



(19)
 Bundesrepublik Deutschland
 Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 10 2007 030 904 A1 2009.02.05

(12)

Offenlegungsschrift

(21) Aktenzeichen: 10 2007 030 904.1

(22) Anmeldetag: 03.07.2007

(43) Offenlegungstag: 05.02.2009

(51) Int Cl.⁸: **C07K 14/435** (2006.01)
C12N 15/12 (2006.01)

(71) Anmelder:
Pharis Biotec GmbH, 30625 Hannover, DE

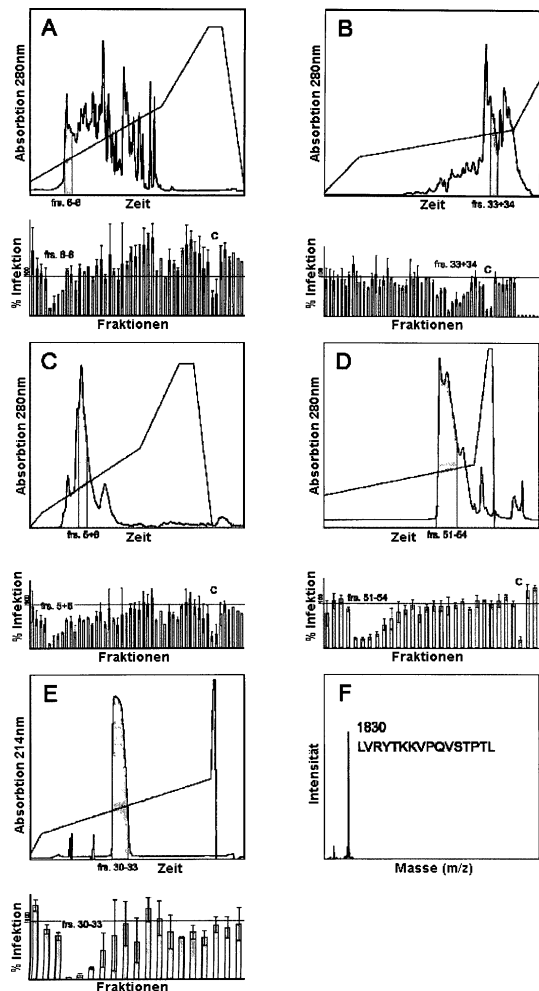
(72) Erfinder:
Kirchhoff, Frank, Prof. Dr.rer.nat., 89081 Ulm, DE;
Münch, Jan, Prof. Dr.rer.nat., 89231 Neu-Ulm, DE;
Ständker, Ludger, Dr.rer.nat., 30625 Hannover, DE;
Forssmann, Wolf-Georg, Prof. Dr.med., 30625 Hannover, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Der Inhalt dieser Schrift weicht von den am Anmeldetag eingereichten Unterlagen ab

(54) Bezeichnung: **Humanes zirkulierendes antivirales Albumin-Fragment (ALB-408) und seine Verwendung**

(57) Zusammenfassung: Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Polypeptid (Eiweißstoff) mit inhibierenden Eigenschaften auf die virale Infektion von Zellen: Humanes zirkulierendes antivirales Albumin-Fragment (ALB-408) und seine therapeutische und diagnostische Verwendung. Die Erfindung umfaßt die natürlich vorkommende Form des ALB-408 sowie abgeleitete Fragmente und/oder Analoga bzw. Derivate sowie schließlich ein Arzneimittel, enthaltend die natürlichen, rekombinanten und synthetischen Peptide, zur Verwendung für medizinische Indikationen und zur Verwendung als ein Diagnosemittel. Die Erfindung umfaßt darüber hinaus modifizierte Formen und Derivate des ALB-408, die eine besonders günstige therapeutische Wirksamkeit aufweisen. Des weiteren eine Nukleinsäure-sonde, hybridisierend für ALB-408 oder eines seiner Fragmente und/oder Derivate, und Antikörper bzw. Antagonisten, gerichtet gegen ALB-408 oder eines seiner Fragmente und/oder Derivate, zu diagnostischen oder therapeutischen Zwecken, insbesondere bei viralen Erkrankungen und zur Behandlung von Infektionen mit HIV-1 und HIV-2.



Beschreibung

[0001] Das ALB-408 konnte überraschenderweise mit Hilfe von chromatographischen Methoden und mit Hilfe eines biologischen Assays aus humanem Hämofiltrat isoliert werden. Die biochemische Charakterisierung des erfindungsgemäßen Peptids erfolgte durch Massenspektrometrie einschliesslich einer vollständigen Sequenzanalyse der Aminosäuren.

[0002] Das Peptid besitzt die folgende Aminosäuresequenz:
LVRYTKKVPQVSTPTL

[0003] Die Molekularmasse des erfindungsgemäßen Peptids ALB-408 beträgt:
1830.2 Da

[0004] Der isoelektrische Punkt (pI) des erfindungsgemäßen Peptids ALB-408 beträgt 10.3.

[0005] Das erfindungsgemäße Peptid ist überraschenderweise ein 16 Aminosäuren umfassendes Fragment des bekannten humanen Plasma-Proteins Serum Albumin (Accession No. NP000468), welches in seiner prozessierten Form aus 585 Aminosäuren besteht. Humanes Albumin ist ein lösliches, monomeres Serum-Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 65.000, welches mehr als die Hälfte des gesamten Plasma-Proteins ausmacht (Konzentration: 3.5 bis 5 g/dl). Die Funktion des humanen Albumins wird vornehmlich als Trägermolekül für hydrophobe als auch für hydrophile Substanzen aller Art, z. B. Steroid- und Peptidhormone, Fettsäuren, Vitamine, Pharmaka und Kationen beschrieben. Aufgrund seiner sehr hohen Serumkonzentration trägt es wesentlich zur Stabilisierung des Blut-pH-Wertes, des extrazellulären Flüssigkeitsvolumens und zur Aufrechterhaltung des kolloidosmotischen Drucks bei. Albumin besitzt eine globuläre Struktur, die durch eine Vielzahl von Disulfidbrücken stabilisiert wird, und liegt in der Regel nicht glykosyliert vor, jedoch treten im Laufe der Molekülalterung oder bei pathophysiologischen Veränderungen häufig Veränderungen infolge von Acetylierung, enzymatischer Glykosylierung und nicht-enzymatischer Glykosylierung auf. Es wird von der Leber als Preproalbumin mit 609 Aminosäuren synthetisiert, das 18 Aminosäuren umfassende N-terminale Signalpeptid wird beim Eintritt in das Endoplasmatische Reticulum intrazellulär abgespalten, weitere 6 Aminosäuren werden im Golgi-Apparat entfernt, bevor das reife, 585 Aminosäuren-umfassende Albumin von den Leberzellen sezerniert wird. Der Abbau des Albumin geht über die Niere, den Gastrointestinaltrakt und in den Gewebezellen der Leber vorstatten.

[0006] Die erfindungsgemäße Peptidsequenz des ALB-408 beginnt bei der Aminosäure 408 und umfasst somit die Aminosäuren 408 bis 424 der zirkulierenden Form des Albumins. Es entsteht offensichtlich durch natürliche Prozessierung des Albumin-Vorläufers durch entsprechende Proteasen.

[0007] Überraschenderweise bewirkt das erfindungsgemäße Peptid eine Unterdrückung der HIV-1-Infektion und/oder -Replikation von bzw. in humanen Zellen.

[0008] Das erfindungsgemäße Peptid ist durch ein Reinigungsverfahren ausgehend von humanem Hämofiltrat erhältlich. Dieses Hämofiltrat fällt bei der Ultrafiltration des Blutes von Nierenkranken in großen Mengen an.

[0009] Das humane Hämofiltrat wird gegebenenfalls mit Wasser verdünnt und angesäuert. Der pH-Wert beträgt vorzugsweise 1.5 bis 3.5, insbesondere 2.5 bis 3.0. Danach wird das Hämofiltrat über einen Kationenaustauscher geleitet, beispielsweise einem mit Sulfonsäuregruppen modifizierenden Trägermaterial (Fraktogel SP – 650 (M), Merck, Darmstadt). Die an den Kationenaustauscher gebundenen Peptide werden mit einer relativ hoch konzentrierten Salzlösung eluiert. Die Ionenstärke der Elutionslösung entspricht dabei ungefähr einer 0.5 bis 1 molaren Ammoniumacetatlösung.

[0010] Das aufgefangene Eluat wird einer weiteren Kationenaustauscher-Chromatographie unterzogen. Diese Chromatographie ist vorzugsweise eine Stufenelution mit Puffer von ansteigenden pH-Werten.

[0011] Die das erfindungsgemäße Peptid enthaltenen Fraktionen werden mittels präparativer Umkehrphasen-Chromatographie und nachfolgender semipräparativer Umkehrphasen-Chromatographie beispielsweise an mit C18 modifizierten Trägermaterialien weitergereinigt. Der Aufreinigungsgrad wird vorzugsweise mittels analytischer Umkehrphasen-Chromatographie beispielsweise an mit C18 modifizierten Trägermaterialien überprüft.

[0012] Die durch die chromatographische Reinigung erhaltene Substanz wurde der Strukturaufklärung zuge-

führt. Die Bestimmung der Molekülmassen des gereinigten Peptids erfolgte mittels eines Flugzeit-Massenspektrometers (MALDI-TOF). Die Sequenzanalyse des nativen Peptids erfolgte über einen MS-MS-Kopplungs-Analyse (ESI-TRAP) mit entsprechendem Datenbankabgleich der erhaltenen Mutter- und Tochterionen. Die erfindungsgemäße Peptidsequenz wurde chemisch synthetisiert und die Authentizität des synthetisch hergestellten Peptids wurde mittels MALDI-MS verifiziert. Dieses synthetisch hergestellte ALB-408 bewirkt ebenfalls eine dosis-abhängige Unterdrückung der HIV-1-Infektion und/oder -Replikation von bzw. in humanen Zellen.

[0013] Das erfindungsgemäße Peptid sowie Analoga, Fragmente und Derivate zu dem Peptid, seine cDNA, sein Gen sowie Antikörper, welche die Wirkung des ALB-408 aufheben, können als Arzneimittel Verwendung finden. Seine biologische Aktivität entspricht der Virus-inhibierender Substanzen. Dabei kann vermutet werden, dass ALB-408 aufgrund seiner Bindung an einen Chemokinrezeptor (z. B. CXCR4) den Eintritt der HI-Viren in die Zellen hemmt. Das erfindungsgemäße Peptid kann dabei in für Peptide üblicher Weise parenteral, intravenös, intramuskulär, intranasal, lokal-topisch, subkutan oder bukal verabreicht werden. Die Menge an zu verabreichendem Peptid beträgt 1 microgramm bis 1 g pro Darreichungseinheit pro Tag. Die Wirkung des erfindungsgemäßen Peptids kann durch Gabe geeigneter Inhibitoren/Antagonisten gehemmt werden.

[0014] Das erfindungsgemäße Diagnostikum enthält poly- oder monoklonale Antikörper gegen das erfindungsgemäße Peptid gegebenenfalls in fluoreszenz- oder radioaktiv-markierter Form, um in einem an sich bekannten ELISA oder RIA eingesetzt zu werden. Das erfindungsgemäße Diagnostikum enthält DNA, RNA und/oder PNA gegebenenfalls in modifizierter und/oder markierter Form zum Einsatz in dem Fachmann bekannten Testsystemen wie PCR oder Fingerprinting. Das erfindungsgemäße Diagnostikum besteht alternativ aus einer massenspektrometrischen Methode (MALD- oder ESI-MS), welche die Substanz nach entsprechender Probenvorbereitung und Anreicherung (Abtrennung von grossen Proteinen durch Fällung, Anreicherung von ALB-408 durch Chromatographie oder RP-Medien, Festphasenextraktion) anhand ihrer einfach oder mehrfach geladenen Ionen (Mutterionen oder Tochterionen nach MS-MS-Fragmentierung) eindeutig qualitativ und quantitativ erfasst.

[0015] Die Erfindung wird anhand der folgenden Beispiele näher beschrieben.

Beispiel 1

Isolierung des antiviral wirksamen ALB-408

1. Schritt: Hämofiltrat-Batch-Extraktion

[0016] 800–1000 L Hämofiltrat werden mit HCl auf einen pH-Wert von 2.7 eingestellt und mit Wasser auf eine Leitfähigkeit von 5.5 mS/cm verdünnt und mit einer Flußrate von 3 L/min auf einen starken Kationenaustauscher aufgetragen.

Chromatographiebedingungen:

Säule:	Vantage VA 250 (Amicon, Witten)
Säulenmaterial:	Fractogel TSK SP 650 (M), 25 cm × 20 cm
Fluß:	3 L/min
Detektion:	280 nm, pH, Leitfähigkeit
Puffer A:	Hämofiltrat pH 2.7, Leitfähigkeit 5.5 mS/cm
Puffer B:	0.5 M Ammoniumacetat
Anlage:	Autopilot Chromatographiesystem, (PerSeptive Biosystems, Wiesbaden)

[0017] Nach Auftrag der insgesamt 1.000 L Flüssigkeit über Nacht wird mit mehreren Säulenvolumina 5 mM HCl gespült. Die Elution der gebundenen Peptide erfolgt als Batch-Elution mit 0.5 M Ammoniumacetat. Hierbei wird eine komplette Elution der Peptide über steigenden pH-Wert (6.8–7.2) und steigende Leitfähigkeit (56 mS/cm) in etwa 5 L Eluat erreicht.

2. Schritt: Erste präparative Auftrennung (Charge 01/2003)

[0018] Die Ammoniumacetat-Eluate der Batch-Extraktion werden in einer Menge von 10.000 L Hämofiltrat-Peptid vereinigt. Nach pH-Einstellung auf 2.7 wird das Peptidextrakt unter Zumischung von VE-Wasser mit

einer Leitfähigkeit von 5.5 mS/cm auf den präparativen Kationenaustauscher aufgetragen.

Chromatographiebedingungen:

Säule: Vantage 250 VA.
 Säulenmaterial: Fractogel TSK SP 650 (M), 25 cm × 20 cm
 Fluß: bis zu 3 L/min während des Auftrages
 0.5 bis 1 L während der Elution
 Detektion: 280 nm, pH, Leitfähigkeit
 Probe: Hämofiltrat pH 2.7, Leitfähigkeit 5.5 mS/cm
 Anlage: Autopilot Chromatographiesystem, (PerSeptive Biosystems, Wiesbaden)

[0019] Nach Auftrag des Rohextraktes über 240 min wird die Säule mit 0.01 M HCl gespült, bis die Leitfähigkeit unter 1 mS/cm ist. Die Elution erfolgt dabei in mehreren Stufen mit den im folgenden angegebenen Puffer

Puffer	pH-Wert	Puffersubstanzen	Leitfähigkeit (mS/cm)
Waschpuffer:	2.0	0.01 M HCl	1
Elutionspuffer 1:	3.6	0.1 M Zitronensäure-1-hydrat	2.9
Elutionspuffer 2:	4.5	0.1 M Essigsäure + 0.1 M Natriumacetat	4.0
Elutionspuffer 3:	5.0	0.1 M Apfelsäure	6.2
Elutionspuffer 4:	5.6	0.1 M Bernsteinsäure	6.1
Elutionspuffer 5:	6.6	0.1 M NaH ₂ PO ₄	4.9
Elutionspuffer 6:	7.4	0.1 M NaH ₂ PO ₄	6.7
Elutionspuffer 7:	9.0	0.1 M Ammoniumcarbonat	6.7

[0020] Die Eluate 1–7 werden als pH-Pool I–VII bezeichnet. Sie werden separat gesammelt und abschließend mit VE-Wasser gespült. Die Elution erfolgt bis zum Erreichen einer neuen Basislinie, wobei für die einzelnen pH-Pools I bis VII Elutionsvolumina von 10 bis 25 L erreicht werden.

3. Schritt: Zweite präparative Auftrennung:

[0021] Die einzelnen pH-Pools werden zur Fraktionierung und gleichzeitigen Entsalzung über eine Reverse Phase Chromatographie getrennt

Chromatographiebedingungen:

Säule: FineLine 100 (Pharmacia, Freiburg)
 Säulenmaterial: Source RPC, 15 µm
 10 × 12.5 cm (FineLine 100)
 Fluß: 150 mL/min (FineLine 100)
 Detektion: 280 nm, Leitfähigkeit, pH
 Puffer A: 10 mM HCl
 Puffer B: 80% Acetonitril in 10 mM HCl
 Gradient: 0–60% Puffer B in 5 Säulenvolumen

[0022] Nach Auftrag der einzelnen pH-Pools wird die Säule mit Puffer A gespült. Während der Elution werden Fraktionen zu 200 ml gesammelt. Die Fraktionen werden gefriergetrocknet und bei –20°C gelagert. Aliquots der entstandenen Fraktionen werden im HIV Hemmtest untersucht. Die Fraktionen 6–8 aus pH-Pool II enthielt das erfindungsgemäße Peptid (**Abb. 1A**).

[0023] HIV Hemmtest: 4000 P4-R5 MAGI Zellen (Charneau P, et al. J Mol Biol 241: 651, 1994) wurden in 100 µl DMEM (10% FCS, 100 U/ml Penicillin G und 100 µg/ml Streptomycinsulfat) ausgesät. P4-R5 Zellen sind stabil mit einer LTR-lacZ Kasette transfiziert und exprimieren nach erfolgreicher Infektion durch HIV-1 Tat-abhängig β-Galaktosidase, welche in einem Chemilumineszenztest nachgewiesen werden kann. Am folgenden Tag wurden Aliquots der Fraktionen zugegeben. Dazu wurden die gefriergetrockneten Chromatographien in 80 µl DMEM aufgenommen und jeweils 25 µl davon zu P4–R5 Zellen pipettiert, inkubiert für 1 h bei 37°C und an-

schließlich mit HIV-1 NL4_3 (1 ng p24 Antigen) infiziert. Virus Stocks wurden durch transiente Transfektion von 293T Zellen mit proviraler DNA mittels Calcium-Phosphat Methode gewonnen. 3 Tage nach Infektion wurde die Enzymaktivität im GalScreen Assay (Tropix) nachgewiesen. Zunächst wurde der komplette Überstand abgezogen, 40 µl einer 1:1 Verdünnung von PBS/GalScreen zugegeben, 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, und anschließend 30 µl der Lysate in 96 Well Lumiplatten gegeben. Anschließend wurde Lumineszenz als relative Lichteinheiten pro Sekunde im Luminometer detektiert (Berthold, Orion). Von allen Ansätzen wurde die mittlere β -Galaktosidase Hintergrundaktivität uninfizierter Kontrollzellen abgezogen. Die Enzymaktivitäten in Ansätzen ohne ALB-408 wurden gleich 100% gesetzt und alle weiteren Werte darauf bezogen. Die letzte Aufreinigung (7. Schritt) wurde unter exakt gleichen Bedingungen in TZM-bl Zellen (Wei X, et al. Antimicrob Agents Chemother 46: 1896, 2002.) untersucht.

4. Schritt: Semipräparative Reverse-Phase C18-Chromatographie:

[0024] Insgesamt 200 mg (entsprechend 1087 L Hämofiltrat-Äquivalentmenge) der im Assay bioaktiven Fraktionen 6–8 aus pH-Pool II wurden über eine semipräparative Reverse-Phase Säule aufgetrennt. Die Fraktionen 33 + 34 enthielt die erfindungsgemäße Substanz (**Abb. 1B**).

Chromatographiebedingungen:

Säule: 4,7 cm × 30 cm Stahlsäule
 Füllmaterial: Bakerbond RP-C18, 15–30 µm, 300 Å
 Puffer A: 100% Wasser, 10 mM HCl
 Puffer B: 80% Acetonitril, 20% Wasser, 10 mM HCl
 Gradient: 0–30% B in 2000 ml
 Fluß: 40 ml/min (Druck: 40 bar)
 Detektion: 214 nm und 280 nm
 Chromatographieanlage: BioCad 250, Perseptive Biosystems
 Fraktionen: á 50 ml ab Start des Gradienten (min 10,75)

5. Schritt: Semipräparative Reverse-Phase C18-Chromatographie:

[0025] Die im Assay bioaktiven Fraktionen 33 + 34 aus dem vorhergehenden Chromatographieschritt wurden über die gleiche semipräparative Reverse-Phase Säule unter Verwendung anderer mobiler Phasen aufgetrennt. Die Fraktionen 5 + 6 enthielt die erfindungsgemäße Substanz (**Abb. 1C**).

Chromatographiebedingungen:

Säule: 4,7 cm × 30 cm Stahlsäule
 Füllmaterial: Bakerbond RP-C18, 15–30 µm, 300 Å
 Puffer A: 30% Methanol, 70% Wasser, 10 mM HCl
 Puffer B: 100% Methanol, 10 mM HCl
 Gradient: 0–15% B in 40 ml
 15–60% B in 1900 ml
 Fluß: 40 ml/min (Druck: 30 bar)
 Detektion: 214 nm und 280 nm
 Chromatographieanlage: BioCad 250, Perseptive Biosystems
 Fraktionen: á 50 ml ab Start des Gradienten (min 9,75)

6. Schritt: Analytische Reverse-Phase C4-Chromatographie:

[0026] Die bioaktive Fraktionen 5 + 6 aus der vorhergehenden Chromatographie wurde über eine analytische Reverse-Phase Säule aufgetrennt. Aliquots wurden im Bioassay getestet. Die Fraktionen 51–57 enthielten die erfindungsgemäße Substanz (**Abb. 1D**).

Chromatographiebedingungen:

Säule: 2 cm × 25 cm Stahlsäule
 Füllmaterial: RP-C4, 5 µm, 100 Å, Biotek Silica, Östringen, Germany
 Puffer A: Wasser, 0.1% TFA
 Puffer B: 80% Acetonitril, 20% Wasser, 0.1% TFA,

Gradient: 0–5% B in 2 min, 5–35% B in 60 min, 35–100% B in 3 min
Fluß: 7 ml/min
Detektion: 214 nm und 280 nm
Chromatographieanlage: Kontron
Fraktionen: á 1 min ab min 1

7. Schritt: Analytische Reverse-Phase C18-Chromatographie:

[0027] Die bioaktive Fraktionen 51–57 aus der vorhergehenden Chromatographie wurde über eine analytische Reverse-Phase Säule aufgetrennt. Aliquots wurden im Bioassay getestet. Die Fraktion 31 enthielten die erfindungsgemäße Substanz in reiner Form ([Abb. 1E](#)).

Chromatographiebedingungen:

Säule: 1 cm × 25 cm Stahlsäule;
Füllmaterial: RP-C18, 5 µm, 300 Å, Vydac (Hesperia, USA)
Puffer A: Wasser, 0.1% TFA
Puffer B: 80% Acetonitril, 20% Wasser, 0.1% TFA
Gradient: 0–15% B in 5 min, 15–45% B in 60 min, 45–100% B in 1 min
Fluß: 2 ml/min
Detektion: 214 nm und 280 nm
Chromatographieanlage: Kontron
Fraktionen: á 1 min ab min 1

[0028] Die erfindungsgemäße Reinsubstanz war in der Fraktion 31 enthalten und wurde daraufhin in dosisabhängigerweise im Bioassay untersucht und peptidchemisch charakterisiert.

Beispiel 2

Massenbestimmungen

[0029] Die Massenbestimmungen des aus Hämofiltrat isolierten Peptids (aus den Fraktionen 31 des 7. Schritts in Beispiel 1) und des chemisch synthetisierten Peptids (Beispiel 3) wurden auf einem MALDI-Massenspektrometer durchgeführt (Voyager DE-Pro). Die Molekülmasse der Peptide wurden entsprechend der nachfolgend gezeigten Massenzahlen (MW) bestimmt: ALB-408, isoliert aus humanem Hämofiltrat (**Abb. 1F**): 1830.9 Da ALB-408, chemisch synthetisiertes Peptid: 1830.6 Da

Sequenzbestimmung

[0030] Das aufgereinigten native Peptid wurde mittels MS-MS-Kopplungs-Analyse (ESI-TRAP) von der Firma PROTEOMEFACTORY AG, Dorotheenstr. 94, 10117 Berlin (Germany) durch Datenbankabgleich der ermittelten ESI-MS-MS-Massen mittels der Mascot-Suchmaschine analysiert und erbrachte als Ergebnis die folgende Sequenz mit der höchsten Warscheinlichkeit: LVRYTKKVPQVSTPTL (**Abb. 1F**).

Datenbankvergleich

[0031] Ein weiterer Datenbankvergleich mit der SwissProt-Datenbank zeigt, dass die Peptidsequenz eine hundertprozentige Identität zu den Aminosäuren 408–424 des humanen Proteins Albumin (Accession No. NP000468) hat, die Sequenz enthält die Aminosäuren: LVRYTKKVPQVSTPTL.

HIV-1 Hemmtest.

[0032] 1,6 mg der Fraktion 31 des 7. Schritts in Beispiel 1 wurden in 160 µl DMEM gelöst. Anschließend wurden 10 µl von Drei-fach Verdünnungen ALB-408 zu 60 µl TZM-bl Zellen (60 µl) gegeben und mit 1 ng p24 Antigen HIV-1 NL4_3 in einem Gesamtvolumen von 100 µl infiziert. 3 Tage später wurde die Infektionsrate in GalScreen Assay bestimmt (siehe Bsp. 1). Fr. 31 blockierte dosisabhängig die Infektion durch das X4 trope HIV-1 NL4_3. Die Dosis, welche die Infektion halbmaximal blockiert (IC50) liegt bei 21,45 µg/ml ([Abb. 2](#)).

Beispiel 3

Chemische Synthese von ALB-408

[0033] Die chemische Synthese von ALB-408 wurde mittels konventioneller Festphasensynthese auf einem Peptid-Synthesizer 9050 (Applied Biosystems) unter Verwendung der bekannten Fmoc-Chemie durchgeführt. Das erhaltene Peptid wurde über Reverse-Phase Chromatographie aufgereinigt, seine Identität und Reinheit wurde mittels analytischer RP-HPLC sowie der unter Beispiel 2 beschriebenen MALDI-MS Massenbestimmung festgestellt.

Beispiel 4

Synthetisches ALB-408 blockiert spezifisch die Infektion X4 troper HIV-1 Varianten

[0034] 5000 TZM-bl Zellen wurden in 100 µl DMEM (10% FCS, 100 U/ml Penicillin G und 100 µg/ml Streptomycinsulfat) ausgesät. ALB-408 wurde in PBS gelöst (10 mg/ml). Einen Tag nach Aussaat der adherenten Zellen wurden jeweils 20 µl von ALB-408 Verdünnungen in PBS zu gegeben und anschließend mit 0,5 ng p24 Antigen HIV-1 in einem Gesamtvolumen von 200 µl infiziert. Zur Infektion wurden molekulare Klone, die sich hinsichtlich ihres Korezeptortropismus unterscheiden, verwendet (Papkalla A, et al. J. Virol 76: 8455–9., 2002). Nach 3 Tagen wurde die Infektion im GalScreen Assay (Tropix) nachgewiesen. Zunächst wurde der komplette Überstand abgezogen, 40 µl einer 1:1 Verdünnung von PBS/GalScreen zugegeben, 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, und anschließend 30 µl der Lysate in 96 Well Lumiplatten gegeben und die Enzymaktivität im Luminometer vermessen (siehe Bsp. 1). ALB-408 blockierte dosisabhängig die Infektion aller untersuchten X4 tropen HIV-1 Varianten (**Abb. 3A**) mit einer mittleren IC₅₀ von 24,2 µg/ml. Die dualtrope, d. h. CXCR4 und CCR5 benutzende Variante 92ht593.1 wurde weniger effizient blockiert. Im Gegensatz dazu wurden strikt CCR5 benutzende HIV-1 Varianten selbst durch sehr hohe Dosen ALB-408 (500 µg/ml) nicht gehemmt (**Abb. 3B**). Aufgrund der spezifischen Hemmung der Infektion durch X4 trope HIV-1 Varianten ist anzunehmen, dass ALB-408 mit dem Chemokinrezeptor CXCR4 interagiert.

[0035] Sowohl das aus Hämofiltrat aufgereinigte ALB-408 (Beispiel 2) als auch das chemisch synthetisierte ALB-408 (Beispiel 4) zeigen eine dosisabhängige Inhibition der HIV-1 Replikation in Zielzellen.

Legenden zu Zeichnungen 1 bis 3

[0036] Zeichnung 1: Isolierung von ALB-408 aus humanem Hämofiltrat. Das mittels pH-Stufenelution fraktionierte Hämofiltrat wurde mittels RP-HPLC weiter fraktioniert und die erhaltenen Fraktionen im HIV Hemmtest gemessen. contr.: T20-Kontrolle

A. 3. Schritt der Isolierung. Die RP-Fraktionierung des pH-Pool 2 zeigte eine inhibitorische Aktivität in den Fraktionen 6–8.

B–E. 4. bis 7. Schritt der Isolierung. Die inhibitorische Aktivität wurde bis zur Reinsubstanz gereinigt.,

F. Massenspektrum (MALDI-MS) und Sequenzanalyse des aufgereinigten ALB-408.

[0037] Zeichnung 2: Aktivitätsnachweis im HIV Hemmtest. Die ALB-408 enthaltende Fraktion 31 hemmt HIV-1. TZM-bl Zellen wurden mit seriellen Verdünnungen der Fr. 31 versetzt und mit HN-1 infiziert. Die Infektionsrate wurde 3 Tage nach Infektion im Gal Screen Test bestimmt. Gezeigt sind Mittelwerte aus Dreifachansätzen ± Standardabweichung. Die Infektionsrate in Ansätzen ohne ALB-408 wurde gleich 100% gesetzt.

[0038] Zeichnung 3: Aktivitätsnachweis im HIV Hemmtest. ALB-408 blockiert die Infektion X4 troper HIV-1 Varianten. TZM-bl Zellen wurden mit seriellen Verdünnungen ALB-408 inkubiert und anschließend mit HIV-1 (0,5 ng p24 Antigen) infiziert. Die Infektionsrate wurde 3 Tage nach Infektion im Gal Screen Test bestimmt. Die Infektionsrate in Ansätzen ohne ALB-408 wurde gleich 100% gesetzt. A) Dosisabhängige Hemmung der Infektion X4 troper HIV-1 Varianten durch ALB-408. B) ALB-408 hat keinen Einfluss auf die Infektion R5 troper HIV-1 Varianten. Dargestellt ist die Infektionsrate (% Kontrolle ohne Peptid) in Gegenwart von 500 µg/ml ALB-408. Gezeigt sind Mittelwerte aus Dreifachansätzen ± Standardabweichung.

Es folgt ein Sequenzprotokoll nach WIPO St. 25.

Dieses kann von der amtlichen Veröffentlichungsplattform des DPMA heruntergeladen werden.

ZITATE ENTHALTEN IN DER BESCHREIBUNG

Diese Liste der vom Anmelder aufgeführten Dokumente wurde automatisiert erzeugt und ist ausschließlich zur besseren Information des Lesers aufgenommen. Die Liste ist nicht Bestandteil der deutschen Patent- bzw. Gebrauchsmusteranmeldung. Das DPMA übernimmt keinerlei Haftung für etwaige Fehler oder Auslassungen.

Zitierte Nicht-Patentliteratur

- Charneau P, et al. J Mol Biol 241: 651, 1994 [\[0023\]](#)
- Wei X, et al. Antimicrob Agents Chemother 46: 1896, 2002 [\[0023\]](#)
- Papkalla A, et al. J. Virol 76: 8455–9., 2002 [\[0034\]](#)

Patentansprüche

1. Das Peptid mit nachfolgender Aminosäuresequenz:
Z₁-LVRYTKKVPQVSTPTL-Z₂ (ALB-408)
sowie seine biologisch aktiven Fragmente und/oder Varianten und/oder Derivate, insbesondere amidierte, acetylierte, sulfatierte, phosphorylierte und/oder glykosylierte Derivate, sowie die durch multiple Synthese darstellbaren Peptide, welche die biologische Aktivität von ALB-408 besitzen, darin repräsentiert Z eine Anzahl von 0 bis zu 10 Aminosäureresten.
2. Das Peptid ALB-408 nach Anspruch 1, wobei einzelne oder mehrere Aminosäurereste in der Sequenzfolge ausgetauscht, deletiert oder zugefügt werden, sowie chemische Modifizierungen an einzelnen Aminosäuren des ALB-408, die eine verbesserte biologische oder pharmakologische Aktivität von ALB-408 zur Folge haben.
3. Polynukleotide kodierend ALB-408 nach Anspruch 1 und Anspruch 2 und/oder dessen Fragmente, Varianten, Derivate und Analoga.
4. Polynukleotide nach Anspruch 3 dadurch gekennzeichnet, daß das Polynukleotid aus DNA, RNA, genomischer DNA oder PNA aufgebaut ist.
5. Ein Vektor enthaltend die Polynucleotide aus Anspruch 3.
6. Eine gentechnisch manipulierte Wirtszelle enthaltend den Vektor nach Anspruch 5.
7. Polynucleotide hybridisierend mit einem Polynucleotid aus Anspruch 3, das für ein Polypeptid mit ALB-408-Aktivität kodiert.
8. Antikörper gerichtet gegen die Polypeptide aus Anspruch 1 und 2.
9. Antagonist/Inhibitor gerichtet gegen die Polypeptide aus Anspruch 1 und 2.
10. Verfahren zur Behandlung von Patienten, die ALB-408 benötigen durch Gabe therapeutischer Mengen der Polypeptide aus Anspruch 1 und 2.
11. Verfahren zur Behandlung von Patienten, die eine Inhibition des ALB-408 benötigen durch Gabe therapeutischer Mengen eines Antagonisten/Inhibitors.
12. Galenische Formulierung bestehend aus Polypeptiden nach Anspruch 1 und 2 und einem verträglichen Carrier.
13. Verfahren zur Behandlung von Patienten, wobei eine therapeutische Wirkung des Polypeptids durch die Gabe von DNA kodierend für ALB-408 und seine Expression in vivo beim Patienten erreicht wird.
14. Verfahren zur Herstellung von ALB-408 gemäß Anspruch 1 durch Extraktion von Hämofiltrat durch Kationenaustauscher-Extraktion mit nachfolgender Elution der adsorbierten Substanzen, eine erneute Kationenaustauscher-Chromatographie des die Peptide enthaltenden Extraktes sowie mehrstufige Umkehrphasen-Chromatographie.
15. Verfahren zur Herstellung von ALB-408 gemäß Anspruch 1 und 2 durch Festphasensynthese im Sinne der Merrifield-Synthese sowie Flüssigphasensynthese nach dem Fachmann bekannten Methoden mit geschützten Aminosäuren und dessen Aufreinigung.
16. Verfahren zur Herstellung einer ALB-408 gemäß Anspruch 1 und 2 durch dem Fachmann bekannte Verfahren der heterologen Expression mittels gängiger biotechnologischer Vektoren.
17. Diagnostikmittel enthaltend poly- oder monoklonale Antikörper nach Anspruch 8 oder enthaltend für die ALB-408 nach Anspruch 1 und 2 kodierende Nukleinsäure oder mRNA.
18. Diagnostikmittel enthaltend die Peptide nach Anspruch 1 und 2 oder Polynucleotide nach Anspruch 3 für Testsysteme zur Kontrolle von Gewebe-, Plasma-, Urin- und Liquor cerebrospinalis-Spiegeln dieser Sub-

stanz.

19. Diagnostikmittel und Testsysteme, welche die Peptide nach Anspruch 1 und 2 nachweisen zur Kontrolle von Gewebe-, Plasma-, Urin- und Liquor cerebrospinalis-Spiegeln dieser Substanz mit Hilfe von massenspektrometrischen Methoden wie MALDL-MS oder ESI-MS in Verbindung mit einer Probenvorbereitung mittels RP-HPLC, Proteinfällung und/oder Festphasenextraktion.

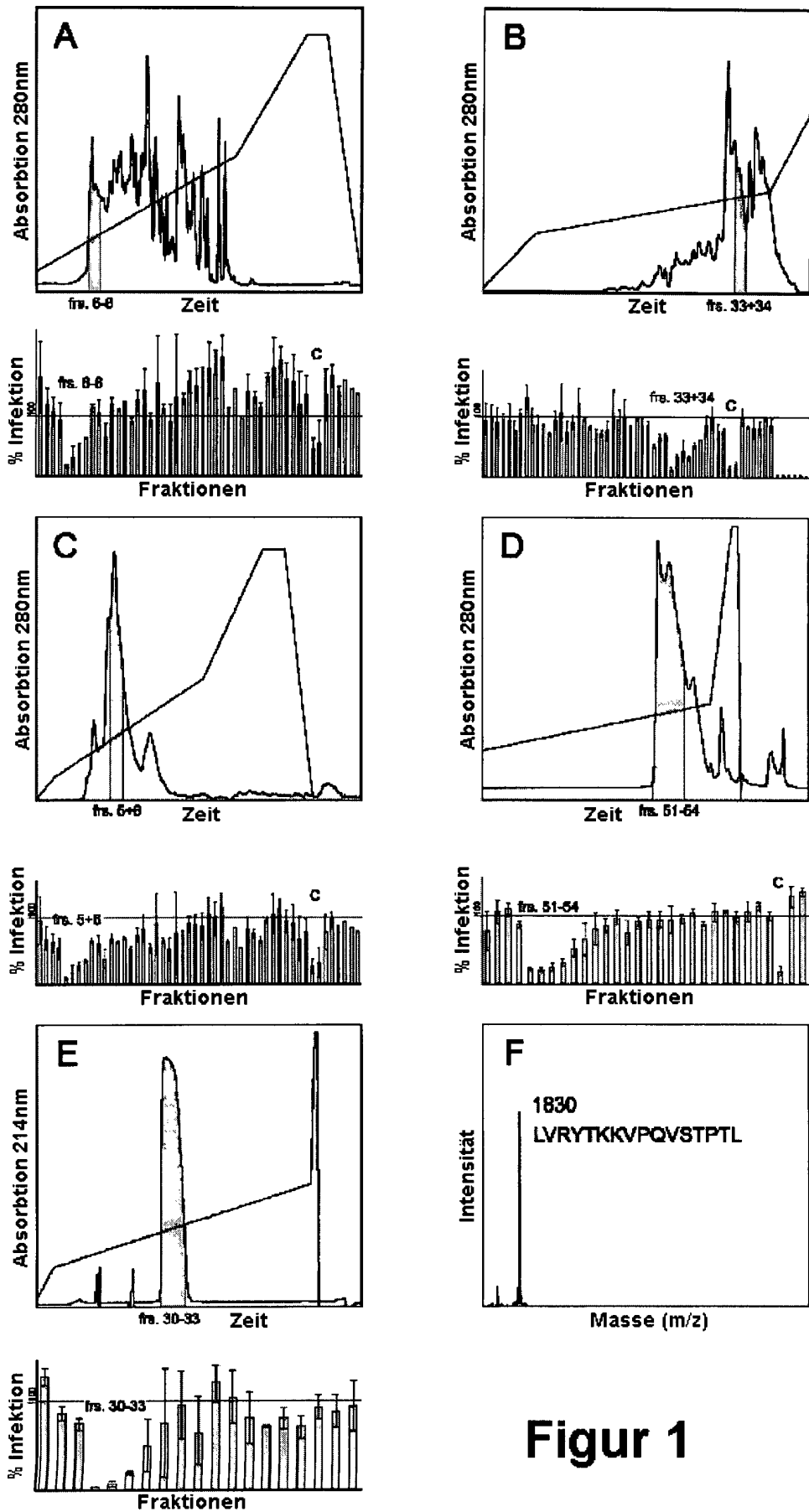
20. Diagnostikmittel enthaltend die Peptide nach Anspruch 1 und 2 als Marker für virale Erkrankungen, bakterielle und Pilz-Infektionen, inflammatorischen und neoplastischen Prozessen sowie als Marker bei entzündlichen Prozessen, gestörten Entzündungsreaktionen, Tumorerkrankungen, Wachstumsstörungen, Erkrankungen des Immunsystems sowie als Marker bei Knochenerkrankungen.

21. Arzneimittel enthaltend die Peptide nach Anspruch 1 und 2 als wirksamen Bestandteil von galenischen Formen zur oralen, intravenösen, intramuskulären, intracutanen, subcutanen, intrathekalen Anwendung sowie als Aerosol zur transpulmonalen Applikation.

22. Verwendung der Peptide aus Anspruch 1 und 2 sowie der Polynucleotide nach Anspruch 3 sowie der Antikörper/Antagonisten aus Anspruch 8 und 9 sowie einer galenischen Formulierung aus Anspruch 12 für die Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von viralen Erkrankungen, dabei insbesondere HIV-1, HIV-2, Zytomegalie-Virus, Herpes-simplex-Virus (Typ 1 und 2), Varicella-Zoster-Virus, Hepatitis-A- und Hepatitis-B-Virus, Influenza-Virus, Polio-Virus, Rhino-Virus, Röteln-Virus, Masern-Virus, Tollwut-Virus, Rous-Sarcom-Virus, Epstein-Barr-Virus sowie zur Behandlung von bakteriellen und Pilz-Infektionen, entzündlichen Prozessen, gestörten Entzündungsreaktionen, Tumorerkrankungen, Wachstumsstörungen, neuronalen Erkrankungen, Erkrankungen der Blutgerinnung und Blutbildung, Gefäßerkrankungen, Erkrankungen des Immunsystems, sowie zur Wund- und Knochenheilung.

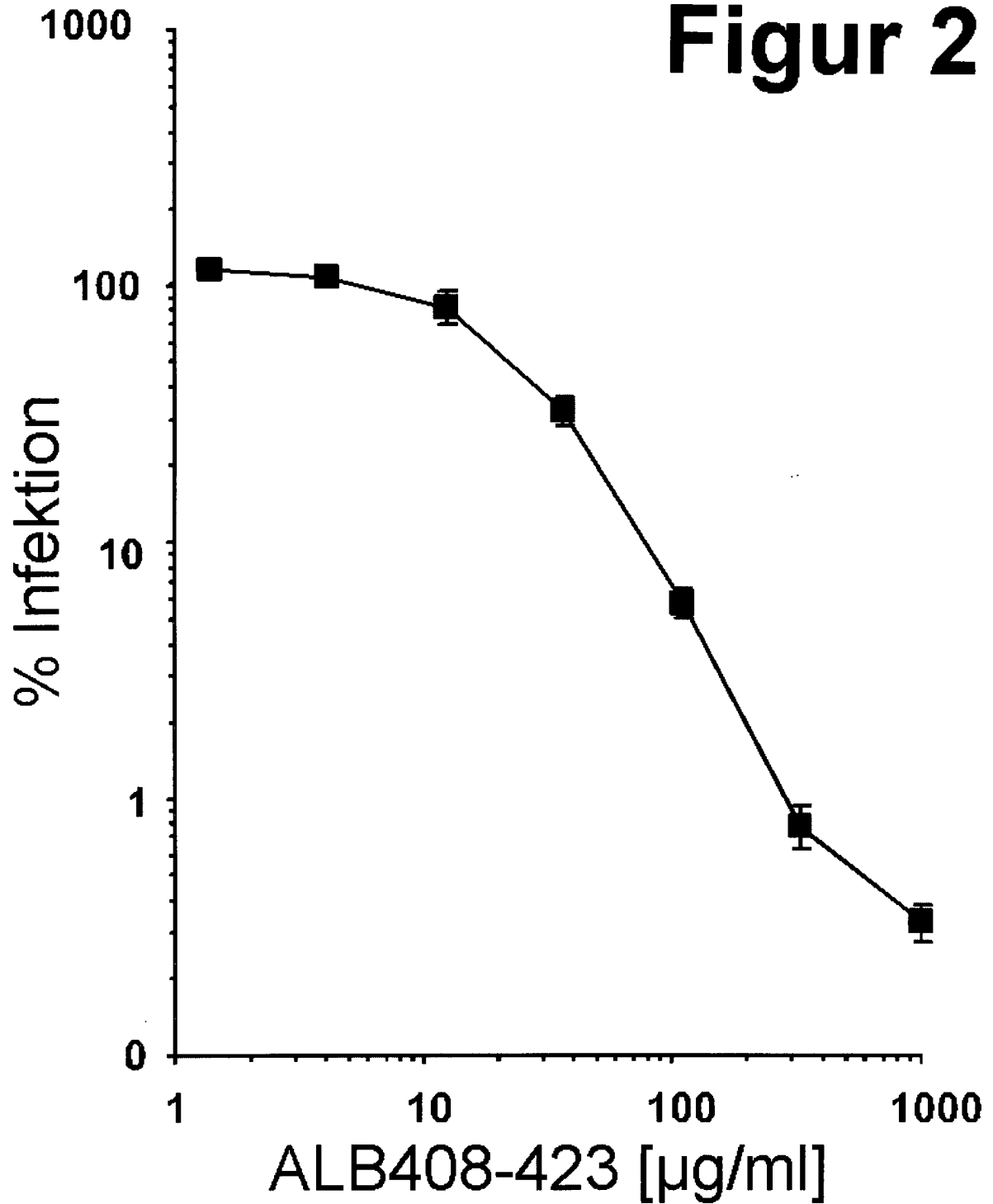
Es folgen 3 Blatt Zeichnungen

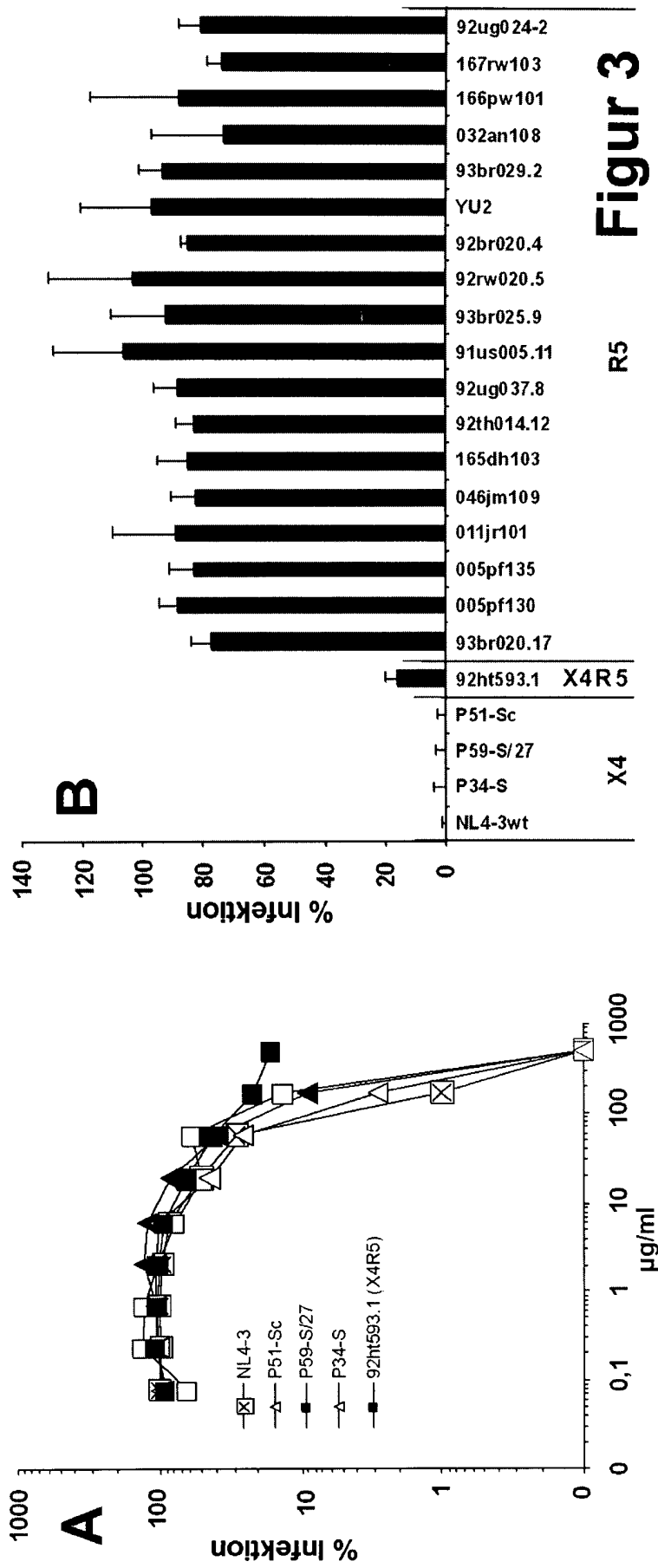
Anhängende Zeichnungen



Figur 1

Figur 2





Figur 3