass sie die Antigene in der transformierten Zellen exprimieren, die von der Zelle sezerniert werden können und/oder an MHC-I- und/oder MHC-II-Moleküle binden und auf der Oberfläche der Zellen präsentiert werden können, so dass sie in dem Patienten, an den man die modifizierte Zelle verabreicht, eine genau zielgerichtete Immunreaktion auslösen.

[0089] Nicht alle Impfansätze sind immer zufrieden stellend und führen zum Beispiel zu beschränkten Immunreaktionen, die nur gegen immundominante Epitope oder gegen Antigene mit großer Variabilität gerichtet sind. Ebenso gestattet eine falsche Präsentation der Antigene durch die Glykoproteine des MHC-Systems auf der Oberfläche der Zellen keine Entwicklung einer zufrieden stellenden Immunität gegen das Protein von Interesse in dem behandelten Patienten. Um diese Probleme zu lösen, haben bestimmte Autoren vorgeschlagen, im Rahmen dieser Impfvorgänge die minimalen antigenen Fragmente zu selektieren, die den Peptidanteilen entsprechen, die von den zytotoxischen T-Lymphozyten spezifisch erkannt werden können, diese in den Zellen zu exprimieren, damit sie sich mit MHC-I-Molekülen verbinden und auf der Oberfläche der Zellen präsentiert werden, um in dem behandelten Patienten eine genau zielgerichtete Immunreaktion auszulösen (Toes et al., 1997, PNAS 94: 14660–14665). Genauer gesagt, wurde gezeigt, dass sehr kleine Epitope (von 7 bis etwa 13 Aminosäuren), die von den in ein Vaccinia-Virus eingebrachten Minigenen exprimiert werden, eine zelluläre Immunisierung auslösen können. Außerdem wurde gezeigt, dass mehrere Minigene gemeinsam von dem gleichen Vektor exprimiert werden können (dieses besondere Konstrukt wird als "Perlenkette" bezeichnet). Dieses

Konstrukt hat den Vorteil, dass eine synergistische Immunreaktion des CTL-Typs induziert wird (Whitton et al., 1993 J. of Virology 67: 348–352).

Protokoll für das In-Kontakt-bringen der Zellen mit dem antigenen Fragment:

[0090] Die Präsentation antigener Fragmente durch MHCI- und/oder MHCII-Moleküle basiert auf einem identifizierten intrazellulären Vorgang (siehe eine Übersicht in Groettrup et al., 1996 Immunology Today 17: 429–435), bei dem sehr kurze antigene Peptide (etwa 7–13 Aminosäuren) durch Abbau eines komplexeren Polypeptids erzeugt werden, gegen das sich die endgültige Immunreaktion richtet. Diese kurzen Peptide werden anschließend an MHCI- oder MHCII-Moleküle gebunden, wodurch ein Proteinkomplex gebildet wird, der zur Zelloberfläche transportiert wird, um diese Peptide den zirkulierenden cytotoxischen T-Lymphozyten bzw. den zirkulierenden T-Helfer-Lymphozyten zu präsentieren. Ferner soll darauf hingewiesen werden, dass die Spezifität der MHCI- oder MHCII-Moleküle für die antigenen Peptide in Abhängigkeit von den betreffenden MHCI- oder MHCII-Molekülen (Beispiel für MHCI: HLA-A, HLA-B usw.) und dem betreffenden Allel (Beispiel für MHCI: HLA-A2, HLA-A3, HLA-A11) variiert. Innerhalb der gleichen Tierspezies besteht von einem Individuum zum nächsten eine große Variabilität der Gene, die die Moleküle des MHC-Systems codieren (siehe zu diesem Thema insbesondere George et al., 1995, Immunology Today 16: 209–212).

[0091] Gemäß einer bestimmten Ausführungsform werden die Zellen, wie dendritische Zellen, Makrophagen, Astrozyten, CD4+-T-Lymphozyten, CD8+-T-Lymphozyten, derart modifiziert, dass sie auf ihrer Oberfläche für das Zielpeptid spezifische Antikörper exprimieren. Das Peptid wird durch die auf der Oberfläche der Zellen exprimierten Antikörper neutralisiert. Diese Zellen sind vorzugsweise Immunzellen, vorzugsweise von dem Patienten, vorzugsweise zytotoxische Zellen, die so modifiziert sind, dass sie den gesamten oder einen Teil eines für das Zielprotein spezifischen Antikörpers exprimieren.

Isolation mononukleärer Zellen aus peripherem Blut:

[0092] 1968 beschrieb Boyum eine Schnelltechnik, mit der mittels Zentrifugation von Blut auf einem Dichtegradienten die mononukleären Zellen (Lymphozyten und Monozyten) mit guter Ausbeute (50% theoretische Ausbeute, d.h. 10^6 Zellen/ml Blut) abgetrennt werden können. 50 ml peripheres Blut werden steril in heparinisierte Röhrchen entnommen und 20 Minuten bei 150 g und 20°C zentrifugiert. Die gewonnenen Zellen werden in zwei Volumina des ursprünglichen peripheren Bluts an sterilem PBS verdünnt. 10 ml dieser Suspension werden auf 3 ml einer Ficoll-Hypaque-Lösung (Lymphozyten-Trennmedium, Flow) aufgegeben. Nach Zentrifugation für 20 Minuten bei 400 g und 20°C ohne Abbremsen sedimentieren die mononukleären Zellen an der PBS-Ficoll-Grenze in einer dichten opaleszenten Schicht, während praktisch die Gesamtheit der roten Blutzellen und der polynukleären Zellen am Boden des Röhrchens sedimentieren. Die mononukleären Zellen werden gewonnen und in sterilem PBS gewaschen.

Internalisierung der Antigene durch antigenpräsentierende Zellen:

[0093] Vorbehandlung der antigenpräsentierenden Zellen: Die antigenpräsentierenden Zellen werden zuvor mit einem PBS/0,5%-BSA(w/v)-Puffer gewaschen, dann nummeriert und anschließend in Gegenwart verschiedener Reduktionsinhibitoren dreifach in PBS/0,5% BSA in einer Endkonzentration von 10 µM bis 10 mM von DTNB (5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure) oder NEM (N-Ethylmaleinimid) vorinkubiert. Die anschließenden Schritte der Antigenbindung an die Zelloberfläche oder der Internalisierung von Antigenen erfolgen ebenfalls in Gegenwart der verschiedenen Inhibitorkonzentrationen.

Protokoll für die Antigeninternalisierung durch die antigenpräsentierenden Zellen:

[0094] $8 \cdot 10^6$ Zellen werden in Mikrotitervertiefungen in Gegenwart einer Sättigungsmenge an Proteinen, die mit Iod 125 (1 µg) radioaktiv markiert sind, in 70 µl inkubiert. Nach einstündiger Inkubation bei 4°C unter Schütteln werden die Antigene an die Oberfläche der Zellen gebunden. Die Zellsuspension wird zweimal in PBS/BSA gewaschen, und die Zellsedimente werden in 70 µl Puffer aufgenommen und bei 37°C für unterschiedliche Zeiträume bis zu 2 Stunden inkubiert. Zellen und Überstände werden durch Zentrifugation bei 800 g für 5 Minuten, 4°C getrennt. Für die längsten Inkubationszeiträume entfällt der vorherige Schritt der Antigenverbinding an die Oberfläche der Zellen. Die Zellen werden in einem RPMI/10%-FCS-Medium in Gegenwart von 20 mM Hepes auf 10^6 Zellen/ml verdünnt. Die Zellen werden in Gegenwart eines Überschusses an Antigen für verschiedene Zeiträume bei 37°C inkubiert (1 µg Moleküle/ $5 \cdot 10^7$ Monozyten-/Makrophagenzellen oder 10^8 EBV-B-Zellen).

[0095] Ausgehend von der Kenntnis der Aminosäuresequenzen der erfindungsgemäßen Proteine von Interesse liegt es in der Fähigkeit des Fachmanns, die vorstehend beschriebenen Moleküle und/oder jedes Molekül, das in der Lage ist, diese Moleküle zu binden, und/oder jedes Molekül, das in der Lage ist, die Aktivität dieser Moleküle von Interesse zu hemmen, zu definieren und zu verwenden.

[0096] Das Therapeutikum wird vorzugsweise ausgewählt aus einem natürlichen Molekül und/oder einem rekombinanten Molekül oder einem Fragment dieser Moleküle, dessen Proteinsequenz der Sequenz der V β 16- und/oder V β 17-Moleküle, vorzugsweise des V β 16-Moleküls, entspricht, gegebenenfalls in Verbindung mit einem oder mehreren natürlichen und/oder rekombinanten Molekülen oder einem Fragment dieser Moleküle, deren/dessen Proteinsequenz den Sequenzen der V β 2-, 3-, 7-, 8-, 12-, 14-, 17- und 22-Moleküle und vorzugsweise der V β 3- und 12-Moleküle oder der V β 7-, 14- und 17-Moleküle und vorteilhafterweise der V β 7- und 17-Moleküle entspricht; aus natürlichen und/oder rekombinanten und/oder synthetischen Molekülen oder einem Fragment dieser Moleküle, die die Moleküle, wie vorstehend definiert, codieren.

[0097] Insbesondere wird das therapeutische und/oder prophylaktische Mittel ausgewählt aus DNA- und/oder RNA-Molekülen, Antisense-Oligonukleotiden und Anti-Gen-Oligonukleotiden, mindestens einem Liganden, der mit V β 16 und/oder 17, insbesondere V β 16, wechselwirken kann, gegebenenfalls in Kombination mit mindestens einem Liganden, der mit mindestens einem von V β 2, 3, 7, 8, 12, 14, 17 und 22 und vorzugsweise V β 3 und 12, wechselwirken kann, aus Antikörpern, vorzugsweise monoklonalen Antikörpern und Anti-Rezeptoren für die TCR mit den obigen verschiedenen V β , mindestens einem Liganden, der mit V β 16 und/oder 17 wechselwirken kann, gegebenenfalls in Kombination mit mindestens einem Liganden, der mit mindestens einem von V β 7, 14 und 17 und 22 und vorzugsweise V β 7 und 17, wechselwirken kann, insbesondere den Antikörpern und vorzugsweise den monoklonalen Antikörpern oder Fragmenten dieser Antikörper und den Anti-Rezeptoren für die TCR mit den obigen verschiedenen V β , einem Mittel, das die Wechselwirkung des Superantigens mit den antigenpräsentierenden Zellen blockieren kann, mindestens einer Zelle, vorzugsweise einer aus einem Säuger stammenden Zelle, die in vitro durch ein Therapeutikum genetisch modifiziert wurde, das aus mindestens einem Nukleinsäuremolekül besteht, das mindestens ein Molekül codiert, dessen Proteinsequenz der Sequenz entspricht, die die Moleküle, wie vorstehend definiert, codiert, insbesondere ein DNA- und/oder RNA-Molekül, mindestens einer Zelle, vorzugsweise einer aus einem Säuger stammenden Zelle, die in vitro mit einem Therapeutikum genetisch modifiziert wurde, das aus mindestens einem Nukleinsäuremolekül besteht, das mindestens einen Liganden, wie vorstehend definiert, codiert, insbesondere ein DNA- und/oder RNA-Molekül.

[0098] Das Therapeutikum wird vorzugsweise aus Folgenden ausgewählt:
aus einem natürlichen und/oder rekombinanten Molekül oder einem Fragment dieser Moleküle, deren Proteinsequenz der Sequenz der MSRV-1-Proteine und vorteilhafterweise der Sequenz des env-Proteins von MSRV-1 entspricht, und
aus den natürlichen und/oder rekombinanten und/oder synthetischen Molekülen oder einem Fragment dieser Moleküle, die die Moleküle, wie vorstehend definiert, codieren.

[0099] Insbesondere wird das therapeutische und/oder prophylaktische Mittel ausgewählt aus DNA- und/oder RNA-Molekülen, Antisense-Oligonukleotiden und Anti-Gen-Oligonukleotiden, mindestens einem Liganden, der mit den MSRV-1-Proteinen, insbesondere mit dem MSRV-1-env-Protein, wechselwirken kann, aus Antikörpern, vorzugsweise monoklonalen Antikörpern und Antikörpern gegen MSRV-1-Proteine, insbesondere Antikörpern gegen MSRV-1-env-Proteine, mindestens einer Zelle, vorzugsweise einer aus einem Säuger stammenden Zelle, die in vitro durch ein Therapeutikum genetisch modifiziert wurde, das aus mindestens einem DNA-Molekül besteht, das mindestens ein Molekül codiert, dessen Proteinsequenz der Sequenz entspricht, die die Moleküle, wie vorstehend definiert, codiert, insbesondere ein DNA- und/oder RNA-Molekül; mindestens einer Zelle, vorzugsweise einer aus einem Säuger stammenden Zelle, die in vitro mit einem Therapeutikum genetisch modifiziert wurde, das aus mindestens einem DNA-Molekül besteht, das mindestens einen Liganden, wie vorstehend definiert, codiert, insbesondere ein DNA- und/oder RNA-Molekül.

[0100] Somit ist das Therapeutikum vorzugsweise ein antivirales Mittel, genauer gesagt ein antivirales Mittel, insbesondere gegen menschliche Viren, vorzugsweise gegen MSRV-1, wie ein Inhibitor des Replikationszyklus und/oder der Expression eines Retrovirus, wie ein Antikörper gegen ein retrovirales Protein, insbesondere ein Anti-Envelop-Antikörper, wie Antisense-Oligonukleotide, die insbesondere die Retrovirusexpression blockieren.

[0101] Vorteilhafterweise kann der Ligand mit einem Retrovirus, insbesondere einem humanen Retrovirus, wie MSRV-1, seinen Proteinen und/oder seinen Nukleinsäuren wechselwirken. Insbesondere wird der Ligand

aus, vorzugsweise monoklonalen, Anti-MSRV-1-Antikörpern, ausgewählt.

[0102] Die Therapeutika, wie vorstehend definiert, werden zur Herstellung einer prophylaktischen und/oder therapeutischen Zusammensetzung verwendet, und die Erfindung betrifft auch diese Zusammensetzung, die mindestens eines dieser Therapeutika, gegebenenfalls in Verbindung mit einem pharmazeutisch verträglichen Vehikel und/oder Excipienten und/oder Adjuvans und/oder Verdünnungsmittel umfasst. Es kann sich u.a. um eine Impfstoffzusammensetzung auf Basis eines (von) Protein- oder Peptidmolekül(s/en) oder Nukleinsäuresequenzen, die von den Molekülen von Interesse oder ihren Fragmenten stammen, wie vorstehend beschrieben, zur Prophylaxe und/oder Therapie einer Autoimmunkrankheit, insbesondere von Multipler Sklerose, handeln. Zu diesen Molekülen können antivirale Mittel gehören. Diese verabreichten Proteine und Peptide sind dadurch gekennzeichnet, dass sie für den Organismus, in den sie verabreicht werden, nicht toxisch sein dürfen oder ihre Fähigkeit, an einen Liganden zu binden, verloren haben müssen und signifikant eine Immunantwort induzieren können, die von T-Lymphozyten und/oder gegen dieses Protein gerichteten Antikörpern vermittelt wird. Solche Proteine werden als "modifiziert" bezeichnet, aber sie behalten ihre Immunogenität bei. Solche modifizierten immunogenen Moleküle werden durch eine Reihe herkömmlicher Behandlungen erhalten, beispielsweise chemische oder Hitze-Denaturierung, Verkürzung oder Mutation mit Deletion, Insertion oder Austausch von Aminosäuren. Ein Beispiel für Verkürzung ist die Verkürzung von Aminosäuren am Carboxyterminus, die bis zu 5–30 Aminosäuren reichen kann. Die modifizierten Moleküle können durch Synthese- und/oder Rekombinationstechniken oder chemische oder physikalische Behandlungen der natürlichen Moleküle erhalten werden.

[0103] Die in der vorliegenden Erfindung identifizierten, natürlichen und/oder rekombinanten Moleküle von Interesse und die Peptidsequenzen oder die Fragmente dieser Moleküle werden zur prophylaktischen und therapeutischen Impfung gegen die Erkrankungen, vorzugsweise Multiple Sklerose, verwendet. Ein Impfstoff umfasst eine immunogen wirksame Menge des immunogenen Moleküls in Verbindung mit einem pharmazeutisch verträglichen Vehikel und gegebenenfalls einem Adjuvans und/oder einem Verdünnungsmittel. Die pharmazeutisch verträglichen Vehikel, Adjuvantien und Verdünnungsmittel sind dem Fachmann bekannt. Als Bezugsstelle kann man Remington's Pharmaceutical Sciences nennen. Die Verwendung von Impfstoffzusammensetzungen erfolgt besonders vorteilhaft in Verbindung mit einer Frühdiagnostik der Erkrankung. Das immunogene Protein wird zur Herstellung eines Medikaments zur prophylaktischen oder therapeutischen Impfung verwendet. Die Proteine von Interesse können aus dem Organismus ausgeschieden werden, ohne dass sie unerwünschte Nebenwirkungen hervorrufen. Die Identifikation solcher Impfmoleküle oder -peptide wird wie folgt durchgeführt: es wird bestätigt, dass die modifizierten Kandidatenmoleküle, wie vorstehend beschrieben, (natürliche, rekombinante Proteine, Peptide) für den Organismus nicht-toxisch sind, dann wird ihre Immunogenität bestätigt, indem (i) ein In-vitro-Proliferationstest von CD4⁺-T-Lymphozyten, die für das verabreichte Antigen spezifisch sind, (T-Zell-Assay) oder ein In-vitro-Test der Zytotoxizität von CD8⁺-Lymphozyten, die für das verabreichte Antigen spezifisch sind, durchgeführt wird und (ii) u.a. der Anteil der zirkulierenden Antikörper, die gegen das natürliche Protein gerichtet sind, gemessen wird. Diese modifizierten Formen werden zur Immunisierung von Menschen durch Standardverfahren mit geeigneten Adjuvantien verwendet.

[0104] Die hergestellten Impfstoffe sind injizierbar, d.h. in flüssiger Lösung oder in Suspension. Wahlweise kann die Zubereitung auch emulgiert sein. Das antigene Molekül kann mit Excipienten, die pharmazeutisch annehmbar und mit dem Wirkstoff kompatibel sind, gemischt werden. Beispiele für vorteilhafte Excipienten sind Wasser, eine Kochsalzlösung, Dextrose, Glycerin, Ethanol oder Äquivalente oder ihre Kombinationen. Wenn gewünscht, kann der Impfstoff kleinere Mengen an Hilfssubstanzen enthalten, wie "Benetzungsmitteln" oder Emulgatoren, Mitteln, die den pH puffern, oder Adjuvantien, wie Aluminiumhydroxid, Muramyl-dipeptid oder Varianten davon. Im Fall der Peptide erhöht ihre Kupplung an ein größeres Molekül (KLH, Tetanustoxin) manchmal ihre Immunogenität. Die Impfstoffe werden herkömmlicherweise durch beispielsweise subkutane oder intramuskuläre Injektion verabreicht. Weitere vorteilhafte Formulierung mit anderen Verabreichungsweisen sind u.a. Suppositorien und manchmal orale Formulierungen.

[0105] Im allgemeinen beträgt die Proteinkonzentration in der zur In-vivo-Verabreichung verwendeten Zusammensetzung zum Beispiel 0,1 µg/ml bis 20 mg/ml.

[0106] Die vorliegende Erfindung betrifft auch die Verwendung von Impfstoffen, die Nukleinsäuremoleküle enthalten, die die erfindungsgemäßen Moleküle von Interesse oder immunogene Peptide oder ihr(e) inaktive(s/n) Fragment(e) codieren. Die Nukleinsäureimpfstoffe, insbesondere DNA-Impfstoffe, werden gewöhnlich in Verbindung mit einem pharmazeutisch verträglichen Vehikel durch intramuskuläre Injektion verabreicht.

[0107] Ein anderer Aspekt der Erfindung betrifft prophylaktische und/oder therapeutische Zusammensetzungen.

gen, die u.a. natürliche und/oder synthetische und/oder rekombinante Substanzen umfassen, die (i) die Aktivität der erfindungsgemäßen Moleküle von Interesse oder ihrer Fragmente blockieren und/oder hemmen können und/oder (ii) ihren Stoffwechsel hemmen können, und/oder (iii) die Expression der erfindungsgemäßen Moleküle von Interesse oder ihrer Fragmente regulieren können, und/oder (iv) die Funktion und/oder Expression von Liganden der erfindungsgemäßen Moleküle von Interesse oder ihrer Fragmente hemmen können. Diese Substanzen können bei prophylaktischen und therapeutischen Behandlungen der Erkrankung, zum Beispiel MS, durch Verabreichung wirksamer Mengen verwendet werden. Die Substanzen können kleine synthetische oder natürliche Moleküle, Derivate der in dieser Erfindung identifizierten Proteine, Lipide, Glykolipide, chemische Verbindungen usw. sein. Die kleinen Moleküle können in großer Menge unter Verwendung kombinatorischer chemischer Banken gescreent und identifiziert werden. Die Erfindung betrifft auch pharmazeutische Zusammensetzungen, die diese Substanzen in Verbindung mit physiologisch verträglichen Vehikeln und/oder Adjuvantien und/oder Excipienten und/oder Verdünnungsmitteln umfassen, und Verfahren zur Herstellung von Medikamenten für die Verwendung in der Therapie oder in der Vorbeugung von Autoimmunerkrankungen, darunter MS, unter Verwendung dieser Substanzen.

[0108] Um solche Moleküle zu identifizieren, verwendet man In-vitro- und In-vivo-Tests und -Protokolle, wie vorstehend beschrieben, unter Verwendung von Proben, die von behandelten und unbehandelten Patienten und/oder Tieren entnommen werden. Die selektierten Moleküle werden in verschiedenen Konzentrationen getestet. Diese Inhibitoren werden auch in Toxizitäts- und Pharmakokinetiktests getestet, um zu bestimmen, ob sie wertvolle Kandidatenarzneistoffe darstellen können. Die kleinen Moleküle können in großer Menge unter Verwendung kombinatorischer chemischer Banken gescreent und identifiziert werden.

[0109] Die vorliegende Erfindung betrifft auch die Verwendung von Zellen, die in vivo nach Injektion von Vektoren transformiert wurden, die mindestens ein therapeutisches Gen von Interesse enthalten, das anhand der identifizierten Moleküle von Interesse oder ihrer Fragmente definiert wird, zur Herstellung einer als Gentherapie bezeichneten prophylaktischen und/oder therapeutischen Zusammensetzung und die Zusammensetzung. Es soll daran erinnert werden, dass zur einfachen Darstellung im Allgemeinen von erfindungsgemäßen Molekülen von Interesse gesprochen wird, um das oder die verschiedenen V β zu bezeichnen, das/die mit der Superantigen-Aktivität und dem oder den MSRV-1-Protein(en), insbesondere dem MSRV-1-env-Protein einhergeht/einhergehen.

[0110] Die Zusammensetzung umfasst auch mindestens einen Vektor, der ein therapeutisches Gen, im Wesentlichen vorstehend beschrieben, enthält und in vivo in die Zielzelle eingebracht werden und das therapeutische Gen von Interesse in vivo exprimieren kann. Der Vorteil liegt in der Möglichkeit, einen Basalspiegel an exprimierten Molekülen in dem behandelten Patienten langfristig aufrechtzuerhalten. Vektoren oder Nukleinsäuren, die therapeutische Gene von Interesse codieren, werden injiziert. Diese Vektoren und Nukleinsäuren müssen bis zu den Zielzellen transportiert werden und transfizieren diese Zellen, in denen sie in vivo exprimiert werden sollen.

[0111] Die Erfindung betrifft die In-vivo-Expression von Nukleotidsequenzen und/oder Vektoren, wie vorstehend beschrieben, d.h. Sequenzen, die Genen von therapeutischem Interesse entsprechen, die insbesondere Folgendes codieren:

- entweder mindestens ein Protein, das aus den in der vorliegenden Erfindung identifizierten Molekülen von Interesse oder ihren Fragmenten ausgewählt ist, und/oder
- oder mindestens einen ganzen oder einen Teil eines polyklonalen oder monoklonalen Antikörpers, der an mindestens ein Protein binden kann, das aus den in der vorliegenden Erfindung identifizierten Molekülen von Interesse oder ihren Fragmenten ausgewählt ist. Es kann sich um einen nativen Transmembranantikörper oder ein Fragment oder Derivat eines solchen Antikörpers handeln, vorausgesetzt, dass der Antikörper, das Antikörperfragment oder -derivat auf der Oberfläche der genetisch modifizierten Säugerzielzelle exprimiert wird und dass der Antikörper an ein Polypeptid, das auf der Oberfläche einer zytotoxischen Effektorzelle oder einer T-"Helfer"-Lymphozyte vorhanden ist, binden und die Aktivität mindestens eines erfindungsgemäßen Moleküls von Interesse hemmen kann. Es kann sich um Antikörperfragmente handeln, die von Zellen exprimiert werden, die diese Antikörper in den Blutkreislauf eines Säugers oder Patienten sezernieren können, der die Zellen enthält, die durch das Gen, das den Antikörper codiert, genetisch modifiziert worden sind, und/oder
- oder mindestens ein Molekül, das mindestens ein Protein hemmt, das aus den in der vorliegenden Erfindung identifizierten Molekülen oder ihren Fragmenten ausgewählt ist, und/oder
- oder mindestens einen Liganden oder einen beliebigen Teil eines Liganden, der an mindestens ein Protein, das aus den in der vorliegenden Erfindung identifizierten Molekülen von Interesse oder ihren Fragmenten ausgewählt ist, binden und/oder seine Funktion hemmen kann. Ausgehend von den Aminosäurese-

quenzen der erfindungsgemäßen Moleküle von Interesse oder ihrer Fragmente, liegt es in der Fähigkeit des Fachmanns, durch Nutzen des genetischen Codes und unter Berücksichtigung seiner Degeneration DNA- und RNA-Nukleotidsequenzen abzuleiten, die den Molekülen von Interesse oder ihren Fragmenten entsprechen. So betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung dieser Nukleotidsequenzen in Form von Antisense-Sequenzen, Sequenzen, die ein therapeutisches Gen codieren, Sequenzen, die in einem Vektor enthalten sein können zur Ex-vivo- und/oder In-vivo-Zelltransformation (Gentherapie).

[0112] Gemäß einer besonderen Ausführungsform wird die Gentherapie dazu verwendet, die Immunantwort gegen das Zielprotein, -peptid oder -molekül von Interesse zu richten, d.h. gegen jedes Molekül, das aus den erfindungsgemäßen Molekülen von Interesse und/oder ihren Fragmenten ausgewählt ist, und/oder gegen jedes Molekül, das die Aktivität und/oder Expression und/oder den Stoffwechsel dieser Moleküle von Interesse hemmt, und/oder Liganden dieser Moleküle. Es ist offensichtlich, dass dazu die Zellen, die für die Transformation mit einem Vektor angesteuert werden müssen, Zellen sind, die zum Immunsystem gehören, entweder antigenpräsentierende Zellen (dendritische Zellen, Makrophagen usw.) oder Zellen des Lymphozytentyps (CD4/CD8).

[0113] Gemäß einer besonderen Ausführungsform werden die antigenpräsentierenden Zellen (APC), insbesondere in vivo, genetisch modifiziert. APC, wie Makrophagen, dendritische Zellen, Mikroglia, Astrozyten, spielen eine Rolle bei der Auslösung der Immunantwort. Sie sind die ersten zellulären Komponenten, die das Antigen abfangen, es in der Zelle prozessieren und transmembrane MHC-I- und MHC-II-Moleküle exprimieren, die an der Präsentation des Immunogens an die CD4+- und CD8+-T-Zellen beteiligt sind, sie produzieren spezifische akzessorische Proteine, die an der Aktivierung der T-Zellen über die Erkennung der T-Rezeptor-V β -Determinanten auf der Oberfläche der T-Lymphozyten beteiligt sind (Debrick et al., 1991, J. Immunol 147: 2846; Reis et al., 1993, J Ep Med 178: 509; Kovacsovics-bankowski et al., 1993, PNAS 90: 4942; Kovacsovics-bankowski et al., 1995, Science 267: 243; Svensson et al., 1997, J Immunol 158: 4229; Norbury et al., 1997, Eur J Immunol 27: 280). Für eine Impfung kann es vorteilhaft sein, wenn man über ein Gentherapiesystem verfügt, das auf den Gentransfer in diese APC-Zellen abzielen kann.

[0114] Es wird die In-vivo-Expression auf der Oberfläche von APC-Zellen eines ganzen oder eines Teils von einem Antikörper und/oder einem Liganden gewählt, der mit dem Zielprotein oder -peptid reagieren kann, das aus den erfindungsgemäßen Molekülen von Interesse und/oder ihren Fragmenten ausgewählt ist. Diese Zellen phagozytieren dann spezifisch das Protein oder Peptid, prozessieren es derart, dass Fragmente dieses Peptids auf der Oberfläche der antigenpräsentierenden Zellen präsentiert werden.

[0115] Die Literatur liefert eine große Zahl von Beispielen für Gene, die Antikörper codieren, die mit Polypeptiden oder Rezeptoren reagieren können. Es liegt in der Fähigkeit des Fachmanns, die für diese Antikörper codierenden Nukleinsäuresequenzen zu erlangen. Es lassen sich beispielsweise die Gene nennen, die die leichten und schweren Ketten des Antikörpers YTH 12.5 (Anti-CD3) (Routledge et al., 1991, Eur J Immunol 21: 2717–2725), des Anti-CD3 gemäß Arakawa et al., 1996, J. Biochem. 120: 657–662 codieren. Die Nukleinsäuresequenzen dieser Antikörper sind anhand von Datenbanken, die vom Fachmann üblicherweise genutzt werden, leicht identifizierbar. Es ist ebenfalls möglich, ausgehend von bei der ATCC verfügbaren Hybridomen die Nukleinsäuresequenzen, die für die schweren und/oder leichten Ketten dieser verschiedenen Antikörper codieren, unter Verwendung von Amplifikationsverfahren, wie RT-PCR mithilfe spezifischer Oligonukleotide oder Techniken, die cDNA-Banken verwenden, zu klonieren (Maniatis et al., 1982, Molecular cloning. A laboratory manual CSH Laboratory, Cold Spring Harbor, New York). Die so klonierten Sequenzen sind dann für die Klonierung in Vektoren verfügbar. Gemäß eines bevorzugten Fall der Erfindung wird die Nukleinsäuresequenz, die die schwere Kette des Antikörpers codiert, mittels homologer Rekombination mit einer Nukleinsäuresequenz fusioniert, die ein Transmembranpolypeptid codiert (Polydefkis et al., 1990, J Exp Med 171: 875–887). Diese molekularbiologischen Techniken sind gut beschrieben.

[0116] Es wird die In-vivo-Expression auf der Oberfläche von APC-Zellen von immunogenen Fragmenten gewählt, die mindestens einem Protein entsprechen, das aus den erfindungsgemäßen Molekülen von Interesse und/oder ihren Fragmenten ausgewählt ist. Dazu kann die Expression durch den Vektor entweder des vollständigen Polypeptids oder vorzugsweise von Polypeptiden wählen, die so selektiert werden, dass sie mit spezifischen Liganden und/oder Rezeptoren reagieren. Das von dem Polynukleotid, das in vivo in die Vertebratenzelle eingebracht wurde, codierte immunogene Peptid kann produziert und/oder sezerniert, prozessiert und dann einer antigenpräsentierenden Zelle (APC) im Kontext mit MHC-Molekülen präsentiert werden. Die so in vivo transferierten APC induzieren eine gegen das in vivo exprimierte Immunogen gerichtete Immunantwort. APC besitzen verschiedene Mechanismen, um Antigene einzufangen: (a) Einfangen von Antigenen durch Membranrezeptoren, wie Immunglobulin-(Fc)- oder Komplementrezeptoren, die an der Oberfläche von Granu-

lozyten, Monozyten oder Makrophagen vorliegen und eine wirksame Zuführung des Antigens in intrazelluläre Kompartimente nach der durch die Rezeptoren vermittelten Phagozytose gestatten. (b) Eintritt in die APC mittels Pinozytose in der flüssigen Phase, woran verschiedene Mechanismen beteiligt sind: Mikropinozytose, d.h. Einfangen kleiner Vesikel (0,1 µm) durch Clathrin-Coated-Pits und Makropinozytose, d.h. Einfangen größerer Vesikel (mit einer Größe zwischen 0,5 µm und etwa 6 µm) (Sallusto et al., 1995, J Exp Med 182: 389–400). Während die Mikropinozytose in allen Zellen konstitutiv erfolgt, ist Makropinozytose auf Zelltypen, wie beispielsweise Makrophagen, dendritische Zellen, Astrozyten, durch Wachstumsfaktoren stimulierte Epithelzellen beschränkt (Racoosin et al., J Cell Sci 1992, 102: 867–880). In dieser Erfindung werden unter Zellen, die zur Makropinozytose in der Lage sind, Zellen verstanden, die die vorstehend beschriebenen Vorgänge durchführen können, und Zellen, die Makromoleküle von vorzugsweise zwischen 0,5 µm und etwa 6 µm im Cytoplasma einfangen können.

[0117] Gemäß einer besonderen Ausführungsform werden, insbesondere in vivo, zytotoxische Effektorzellen oder T-"Helfer"-Lymphozyten genetisch derart modifiziert, dass sie auf ihrer Oberfläche Liganden für mindestens eines der erfindungsgemäßen Moleküle von Interesse exprimieren, die von diesen Zellen nicht natürlicherweise exprimiert werden und an das ganze oder einen Teil mindestens eines der erfindungsgemäßen Moleküle von Interesse auf der Oberfläche der gleichen Zelle oder einer anderen Zelle binden und die Aktivität mindestens eines erfindungsgemäßen Moleküls von Interesse hemmen können, indem in diese Zellen Nukleinsäuresequenzen eingebracht werden, die das Gen enthalten, das dieses Polypeptid codiert.

[0118] Erfindungsgemäß ist es ebenfalls möglich, eine Nukleinsäuresequenz zu wählen, die ein Gen von therapeutischem Interesse enthält, das einen ganzen oder einen Teil von einem Antikörper codiert, der gegen ein Protein gerichtet ist, das aus den erfindungsgemäßen Molekülen von Interesse und den Peptidsequenzen und/oder Fragmenten dieser Sequenzen ausgewählt ist, das auf der Oberfläche der Zielzellen des zu behandelnden Patienten exprimiert werden kann, wobei der Antikörper durch diese Effektorzellen an ein Polypeptid der erfindungsgemäßen Moleküle von Interesse, die an der Oberfläche von zytotoxischen Lymphozyten und/oder T-"Helfer"-Lymphozyten vorhanden sind, binden oder sogar die Aktivität dieser Moleküle von Interesse hemmen kann.

[0119] Man hat viele Werkzeuge entwickelt, um verschiedene heterologe Gene und/oder Vektoren in Zellen, insbesondere Säugerzellen, einzubringen. Diese Techniken können in zwei Kategorien eingeteilt werden: Die erste Kategorie beinhaltet physikalische Techniken, wie Mikroinjektion, Elektroporation oder Teilchenbeschuss. Die zweite Kategorie basiert auf der Verwendung molekularbiologischer und zellbiologischer Techniken, mit denen das Gen mit einem biologischen oder synthetischen Vektor transferiert wird, der das Einbringen des Materials in die Zelle in vivo erleichtert. Heutzutage sind die wirksamsten Vektoren virale, insbesondere adenovirale und retrovirale, Vektoren. Diese Viren besitzen natürliche Fähigkeiten zur Überquerung von Plasmamembranen, zur Vermeidung des Abbaus ihres genetischen Materials und zum Einbringen ihres Genoms in den Zellkern. Diese Viren sind größtenteils untersucht, und bestimmte werden bereits experimentell bei Anwendungen in Menschen zur Impfung, Immuntherapie oder zur Kompensation genetischer Defizienzen eingesetzt. Dieser virale Ansatz unterliegt jedoch Beschränkungen, insbesondere aufgrund der beschränkten Klonierungskapazität in diese Virengenome, des Risikos der Ausbreitung der erzeugten Viruspartikel im Organismus und in der Umgebung, des Risikos einer Artefaktmutagenese durch Insertion in die Wirtszelle im Fall von Retroviren und der Möglichkeit, dass während der Behandlung eine starke inflammatorische Immunantwort in vivo ausgelöst wird, was die Anzahl möglicher Injektionen beschränkt (McCoy et al., 1995, human Gene Therapy 6: 1553–1560; Yang et al., 1996 Immunity 1: 433–422). Es gibt anderen, zu diesen viralen Vektoren alternative Systeme. Die Verwendung nicht-viraler Verfahren, wie beispielsweise Copräzipitation mit Calciumphosphat, die Verwendung von Rezeptoren, die virale Systeme nachahmen (siehe eine Zusammenfassung bei Cotten und Wagner, 1993, Current Opinion in Biotechnology, 4: 705–710) oder die Verwendung von Polymeren, wie Polyamidoaminen (Haensler und Szoka, 1993, Bioconjugate Chem 4: 372–379). Andere nicht-virale Techniken basieren auf der Verwendung von Liposomen, deren Wirksamkeit zum Einbringen biologischer Makromoleküle, wie DNA, RNA, Proteine oder pharmazeutische Wirkstoffe, in der wissenschaftlichen Literatur breit beschrieben ist. Auf diesem Gebiet haben Arbeitsgruppen die Verwendung kationischer Lipide mit starker Affinität für die Zellmembranen und/oder Nukleinsäuren vorgeschlagen. Es wurde tatsächlich gezeigt, dass ein Nukleinsäuremolekül selbst die Plasmamembran bestimmter Zellen in vivo überqueren kann (WO 90/11092), wobei die Wirksamkeit insbesondere von der Polyanion-Natur der Nukleinsäure abhängt. Seit 1989 (Felgner et al., Nature 337: 387–388) hat man kationische Lipide zur Erleichterung des Einbringens großer anionischer Moleküle vorgeschlagen, wodurch die negativen Ladungen dieser Moleküle neutralisiert und ihr Einbringen in die Zellen erleichtert wird. Verschiedene Arbeitsgruppen haben solche kationischen Lipide entwickelt: DOTMA (Felgner et al., 1987, PNAS 84: 7413–7417), DOGS or Transfectam™ (Behr et al., 1989, PNAS 86: 6982–6986), DMRIE und DORIE (Felgner et al., 1993, Methods 5: 67–75), DC-CHOL (Gao und Huang, 1991,

BBRC 179: 280–285), DOTAPTM (McLachlan et al., 1995, Gene therapy 2: 674–622) oder LipofectaminTM sowie die anderen in den Patenten WO 91/16024, WO 95/14651 und WO 94/05624 beschriebenen Moleküle. Andere Gruppen haben kationische Polymere entwickelt, die den Transfer von Makromolekülen, insbesondere anionischen Makromolekülen, in Zellen erleichtern. Das Patent WO 95/24221 beschreibt die Verwendung dendritischer Polymere, das Dokument WO 96/02655 beschreibt die Verwendung von Polyethylenimin oder Polypropylenimin, und die Dokumente US-A-5595897 und FR 2719316 beschreiben die Verwendung von Polylysinkonjugaten.

[0120] Vorausgesetzt, dass man in vivo eine auf einen gegebenen Zelltyp zielgesteuerte Transformation erhalten möchte, ist offensichtlich, dass der verwendete Vektor selbst "zielgesteuert" werden muss (wie vorstehend beschrieben).

[0121] Das in der vorliegenden Erfindung definierte biologische Material kann in vivo insbesondere in injizierbarer Form verabreicht werden. Man kann auch eine Injektion auf epidermalem, intravenösem, intraarteriellem, intramuskulärem, intrazerebralem Weg mit einer Spritze oder jedem anderen äquivalenten Mittel in Betracht ziehen. Gemäß einer anderen Ausführungsform durch orale Verabreichung oder jedes andere Mittel, das dem Fachmann genau bekannt und auf die vorliegende Erfindung anwendbar ist. Die Verabreichung kann in einer einzelnen oder wiederholten Dosis, ein- oder mehrmals nach einer gewissen Verzögerungszeit erfolgen. Der geeignetste Verabreichungsweg und die geeignetste Dosierung variieren in Abhängigkeit von verschiedenen Parametern, wie beispielsweise dem zu behandelnden Individuum oder der zu behandelnden Erkrankung, dem Stadium und/oder der Entwicklung der Erkrankung oder auch der Nukleinsäure und/oder dem Protein und/oder Peptid und/oder Molekül und/oder der zu transformierenden Zelle oder dem Zielorgan/-gewebe.

[0122] Weitere Aufgabe der Erfindung sind Folgende:

- ein Verfahren zur Identifikation von Substanzen, die die Transkription und/oder Translation eines humanen Retrovirus, insbesondere des MSRV-1-Retrovirus oder einer MSRV-1-Variante, wie vorstehend definiert, aufhalten können, das eine Superantigen-Aktivität besitzt, wobei diese Superantigen-Aktivität mit einer Autoimmunerkrankung einhergeht, gemäß dem:
die Substanz mit Zellen in Kontakt gebracht wird, die ein retrovirales Polypeptid, wie vorstehend definiert, mit Superantigen-Aktivität exprimieren, und
ein Verlust oder eine Verringerung der erfindungsgemäßen Superantigen-Aktivität nachgewiesen wird.
- ein Kit zum Screening von Substanzen, die die Superantigen-Aktivität eines Retrovirus, insbesondere des MSRV-1-Retrovirus oder einer MSRV-1-Variante, wie vorstehend definiert, das/die mit einer Autoimmunerkrankung einhergeht, blockieren können oder die Transkription und/oder Translation des Retrovirus blockieren können, umfassend:
Zellen, die an ihrer Oberfläche MHC-Klasse-II-Produkte exprimieren, mit dem retroviralen Superantigen transformiert sind und dieses funktionell exprimieren,
Zellen, die ein oder mehrere Rezeptor-V β -Ketten tragen und durch das retrovirale Superantigen stimuliert sind, und
Mittel zum Nachweis eines Verlusts oder einer Verringerung der erfindungsgemäßen Superantigen-Aktivität.

Definitionen:

[0123] Unter Antikörperfragment werden F(ab)2-, Fab'-, Fab- und sFv-Fragmente (Blazer et al., 1997, Journal of Immunology 159: 5821–5833; Bird et al., 1988, Science 242: 423–426) eines nativen Antikörpers verstanden, und unter Derivat wird beispielsweise ein chimäres Derivat eines solchen Antikörpers verstanden (siehe zum Beispiel die Chimären der Anti-Maus/human-CD3-Antikörper in Arakawa et al., 1996, J Biochem 120: 657–662 oder Immunotoxine, wie sFv-Toxin, von Chaudary et al., 1989, Nature 339: 394–397).

[0124] Unter Transmembranantikörper wird ein Antikörper verstanden, von dem zumindest die funktionelle Region, die sein spezifisches Antigen erkennen und daran binden kann, an der Oberfläche der Zielzellen exprimiert wird, um die Erkennung und Bindung zu ermöglichen. Genauer gesagt, bestehen die erfindungsgemäßen Antikörper aus Fusionspolypeptiden, die die Aminosäuren, die die funktionelle Region definieren, und eine Aminosäuresequenz (Transmembranpolypeptid) enthalten, welche die Verankerung im Inneren der Lipidmembran-Doppelschicht der Zielzelle oder an der äußeren Oberfläche dieser Doppelschicht gestattet. Die für zahlreiche Transmembranpolypeptide codierenden Nukleinsäuresequenzen sind in der Literatur beschrieben. Gemäß einem ganz besonders vorteilhaften Fall wird die für die schwere Antikörperkette codierende Nukleinsäuresequenz mit der ein Transmembranpolypeptid codierenden Nukleinsäuresequenz fusioniert.

[0125] Unter Elementen, die die In-vivo-Expression eines Gens gewährleisten, wird insbesondere auf die Elemente Bezug genommen, die die zur Gewährleistung der Expression des Gens nach Transfer in eine Zielzelle notwendig sind. Es handelt sich insbesondere um Promotorsequenzen und/oder Regulationssequenzen, die in der Zelle wirksam sind, und gegebenenfalls die Sequenzen, die erforderlich sind, um die Expression des Polypeptids an der Oberfläche der Zielzellen zu ermöglichen. Der verwendete Promotor kann ein viraler, ubiquitärer oder gewebsspezifischer oder auch ein synthetischer Promotor sein. Als Beispiel werden Promotoren genannt, wie die Promotoren der Viren RSV (Rous-Sarkoma-Virus), MPSV, SV40 (Simian Virus) oder CMV (Cytomegalievirus) oder des Vaccinia-Virus, die Promotoren des Gens, das Muskelkreatinkinase, und des Gens, das Aktin codiert. Es ist ebenfalls möglich, eine Promotorsequenz zu wählen, die für einen gegebenen Zelltyp spezifisch oder unter definierten Bedingungen aktivierbar ist. Die Literatur liefert eine große Zahl an Informationen zu derartigen Promotorsequenzen.

[0126] Unter zytotoxischen Effektorzellen werden makrophagen, Astrozyten, zytotoxische T-Lymphozyten (CTL), die an ihrer Oberfläche CD8-Moleküle exprimieren, und Killerzellen (NK) sowie ihre Derivate verstanden, wie beispielsweise LAK (Versteeg, 1992, Immunology today 13: 244–247; Brittende et al., 1996, Cancer 77: 1226–1243). Mit T-"Helfer"-Lymphozyten sollen insbesondere Zellen bezeichnet werden, die an ihrer Oberfläche CD4-Moleküle exprimieren, die nach der Aktivierung die Sekretion von Aktivierungsfaktoren für die Effektorzellen der Immunantwort ermöglichen. Die Polypeptide und insbesondere die Rezeptoren, die an der Oberfläche dieser Zellen exprimiert werden und an der Aktivierung solcher Zellen beteiligt sind, bestehen insbesondere aus dem ganzen oder einem Teil des TCR-Komplexes, der die Vb-Determinanten und/oder CD3 umfasst, den ganzen oder einem Teil der Komplexe CD8, CD4, CD28, LFA-1, 4-1BB (Melero et al., 1998, Eur J Immunol 28: 1116–1121), CD47, CD2, CD1, CD9, CD45, CD30 und CD40, den ganzen oder einem Teil der Rezeptoren für Cytokine (Finke et al., 1998, Gene therapy 5: 31–39), wie IL-7, IL-4, IL-2, IL-15 oder GM-CSF, dem ganzen oder einem Teil des Rezeptorkomplexes für NK-Zellen, wie beispielsweise NKAR, Nkp46 usw. (Kawano et al., 1998, Immunology 95: 5690–5693; Pessino et al., 1998, J Exp Med 188: 953–960), Nkp44, den ganzen oder einem Teil der Makrophagenrezeptoren, wie beispielsweise der Fc-Rezeptor (Deo et al., 1997, Immunology Today 18: 127–135).

[0127] Unter therapeutischer Wirksamkeit wird allgemein die hemmende Wirkung auf die Aktivität des Superantigentyps, wie anhand der erfindungsgemäßen V β -Profile definiert, und die Fähigkeit verstanden, die molekularen und/oder immunologischen Wechselwirkungen der erfindungsgemäßen V β zu hemmen und/oder zu blockieren, die zu ihrer Vermehrung oder Verringerung führen, wie vorstehend beschrieben.

[0128] Unter Überstand oder Überstandsfraktion werden der Überstand oder eine Fraktion von diesem, einschließlich der Moleküle, Peptide und/oder Proteine, die sie umfassen, verstanden.

[0129] Die Experimente werden durchgeführt ausgehend von:

- 1) mononukleären Blutzellen von elf gesunden Spendern, die auf einem Ficoll-Gradienten gereinigt werden. Eine HLA-DR-Typisierung jedes Spenders wurde zuvor durchgeführt.
- 2) (i) einem Pool von Kulturüberständen, die mittels Ultrazentrifugation (100000 g $\times$ 2 Stunden) konzentriert wurden, von humanen B-Lymphozyten, die von MS-Patienten (LBMS) oder Nicht-MS-Kontrolle (LBTE) stammen, und (ii) Kulturüberstand humaner Plexus-choroidei-Zellen, die von einem MS-Patienten (GRE) und einer Nicht-MS-Kontrolle (LES) stammen.
- 3) rekombinante Proteine.

Beispiel 1: Herstellung von Extrakten der Überstände von Zellkulturen, die von an MS leidenden Patienten und Nicht-MS-Kontrollen stammen.

[0130] Die Protokolle für die Kultur von Plexus-choroidei-Zellen sind in der PCT-Patentanmeldung WO 93/20188 beschrieben.

1) Kultur von Plexus-choroidei-Zellen.

[0131] Plexus-choroidei-Zellen werden aus Explantaten erhalten, die post-mortem entnommen und, gegebenenfalls nach mechanischer und/oder enzymatischer Dissektion der entnommenen Gewebe, kultiviert werden. Die Zellen, die in der Kultur proliferieren, haben fibroblastisches Aussehen und entsprechen aus dem Leptomeninx stammenden Zellen, die manchmal als "Plexus-choroidei-Fibroblasten" bezeichnet werden. Sie können für eine bestimmte Anzahl von Passagen kultiviert, während intermediärer Passagen eingefroren und schließlich für eine neue Kultur wieder aufgetaut werden.

[0132] Die LES-(Nicht-MS-Kontroll)- und GRE-(MS)-Zellen wurden aufgetaut und dann in F-12-"Voll"-medium in Kultur gebracht, das Folgendes enthielt:

200 U/ml Penicillin

20 mg/l Streptomycin

6 mM L-Glutamin

1% Natriumpyruvat

1% essenzielle Aminosäuren

Anti-Leukozyten-IFN-Antikörper (von Sigma vertriebener polyklonaler Anti-alpha-Interferon-Antikörper), auf eine Endkonzentration von 10 U/ml hinzugefügt.

[0133] Dieses Medium wird mit 30% FCS (fötalem Kälberserum) angereichert, dessen Komplement bei 56°C für 30 min zerstört wurde. Die Zellkultur erfolgt in einem befeuchteten Brutschrank bei 37°C in Gegenwart von 5% CO₂. Der Mediaustausch erfolgt zweimal pro Woche. Wenn die adhären Zellen am Boden der Flasche konfluent sind, wird die Kultur zweigeteilt. Dazu wird der Kulturüberstand (SC) entfernt und durch "frisches" F12-Vollmedium/30% FCS ersetzt. Mithilfe eines Schabers oder eines Trypsin/EDTA-Gemisches werden die Zellen von der Flaschenwand abgelöst. Dann werden sie vorsichtig resuspendiert, bevor sie in zwei Kulturflaschen aufgeteilt werden. Man sagt, dass die Kultur zweigeteilt oder einer Passage unterzogen wurde.

[0134] Die SC werden geerntet und bei -80°C für die Ultrazentrifugation eingefroren, nachdem Zelltrümmer durch Zentrifugation bei 3000 U/min für 30 min entfernt wurden. Für die Untersuchung wurde für jede Kultur (MS/GRE und Nicht-MS/LES) ein Gesamtvolumen von etwa 400 ml aufgetaut, vereinigt und vor der Ultrazentrifugation homogenisiert.

2) Kultur von B-Lymphoblastenlinien.

– Gewinnung von B-Lymphozyten aus peripherem Blut und Etablierung mit EBV (Epstein-Barr-Virus) immortalisierter B-Lymphoblastenlinien.

[0135] Humane Lymphozyten werden aus 50 ml heparinisiertem Blut, das mit RPMI 1640 auf die Hälfte verdünnt wurde, durch Zentrifugation auf einem Ficoll-Gradienten isoliert. Sie werden vorsichtig aus dem Ring gewonnen, ebenso wie gegebenenfalls Zellaggregate, die kurz unterhalb des Rings bandieren können. Die Zellen werden dann zweimal in RPMI 1640-Medium gewaschen. Nach diesen Waschschrritten werden die Zellen in einer Konzentration von 2×10^6 Zellen/ml in RPMI 1640-Medium resuspendiert, das Folgendes enthält:

200 U/ml Penicillin

20 mg/l Streptomycin

6 mM L-Glutamin

1% Natriumpyruvat

1% essenzielle Aminosäuren

Anti-Leukozyten-IFN-Antikörper (von Sigma vertriebener polyklonaler Anti-alpha-Interferon-Antikörper), auf eine Endkonzentration von 10 U/ml hinzugefügt.

[0136] Dieses Medium wird mit 20% FCS (fötalem Kälberserum) angereichert, dessen Komplement bei 56°C für 30 min zerstört wurde.

[0137] Die Kulturflaschen werden in Brutschränken bei 37°C unter einer feuchten Atmosphäre mit 5% CO₂ inkubiert, nachdem zum Kulturmedium 1 ml filtrierter Überstand einer produktiven EBV-B95-8-Kultur (also 10^5 EBV-Viruspartikel auf insgesamt 4 bis 5×10^6 Lymphozyten) in Gegenwart von 200 µl einer CSA-Sandoz-Lösung (2 µg CSA auf insgesamt 4 bis 5×10^6 Lymphozyten) gegeben wurden, und dies bis zum ersten Wechsel des Kulturmediums. Der Austausch des Kulturmediums erfolgt zweimal pro Woche. Die Flaschen werden für drei Monate gehalten; danach wird die Flasche verworfen, wenn keine Lymphozytenproliferation begonnen hat. Wenn in einer Flasche die Zellproliferation begonnen hat, werden die Zellen in der gleichen Flasche aufbewahrt, bis eine signifikante Anzahl an proliferativen Kolonien Klumpen bildet. Die "Zweiteilung" der Kultur (Passage oder Subkultur) erfolgt nach mechanischer Dissoziation der Klumpen durch starkes Pipettieren oder Umschütteln. Die so erhaltenen Kulturen entsprechen B-Lymphozytenlinien (Lymphoblastenlinien). Vier von bestimmten MS-Patienten und zwei von Nicht-MS-Kontrollen stammende Linien wurden unter diesen Bedingungen erhalten.

– Einfrieren von Zellen.

[0138] Die Zellen werden in RPMI-Medium/20% FCS gewaschen. Das in FCS aufgenommene Sediment (et-

wa 1 ml pro 8×10^6 Zellen) wird zum Einfrieren in ein Cryoröhrchen überführt. 200 µl einer zuvor hergestellten und bei -20°C aufbewahrten FCS-DMSO-Lösung werden zu dieser Zellsuspension gegeben (Endkonzentration von DMSO = 10%), die dann schwach gevortext wird. Die Zellen werden so bei -80°C in Gaze eingefroren und am nächsten Tag in Stickstoff aufbewahrt.

– Auftauen und erneutes Kultivieren der in DMSO eingefrorenen Zellen.

[0139] Die bei Umgebungstemperatur aufgetauten Zellen werden zweimal in 10 ml RPMI-Medium/20% FCS gewaschen und erneut in Kultur gebracht.

[0140] Die vier MS-Kulturen und die zwei Kontrollkulturen werden gleichzeitig mit den gleichen Reagenzien und den gleichen Mediumchargen in Kultur gebracht, aber in getrennten Kulturlabors (P3 bzw. P2) gezüchtet. Die Einzelkulturen werden für etwa einen Monat parallel durchgeführt, um nach Poolen der getrennten SC von jedem MS-Patienten und jeder Kontrolle ein Volumen von etwa 600–800 ml von jedem Typ (LBMS und LBTE) zu gewinnen. Dieses Volumen wurde durch systematisches Einfrieren der zweimal pro Woche entnommenen Überstände bei -80°C nach einer Vorzentrifugation bei 1800 U/min für 10 min, um die Zellen in Suspension zu sedimentieren und zu gewinnen, gefolgt von einer zweiten Vorzentrifugation bei 3000 U/min für 30 min, um die Zelletrümmer zu entfernen, vereinigt.

[0141] Die MS- und Nicht-MS-Überstände wurden vor der Ultrazentrifugation aufgetaut, getrennt gepoolt und gemischt (MS = LBMS-Pool und Kontrolle = LBTE-Pool) (650 ml Pools). Die Ultrazentrifugationssedimente des gleichen Pools, die nach Aufteilen in getrennte 40-ml-Röhrchen zentrifugiert wurden, wurden vor dem Aliquotieren und Einfrieren des zu testenden Extrakts ebenfalls gepoolt und gemischt, um einen homogenen Extrakt in allen Aliquoten des gleichen Ursprungs zu erhalten.

3) Nachweis von Mykoplasmen, die die Kultur kontaminieren können.

[0142] Ein auf der ELISA-(Enzyme-Linked-ImmunoSorbent-Assay)-Technik basierendes Kit (Boehringer) wurde zum Nachweis von Mykoplasmen verwendet, um die Abwesenheit einer Mykoplasmenkontamination in den Kulturen zu gewährleisten.

4) Gewinnung eines Konzentrats von Kulturüberstand durch Ultrazentrifugation auf einem Glycerinkissen.

[0143] Die aufgetauten und zuvor von Zelltrümmern befreiten Überstände werden in Ultrazentrifugationsröhrchen überführt. Ein Glycerinkissen (PBS/30% Glycerin) von wenigen cm wird auf den Boden des Röhrchens aufgebracht. Nach zweistündiger Ultrazentrifugation bei $100000 \times g$ (in der Mitte des Röhrchens berechnet) bei 4°C mit langsamem Abbremsen (30 min) wird der Überstand entfernt, das Sediment in PBS-Puffer mit 10% Glycerin aufgenommen, mit den Sedimenten der anderen Röhrchen des gleichen Ursprungspools vereinigt und homogenisiert, und das Ganze wird zu 100 µl aliquotiert. Ein Aliquot dient der Messung der Aktivität der reversen Transkriptase-(RT)-Aktivität, und die anderen werden bei -80°C aufbewahrt. Die benötigten Aliquote werden für die Tests an mononukleären Blutzellen aufgetaut.

Beispiel 2: Präparation aus elf gesunden Spendern mit festgestellter HLA-DR-Typisierung stammender mononukleärer Blutzellen.

Spender	HLA-DR-Typisierung
1 –	DR2-DR4
2 –	DR1-DR1 → DR1
3 –	DR3-DR11(5)
4 –	DR13-DR8
5 –	DR13(6)-DR14 → DR6
6 –	DR2-DR2 → DR2
7 –	DR3-DR12(5)
8 –	DR3-DR7
9 –	DR3-DR13
10 –	DR4-DR5
11 –	DR4-DR4 → DR4

[0144] Die mononukleären Blutzellen von 100 ml Blut, die von den vorstehend genannten elf Spendern stammen, werden von roten Blutzellen auf einem Ficoll-Gradienten (15 ml Ficoll/25 ml Blut) durch Zentrifugation 15 min bei 800 g abgetrennt. Die Zellen werden dann mit RPMI 1640-Medium gewaschen und unter den gleichen Bedingungen erneut zentrifugiert, bevor sie aliquotiert und in einer Endkonzentration von 2×10^7 Zellen/ml in einer Lösung von 90%igem Humanserum mit zerstörtem Komplement und 10% DMSO in gasförmigem Stickstoff eingefroren werden.

Beispiel 3: Kultivierung mononukleärer Blutzellen von gesunden Spendern.

[0145] Nach schnellem Auftauen werden die Lymphozyten von gesunden Spendern (5×10^6 Zellen) für 30 min bei 37°C mit 100 µl konzentrierten Kulturüberständen (i) von LBMS oder LBTE oder (ii) GRE oder LES in Kontakt gebracht.

[0146] Nach In-Kontakt-bringen werden die Zellen in Kulturmedium (RPMI, angereichert mit 10% humanem AB-Serum nach Zerstörung des Komplements und mit Gentamycin) resuspendiert und zu 2×10^6 Zellen pro ml in die Brunnen von Kulturplatten mit 24 Vertiefungen verteilt. Die Lebensfähigkeit der Zellen und ihre Immunkompetenz wurden bestätigt, indem in eine Kontrolle eine Aktivierung durch ein herkömmliches Mitogen (PHA zu $5 \mu\text{g}/2 \times 10^6$ Zellen) eingebracht wurde.

Beispiel 4: Analyse des Vβ-Repertoires der CD3-Lymphozyten durch immunologischen Nachweis.

[0147] Die Analyse des CD3-Repertoires erfolgte unter Verwendung eines an Fluoresceinisothiocyanat gekuppelten Anti-CD3-Antikörpers und von 12 an Biotin gekuppelten Anti-Vβ-Antikörpern (Immunotech-Coulter-Beckman). Diese zwölf Antikörper sind in der folgenden Tabelle 1 aufgelistet.

Tabelle 1

Anti-Vβ-Ak	Bezeichng.	Sag-Ziel	Bemerkungen
Vβ2	IM 2081	TSST-1	10% CD3 + PBL
Vβ3	IM 2109	SEB	
Vβ5-1	IM 2082		4-7% CD3 + PBL
Vβ7	IM 2288		1,5-2,4% CD3 + PBL IDDM-Diabetes-Superantigen (Conrad et al., J Immunol, 1997)
Vβ8	IM 1191	SEE, Tollwut-protein N	2,6-5,1% CD3 + PBL Tollwut-Superantigen (Lafon et al., Nature, 1992)
Vβ12	IM 2019	SEB (12a)	1,1-1,9% CD3 + PBL
Vβ13-1	IM 2021	EBV	1,8-3,3% CD3 + PBL, Epstein-Barr-Superantigen (Sutkowski et al., J. Exp. Med., 1996)
Vβ14	IM 2022		2,2-5,6% CD3 + PBL

Vß16	IM 2023		1,1-2% CD3 + PBL
Vß17	IM 1194	MAM, SEB	3,3-7% CD3 + PBL
Vß21-3	IM 2025		2,2-3,6% CD3 + PBL
Vß22	IM 2026		2,4-5,1% CD3 + PBL

[0148] Nach 24-stündiger Kultur wurde der Inhalt der Brunnen in Gegenwart von LBMS, LBTE und PHA oder GRE, LES und PHA kultiviert und geerntet. Der Überstand wird aliquotiert und für den anschließenden Nachweis von Cytokinen bei -80°C aufbewahrt. Die Zellen werden in Phosphatpuffer gewaschen, in Mikroröhrchen aufgeteilt und mit einem mit Fluoresceinisothiocyanat markierten Anti-CD3-Antikörper (0,5 µg pro 5×10^5 Zellen) und mit jedem biotinylierten Anti-Vß-Antikörper (1 µg Antikörper pro 2×10^6 Zellen) für 30 min bei 4°C gleichzeitig inkubiert. Die Zellen werden dann in Phosphatpuffer gewaschen und für 30 min bei 4°C mit an Phycoerythrin gekuppeltem Streptavidin (1 µl in 50 µl Zellsuspension) inkubiert. Am Ende dieser Inkubationszeit werden die Zellen gewaschen und in 250 µl Cell Fix (Handelsname) resuspendiert, bevor sie mittels Durchflusszytometrie analysiert werden. Die Immunfluoreszenz wird mithilfe eines FACSCALIBUR-(Handelsname)-Durchflusszytometers, das mit dem CellQUEST-II-(Handelsname)-Programm (Becton-Dickinson) ausgerüstet ist, gemessen.

[0149] Für jede Kultur und jeden Antikörper werden die Prozent Zellen, die ein bestimmtes Vß exprimieren, unter den gesamten CD3+-Zellen berechnet. Die Größe der Familien wird in den mit LBMS, LBTE, LES und GRE aktivierten Kulturen verglichen. Eine Zunahme von 31% einer Vß-Familie in einer LBMS- oder GRE-Kultur, bezogen auf die negativen Kontrollen, wird als signifikante Erhöhung betrachtet.

Beispiel 5: Protokoll der Analyse des Vß-Repertoires von T-Lymphozyten mittels Molekularbiologie.

[0150] Extrakte von Kulturüberstand von Zellen, die von an MS leidenden Patienten oder Nicht-MS-Kontrollen stammen, werden wie im Beispiel 1 beschrieben hergestellt, und PBL-Zellen von gesunden Spendern werden wie im Beispiel 2 beschrieben hergestellt. Die beiden Präparationen werden wie im Beispiel 3 beschrieben gezüchtet, und die T-Zellen werden mit den PBL aus der Kultur gewonnen. Die Analyse des Vß-Repertoires des auf der Oberfläche dieser Zellen vorhandenen T-Rezeptors erfolgt mittels Molekularbiologie, wie nachstehend beschrieben:

Die Gesamt-RNA der gewonnenen Lymphzellen werden unter Verwendung herkömmlicher Extraktionstechniken, die dem Fachmann bekannt sind, extrahiert. Eine reverse Transkription wird durchgeführt; so werden komplementäre DNAs synthetisiert (zum Beispiel unter Verwendung des RT-Expand-Kits, Roche). Dann wird eine für eine Familie von Vß-Transkripten (TCRBV) spezifische Amplifikation durchgeführt, indem für die untersuchte Vb-Familie spezifische Primer verwendet werden (zum Beispiel durch Verwendung der in der Literatur beschriebenen Primer) (Lue C et al., Am J Clin Pathol 1999 111: 683; Akatsuka Y et al., Tissue Antigens 1999 53: 122; Ryan DK et al., Mol Pathol 1997 50: 77; Lang R et al., J Immunol Methods 1997, 203: 181; Dreitz MJ et al., Vet Immunol Immunopathol 1999 69: 113; Mima T et al., Biochem Biophys Res Commun 1999 263: 172; Aifantis I et al., Immunity 1998 9: 649; Deng X et al., J Biol Chem 1998 273: 23709; Lobashevsky A et al., Transplantation 1996 62: 1332; Hawke NA et al., J Immunol 1996 156: 2458; Lim SH et al., Cancer Immunol Immunother 1996 42: 69). Anschließend werden Amplikonextensionsreaktionen durchgeführt unter Verwendung von einerseits fluoreszenten TCR-BC-Oligonukleotiden und andererseits fluoreszenten TCR-BJ-Oligonukleotiden (13 J beta). Diese fluoreszenzmarkierten Amplikonprodukte haben aufgrund von Umlagerungen der für jeden T-Vß-"x"-Klon spezifischen Gene unterschiedliche Größen und werden auf einem Elektrophoresegel analysiert, und die mit jeder Bande auf dem Gel einhergehenden Fluoreszenz wird mithilfe eines Phosphorl-mager abgelesen und quantifiziert.

[0151] So werden Graphen erhalten, deren Profil die Amplifikation einer auf der Oberfläche der T-Zellen befindlichen Vß-Familie wiedergibt ([Fig. 3](#)). Ist die Aktivierung der T-Zelle polyklonal, werden mehrere Peaks an dem gleichen Graph beobachtet, was das Vorliegen vieler Moleküle der Vß-Familie auf der Oberfläche der T-Zellen widerspiegelt.

Beispiel 6: Nachweis der produzierten Cytokine.

[0152] Die inflammatorischen Cytokine (IL-6, TNF-α und INF-γ) wurden unter Verwendung von Optalia-(Handelsname)-Immunocapture-ELISA-Kits von Pharmingen-Becton-Dickinson auf Titerplatten mit 96 Vertiefungen nach den Anleitungen des Herstellers gemessen. Eine Referenz aus einem Verdünnungsbereich von rekombinantem Cytokin mit bekannter Konzentration (in pg/ml) wird bei jeder Testplatte mit eingeschlossen. Die op-

tische Dichte wird mit einem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 405 nm zum Ablesen des Chromogens ABTS (Boehringer Mannheim) gemessen. Die Untersuchung der Cytokine erfolgt in 50 µl Kulturüberständen 24 Stunden nach dem In-Kontakt-bringen für 8 mit LBMS oder LBTE stimulierte Spender und in den Kulturüberständen 24 Stunden und 72 Stunden nach dem In-Kontakt-bringen für 6 mit LES oder GRE stimulierte Spender.

[0153] Die Ergebnisse sind in pg/ml Überstand, entsprechend der Produktion von 2×10^6 Zellen, ausgedrückt.

Tabelle 2

	LBMS	LBTE
IL-6 (n = 6)	714	220
INF- γ (n = 3)	716	383
TNF- α (n = 6)	83	54

Beispiel 7: Abschätzen der Prozent an apoptotischen Zellen.

[0154] Der prozentuale Anteil an Lymphozyten, die in die Apoptose eingetreten sind, wurde einerseits in den PBL-Populationen, die für 24 Stunden mit LBMS oder LBTE kultiviert wurden, für 8 Spender und andererseits in den Populationen, die mit LES und GRE kultiviert wurden, für 9 Spender gemessen.

[0155] Die Apoptose wurde mittels Durchflusszytometrie durchgeführt unter Berücksichtigung der Größen- und Granulometriecharakteristika, die zwischen lebenden und apoptotischen Zellen bestehen, wie für Jurkat-Lymphozyten beschrieben (Thoulouze et al., J. Virol. 71, 7372–7380, 1997).

[0156] Die prozentuale Apoptose in den Kulturen mit LBMS stimulierter Lymphozyten ist signifikant höher als die in Kulturen von mit LBTE stimulierten Lymphozyten erhaltene (Mittelwert der prozentualen Apoptose von 38,35 für LBMS gegenüber 28% für LBTE).

Beispiel 8: Nachweis viraler Antigene in den Lymphozytenkulturen.

[0157] Es wurden zwei Antikörpermischungen zum Nachweis des Vorliegens viraler Antigene in den humanen Lymphozyten nachzuweisen, die in Gegenwart von Extrakten von LES- und GRE-Plexus-choroidei-CS unter den gleichen Bedingungen, wie für die Analyse der Vermehrung der TCR-(T-Zell-Rezeptor)-V β -Familien, kultiviert wurden.

[0158] Es wird (i) ein erster Pool (Pool 1) von polyklonalen Antikörpern, die in Kaninchen erhalten wurden, mit 1 µl von jedem der drei polyklonalen Antikörper und (ii) ein zweiter Pool (Pool 2) von monoklonalen Antikörpern, die nach Immunisierung von Mäusen erhalten wurden, mit 1 µl von jedem der drei monoklonalen Antikörper hergestellt. Diese polyklonalen und monoklonalen Antikörper sind gegen die Proteine gerichtet, die von den env-, gag- und pol-Sequenzen von MSRV-1, beschrieben in den Patentanmeldungen WO-A-98/23755 und WO-A-99/02666, codiert werden.

[0159] Von gesunden Spendern stammende humane Lymphozyten (10^6 Zellen pro Färbung) werden für 24 Stunden mit ultrazentrifugierten Überständen von LES- oder GRE-Plexus-choroidei-Zellen in Kontakt gebracht. Die Lymphozyten werden dann in RPMI-Medium gewaschen. Das Zellsediment wird in 500 µl Fixierungspuffer (Phosphatpuffer 3% Paraformaldehyd) aufgenommen und für 20 min bei 4°C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen in einem Permeabilisierungspuffer (Phosphatpuffer mit 1% of fötalem Kälberserum, 0,1% Natriumazid und 0,1% Saponin) werden die fixierten Zellen für 30 min bei 4°C mit 3 µl jedes der Anti-MSRV-1-Pools in einem Endvolumen von 50 µl Permeabilisierungspuffer inkubiert. Nach einmaligem Waschen mit Permeabilisierungspuffer werden die mit den Anti-MSRV-1-Antikörpern von Pool 1 inkubierten Zellen für 30 min bei 4°C mit gegen Kaninchen-Immunoglobuline gerichteten biotinylierten Antikörpern (Byosis, Verdünnung 1/2000) inkubiert, gewaschen und dann für 30 min bei 4°C mit Fluoresceinisothiocyanat-gekuppeltem Streptavidin (Strep-FITC 1/50°, Immunotech Coulter-Beckman) inkubiert. Die mit den Anti-MSRV-1-Antikörpern von Pool 2 inkubierten Zellen werden mit gegen Mausantikörper gerichteten, mit Biotin gekuppelten Antikörpern (Amersham, 1/500) und dann, nach Waschen, mit Strep-FITC inkubiert. Die in 250 µl Cell-fix resuspendierten Zellen werden dann mittels Durchflusszytometrie analysiert.

Beispiel 9: Analyse der V β -Repertoires von CD3-Lymphozyten.

[0160] Die Analyse der Repertoires von acht Spendern erfolgt durch Doppelmarkierung an Zellen, die für 24 Stunden entweder mit LBMS oder mit LBTE zusammengebracht wurden. Die gleichen Spender wurden in Gegenwart von LES und GRE getestet.

[0161] Die Prozent Zellen, die ein bestimmtes V β exprimieren, unter den CD3-Lymphozyten in den Kulturen von Lymphozyten, die mit LBMS stimuliert wurden, werden mit denen verglichen, die in den mit LBTE stimulierten Kulturen erhalten werden. Die von zwei Spendern (Spender 1 und Spender 5) als Reaktion auf LBMS (dunkle Histogramme) und LBTE (helle Histogramme) verwendeten V β -Repertoires sind in den [Fig. 1](#) (Spender 1) und 2 (Spender 5) gezeigt. Bei Spender 1 sind, mit Ausnahme von V β 7, die Prozent von V β , die zur Reaktion auf LBMS verwendet werden, identisch mit denjenigen, die zur Reaktion auf LBTE verwendet werden. Dagegen sind bei Spender 5 die Prozent an V β 3 und V β 16, die durch LBMS rekrutiert werden, verschieden von den durch LBTE rekrutierten (8,2 und 13,6 für V β 3 bzw. 2,1 und 4,2 für V β 16).

[0162] Ein 31%iger Anstieg in einer V β -Familie, bezogen auf die in den Kulturen von LBTE-Lymphozyten erhaltenen Prozent, wird als Anzeichen einer signifikanten Vermehrung einer bestimmten V β -Familie durch LBMS angesehen.

[0163] Die vergleichende Analyse unter Verwendung dieses Kriteriums ist in der nachstehenden Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3

Nr.	HLA	V β 2	V β 3	V β 5	V β 7	V β 8	V β 12	V β 13	V β 14	V β 16	V β 17	V β 21	V β 22
1	DR 2/4				X								
4	DR 13/8						X			X			
5	DR 13/14		X							X			
7	DR 3/12										X		
8	DR 3/7		X							X			
9	DR 3/13					X				X			
10	DR 4/5		X				X		X	X			X
11	DR 4/4	X					X			X			
	% Alter	12,5	37,5	0	13	13	37,5	0	12,6	75	12,5	0	12,5

[0164] Nach Kontakt mit LBMS wird Folgendes beobachtet:

75% (6/8) der Spender zeigen eine Vermehrung der V β 16-Familie,

37,5% (3/8) der Spender zeigen eine Vermehrung der V β 12-Familie,

37,5% (3/8) der Spender zeigen eine Vermehrung der V β 3-Familie und

12,5% (1/8) der Spender zeigen eine Vermehrung einer der Familien V β 2, 7, 8, 14, 17 oder 22.

[0165] Die mit den LES- und GRE-Präparationen erhaltenen Ergebnisse können durch Analyse der mit den Spendern 10 und 11 erhaltenen Repertoires veranschaulicht werden. GRE induziert die Vermehrung von V β 16. Die mit GRE erhaltenen Vermehrungen sind in der gleichen Größenordnung und von der gleichen Art, wie die mit LBMS erhaltenen.

[0166] Die V β 16-Vermehrung hängt nicht mit dem Vorliegen eines bestimmten DR zusammen, weil sie sowohl in einer DR3-Umgebung als auch in einer DR4-, DR5-, DR8-, DR13- oder DR14-Umgebung, d.h. bei 6 der 8 von den 6 Spendern exprimierten Haplotypen, erhalten werden kann.

[0167] LBMS induziert gewöhnlich in den Spendern eine hauptsächliche Vermehrung von nur einer oder zwei V β -Familien, mit Ausnahme von zwei Fällen: ein Spender zeigt gleichzeitig eine Vermehrung von V β 3, 12, 14, 16 und 22 und ein anderer gleichzeitig von V β 12 und V β 16. Die Haplotypen dieser zwei Spender sind DR4/4 bzw. DR4/5.

Beispiel 10: Analyse des V β -Repertoires von T-Lymphozyten mittels Molekularbiologie.

[0168] Das Experiment wird wie im Beispiel 5 beschrieben durchgeführt. PBL-Zellen von verschiedenen gesunden Spendern (Spender 7, 14, 19 und 18) werden gewonnen und mit zentrifugierten Sedimenten von Überständen von B-Zellen, die von MS-Patienten oder gesunden Individuen stammen, zusammengebracht. Amplifikationen der V β 16- oder V β 17-Determinante werden durchgeführt (siehe [Fig. 4A](#) und [Fig. 4B](#)).

Amplifikation der V β 16-Determinante

- A: Gesunder Spender 7 und B-Zellen von gesunden Kontrollen
- B: Gesunder Spender 7 und B-Zellen von MS-Patienten
- C: Gesunder Spender 14 und B-Zellen von MS-Patienten
- D: Gesunder Spender 14 und Kulturmedium
- E: Gesunder Spender 19 und B-Zellen von MS-Patienten
- F: Gesunder Spender 19 und Zellen von gesundem Individuum
- G: Gesunder Spender 19 und Kulturmedium
- H: Gesunder Spender 18 und B-Zellen von MS-Patient
- I: Gesunder Spender 18 und Zellen von gesundem Individuum
- J: Gesunder Spender 18 und Zellen von gesundem Individuum

Amplifikation der V β 17-Determinante

- A: Gesunder Spender 17 und B-Zellen von MS-Patient
- B: Gesunder Spender 17 und B-Zellen von gesundem Individuum
- C: Gesunder Spender 17 und Kulturmedium

[0169] Die Graphen zeigen, dass es für den gleichen gesunden PBL Spender ein unterschiedliches Profil für die gleiche V β 16- oder sogar V17-Familie gibt, die nach Inkubation mit B-Zellen von MS-Patienten oder mit B-Zellen von einem gesunden Individuum amplifiziert werden. Diese Profile sind polyklonal. Dies zeigt gut die polyklonale Aktivierung der Zellen des gesunden Spenders nach Inkubation mit konzentrierten Sedimenten aus Überständen von B-Zellen von MS-Patienten, die sich von derjenigen mit konzentrierten Sedimenten von Überständen von B-Zellen eines gesunden Individuums unterscheiden. Diese polyklonale Aktivierung deutet auf das Vorliegen von einem oder mehreren Superantigen(en) oder superantigenähnlichen Substanzen in den konzentrierten MS-Sedimenten. Diese molekularbiologische Analyse der Vermehrung von T-Zellen mit V β 16-Determinante im Anschluss an die Inkubation in Gegenwart konzentrierter MS-Sedimente bestätigt die nach Analyse mittels immunologischem Nachweis, wobei die membranständigen V β -Determinanten direkt mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen wurden, wie im Beispiel 9 beschrieben, gemachte Beobachtung.

Beispiel 11: Nachweis der Vermehrung oder des Verlusts V β -tragenden Lymphozyten in Verbindung mit MS.

[0170] Suspensionen von PBL, peripheral blood lymphocytes, die aus gesunden Spendern (Spender 5, 7, 14, 15, 19) entnommen wurden, werden mit konzentrierten Sedimenten von Überständen von B-Zelllinien (ACX, FEX, BUX) in Kontakt gebracht, die aus Blutproben von MS-Patienten, wie im Beispiel 3 beschrieben, etabliert wurden. Parallel werden diese Suspensionen mit konzentrierten Sedimenten von Überständen von B-Zelllinien (T8, T9) in Kontakt gebracht, die aus Blutproben von gesunden Patienten etabliert wurden. Nach der Inkubation wird das V β -Repertoire der CD3-Zellen mittels immunologischem Nachweis, wie im Beispiel 4 beschrieben, analysiert. Eine hauptsächliche Proliferation der T-Zellen, die die V β 16-Determinante aufweisen, wird beobachtet sowie eine Proliferation von T-Zellen mit V β 7, 14, 17 (Tabelle 4); somit wird, wie vorstehend beschrieben, eine Superantigen-Aktivität nachgewiesen, die durch die konzentrierten Sedimente von Überständen von B-Linien, die von MS-Patienten stammen, induziert wird. Die prozentuale Proliferation der T-Zellen in vitro wird wie vorstehend beschrieben bestimmt. Parallel wird in diesem Beispiel deutlich gezeigt, dass es auch mit unterschiedlichen gesunden Spendern eine Verringerung der Subpopulationen von T-Zellen, die die gleichen V β 16, 7, 14, 17 tragen, für andere Spender geben kann. Diese Verringerung kann eine Anergisierung oder Apoptose der Zellen nach der Superantigenwirkung, die durch die konzentrierten Sedimente von Zellüberständen, die von MS-Patienten stammen, induziert wird, widerspiegeln. Es sollte beachtet werden, dass 100% der getesteten gesunden PBL-Suspensionen entweder mit einer Zellvermehrung oder mit einer Verringerung der Anzahl an T-Zellen, die die V β 16-Determinante aufweisen, nach einer Inkubation mit konzentrierten Sedimenten von Überständen von B-Zellen, die von MS-Patienten stammen und Superantigen-Aktivität besitzen, reagieren.

[0171] Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

Tabelle 4

Spender	HLA DR	Vß2	Vß7	Vß14	Vß16	Vß17
5	13/14	+7,6	-38	-28	-49	-31
7	3/12	-6	-21	+37	+315	-24
14	4/14				+37	+5,13
15	3/13	+11	-24	+65	-72	-2
19	4/15				+56	

Beispiel 12: Stimulation der Cytokinproduktion.

[0172] Die Kulturen mit LBMS stimulierten Lymphozyten unterscheiden sich durch signifikant höhere Produktionen von IL-6 und INF- γ von den mit LBTE stimulierten Zellen. Die Titer an TNF- α sind dagegen sehr niedrig und für die beiden Kulturtypen äquivalent. Die Ergebnisse, ausgedrückt in pg/ml Kultur entsprechend 2×10^6 Zellen, sind in Tabelle 5 gezeigt.

Tabelle 5

	LBMS	LBTE
IL-6 (n = 6)	714	220
INF- γ (n = 3)	716	383
TNF- α (n = 6)	83	54

Beispiel 13: Nachweis viraler Antigene in den Lymphozytenkulturen.

[0173] Das Vorliegen spezifischer retroviraler Antigene wurde mithilfe von zwei Antikörperpools untersucht, die gegen MSRV-1-Proteine gerichtet waren. Die Immunfluoreszenzergebnisse an den mit ultrazentrifugierten LES- oder GRE-CS angeimpften Kulturen, die mit den zwei Pools erhalten wurden (Pool 2 = monoklonale Maus-Antikörper, Pool 1 = polyklonale Kaninchen-Antikörper) sind für die Spender 10 und 11 in Tabelle 6 dargestellt. Die Zahlen stellen die Prozent Zellen dar, die Fluoreszenzintensitäten zwischen den Kanälen 100 und 1000 zeigten.

Tabelle 6

	Spender 10		Spender 11	
	LES	GRE	LES	GRE
Pool 1	0,6	22,6	0,4	4,76
Pool 2	7,11	30,77	0,12	4,69

[0174] Die Ergebnisse sind als Prozent der Population, die eine Fluoreszenzintensität zwischen den Kanälen 100 und 1000 exprimieren, dargestellt.

[0175] Parallel zu diesen Ergebnissen hinsichtlich der MSRV-1-Antigene zeigt die Vermehrung einer beschränkten Anzahl an Vß-Familien bei einem Großteil der Spender in Abwesenheit von HLA-Restriktion, dass die Antwort einer Antwort des Superantigen-Typs ähnelt. Die Produktion von Cytokinen des inflammatorischen Typs (IL-6, IFN- γ) bestätigt das Vorliegen einer die Lymphozyten-rekrutierung fördernden Umgebung.

[0176] Das Fehlen einer TNF- α -Produktion ist ein Argument zugunsten des Fehlens von Kontamination durch bakterielle Superantigene oder LPS.

Beispiel 14: Produktion monoklonaler Antikörper.

[0177] Die Produktion monoklonaler Antikörper aus Ascites fordert eine Kompatibilität des H2-Systems zwischen dem Hybridom und der produzierenden Maus. Weibliche Balb/c-Mäuse im Alter von 6 Wochen werden einer Injektion von 0,5 ml Pristan (2,6,10,14-Tetramethylpentadecansäure) in ihre Peritonealhöhle zur Ascitesproduktion unterzogen (Porter et al., 1972). Eine Woche bis 10 Tage später werden $5 \cdot 10^6$ bis $10 \cdot 10^6$ Hybridome, verdünnt in etwa 0,5 ml sterilem 0,145 M NaCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 2,7 mM KCl, 1,5 mM KH_2PO_4 -Puffer bei pH 7,4, intraperitoneal injiziert. Der Ascites erscheint eine bis zwei Wochen später. Die in der Peritonealhöhle vorliegenden Ascitesflüssigkeiten werden anschließend nach einem Schnitt in das Peritoneum mit einer Spritze entnommen. Die gewonnene Flüssigkeit wird bei 3000 g für 15 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert, über Gaze filtriert, um das Fett zu beseitigen, dann unter Zugabe von 1/20 ihres Volumens an 1 M Tris-HCl bei pH 8,0 gepuffert. Durch dieses Verfahren lassen sich 10-mal größere Antikörpermengen erhalten als mittels Hybridomkultur erhalten werden.

[0178] Die in der Ascitesflüssigkeit enthaltenen Immunglobuline werden mithilfe von Salzen (Ammoniumsulfat oder Natriumsulfat) ausgefällt. Die Ascitesflüssigkeit wird mit 40% Ammoniumsulfat gefällt. Nach 20 Minuten in der Kälte wird die Lösung für 15 Minuten 8000 g bei 4°C zentrifugiert. Der Niederschlag wird gewaschen und im Kalten in einer 40%igen Ammoniumsulfatlösung resuspendiert, dann erneut zentrifugiert. Der neue, an IgG angereicherte Niederschlag wird in PBS-Puffer in Lösung gebracht und über Nacht gegen 25 mM Tris-HCl-Puffer, 150 mM NaCl, pH 7,4, dialysiert. Parallel wird eine Agarose-Protein-A-(oder Protein-G)-Säule (in lyophilisierter Form vertrieben, Pierce) gründlich mit dem 25 mM Tris-HCl-Puffer, 150 mM NaCl, pH 7,4, gewaschen. Die an IgG angereicherte Lösung wird auf die Säule aufgebracht, dann wird die Säule gewaschen. Die auf der Säule zurückgehaltenen IgG werden bei saurem pH (200 mM Glycin, pH 2,8) eluiert. Die eluierten Fraktionen werden mit einem Volumen 1 M Tris-Base, pH 10,5, neutralisiert. Der Immunglobulingehalt jeder erhaltenen Fraktion wird durch Ablesen der Absorption bei 280 nm (ϵ 1%, 1 cm = 14,0 Prahl und Porter, 1968) quantifiziert. Die reichen Fraktionen werden vereinigt. Der Grad der Reinigung der vereinigten IgG wird durch Elektrophorese auf Acrylamidgel in Gegenwart von SDS analysiert. Die gereinigten IgG werden über Nacht gegen den 25 mM Tris-HCl-Puffer, 150 mM NaCl, pH 7,4, dialysiert, sterilfiltriert, aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt. Ihre Endkonzentration wird durch Ablesen der Absorption bei 280 nm oder mittels BCA-Mikrotest bestimmt.

[0179] Es liegt jedoch in der Fähigkeit des Fachmanns, andere Protokolle zur Herstellung monoklonaler Antikörper festzulegen, beispielsweise ausgehend von den Techniken, die von Köhler und Milstein und Galfre G. et al. beschrieben wurden, die zuvor genannt wurden, oder von diesen hergeleiteten Techniken.

Beispiel 15: Messung der Aktivität der T-Zellen durch Zellproliferation (Sredni et al., 1981).

[0180] Die T-Zellen werden zweimal in Kulturmedium gewaschen, um jede im ursprünglichen Kulturmedium vorhandene Spur von IL2 zu beseitigen. B-Lymphozyten (EBV-LCL) oder Monozyten/Makrophagen, die als antigenpräsentierende Zellen verwendet werden, werden bei 10000 rad bestrahlt und zweimal mit Kulturmedium (RPMI) gewaschen. $2 \cdot 10^4$ T-Zellen ($2 \cdot 10^5$ Zellen/ml) und $2 \cdot 10^4$ bestrahlte autologe B-Zellen ($2 \cdot 10^5$ Zellen/ml) werden zusammen in Gegenwart eines Bereichs von ansteigenden Antigenkonzentrationen in einem Endvolumen von 200 µl in Mikrotitervertiefungen inkubiert. Nach 48-stündiger Kultur bei 37°C wird 1 µCi ^3H -Thymidin in 50 µl RPMI-Medium in jede Vertiefung gegeben. Die T-Zellen, die die einzigen sind, die sich teilen, bauen das tritierte Thymidin in die DNA ein. Nach 18-stündiger Kultur werden die Zellen jeder Mikrotitervertiefung auf Glaswollscheiben mittels Absaugen gewonnen. Nach osmotischer Lyse der Zellen wird die in die DNA eingebaute Radioaktivität auf den Scheiben absorbiert (Cell Harvester 530, Inotech). Jede getrocknete Scheibe wird in ein Kunststoffröhrchen eingebracht, das 2 ml Szintillationsflüssigkeit enthält; die auf jeder Scheibe adsorbierte Radioaktivität wird mit einem Flüssigszintillations-Beta-Zähler (LKB Rackbeta 1217) quantifiziert. Die Ergebnisse werden als arithmetisches Mittel der cpm/Kultur ("counts per minute") ausgedrückt.

Beispiel 16: Protokoll für den Nachweis einer Verbindung zwischen Peptiden und Histokompatibilitätsmolekülen (Ansatz mit APC, die mit einem Peptid transformiert werden, das an die MHCI- oder MHCII-Moleküle bindet).

1) Material (Beispiel für das MHCI-Molekül):

[0181] Die Quellen für Histokompatibilitätsmoleküle sind zurzeit zwei Haupttypen: Mutantenzellen und gereinigte Histokompatibilitätsmoleküle.

[0182] Die verwendete Mutantenzelle ist die humane T2-Zelle, eine Variante der T1-Linie, die durch Fusion

des CEM-T-Lymphoms und des B-Lymphoms 721.174 produziert wurde (Salter und Cresswell, Embo J 1986, 5: 943–949). Diese Zelle, die keine Peptidtransporter besitzt, enthält von Peptiden befreite schwere Ketten der Moleküle der Klasse I, die exogene Peptide aufnehmen können.

[0183] Klasse-I-Histokompatibilitätsmoleküle, die durch Affinitätschromatographie aus mit EBV transformierten humanen B-Zelllinien gereinigt wurden, können ebenfalls verwendet werden. In diesem Fall müssen endogene Peptide durch Behandlung mit 1,5 M Harnstoff und 12,5 mM Natriumhydroxid (pH 11,7) für 1 Stunde bei 4°C entfernt werden, gefolgt von ihrer Beseitigung auf einer Entsalzungssäule (PDLO, Pharmacia). Die Histokompatibilitätsmoleküle werden sofort wieder in einem PBS-Puffer mit 0,05% Tween 20, 2 mM EDTA, 0,1% NP40 und 6 mM CHAPS, in Gegenwart von 2 µg/ml B2m zur Erleichterung der Reassoziierung in Gegenwart der zu testenden Peptide gebracht (Gnjatic et al., Eur J Immunol 1995, 25: 1638–1642). Die getesteten Peptide haben gewöhnlich 8 bis 10, gelegentlich 11 oder 12 Reste. Sie wurden von Neosystems (Strasburg) oder von Chiron Mimotopes (Victoria, Australien) synthetisiert. Sie werden in Konzentrationen von 100 µM bis 0,1 nM verwendet.

2) Assemblierungsprotokoll (Connan et al., Eur J Immunol 1994, 24: 777; Couillin et al., Eur J Immunol 1995, 25: 728–732).

[0184] Aliquote von $8 \cdot 10^5$ Zellen in einem Volumen von 64 µl, aufgeteilt in Eppendorf-Mikrozentrifugenröhrchen, werden mit einem Lysepuffer zusammengebracht, der 10 mM PBS, pH 7,5, 1% NP40, Proteaseinhibitoren (1 mM PMSF, 100 µM Iodacetamid, 2 µg/ml Aprotinin, 10 µM Leupeptin, 10 µM Pepstatin und 10 µg/ml Trypsininhibitor) enthält. Die Lyse erfolgt in Gegenwart der zu testenden Peptide für 30 Minuten oder 1 Stunde bei 37°C. Nach Entfernen des nicht solubilisierten Materials durch Zentrifugation bei 15000 U/min bei 4°C werden 140 µl PBS mit 0,05% Tween 20, 3 mM Natriumazid, 1 mM PMSF und 10 mg/ml Rinderalbumin zum Überstand gegeben. Jede Probe wird für 20 Stunden bei 4°C in 2 Vertiefungen einer Mikrotiterplatte des Typs Nunc Maxisorb inkubiert, die mit einem monoklonalen Antikörper (10 µg/ml in PBS) vorbeschichtet sind, der die Histokompatibilitätsmoleküle mit (einer) Konformation(en) erkennt, die für die Peptidpräsentation passend ist/sind und derjenigen (denjenigen) auf der Oberfläche der Zellen ähnlich ist/sind. Die mit Antikörpern beschichtete Platte wird vor der Probenzugabe mit 10 mg/ml Rinderalbumin in PBS-Tween abgesättigt. Der sekundäre Antikörper gestattet den Nachweis der Assemblierung der angesteuerten Histokompatibilitätsmoleküle. Es ist entweder an Biotin (NHS-LC Biotin, Pierce) oder alkalische Phosphatase gekuppelt (P-552, Sigma) und wird für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Wenn Biotin verwendet wird, wird eine 45-minütige Inkubation bei 20–25°C mit an alkalische Phosphatase gekoppeltem Streptavidin (E-2636, Sigma) durchgeführt. Die Aktivität der alkalischen Phosphatase wird unter Verwendung von 100 µM 4-Methylumbelliferylphosphat (M-8883, Sigma) als Substrat in 50 mM Diethanolamin, pH 9,5, mit 1 mM $MgCl_2$ gemessen. Das Ablesen erfolgt bei 340/460 nm unter Verwendung eines Durchflussszytometers.

3) Stabilität der HLA/Peptid-Komplexe:

[0185] Die Stabilität der vorstehend genannten Komplexe wurde untersucht, weil sie die gute Präsentation des Antigens und die Induktion der T-Antwort beeinflusst. Dazu wurde entweder gereinigtes HLA oder Zelllysate verwendet. Bei dem gereinigten HLA wurden die endogenen Peptide wie in 2) beschrieben beseitigt, dann wurde es mit dem zu testenden Peptid in einem Eppendorfröhrchen bei 37°C für verschiedene Zeiten von einigen Minuten bis zu mehreren Tagen zusammengebracht. Die anschließende Inkubationsphase auf einer Platte mit 96 Vertiefungen (wie in 2 beschrieben) mit den Anti-HLA-Antikörpern erfolgt für eine Stunde bei 37°C. Das Sichtbarmachen erfolgt auf herkömmliche Weise. Beim Zelllysate werden ebenfalls alle Inkubationen bei 37°C unter Zugabe sämtlicher Proteaseinhibitoren durchgeführt.

Beispiel 17: Das MSR-V-Envelop-Protein reproduziert die dominante Stimulation der Population von T-Lymphozyten, die Vβ16-Ketten tragen, die zuvor bei Infektion durch die Fraktion, die die Virenpartikel enthält, beobachtet wurde.

[0186] Die Analyse der Vermehrung oder der Verarmung (des Verlusts) von T-Lymphozyten-Subpopulationen erfolgte mittels FACS an mononukleären Blutzellen von gesunden Spendern, im Großen und Ganzen gemäß den in den Beispielen 2, 3, 4, 9 und 11 beschriebenen Protokollen.

[0187] Tabelle 7 zeigt die Ergebnisse, die mit einer neuen MS-Virion-Charge erhalten wurden, die in MS-Plexus-choroidei-Kulturen produziert und an einer neuen Reihe von unterschiedlichen gesunden Spendern getestet wurde. Sie zeigt die Reproduzierbarkeit der hauptsächlichlichen Vβ16-Stimulation bei dem Großteil der gesunden Spender (Don 12, 15, 16, 19 und 20). Die schwache Reaktivität von zwei Spendern (Don 14 und 18) ent-

spricht einem schwachen Prozentanteil an "Non-Responder"-Spendern, die in aufeinander folgenden Reihen regelmäßig beobachtet wird. Die parallele Abnahme aller V β im Spender 13 erinnert an ein Problem mit der Lebensfähigkeit seiner Zellen, die in Stickstoff aufbewahrt und für die Kultur aufgetaut wurden. Folglich wurde dieser Spender im Folgenden nicht mehr verwendet.

Tabelle 7

	V β 2	V β 14	V β 16	V β 17
Don 12	-6	-8	50	-8
Don 13	-39	-27	-20	-52
Don 14	-19	-23	12	-4
Don 15	-30	0	75	-16
Don 16	-50	-66	88	-51
Don 18	-25	-31	5	-17
Don 19	-9	-14	43	-50
Don 20	0	17	67	0

[0188] Die Modifikation, die an den Protokollen vorgenommen wurde, die in den vorstehend genannten Beispielen beschrieben sind, besteht in dem Ersetzen der Zugabe der Fraktion, die Virionen enthält, die von MS-Zellkulturen produziert wurden, durch rekombinante Proteine, die ausgehend von den retroviralen MS-RV-Sequenzen in Verbindung mit den gleichen Quellen für Virionen produziert wurden, oder nur durch Solubilisierungspuffer.

[0189] Diese Analyse hat es bereits ermöglicht, die immunologischen Eigenschaften des Envelop-Proteins des MSRV-Retrovirus (MSRV-env) zu demonstrieren, das die hauptsächliche Stimulation der V β 16-positiven T-Lymphozyten-Subpopulation und eine kleinere Stimulation der V β 17-positiven T-Lymphozyten-Subpopulation reproduziert.

[0190] Dazu wurde gemäß molekularbiologischen Techniken, die dem Fachmann bekannt sind, ein bakterielles Expressionsplasmid mit den DNA-Insert erhalten, das den Leserahmen eines MSRV-env-Proteins codiert.

[0191] Die Sequenz des Inserts ist in SEQ ID NR: 1 angegeben.

[0192] Die Aminosäuresequenz des aus diesem Plasmid exprimierten rekombinanten Proteins ist in SEQ ID NR: 2 angegeben.

[0193] Das Expressionsplasmid gestattete es, das MSRV-env-Protein als Fusion mit einem "Polyhistidin"-Ende (HIS-Tag) zu produzieren, was seine Reinigung auf einer Affinitätssäule aus einem Extrakt rekombinanter E.-coli-Bakterien, in denen die Expression des Proteins durchgeführt wurde, ermöglichte.

[0194] Das rekombinante env-Protein wurde gereinigt und mittels SDS-PAGE-Elektrophorese in Gegenwart von Molekulargewichtsmarkern analysiert. Die Fraktionen mit spezifischer Elution des rekombinanten Proteins, das in der durch das HIS-Tag auf einer Affinitätssäule zurückgehaltenen unlöslichen Fraktion produziert wird, wurden gewonnen. Die Entsprechung mit dem an das HIS-Tag fusionierten Protein erfolgte durch Western-Blot mit einem für das HIS-Tag spezifischen Antikörper, der das Protein von 60 KD markierte, das nur in der eluierten Fraktion angetroffen wird, nach Sichtbarmachen auf einem SDS-PAGE-Elektrophoresegel. Die reichhaltigste Fraktion (etwa 0,5 mg/ml) wurde für die Zugabe zu den Zellen von gesunden Spendern bei dem immunologischen Test, der Gegenstand dieses Beispiels ist, verwendet.

[0195] Die mononukleären Blutzellen von drei Spendern (12, 15 und 16) wurden parallel für 3 Tage in Gegenwart von 10 ng/ml und 100 ng/ml des rekombinanten MSRV-env-Proteins sowie einer äquivalenten Verdünnung von nur Solubilisierungspuffer inkubiert.

[0196] Nach dreitägiger Inkubation hat die Analyse des V β -Repertoires anhand der bereits in den vorstehen-

den Beispielen beschriebenen Analysekriterien gezeigt, dass die Spender 12 und 16 durch eine Vermehrung von V β 16 und V β 17 signifikant auf das Vorliegen des MSRV-env-Proteins reagierten. Spender 16 zeigte außerdem eine V β 2-Vermehrung. Bei Spender 15 wurde keine gerichtete V β -Antwort gefunden.

[0197] Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 zusammengefasst.

Tabelle 8

Don 12	V β 2	V β 7	V β 14	V β 16	V β 17
10 ng/ml	13	-7	7	159	151
100 ng/ml	9	-9	8	212	156

Don 15	V β 2	V β 7	V β 14	V β 16	V β 17
10 ng/ml	10	4	32	-30	24
100 ng/ml	7	2	1	-4	6

Don 16	V β 2	V β 7	V β 14	V β 16	V β 17
10 ng/ml	80	-60	ND	52	156

[0198] Dies zeigt, dass das MSRV-env-Protein für die dominante Stimulation der V β 16-Subpopulationen, die mit der in den vorstehenden Beispielen verwendeten Gesamt-Virenfraktion, die die MSRV-1-Partikel enthält, beobachtet wird, aber auch für Costimulationen oder alternative Stimulationen einiger anderer Subpopulationen (z.B. V β 17 und V β 2), die mit kleinerer Häufigkeit an der Gesamtheit der bis heute getesteten gesunden Spender beobachtet wird, verantwortlich sein kann.

[0199] Diese Ergebnisse zeigen auch, dass die MSRV-1-Sequenzen, die das env-Protein codieren, unter den zuvor beschriebenen Nukleotidsequenzen herausgenommen werden können und dass die MSRV-1-env-Proteinvarianten unter den vorstehend beschriebenen Sequenzen genommen werden können, vorausgesetzt, dass die Variabilität der retroviralen Sequenzen die Stabilität einer bestimmten biologischen Eigenschaft bei einem Großteil der Varianten nicht ausschließt.

Beispiel 18: Beseitigung der Stimulation des Superantigentyps von T-Lymphozyten-Subpopulationen durch Zugaben antiviraler Medikamente.

[0200] Die Analyse der Vermehrung oder der Verarmung der T-Lymphozyten-Subpopulationen erfolgte mittels FACS an mononukleären Blutzellen gesunder Spender gemäß der in den Beispielen 2, 3, 4, 9 und 11 gegebenen Beschreibung.

[0201] An dem in den vorstehend genannten Beispielen beschriebenen Protokoll wurde eine Modifikation dahingehend vorgenommen, dass parallel in Vertiefungen, die die mononukleären Blutzellen von dem gleichen gesunden Spender enthielten, Folgendes überimpft wurde: 1) eine Fraktion, die Virionen enthielt, die durch MS-Zellkulturen produziert wurden, 2) die gleiche Virusfraktion in Gegenwart von 12,5 μ M AZT (Sigma), 3) die gleiche Virusfraktion in Gegenwart von 20 μ M DDI (Sigma). Diese Kulturen wurden mit Zellen eines Spenders durchgeführt, dessen mononukleäre Blutzellen in Aliquoten eingefroren worden waren, wobei für ein oder mehrere Aliquote unter diesen eine Wirkung des Superantigen-Typs in Gegenwart von Virionen, die von MS Kulturen stammten, gezeigt worden war (vgl. Tabelle 7).

[0202] Ferner wurden Toxizitätstests mit AZT (Azidodesoxythymidin) allein und DDI (Didesoxyinosin) allein an den gleichen Zellen durchgeführt, die keine signifikante Zellmortalität ergaben.

[0203] Die Untersuchung mit antiviralen Medikamenten hat es bereits gestattet, eine Hemmwirkung dieses Medikamententyps auf die Induktion einer Stimulation des Superantigen-Typs durch eine konzentrierte Fraktion von Überständen von Kulturen von Zellen nachzuweisen, die von an MS leidenden Patienten stammten und retrovirale Partikel in Verbindung mit MSRV-1-RNA enthielten. Die entsprechenden Ergebnisse sind in der nachstehenden Tabelle 10 dargestellt. Die mit "Medium" bezeichnete Zeile entspricht dem Medium, das das

MS-Virion ohne antiretrovirale Mittel enthält, und die mit DDI und AZT bezeichneten Zeilen beziehen sich auf in Gegenwart dieser Inhibitoren durchgeführte Tests. Die gemäß den vorstehenden Beispielen durchgeführte FACS-Analyse der T-Subpopulationen in den verschiedenen Kulturvertiefungen zeigt:

- Eine signifikante V β 16-Vermehrung von Lymphozyten, die in Gegenwart nur des "MS"-Virions inkubiert wurden, die in Gegenwart der "Kontroll-Virion"-Fraktion, die von "Nicht-MS"-Kontrollkulturen stammte, nicht gefunden wurden.
- Das Fehlen oder eine Hemmung der V β 16-Vermehrung von Lymphozyten, die in Gegenwart des "MS"-Virions und von AZT inkubiert wurden.
- Das Fehlen einer V β 16-Vermehrung von Lymphozyten, die in Gegenwart des "MS"-Virions und von DDI inkubiert wurden.

Tabelle 10

Don 12	V β 2	V β 14	V β 16	V β 17
AZT	13	-6	7	0
DDI	-4	-21	-15	-11
Medium	-6	-8	50	-8

Don 20	V β 2	V β 14	V β 16	V β 17
AZT	-3	-15	-3	16
DDI	-5	-35	-33	-19
Medium	0	17	67	0

[0204] Angesichts dieser Ergebnisse scheint es jetzt, dass jedes Medikament, Molekül oder Therapieverfahren mit einer inhibitorischen, blockierenden oder modulierenden Wirkung auf die Expression eines, insbesondere infektiösen und/oder endogenen, Retrovirus zur Hemmung der immunpathologischen Wirkung verwendet werden kann, die von dem oder den Pathogen(en) in Verbindung mit der Produktion dieser Retroviruspartikel induziert wird. Die allgemeinen Merkmale dieser immunpathologischen Wirkung sind in der vorliegenden Erfindung beschrieben.

[0205] Angesichts dieser Ergebnisse und derjenigen der Beispiele 8 und 17 scheint es jetzt, dass diese Mittel oder Therapieverfahren aus den Verbindungen ausgewählt werden könne, die auf die Expression des MS-RV-1-Retrovirus wirken.

SEQ ID NR:1 :

ATGGCCCTCCCTTATCATACTTTTCTCTTTACTGTTCTCTTACCCCCTTTTCG
CTCTCACTGCACCCCCTCCATGCTGCTGTACAACCAGTAGCTCCCCTTAC
CAAGAGTTTCTATGGAGAACGCGGCTTCCTGGAAATATTGATGCCCCATC
ATATAGGAGTTTATCTAAGGGAAACTCCACCTTCACTGCCCACACCCATA
TGCCCCGCAACTGCTATAACTCTGCCACTCTTTGCATGCATGCAAATACT
CATTATTGGACAGGGAAAATGATTAATCCTAGTTGTCCTGGAGGACTTGG
AGCCACTGTCTGTTGGACTTACTTCACCCATACCAGTATGTCTGATGGGG
GTGGAATTCAAGGTCAGGCAAGAGAAAAACAAGTAAAGGAAGCAATCTC
CCAAGTACCCGGGGACATAGCACCCCTAGCCCCTACAAAGGACTAGTT
CTCTCAAAACTACATGAAACCCTCCGTACCCATACTCGCCTGGTGAGCCT
ATTTAATACCACCCTCACTCGGCTCCATGAGGTCTCAGCCCCAAAACCCTA
CTAACTGTTGGATGTGCCTCCCCCTGCACTTCAGGCCATACATTTCAATC
CCTGTTCTGAACAATGGAACAACCTTCAGCACAGAAATAAACACCACTT
CCGTTTTAGTAGGACCTCTTGTTTCCAATCTGGAAATAACCCATACCTCA
AACCTCACCTGTGTAAAATTTAGCAATACTATAGACACAACCAGCTCCCA
ATGCATCAGGTGGGTAACACCTCCCACACGAATAGTCTGCCTACCCTCAG
GAATATTTTTTGTCTGTGGTACCTCAGCCTATCATTGTTTGAATGGCTCTT
CAGAATCTATGTGCTTCCTCTCATTCTTAGTGCCCCCTATGACCATCTACA
CTGAACAAGATTTATACAATCATGTCGTACCTAAGCCCCACAACAAAAG
AGTACCCATTCTTCCTTTTGTATCAGAGCAGGAGTGCTAGGCAGACTAG
GTACTGGCATTGGCAGTATCACAACCTCTACTCAGTTCTACTACAACTA
TCTCAAGAAATAAATGGTGACATGGAACAGGTCACTGACTCCCTGGTCA
CCTTGCAAGATCAACTTAACTCCCTAGCAGCAGTAGTCCTTCAAAATCGA
AGAGCTTTAGACTTGCTAACCGCCAAAAGAGGGGGAACCTGTTTATTTTT
AGGAGAAGAACGCTGTTATTATGTTAATCAATCCAGAATTGTCAGTGA
AAGTTAAAGAAATTCGAGATCGAATACAATGTAGAGCAGAGGAGCTTCA
AAACACCGAACGCTGGGGCCTCCTCAGCCAATGGATGCCCTGGACTCTC
CCCTTCTTAGGACCTCTAGCAGCTATAATATTTTTACTCCTCTTTGGACCC
TGTATCTTCAACTTCCTTGTTAAGTTTGTCTCTTCCAGAATTGAAGCTGTA

AAGCTACAAATAGTTCTTCAAATGGAACCCCAGATGCAGTCCATGACTA
 AAATCTACCGTGGACCCCTGGACCGGCCTGCTAGACTATGCTCTGATGTT
 AATGACATTGAAGTCACCCCTCCCGAGGAAATCTCAACTGCACAACCCC
 TACTACACTCCAATTCAGTAGGAAGCAGTTAG

SEQ ID NR:2 :

MALPYHTFLFTVLLPPFALTAPPPCCCTTSSSPYQEFLWRTRLPGNIDAPSYRSL
 SKGNSTFTAHTHMPRNCYNSATLCMHANTHYWTGKMINPSCPGGLGATVC
 WTYFTHTSMSDGGGIQGOAREKQVKEAISQLTRGHSTPSPYKGLVLSKLHETL
 RTHTRLVSLFNNTTLRLHEVSAQNPTNCWMCLPLHFRPYISIPVPEQWNNFSTEI
 NTTSVLVGPLVSNLEITHSNLTCVKFSNTIDTTSSQCIRWVTPPTRIVCLPSGIF
 FVCGTSAYHCLNGSSESMCFLSFLVPPMTIYTEQDLYNHVVPKPHNKRVPILPF
 VIRAGVLGRLGTGIGSITTSTQFYKLSQEINGDMEQVTDLSLVTLODQLNSLAA
 VVLQNRRLDLLTAKRGGTCLFLGEERCYYVNOQSRIVTEKVKEIRDRIQCRAEEL
 QNTERWGLLSQWMPWTLPLGPLAAIIFLLFGPCIFNFLVKFVSSRIEAVKLQIV
 LQMEPQMOSMTKIYRGPLDRPARLCSDVNDIEVTPPEEISTAQPLLHSNSVGSS

Bibliographische Bezugsstellen zu Vβ

- Brenden N, et al., Differential MHC expression requirements for positive selection of separate TCR Vb families, *Immunogenetics*. Jan. 1999; 49(1): 1–6.
- Hodges E, et al., T cell receptor (TCR) Vbeta gene usage in bronchoalveolar lavage and peripheral blood T cells from asthmatic and normal subjects, *Clin Exp Immunol*. Juni 1998; 112(3): 363–74.
- Allen TM, et al., The T-cell receptor beta chain-encoding gene repertoire of a New World primate species, the cotton-top tamarin, *Immunogenetics*. 1996; 45(2): 151–60.
- Yassai M, et al., Bacterial toxin superantigens stimulate all members of susceptible VB gene families, *Ann N Y Acad Sci*. 7. Juli 1995; 756: 110–2.
- Donahue JP, et al., Genetic analysis of low Vbeta 3 expression in humans, *J Exp Med*. 1. Mai 1994; 179(5): 1701–6.
- Isono T, et al., Sequence and diversity of variable gene segments coding for rabbit T-cell receptor beta chains, *Immunogenetics*. 1994; 39(4): 243–8.
- Levinson G, et al., Sequence and diversity of rhesus monkey T-cell receptor beta chain genes, *Immunogenetics*. 1992; 35(2): 75–88.
- Buitkamp J, et al., Vb6 T-cell receptor elements in artiodactyls: conservation and germline polymorphisms, *Mamm Genome*. September 1993; 4(9): 504–10.
- Johnston SL, et al., Diversity of alpha and beta subunits of T-cell receptors specific for the H4 minor histocompatibility antigen, *Immunogenetics*. 1997; 46(1): 17–28.
- Huck S, et al., Variable region genes in the human T-cell rearranging gamma (TRG) locus: V-J junction und homology with the mouse genes, *EMBO J*. März 1988; 7(3): 719–26.
- Sherman LA, et al., Comparison of the H-2Kb-specific cytolytic T lymphocyte receptor repertoire in Igh recombinant strains, *J Immunol*. Juni 1985; 134(6): 3569–73.

SEQUENZPROTOKOLL

<110> BIO MERIEUX

<120> Verfahren zum Nachweis einer Superantigen-Aktivität
in einer Probe und therapeutische oder prophylaktische
Zusammensetzung

<130> SEP21-SAg

<140>

<141>

<150> FR-9903622

<151> 1999-03-19

<150> FR-9913755

<151> 1999-10-28

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1629

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

atggccctcc cttatcatatc ttttctcttt actgttctct taccctcttt cgctctcact 60
gcacccctc catgtgtctg tacaaccagt agctccctt accaagagtt tctatggaga 120
acgcggttc ctggaaatat tgatgcccc tcatatagga gtttatctaa gggaaactcc 180
accttctctg cccacacca tatgccccg aactgctata actctgccac tctttgcatg 240
catgcaaata ctattattg gacagggaaa atgattaatc ctagttgtcc tggaggactt 300
ggagccactg tctgttggac ttacttcacc cataccagta tgtctgatgg ggggtggaatt 360
caaggctcagg caagagaaaa acaagtaaag gaagcaatct cccaactgac ccggggacat 420
agcaccctta gccctacaa aggactagtt ctctcaaac tacatgaaac cctccgtacc 480
catactcgcc tggtgagcct atttaatacc accctcactc ggctccatga ggtctcagcc 540
caaaacccta ctaactgttg gatgtgcctc ccctgcact tcaggccata catttcaatc 600
cctgttcctg aacaatggaa caacttcagc acagaaataa acaccacttc cgttttagta 660
ggacctcttg tttccaatct ggaaataacc catacctcaa acctcacctg tgtaaaattt 720
agcaatacta tagacacaac cagctcccaa tgcatcaggt gggtaacacc tcccacacga 780
atagtctgcc taccctcagg aatatttttt gtctgtggta cctcagccta tcattgtttg 840
aatggctctt cagaatctat gtgcttcctc tcattcttag tgccccctat gaccatctac 900
actgaacaag atttatacaa tcatgtcgta cctaagcccc acaacaaaag agtaccatt 960
cttccttttg ttatcagagc aggagtgtc ggcagactag gtactggcat tggcagtatc 1020
acaacctcta ctcagttcta ctacaaacta tctcaagaaa taaatggtga catggaacag 1080
gtcactgact ccctggtcac cttgcaagat caacttaact ccctagcagc agtagtcctt 1140

```

```

caaaatcgaa gagctttaga cttgctaacc gccaaaagag ggggaacctg tttattttta 1200
ggagaagaac gctgttatta tgtaatacaa tccagaattg tcaactgagaa agttaagaa 1260
attcgagatc gaatacaatg tagagcagag gagcttcaaa acaccgaacg ctggggcctc 1320
ctcagccaat ggatgccctg gactctcccc ttcttaggac ctctagcagc tataatattt 1380
ttactectct ttggacctg tatcttcaac ttccttgta agtttgtctc ttccagaatt 1440
gaagctgtaa agctacaaat agttcttcaa atggaacccc agatgcagtc catgactaaa 1500
atctaccgtg gacctctgga ccggcctgct agactatgct ctgatgttaa tgacattgaa 1560
gtcacccctc ccgaggaaat ctcaactgca caaccctac tacactccaa ttcagtagga 1620
agcagttag 1629

```

<210> 2

<211> 542

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

```

Met Ala Leu Pro Tyr His Thr Phe Leu Phe Thr Val Leu Leu Pro Pro
  1           5           10           15

Phe Ala Leu Thr Ala Pro Pro Pro Cys Cys Cys Thr Thr Ser Ser Ser
          20           25           30

Pro Tyr Gln Glu Phe Leu Trp Arg Thr Arg Leu Pro Gly Asn Ile Asp
      35           40           45

Ala Pro Ser Tyr Arg Ser Leu Ser Lys Gly Asn Ser Thr Phe Thr Ala
  50           55           60

His Thr His Met Pro Arg Asn Cys Tyr Asn Ser Ala Thr Leu Cys Met
  65           70           75           80

His Ala Asn Thr His Tyr Trp Thr Gly Lys Met Ile Asn Pro Ser Cys
          85           90           95

Pro Gly Gly Leu Gly Ala Thr Val Cys Trp Thr Tyr Phe Thr His Thr
      100           105           110

Ser Met Ser Asp Gly Gly Gly Ile Gln Gly Gln Ala Arg Glu Lys Gln
      115           120           125

Val Lys Glu Ala Ile Ser Gln Leu Thr Arg Gly His Ser Thr Pro Ser
      130           135           140

Pro Tyr Lys Gly Leu Val Leu Ser Lys Leu His Glu Thr Leu Arg Thr
      145           150           155           160

His Thr Arg Leu Val Ser Leu Phe Asn Thr Thr Leu Thr Arg Leu His

```

165	170	175
Glu Val Ser Ala Gln Asn Pro Thr Asn Cys Trp Met Cys Leu Pro Leu		
180	185	190
His Phe Arg Pro Tyr Ile Ser Ile Pro Val Pro Glu Gln Trp Asn Asn		
195	200	205
Phe Ser Thr Glu Ile Asn Thr Thr Ser Val Leu Val Gly Pro Leu Val		
210	215	220
Ser Asn Leu Glu Ile Thr His Thr Ser Asn Leu Thr Cys Val Lys Phe		
225	230	235
Ser Asn Thr Ile Asp Thr Thr Ser Ser Gln Cys Ile Arg Trp Val Thr		
245	250	255
Pro Pro Thr Arg Ile Val Cys Leu Pro Ser Gly Ile Phe Phe Val Cys		
260	265	270
Gly Thr Ser Ala Tyr His Cys Leu Asn Gly Ser Ser Glu Ser Met Cys		
275	280	285
Phe Leu Ser Phe Leu Val Pro Pro Met Thr Ile Tyr Thr Glu Gln Asp		
290	295	300
Leu Tyr Asn His Val Val Pro Lys Pro His Asn Lys Arg Val Pro Ile		
305	310	315
Leu Pro Phe Val Ile Arg Ala Gly Val Leu Gly Arg Leu Gly Thr Gly		
325	330	335
Ile Gly Ser Ile Thr Thr Ser Thr Gln Phe Tyr Tyr Lys Leu Ser Gln		
340	345	350
Glu Ile Asn Gly Asp Met Glu Gln Val Thr Asp Ser Leu Val Thr Leu		
355	360	365
Gln Asp Gln Leu Asn Ser Leu Ala Ala Val Val Leu Gln Asn Arg Arg		
370	375	380
Ala Leu Asp Leu Leu Thr Ala Lys Arg Gly Gly Thr Cys Leu Phe Leu		
385	390	395
Gly Glu Glu Arg Cys Tyr Tyr Val Asn Gln Ser Arg Ile Val Thr Glu		
405	410	415
Lys Val Lys Glu Ile Arg Asp Arg Ile Gln Cys Arg Ala Glu Glu Leu		

420	425	430
Gln Asn Thr Glu Arg Trp Gly Leu Leu Ser Gln Trp Met Pro Trp Thr		
435	440	445
Leu Pro Phe Leu Gly Pro Leu Ala Ala Ile Ile Phe Leu Leu Leu Phe		
450	455	460
Gly Pro Cys Ile Phe Asn Phe Leu Val Lys Phe Val Ser Ser Arg Ile		
465	470	475
Glu Ala Val Lys Leu Gln Ile Val Leu Gln Met Glu Pro Gln Met Gln		
485	490	495
Ser Met Thr Lys Ile Tyr Arg Gly Pro Leu Asp Arg Pro Ala Arg Leu		
500	505	510
Cys Ser Asp Val Asn Asp Ile Glu Val Thr Pro Pro Glu Glu Ile Ser		
515	520	525
Thr Ala Gln Pro Leu Leu His Ser Asn Ser Val Gly Ser Ser		
530	535	540

Patentansprüche

1. Verfahren zum Nachweis von Multipler Sklerose oder einer Prädisposition für die Entwicklung von Multipler Sklerose in einer biologischen Probe, **dadurch gekennzeichnet**, dass eine Superantigen-Aktivität nachgewiesen wird, die durch das Produkt der Expression des MSRV-1-env-Gens oder eines Fragments des MSRV-1-env-Gens induziert wird, wobei das MSRV-1-env-Gen die in SEQ ID NR: 1 dargestellte Sequenz umfasst oder daraus besteht, oder dass eine Superantigen-Aktivität nachgewiesen wird, die durch das Produkt der Expression des env-Gens einer Variante von MSRV-1 oder eines Fragments des env-Gens der Variante induziert wird, wobei das env-Gen der Variante eine Homologie von mindestens 90% mit dem MSRV-1-env-Gen besitzt, indem eine Vermehrung oder ein Verlust von Lymphozyten nachgewiesen wird, die aus Lymphozyten mit einer V β 16- und/oder V β 17-Determinante und Lymphozyten mit einer V β 7-Determinante ausgewählt sind, wobei die Vermehrung oder der Verlust mindestens 31% beträgt.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass eine Vermehrung von Lymphozyten mit einer V β 16-Determinante nachgewiesen wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass ein Verlust von Lymphozyten mit einer V β 16-Determinante nachgewiesen wird.
4. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass eine Vermehrung von Lymphozyten mit einer V β 16-Determinante und eine gleichzeitige Vermehrung von Lymphozyten mit einem V β , ausgewählt aus mindestens einem von V β 2, 3, 7, 8, 12, 14, 17 und 22 und vorzugsweise V β 3 und 12, nachgewiesen wird.
5. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass ein Verlust von Lymphozyten mit einer V β 16-Determinante und ein gleichzeitiger Verlust von Lymphozyten mit einem V β , ausgewählt aus mindestens einem von V β 2, 3, 7, 8, 12, 14, 17 und 22, vorzugsweise aus mindestens einem von V β 7, 14 und 17 und vorteilhafterweise V β 7 und 17, nachgewiesen wird.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Superantigen-Aktivität durch das Produkt der Expression des in SEQ ID NR: 1 dargestellten MSRV-1-env-Gens oder eines Fragments des MSRV-1-env-Gens induziert wird.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Superantigen-Aktivität durch das in SEQ ID NR: 2 dargestellte MSRV-1-Hüllprotein oder ein Fragment dieses Hüllproteins induziert

wird.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass die biologische Probe aus mononukleären Blutzellen ausgewählt ist.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass das Produkt der Expression des env-Gens von MSRV-1 oder des Fragments des env-Gens von MSRV-1 oder der MSRV-1-Variante aus mit MSRV-1 oder der MSRV-1-Variante infizierten Zellen, die aus Plexus-choroidei-Zellen, Leptomeninx-Zellen, Zellen etablierter Zelllinien, wie den Zellen der Zelllinien PLI-2, hinterlegt bei der ECACC am 22. Juli 1992 unter der Nummer 92072201, und LM7PC, hinterlegt bei der ECACC am 8. Januar 1993 unter der Nummer 93010817 kraft des Budapester Vertrags, ausgewählt sind, oder ausgehend von einem Expressionsvektor erhalten wird, der das env-Gen oder ein Fragment des env-Gens von MSRV-1 oder der MSRV-1-Variante umfasst, oder dadurch, dass das Expressionsprodukt des env-Gens oder des Fragments des env-Gens von MSRV-1 oder der MSRV-1-Variante ein Polypeptidmolekül ist, das aus einem Protein oder einem Fragment des Proteins ausgewählt ist, das SEQ ID NR: 2 umfasst oder daraus besteht.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, gekennzeichnet durch:

- (i) Entnahme eines Kulturüberstands von mononukleären Blutzellen oder Plexus-choroidei-Zellen oder Leptomeninx-Zellen, wobei diese Zellen von Patienten stammen, die von Multipler Sklerose betroffen sind oder von denen angenommen wird, dass sie eine Prädisposition für die Entwicklung von Multipler Sklerose haben, oder von einer etablierten Zelllinie, wie Zellen der Zelllinien PLI-2, hinterlegt bei der ECACC am 22. Juli 1992 unter der Nummer 92072201, und LM7PC, hinterlegt bei der ECACC am 8. Januar 1993 unter der Nummer 93010817 kraft des Budapester Vertrags;
- (ii) In-Kontakt-Bringen des Kulturüberstands oder eines Teils des Kulturüberstands mit einer Reihe von, vorzugsweise mindestens drei, Kulturen von mononukleären Blutzellen, die von gesunden Spendern stammen, und
- (iii) Nachweisen der Vermehrung und gegebenenfalls einer gleichzeitigen Vermehrung oder des Verlusts und gegebenenfalls gleichzeitigen Verlusts der mononukleären Blutzellen des Schrittes (ii).

11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass die von Patienten, die von Multipler Sklerose (MS) betroffen sind, stammenden mononukleären Blutzellen aus Monozyten und B-Lymphozyten ausgewählt sind und die von gesunden Spendern stammenden mononukleären Blutzellen aus T-Lymphozyten ausgewählt sind.

12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, gekennzeichnet durch:

- (i) Entnahme mononukleärer Blutzellen, wobei diese Zellen von Patienten, die von Multipler Sklerose betroffen sind, oder von Patienten, von denen angenommen wird, dass sie eine Prädisposition für die Entwicklung von Multipler Sklerose haben, und von gesunden Individuen stammen,
- (ii) In-Kontakt-Bringen der von Patienten oder gesunden Individuen stammenden mononukleären Blutzellen mit Kulturüberständen oder einer Fraktion von Kulturüberstand von Zellen, die aus mononukleären Blutzellen, Plexus-choroidei-Zellen und Leptomeninx-Zellen, von etablierten Zelllinien stammenden Zellen, wie Zellen der Zelllinien PLI-2, hinterlegt bei der ECACC am 22. Juli 1992 unter der Nummer 92072201, und LM7PC, hinterlegt bei der ECACC am 8. Januar 1993 unter der Nummer 93010817 kraft des Budapester Vertrags, ausgewählt sind, und
- (iii) Nachweisen der Vermehrung und gegebenenfalls gleichzeitigen Vermehrung oder des Verlusts und gegebenenfalls der gleichzeitigen Verringerung ausgehend von den mononukleären Blutzellen des Schrittes (i).

13. Verfahren nach den Ansprüchen 10, 11 und 12, dadurch gekennzeichnet, dass diese Vermehrung und gegebenenfalls gleichzeitige Vermehrung durch Verwendung von Liganden nachgewiesen wird, wobei jeder Ligand für eine aus V β 16, 2, 3, 7, 8, 12, 14, 17 und 22, vorzugsweise V β 16, 3 und 12, ausgewählte Determinante spezifisch ist, und dass dieser Verlust und gegebenenfalls die gleichzeitige Verringerung durch Verwendung von Liganden nachgewiesen wird, wobei jeder Ligand für eine aus V β 16, 2, 3, 7, 8, 12, 14, 17 und 22, vorzugsweise V β 16, 7, 14 und 17 ausgewählte Determinante spezifisch ist.

14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass der Ligand ein Antikörper, vorzugsweise ein monoklonaler Antikörper, oder ein Antikörperfragment ist.

15. Verfahren nach Anspruch 10, 11 und 12, dadurch gekennzeichnet, dass zum Nachweis der Vermehrung und gegebenenfalls gleichzeitigen Vermehrung oder des Verlusts und gegebenenfalls der gleichzeitigen Verringerung Folgendes durchgeführt wird:

- (i) eine Extraktion von Gesamt-RNA mononukleärer Blutzellen, die mit MS-Kulturüberstand oder einer Fraktion von MS-Kulturüberstand und mit Referenzkulturüberstand oder einer Fraktion von Referenzkulturüberstand zusammengebracht wurden,
- (ii) eine reverse Transkription der RNA,
- (iii) eine spezifische Amplifikation jeder V β -Familie mithilfe eines bestimmten Primer-Paars,
- (iv) eine Markierung der erhaltenen Amplifikationsprodukte mit jedem geeigneten Marker,
- (v) eine Elektrophorese der Amplifikationsprodukte und eine Analyse der erhaltenen Elektrophoreseprofile mithilfe eines geeigneten Detektors.

16. Verfahren nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass die von Patienten, die von MS betroffen sind, stammenden mononukleären Blutzellen aus Lymphozyten ausgewählt sind.

17. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 16, dadurch gekennzeichnet, dass ferner mindestens einer der folgenden Parameter nachgewiesen wird:
eine Stimulation der Produktion von Cytokinen, wie Interleukin-6 (IL-6) und Interferon- γ (INF- γ),
eine Induktion der Zellapoptose.

18. Verfahren nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass die beiden Parameter in Verbindung miteinander nachgewiesen werden.

19. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, gekennzeichnet durch

- (i) Produktion oder Synthese eines rekombinanten Proteins, wie in SEQ ID NR: 2 dargestellt, oder eines Fragments des Proteins,
- (ii) In-Kontakt-Bringen des Proteins oder Fragments mit einer Reihe von, vorzugsweise mindestens drei, Kulturen mononukleärer Blutzellen, die von gesunden Spendern stammen, und
- (iii) Nachweisen der Vermehrung und gegebenenfalls einer gleichzeitigen Vermehrung oder des Verlusts und gegebenenfalls der gleichzeitigen Verringerung der mononukleären Blutzellen des Schrittes (ii).

20. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, gekennzeichnet durch:

- (i) Entnahme mononukleärer Blutzellen, wobei diese Zellen von Patienten, die von MS betroffen sind, oder von Patienten, von denen angenommen wird, dass sie ein Risiko für die Entwicklung von MS besitzen, und von gesunden Individuen stammen,
- (ii) In-Kontakt-Bringen der von Patienten oder gesunden Individuen stammenden mononukleären Blutzellen mit einem Polypeptid oder einem rekombinanten Protein, wie in SEQ ID NR: 2 dargestellt, oder einem Fragment des Polypeptids oder Proteins und
- (iii) Nachweisen der Vermehrung und gegebenenfalls gleichzeitigen Vermehrung oder des Verlusts und gegebenenfalls der gleichzeitigen Verringerung ausgehend von den mononukleären Blutzellen des Schrittes (i).

21. Verfahren nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, dass das Polypeptid oder Protein von einem env-Gen, wie in SEQ ID NR: 1 dargestellt, codiert wird.

22. Verfahren zur Untersuchung der Wirksamkeit eines Mittels oder einer Zusammensetzung zur Hemmung einer Superantigen-Aktivität in einer biologischen Probe, die durch das MSRV-1-Retrovirus oder eine MSRV-1-Variante durch Expression seines/ihrer env-Gens oder eines Fragments des env-Gens induziert wird, wobei das MSRV-1-env-Gen die in SEQ ID NR: 1 dargestellte Sequenz umfasst und das env-Gen der Variante eine Homologie von mindestens 90% mit dem MSRV-1-env-Gen aufweist, gekennzeichnet durch:

- i) In-Kontakt-Bringen eines Kulturüberstands von mononukleären Blutzellen oder Plexus-choroidei-Zellen oder Leptomeninx-Zellen, wobei diese Zellen von Patienten stammen, die von einer Autoimmunkrankheit betroffen sind, oder von Zellen einer etablierten Zelllinie, wie Zellen der Zelllinien PLI-2 und LM7PC, mit von gesunden Spendern stammenden mononukleären Blutzellen in Gegenwart des Mittels oder der Zusammensetzung in zuvor bestimmten Dosen und
- (ii) Nachweisen der Hemmung der Vermehrung und gegebenenfalls gleichzeitigen Vermehrung oder der Hemmung des Verlusts und gegebenenfalls der gleichzeitigen Verringerung von Lymphozyten mit mindestens einer Determinante, ausgewählt aus V β 16, 7 und 17, unter Verwendung eines Liganden nach Anspruch 14 oder einer Amplifikation in Verbindung mit einer Elektrophorese nach Anspruch 15.

23. Verfahren nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, dass die Zellen von einem von Multipler Sklerose betroffenen Patienten stammen.

24. Verfahren nach Anspruch 22 oder 23, dadurch gekennzeichnet, dass die von Patienten, die von MS

betroffen sind, stammenden mononukleären Blutzellen aus B-Lymphozyten und Monozyten ausgewählt sind.

25. Verfahren zur Untersuchung der prophylaktischen und/oder therapeutischen Wirksamkeit eines Mittels oder einer Zusammensetzung gegen Multiple Sklerose und/oder eine Prädisposition für Multiple Sklerose, dadurch gekennzeichnet, dass eine Hemmung einer Superantigen-Aktivität in einer biologischen Probe, wie in den Ansprüchen 22 bis 24 beschrieben, nachgewiesen wird.

26. Verfahren nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, dass die Hemmung des hauptsächlichsten Verlusts von Lymphozyten mit einer V β 16-Determinante und der gleichzeitigen Verringerung von Lymphozyten mit V β 7 und 17 nachgewiesen wird.

27. Verfahren nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, dass die Hemmung der hauptsächlichsten Vermehrung von Lymphozyten mit einer V β 16-Determinante und der gleichzeitigen Vermehrung von Lymphozyten mit V β 3 und 12 nachgewiesen wird.

28. Verfahren nach einem der Ansprüche 25 bis 27, dadurch gekennzeichnet, dass die Zellen von einem von Multipler Sklerose betroffenen Patienten stammen.

29. Verfahren nach einem der Ansprüche 25 bis 28, dadurch gekennzeichnet, dass die von Patienten, die von Multipler Sklerose betroffen sind, stammenden mononukleären Blutzellen aus B-Lymphozyten und Monozyten ausgewählt sind.

30. Verfahren zur Identifikation von Substanzen, die die Transkription und/oder Translation des humanen MSRV-1-Retrovirus oder einer MSRV-1-Variante blockieren können, das/die bei Multipler Sklerose eine Superantigen-Aktivität durch Expression seines/ihres env-Gens oder eines Fragments des env-Gens induziert, wobei das MSRV-1-env-Gen die in SEQ ID NR: 1 dargestellte Sequenz umfasst und das env-Gen der Variante eine Homologie von mindestens 90% mit dem MSRV-1-env-Gen besitzt, umfassend:

In-Kontakt-Bringen der Substanz mit Zellen, die ein durch SEQ ID NR: 2 dargestelltes retrovirales Polypeptid oder ein Fragment des Polypeptids mit Superantigen-Aktivität exprimieren, und
Nachweisen eines Verlusts oder einer Verringerung der Superantigen-Aktivität, wie in den Ansprüchen 1 bis 5 beschrieben.

31. Kit zum Screening von Substanzen, die die Superantigen-Aktivität des MSRV-1-Retrovirus oder einer MSRV-1-Variante blockieren können, das/die diese Aktivität durch Expression seines/ihres env-Gens oder eines Fragments des env-Gens induziert, wobei das MSRV-1-env-Gen die in SEQ ID NR: 1 dargestellte Sequenz umfasst und das env-Gen der Variante eine Homologie von mindestens 90% mit dem MSRV-1-env-Gen besitzt, gegen Multiple Sklerose, oder die die Transkription und/oder Translation des Retrovirus blockieren können, wobei das Kit Folgendes umfasst:

Zellen, die an ihrer Oberfläche MHC-Klasse-II-Produkte exprimieren und mit dem retroviralen Superantigen, das mindestens das in SEQ ID NR: 2 dargestellte Fragment umfasst, transformiert sind und dieses funktionell exprimieren,

Zellen, die ein oder mehrere Rezeptor-V β -Ketten tragen und durch das retrovirale Superantigen stimuliert sind, wobei diese Zellen aus Lymphozyten mit einer V β 16- und/oder V β 17-Determinante und Lymphozyten mit einer V β 7-Determinante ausgewählt sind, und

Mittel zum Nachweis eines Verlusts oder einer Verringerung der Superantigen-Aktivität, wie in den Ansprüchen 1 bis 5 beschrieben, wobei die Mittel aus einem Liganden nach Anspruch 14 und einer Amplifikation in Verbindung mit einer Elektrophorese nach Anspruch 15 ausgewählt sind.

Es folgen 5 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

FIG 1

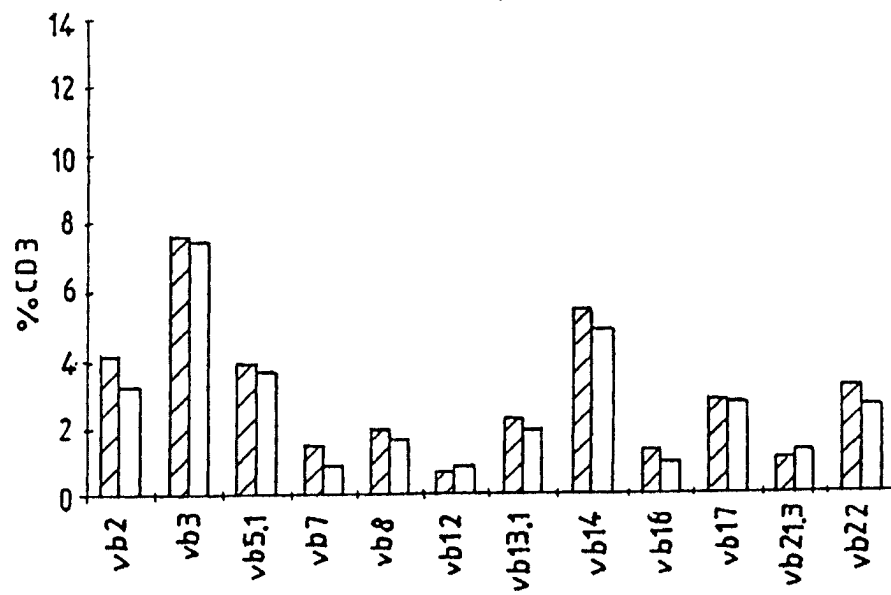


FIG 2

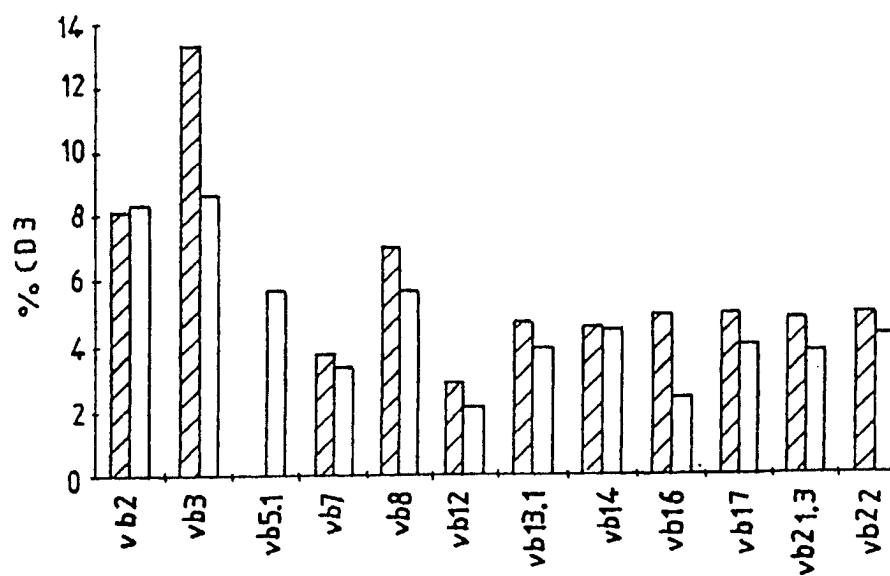
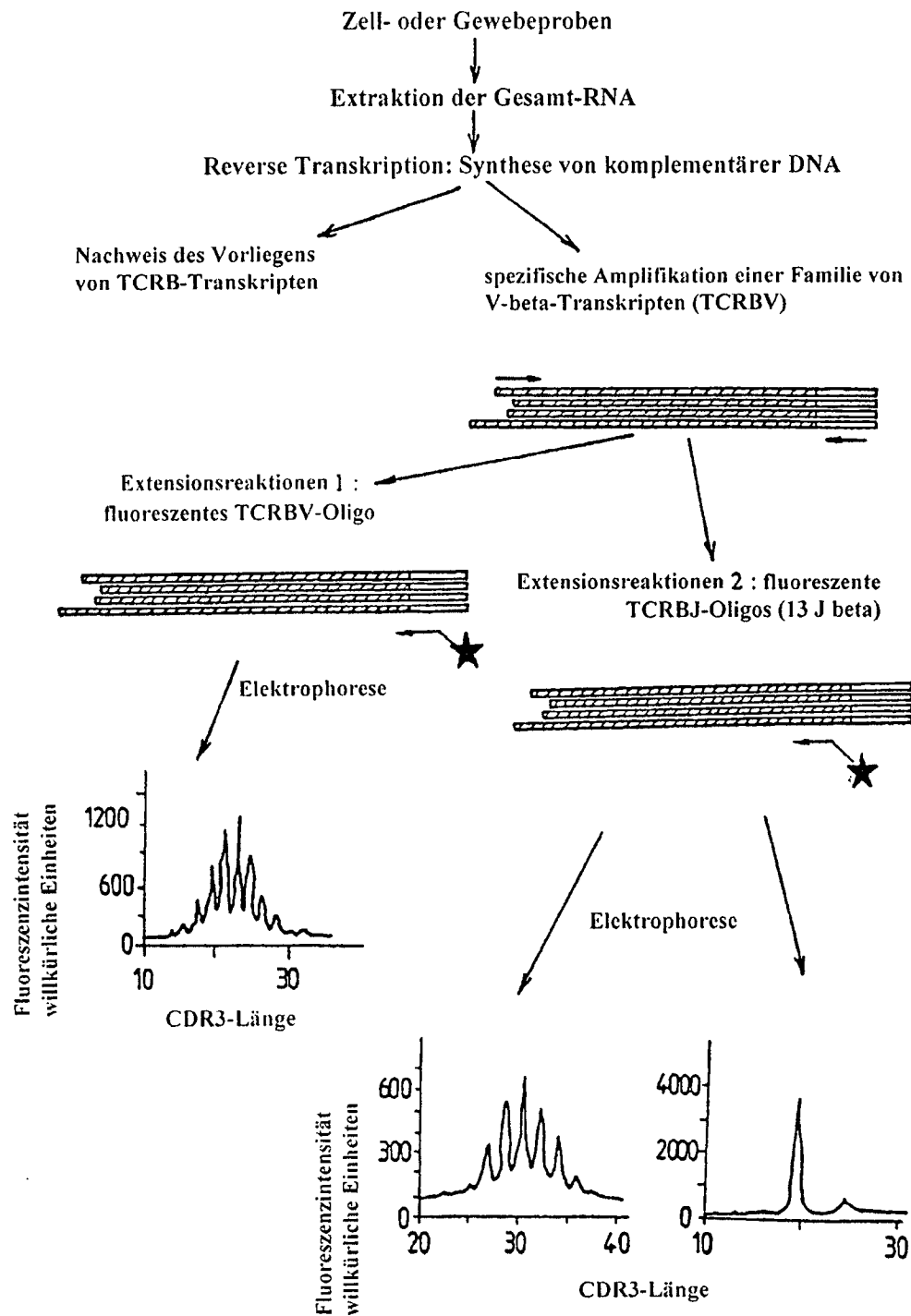


FIG 3

Allgemeines Verfahren



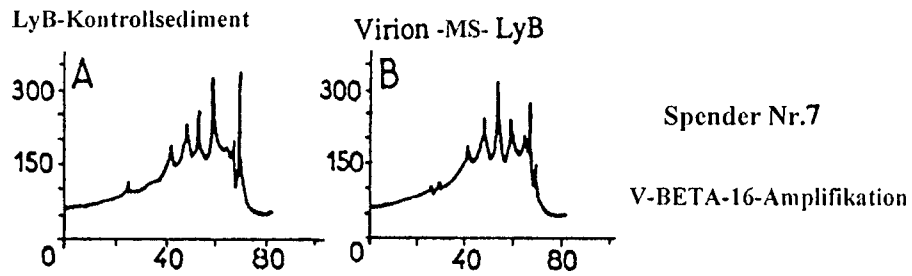
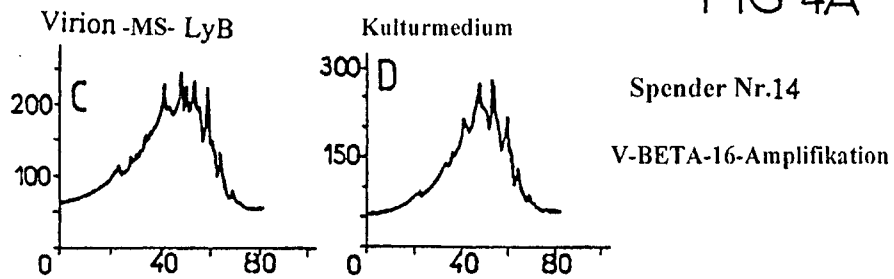
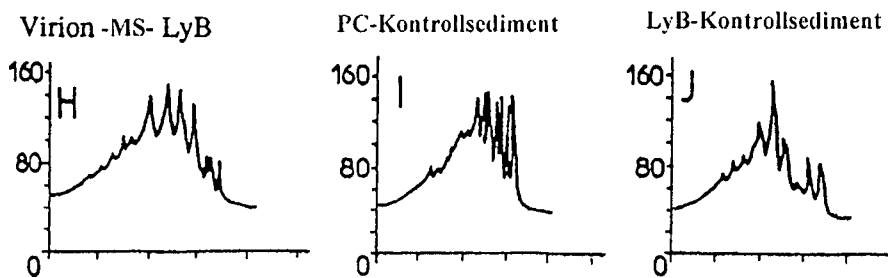
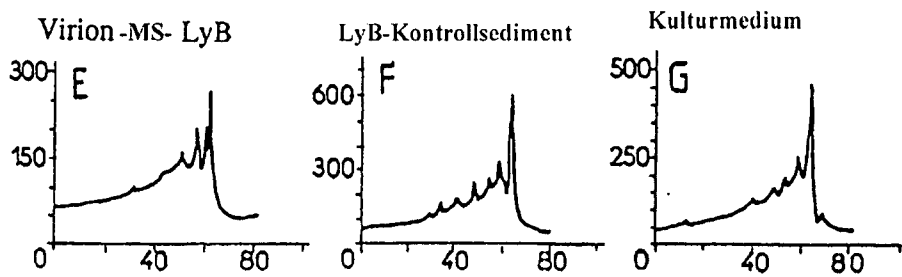


FIG 4A



Spender Nr. 19 V-BETA-16-Amplifikation



Spender Nr. 19 V-BETA-17-Amplifikation

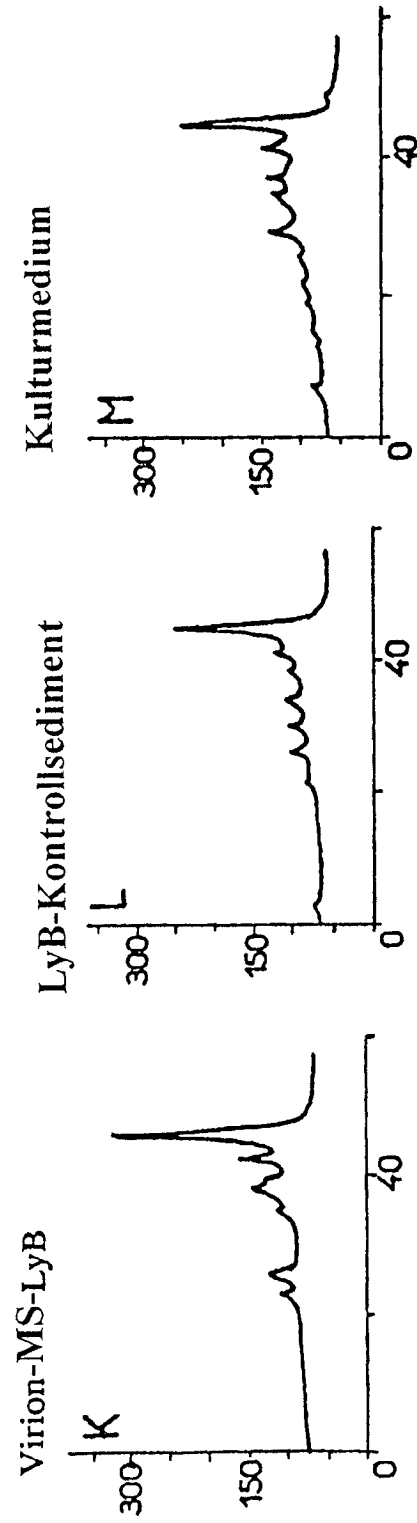


FIG 4B