



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 600 05 952 T2 2004.07.29**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 189 627 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **600 05 952.9**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/FR00/01670**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **00 951 595.8**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 00/78337**

(86) PCT-Anmeldetag: **16.06.2000**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **28.12.2000**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **27.03.2002**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **15.10.2003**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **29.07.2004**

(51) Int Cl.7: **A61K 38/17**

C07K 14/74, C07K 16/28, A61P 29/00

(30) Unionspriorität:

9907736 18.06.1999 FR

(73) Patentinhaber:

Commissariat à l'Energie Atomique, Paris, FR

(74) Vertreter:

**WINTER, BRANDL, FÜRNISS, HÜBNER, RÖSS,
KAISER, POLTE, Partnerschaft, 85354 Freising**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

**ARACTINGI, Selim, F-75007 Paris, FR;
CAROSELLA, Delfino, Edgardo, F-75016 Paris,
FR; DAUSSET, Jean, F-75005 Paris, FR; KHALIL
DAHER, Iman, F-94150 Rungis, FR; MOREAU,
Philippe, F-91170 Viry-Chatillon, FR; PAUL,
Pascale, F-75010 Paris, FR; ROUAS-FREISS,
Nathalie, F-75013 Paris, FR**

(54) Bezeichnung: **LÖSLICHE HLA-G ENTHALTENDE ZUSAMMENSETZUNGEN ZUR BEHANDLUNG ENTZÜNDLICHEN HAUTKRANKHEITEN**

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] Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von Zusammensetzungen, die lösliche Formen von HLA-G enthalten, zur Behandlung von Pathologien der Haut und insbesondere von entzündlichen Dermatosen, das Verfahren zum Erhalt solcher löslichen Formen von HLA-G, sowie Antikörper, die gegen solche löslichen Formen gerichtet sind.

[0002] Die Antigene des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC) unterteilen sich in mehrere Klassen, die Klasse I-Antigene (HLA-A, HLA-B und HLA-C), die drei globuläre Domänen aufweisen ($\alpha 1$, $\alpha 2$ und $\alpha 3$) von denen die $\alpha 3$ -Domäne mit dem $\beta 2$ -Mikroglobulin assoziiert ist, die Klasse II-Antigene (HLA-DP, HLA-DQ und HLA-DR) und die Klasse III-Antigene (Komplement).

[0003] Die Klasse I-Antigene umfassen außer den oben genannten Antigenen weitere Antigene, nicht-klassische Klasse I-Antigene genannt, und insbesondere die Antigene HLA-E, HLA-F und HLA-G; letzteres wird insbesondere durch die extravillösen Trophoblasten der normalen humanen Plazenta und die Thymusepithelzellen exprimiert.

[0004] Die Sequenz des HLA-G-Gens (Gen HLA-6.0) wurde von GERAGHTY et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1987, 84, 9145-9149) beschrieben: es umfaßt 4396 Basenpaare und weist eine Intron/Exon-Organisation auf, die zu derjenigen der HLA-A-, -B- und -C-Gene homolog ist. Im einzelnen umfaßt dieses Gen 8 Exons, 7 Introns und ein untranslatiertes 3'-Ende; die 8 Exons entsprechen jeweils: Exon 1: Signalsequenz, Exon 2: extrazelluläre $\alpha 1$ -Domäne, Exon 3: extrazelluläre $\alpha 2$ -Domäne, Exon 4: extrazelluläre $\alpha 3$ -Domäne, Exon 5: Transmembranregion, Exon 6: zytoplasmatische Domäne I, Exon 7: zytoplasmatische Domäne II (untranslatiert), Exon 8: zytoplasmatische Domäne III (untranslatiert) und untranslatierte 3'-Region (GERAGHTY et al., wie oben zitiert; ELLIS et al., J. Immunol., 1990, 144, 731-735; KIRSZENBAUM M. et al., Oncogeny of hematopoiesis. Aplastic anemia Eds. E. Gluckman, L. Coulombel, Colloque INSERM/John Libbey Eurotext Ltd). Dennoch unterscheidet sich das HLA-G-Gen von den anderen Klasse I-Genen dadurch, daß das Stopcodon für die Translation in Phase mit dem zweiten Codon von Exon 6 lokalisiert ist; folglich ist die zytoplasmatische Region des von diesem HLA-6.0-Gen codierten Proteins deutlich kürzer als die der zytoplasmatischen Regionen der Proteine HLA-A, -B und -C.

[0005] Diese HLA-G-Antigene werden im wesentlichen durch die Zytotrophoblastenzellen der Plazenta exprimiert, und man nimmt an, daß sie eine Rolle beim Schutz des Fötus spielen (keine Abstoßung durch die Mutter). Insofern das HLA-G-Antigen monomorph ist, kann es außerdem auch am Wachstum oder der Funktion der Plazentazellen beteiligt sein (KOVATS et al., Science, 1990, 248, 220-223).

[0006] Weitere Untersuchungen bezüglich dieses

nichtklassischen Klasse I-Antigens (ISHITANI et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1992, 89, 3947-3951) haben gezeigt, daß das Primärtranskript des HLA-G-Gens auf mehrere Arten gespleißt werden kann und wenigstens drei verschiedene reife mRNAs liefert: Das Primärtranskript von HLA-G liefert eine vollständige Kopie (G1) mit 1200 bp, ein Fragment mit 900 by (G2) und ein Fragment mit 600 by (G3).

[0007] Das G1-Transkript umfaßt kein Exon 7 und entspricht der von ELLIS et al. (wie oben zitiert) beschriebenen Sequenz, das heißt, daß es für ein Protein codiert, das eine Leadersequenz, drei externe Domänen, eine Transmembranregion und eine zytoplasmatische Sequenz umfaßt. Die G2-mRNA umfaßt kein Exon 3, das heißt, daß sie für ein Protein codiert, in dem die $\alpha 1$ - und $\alpha 3$ -Domäne direkt verknüpft sind; die G3-mRNA enthält weder Exon 3 noch Exon 4, das heißt, daß sie für ein Protein codiert, in dem die $\alpha 1$ -Domäne und die Transmembransequenz direkt verknüpft sind.

[0008] Das Spleißen, das für den Erhalt des HLA-G2-Antigens maßgeblich ist, führt zur Verknüpfung eines Adenins (A) (das aus der für $\alpha 1$ codierenden Domäne stammt) mit einer AC-Sequenz (die aus der für $\alpha 3$ codierenden Domäne stammt), was zur Bildung eines AAC-Codons (Asparagin) anstelle des GAC-Codons (Asparaginsäure) führt, das man zu Beginn der für die $\alpha 3$ -Domäne in HLA-G1 codierenden Sequenz antrifft.

[0009] Der Spleißvorgang zum Erhalt von HLA-G3 führt nicht zur Bildung eines neuen Codons in der Spleißzone.

[0010] Die Autoren dieses Artikels haben ferner die verschiedenen exprimierten Proteine analysiert: Die 3 mRNAs werden in der Zelllinie .221-G in Protein translatiert.

[0011] Einige der Erfinder haben die Existenz weiterer gespleißter Formen von HLA-G-mRNA gezeigt: Das HLA-G4-Transkript, das kein Exon 4 beinhaltet; das HLA-G5-Transkript, das Intron 4 zwischen den Exons 4 und 5 beinhaltet, was auch zu einer Änderung des Leserasters bei der Translation dieses Transkripts und insbesondere zum Auftreten eines Stopcodons nach Aminosäure 21 von Intron 4 führt; und das HLA-G6-Transkript, das Intron 4 besitzt, aber Exon 3 verloren hat (KIRSZENBAUM M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1994, 91, 4209-4213; Europäische Patentanmeldung EP 0 677 582; KIRSZENBAUM M. et al., Human Immunol., 1995, 43, 237-241; MOREAU P. et al., Human Immunol. 1995, 43, 231-236); sie haben ferner gezeigt, daß diese verschiedenen Transkripte in mehreren fötalen und adulten humanen Zelltypen exprimiert werden, besonders in Lymphozyten (KIRSZENBAUM M. et al., Human Immunol., 1995, wie oben zitiert; MOREAU P. et al., Human Immunol. 1995, wie oben zitiert).

[0012] Es gibt also wenigstens 6 verschiedene HLA-G-mRNAs, die potentiell für 6 Proteinisoformen von HLA-G codieren, davon 4 membranständige (HLA-G1, G2, G3 und G4) und 2 lösliche Isoformen

(G5, G6).

[0013] Es wurde gezeigt, daß die Expression dieser Proteinisoformen von HLA-G durch Interferon γ erhöht wird (Yang et al., J. Immunol., 1996, 156, 4224-4231).

[0014] Die immunmodulatorische Funktion, die von diesen HLA-G-Molekülen ausgeübt wird, wurde beschrieben, und die Mechanismen dieser Funktion wurden durch Aufzeigen ihrer Wechselwirkung mit die Lyse inhibierenden Rezeptoren auf den NK-Zellen (KIR-Rezeptoren) aufgeklärt, die zu einer Inhibition der zytotoxischen Funktionen dieser Zellen führen; N. ROUAS-FREISS et al. (Proc. Nat. Acad. Sci., 1977, 94, 5249-5254) haben beispielsweise gezeigt, daß K562-Targetzellen (humane Erythroleukämie), die mit dem HLA-G-Gen transfiziert waren, vor Lyse durch NK-Zellen geschützt waren. Diese Zellen sind gewöhnlich für NK-Zellen sensitiv.

[0015] Einige der Erfinder haben gezeigt, daß die NK-Zellen kein HLA-G-Transkript exprimieren (Teyssier et al., Nat. Immunol., 1995, 14, 262-270), und dieses Ergebnis bestätigt, daß die Expressionsprodukte des HLA-G-Gens wahrscheinlich bei den physiologischen (Schwangerschaft) oder pathologischen Stadien der Immuntoleranz eine Rolle spielen, bei denen die NK-Zellen besonders aktiv (Autoimmunerkrankungen, Transplantationen) oder im Gegenteil inhibiert sind (anomale Präsenz von HLA-G auf bestimmten Tumoren oder bei Virusinfektionen).

[0016] Auf diese Weise haben einige der Erfinder auch gezeigt, daß bestimmte Tumoren HLA-G-Moleküle exprimieren, was es ihnen ermöglicht, der Immunüberwachung zu entgehen (Paul et al., Proc. Nat. Acad. Sci., 1998, 95, 4510-4515).

[0017] Eine häufige chronische entzündliche Pathologie ist Psoriasis, die bei 2% der Individuen kaukasischer Populationen beobachtet wird. Obwohl die Krankheit durch eine Hyperproliferation der Keratinozyten der Epidermis gekennzeichnet ist, konnte durch sehr viele physiopathologische Studien gezeigt werden, daß T-Lymphozyten des Subtyps Th1, die die Läsionsstelle infiltrieren und Interleukin 2 (IL-2) und Interferon γ (IFN- γ) produzieren, eine herausragende Rolle bei der Pathogenese dieser Krankheit spielen (Z. Bata-Csorgo et al., J. Investigative Dermatol., 1995, 89S-94S; Schlaak et al., J. Invest. Dermatol., 1994, 102, 145-149; Vogel et al., Eur. J. Biochem., 1995, 227, 143-149). Tatsächlich wurde gezeigt, daß der Überstand von T-Zellklonen, die von Psoriasisläsionen stammen, in der Lage war, die Hyperproliferation der Epidermis zu induzieren (Strange et al., J. Invest. Dermatol., 1993, 101, 695-700). Ebenso wurde gezeigt, daß die Beibehaltung des psoriatischen Phänotyps von verpflanzten humanen Hautbiopsien bei SCID-Mäusen von der Co-Injektion der von diesen Läsionen stammenden T-Lymphozyten abhängig war (Gilhar et al., J. Invest. Dermatol., 1997, 109, 283-288).

[0018] Die Expression von HLA-G durch Hautzellen und seine potentielle Rolle bei den damit verbunde-

nen Pathologien wurde von Ulbrecht et al. (Eur. J. Immunol., 1994, 24, 176-180) untersucht. Die Autoren dieses Artikels, die lediglich die Expression der Transkripte der membranständigen Isoformen von HLA-G und insbesondere der dominanten Isoform HLA-G1 untersuchen, zeigen, daß während eine geringe Menge an HLA-G-Transkripten in den Hautbiopsien mit Psoriasisläsionen gefunden wird, HLA-G-Transkripte in Biopsien gesunder Haut, die von verschiedenen Individuen stammen, entweder fehlen oder in erhöhten Mengen vorliegen. Diese Autoren schließen hieraus folglich, daß es zwischen der Expression von HLA-G und den Pathologien der Haut keinen offensichtlichen Zusammenhang gibt.

[0019] Die Erfinder haben nun gefunden, daß lösliche Isoformen von HLA-G eine therapeutische Wirkung auf entzündliche pathologische Zustände der Haut haben.

[0020] Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung einer Zusammensetzung, die im wesentlichen aus wenigstens einer löslichen Form von HLA-G und wenigstens einem pharmazeutisch verträglichen Trägerstoff (Exzipient) besteht, zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von entzündlichen pathologischen Zuständen der Haut.

[0021] Die Exzipienten in Verbindung mit dieser Zusammensetzung sind dem gewünschten Verabreichungsweg angepaßt; sie werden aus fachmännisch bekannten Exzipienten ausgewählt.

[0022] Diese löslichen HLA-G können vorteilhaft auf allgemeinem Wege (oralen Weg, parenteralen Weg) oder auf lokalem Wege (topische Verabreichung) verabreicht werden.

[0023] In letztgenanntem Fall liegt die Zusammensetzung in Form von Creme, Lotionen, Liposomen oder Gel vor.

[0024] Die Erfinder haben unerwarteterweise gefunden, daß in den entzündlichen Läsionen der Haut sowohl HLA-G-Protein exprimierende Makrophagen vorliegen, die in den Papillen der Dermis lokalisiert sind, als auch infiltrierende CD3⁺-T-Lymphozyten, die eine der zytotoxischen Funktionen inhibierenden Rezeptor exprimieren, der von HLA-G erkannt wird, wie beispielsweise den Rezeptor ILT2.

[0025] Die Erfinder haben gezeigt, daß die dominante membranständige Isoform HLA-G1 und die lösliche Isoform HLA-G5 nur in den entzündlichen Läsionen der Haut exprimiert werden, während in gesunder Haut kein HLA-G-Protein gefunden wird.

[0026] Die Erfinder haben auch gezeigt, daß das HLA-G-Protein und insbesondere eine Isoform, die wenigstens die α 1-Domäne von HLA-G umfaßt, in der Lage ist, die Proliferationsfunktionen und die zytotoxischen Funktionen der T-Lymphozyten zu inhibieren.

[0027] So haben die Erfinder also die entzündungshemmende Wirkung des HLA-G-Proteins und insbesondere einer Zusammensetzung, die aus einer diffundierenden löslichen Form besteht, die wenigstens die α 1-Domäne von HLA-G umfaßt, wie beispielswei-

se die Isoform HLA-G5, bei der Behandlung von entzündlichen Pathologien der Haut gezeigt.

[0028] Erfindungsgemäß ist diese Zusammensetzung insbesondere auf die Behandlung von Psoriasis ausgerichtet.

[0029] Gemäß einer vorteilhaften Ausführungsform der Erfindung wird diese lösliche Form von HLA-G aus der Gruppe ausgewählt, die aus den löslichen HLA-G-Isoformen, die wenigstens eine extrazelluläre Domäne ($\alpha 1$, $\alpha 2$ oder $\alpha 3$) umfassen, und den solubilierten Formen von HLA-G1, HLA-G2, HLA-G3 oder HLA-G4 (membranständige Isoformen) besteht.

[0030] Diese löslichen HLA-G umfassen wenigstens die extrazelluläre $\alpha 1$ -Domäne.

[0031] Diese löslichen Formen werden insbesondere in einem Baculovirus produziert.

[0032] Was die membranständigen Formen betrifft, so werden sie vorteilhaft nach dem in der Internationalen Patentanmeldung PCT WO 98/37098 beschriebenen Verfahren in Eukaryontenzellen exprimiert und dann durch Behandlung der Membran (Abspaltungsmittel wie Papain) und zweckmäßige Reinigung, beispielsweise über eine Immunaффinitätssäule mit spezifischen Antikörpern, solubiliert.

[0033] Unter löslicher Form von HLA-G werden daher auch die löslichen HLA-G (die keine Transmembrandomäne umfassen) verstanden, wie die beispielsweise unter den oben genannten Bedingungen solubilierten membranständigen HLA-G.

[0034] Vorzugsweise umfaßt die auf topischem Wege verabreichte Zusammensetzung zwischen 0,1 und 5 $\mu\text{g/ml}$, vorzugsweise zwischen 0,5 und 2,5 $\mu\text{g/ml}$ lösliche Form von HLA-G.

[0035] Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch ein Verfahren zur Herstellung eines löslichen HLA-G, das dadurch gekennzeichnet ist, daß es die folgenden Schritte umfaßt:

- Co-Infektion von Insektenzellen mit einem Baculovirus, das die cDNA für das $\beta_2\text{M}$ enthält, und einem weiteren Baculovirus, das die α -Kette einer löslichen Isoform von HLA-G enthält;
- Kultivierung der transfizierten Insektenzellen, und
- Ernte der Überstände und Reinigung der exprimierten löslichen HLA-G-Isoform.

[0036] Gemäß einer vorteilhaften Form zur Durchführung dieses Verfahrens wird die lösliche HLA-G-Isoform mit Hilfe eines für die löslichen HLA-G-Isoformen spezifischen Antikörpers gereinigt.

[0037] Gemäß einer vorteilhaften Variante dieser Durchführungsform wird der Antikörper durch Immunisierung von nicht-humanen Säugern, wie Kaninchen, mit einem immunogenen Peptid erhalten, das aus einem synthetischen Peptid mit 21 Aminosäuren besteht, das dem durch Intron 4 kodierten C-terminalen Teil der löslichen Formen von HLA-G entspricht, dessen Sequenz SKEGDG GIMSVRESRSLSEDL (SEQ ID NO: 1) ist, das an das Trägerprotein KLH gekoppelt ist.

[0038] Neben den vorausgehenden Ausführungsformen umfaßt die Erfindung noch weitere Ausführungsformen, die aus der nachfolgenden Beschreibung hervorgehen, die sich auf Beispiele für die Durchführung des Verfahrens, das Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist, sowie auf die anliegenden Zeichnungen bezieht, wobei:

[0039] die **Fig. 1** und **2** die Anwesenheit der RNAs der verschiedenen HLA-G-Isoformen in Psoriasisläsionen im Vergleich mit gesunder Haut zeigen;

[0040] **Fig. 3** die Anwesenheit der für die Isoform HLA-G5 spezifischen RNA in den Psoriasisläsionen im Vergleich mit gesunder Haut zeigt;

[0041] **Fig. 4** die inhibierende Aktivität der HLA-G-Isoformen auf natürliche Killerzellen (NK-Zellen) in peripherem Blut veranschaulicht; diese Figur gibt auf der Abszisse die untersuchte Isoform und auf der Ordinate die Prozent spezifische Lyse an. M8-Zellen (Melanomzelllinien HLA-Klasse I⁺, Klasse II⁻), die entweder mit dem Vektor allein (M8-pCDNA) (Invitrogen) oder mit Vektoren, die die für HLA-G1 codierende cDNA (M8-HLA-G1), die für HLA-G2 codierende cDNA (M8-HLA-G2), die für HLA-G3 codierende cDNA (M8-HLA-G3), die für HLA-G4 codierende cDNA (M8-HLA-G4) enthielten, transfiziert waren, werden als Targets (T) verwendet. Mononukleäre periphere Blutzellen, PBMC, werden als Effektorzellen (E) verwendet. Die Ergebnisse sind als Prozent Lyse ausgedrückt, die nach 4 h in einem Test auf Freisetzung von Chrom 51 (⁵¹Cr) beobachtet wird;

[0042] **Fig. 5** die inhibierende Aktivität der HLA-G-Isoformen auf eine auf HLA-A2 beschränkte CD³+T-Lymphozytenlinie veranschaulicht, die ein virales Peptid präsentiert, das von der Matrix des Influenzavirus, Positionen 58 bis 66, stammt; diese Figur gibt auf der Abszisse die untersuchte Isoform und auf der Ordinate die spezifische prozentuale Lyse an; das Verhältnis Effektorzellen/Targetzellen beträgt 15:1.

[0043] Es versteht sich jedoch, daß diese Beispiele lediglich der Veranschaulichung des Gegenstands der Erfindung dienen und diese in keiner Weise beschränken.

BEISPIEL 1: Herstellung einer löslichen Form einer HLA-G-Isoform mit einem Baculovirus.

[0044] Die lösliche Isoform HLA-G5, deren Struktur sich aus 3 extrazellulären $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ - und $\alpha 3$ -Domänen zusammensetzt und die mit dem $\beta 2$ -Mikroglobulin ($\beta 2\text{M}$) assoziiert ist, stammt von einem alternativen Transkript, das ein Stopcodon in Intron 4 des HLA-G-Gens besitzt. Die Produktion eines rekombinanten löslichen HLA-G-Proteins setzt eine Co-Infektion von Insektenzellen mit einem Baculovirus, das die komplementäre DNA für $\beta 2\text{M}$ enthält, und einem weiteren Baculovirus, das die cDNA für die α -Kette von HLA-G5 enthält, voraus. Dies erlaubt es tatsächlich, die physiologische Form HLA-G5/ $\beta 2\text{M}$ zu erhalten.

1. Konstruktion von Transfervektoren für die Rekombination mit dem BacTen-Virus.

a) Insertion des β 2M-Gens in einen Transfervektor:

Die für β 2M codierende DNA-Sequenz wird in die BglIII-KpnI-Stellen des Transfervektors pTen12 (Quantum) inseriert. Der rekombinante Klon wird durch Enzymverdau überprüft und dann zur Co-Transfektion mit der linearisierten DNA des BacTen-Baculovirus amplifiziert und sterilisiert.

b) Insertion des für HLA-G5 codierenden Gens in einen Transfervektor:

Die für das HLA-G5-Molekül codierende Sequenz wird in die BglIII-KpnI-Stellen des Transfervektors pTen12 inseriert. Der rekombinante Klon wird durch Enzymverdau überprüft und dann zur Co-Transfektion mit der linearisierten DNA des BacTen-Baculovirus (Quantum) amplifiziert und sterilisiert.

2. Konstruktion von rekombinanten Baculoviren.

[0045] Der erste Schritt besteht in der Herstellung von rekombinanten Baculoviren mit HLA-G5A einerseits und β 2M andererseits. Die beiden Transfervektoren, die die β 2M- und HLA-G5A-Gene tragen, werden zur Co-Transfektion von Sf9-Insektenzellen in Kultur mit linearem BacTen zusammengegeben. Die Überstände der Co-Transfektion werden geerntet und es wird eine Klonierung mit Plaques durchgeführt, um die rekombinanten Baculovirusklone zu isolieren. Um die Beschaffenheit der Konstruktion sicherzustellen, wird die DNA der viralen Klone extrahiert und die Insertion des Gens in den richtigen viralen Locus wird durch PCR überprüft. Für jede der Konstruktionen wurden sechs Klone erhalten und jeder diente dazu, erneut Sf9-Zellen zu infizieren. Dann wurden die Kulturüberstände sowie die Zellen nach Zentrifugation zurückgewonnen. Dieses Protein wird durch Immunität mit Hilfe von PAG5-6-Antikörpern gereinigt (siehe Beispiel 4). Die Struktur des Proteins wird durch Western Blot zusammen mit PAG5-6-Antikörpern (anti-HLA-G5) und BIG6-Antikörpern (Immunotech) (anti- β 2M), die für die lösliche Form HLA-G5 bzw. das β 2M spezifisch sind, überprüft. Von den 6 HLA-G5-produzierenden und den 4 β 2M-produzierenden Klonen wurde jeweils einer ausgewählt. Ein HLA-G5 α -Klon und ein β 2M-Klon wurden für die Co-Infektion der Sf9-Zellen eingesetzt. Durch Western Blot-Analyse und Immunpräzipitation mit einem W6/32-Konformationsantikörper (IgG2a, anti- α -Ketten von HLA-Klasse I, die mit β 2-M assoziiert sind (Sigma)) kann man zeigen, daß der Überstand dieser Co-Infektion das HLA-G5-Protein assoziiert mit β 2M enthält; es stellt also eine der physiologischen Form verwandte Form dar. Diese Sf9-Zellen erlauben es also, große Mengen von löslichem HLA-G5-Protein zu erhalten.

BEISPIEL 2: Nachweis der Regulatorrolle von HLA-G bei den mit Psoriasis verbundenen T-abhängigen Phänomenen.

1. Herkunft der Hautbiopsien

[0046] Hautbiopsien mit typischen Plaques von Läsionen chronischer Psoriasis, die von Patienten stammten, die innerhalb der letzten 15 Tage vor dem Tag der Biopsie weder lokal noch generell behandelt worden waren, wurden analysiert.

[0047] Gesunde Hautbiopsien, die von Patienten stammten, die einer operativen Brustreduktion unterzogen worden waren, wurden als negative Kontrollen verwendet.

[0048] Die Proben werden in zwei Partien aufgeteilt, ein Teil wird zur Analyse mit RT-PCR sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und der verbleibende Teil wird zur immunhistochemischen Analyse in OCT (Miles Inc Diagnostics Division) eingelagert.

2. Nachweis der HLA-G-Transkripte insgesamt und des für die lösliche HLA-G5-Isoform spezifischen Transkripts in Hautbiopsien mit Psoriasisläsionen

a) Material und Methoden

[0049] Die Messenger-RNAs werden aus eingefrorenen Biopsien von 6 Proben psoriasisgeschädigter Haut (Pso1-Pso6, **Fig. 1** und **3**) und von 4 normalen Hautproben (gesunde Haut **1** bis gesunde Haut **4**, Figuren 2 und 3) unter den folgenden Bedingungen extrahiert; die Proben werden mit dem Reagens RNA Now (Biogentex, Inc.) zusammengegeben und mit einem Ultraturrax-Homogenisator (IKA Labortechnik) gemäß den Angaben des Herstellers homogenisiert. Die Qualität des RNA-Extrakts wird durch Gelelektrophorese auf 1,5%iger Agarose unter denaturierenden Bedingungen überprüft. 5 μ g RNA werden mit einem Oligo dT-Primer mit 12 bis 18 Oligonukleotiden (Gibco BRL) und reverser Transkriptase von Moloney-Virus (M-MLV) 1 h bei 42°C revers in cDNA transkribiert. Dann wird die erhaltene cDNA durch PCR einerseits mit Primern, die die gesamten HLA-G-Transkripte erkennen [Sonde G.257 (Exon 2) und 3G.U (untranslatiertes 3'-Ende)], die zur PCR-Amplifikation der HLA-G-Transkripte verwendet werden, die den verschiedenen bekannten Isoformen von HLA-G entsprechen (**Fig. 1** und **2**), und andererseits mit Primern, die für die Sequenz von löslichem HLA-G5 spezifisch sind, nämlich den Primern G.526 und G.i4b (**Fig. 3**), amplifiziert.

[0050] Im einzelnen sind die verschiedenen eingesetzten Primer und Sonden also die folgenden:

- G.526 (Exon 3) und G3.U (3' UT) für die Isoformen G1, G4 und G5;
- G.526 (Exon 3) und G.i4b (Intron 4) für die G5-Isoform;
- G.-3 (der teilweise die Exons 2 und 4 abdeckt) und G3.U (3' UT) für die Isoformen G2 und G6;

– G.3-4 (der teilweise die Exons 2 und 5 abdeckt) und G3.U (3' UT) für die G3-Isoform.

[0051] Die PCR-Bedingungen sind wie folgt: 1 min bei 90°C, 90 s bei 65°C (61°C für das Primerpaar G.526 und G.i4b) und 2 min bei 72°C, für 35 Zyklen. Die PCR-Produkte werden durch Gelelektrophorese auf 1,5%iger Agarose aufgetrennt.

[0052] Die Transkripte des β -Actins werden für 16 Zyklen mit Hilfe spezifischer Primer (Clontech) co-amplifiziert, um die RNA-Menge zwischen den verschiedenen Proben zu normieren.

[0053] Dann werden die PCR-Produkte auf ein Nylonmembran transferiert (Hybond N⁺, Amersham), mit einer radiomarkierten Sonde hybridisiert und die Intensität des Hybridisierungssignals wird densitometrisch quantifiziert.

[0054] Die spezifischen HLA-G-Sonden sind die folgenden:

- GR, spezifisch für Exon 2, die alle HLA-G-Transkripte erkennt, und
- G.14 F, spezifisch für Intron 4, die nur das HLA-G5-Transkript erkennt.

[0055] Die obigen Primer und Sonden werden bei P. MOREAU et al., C.R. Acad. Sci. Paris, Sciences de la vie/Life Sciences, 1995; 318; 837-42) beschrieben.

[0056] Die cDNA der Choriokarzinomzellen JEG-3 (ATCC), die ein erhöhtes Transkriptionsniveau für HLA-G besitzen, werden als positive Kontrolle verwendet. Bei den obigen Tests wird die Linie JEG-3 in einem DMEM-Medium (Sigma) kultiviert, das mit 10% hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum, Antibiotika und 2 mM L-Glutamin supplementiert ist. Die Zelllinien enthalten keine Mykoplasmen.

[0057] Die spezifischen HLA-G-Banden werden durch Hybridisierung mit der spezifischen Sonde GR nachgewiesen, die in Exon 2 lokalisiert ist. Die PCR-Produkte, die bei derselben Reaktion mit den Primern für das β -Actin coamplifiziert wurden, werden mit Hilfe einer β -Actin-Sonde auf derselben Membran nachgewiesen.

b) Ergebnisse

[0058] Die Ergebnisse sind in den **Fig. 1 bis 3** gezeigt.

[0059] Die HLA-G-Transkripte werden in allen Proben geschädigter Haut mit Psoriasisläsionen und nur in 2 von 4 Proben gesunder Haut nachgewiesen. Mit Ausnahme einer Probe (Probe 3) werden in den Proben geschädigter Haut nur die Transkripte nachgewiesen, die den Isoformen HLA-G1 und HLA-G5 entsprechen. In den Biopsien geschädigter Haut von 6 Kranken mit Psoriasis liegt ein höheres Transkriptionsniveau für HLA-G vor, insbesondere was die Isoform G1/G5 betrifft ($p < 0,05$; **Fig. 1 und 3**).

[0060] In diesen Proben fehlt das Signal für die lösliche Isoform HLA-G5 bei 4 Testproben normaler Haut (**Fig. 3**), findet sich aber bei 3 der 6 Patienten

mit Psoriasis (**Fig. 3**).

[0061] Die Ergebnisse zeigen insgesamt, daß die Transkriptmenge für HLA-G1 und G-5 bei den Hauptbiopsien mit Psoriasisläsionen höher ist als bei den Proben gesunder Haut und daß das HLA-G5-Transkript nur in den Hautbiopsien mit Psoriasisläsionen exprimiert wird.

3. Nachweis des HLA-G-Proteins in Hauptbiopsien mit Psoriasisläsionen

a) Material und Methoden

a₁) Immunhistochemie

[0062] Aus eingefrorenen Proben wurden Kryostat-schnitte hergestellt und dann wurden die Schnitte in Aceton bei –20°C 20 min lang entwässert und an der offenen Luft getrocknet.

[0063] Die Immunmarkierung erfolgt mit Hilfe des Dako EnVision+System Peroxidase (AEC)-Kits (Dako) gemäß den Instruktionen des Herstellers.

[0064] Die verwendeten Antikörper sind die folgenden:

- 87G und 01G, spezifisch für HLA-G (HLA-G1 bis -G5) und 16G1, spezifisch für HLA-G5 (D. Geraghty, Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, USA),
- 4H84, spezifisch für die HLA-G-Isoformen in denaturierter Form (M. McMaster, San Francisco, USA) – anti-ILT2, der einen an der Bindung an HLA-G beteiligten KIR erkennt (Navarro et al., Eur. J. Immunol., 1999, 29, 277-283),
- W6/32: anti-Klasse I Antigen des MHC (Sigma)
- anti-CD3 (Sigma)
- anti CD14 (Sigma)
- Maus-IgG2a. Kontrollantikörper (Sigma).

a₂) Doppelmarkierung

[0065] Die Doppelmarkierungen erfolgen mit den folgenden Antikörperpaaren:

- 87G und anti-CD68
- 87G und anti-CD11c (Dako)
- anti-ILT2 und anti-CD3

[0066] Die angewandten Bedingungen sind die folgenden; nach Inkubation mit normalem Ziegenerum werden die Schnitte mit dem ersten Antikörper (**87G** oder anti-ILT2) 60 min lang inkubiert, gespült und dann mit einem Ziege-anti-Maus-IgG-Antikörper, der an Texasrot gekoppelt ist, inkubiert. Anschließend werden die Schnitte gespült und 30 min lang mit dem zweiten, an Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) gekoppelten Antikörper: anti-CD68- oder anti-CD11c-Antikörper, wenn der erste Antikörper **87G** ist, oder anti-CD3-Antikörper, wenn der erste Antikörper anti-ILT2 ist, inkubiert.

[0067] Bei den Kontrollschnitten wird der erste Antikörper (**87G** oder anti-ILT2) durch den Kontrollanti-

körper (Maus-IgG2a) ersetzt.

[0068] Die Schnitte werden dann mittels Konfokal-Lasermikroskopie analysiert.

b) Ergebnisse

b₁) Nachweis der Gesamtheit der HLA-G-Proteine und des löslichen HLA-G5-Proteins in Hautbiopsien

[0069] Bei Verwendung des 87G-Antikörpers oder des 01G-Antikörpers, die alle HLA-G-Isoformen erkennen, wird keine Expression des HLA-G-Proteins in den Proben gesunder Haut nachgewiesen.

[0070] Umgekehrt wird in den 9 Hautproben mit Psoriasisläsionen die Expression von HLA-G in Papillenzellen der Dermis nachgewiesen. Das Expressionsniveau von HLA-G variiert abhängig von den Proben; es ist in manchen Proben erhöht. Außerdem wird nur bei zwei Proben auch die Expression von HLA-G in der Epidermis, in den dem Infiltrat entzündlicher Zellen der Dermis nahen Zonen entweder in isolierten Herden entzündlicher Zellen oder in ein paar Keratinozyten nachgewiesen. Die Lokalisation von HLA-G in diesen wenigen Keratinozyten hängt wahrscheinlich mit der Diffusion der HLA-G5-Isoform aus Dermiszellen zusammen, die diese Isoform exprimieren.

[0071] Bei Verwendung des 16G1-Antikörpers, der spezifisch die lösliche HLA-G5-Isoform erkennt, wird auch eine spezifische Markierung der Papillenzellen der Dermis nachgewiesen.

b₂) Lokalisation der Zellen, die HLA-G exprimieren, in den Psoriasisläsionen

[0072] Die Doppelmarkierungen mit dem 87G-Antikörper und dem anti-CD3-Antikörper oder dem anti-CD14-Antikörper zeigen, daß HLA-G mit Zellen co-lokalisiert ist, die CD14 exprimieren, umgekehrt wird keine Co-Lokalisation von HLA-G mit den T-Lymphozyten (CD3⁺) beobachtet.

b₃) Die Zellen, die HLA-G exprimieren, sind CD68⁺, CD11c⁺-Makrophagen

[0073] Die Markierung der seriellen Schnitte von Hautproben mit Psoriasisläsionen mit den Antikörpern **87G** und anti-CD68 oder anti-CD11c, die spezifisch die Makrophagen erkennen, zeigt, daß quasi die Gesamtheit der Zellen, die HLA-G exprimieren, auch CD68 und CD11c exprimieren und daher Makrophagen sind.

b₄) Der KIR-Rezeptor vom ILT2-Typ liegt in den T-Lymphozyten vor, die Psoriasisläsionen infiltrieren

[0074] Die Markierung der Hautbiopsien mit Psoriasisläsionen mit dem anti-ILT2-Antikörper zeigt die Anwesenheit eines dichten Infiltrats in der oberen Dermis. Umgekehrt wird in der Dermis der Proben ge-

sunder Haut keine Markierung nachgewiesen. Außerdem zeigen Doppelmarkierungsversuche mit den anti-CD3- und anti-ILT2-Antikörpern in den Papillen der Dermis die Anwesenheit einiger doppelt markierter Zellen.

[0075] Zusammenfassend zeigen die oben dargestellten Ergebnisse insgesamt, daß:

- die Expression der HLA-G-RNAs in gesunder Haut schwach oder nicht nachweisbar ist und das HLA-G-Protein fehlt,
- in den Psoriasisläsionen eine erhöhte Expression der RNAs und des Proteins der Isoformen HLA-G1 und -G5 vorliegt,
- die HLA-G-Expression in den Psoriasisläsionen in Makrophagen lokalisiert ist und
- in den Psoriasisläsionen die infiltrierenden T-Lymphozyten einen die zytotoxischen Funktionen inhibierenden Rezeptor exprimieren, der von HLA-G erkannt wird (ILT2-Rezeptor).

[0076] Diese Ergebnisse zeigen die Anwesenheit in Psoriasisläsionen sowohl von Zellen, die HLA-G exprimieren (Makrophagen der Papillen der Dermis), als auch von infiltrierenden, für die Psoriasisläsionen verantwortlichen Zellen (CD3⁺-T-Lymphozyten), die einen die zytotoxischen Funktionen inhibierenden Rezeptor exprimieren, der von HLA-G erkannt wird (ILT2-Rezeptor).

[0077] Folglich zeigen diese Ergebnisse die direkte Rolle von HLA-G und insbesondere der dominanten membranständigen Isoform HLA-G1 und der diffundierenden löslichen Isoform HLA-G5 bei der lokalen Regulation der T-abhängigen Phänomene, die für Psoriasis verantwortlich sind.

BEISPIEL 3: Rolle der extrazellulären α 1-Domäne von HLA-G bei der Inhibierung der Immunfunktionen und Anwendung bei der Behandlung von Psoriasis

1. Rolle der extrazellulären α 1-Domäne von HLA-G bei der Inhibierung der zytotoxischen Aktivität von NK-Zellen und T-Zellen

a) NK-Zellen

[0078] Die Verwendung von Zellen, die mit jeder der Isoformen HLA-G1, -G2, -G3 oder -G4 transfiziert sind, als Targetzellen gegenüber immunkompetenten natürlichen Killerzellen, die in peripherem Blut vorhanden sind, erlaubt es zu zeigen, daß jede der Isoformen in der Lage ist, die zytotoxische Aktivität der natürlichen Killerzellen zu inhibieren (**Fig. 4**). Diese Versuche wurden bei mehr als zehn freiwilligen gesunden Spendern durchgeführt und die Signifikanz der von jeder der Isoformen ausgeübten Inhibierung wurde durch statistische Tests validiert (**Fig. 4**).

b) T-Zellen

[0079] Ähnliche Zytotoxizitätstests, die in vitro mit

den gleichen Targetzellen gegenüber CD8+-T-Zellen durchgeführt wurden, die durch den MHC beschränkt waren und für ein antigenes Peptid spezifisch waren, haben ebenfalls gezeigt, daß jede der Isoformen HLA-G1, -G2, -G3 und -G4 die zytotoxische Aktivität dieser T-Zellen signifikant inhibiert (**Fig. 5**).

[0080] Auf Grundlage der Struktur der HLA-G3-Isoform, die lediglich aus der extrazellulären α 1-Domäne besteht, die sämtliche oben beschriebenen inhibierenden Eigenschaften besitzt, kann man auf die Funktionalität dieser Domäne schließen. Diese Domäne enthält folglich das funktionelle Motiv von HLA-G und kann daher im Hinblick auf eine Immuntoleranz als pharmakologisches Mittel verwendet werden.

2. Anwendung zur Behandlung von Psoriasis

[0081] Die direkte Rolle von HLA-G und insbesondere der dominanten membranständigen Isoform HLA-G1 und der diffundierenden löslichen Isoform HLA-G5 bei der lokalen Regulation der T-abhängigen Phänomene, die für Psoriasis verantwortlich sind, wurde in Beispiel 2 gezeigt.

[0082] Die Rolle von HLA-G und insbesondere der α 1-Domäne dieser Isoformen bei der Inhibierung der T-Funktionen wurde oben gezeigt.

[0083] Folglich zeigen die Ergebnisse insgesamt, daß eine pharmazeutische Zusammensetzung, die diese HLA-G-Isoform insbesondere in diffundierender löslicher Form enthält, wie die Isoform HLA-G5, eine schützende Rolle bei der Behandlung von Psoriasis spielt.

BEISPIEL 4: Produktion eines als PAG5-6 bezeichneten Antikörpers, der spezifisch die löslichen Formen von HLA-G (HLA-G5 und HLA-G6) erkennt, in Form eines polyklonalen, aus Kaninchen erhaltenen Serums.

[0084] Die Immunisierung von Kaninchen mit einem immunogenen Peptid, das aus einem synthetischen Peptid mit 21 Aminosäuren besteht, das dem C-terminalen Teil entspricht, der von Intron 4 der löslichen HLA-G-Formen codiert wird und dessen Sequenz SKEGDGGIMSVRESRSLSEDL (SEQ ID NO: 1) ist, das an das Trägerprotein KLH gekoppelt ist, erlaubt es ein polyklonales Serum zu erhalten, das bei den Methoden der Immunpräzipitation, des Immunblottings (Western Blot), der Immunhistochemie und bei immunenzymatischen Methoden vom Typ ELISA spezifisch die löslichen Formen von HLA-G (HLA-G5 und HLA-G6) erkennt. Dieses Serum wurde an einer Affinitätssäule (Protein G-Sepharose) gereinigt und kann sowohl zum Nachweis als auch zur Titration und zur Reinigung der löslichen HLA-G-Formen dienen.

Patentansprüche

1. Verwendung einer Zusammensetzung, die im

wesentlichen aus wenigstens einer löslichen Form von HLA-G und wenigstens einem pharmazeutisch verträglichen Trägerstoff besteht, zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von entzündlichen pathologischen Zuständen der Haut.

2. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die lösliche Form von HLA-G ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus den löslichen HLA-G-Isoformen, die wenigstens die extrazelluläre α 1-Domäne umfassen, und den solubilisierten Formen von HLA-G1, HLA-G2, HLA-G3 oder HLA-G4.

3. Verwendung nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Zusammensetzung zwischen 0,1 und 5 μ g/ml, vorzugsweise zwischen 0,5 und 2,5 μ g/ml lösliche Form von HLA-G umfaßt.

4. Verfahren zur Herstellung eines löslichen HLA-G, dadurch gekennzeichnet, daß es die folgenden Schritte umfaßt:

- Coinfektion von Insektenzellen mit einem Baculovirus, das die cDNA für das β ₂M enthält, und einem weiteren Baculovirus, das die α -Kette einer löslichen HLA-G-Isoform enthält;
- Kultivierung der transfizierten Insektenzellen, und
- Ernte der Überstände und Reinigung der exprimierten löslichen HLA-G-Isoform.

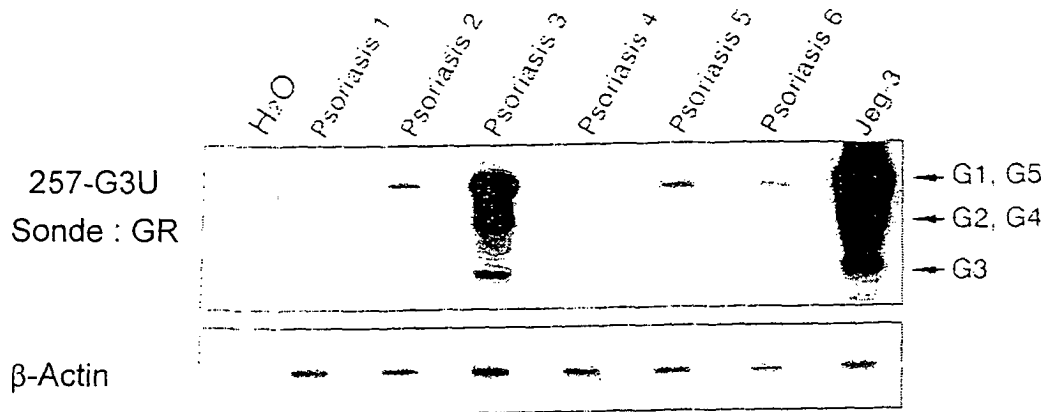
5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die lösliche HLA-G-Isoform mit Hilfe eines für die Isoformen von löslichem HLA-G spezifischen Antikörpers gereinigt wird.

6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß der Antikörper durch Immunisierung von nicht-humanen Säugern, insbesondere Kaninchen, mit einem immunogenen Peptid gemäß SEQ ID NO:1, das an das Trägerprotein KLH gekoppelt ist, erhalten wird.

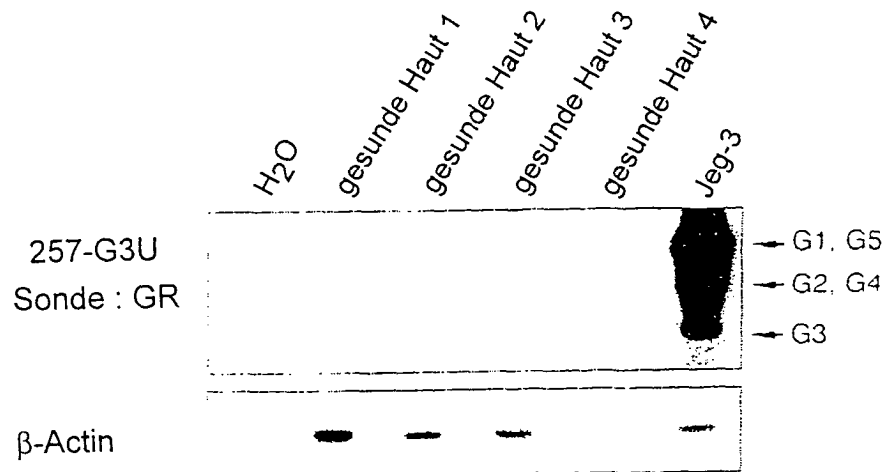
7. Antikörper gegen lösliches HLA-G, dadurch gekennzeichnet, daß er durch Immunisierung von nicht-humanen Säugern, insbesondere Kaninchen, mit einem immunogenen Peptid erhalten ist, das aus einem synthetischen Peptid mit 21 Aminosäuren gemäß SEQ ID NO:1 besteht, das an das Trägerprotein KLH gekoppelt ist.

Es folgen 4 Blatt Zeichnungen

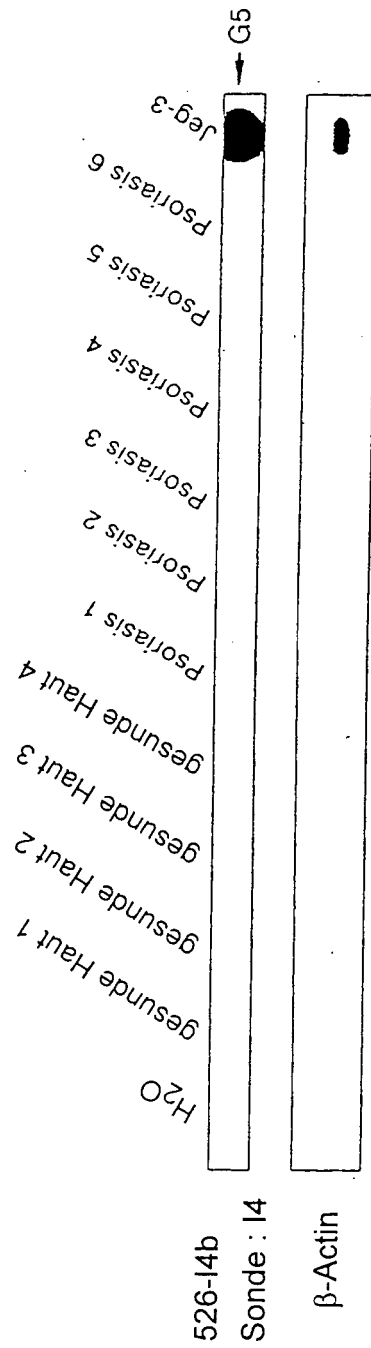
Anhängende Zeichnungen



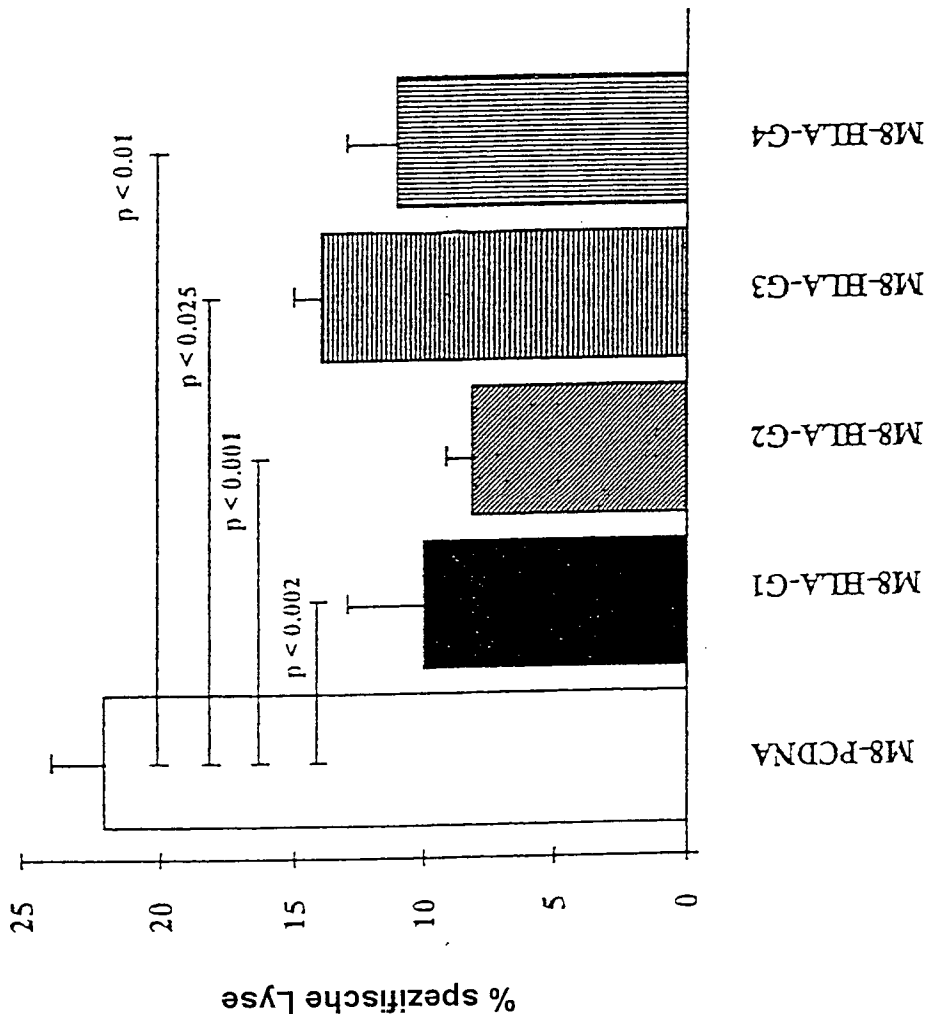
FIGUR 1



FIGUR 2

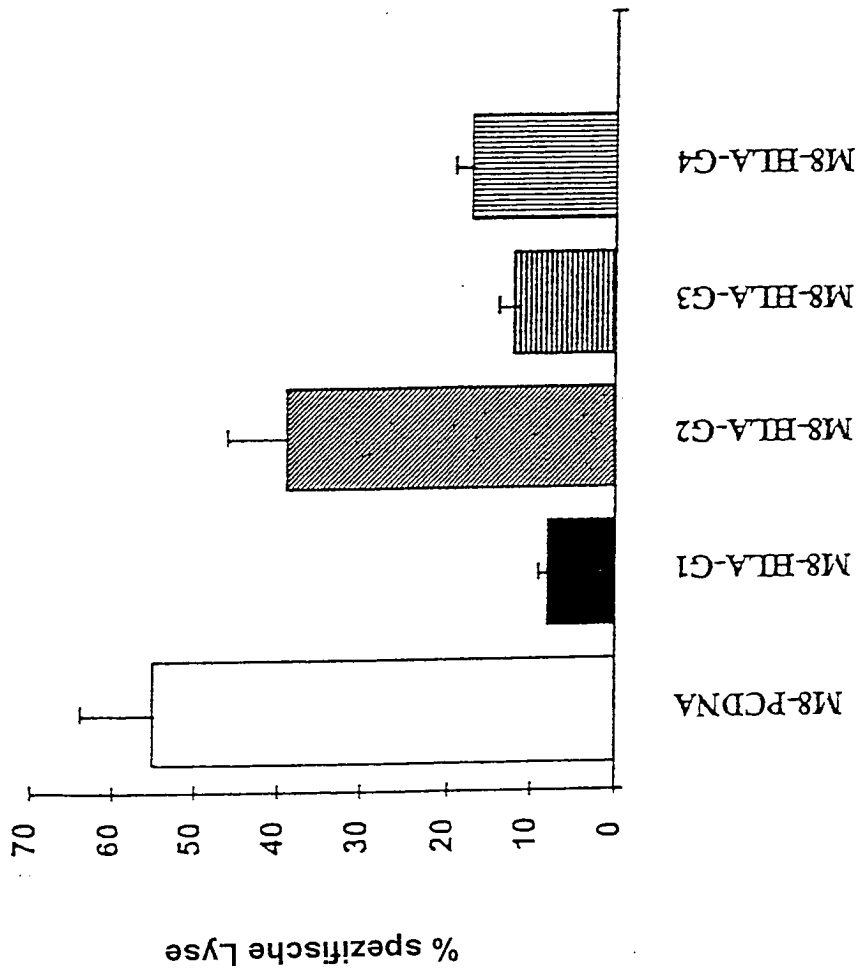


FIGUR 3



Verhältnis Effektor : Target 50 : 1

FIGUR 4



Verhältnis Effektor : Target 15 : 1

FIGUR 5