

(19)



österreichisches
patentamt

(10)

AT 503 387 A1 2007-10-15

(12)

Österreichische Patentanmeldung

(21) Anmeldenummer: **A 513/2006**

(22) Anmeldetag: **27.03.2006**

(43) Veröffentlicht am: **15.10.2007**

(51) Int. Cl.⁸: **A61K 38/17** (2006.01),
A61P 31/06 (2006.01),
A61P 31/18 (2006.01)

(73) Patentanmelder:

UNIVERSITÄT WIEN
A-1010 WIEN (AT)

(72) Erfinder:

BULGHERESI SILVIA DR.
WIEN (AT)
OTT JÖRG DR.
WOLFSGRABEN (AT)

(54) **PHARMAZEUTISCHE ZUSAMMENSETZUNG ZUR VORBEUGUNG VON INFEKTIONEN**

(57) Die vorliegende Erfindung ist auf eine Klasse von Polypeptiden mit der allgemeinen Formel

GWX₁RX₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈X₉LX₁₀X₁₁X₁₂X₁₃LX₁₄
WX₁₅X₁₆ADX₁₇X₁₈CKX₁₉X₂₀X₂₁GRLVVX₂₂RT
X₂₂DX₂₃X₂₄X₂₅FLX₂₆X₂₇NX₂₈LKX₂₉X₃₀X₃₁X₃₂X₃₃X₃₄WVGLX₃₅X₃₆X₃₇X₃₈X₃₉X₄₀X₄₁RTWX₄₂W
SDGTX₄₃X₄₄X₄₅X₄₆X₄₇X₄₈X₄₉X₅₀X₅₁X₅₂X₅₃WX₅₄X₅₅X₅₆EPDAX₅₇GEEECAX₅₈X₅₉X₆₀YX₆₁X₆₂
X₆₃X₆₄X₆₅X₆₆X₆₇X₆₈X₆₉NDX₇₀X₇₁CX₇₂X₇₃X₇₄C
X₇₅X₇₆X₇₇X₇₈FICE

gerichtet, wobei X_{1bis77} = eine genetisch codierte Aminosäure. Diese Polypeptide können an virale und bakterielle Antigene binden und zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Vorbeugung von Infektionskrankheiten verwendet werden.

AT 503 387 A1 2007-10-15

Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung ist auf eine Klasse von Polypeptiden mit der allgemeinen Formel

**GWX₁RX₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈X₉LX₁₀X₁₁X₁₂X₁₃LX₁₄WX₁₅X₁₆ADX₁₇X₁₈CKX₁₉X₂₀X₂₁GRLVVX₂₂R
TX₂₂DX₂₃X₂₄X₂₅FLX₂₆X₂₇NX₂₈LKX₂₉X₃₀X₃₁X₃₂X₃₃X₃₄WVGLX₃₅X₃₆X₃₇X₃₈X₃₉X₄₀X₄₁RTWX₄₂WSDGTX₄₃X₄₄X₄₅X₄₆X₄₇X₄₈X₄₉X₅₀X₅₁X₅₂X₅₃WX₅₄X₅₅X₅₆EPNDAX₅₇GEEECAX₅₈X₅₉X₆₀Y
X₆₁X₆₂X₆₃X₆₄X₆₅X₆₆X₆₇X₆₈X₆₉NDX₇₀X₇₁CX₇₂X₇₃X₇₄CX₇₅X₇₆X₇₇X₇₈FICE**

gerichtet, wobei X_{1bis77} = eine genetisch codierte Aminosäure. Diese Polypeptide können an virale und bakterielle Antigene binden und zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Vorbeugung von Infektionskrankheiten verwendet werden.

NACHGEREICHT

Pharmazeutische Zusammensetzung zur Vorbeugung von Infektionen

Die Erfindung bezieht sich auf eine pharmazeutische Zusammensetzung zur Vorbeugung und/oder Behandlung von viralen und bakteriellen Infektionen.

Die Erkennung von Krankheitserregern durch dendritische Zellen (DCs) ist einer der wichtigsten Schritte beim Induzieren einer schützenden Immunität. Zum Auslösen einer adaptiven Immunreaktion nehmen unreife DCs, die in peripheren Schleimhautgeweben im ganzen Körper lokalisiert sind, Krankheitserreger wahr und geben ihre Informationen an Lymphozyten weiter. DCs exprimieren ein Repertoire von Krankheitserreger erkennenden Rezeptoren, einschließlich calciumabhängiger Lektine (CTLs; Weis et al. 1998). CTLs erkennen spezifische Kohlenhydratstrukturen, die an den Zellwandkomponenten von Krankheitserregern vorhanden sind, und internalisieren Krankheitserreger zum Abbau in Lysosomzellen, um die Antigenverarbeitung und -präsentation durch DCs zu steigern.

Bei den meisten durch DCs exprimierten CTLs handelt es sich um Transmembranproteine des Typs II (Figdor et al. 2002), welche eine einzige Kohlenhydraterkennungsdomäne (CRD) enthalten (Weis et al. 1998), in der zwei Calciumbindungsstellen an einer Schleife vorhanden sind, die aus der Proteinoberfläche herausragt (Dickramer 1988).

Das CTL DC-SIGN (ein Nicht-Integrin, das DC-spezifische interzelluläre Adhäsionsmoleküle ergreift) wird durch Haut-DCs und ebenso in den Schleimhautgeweben durch interstitielle DCs in der Lunge, im Mastdarm, im Gebärmutterhals und in der Plazenta sowie in den Lymphknoten exprimiert (Geijtenbeek et al. 2000, Kammerer et al. 2003). DC-SIGN wirkt als Rezeptor für mehrere Viren, einschließlich HIV-1 (Geijtenbeek et al. 2002), Ebolavirus, Cytomegalovirus (CMV), Hepatitis-C-Virus und Denguevirus (Alvarez et al. 2002, Halary et al. 2002, Navarro-Sanchez et al. 2003, Tassaneetrithep et al. 2003, Gardner et al. 2003, Pohlmann et al. 2003, Lozach et al. 2003, Simmons et al. 2003).

Aus der WO 01/64752 ist bekannt, dass der Rezeptor DC-SIGN eine Infektion von T-Lymphozyten mit HIV ermöglicht.

HIV-1 bindet durch hochaffine Interaktionen zwischen der CRD des DC-SIGN und N-gekoppelten Hochmannose-Kohlenhydratketten am Virushüllen-Glycoprotein gp120 an DC-SIGN (Feinberg et al. 2001, Mitchell et al. 2001, Mizuochi et al. 1990). Dieser hochaffine Virus-Attachment-Faktor kann die Infektionseffizienz permissiver Zellen wahrscheinlich

NACHGEREICHT

durch Erhöhung der Geschwindigkeit der Virushaftung an der Zelloberfläche steigern (Lee et al. 2001).

Nicht virale Krankheitserreger, wie z.B. *Mycobacterium tuberculosis* und *Helicobacter pylori*, interagieren ebenfalls mit DC-SIGN durch LPS-Strukturen. *M. tuberculosis* interagiert nämlich mit DC-SIGN durch Lipoarabinomannan (LAM), das Mannosereste enthält, die ausschließlich aus Mono-, Di- und Trimeren von α -D-Mannosen bestehen, die direkt an den Arabinofuranosyl-Enden angekoppelt sind (ManLAM; Geijtenbeek et al. 2003), während *H. pylori* durch das Lewis X (Le^X , CD15)-Glykanantigen interagiert (Gal β 1,4(Fuc α 1,3)GlcNAc; Appelmek et al. 2003).

DC-SIGN kann ein molekulares Ziel für klinische Eingriffe bei Infektionen durch Krankheitserreger darstellen. Es zeigte sich, dass die Mannose-spezifischen Pflanzenlektine GNA (*Galanthus nivalis*-Agglutinin) und HHA (*Hippeastrum hybrid*-Agglutinin) gp120 binden und dabei dessen Erkennung durch DC-SIGN verhindern und den Eintritt von HIV-1 blockieren. Diese Eigenschaft macht Pflanzenlektine zu Hauptkandidaten für Arzneimittel zur Verwendung als mikrobizide Mittel zur Verhinderung der sexuellen Übertragung einer HIV-Infektion (Balzarini et al. 2003 a;b).

Diese Lektine zeigen jedoch eine immunmodulierende Wirkung (Borrebaeck & Carlsson, 1989, Vijayakumar et al. 1994, Klipatrick 1995), welche möglicherweise in klinischer Hinsicht nicht günstig, aber tatsächlich ein zweischneidiges Schwert ist. Daher ist die Suche nach neuen starken Bindemitteln, insbesondere nach gp120, die immunologische Reaktionen nicht modulieren können, von entscheidender Wichtigkeit.

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht in der Bereitstellung einer neuen Substanz zur Hemmung der Bindung von viralen und bakteriellen Antigenen an menschliches DC-SIGN.

Die Aufgabe der Erfindung kann mit einem Polypeptid gemäß den Ansprüchen 1-5 erfüllt werden.

Die Proteinsequenz gemäß Anspruch 3 entspricht der vorhergesagten Kohlenhydrat-erkennungsdomäne (CRD) des *Stilbonema majum*-CTL Mermaid-3, GenBank-Zugangsnummer AAX22008. Die Proteinsequenz gemäß Anspruch 4 entspricht der vorhergesagten CRD des CTL Mermaid-1 entweder von *Laxus oneistus* oder von *S. majum*, GenBank-Zugangsnummer AAX22004 bzw. AAX22006, und die Proteinsequenz gemäß Anspruch 5

entspricht der vorhergesagten CRD des CTL Mermaid-2 entweder von *L. oneistus* oder von *S. majum*, GenBank-Zugangsnummer AAX22005 bzw. AAX22007.

Es zeigte sich, dass rekombinantes Mermaid (siehe Verfahren) die Bindung von menschlichem DC-SIGN an gp120 sowie an ManLAM und Le^X erheblich hemmt.

Die vorliegende Erfindung ist daher auf eine pharmazeutische Zusammensetzung gerichtet, die ein Polypeptid gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5 enthält, welches die folgende allgemeine Formel aufweist:

**GWX₁RX₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈X₉LX₁₀X₁₁X₁₂X₁₃LX₁₄WX₁₅X₁₆ADX₁₇X₁₈CKX₁₉X₂₀X₂₁GRLVVX₂₂R
TX₂₂DX₂₃X₂₄X₂₅FLX₂₆X₂₇NX₂₈LKX₂₉X₃₀X₃₁X₃₂X₃₃X₃₄WVGLX₃₅X₃₆X₃₇X₃₈X₃₉X₄₀X₄₁RTWX
42WSDGTX₄₃X₄₄X₄₅X₄₆X₄₇X₄₈X₄₉X₅₀X₅₁X₅₂X₅₃WX₅₄X₅₅X₅₆EPNDAX₅₇GEEECAX₅₈X₅₉X₆₀Y
X₆₁X₆₂X₆₃X₆₄X₆₅X₆₆X₆₇X₆₈X₆₉NDX₇₀X₇₁CX₇₂X₇₃X₇₄CX₇₅X₇₆X₇₇X₇₈FICE**

wobei

X_{1bis77} = eine genetisch codierte Aminosäure.

Eine bevorzugte pharmazeutische Zusammensetzung enthält ein Polypeptid gemäß der obenstehenden allgemeinen Formel, wobei

X₁=L

X_{1bis9}=SPQGTVVK

X_{10bis13}=YRRS

X₁₄=S

X_{15bis16}=SK

X_{17bis18}=EF

X_{19bis21}=DVD

X₂₂=D

X_{23bis25}=MHL

X_{26bis27}=IK

X₂₈=V

X_{29bis34}=EKKSRV

X_{35bis38}=RRTA

X₃₉=S oder P

NACHGEREICHT

X_{40bis41}=HS

X₄₂=I

X_{43bis46}=RQNE

X₄₇=G oder D

X_{48bis49}=DL

X₅₀= D oder N

X₅₁=A oder T

X_{52bis53}=NL

X_{54bis56}=LRD

X₅₇=A

X_{58bis60}=LFM

X_{61bis69}=SPWEKAWGL

X_{70bis71}=YL

X_{72bis74}=RGG

X₇₅=R

X₇₆=N oder S

X_{77bis78}=YQ

oder wobei

X₁=L

X_{1bis9}=SPQGTVVK

X_{10bis13}=YRRS

X₁₄=S

X_{15bis16}=SK

X_{17bis18}=EF

X_{19bis21}=DVD

X₂₂=D

X_{23bis25}=MHL

X_{26bis27}=IK

X₂₈=V

X_{29bis34}=EKKSrv

X_{35bis38}=RRTA

X₃₉=S

X_{40bis41}=HS

X₄₂=I

X_{43bis46}=RQNE

NACHGEREICHT

X₄₇=G
X_{48bis49}=DL
X₅₀= D
X₅₁=A
X_{52bis53}=NL
X_{54bis56}=LRD
X₅₇=A
X_{58bis60}=LFM
X_{61bis69}=SPWEKAWGL
X_{70bis71}=YL
X_{72bis74}=RGG
X₇₅=R
X₇₆=N
X_{77bis78}=YQ

(SEQ ID No. 1)

oder wobei

X₁=L
X_{1bis9}=SPQGTVVK
X_{10bis13}=YRRS
X₁₄=S
X_{15bis16}=SK
X_{17bis18}=EF
X_{19bis21}=DVD
X₂₂=D
X_{23bis25}=MHL
X_{26bis27}=IK
X₂₈=V
X_{29bis34}=EKKS RV
X_{35bis38}=RRTA
X₃₉=P
X_{40bis41}=HS
X₄₂=I
X_{43bis46}=RQNE
X₄₇=D

NACHGEREICHT

X_{48bis49}=DL
X₅₀= D
X₅₁=A
X_{52bis53}=NL
X_{54bis56}=LRD
X₅₇=A
X_{58bis60}=LFM
X_{61bis69}=SPWEKAWGL
X_{70bis71}=YL
X_{72bis74}=RGG
X₇₅=R
X₇₆=N
X_{77bis78}=YQ

(SEQ ID No. 2)

oder wobei

X₁=L
X_{1bis9}=SPQGTVVK
X_{10bis13}=YRRS
X₁₄=S
X_{15bis16}=SK
X_{17bis18}=EF
X_{19bis21}=DVD
X₂₂=D
X_{23bis25}=MHL
X_{26bis27}=IK
X₂₈=V
X_{29bis34}=EKKSRV
X_{35bis38}=RRTA
X₃₉=P
X_{40bis41}=HS
X₄₂=I
X_{43bis46}=RQNE
X₄₇=D
X_{48bis49}=DL

NACHGEREICHT

X₅₀=N

X₅₁=T

X_{52bis53}=NL

X_{54bis56}=LRD

X₅₇=A

X_{58bis60}=LFM

X_{61bis69}=SPWEKAWGL

X_{70bis71}=YL

X_{72bis74}=RGG

X₇₅=R

X₇₆=S

X_{77bis78}=YQ

(SEQ ID No. 3)

Die vorliegende Erfindung ist auch auf die Verwendung eines Polypeptids, wie obenstehend erwähnt, für die Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Vorbeugung viraler oder bakterieller Infektionen, insbesondere HIV und Tuberkulose, gerichtet.

In einer bevorzugten Form liegt die erfinderische pharmazeutische Zusammensetzung für eine äußerliche oder orale Anwendung vor.

Die Erfindung ist ebenso auf eine cDNA gerichtet, die für ein Polypeptid gemäß SEQ ID No. 1, 2 oder 3 oder gemäß der allgemeinen Sequenz nach Anspruch 1 codiert.

Materialien und Verfahren

Nematoden. *L. oneistus* und *S. majum* wurden in einer Tiefe von 0,5 m von der Sandbank einer Riffrückseite am Carrie Bow Cay, belizisches Barriere-Riff, Karibisches Meer, gesammelt (Ott & Novak, 1989). Die Würmer wurden durch Schütteln des Sandes und Gießen des Überstands durch einen Maschensieb mit einer Porengröße von 63 µm extrahiert. Danach wurden sie unter einem Präpariermikroskop mit der Hand aussortiert und tiefgefroren in RNAlater (Sigma) für eine mRNA-Extraktion oder in Methanol gelagert.

Homologieklonierung der cDNAs, die für Proteine gemäß den Ansprüchen 1 bis 5 codieren. Als Beispiel werden die Verfahren beschrieben, die zum Klonieren von [*Sm-*] *mermaid-3* eingesetzt werden, welches für ein Protein codiert, dessen CRD mit dem Proteinfragment gemäß Anspruch 3 übereinstimmt.

Mit dem QuickPrep Micro mRNA-Reinigungskit (Amersham Biosciences) wurde mRNA aus 500 *L. oneistus*- und 500 *S. majum*-Individuen extrahiert und mit einem RNA-Oligo bei 5' ligasiert (GeneRacer Kit, Invitrogen), und mit dem T-sensibilisierten Ready-To-Go-First-Strand-Kit (Amersham Biosciences) wurde cDNA synthetisiert. Ein 375-bp-cDNA-Fragment wurde aus *S. majum*-cDNA amplifiziert, wobei der degenerierte Oligonucleotid-primer SB1A (5'-CAAAGCTTTGGGTXXGGXTTX-3') und der T-sensibilisierte Ready-To-Go-First-Strand-Kit-NotI-d(T)18-Primer verwendet wurden. Die T_m für die ersten 3 PCR-Zyklen betrug 45°C, und die T_m für die restlichen 30 Zyklen betrug 57°C. 90 Sekunden lang wurde eine Elongation durchgeführt. Der entsprechende [*Sm-*] *mermaid-3*-Klon wurde in voller Länge erhalten, indem der GeneRacer 5'-Primer gegen das RNA-Oligo und der SB27-Primer in der 3'UTR (5'-CTAACAGTCACTGACTCTCAACGAATCC-3') verwendet wurden. [*Lo-*] *mermaid-1*-, [*Lo-*] *mermaid-2*-, [*Sm-*] *mermaid-1*- und [*Sm-*] *mermaid-2*-cDNA-Klone wurden erhalten, indem der Primer SB34 in der 5'UTR (5'-TTTTTTATTTCACAGCCATCGGTTTCC-3') und der Primer SB27 in der 3'UTR verwendet wurden. *Mermaid*-mRNA-Sequenzen wurden bei der GenBank unter den folgenden Zugangsnummern hinterlegt: [*Lo-*] *mermaid-1* (AY927369), [*Lo-*] *mermaid-2* (AY927370), [*Sm-*] *mermaid-1* (AY927371), [*Sm-*] *mermaid-2* (AY927372) und [*Sm-*] *mermaid-3* (AY927373).

Expression und Reinigung der Proteine gemäß den Ansprüchen 1 bis 5. Als Beispiel werden die Verfahren beschrieben, die zur Expression und Reinigung eines Proteins eingesetzt werden, welches das Proteinfragment gemäß Anspruch 3 umfasst.

Ein mit den Aminosäuren 20-161 von [*Sm-*] *Mermaid-3* übereinstimmendes PCR-Fragment war NdeI/BamHI, das zu pET15b (Novagen) kloniert wurde. Das resultierende His-Mermaid-Fusionsprotein enthielt eine N-terminale Hexahistidin-Markierung (His-Markierung) und wurde im *E. coli*-Stamm BL21-AI (Invitrogen) im Wesentlichen gemäß den Instruktionen des Herstellers exprimiert. Die His-Mermaid-Expression wurde durch 0,2%ige Arabinose und 1mM DTT bei 37°C 3 h lang induziert. Bakterienlysate, die His-Mermaid enthielten, wurden auf ein Nickelchelatharz (His-Bind Resin; Novagen) in einem Bindungspuffer (8 M Harnstoff, 20 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, 0,5 M NaCl, 10 mM Imidazol) aufgebracht und mit demselben Puffer eluiert (abgesehen von der Imidazol-konzentration, die auf 0,5 M erhöht wurde). Eluierte Proteine wurden gegen PBS, die

sinkende Harnstoffkonzentrationen enthielt, dialysiert, um eine Renaturierung zu ermöglichen.

Antikörper und Western-Blots. Im Anschluss an Standardverfahrensweisen erzeugten wir einen polyklonalen Kaninchen-Antikörper gegen das Peptid HLFLIKNVLKEKKS RVW sowie einen polyklonalen Maus-Antikörper gegen gereinigtes His-Mermaid (siehe voriger Abschnitt bezüglich Verfahren). Die Proteine wurden durch eine reduzierte Natriumdodecylsulfat (SDS)-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (PAGE) auf 4-12%igen NuPAGE-Bis-Tris-Fertiggels (Invitrogen) aufgetrennt und auf Hybond-ECL-Nitrocellulose-Membrane (Amersham Biosciences) übertragen. Die Membrane wurden 30 Minuten lang in phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS), enthaltend 5 (Gew./Vol.)% fettfreie Milch, bei Raumtemperatur blockiert und über Nacht bei 4°C mit Kaninchen-Antipeptid-Antikörper (1:500), Maus-Anti-His-Mermaid-Antikörper (1:100) oder einer monoklonalen Antikörper-Anti-His-Markierung (1:1.000; Amersham Biosciences) in PBS, enthaltend 5% fettfreie Milch, sondiert, gefolgt von einer 30-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur mit einem sekundären Meerrettichperoxidase-konjugierten Anti-Kaninchen- oder Anti-Maus-Antikörper (1:4.000 bzw. 1:2.000; Amersham Biosciences) in PBS, enthaltend 5% fettfreie Milch. Protein-Antikörper-Komplexe wurden unter Verwendung von ECL Plus-Nachweisreagenzien (Amersham Biosciences) sichtbar gemacht.

Adhäsionsassay mit löslichem DC-SIGN-Fc. Die untenstehend beschriebenen Verfahren wurden eingesetzt, um die Fähigkeit eines das Proteinfragment gemäß Anspruch 3 (His-Mermaid) enthaltenden Proteins zum Blockieren der Interaktion von DC-SIGN mit pathogenen Antigenen zu untersuchen. Dieselben Verfahren konnten auch zum Untersuchen der Proteinfragmente gemäß den Ansprüchen 1, 2, 4 und 5 eingesetzt werden.

DC-SIGN-Fc besteht aus dem extrazellulären Abschnitt von DC-SIGN (Aminosäurereste 64-404), der am C-Terminus mit einem menschlichen IgG1-Fc-Fragment zum Sig-pIgG1-Fc-Vektor fusioniert wurde (Fawcett et al. 1992). DC-SIGN-Fc wurde durch Cotransfektion des DC-SIGN-Sig-pIgG1 Fc (20 µg)- und des pEE14 (5 µg)-Vektors in K1-Eierstockzellen des chinesischen Hamsters produziert.

Der Adhäsionsassay mit löslichem DC-SIGN wurde wie beschrieben durchgeführt (Geijtenbeek et al. 2003). Kurz gesagt, lösliche Liganden (HIV-1 gp120, ManLAM und Le^x) wurden bei Raumtemperatur für 18 h auf ELISA-Platten (1 µg/Mulde) geschichtet, gefolgt von einem 2-stündigen Blockieren mit 1%igem BSA bei 37°C. Ein löslicher DC-SIGN-Fc-Überstand wurde bei 37°C für 30 Minuten hinzugefügt. Ungebundenes DC-SIGN-Fc wurde

abgewaschen, und die Bindung wurde durch eine Anti-IgG1-ELISA bestimmt. Die Adhäsion wurde entweder in Gegenwart von 50 µg/ml blockierendem monoklonalem Antikörper-Anti-DC-SIGN (AZN-D1) oder von 20 µg/ml His-Mermaid gehemmt. AZN-D1 wurde erhalten, indem Hybridoma-Überstände von BALB/c-Mäusen, die mit menschlicher DC immunisiert waren, hinsichtlich der Fähigkeit, die Adhäsion von DC mit ICAM-3 zu blockieren, gescreent wurden, wie durch den Fluoreszenzperlen-Adhäsionsassay gemessen.

Resultate

Spezifität der Anti-Mermaid-Antikörper. Wir erzeugten einen polyklonalen Kaninchen-Peptidantikörper und einen polyklonalen Maus-Anti-His-Mermaid-Antikörper. Beide Antikörper erkannten speziell eine Bande von ~20 kDa in Immunoblots von gereinigtem His-Mermaid, welche ein vorhergesagtes MW von 19 kDa aufweist (Fig. 1A, Bahn 2 und 5). Diese Bande entspricht His-Mermaid, da sie in der erwarteten Größe wandert, nach der Vorinkubation des Antikörpers mit dem für die Immunisierung verwendeten Peptid fehlt (Fig. 1A, Bahn 1) und nicht aufscheint, wenn dieselben Blots mit einem Kaninchen- oder Maus-Präimmunserum sondiert werden (Fig. 1A, Bahn 3 bzw. 6).

His-Mermaid hemmt die DC-SIGN-Interaktion mit gp120, ManLAM und LewisX.

Zuvor wurde die Bindung von DC-SIGN an gp120, ManLAM und LewisX gezeigt, genauso wie die Fähigkeit der Antikörper gegen DC-SIGN, diese Interaktionen zu hemmen (Geijtenbeek et al. 2003, Appelmek et al. 2003). Wir untersuchten, ob His-Mermaid hinsichtlich der Antigenbindung mit DC-SIGN-Fc konkurrieren konnte, und wir stellten fest, dass die Bindung von DC-SIGN-Fc an alle drei Antigene durch eine Koinkubation mit His-Mermaid erheblich gehemmt wurde (Fig. 1). His-Mermaid zeigte mehr Affinität für gp120 und ManLAM als für LewisX.

Figur 1 zeigt als Bahn 2 einen Peptidantikörper gegen Mermaid, als Bahn 5 einen Maus-Antikörper gegen His-Mermaid und als Bahn 4 einen Anti-His-Markierungsantikörper. Alle detektieren eine ~20 kDa-Bande auf Immunoblots von gereinigtem His-Mermaid. Dieses Bandenprotein kann durch eine Vorinkubation eines Peptidantikörpers mit überschüssigem Peptid blockiert werden (Bahn 1) und fehlt bei Blots von His-Mermaid, die mit Kaninchen- oder Maus-Präimmunserum sondiert wurden (Bahn 3 bzw. 6).

Figur 2 zeigt die Hemmung einer DC-SIGN-Bindung an gp120-, ManLAM- und Le^X-Antigene durch His-Mermaid. Der Anti-DC-SIGN-Antikörper hemmt bekanntermaßen diese Interaktionen und wurde als positive Kontrolle eingesetzt.

Literaturhinweise

Alvarez CP, Lasala F, Carrillo J, Muniz O, Corbi AL, Delgado R. 2002. C-type lectins DC-SIGN and L-SIGN mediate cellular entry by Ebola virus in cis and in trans. *J Virol.* 76(13):6841-4.

Appelmek BJ, van Die I, van Vliet SJ, Vandenbroucke-Grauls CM, Geijtenbeek TB, van Kooyk Y. 2003. Cutting edge: carbohydrate profiling identifies new pathogens that interact with dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin on dendritic cells. *J Immunol.* 170(4):1635-9.

Balzarini J, Hatse S, Vermeire K, Princen K, DeClercq E, Egberink et al. 2003. Mannose-specific plant lectins from the Amaryllidaceae family qualify as efficient microbicide to prevent infection and transmission of the human immunodeficiency virus. Zur Veröffentlichung vorgelegt.

Balzarini J, Van Laethem K, Hatse S, Vermeire K, DeClercq E. et al. 2003. Unique resistance profile of human immunodeficiency virus against mannose-specific plant lectins. Zur Veröffentlichung vorgelegt.

Borrebaeck CAK, Carlsson R. 1989. Lectins as mitogens. *Adv. Lectin Res.* 2:1-27.

Drickamer K. 1988. Two distinct classes of carbohydrate-recognition domains in animal lectins. *J Biol Chem.* 263(20):9557-60.

Fawcett J, Holness CL, Needham LA, Turley H, Gatter KC, Mason DY, Simmons DL. 1992. Molecular cloning of ICAM-3, a third ligand for LFA-1, constitutively expressed on resting leukocytes. *Nature.* 360(6403):481-4.

Feinberg H, Mitchell DA, Drickamer K, Weis WI. 2001. Structural basis for selective recognition of oligosaccharides by DC-SIGN and DC-SIGNR. *Science* 294:2163-2166.

Figdor CG, van Kooyk Y, Adema GJ. 2002. C-type lectin receptors on dendritic cells and Langerhans cells. *Nat Rev Immunol.* 2(2):77-84.

Gardner JP, Durso RJ, Arrigale RR, Donovan GP, Maddon PJ, Dragic T, Olson WC. 2003. L-SIGN (CD 209L) is a liver-specific capture receptor for hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100(8):4498-503.

Geijtenbeek, TB, Kwon DS, Torensma R, van Vliet SJ, van Duijnhoven GC, Middel J, Cornelissen IL, Nottet HS, KewalRamani VN, Littman DR, Figdor CG, van Kooyk Y. 2000. DC-SIGN, a dendritic cell specific HIV-1-binding protein that enhance trans-infection of T cell. *Cell* 100:587-597.

Geijtenbeek TB, van Duijnhoven GC, van Vliet SJ, Krieger E, Vriend G, Figdor CG, van Kooyk Y. 2002. Identification of different binding sites in the dendritic cell-specific receptor DC-SIGN for intercellular adhesion molecule 3 and HIV-1. *J. Biol. Chem.* 277(13):11314-20.

Geijtenbeek, TB, van Vliet SJ, Koppel E. A., Sanchez-Hernandez M., Vandenbroucke-Grauls CMJE, Appelmek B, van Kooyk Y. 2003. Mycobacteria target DC-SIGN to suppress dendritic cell function. *J Exp Med.* 197:7-17.

Halary F, Amara A, Lortat-Jacob H, Messerle M, Delaunay T, Houles C, Fieschi F, Arenzana-Seisdedos F, Moreau JF, Dechanet-Merville J. 2002. Human cytomegalovirus binding to DC-SIGN is required for dendritic cell infection and target cell trans-infection. *Immunity.* 17(5):653-64.

Kammerer U, Eggert AO, Kapp M, McLellan AD, Geijtenbeek TB, Dietl J, van Kooyk Y, Kampgen E. 2003. Unique appearance of proliferating antigen-presenting cells expressing DC-SIGN (CD209) in the decidua of early human pregnancy. *Am J Pathol.* 162(3):887-96.

Kilpatrick DC. 1995. Lectins in immunology, S. 155-182. Bei Pusztai A. und Bardocz S. (Hrsg.), *Lectins. Biomedical perspectives*, Taylor and Francis Ltd., London.

Lee B, Leslie G, Soilleux E, O'Doherty U, Baik S, Levroney E, Flummerfelt K, Swiggard W, Coleman N, Malim M, Doms RW. 2001. cis Expression of DC-SIGN allows for more efficient entry of human and simian immunodeficiency viruses via CD4 and a coreceptor. *J Virol.* 75(24):12028-38.

Lozach PY, Lortat-Jacob H, de Lacroix de Lavalette A, Staropoli I, Foug S, Amara A, Houles C, Fieschi F, Schwartz O, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F, Altmeyer R. 2003.

DC-SIGN and L-SIGN are high affinity binding receptors for hepatitis C virus glycoprotein E2. *J Biol Chem.* 278(22):20358-66.

Mitchell DA, Fadden AJ, Drickamer K. 2001. A novel mechanism of carbohydrate recognition by the C-type lectins DC-SIGN and DC-SIGNR. Subunit organization and binding to multivalent ligands. *J Biol Chem.* 276(31):28939-45.

Mizuuchi T, Matthews TJ, Kato M, Hamako J, Titani K, Solomon J, Feizi T. 1990. Diversity of oligosaccharide structures on the envelope glycoprotein gp 120 of human immunodeficiency virus 1 from the lymphoblastoid cell line H9. Presence of complex-type oligosaccharides with bisecting N-acetylglucosamine residues. *J Biol Chem.* 265(15):8519-24.

Navarro-Sanchez E, Altmeyer R, Amara A, Schwartz O, Fieschi F, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F, Despres P. 2003. Dendritic-cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin is essential for the productive infection of human dendritic cells by mosquito-cell-derived dengue viruses. *EMBO Rep.* 4(7):723-8.

Ott, JA, Novak R. 1989. Living at an interface: Meiofauna at the oxygen/sulphide boundary in marine sediments, S. 415-422. Bei Ryland J. S. und P. A. Tyler (Hrsg.), *Reproduction, genetics and distributions of marine organisms*, Olsen and Olsen, Fredensborg.

Pohlmann S, Zhang J, Baribaud F, Chen Z, Leslie GJ, Lin G, Granelli-Piperno A, Doms RW, Rice CM, McKeating JA. 2003. Hepatitis C virus glycoproteins interact with DC-SIGN and DC-SIGNR. *J Virol.* 77(7):4070-80.

Simmons G, Reeves JD, Grogan CC, Vandenberghe LH, Baribaud F, Whitbeck JC, Burke E, Buchmeier MJ, Soilleux EJ, Riley JL, Doms RW, Bates P, Pohlmann S. 2003. DC-SIGN and DC-SIGNR bind ebola glycoproteins and enhance infection of macrophages and endothelial cells. *Virology.* 305(1):115-23.

Tassaneetrithep B, Burgess TH, Granelli-Piperno A, Trumpfheller C, Finke J, Sun W, Eller MA, Pattanapanyasat K, Sarasombath S, Birx DL, Steinman RM, Schlesinger S, Marovich MA. 2003. DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. *J Exp Med.* 197(7):823-9.

Vijayakumar T, Remani P, Ankathil R, Bhattathiri VN. 1994. Plant lectins in immunology, cytology, and haematology: a bibliography and projects for development. *Hematol Rev* 8:151-168.

Weis WI, Taylor ME, Drickamer K. 1998. The C-type lectin superfamily in the immune system. *Immunol Rev*. 163:19-34.

NACHGEREICHT

Sequenzprotokoll

SEQ ID No. 1

GWLRSPQG TVVKLYRRSL SWSKADEFCK DVDGRLVVDR TADMHLFLIK
NVLKEKKS RV WVGLRRTASH SRTWIWSDGT RQNEGDLDAN LWLRDEPNDA
AGEEECALFM YSPWEKAWGL NDYLCRGGCR NYQFICE

SEQ ID No: 2

GWLRSPQG TVVKLYRRSL SWSKADEFCK DVDGRLVVDR TADMHLFLIK
NVLKEKKS RV WVGLRRTAPH SRTWIWSDGT RQNEDDL~~DAN~~ LWLRDEPNDA
AGEEECALFM YSPWEKAWGL NDYLCRGGCR NYQFICE

SEQ ID No: 3

GWLRSPQG TVVKLYRRSL SWSKADEFCK DVDGRLVVDR TADMHLFLIK
NVLKEKKS RV WVGLRRTAPH SRTWIWSDGT RQNEDDLNTN LWLRDEPNDA
AGEEECALFM YSPWEKAWGL NDYLCRGGCR SYQFICE

NACHGEREICHT

Patentansprüche:

1. Pharmazeutische Zusammensetzung, enthaltend ein Polypeptid mit folgender Aminosäuresequenz:

GWX₁RX₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈X₉LX₁₀X₁₁X₁₂X₁₃LX₁₄WX₁₅X₁₆ADX₁₇X₁₈CKX₁₉X₂₀X₂₁GRLVVX₂₂R
 TX₂₂DX₂₃X₂₄X₂₅FLX₂₆X₂₇NX₂₈LKX₂₉X₃₀X₃₁X₃₂X₃₃X₃₄WVGLX₃₅X₃₆X₃₇X₃₈X₃₉X₄₀X₄₁RTWX₄₂
 WSDGTX₄₃X₄₄X₄₅X₄₆X₄₇X₄₈X₄₉X₅₀X₅₁X₅₂X₅₃WX₅₄X₅₅X₅₆EPNDAX₅₇GEEECAX₅₈X₅₉X₆₀Y
 X₆₁X₆₂X₆₃X₆₄X₆₅X₆₆X₆₇X₆₈X₆₉NDX₇₀X₇₁CX₇₂X₇₃X₇₄CX₇₅X₇₆X₇₇X₇₈FICE

wobei

X_{1bis77} = eine genetisch codierte Aminosäure.

2. Pharmazeutische Zusammensetzung, enthaltend ein Polypeptid gemäß Anspruch 1, wobei

X₁=L

X_{1bis9}=SPQGTVVK

X_{10bis13}=YRRS

X₁₄=S

X_{15bis16}=SK

X_{17bis18}=EF

X_{19bis21}=DVD

X₂₂=D

X_{23bis25}=MHL

X_{26bis27}=IK

X₂₈=V

X_{29bis34}=EKKSRV

X_{35bis38}=RRTA

X₃₉=S oder P

X_{40bis41}=HS

X₄₂=I

X_{43bis46}=RQNE

X₄₇=G oder D

NACHGEREICHT

X_{48bis49}=DL
X₅₀= D oder N
X₅₁=A oder T
X_{52bis53}=NL
X_{54bis56}=LRD
X₅₇=A
X_{58bis60}=LFM
X_{61bis69}=SPWEKAWGL
X_{70bis71}=YL
X_{72bis74}=RGG
X₇₅=R
X₇₆=N oder S
X_{77bis78}=YQ

3. Pharmazeutische Zusammensetzung, enthaltend ein Polypeptid (SEQ ID No. 1) gemäß Anspruch 1, wobei

X₁=L
X_{1bis9}=SPQGTVVK
X_{10bis13}=YRRS
X₁₄=S
X_{15bis16}=SK
X_{17bis18}=EF
X_{19bis21}=DVD
X₂₂=D
X_{23bis25}=MHL
X_{26bis27}=IK
X₂₈=V
X_{29bis34}=EKKSrv
X_{35bis38}=RRTA
X₃₉=S
X_{40bis41}=HS
X₄₂=I
X_{43bis46}=RQNE
X₄₇=G
X_{48bis49}=DL

NACHGEREICHT

X₅₀= D
X₅₁=A
X_{52bis53}=NL
X_{54bis56}=LRD
X₅₇=A
X_{58bis60}=LFM
X_{61bis69}=SPWEKAWGL
X_{70bis71}=YL
X_{72bis74}=RGG
X₇₅=R
X₇₆=N
X_{77bis78}=YQ

4. Pharmazeutische Zusammensetzung, enthaltend ein Polypeptid (SEQ ID No. 2) gemäß Anspruch 1, wobei

X₁=L
X_{1bis9}=SPQGTVVK
X_{10bis13}=YRRS
X₁₄=S
X_{15bis16}=SK
X_{17bis18}=EF
X_{19bis21}=DVD
X₂₂=D
X_{23bis25}=MHL
X_{26bis27}=IK
X₂₈=V
X_{29bis34}=EKKSRV
X_{35bis38}=RRTA
X₃₉=P
X_{40bis41}=HS
X₄₂=I
X_{43bis46}=RQNE
X₄₇=D
X_{48bis49}=DL
X₅₀= D

NACHGEREICHT

X₅₁=A
X_{52bis53}=NL
X_{54bis56}=LRD
X₅₇=A
X_{58bis60}=LFM
X_{61bis69}=SPWEKAWGL
X_{70bis71}=YL
X_{72bis74}=RGG
X₇₅=R
X₇₆=N
X_{77bis78}=YQ

5. Pharmazeutische Zusammensetzung, enthaltend ein Polypeptid (SEQ ID No. 3)
gemäß Anspruch 1, wobei

X₁=L
X_{1bis9}=SPQGTVVK
X_{10bis13}=YRRS
X₁₄=S
X_{15bis16}=SK
X_{17bis18}=EF
X_{19bis21}=DVD
X₂₂=D
X_{23bis25}=MHL
X_{26bis27}=IK
X₂₈=V
X_{29bis34}=EKKS RV
X_{35bis38}=RRTA
X₃₉=P
X_{40bis41}=HS
X₄₂=I
X_{43bis46}=RQNE
X₄₇=D
X_{48bis49}=DL
X₅₀=N
X₅₁=T

NACHGEREICHT

X_{52bis53}=NL

X_{54bis56}=LRD

X₅₇=A

X_{58bis60}=LFM

X_{61bis69}=SPWEKAWGL

X_{70bis71}=YL

X_{72bis74}=RGG

X₇₅=R

X₇₆=S

X_{77bis78}=YQ

6. Pharmazeutische Zusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 1-5, dadurch gekennzeichnet, dass sie für eine äußerliche oder orale Anwendung vorliegt.
7. Verwendung eines Polypeptids gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6 für die Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Vorbeugung viraler oder bakterieller Infektionen.
8. Verwendung gemäß Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der viralen Infektion um HIV handelt.
9. Verwendung gemäß Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der bakteriellen Infektion um Tuberkulose handelt.
10. cDNA, welche für ein Polypeptid gemäß SEQ ID No. 1, 2 oder 3 codiert.

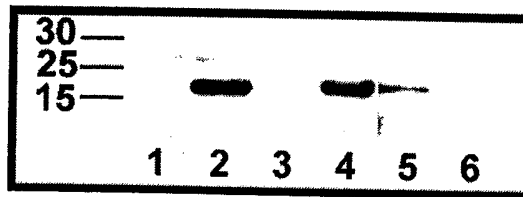


Fig. 1

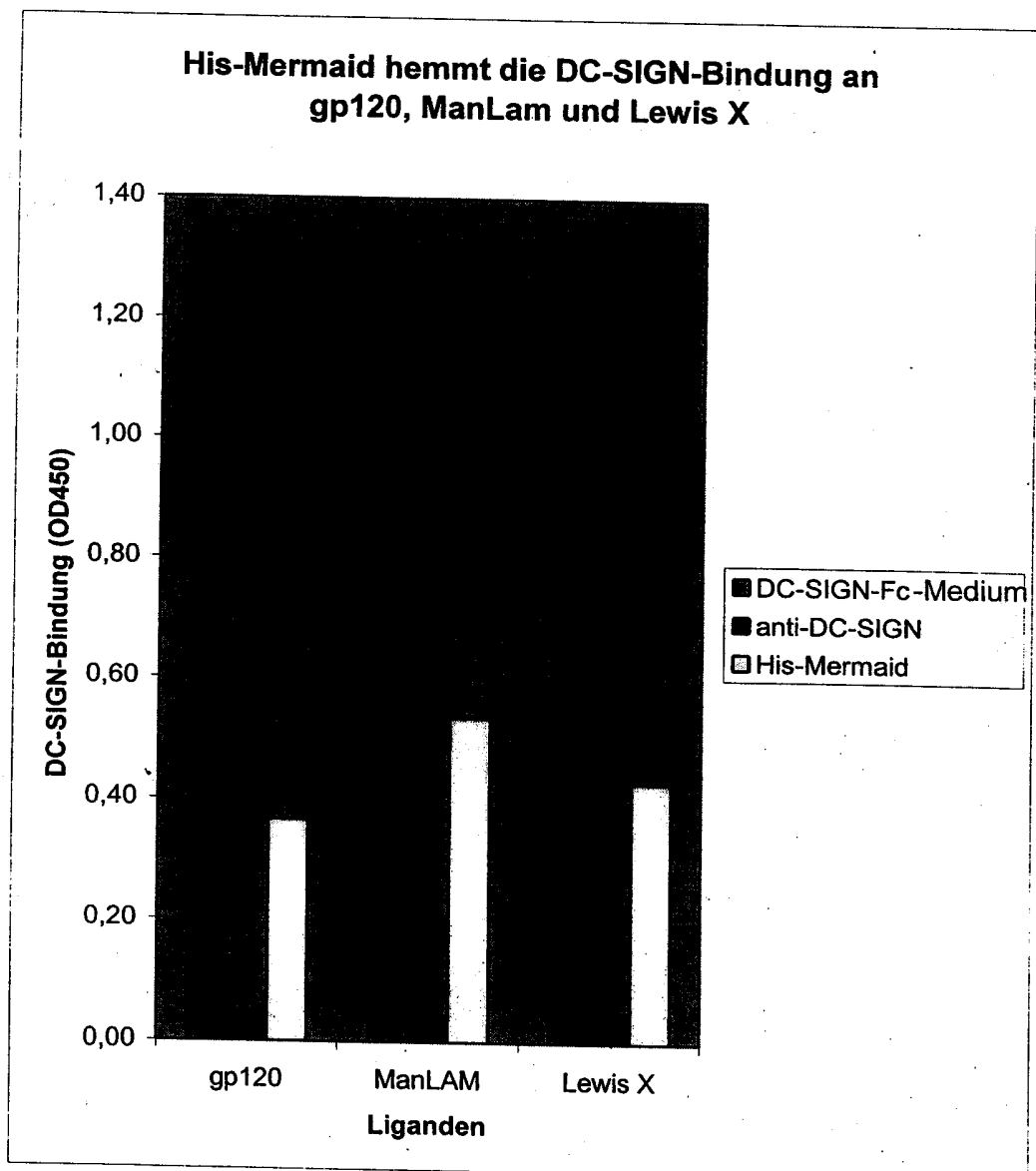


Fig. 2

Patentansprüche:

1. Pharmazeutische Zusammensetzung, enthaltend ein Polypeptid mit folgender Aminosäuresequenz:

GWX₁RX₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈LX₉LX₁₀X₁₁X₁₂X₁₃LX₁₄WX₁₅X₁₆ADX₁₇X₁₈CKX₁₉X₂₀X₂₁GRLVVX₂₂R
TX₂₂DX₂₃X₂₄X₂₅FLX₂₆X₂₇NX₂₈LKX₂₉X₃₀X₃₁X₃₂X₃₃X₃₄WVGLX₃₅X₃₆X₃₇X₃₈X₃₉X₄₀X₄₁RTWX
X₄₂WSDGTX₄₃X₄₄X₄₅X₄₆X₄₇X₄₈X₄₉X₅₀X₅₁X₅₂X₅₃WX₅₄X₅₅X₅₆EPNDAX₅₇GEEECAX₅₈X₅₉X₆₀Y
X₆₁X₆₂X₆₃X₆₄X₆₅X₆₆X₆₇X₆₈X₆₉NDX₇₀X₇₁CX₇₂X₇₃X₇₄CX₇₅X₇₆X₇₇X₇₈FICE

wobei

X_{1bis77} eine genetisch codierte Aminosäure ist.

2. Pharmazeutische Zusammensetzung, enthaltend ein Polypeptid gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass

X₁=L

X_{1bis9}=SPQGTVVK

X_{10bis13}=YRRS

X₁₄=S

X_{15bis16}=SK

X_{17bis18}=EF

X_{19bis21}=DVD

X₂₂=D

X_{23bis25}=MHL

X_{26bis27}=IK

X₂₈=V

X_{29bis34}=EKKS RV

X_{35bis38}=RRTA

X₃₉=S oder P

X_{40bis41}=HS

X₄₂=I

X_{43bis46}=RQNE

X₄₇=G oder D

NACHGEREICHT

X_{48bis49}=DL
X₅₀= D oder N
X₅₁=A oder T
X_{52bis53}=NL
X_{54bis56}=LRD
X₅₇=A
X_{58bis60}=LFM
X_{61bis69}=SPWEKAWGL
X_{70bis71}=YL
X_{72bis74}=RGG
X₇₅=R
X₇₆=N oder S
X_{77bis78}=YQ
ist.

3. Pharmazeutische Zusammensetzung, enthaltend ein Polypeptid gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass

X₁=L
X_{1bis9}=SPQGTVVK
X_{10bis13}=YRRS
X₁₄=S
X_{15bis16}=SK
X_{17bis18}=EF
X_{19bis21}=DVD
X₂₂=D
X_{23bis25}=MHL
X_{26bis27}=IK
X₂₈=V
X_{29bis34}=EKKS RV
X_{35bis38}=RRTA
X₃₉=S
X_{40bis41}=HS
X₄₂=I
X_{43bis46}=RQNE
X₄₇=G

NACHGEREICHT

X_{48bis49}=DL

X₅₀= D

X₅₁=A

X_{52bis53}=NL

X_{54bis56}=LRD

X₅₇=A

X_{58bis60}=LFM

X_{61bis69}=SPWEKAWGL

X_{70bis71}=YL

X_{72bis74}=RGG

X₇₅=R

X₇₆=N

X_{77bis78}=YQ

ist.

4. Pharmazeutische Zusammensetzung, enthaltend ein Polypeptid gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass

X₁=L

X_{1bis9}=SPQGTVVK

X_{10bis13}=YRRS

X₁₄=S

X_{15bis16}=SK

X_{17bis18}=EF

X_{19bis21}=DVD

X₂₂=D

X_{23bis25}=MHL

X_{26bis27}=IK

X₂₈=V

X_{29bis34}=EKKSRV

X_{35bis38}=RRTA

X₃₉=P

X_{40bis41}=HS

X₄₂=I

X_{43bis46}=RQNE

X₄₇=D

NACHGEREICHT

X_{48bis49}=DL
X₅₀= D
X₅₁=A
X_{52bis53}=NL
X_{54bis56}=LRD
X₅₇=A
X_{58bis60}=LFM
X_{61bis69}=SPWEKAWGL
X_{70bis71}=YL
X_{72bis74}=RGG
X₇₅=R
X₇₆=N
X_{77bis78}=YQ
ist.

5. Pharmazeutische Zusammensetzung, enthaltend ein Polypeptid gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass

X₁=L
X_{1bis9}=SPQGTVVK
X_{10bis13}=YRRS
X₁₄=S
X_{15bis16}=SK
X_{17bis18}=EF
X_{19bis21}=DVD
X₂₂=D
X_{23bis25}=MHL
X_{26bis27}=IK
X₂₈=V
X_{29bis34}=EKKSRV
X_{35bis38}=RRTA
X₃₉=P
X_{40bis41}=HS
X₄₂=I
X_{43bis46}=RQNE
X₄₇=D

NACHGEREICHT

X_{48bis49}=DL

X₅₀=N

X₅₁=T

X_{52bis53}=NL

X_{54bis56}=LRD

X₅₇=A

X_{58bis60}=LFM

X_{61bis69}=SPWEKAWGL

X_{70bis71}=YL

X_{72bis74}=RGG

X₇₅=R

X₇₆=S

X_{77bis78}=YQ

ist.

6. Pharmazeutische Zusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 1-5, dadurch gekennzeichnet, dass sie für eine äußerliche oder orale Anwendung vorliegt.
7. Verwendung eines Polypeptids gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6 für die Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Vorbeugung viraler oder bakterieller Infektionen.
8. Verwendung gemäß Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der viralen Infektion um HIV handelt.
9. Verwendung gemäß Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der bakteriellen Infektion um Tuberkulose handelt.
10. cDNA, welche für ein Polypeptid gemäß SEQ ID No. 1, 2 oder 3 codiert.



Klassifikation des Anmeldungsgegenstands gemäß IPC ⁸ : A61K 38/17 (2006.01); A61P 31/06 (2006.01); A61P 31/18 (2006.01)
Klassifikation des Anmeldungsgegenstands gemäß ECLA: A61K 38/17
Recherchierter Prüfstoff (Klassifikation): A61K, A61P
Konsultierte Online-Datenbank: STN-registry, WPI, CAS, Fulltext
Dieser Recherchenbericht wurde zu den am 14. Juli 2006 eingereichten Ansprüchen 1-10 erstellt.

Kategorie ¹⁾	Bezeichnung der Veröffentlichung: Ländercode, Veröffentlichungsnummer, Dokumentart (Anmelder), Veröffentlichungsdatum, Textstelle oder Figur soweit erforderlich	Betreffend Anspruch
A	EP 1046651 A1 (KONINKLIJKE UNIVERSITEIT NIJMEGEN) 25. Oktober 2000 (25.10.2000) <i>Beispiele; Ansprüche 1, 6</i> ----	1-10

Datum der Beendigung der Recherche: 10. Jänner 2007	☐ Fortsetzung siehe Folgeblatt	Prüfer(in): Mag. MOSSER
---	---	-----------------------------------

¹⁾ Kategorien der angeführten Dokumente: X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung : der Anmeldungsgegenstand kann allein aufgrund dieser Druckschrift nicht als neu bzw. auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden. Y Veröffentlichung von Bedeutung : der Anmeldungsgegenstand kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren weiteren Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist.		A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert. P Dokument, das von Bedeutung ist (Kategorien X oder Y), jedoch nach dem Prioritätstag der Anmeldung veröffentlicht wurde. E Dokument, das von besonderer Bedeutung ist (Kategorie X), aus dem ein älteres Recht hervorgehen könnte (früheres Anmeldedatum, jedoch nachveröffentlicht, Schutz ist in Österreich möglich, würde Neuheit in Frage stellen). & Veröffentlichung, die Mitglied der selben Patentfamilie ist.
---	--	---