



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 698 38 254 T2** 2008.05.08

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 007 670 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **698 38 254.4**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US98/09048**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **98 920 965.5**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1998/050549**

(86) PCT-Anmeldetag: **07.05.1998**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **12.11.1998**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **14.06.2000**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **15.08.2007**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **08.05.2008**

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

C12Q 1/68 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

852824 **07.05.1997** **US**

(73) Patentinhaber:

Human Genome Sciences, Inc., Rockville, Md., US

(74) Vertreter:

Vossius & Partner, 81675 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

**RUBEN, Steven M., Brookeville, Maryland 20833,
US; LI, Yi, Sunnyvale, CA 94086, US**

(54) Bezeichnung: **ZWEI MENSCHLICHE G-PROTEIN-GEKOPPELTE REZEPTORPROTEINE: EBV-INDUZIERTER GPCR2 (EBI-2) UND EGD-1-ÄHNLICHER GPCR**

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] Diese Erfindung betrifft neu identifizierte Polynucleotide, Polypeptide, die durch solche Polynucleotide codiert sind, die Verwendung solcher Polynucleotide und Polypeptide sowie die Herstellung von solchen Polynucleotiden und Polypeptiden. Genauer gesagt ist das Polypeptid der vorliegenden Erfindung ein menschlicher EBV-induzierter G-Protein-gekoppelter Rezeptor (EBI-2), der hierin auch manchmal als „GBR“ oder „GPCR“ und kollektiv als „GBRs“ bezeichnet wird. Die Erfindung betrifft auch die Hemmung der Wirkung solcher Polypeptide.

[0002] Mindestens neun Gene sind identifiziert worden, die offensichtlich in Antwort auf eine Epstein-Barr-Virus (EBV) Infektion aktiviert werden. Eines von zwei neuen Genen, das auch in solchen Studien von EBV-Infektionen identifiziert wurde, war ein neues GPCR-ähnliches cDNA-Molekül, das als EBV-induzierter G-Protein-gekoppelter Rezeptor (EBI)-1 bezeichnet wurde.

[0003] Außerdem wurde früher ein Endothelium-Differenzierungsgen (EDG) identifiziert, das aus PMA-stimulierten menschlichen Endothelzellen erhalten wurde. Ratten- und Schafhomologe von EDG-1 sind identifiziert worden, die auch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren darstellen.

[0004] Es ist gut etabliert, dass viele medizinisch signifikante biologische Prozesse durch Proteine vermittelt werden, die an Signalübertragungswegen teilhaben, die G-Proteine und/oder sekundäre Botenstoffe, z.B.: cAMP, umfassen (Lefkowitz, Nature, 351: 353–354 (1991)). Hierin werden diese Proteine als Proteine bezeichnet, die an Wegen mit G-Proteinen oder PPG-Proteinen teilnehmen. Manche Beispiele dieser Proteine umfassen GPC-Rezeptoren wie jene für adrenerge Mittel und Dopamin (Kobilka, B. K., et al., PNAS, 84: 46–50 (1987), Kobilka, B. K., et al., Science, 238: 650–656 (1987); Bunzow, J. R., et al., Nature, 336: 783–787 (1988)), G-Proteine selbst, Effektorproteine, z.B. Phospholipase C, Adenyl-Cyclase, und Phosphodiesterase und Aktuator-Proteine, z.B. Proteinkinase A und Proteinkinase C (Simon, M. I., et al., Science, 252: 802–8 (1991)).

[0005] Zum Beispiel ist in einer Form der Signalübertragung der Effekt der Hormonbindung die Aktivierung eines Enzyms, der Adenylat-Cyclase, innerhalb der Zelle. Enzymaktivierung durch Hormone ist von der Anwesenheit der Nucleotide GTP abhängig und GTP beeinflusst auch die Hormonbindung. Ein O-Protein verbindet die Hormonrezeptoren mit der Adenylat-Cyclase. Es wurde gezeigt, dass O-Protein GTP in gebundenes GDP austauscht, wenn es durch Hormonrezeptoren aktiviert wird. Die GTP-tragende Form bindet dann an aktivierte Adenylat-Cyclase. Die durch das G-Protein selbst katalysierte Hydrolyse von GTP zu GDP führt das O-Protein zu seiner grundlegenden Form, der inaktiven Form, zurück. Daher dient das O-Protein einer zweifachen Rolle, als ein Zwischenprodukt, welches das Signal von Rezeptor zum Effektor weitergibt, und als eine Uhr, die die Signaldauer kontrolliert.

[0006] Die Membranprotein-Gensuperfamilie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren ist dahingehend charakterisiert worden, dass sie sieben mutmaßliche Transmembrandomänen aufweist. Von den Domänen wird angenommen, dass sie transmembrane α -Helices aufweisen, die durch extrazelluläre oder cytoplasmatische Schleifen verbunden sind. Ein funktionelles O-Protein ist ein Trimer, das aus einer variablen alpha-Untereinheit besteht, verbunden mit viel enger assoziierten und konstanten beta- und gamma-Untereinheiten. Eine große Auswahl an Liganden (mehr als 20) sind identifiziert worden, die über GPCRs wirken. Im Allgemeinen führt das Binden eines entsprechenden Liganden an einen GPCR zur Aktivierung des Rezeptors. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren umfassen eine große Auswahl an biologisch aktiven Rezeptoren, wie zum Beispiel Hormon-, virale, Wachstumsfaktor- und Neurorezeptoren. Ein solcher aktivierter Rezeptor initiiert den regulatorischen Zyklus des O-Proteins. Dieser Zyklus besteht aus dem GTP-Austausch gegen GDP, Dissoziation der alpha- und beta/gamma-Untereinheiten, Aktivierung des sekundären Botenstoffwegs durch einen Komplex von GTP und der alpha-Untereinheit des O-Proteins und Rückkehr zum Ruhestadium durch GTP-Hydrolyse über die der G-Protein-alpha-Untereinheit eigene GTPase-Aktivität.

[0007] G-Protein-gekoppelte Rezeptoren sind so charakterisiert worden, dass sie diese sieben konservierten hydrophoben Abschnitte von etwa 20 bis 30 Aminosäuren umfassen, die mindestens acht divergente hydrophile Schleifen verbinden. Die G-Proteinfamilie von gekoppelten Rezeptoren umfasst Dopaminrezeptoren, die neuroleptische Arzneistoffe binden, die zur Behandlung von psychotischen und neurologischen Erkrankungen verwendet werden. Andere Beispiele an Mitgliedern dieser Familie umfassen Calcitonin-, -adrenerge, Endothelin-, cAMP-, Adenosin-, muskarinische, Acetylcholin-, Serotonin-, Histamin-, Thrombin-, Kinin-, Folikel-stimulierendes Hormon-, Opsin- und Rhodopsin-, Odorans-, Cytomegalievirus-Rezeptoren usw..

[0008] Die meisten GPRs weisen konservierte Cysteinreste in jeder der ersten beiden extrazellulären Schlei-

fen auf, die Disulfidbrücken bilden, von welchen angenommen wird, dass sie die funktionelle Proteinstruktur stabilisieren. Die sieben Transmembranregionen werden als TM1, TM2, TM3, TM4, TM5, TM6 und TM7 bezeichnet. TM3 wird auch mit der Signalübertragung in Zusammenhang gebracht.

[0009] Phosphorylierung und Lipidierung (Palmitoylierung oder Farnesylierung) von Cysteinresten kann die Signaltransduktion von manchen GPRs beeinflussen. Die meisten GPRs enthalten potentielle Phosphorylierungsstellen innerhalb der dritten cytoplasmatischen Schleife und/oder des Carboxylterminus. Bei vielen GPRs wie zum Beispiel dem β -Adenorezeptor vermittelt die Phosphorylierung durch Protein-Kinase A und/oder spezifische Rezeptorkinasen die Rezeptordesensibilisierung.

[0010] Von den Ligandenbindungsstellen der GPRs wird angenommen, dass sie einen aus mehreren GPR-Transmembrandomänen gebildeten hydrophilen Sockel umfassen, wobei der Sockel von hydrophoben Resten der GPRs umgeben ist. Von der hydrophilen Seite jeder GPR-Transmembran-Helix wird postuliert, dass sie nach innen zeigt und die polare Ligandenbindungsstelle bildet. TM3 ist mit mehreren GPRs in Zusammenhang gebracht worden, dass sie eine Ligandenbindungsstelle aufweist, wie zum Beispiel eine, die den TM3-Aspartatrest einschließt. Außerdem werden TM5-Serine, ein TM6-Asparagin und TM6- oder TM7-Phenylalanine oder -Tyrosine mit der Ligandenbindung in Zusammenhang gebracht.

[0011] GPRs können intrazellulär durch heterotrimere G-Proteine an verschiedene intrazelluläre Enzyme, Ionenkanäle und Transporter gekoppelt sein (siehe Johnson et al., *Endoc., Rev.*, 10: 317–331 (1989)). Unterschiedliche G-Protein- α -Untereinheiten stimulieren vorzugsweise spezielle Effektoren, um verschiedene biologische Funktionen in einer Zelle zu modulieren. Phosphorylierung von cytoplasmatischen Resten an GPRs ist als ein wichtiger Mechanismus der Regulation von G-Protein-Kopplung von manchen GPRs identifiziert worden.

[0012] G-Protein-gekoppelte Rezeptoren werden in zahlreichen Stellen innerhalb eines Säugerwirts gefunden, zum Beispiel ist Dopamin ein entscheidender Neurotransmitter im zentralen Nervensystem und ist ein G-Protein-gekoppelter Rezeptorligand.

[0013] In Übereinstimmung mit einem Aspekt der vorliegenden Erfindung werden neue Polypeptide bereitgestellt, sowie biologisch aktive und diagnostisch oder therapeutisch nützliche Fragmente und Derivate davon. Die Polypeptide der vorliegenden Erfindung sind von menschlichem Ursprung.

[0014] In Übereinstimmung mit einem anderen Aspekt der vorliegenden Erfindung werden isolierte Nucleinsäuremoleküle bereitgestellt, einschließlich mRNAs, DNAs, cDNAs, genomischer DNA sowie auch Antisense-Analoga davon und biologisch aktiver und diagnostisch oder therapeutisch nützlicher Fragmente davon.

[0015] In Übereinstimmung mit einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung wird ein Prozess zur Herstellung solcher Polypeptide durch rekombinante Techniken bereitgestellt, welcher Züchten von rekombinanten prokaryontischen und/oder eukaryontischen Wirtszellen, die eine Nucleinsäuresequenz enthalten, die ein Polypeptid der vorliegenden Erfindung codiert, unter Bedingungen umfasst, welche die Expression dieses Proteins und die anschließende Gewinnung dieses Proteins fördern.

[0016] In Übereinstimmung mit noch einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung werden Antikörper gegen solche Polypeptide bereitgestellt.

[0017] In Übereinstimmung mit einer weiteren Ausführungsform wird ein Verfahren zur Verwendung von einem oder mehreren der Rezeptoren gemäß der Erfindung zum Durchmustern nach Rezeptorantagonisten und/oder -Agonisten und/oder Rezeptorliganden bereitgestellt.

[0018] In Übereinstimmung mit noch einer weiteren Ausführungsform können solche Agonisten verwendet werden, um das Polypeptid der vorliegenden Erfindung zur Behandlung von Zuständen zu verwenden, die mit der Unterexpression des Polypeptids der vorliegenden Verbindung in Zusammenhang stehen.

[0019] In Übereinstimmung mit einem anderen Aspekt können solche Antagonisten zur Hemmung des Polypeptids der vorliegenden Erfindung zur Behandlung von Zuständen verwendet werden, die mit der Überexpression des Polypeptids der vorliegenden Verbindung in Zusammenhang stehen.

[0020] In Übereinstimmung mit noch einem weiteren, wie in den Ansprüchen definierten Aspekt der vorliegenden Erfindung werden nicht natürlich vorkommende, synthetische, isolierte und/rekombinante Polypeptide be-

reitgestellt, die Fragmente, Konsensus-Fragmente und/oder Sequenzen, die konservative Aminosäuresubstitutionen aufweisen von mindestens einer Transmembrandomäne darstellen, so dass die Polypeptide der vorliegenden Erfindung Liganden binden können, oder die auch quantitativ oder qualitativ die Ligandenbindung an die Polypeptide der vorliegenden Erfindung modulieren können.

[0021] In Übereinstimmung mit noch einem weiteren, wie in den Ansprüchen definierten Aspekt der vorliegenden Erfindung werden synthetische oder rekombinante Polypeptide, konservative Substitutionsderivate davon, Antikörper, anti-idiotypische Antikörper, Zusammensetzungen und Verfahren bereitgestellt, die aufgrund ihrer erwarteten biologischen Eigenschaften, die in diagnostischen, therapeutischen und/oder Forschungsanwendungen verwendet werden können, als mögliche Modulatoren der Funktion des G-Protein-gekoppelten Rezeptors durch Bindung an Liganden oder Modulieren der Ligandenbindung nützlich sein können.

[0022] In Übereinstimmung mit einem anderen, wie in den Ansprüchen definierten Gegenstand der vorliegenden Erfindung werden synthetische, isolierte oder rekombinante Polypeptide bereitgestellt, die entworfen wurden, um verschiedene GPRs oder Fragmente davon wie Rezeptorarten oder Unterarten zu hemmen oder nachzuahmen.

[0023] In Übereinstimmung mit noch einem weiteren Gegenstand der vorliegenden Erfindung wird ein diagnostischer in vitro-Test zum Nachweis einer Krankheit oder einer Anfälligkeit für eine Krankheit bereitgestellt, die mit einer Mutation in einer Nucleinsäuresequenz in Zusammenhang steht, die ein Polypeptid der vorliegenden Erfindung codiert.

[0024] Diese und andere Aspekte der vorliegenden Erfindung sollten einem Fachmann von den Lehren hierin offensichtlich sein.

[0025] Die folgenden Abbildungen sind darstellend für die Ausführungsformen der Erfindung und sind nicht dafür gedacht den Geltungsbereich der Erfindung, wie er durch die Ansprüche umfasst wird, zu limitieren.

[0026] **Fig. 1** zeigt die cDNA-Sequenz (SEQ ID NO: 1) und die entsprechende, davon abgeleitete Aminosäuresequenz (SEQ ID NO: 2) des EBV-induzierten G-Protein-gekoppelten Rezeptors der vorliegenden Erfindung. Die Polynucleotidsequenz enthält eine 2249 Nucleotid-Sequenz, die einen 342 Aminosäure langen offenen Leserahmen codiert. In **Fig. 1** wird die Standard 1-Buchstaben-Abkürzung für Aminosäuren verwendet, um die abgeleitete Aminosäuresequenz darzustellen. Die Sequenzierung wurde unter Verwendung eines automatisierten 373-DNA-Synthesegeräts (Applied Biosystems, Inc.) durchgeführt. Es wird vorausgesagt, dass die Sequenzierungsgenauigkeit größer als 97% ist.

[0027] **Fig. 2** ist ein Aminosäure-Sequenzvergleich zwischen dem EBV-induzierten (EBI-2) G-Protein-gekoppelten Rezeptor (obere Linie, siehe SEQ ID NO: 2) und dem menschlichen EBI-1-G-Protein-gekoppelten Rezeptor (untere Linie, SEQ ID NO: 17). Die Standard-1-Buchstaben-Abkürzungen werden verwendet, um die Aminosäurereste der geschilderten Aminosäuresequenzen darzustellen. Das EBI-2-Polypeptid gemäß der vorliegenden Erfindung zeigt ungefähr 25% Identität und 49% Ähnlichkeit zu der Aminosäuresequenz des EBI-1-Gens über eine Ausdehnung von ungefähr 350 Aminosäuren.

[0028] **Fig. 3** zeigt als ein Referenzbeispiel die cDNA-Sequenz (SEQ ID NO: 3) und die entsprechende, abgeleitete Aminosäuresequenz (SEQ ID NO: 4) des EDG-1-ähnlichen G-Protein-gekoppelten Rezeptors der vorliegenden Erfindung. Die Polynucleotidsequenz enthält eine 1637 Nucleotid-Sequenz, die einen 260 Aminosäuren langen ORF codiert. In **Fig. 3** wird die Standard-1-Buchstaben-Abkürzung für Aminosäuren verwendet, um die abgeleitete Aminosäuresequenz darzustellen. Die Sequenzierung wurde unter Verwendung eines automatisierten 373-DNA-Sequenzierungsgeräts (Applied Biosystems, Inc.) durchgeführt. Es wird vorausgesagt, dass die Sequenzierungs-Genauigkeit mehr als 97% genau ist.

[0029] **Fig. 4** ist ein Aminosäuresequenzvergleich zwischen dem EDG-1-ähnlichen G-Protein-gekoppelten Rezeptor (obere Linie, siehe SEQ ID NO: 4) und dem menschlichen EDG-1-Orphan-G-Protein-gekoppeltem Rezeptor (untere Linie, SEQ ID NO: 18). Die Standard-1-Buchstaben-Abkürzungen werden verwendet, um die Aminosäurereste der dargestellten Aminosäuresequenzen zu repräsentieren. Das EDG-1-ähnliche Polypeptid gemäß der Erfindung zeigt ungefähr 54% Identität und 73% Ähnlichkeit mit der Aminosäuresequenz des menschlichen EDG-1-Orphan-G-Protein-gekoppelten Rezeptorgens über zwei Regionen von insgesamt ungefähr 120 Aminosäuren.

[0030] In Übereinstimmung mit einem Aspekt der vorliegenden Erfindung wird eine isolierte Nucleinsäure

(Polynucleotid) bereitgestellt, welche das reife Polypeptid, das die abgeleitete Aminosäuresequenz von **Fig. 1** (SEQ ID NO: 2) aufweist, oder das reife Polypeptid codiert, das durch die cDNA des Clons codiert ist, der am 28. 4. 1997 als ATCC-Hinterlegungsnummer 209003 hinterlegt wurde.

[0031] Ein Polynucleotid, das ein EBI-2-Polypeptid der vorliegenden Erfindung codiert, kann in einer cDNA-Bank aus Nabelvenen-Endothelzellen, neutrophilen Leukocytenzellen und Corpus-colosum-Zellen gefunden werden. Das Polynucleotid dieser Erfindung wurde in einer cDNA-Bank entdeckt, die aus Nabelvenen-Endothelzellen stammt. Wie vorstehend beschrieben, ist es strukturell mit der G-Protein-gekoppelten Rezeptorfamilie verwandt. Es enthält einen offenen Leserahmen, der ein Protein von 343 Aminosäureresten codiert.

[0032] Die vorliegende Anmeldung offenbart darüber hinaus ein Referenzbeispiel einer isolierten Nucleinsäure (Polynucleotid), die das reife Polypeptid, welches die abgeleitete Aminosäuresequenz von **Fig. 3** (SEQ ID NO: 4) aufweist, oder das reife Polypeptid codiert, welches durch die cDNA des am 28. 4. 1997 als ATCC-Hinterlegungsnummer 209004 hinterlegten Clons codiert wird.

[0033] Ein Polynucleotid, das ein EDG-1-ähnliches G-Protein-gekoppeltes Rezeptorpolypeptid codiert, kann in einer cDNA-Bank von aktivierten Neutrophilen, Cyclohexamin behandelten Raji-Zellen, der RSR; 1 I-Knochenmarkszelllinie, aktivierten T-Zellen, Mandeln und DC34-positiven Nabelschnur-Blutzellen gefunden werden. Northern-Blot-Analyse deutet darauf hin, dass das EDG-1-ähnliche Rezeptorgen hauptsächlich in Leukocyten exprimiert wird, aber die Expression kann auch in Plazenta, Milz, Schilddrüse, Lunge und Bauchspeicheldrüsengewebe beobachtet werden. Das Polynucleotid wurde in einer cDNA-Bank entdeckt, die aus aktivierten Neutrophilen stammte. Wie vorstehend beschrieben, ist es strukturell mit der G-Protein-gekoppelten Proteinfamilie verwandt. Es enthält einen offenen Leserahmen, der ein Protein von 261 Aminosäureresten codiert.

[0034] Wie vorstehend angemerkt, liegt die Bedeutung, die GPCR-Molekülen wie zum Beispiel jenen der vorliegend beanspruchten Erfindung beigemessen wird, zum großen Teil in der Vielfalt biologischer Funktionen, an welchen sie teilhaben. Zum Beispiel wird angenommen, dass die beta/gamma-Untereinheit nach Freisetzung von der alpha-Untereinheit durch Aktivierung des Arachidonsäure-Signalübertragungswegs über die Aktivierung der Phospholipase A2 auch eine funktionelle Rolle in der Regulation der Signalübertragung spielen kann. Außerdem sind GPCR-Moleküle und ihre assoziierten G-Proteine mit der Kopplung von visuellen Pigmenten an cGMP-Phosphodiesterase, Phosphatidyl-Inosit (PI)-Umsetzung, Adenylat-Cyclase-Signalkanäle und anderen integralen Membranenzymen an Transporterproteine in Zusammenhang gebracht worden. Als eine Folge ist es offensichtlich, dass ein neues GPCR-Molekül sich in einer großen Vielfalt von pharmazeutischen Anwendungen, einschließlich Forschung und Entwicklung, als nützlich herausstellen könnte. Zum Beispiel können zielbasierte Durchmusterungen nach kleinen Molekülen und anderen solch pharmakologisch wertvollen Faktoren auf der Aktivierung eines bestimmten GPCR basiert werden. Es ist auch beobachtet worden, dass kurze Peptide durch Nachahmung des GPCR funktionieren können (bezeichnet als Rezeptormimetika). Darüber hinaus können sich Antikörper, die gegen solche Faktoren erzeugt werden, in etlichen Funktionen als nützliche Arzneimittel erweisen. Mögliche therapeutische und/oder diagnostische Anwendungen eines solchen Faktors kann solch unterschiedliche klinische Präsentationen wie Herzerkrankung, Geisteskrankheit, Krebs, Atherosklerose, Restenose, Alzheimer-Krankheit, Parkinson-Krankheit und etliche andere umfassen.

[0035] Demgemäß können die Polynucleotide der vorliegenden Erfindung in Form von RNA oder in Form von DNA vorliegen, wobei DNA cDNA, genomische DNA und synthetische DNA umfasst. Die DNA kann doppelsträngig oder einzelsträngig vorliegen und, wenn einzelsträngig, kann sie der codierende Strang oder der nicht-codierende (Antisense)-Strang sein. Die codierende Sequenz, welche das reife EBI-2-Polypeptid codiert, kann mit der in **Fig. 1** (SEQ ID NO: 1) gezeigten codierenden Sequenz oder mit jener des hinterlegten Clons identisch sein oder kann eine unterschiedliche codierende Sequenz darstellen, wobei die codierende Sequenz als ein Ergebnis der Redundanz oder Degeneration des genetischen Codes das gleiche reife Polypeptid wie die DNA von **Fig. 1** (SEQ ID NO: 1) oder die hinterlegte DNA codiert.

[0036] Die Polynucleotide, die das reife EBI-2-Polypeptid von **Fig. 1** (SEQ ID NO: 2) oder das reife EBI-2-Polypeptid codieren, das durch die hinterlegte cDNA codiert ist, können umfassen: nur die codierende Sequenz des reifen Polypeptids; die codierende Sequenz des reifen Polypeptids und eine zusätzliche codierende Sequenz wie zum Beispiel einen Leader oder eine sekretorische Sequenz oder eine Proprotein-Sequenz; die codierende Sequenz für das reife Polypeptid (und wahlweise eine zusätzliche codierende Sequenz) und eine nicht codierende Sequenz wie zum Beispiel Introns oder eine nicht codierende Sequenz 5'- und/oder 3'- von der codierenden Sequenz des reifen Polypeptids.

[0037] Der Begriff „Polynucleotid, das ein Polypeptid codiert“ umfasst daher ein Polynucleotid, das nur eine codierende Sequenz für das Polypeptid einschließt, sowie ein Polynucleotid, das zusätzliche codierende und/oder nicht codierende Sequenzen einschließt.

[0038] Die vorliegende Erfindung betrifft ferner Varianten der hierin vorstehend beschriebenen Polynucleotide, die innerhalb der Einschränkungen der Ansprüche Fragmente, Analoge und Derivate des Polypeptids, das die abgeleitete Aminosäuresequenz von **Fig. 1** (SEQ ID NO: 2) aufweist, oder des durch die cDNA des hinterlegten Clons codierte Polypeptids codieren. Die Variante von einem dieser beiden Polynucleotide kann eine natürlich vorkommende allele Variante des Polynucleotids oder eine nicht natürlich vorkommende Variante des Polynucleotids sein.

[0039] Die vorliegende Erfindung umfasst daher Polynucleotide, codierend das gleiche reife Polypeptid, das in **Fig. 1** (SEQ ID NO: 2) gezeigt wird, oder das gleiche reife Polypeptid, das durch die cDNA des hinterlegten Clons codiert wird, sowie innerhalb der Einschränkungen der Ansprüche liegende Varianten solcher Polynucleotide, wobei die Varianten ein Fragment, Derivat oder Analog des Polypeptids von **Fig. 1** (SEQ ID NO: 2) oder des Polypeptids codieren, das durch die cDNA des hinterlegten Clons codiert wird. Solche Nucleotidvarianten umfassen Deletionsvarianten, Substitutionsvarianten und Additions- oder Insertionsvarianten.

[0040] Wie hierin vorstehend angedeutet, kann das Polynucleotid eine codierende Sequenz aufweisen, die eine natürlich vorkommende allele Variante der in **Fig. 1** (SEQ ID NO: 1) gezeigten codierenden Sequenz oder der codierenden Sequenz des hinterlegten Clons ist, wobei diese Variante mindestens 90% identisch ist zu den letzteren Sequenzen. Wie im Fachgebiet bekannt, ist eine allele Variante eine alternative Form einer Polynucleotidsequenz, die eine Substitution, Deletion oder Addition einer oder mehrerer Nucleotide aufweisen kann, welche die Funktion des codierten Polypeptids nicht wesentlich ändert.

[0041] Die vorliegende Erfindung umfasst auch Polynucleotide, wobei die codierende Sequenz für das reife Polypeptid im gleichen Leserahmen mit einer Polynucleotidsequenz fusioniert sein kann, die bei der Expression und Absonderung eines Polypeptids von einer Wirtszelle hilft, zum Beispiel eine Leadersequenz, die als eine sekretorische Sequenz zum Kontrollieren des Transports eines Polypeptids aus der Zelle hilft. Das Polypeptid, welches eine Leadersequenz aufweist, ist ein Präprotein, und wobei die Leadersequenz durch die Wirtszelle von der reifen Form des Polypeptids abgespalten werden kann. Die Polynucleotide können auch ein Proprotein codieren, das ein reifes Protein mit zusätzlichen 5' Aminosäureresten darstellt. Ein reifes Protein, welches eine Prosequenz aufweist, ist ein Proprotein und ist eine inaktive Form des Proteins. Sobald die Prosequenz abgespalten ist, verbleibt ein reifes Protein. Das Polynucleotid der vorliegenden Erfindung kann daher zum Beispiel ein reifes Protein, oder ein Protein, welches eine Prosequenz aufweist, oder ein Protein codieren, das sowohl eine Prosequenz als auch eine Präsequenz (Leadersequenz) aufweist.

[0042] Die Polynucleotide der vorliegenden Erfindung können auch eine codierende Sequenz aufweisen, die im Leserahmen mit einer Markersequenz fusioniert ist, welche die Reinigung des Polypeptids der vorliegenden Erfindung ermöglicht. Die Markersequenz kann im Falle eines bakteriellen Wirts einen Hexa-Histidin-Marker darstellen, der durch einen pQE-9-Vektor geliefert wird, um die Reinigung des reifen Polypeptids, das mit dem Marker fusioniert ist, zu gewährleisten oder, zum Beispiel kann, wenn eine Säugerwirt, zum Beispiel COS-7-Zellen, verwendet wird, die Markersequenz einen Hämagglutinin (HA)-Marker darstellen. Der HA-Marker entspricht einem Epitop, das von dem Influenza-Hämagglutininprotein stammt (Wilson, I., et al., Cell, 37: 767 (1984)).

[0043] Der Begriff „Gen“ bedeutet das DNA-Segment, das an der Herstellung einer Polypeptidkette beteiligt ist; es umfasst Regionen, welche der codierenden Region vorausgehen und folgen (Leader und Trailer), sowie auch intervenierende Sequenzen (Introns) zwischen den einzelnen codierenden Segmenten (Exons).

[0044] Fragmente des Volllängengens der vorliegenden Erfindung können als Hybridisierungs sonden für eine cDNA oder eine genomische Bank verwendet werden, um die Gesamtlängen-DNA zu isolieren und um andere DNAs zu isolieren, die eine hohe Sequenzähnlichkeit zu dem Gen oder ähnliche biologische Aktivität aufweisen. Sonden dieser Art weisen bevorzugt mindestens 10 und vorzugsweise mindestens 15 und noch stärker bevorzugt mindestens 30 Basen auf und können zum Beispiel mindestens 50 oder mehr Basen enthalten. Tatsächlich können Sonden dieses Typs, die mindestens bis zu 150 Basen oder mehr aufweisen, vorzugsweise benützt werden. Die Sonde kann auch verwendet werden, um einen DNA-Clon, der einem Volllängentranskript entspricht, und einen genomischen Clon oder genomische Clone, die das gesamte Gen einschließlich regulatorischer und Promotorregionen, Exons und Introns umfassen, zu identifizieren. Ein Beispiel einer Durchmusterung umfasst Isolieren der codierenden Region des Gens unter Verwendung der bekannten DNA-Sequenz,

um eine Oligonucleotidsonde zu synthetisieren. Markierte Oligonucleotide, die eine Sequenz aufweisen, die komplementär oder identisch zu jener des Gens oder zu einem Teil der Gensequenzen der vorliegenden Erfindung ist, können verwendet werden, um eine genomische DNA-Bank zu durchmustern, um zu bestimmen, mit welchen Mitgliedern der Bank die Sonde hybridisiert.

[0045] Es ist auch klar, dass solche Sonden vorzugsweise mit einem analytisch nachweisbaren Reagens markiert werden können und werden, um die Identifizierung der Sonde zu erleichtern. Nützliche Reagenzien umfassen, sind aber nicht beschränkt auf, Radioaktivität, fluoreszierende Farbstoffe oder Enzyme, die im Stande sind die Bildung eines nachweisbaren Produktes zu katalysieren. Die Sonden sind daher nützlich, um komplementäre DNA-Kopien aus anderen Quellen nachzuweisen oder solche Quellen nach verwandten Sequenzen zu durchmustern.

[0046] Die vorliegende Erfindung betrifft ferner Polynucleotide, die mit den hierin vorstehend beschriebenen Sequenzen hybridisieren, wenn mindestens 90% und stärker bevorzugt mindestens 95% Identität zwischen den Sequenzen vorliegt. (Wie vorstehend angezeigt, würde 70% Identität innerhalb einer solchen Definition zum Beispiel ein 70 Basenpaar-Fragment umfassen, das aus einem Polynucleotid von 100 Basenpaaren entnommen wird.) Die vorliegende Erfindung betrifft insbesondere Polynucleotide, die unter stringenten Bedingungen mit den hierin vorstehend beschriebenen Polynucleotiden hybridisieren. Wie hierin verwendet, bedeutet der Begriff „stringente Bedingungen“, dass Hybridisierung nur vorkommen wird, wenn mindestens 95% und vorzugsweise mindestens 97% Identität zwischen den Sequenzen vorliegt. Die Polynucleotide, die mit den hierin vorstehend beschriebenen Polynucleotiden hybridisieren, codieren Enzyme, die im Wesentlichen die gleiche biologische Funktion oder Aktivität aufweisen wie das reife Polypeptid, das durch die DNA von **Fig. 1** (SEQ ID NO: 2) codiert wird. Bezug nehmend auf Identität im Fall von Hybridisierung, wie sie im Fachgebiet bekannt ist, bezieht sich eine solche Identität auf die Komplementarität von Polynucleotidsegmenten.

[0047] Polynucleotide, wie sie hierin offenbart sind, können mindestens 15 Basen, vorzugsweise mindestens 30 Basen und stärker bevorzugt mindestens 50 Basen aufweisen, die an irgendeinen Teil eines Polynucleotids der vorliegenden Erfindung hybridisieren und welche, wie hierin vorstehend beschrieben, dazu eine Identität aufweisen und welche die Aktivität beibehalten können oder nicht. Zum Beispiel können solche Polynucleotide als Sonden für die Polynucleotide von SEQ ID NO: 1 zum Beispiel für die Gewinnung des Polynucleotids oder als eine diagnostische Sonde oder als ein PCR-Primer eingesetzt werden.

[0048] Die vorliegende Erfindung ist daher auf Polynucleotide gerichtet, die ein Polypeptid codieren, das GP-CR-Aktivität aufweist und mindestens 90% Identität und stärker bevorzugt mindestens 95% Identität mit einem Polynucleotid aufweist, welches das Polypeptid von SEQ ID NO: 2 codiert. Die vorliegende Anmeldung offenbart Fragmente davon, wobei die Fragmente mindestens 15 Basen, vorzugsweise mindestens 30 Basen, stärker bevorzugt mindestens 50 Basen aufweisen, und am stärksten bevorzugt Fragmente, die mindestens bis zu 150 Basen oder mehr aufweisen, wobei die Fragmente mindestens 90% identisch, vorzugsweise mindestens 95% identisch und am stärksten bevorzugt mindestens 97% identisch zu einem Teil eines Polynucleotids der vorliegenden Erfindung sind.

[0049] Die Hinterlegung(en), auf die hierin Bezug genommen wird, wird (werden) unter den Bedingungen des Budapester Vertrages über die internationale Anerkennung der Hinterlegung von Mikroorganismen für die Zwecke des Patentverfahrens beibehalten. Diese Hinterlegungen werden lediglich als eine Annehmlichkeit für die Fachleute bereitgestellt und nicht als ein Zugeständnis, dass unter 35 U.S.C. 112 eine Hinterlegung benötigt wird. Die Sequenz der in dem hinterlegten Material enthaltenen Polynucleotide sowie die Aminosäuresequenz der davon codierten Polypeptide werden hierin durch Referenz eingeschlossen und sie sind im Falle jedes Konflikts mit irgendeiner Beschreibung der Sequenzen hierin maßgebend. Eine Lizenz kann benötigt werden, um das hinterlegte Material zu erzeugen, zu verwenden oder zu verkaufen und es wird hierbei keine solche Lizenz gewährt.

[0050] Die vorliegende Erfindung betrifft ferner Polypeptide, welche die abgeleiteten Aminosäuresequenzen von **Fig. 1** (SEQ ID NO: 2) aufweisen, sowie Fragmente, Analoge oder Derivate solcher Polypeptide innerhalb der Einschränkungen der Ansprüche.

[0051] Die Begriffe „Fragment“, „Derivat“ und „Analog“, wenn sie sich auf das Polypeptid von **Fig. 1** (SEQ ID NO: 2) oder auf jene beziehen, die durch die hinterlegte cDNA codiert werden, bedeuten ein Polypeptid, das im Wesentlichen entweder die gleiche biologische Funktion oder Aktivität wie ein solches Polypeptid beibehält, d.h. als ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor wirkt, oder die Fähigkeit beibehält, an den Liganden oder den Rezeptor zu binden, auch wenn das Polypeptid nicht als ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor wirkt, wie eine lös-

liche Form des Rezeptors.

[0052] Das Polypeptid der vorliegenden Erfindung kann ein rekombinantes Polypeptid, ein natürliches oder ein synthetisches Polypeptid und vorzugsweise ein rekombinantes Polypeptid sein.

[0053] Innerhalb der Beschränkungen der Ansprüche kann das Fragment, Derivat oder Analog des Polypeptids von **Fig. 1** (SEQ ID NO: 2) oder das durch die hinterlegte cDNA codierte eines sein, (i) in dem ein oder mehrere Aminosäurereste gegen einen konservierten oder nicht konservierten Aminosäurerest (vorzugsweise einem konservierten Aminosäurerest) ausgetauscht sind und ein solcher substituierter Aminosäurerest kann oder kann nicht durch den genetischen Code codiert sein, oder (ii) eines sein, in dem ein oder mehrere Aminosäurereste eine Substituentengruppe umfassen, oder (iii) eines sein, in dem das reife Polypeptid mit einer anderen Verbindung fusioniert ist, wie zum Beispiel einer solchen Verbindung, um die Halbwertszeit des Polypeptids zu erhöhen (zum Beispiel Polyethylenglykol), oder (iv) eines sein, in dem die zusätzlichen Aminosäuren mit dem reifen Polypeptid fusioniert sind, oder (v) eines sein, in dem ein Fragment des Polypeptids löslich ist, d.h. nicht Membran-gebunden ist, jedoch noch immer den Liganden an den membran-gebundenen Rezeptor bindet. Solche Fragmente, Derivate und Analoge werden von den Lehren hierin als im Anwendungsbereich von Fachleuten erachtet.

[0054] Die Polypeptide und Polynucleotide der vorliegenden Erfindung werden in einer isolierten Form bereitgestellt und werden vorzugsweise bis zur Homogenität gereinigt.

[0055] Der Begriff „isoliert“ bedeutet, dass das Material aus seiner ursprünglichen Umgebung entfernt wird (z.B. der natürlichen Umgebung, wenn es natürlich vorkommt). Zum Beispiel ist ein natürlich vorkommendes Polynucleotid oder Polypeptid, das in einem lebenden Tier vorhanden ist, nicht isoliert, aber das gleiche Polynucleotid oder Polypeptid, das aus manchen oder allen der gleichzeitig vorkommenden Materialien in dem natürlichen System abgetrennt wird, ist isoliert. Solche Polynucleotide könnten Teil eines Vektors darstellen und/oder solche Polynucleotide oder Polypeptide könnten Teil einer Zusammensetzung sein und noch immer so isoliert sein, dass ein solcher Vektor oder eine solche Zusammensetzung nicht Teil seiner natürlichen Umwelt ist.

[0056] Die Polypeptide der vorliegenden Erfindung umfassen das Polypeptid von SEQ ID NO: 2 (insbesondere das reife Polypeptid) sowie auch Polypeptide, die mindestens 90% Identität zum Polypeptid von SEQ ID NO: 2 aufweisen und noch mehr bevorzugt mindestens 90% Identität zu dem Polypeptid von SEQ ID NO: 2, und umfassen innerhalb der Beschränkungen der Ansprüche auch Teile solcher Polypeptide mit einem solchen Teil des Polypeptids, der üblicherweise mindestens 30 Aminosäuren und stärker bevorzugt mindestens 50 Aminosäuren enthält.

[0057] Wie im Fachgebiet bekannt, wird „Ähnlichkeit“ zwischen zwei Polypeptiden durch Vergleichen der Aminosäuresequenz und der konservierten Aminosäuresubstitutionen eines Polypeptids mit der Sequenz eines zweiten Polypeptids bestimmt.

[0058] Fragmente oder Teile der Polypeptide der vorliegenden Erfindung können zur Erzeugung des entsprechenden Vollängen-Polypeptids durch Peptidsynthese eingesetzt werden; die Fragmente können daher als Zwischenprodukte zum Erzeugen der Vollängen-Polypeptide eingesetzt werden. Fragmente oder Teile der Polynucleotide der vorliegenden Erfindung können verwendet werden, um Vollängen-Polynucleotide der vorliegenden Erfindung zu synthetisieren.

[0059] Die vorliegende Anmeldung offenbart auch ein Verfahren zum Identifizieren und/oder Isolieren von Zellen, Geweben oder Klassen von Zellen oder Geweben zum Beispiel durch Verwendung von Sonden der Polynucleotide, die das G-Protein-gekoppelte Rezeptor-Polypeptid EBI-2 codieren, oder durch Verwendung eines Antikörpers, der für den G-Protein-gekoppelten Rezeptor EBI-2 spezifisch ist. Da die G-Protein-gekoppelten Rezeptor-Polypeptide gemäß der Erfindung EBI-2 in Venen-Endothelzellen, neutrophilen Leukocytenzellen und Corpus-colosum-Zellen vorkommen, können die vorstehenden Sonden oder Antikörper zum Beispiel benutzt werden, um solche Zellen, Gewebe oder Klassen von Zellen oder Geweben zu identifizieren und/oder zu isolieren.

[0060] Die vorliegende Erfindung betrifft auch die Vektoren, die Polynucleotide der vorliegenden Erfindung enthalten, Wirtszellen, die gentechnisch mit Vektoren der Erfindung erzeugt werden, und die Herstellung von Polypeptiden der Erfindung durch rekombinante Techniken.

[0061] Wirtszellen werden mit den Vektoren dieser Erfindung gentechnisch erzeugt (transduziert oder transformiert oder transfiziert), die zum Beispiel ein Clonierungsvektor oder ein Expressionsvektor sein können. Dieser Vektor kann zum Beispiel in der Form eines Plasmids oder eines viralen Partikels, eines Phagen usw. vorliegen. Die gentechnisch erzeugten Wirtszellen werden in herkömmlichem Nährmedium gezüchtet werden, das wie geeignet zum Aktivieren von Promotoren, Auswählen von Transformanten oder zum Amplifizieren der G-Protein-gekoppelten Rezeptorgene modifiziert ist. Die Kulturbedingungen wie zum Beispiel Temperatur, pH-Wert und ähnliches sind jene, die früher bei der für die Expression ausgewählten Wirtszelle verwendet wurden und werden für einen Fachmann offensichtlich sein.

[0062] Die Polynucleotide der vorliegenden Erfindung können zur Erzeugung der Polypeptide durch rekombinante Techniken angewandt werden. Die Polynucleotide können daher zur Expression eines Polypeptids zum Beispiel in irgendeiner einer Vielfalt an Expressionsvektoren eingeschlossen werden. Solche Vektoren umfassen chromosomale, nicht chromosomale und synthetische DNA-Sequenzen, z. B. Derivate von SV40; bakterielle Plasmide; Phagen-DNA; Baculovirus; Hefepasmide; Vektoren, die aus Kombinationen von Plasmiden und Phagen-DNA, viraler DNA wie Vaccinia, Adenovirus, Vogelpockenvirus und dem Pseudorabies-Virus stammen. Jeder andere Vektor kann jedoch verwendet werden, solange er in dem Wirt replizierbar und lebensfähig ist.

[0063] Die geeignete DNA-Sequenz kann in einen Vektor durch eine Vielfalt an Verfahren eingeführt werden. Im Allgemeinen wird die DNA-Sequenz durch im Fachgebiet bekannte Verfahren in (eine) geeignete Restriktions-Endonucleasenstelle(n) eingeführt. Solche und andere Verfahren werden als innerhalb des Wissens von Fachleuten betrachtet.

[0064] Die DNA-Sequenz im Expressionsvektor ist funktionsfähig mit (einer) entsprechenden Expressions-Kontrollsequenzen) (Promotor) verbunden, um die mRNA-Synthese zu steuern. Als repräsentative Beispiele solcher Promotoren können erwähnt werden: LTR oder SV40-Promotor, der E. coli-lac- oder -trp-Promotor, der Lambda-Phagen-P_L-Promotor und andere Promotoren, von denen bekannt ist, dass sie die Genexpression in prokaryontischen oder eukaryontischen Zellen oder ihren Viren kontrollieren. Der Expressionsvektor enthält auch eine Ribosomenbindungsstelle für die Translationsinitiation und einen Transkriptionsterminator. Der Vektor kann auch geeignete Sequenzen zum Amplifizieren der Expression umfassen.

[0065] Außerdem enthalten die Expressionsvektoren vorzugsweise ein oder mehrere selektierbare Marker-gene, um ein phänotypisches Merkmal zur Selektion der transformierten Wirtszellen bereitzustellen, wie zum Beispiel Dihydrofolatereduktase oder Neomycin-Resistenz für eukaryontische Zellkultur oder wie zum Beispiel Tetracyclin- oder Ampicillinresistenz in E. coli.

[0066] Der Vektor, der die geeignete, wie hierin vorstehend beschriebene DNA-Sequenz sowie einen geeigneten Promotor oder eine geeignete Kontrollsequenz enthält, kann angewandt werden, um eine geeignete Wirtszelle zu transformieren, um dem Wirt zu erlauben, das Protein zu exprimieren.

[0067] Als repräsentative Beispiele von geeigneten Wirten können erwähnt werden: bakterielle Zellen wie zum Beispiel E. coli, Streptomyces, Salmonella typhimurium; Pilzzellen, wie zum Beispiel Hefe, Insektenzellen, wie zum Beispiel Drosophila S2 und Spodoptera Sf9; tierische Zellen wie zum Beispiel CHO, COS oder Bowes-Melanom; Adenoviren, Pflanzenzellen usw. Die Auswahl an geeigneten Wirten wird von den Lehren hierin als innerhalb des Wissens von Fachleuten angesehen.

[0068] Genauer gesagt umfasst die vorliegende Erfindung auch rekombinante Konstrukte, die eine oder mehrere der Sequenzen umfassen, wie sie vorstehend ausführlich beschrieben wurden. Die Konstrukte umfassen einen Vektor wie zum Beispiel ein Plasmid oder einen viralen Vektor, in welchen eine Sequenz der Erfindung in einer Vorwärts- oder Rückwärts-Orientierung inseriert worden ist. In einem bevorzugten Aspekt dieser Ausführungsform umfasst das Konstrukt ferner regulatorische Sequenzen, einschließlich zum Beispiel einen Promotor, der funktionsfähig mit der Sequenz verbunden ist. Eine große Anzahl an geeigneten Vektoren und Promotoren sind Fachleuten bekannt und sind im Handel erhältlich. Die folgenden Vektoren werden als Beispiel bereitgestellt. Bakteriell: pQE70, pQE60, pQE-9 (Quiagen), pbs, pD10, Phagescript, psiX174, pBluescript SK, pbsks, pNH8A, pNH16a, pNH18A, pNH46A (Stratagene); ptrc99a, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5 (Pharmacia). Eukaryontisch: pWLNEO, pSV2CAT, pOG44, pXT1, pSG (Stratagene), pSVK3, pBPV, pMSG, pSVL (Pharmacia). Jedes andere Plasmid oder jeder andere Vektor kann jedoch verwendet werden, solange es/er in dem Wirt replizierbar und lebensfähig ist.

[0069] Promotorregionen können aus jedem gewünschten Gen unter Verwendung von CAT(Chlorampheni-

col-Transferase)-Vektoren oder anderen Vektoren mit selektierbaren Markern ausgewählt werden. Zwei geeignete Vektoren sind PKK232-8 und PCM7. Insbesondere erwähnte bakterielle Promotoren umfassen lacI, lacZ, T3, Tz, gpt, Lambda-P_R, -P_L und trp. Eukaryontische Promotoren umfassen sehr frühen CMV-, HSV-Thymidin-Kinase, frühen und späten SV40, LTRs aus dem Retrovirus und Maus-Metallothionein-I. Die Auswahl des geeigneten Promotors liegt vollkommen innerhalb des Niveaus eines Fachmannes.

[0070] In einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung Wirtszellen, welche die vorstehend beschriebenen Konstrukte enthalten. Die Wirtszelle kann eine höhere eukaryontische Zelle sein, wie zum Beispiel eine Säugerzelle, oder eine niedrigere eukaryontische Zelle sein, wie zum Beispiel eine Hefezelle oder die Wirtszelle kann eine prokaryontische Zelle sein, wie zum Beispiel eine Bakterienzelle. Die Einführung eines Konstruktes in die Wirtszelle kann durch Calcium-Phosphattransfektion, DEAE-Dextran-vermittelte Transfektion oder Elektroporation ausgeführt werden (Davis, L., Dibner, M., Battey, I., Basic Methods in Molecular Biology, (1986)).

[0071] Die Konstrukte in Wirtszellen können in einer herkömmlichen Weise verwendet werden, um das durch die rekombinante Sequenz codierte Genprodukt zu erzeugen. Alternativ können die Polypeptide der Erfindung durch herkömmliche Peptidsynthesegeräte synthetisch hergestellt werden.

[0072] Reife Proteine können in Säugerzellen, Hefe, Bakterien oder anderen Zellen unter der Kontrolle von geeigneten Promotoren exprimiert werden. Zellfreie Translationssysteme können auch eingesetzt werden, um solche Proteine unter Verwendung von RNAs zu erzeugen, die von DNA-Konstrukten der vorliegenden Erfindung stammen. Geeignete Clonierungs- und Expressionsvektoren zur Verwendung bei prokaryontischen und eukaryontischen Wirten werden von Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Zweite Auflage, Cold Spring Harbor, N.Y., (1989) beschrieben, dessen Offenbarung wird hierbei durch Bezugnahme eingeschlossen.

[0073] Transkription der DNA, die Polypeptide der vorliegenden Erfindung codiert durch höhere Eukaryonten wird durch Insertion einer Enhancersequenz in den Vektor erhöht. Enhancer sind cis-agierende Elemente von DNA, üblicherweise etwa von 10 bis 300 Basenpaare lang, die auf einen Promotor wirken, um seine Transkription zu erhöhen. Beispiele umfassen den SV40-Enhancer, auf der späten Seite des Replikationsursprungs, Basenpaare 100 bis 270, einen frühen Promotor-Enhancer des Cytomegalievirus, den Polyoma-Enhancer auf der späten Seite des Replikationsursprungs und die Adenovirus-Enhancer.

[0074] Im Allgemeinen werden rekombinante Expressionsvektoren Replikationsursprünge und selektierbare Marker, welche die Transformation der Wirtszelle erlauben, z.B. das Ampicillin-Resistenzgen von *E. coli* und das *S. cerevisiae*-TRP1-Gen, und einen Promotor enthalten, der von einem hoch exprimierten Gen stammt, um die Transkription einer stromabwärts gelegenen strukturellen Sequenz zu lenken. Solche Promotoren können von Operonen stammen, die glycolytische Enzyme codieren, wie zum Beispiel unter anderen die 3-Phosphoglycerat-Kinase (PGK), den α -Faktor, die saure Phosphatase oder Hitzeschockproteine. Die heterologe strukturelle Sequenz ist in geeigneter Phase mit Translationsinitiations- und Terminationssequenzen und vorzugsweise einer Leadersequenz zusammengesetzt, die im Stande ist, die Sekretion des translatierten Proteins in den periplasmatischen Raum oder das extrazelluläre Medium zu lenken.

[0075] Wahlweise kann die heterologe Sequenz ein Fusionsprotein codieren, das ein N-terminales Identifikationspeptid einschließt, das gewünschte Eigenschaften verleiht, z.B. Stabilisation oder vereinfachte Reinigung des exprimierten rekombinanten Produkts.

[0076] Nützliche Expressionsvektoren für bakterielle Verwendung werden durch Insertion einer strukturellen DNA-Sequenz, die ein gewünschtes Protein codiert, zusammen mit geeigneten Translationsinitiations- und Terminationsignalen in funktionsfähiger Leserahmenphase mit einem funktionsfähigen Promotor konstruiert. Der Vektor wird ein oder mehrere phänotypische selektierbare Marker und einen Replikationsursprung umfassen, um die Beibehaltung des Vektors zu sichern und um, falls wünschenswert, Amplifikation innerhalb des Wirtes bereitzustellen. Geeignete prokaryontische Wirte für die Transformation umfassen *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium* und verschiedene Arten innerhalb der Gattungen *Pseudomonas*, *Streptomyces* und *Staphylococcus*, obwohl andere als eine Wahl eingesetzt werden können.

[0077] Als ein repräsentatives, aber nicht limitierendes Beispiel können nützliche Expressionsvektoren zur bakteriellen Verwendung einen selektierbaren Marker und einen bakteriellen Replikationsursprung umfassen, der aus im Handel erhältlichen Plasmiden besteht, umfassend genetische Elemente des gut bekannten Clonierungsvektors pBR322 (ATCC 37017). Solche im Handel erhältliche Vektoren umfassen zum Beispiel

pKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Upsala, Schweden) und GEM1 (Promega Biotec, Madison, WI, USA). Diese pBR322-„Rückgrat“-Abschnitte werden mit einem geeigneten Promotor und der zu exprimierenden strukturellen Sequenz kombiniert.

[0078] Nach der Transformation eines geeigneten Wirtsstammes und dem Züchten des Wirtsstammes bis zu einer geeigneten Zelldichte wird der ausgewählte Promotor durch geeignete Mittel (z.B. Veränderung der Temperatur oder chemische Induktion) induziert und die Zellen werden für eine zusätzliche Zeitdauer gezüchtet.

[0079] Zellen werden üblicherweise durch Zentrifugation geerntet, durch physikalische oder chemische Mittel aufgebrochen und der daraus resultierende Rohextrakt wird für weitere Reinigung zurückbehalten.

[0080] Mikrobielle Zellen, die zur Expression der Proteine eingesetzt werden, können durch irgendein bequemes Verfahren, einschließlich Einfrier-Auftau-Zyklen, Ultraschall, mechanischem Aufbrechen oder der Verwendung von Zellysierungsmitteln, aufgebrochen werden; solche Verfahren sind Fachleuten gut bekannt.

[0081] Verschiedene Säugerzellen-Kultursysteme können auch eingesetzt werden, um rekombinantes Protein zu exprimieren. Beispiele von Säugerzellen-Expressionssystemen umfassen die COS-7-Linien von Affen-nieren-Fibroblasten, beschrieben von Gluzman, Cell, 23: 175 (1981), und andere Zelllinien, die im Stande sind einen kompatiblen Vektor zu exprimieren, zum Beispiel die C127-, 3T3-, CHO-, HeLa- und BHK-Zelllinien. Säuger-Expressionsvektoren werden einen Replikationsursprung, einen geeigneten Promotor und Enhancer und auch irgendwelche notwendigen Ribosomen-Bindungsstellen, eine Polyadenylierungsstelle, Spleiß-Donor- und -Akzeptorstellen, transkriptionelle Terminationssequenzen und flankierende, nicht transkribierte 5'-Sequenzen umfassen. DNA-Sequenzen, die aus den SV40-Spleiß- und Polyadenylierungsstellen stammen, können verwendet werden, um die benötigten, nicht transkribierten genetischen Elemente bereitzustellen.

[0082] Die G-Protein-gekoppelten Rezeptorpolypeptide können aus rekombinanten Zellkulturen durch Verfahren einschließlich Ammoniumsulfat oder EthanolAusfällung, saurer Extraktion, Anionen- oder Kationen-Austauschchromatographie, Phosphocellulose-Chromatographie, hydrophober Interaktionschromatographie, Affinitätschromatographie, Hydroxylapatit-Chromatographie und Lecitin-Chromatographie gewonnen und gereinigt werden. Protein-Rückfaltungsschritte können, falls nötig, in der Fertigstellung der Konfiguration des reifen Proteins verwendet werden. Schließlich kann Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) für die endgültigen Reinigungsschritte angewandt werden.

[0083] Die Polypeptide der vorliegenden Erfindung können ein natürliches Produkt oder ein Produkt von chemisch-synthetischen Verfahren sein oder durch rekombinante Techniken aus einem prokaryontischen oder eukaryontischen Wirt erzeugt werden (zum Beispiel durch Bakterien, Hefe, höhere Pflanzen, Insekten und Säugerzellen in Kultur). Abhängig von dem in einem rekombinanten Herstellungsverfahren eingesetzten Wirt können die Polypeptide der vorliegenden Erfindung glycosyliert oder nicht glycosyliert sein. Erfindungsgemäße Polypeptide können auch einen anfänglichen Methionin-Aminosäurerest umfassen.

[0084] Der G-Protein-gekoppelte Rezeptor der vorliegenden Erfindung kann in einem Prozess zur Durchmusterung nach Antagonisten und/oder Agonisten für den Rezeptor eingesetzt werden.

[0085] Im Allgemeinen umfassen solche Durchmusterungsverfahren das Bereitstellen von geeigneten Zellen, die den Rezeptor auf der Oberfläche davon exprimieren. Insbesondere wird ein Polypeptid eingesetzt, das den Rezeptor der vorliegenden Erfindung codiert, um Zellen zu transfizieren, um dadurch den G-Protein-gekoppelten Rezeptor zu exprimieren. Eine solche Transfektion kann durch die hierin vorstehend beschriebenen Verfahren erzielt werden.

[0086] Ein solches Durchmusterungsverfahren umfasst die Verwendung von Melanophoren, die transfiziert werden, um den G-Protein-gekoppelten Rezeptor der vorliegenden Erfindung zu exprimieren. Eine solche Durchmusterungstechnik wird in PCT WO 92/01810 beschrieben, veröffentlicht am 6. Februar 1992.

[0087] Zum Beispiel kann daher ein solcher Test zum Durchmusteren nach einem Rezeptorantagonisten durch Inkontaktbringen der melanophoren Zellen, die den G-Protein-gekoppelten Rezeptor exprimieren, sowohl mit dem Rezeptorliganden als auch einer Verbindung, auf die durchgemustert werden soll, angewandt werden. Hemmung des durch den Liganden erzeugten Signals deutet darauf hin, dass eine Verbindung ein möglicher Rezeptor-Antagonist ist, d.h. die Aktivierung des Rezeptors inhibiert.

[0088] Die Durchmusterung kann zum Bestimmen eines Agonisten durch Inkontaktbringen solcher Zellen mit

Verbindungen, die durchmustert werden sollen, und durch Bestimmung, ob eine solche Verbindung ein Signal erzeugt, d.h. den Rezeptor aktiviert, eingesetzt werden.

[0089] Andere Durchmusterungstechniken umfassen die Verwendung von Zellen, die den G-Protein-gekoppelten Rezeptor exprimieren (zum Beispiel transfizierte CHO-Zellen), in einem System, das extrazelluläre pH-Wert-Veränderungen, hergerufen durch Rezeptoraktivierung, misst, wie zum Beispiel beschrieben in Science, Bd. 246, Seiten 181–296 (Oktober 1989). Zum Beispiel können mögliche Agonisten oder Antagonisten mit einer Zelle in Kontakt gebracht werden, die den G-Protein gekoppelten Rezeptor exprimiert, und eine sekundäre Botenaktwort, z.B. Signaltransduktion oder pH-Wert-Änderungen, kann gemessen werden, um zu bestimmen, ob der mutmaßliche Agonist oder Antagonist wirksam ist.

[0090] Eine andere solche Durchmusterungstechnik umfasst das Einführen von RNA, die den G-Protein-gekoppelten Rezeptor codiert, in Xenopus-Oocyten, um den Rezeptor transient zu exprimieren. Die Rezeptor-Oocyten können dann im Falle der Durchmusterung nach Antagonisten mit dem Rezeptorliganden und einer zu durchmusternden Verbindung in Kontakt gebracht werden, gefolgt vom Nachweis der Hemmung des Calciumsignals.

[0091] Eine andere Durchmusterungstechnik umfasst die Expression des G-Protein-gekoppelten Rezeptors, wobei der Rezeptor mit einer Phospholipase C oder D gekoppelt ist. Als repräsentative Beispiele solcher Zellen können Endothelzellen, glatte Muskelzellen, embryonale Nierenzellen usw. erwähnt werden. Die Durchmusterung nach einem Antagonisten oder Agonisten kann, wie hierin vorstehend beschrieben, durch Nachweisen der Aktivierung des Rezeptors oder Hemmung der Aktivierung des Rezeptors aus dem zweiten Signal der Phospholipase erzielt werden.

[0092] Ein anderes Verfahren umfasst die Durchmusterung nach Antagonisten durch Bestimmen der Hemmung des Bindens von markierten Liganden an Zellen, die den Rezeptor auf der Oberfläche davon aufweisen. Ein solches Verfahren umfasst Transfektion einer eukaryontischen Zelle mit DNA, die den G-Protein-gekoppelten Rezeptor codiert, sodass die Zelle den Rezeptor auf seiner Oberfläche exprimiert, und Inkontaktbringen der Zelle mit einem möglichen Antagonisten in der Anwesenheit einer markierten Form eines bekannten Liganden. Der Ligand kann markiert sein, z.B. durch Radioaktivität. Die Menge an markiertem Liganden, der an die Rezeptoren gebunden ist, wird zum Beispiel durch Messen der Radioaktivität der Rezeptoren gemessen. Wenn der mutmaßliche Antagonist an den Rezeptor bindet, wie durch eine Reduktion des markierten Liganden, der an die Rezeptoren bindet, bestimmt wird, wird die Bindung des markierten Liganden an den Rezeptor gehemmt.

[0093] Die vorliegende Erfindung stellt auch ein Verfahren zum Bestimmen bereit, ob ein Ligand, von dem nicht bekannt ist, dass er im Stande ist an einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor zu binden, an einen solchen Rezeptor binden kann, was das Inkontaktbringen einer Säugerzelle, die einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor exprimiert, mit dem Liganden unter Bedingungen, welche die Bindung der Liganden an den G-Protein-gekoppelten Rezeptor erlauben, den Nachweis des Vorhandenseins eines Liganden, der an den Rezeptor bindet, und dadurch das Bestimmen, ob der Ligand an den G-Protein-gekoppelten Rezeptor bindet, umfasst. Die hierin vorstehend beschriebenen Systeme zur Bestimmung von Agonisten und/oder Antagonisten können auch zur Bestimmung von Liganden angewandt werden, die an den Rezeptor binden.

[0094] Im Allgemeinen können Antagonisten von G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, die mittels Durchmusterungsverfahren bestimmt werden, für eine Vielzahl an therapeutischen Zwecken eingesetzt werden. Zum Beispiel sind solche Antagonisten zur Behandlung von Bluthochdruck, Angina Pectoris, Mykardialinfarkt, Geschwüren, Asthma, Allergien, Psychosen, Depression, Migräne, Erbrechen, Schlaganfall, Essstörungen, Migräne-Kopfschmerzen, Krebs und gutartiger Prostata-Hypertrophie eingesetzt worden.

[0095] Agonisten für G-Protein-gekoppelte Rezeptoren sind auch für therapeutische Zwecke nützlich, wie zum Beispiel die Behandlung von Asthma, Parkinson-Krankheit, akutem Herzversagen, Bluthochdruck, Harnretention und Osteoporose.

[0096] Beispiele an G-Protein-gekoppelten Antagonisten umfassen einen Antikörper, oder in manchen Fällen ein Oligonucleotid, das an den G-Protein-gekoppelten Rezeptor bindet, aber keine sekundäre Botenantwort hervorruft, sodass die Aktivität des G-Protein-gekoppelten Rezeptors verhindert wird. Antikörper umfassen anti-idiotypische Antikörper, die einmalige Determinanten erkennen, die im Allgemeinen mit der Antigen-Bindungsstelle eines Antikörpers assoziiert sind. Mögliche Antagonisten umfassen auch Proteine, die eng mit dem Liganden des G-Protein-gekoppelten Rezeptors verwandt sind, d.h. ein Fragment des Liganden, das die bio-

logische Funktion verloren hat und keine Antwort hervorruft, wenn es an den G-Protein-gekoppelten Rezeptor bindet.

[0097] Ein möglicher Antagonist umfasst auch ein Antisense-Konstrukt, das durch die Verwendung von Antisense-Technologie erzeugt wird. Antisense-Technologie kann verwendet werden, um Genexpression durch Dreifachhelixbildung oder Antisense-DNA oder -RNA zu kontrollieren, wobei beide Verfahren auf der Bindung eines Polynucleotids an DNA oder RNA beruhen. Zum Beispiel wird der codierende 5'-Teil der Polynucleotidsequenz, welche die reifen Polypeptide der vorliegenden Erfindung codiert, verwendet, um ein etwa 10 bis 40 Basenpaare langes Antisense-RNA-Oligonucleotid zu entwerfen. Ein DNA-Oligonucleotid wird entworfen, um mit einer Genregion komplementär zu sein, die an der Transkription beteiligt ist (Dreifachhelix siehe Lee et al., Nucl. Acids Res., 6: 3073 (1979); Cooney et al., Science, 241: 456 (1988); und Dervan et al., Science, 251: 1360 (1991)), um dadurch die Transkription und die Erzeugung des G-Protein-gekoppelten Rezeptors zu verhindern. Das Antisense-RNA-Oligonucleotid hybridisiert mit der mRNA in vivo und blockiert die Translation des mRNA-Moleküls in den G-Protein-gekoppelten Rezeptor (Antisense-Okano, J. Neurochem., 56: 560 (1991); Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression, CRC Press, Boca Raton, FL (1988)). Die vorstehend beschriebenen Oligonucleotide können an Zellen verabreicht werden, sodass die Antisense-RNA oder -DNA in vivo exprimiert werden kann, um die Produktion des G-Protein-gekoppelten Rezeptors zu verhindern.

[0098] Ein anderer möglicher Antagonist ist ein kleines Molekül, das an den G-Protein-gekoppelten Rezeptor bindet und ihn für Liganden unzugänglich macht, sodass normale biologische Aktivität verhindert wird. Beispiele solcher kleiner Moleküle umfassen kleine Peptide oder peptidähnliche Moleküle, sind aber nicht darauf beschränkt.

[0099] Mögliche Antagonisten umfassen auch eine lösliche Form eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors, z.B. ein Rezeptorfragment, die an den Liganden bindet und verhindert, dass der Ligand mit membrangebundenen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren interagiert.

[0100] Der G-Protein-gekoppelte Rezeptor und Antagonisten oder Agonisten können in Kombination mit einem geeigneten pharmazeutischen Träger eingesetzt werden. Solche Zusammensetzungen umfassen eine therapeutisch wirksame Menge des Polypeptids und einen pharmazeutisch verträglichen Träger oder Excipienten. Solche Träger umfassen, sind aber nicht beschränkt auf Salzlösung, gepufferte Salzlösung, Dextrose, Wasser, Glycerin, Ethanol und Kombinationen davon. Die Rezepturen sollten zur Art der Verabreichung passen.

[0101] Die Offenbarung stellt auch eine pharmazeutische Packung oder einen Kit bereit, umfassend einen oder mehrere Behälter, die mit einem oder mehreren Bestandteilen der Arzneimittel der Erfindung gefüllt sind. Gemeinsam mit (einem) solchen Behälter(n) kann eine Mitteilung in der Form sein, wie sie durch Regierungsbehörden zur Regelung der Herstellung, Verwendung oder des Verkaufs von pharmazeutischen oder biologischen Produkten vorgeschrieben ist, wobei die Mitteilung die Erlaubnis der Behörde für die Herstellung, Verwendung oder den Verkauf zur Anwendung an Menschen widerspiegelt. Außerdem können die Arzneimittel gemeinsam mit anderen therapeutischen Verbindungen eingesetzt werden.

[0102] Die Arzneimittel können in einer zweckmäßigen Weise wie zum Beispiel durch topische, intravenöse, intraperitoneale, intramuskuläre, subkutane, intranasale oder intradermale Wege verabreicht werden. Die Arzneimittel werden in einer Menge verabreicht, die für das Behandeln und/oder die Prophylaxe der spezifischen Indikation wirkungsvoll ist. Im Allgemeinen werden die Arzneimittel in einer Menge von mindestens etwa 10 g/kg Körpergewicht verabreicht werden und in den meisten Fällen werden sie in einer Menge von nicht mehr als 8 mg/kg Körpergewicht pro Tag verabreicht werden. In den meisten Fällen ist die Dosierung von etwa 10 g/kg Körpergewicht bis zu etwa 1 mg/kg Körpergewicht pro Tag, wobei die Verabreichungswege, Symptome usw. in Betracht gezogen werden.

[0103] Die G-Protein-gekoppelten Rezeptor-Polypeptide und Antagonisten oder Agonisten, welche Peptide darstellen, können in Übereinstimmung mit der vorliegenden Erfindung durch Expression von solchen Polypeptiden in vivo angewandt werden, was oft als „Gentherapie“ bezeichnet wird.

[0104] Zellen eines Patienten können daher zum Beispiel mit einem Polynucleotid (DNA oder RNA) ex vivo erzeugt werden, das ein Polypeptid codiert, die gentechnisch erzeugten Zellen werden dann einem Patienten zur Verfügung gestellt, der mit dem Polypeptid behandelt werden soll. Solche Verfahren sind im Fachgebiet gut bekannt. Zum Beispiel können Zellen durch im Fachgebiet bekannte Verfahren unter Verwendung eines retro-

viralen Partikels erzeugt werden, das RNA enthält, die ein Polypeptid der vorliegenden Erfindung codiert.

[0105] Auf ähnliche Weise können Zellen in vivo zur Expression eines Polypeptids in vivo zum Beispiel mit im Fachgebiet bekannten Verfahren erzeugt werden. Wie im Fachgebiet bekannt, kann eine Erzeugerzelle für die Produktion eines retroviralen Partikels, das die das Polypeptid der vorliegenden Erfindung codierende RNA enthält, einem Patienten zur Erzeugung von Zellen in vivo und zur Expression des Polypeptids in vivo verabreicht werden. Diese und andere Verfahren zur Verabreichung eines Polypeptids der vorliegenden Erfindung durch ein solches Verfahren sollte für Fachleute von den Lehren der vorliegenden Erfindung offensichtlich sein. Zum Beispiel kann das Expressionsvehikel zur Erzeugung von Zellen ein anderes als ein Retrovirus sein, zum Beispiel ein Adenovirus, das verwendet werden kann, um Zellen nach der Kombination mit einem geeigneten Verabreichungsvehikel in vivo zu erzeugen.

[0106] Retroviren, aus welchen die hierin erwähnten retroviralen Plasmidvektoren abgeleitet werden können, umfassen, sind aber nicht beschränkt auf Moloney-Leukämie-Virus der Maus, Nieren-Nekrosevirus, Retroviren wie zum Beispiel Rous-Sarcom-Virus, Harvey-Sarcom-Virus, Vogel-Leukosevirus, Gibbonaffen-Leukämievirus, menschliches Immunschwächevirus, Adenovirus, myeloproliferatives Sarcomvirus und Brustkrebsvirus. In einer Ausführungsform stammt der retrovirale Plasmidvektor vom Moloney-Leukämievirus der Maus.

[0107] Der Vektor umfasst einen oder mehrere Promotoren. Geeignete Promotoren, die eingesetzt werden können, umfassen, sind aber nicht beschränkt auf die retrovirale LTR; den SV40-Promotor; und den menschlichen Cytomegalievirus(CMV)-Promotor, der in Miller, et. al., Biotechniques, Bd. 7 Nr. 9, 980–990 (1989) beschrieben wurde, oder irgendeinen anderen Promotor (z.B. zelluläre Promotoren wie zum Beispiel eukaryontische zelluläre Promotoren, einschließlich, aber nicht beschränkt auf die Histon-, Pol III- und β -Aktin-Promotoren). Andere virale Promotoren, die eingesetzt werden können, umfassen, sind aber nicht beschränkt auf Adenoviruspromotoren, Thymidinkinase(TK)-Promotoren und B19-Parvoviruspromotoren. Die Auswahl an geeigneten Promotoren wird aus den hierin enthaltenen Lehren einem Fachmann offensichtlich sein.

[0108] Die Nucleinsäuresequenz, die das Polypeptid der vorliegenden Erfindung codiert, steht unter der Kontrolle eines geeigneten Promotors. Geeignete Promotoren, die eingesetzt werden können, umfassen, sind aber nicht beschränkt auf adenovirale Promotoren wie zum Beispiel den späten adenoviralen Hauptpromotor; oder heterologe Promotoren wie zum Beispiel den Cytomegalievirus(CMV)-Promotor; den Promotor des respiratorischen Syncytialvirus (RSV); induzierbare Promotoren wie zum Beispiel den MMT-Promotor, den Metallothioneinpromotor; Hitzeschockpromotoren: den Albuminpromotor; den ApoA1-Promotor; menschliche Globin-Promotoren; virale Thymidinkinasepromotoren wie zum Beispiel den Herpes simplex-Thymidinkinasepromotor; retrovirale LTRs (einschließlich der hierin beschriebenen, veränderten retroviralen LTRs); den β -Actin-Promotor; und menschliche Wachstumshormon-Promotoren. Der Promotor kann auch der native Promotor sein, der das Gen kontrolliert, welches das Polypeptid codiert.

[0109] Der retrovirale Plasmidvektor wird eingesetzt, um Verpackungszelllinien zu transduzieren, um Erzeuger-Zelllinien zu bilden. Beispiele von Verpackungszellen, die transduziert werden können, umfassen, sind aber nicht beschränkt auf PE501, PA317, ψ -2, ψ -AM, PA12 T19-14X, VT-19-17-H2, ψ CRE, ψ CRIP, GP+E-86, GP+envAm12 und DAN-Zelllinien, wie sie in Miller, Human Gene Therapy, Bd. 1, Seiten 5–14 (1990) beschrieben sind, welches hierin in seiner Gesamtheit durch Bezugnahme eingeschlossen ist. Der Vektor kann die Verpackungszellen durch im Fachgebiet bekannte Mittel transduzieren. Solche Mittel umfassen, sind aber nicht beschränkt auf Elektroporation, die Verwendung von Liposomen und CaPO_4 -Ausfällung. In einer Alternative kann der retrovirale Plasmidvektor in ein Liposom eingekapselt sein oder an ein Lipid gekoppelt sein und dann einem Wirt verabreicht werden. Die Erzeugerzelllinie erzeugt infektiöse retrovirale Vektorpartikel, welche die Nucleinsäuresequenz(en) umfassen, die die Polypeptide codiert (codieren). Solche retrovirale Vektorpartikel können dann eingesetzt werden, um eukaryontische Zellen entweder in vitro oder in vivo zu transduzieren. Die transduzierten eukaryontischen Zellen werden die Nucleinsäuresequenz(en) exprimieren, die das Polypeptid codiert (codieren). Eukaryontische Zellen, die transduziert werden können, umfassen, sind aber nicht beschränkt auf embryonale Stammzellen, embryonale Carzinomzellen sowie hämatopoietische Stammzellen, Hepatocyten, Fibroblasten, Myoblasten, Keratinocyten, Endothelzellen und Bronchialepithelzellen.

[0110] G-Protein-gekoppelte Rezeptoren sind in Säugerwirten universell und sind für viele biologische Funktionen einschließlich vieler Krankheiten verantwortlich. Demgemäß ist es wünschenswert Verbindungen, die einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor stimulieren, und Verbindungen, die einem G-Protein-gekoppelten Rezeptor entgegenwirken, zu finden.

[0111] Diese Erfindung stellt ferner ein Verfahren zum Identifizieren von Verbindungen bereit, die speziell mit

den menschlichen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren an der Oberfläche einer Zelle interagieren und daran binden, was das Inkontaktbringen einer Säugerzelle, umfassend ein isoliertes DNA-Molekül, das den G-Protein-gekoppelten Rezeptor codiert, mit einer Vielzahl von Verbindungen, das Bestimmen derjenigen, die an die Säugerzelle binden, und dadurch das Identifizieren von Verbindungen umfasst, die spezifisch mit einem menschlichen G-Protein-gekoppelten Rezeptor der vorliegenden Erfindung interagieren und daran binden.

[0112] Diese Offenbarung stellt ein Verfahren zum Nachweis der Expression des G-Protein-gekoppelten Rezeptors auf der Oberfläche einer Zelle durch Nachweisen der Anwesenheit von mRNA bereit, die einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor codiert, welches das Erhalten der gesamten mRNA aus der Zelle und Inkontaktbringen der auf diese Weise erhaltenen mRNA mit einer Nucleinsäuresonde, die ein Nucleinsäuremolekül von mindestens 15 Nucleotiden umfasst, das im Stande ist, spezifisch mit einer Sequenz zu hybridisieren, die innerhalb der Sequenz eines Nucleinsäuremoleküls vorhanden ist, das einen menschlichen G-Protein-gekoppelten Rezeptor codiert, unter Hybridisierungsbedingungen, das Nachweisen der Anwesenheit von an die Sonde hybridisierter mRNA und dadurch das Nachweisen der Expression des G-Protein-gekoppelten Rezeptors der Zelle, umfasst.

[0113] Diese Erfindung betrifft auch die Verwendung des G-Protein-gekoppelten Rezeptorgens als Teil eines diagnostischen Tests zum Nachweisen von Krankheiten oder der Empfindlichkeit für Krankheiten, die mit der Anwesenheit von mutierten G-Protein-gekoppelten Rezeptorgenen in Zusammenhang stehen. Solche Erkrankungen stehen mit der Zelltransformation in Zusammenhang, wie zum Beispiel Tumore und Krebs.

[0114] Personen, die Mutationen im menschlichen G-Protein-gekoppelten Rezeptorgen tragen, können auf dem DNA-Niveau durch eine Vielzahl an Techniken nachgewiesen werden. Nucleinsäuren zur Diagnose kann von einer Patientenzelle wie zum Beispiel aus dem Blut, Harn, Speichel, einer Gewebebiopsie und dem Autopsiematerial erhalten werden. Die genomische DNA kann direkt zum Nachweis verwendet werden oder kann enzymatisch unter Verwendung von PCR (Saiki et al., Nature, 324: 163–166 (1986)) vor der Analyse amplifiziert werden. RNA oder cDNA kann auch für den gleichen Zweck verwendet werden. Als ein Beispiel können PCR-Primer verwendet werden, die zu der Nucleinsäure komplementär sind, die das G-Protein-gekoppelte Rezeptorprotein codieren, um G-Protein-gekoppelte Rezeptormutationen zu identifizieren und zu analysieren. Zum Beispiel können durch eine Veränderung in der Größe des amplifizierten Produkts im Vergleich mit dem normalen Genotyp Deletionen und Insertionen nachgewiesen werden. Punktmutationen können durch Hybridisieren der amplifizierten DNA an radioaktiv markierte G-Protein-gekoppelte Rezeptor-RNA oder alternativ an radioaktiv-markierte G-Protein-gekoppelte Rezeptor-Antisense-DNA-Sequenzen identifiziert werden. Perfekt paarende Sequenzen können von nicht-perfekt paarenden Doppelhelices durch Rnase A-Spaltung oder durch Unterschiede in der Schmelztemperatur unterschieden werden.

[0115] Genetische Untersuchung basierend auf DNA-Sequenzunterschieden kann durch Nachweis der Änderungen in der elektrophoretischen Mobilität von DNA-Fragmenten in Gelen mit oder ohne denaturierende Mittel erzielt werden. Kleine Sequenzdeletionen und -Insertionen können durch Gelelektrophorese mit hoher Auflösung sichtbar gemacht werden. DNA-Fragmente von unterschiedlichen Sequenzen können auf denaturierenden Formamid-Gradientengelen unterschieden werden, in welchen die Mobilitäten von unterschiedlichen DNA-Fragmenten gemäß ihrer spezifischen Schmelz- oder teilweisen Schmelztemperaturen im Gel an unterschiedlichen Positionen verlangsamt werden (siehe z.B. Myers et al., Science, 230: 1242 (1985)).

[0116] Sequenzveränderungen an spezifischen Stellen können auch durch Nuclease-Schutztests wie zum Beispiel Rnase- und S1-Schutz oder das chemische Spaltungsverfahren gezeigt werden (z.B. Cotton et al., PNAS, USA, 85: 4397–4401 (1985)).

[0117] Der Nachweis einer spezifischen DNA-Sequenz kann daher durch Verfahren wie zum Beispiel Hybridisierung, RNase-Schutz, chemische Spaltung, direkte DNA-Sequenzierung oder die Verwendung von Restriktionsenzymen (z.B. Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP)) und Southern-Blot-Verfahren von genomischer DNA erzielt werden.

[0118] Mutationen können zusätzlich zu der konventionelleren Gel-Elektrophorese und DNA-Sequenzierung auch durch in situ-Analyse nachgewiesen werden.

[0119] Die vorliegende Offenbarung betrifft auch einen diagnostischen Test zum Nachweisen von veränderten Mengen an löslichen Formen von Rezeptor-Polypeptiden der vorliegenden Erfindung in verschiedenen Geweben. Tests, die verwendet werden, um Mengen an löslichen Rezeptor-Polypeptiden in einer Probe nachzuweisen, die aus einer Wirtszelle stammt, sind Fachleuten gut bekannt und umfassen Radioimmuntests, kom-

petitive Bindungstests, Western-Blot-Analyse und vorzugsweise einen ELISA-Test.

[0120] Ein ELISA-Test umfasst anfänglich das Herstellen eines Antikörpers, der für Antigene der G-Protein-gekoppelten Rezeptor-Polypeptide spezifisch ist, vorzugsweise eines monoclonalen Antikörpers. Außerdem wird ein Reporterantikörper gegen den monoclonalen Antikörper erzeugt. An den Reporterantikörper wird ein nachweisbares Reagens wie zum Beispiel Radioaktivität, Fluoreszenz oder in diesem Beispiel ein Meerrettichperoxidaseenzym angebracht. Nun wird eine Probe von einem Wirt entnommen und auf einem festen Träger inkubiert, z.B. einer Polystyrolschale, welche die Proteine in der Probe bindet. Alle freien Proteinbindungsstellen auf der Schale werden dann durch Inkubation eines nicht-spezifischen Proteins wie zum Beispiel Rinderserumalbumin bedeckt. Als Nächstes wird der monoclonale Antikörper in der Schale inkubiert, während dessen die monoclonalen Antikörper an alle G-Protein-gekoppelten Rezeptorproteine binden, die an die Polystyrolschale gebunden sind. Alle nicht-gebundenen monoclonalen Antikörper werden mit Puffer ausgewaschen. Der mit der Meerrettichperoxidase verbundene Reporterantikörper wird nun in die Schale gegeben, was in der Bindung des Reporterantikörpers an die an G-Protein Rezeptorproteine gebundenen monoclonalen Antikörper resultiert. Nicht anhaftender Reporterantikörper wird dann ausgewaschen. Peroxidasesubstrate werden zu der Schale hinzugefügt und die Menge an Farbentwicklung in einer bestimmten Zeitspanne ist eine Messung der Menge an G-Protein-gekoppelten Rezeptorproteinen, die in einem bestimmten Volumen einer Patientenprobe enthalten sind, wobei ein Vergleich mit einer Standardkurve erfolgt.

[0121] Die Sequenzen der vorliegenden Erfindung sind auch für die Chromosomenidentifizierung nützlich. Die Sequenz ist spezifisch auf eine bestimmte Stelle auf einem einzelnen menschlichen Chromosom gerichtet und kann damit hybridisieren. Darüber hinaus gibt es gegenwärtig einen Bedarf für die Identifizierung von bestimmten Stellen auf dem Chromosom. Gegenwärtig sind wenige, auf tatsächlichen Sequenzdaten basierende (Wiederholungspolymorphismus), Chromosomen-markierende Reagenzien erhältlich. Die Kartierung von DNAs auf Chromosomen gemäß der vorliegenden Erfindung ist ein wichtiger erster Schritt in der Korrelierung jener Sequenzen mit Genen, die mit Erkrankungen im Zusammenhang stehen.

[0122] Kurz gesagt können Sequenzen durch Erzeugen von PCR-Primern (vorzugsweise 15–25 bp) von der cDNA auf Chromosomen kartiert werden. Computeranalyse der nicht-translatierten 3'-Region wird verwendet, um Primer rasch auszuwählen, die nicht mehr als ein Exon der genomischen DNA umspannen, was daher den Amplifizierungsprozess komplizieren würde. Diese Primer werden für die PCR-Durchmusterung von somatischen Zellhybriden verwendet, die einzelne menschliche Chromosomen enthalten. Nur jene Hybride, die das menschliche Gen enthalten, das dem Primer entspricht, werden ein amplifiziertes Fragment ergeben.

[0123] PCR-Kartierung von somatischen Zellhybriden ist ein rasches Verfahren, um eine spezielle DNA einem speziellen Chromosom zuzuweisen. Unter Verwendung der vorliegenden Erfindung kann mit den gleichen Oligonucleotidprimern eine Unterlokalisierung mit Fragmentgruppen von spezifischen Chromosomen oder Pools von großen genomischen Clonen in einer analogen Weise erreicht werden. Andere Kartierungsstrategien, die auf ähnliche Weise verwendet werden können, um eine Kartierung zu seinem Chromosom zu erreichen, umfassen in situ-Hybridisierung, Vordurchmusterung mit markierten durchflusssortierten Chromosomen und Vorselektion durch Hybridisierung, um chromosomenspezifische cDNA-Banken zu konstruieren.

[0124] Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung (FISH) eines cDNA-Clons an eine Ausbreitung Metaphase-Chromosomen kann auch verwendet werden, um die genaue Chromosomenstelle in einem Schritt bereitzustellen. Diese Technik kann mit cDNA verwendet werden, die so kurz wie 50 oder 60 Basen ist. Für die Zusammenfassung dieser Technik siehe Verma et al., Human Chromosomes: a Manual of Basic Techniques, Pergamon Press, New York (1988).

[0125] Sobald eine Sequenz einmal zu einer genauen Chromosomenstelle kartiert wurde, kann die physikalische Position der Sequenz auf dem Chromosom mit genetischen Kartendaten korreliert werden. Solche Daten werden zum Beispiel in V. McKusick, Mendelian Inheritance in Man gefunden (erhältlich online über die John Hopkins University Welch Medical Library). Die Beziehung zwischen Genen und Erkrankungen, die zu der gleichen chromosomalen Region kartiert worden sind, werden dann über Kopplungsanalyse (gemeinsame Vererbung von physikalisch benachbarten Genen) identifiziert.

[0126] Als Nächstes ist es notwendig, die Unterschiede in der cDNA oder genomischen Sequenz von betroffenen oder nicht betroffenen Individuen zu bestimmen. Wenn eine Mutation in manchen oder allen der betroffenen Personen beobachtet wird, aber nicht in irgendwelchen normalen Personen, dann ist es wahrscheinlich, dass die Mutation der ursächliche Erreger der Krankheit ist.

[0127] Mit der gegenwärtigen Auflösung der physikalischen Kartierung und genetischen Kartierungstechniken könnte eine cDNA, die genau zu einer chromosomalen Region lokalisiert wurde, die mit dieser Erkrankung in Zusammenhang steht, eines von zwischen 50 und 500 möglichen ursächlichen Genen darstellen. (Das nimmt eine Kartierungsauflösung von 1 Megabase und einem Gen pro 20 kb an).

[0128] Die Polypeptide, ihre Fragmente oder andere Derivate oder Analoge davon oder Zellen, die sie exprimieren, können als ein Immunogen verwendet werden, um Antikörper dagegen zu erzeugen. Diese Antikörper können zum Beispiel polyclonale oder monoclonale Antikörper sein. Die vorliegende Erfindung umfasst auch Chimäre, Einzelketten und humanisierte Antikörper sowie Fab-Fragmente oder das Produkt einer Fab-Expressionsbank. Verschiedene, im Fachgebiet bekannte Verfahren können für die Erzeugung solcher Antikörper und Fragmente verwendet werden.

[0129] Antikörper, die gegen die Polypeptide erzeugt werden, die einer Sequenz der vorliegenden Erfindung entsprechen, können durch direkte Injektion der Polypeptide in ein Tier, oder durch Verabreichung der Polypeptide an ein Tier, vorzugsweise keinen Menschen, erhalten werden. Der auf diese Weise erhaltene Antikörper wird dann die Polypeptide selbst binden. Auf diese Weise kann sogar eine Sequenz, die nur ein Fragment des Polypeptids codiert, für die Erzeugung von Antikörpern verwendet werden, welche die gesamten nativen Polypeptide binden. Solche Antikörper können dann verwendet werden, um die Polypeptide aus Geweben zu isolieren, die dieses Polypeptid exprimieren.

[0130] Zur Erzeugung von monoclonalen Antikörpern kann jede Technik verwendet werden, die Antikörper bereitstellt, welche durch fortlaufende Zelllinienkulturen erzeugt werden. Beispiele umfassen die Hybridom-Technik (Köhler und Milstein, 1975, *Nature*, 256: 495–497), die Triom-Technik, die menschliche B-Zell-Hybridomtechnik (Kozbor et al., 1983, *Immunology Today* 4: 72) und die EBV-Hybridom-Technik, um menschliche monoclonale Antikörper zu erzeugen (Cole, et al., 1985, in *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., Seiten 77–96).

[0131] Für die Erzeugung von Einzelketten-Antikörpern beschriebene Techniken (US-Patent 4.946.778) können adaptiert werden, um Einzelketten-Antikörper gegen immunogene Polypeptidprodukte dieser Erfindung zu erzeugen. Außerdem können transgene Mäuse verwendet werden, um vermenschlichte Antikörper gegen immunogene Polypeptidprodukte dieser Erfindung zu exprimieren.

[0132] Die vorliegende Erfindung wird hierin weiter unter Bezugnahme auf die folgenden Beispiele beschrieben werden, es ist jedoch klar, dass die vorliegende Erfindung nicht auf solche Beispiele beschränkt ist. Alle Teile oder Mengen beziehen sich, falls nicht anders angegeben, auf das Gewicht.

[0133] Um das Verständnis der folgenden Beispiele zu erleichtern, werden bestimmte, oft gebrauchte Verfahren und/oder Begriffe beschrieben werden.

[0134] „Plasmide“ werden durch ein kleines p, dem Großbuchstaben und/oder Nummern vorausgehen und/oder folgen, beschrieben. Die Ausgangsplasmide hierin sind entweder im Handel erhältlich, auf einer nicht eingeschränkten Basis öffentlich erhältlich oder können aus erhältlichen Plasmiden in Übereinstimmung mit veröffentlichten Verfahren konstruiert werden. Außerdem werden einem Fachmann Plasmide, die zu jenen äquivalent sind, die im Fachgebiet beschrieben werden, offensichtlich sein.

[0135] „Spaltung“ von DNA bezieht sich auf das katalytische Schneiden von DNA mit einem Restriktionsenzym, das nur an bestimmten Sequenzen in der DNA wirkt. Die verschiedenen, hierin verwendeten Restriktionsenzyme sind im Handel erhältlich und ihre Reaktionsbedingungen, Co-Faktoren und anderen Erfordernisse wurden so verwendet, wie es einem Fachmann bekannt sein würde. Für analytische Zwecke wird üblicherweise 1 µg an Plasmid oder DNA-Fragment mit etwa 2 Einheiten an Enzym in etwa 20 µl Pufferlösung verwendet. Zum Zweck der Isolierung von DNA-Fragmenten zur Plasmidkonstruktion werden üblicherweise 5 bis 50 µg an DNA mit 20 bis 250 Einheiten an Enzym in einem größeren Volumen gespalten. Geeignete Puffer und Substratmengen für bestimmte Restriktionsenzyme werden durch den Hersteller vorgeschrieben. Inkubationszeiten von etwa 1 Stunde bei 37°C werden normalerweise verwendet, können aber in Übereinstimmung mit dem Anweisungen des Lieferanten variieren. Nach der Spaltung wird die Reaktion direkt auf einem Polyacrylamidgel einer Elektrophorese unterworfen, um das gewünschte Fragment zu isolieren.

[0136] Größenauftrennung der gespaltenen Fragmente wird unter Verwendung eines 8% Polyacrylamidgels durchgeführt, wie von Goeddel, D. et al., *Nucleic Acids Res.*, 8: 4057 (1980) beschrieben.

[0137] „Oligonucleotide“ bezieht sich entweder auf einzelsträngige Polydesoxynucleotide oder zwei komplementäre Polydesoxynucleotidstränge, die chemisch synthetisiert sein können. Solche synthetischen Oligonucleotide haben kein 5'-Phosphat und werden daher ohne Hinzufügen eines Phosphats durch ein ATP in der Anwesenheit einer Kinase nicht an ein anderes Oligonucleotid ligieren. Ein synthetisches Oligonucleotid wird mit einem Fragment ligieren, das nicht dephosphoryliert worden ist.

[0138] „Ligierung“ bezieht sich auf den Prozess der Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen zwei doppelsträngigen Nucleinsäurefragmenten (Maniatis, T., et al., ebenda, S. 146). Wenn nicht anders bereitgestellt, kann die Ligierung unter Verwendung von bekannten Puffern und Bedingungen mit 10 Einheiten an T4-DNA-Ligase („Ligase“) pro 0,5 µg an ungefähr äquimolaren Mengen der zu ligierenden DNA-Fragmente erreicht werden.

[0139] Wenn nicht anders angegeben, wurde die Transformation wie in den Verfahren von Graham, F. und Van der Eb, A., *Virology*, 52: 456–457 (1973) durchgeführt.

Beispiel 1

Bakterielle Expression und Reinigung von EBI-2

[0140] Die DNA-Sequenz, die EBI-2 codiert, ATCC #209003, wird anfänglich unter Verwendung von PCR-Oligonucleotidprimern amplifiziert, die den 5'-Sequenzen des prozessierten EBI-2-Proteins (ohne der Signal-Peptidsequenz) und den Vektorsequenzen 3' vom EBI-2-Gen entsprechen. Zusätzliche Nucleotide, die EBI-2 entsprechen, wurden zu den 5' bzw. 3'-Sequenzen hinzugefügt. Der 5'-Oligonucleotidprimer hat die Sequenz 5' CCGAGGATCCATGCAAGCCGTCGACAAT 3' (SEQ ID NO: 5) und enthält eine BamHI-Restriktionsenzymstelle, gefolgt von 18 Nucleotiden der EBI-2 Codierungssequenz, beginnend an der vermuteten terminalen Aminosäure des prozessierten Proteincodons. Die 3' Sequenz 5' CCGAGGATCCTTACATTGGAGTCTCTTC 3' (SEQ ID NO: 6) enthält komplementäre Sequenzen zur BamHI-Stelle, worauf 18 Nucleotide von EBI-2 folgen. Die Restriktionsenzymstellen entsprechen den Restriktionsenzymstellen auf dem bakteriellen Expressionsvektor pQE-60 (Quiagen, Inc., Chatsworth, CA, 91311). pQE-60 codiert Antibiotikaresistenz (Amp^r), einen bakteriellen Replikationsursprung (ori), einen IPTG-regulierbaren Promotor-Operator (P/O), eine Ribosomenbindungsstelle (RBS), einen 6-His-Marker und Restriktionsenzymstellen. pQE-60 wurde dann mit BamHI gespalten. Die amplifizierten Sequenzen wurden in pQE-60 ligiert und wurden im Leserahmen mit der Sequenz inseriert, die den Histidin-Marker und die RBS codiert. Das Ligierungsgemisch wurde dann verwendet, um den *E. coli*-Stamm M15/rep 4 (Quiagen, Inc.) durch das in Sambrook J. et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) beschriebene Verfahren zu transformieren. M15/rep4 enthält vielfache Kopien des Plasmids pREP4, das den lacI-Repressor exprimiert und auch Kanamycin-Resistenz (Kan^r) verleiht. Transformanten werden durch ihre Fähigkeit, auf LB-Platten zu wachsen identifiziert und Ampicillin/Kanamycin-resistente Kolonien wurden ausgewählt. Plasmid DNA wurde isoliert und durch Restriktionsanalyse bestätigt. Clone, die die gewünschten Konstrukte enthielten, wurden über Nacht in Flüssigkultur in LB-Medium, das sowohl mit Amp (100 µg/ml) als auch Kan (25 µg/ml) ergänzt war, gezüchtet. Die Übernachtskultur wurde verwendet, um eine große Kultur in einem Verhältnis von 1:100 bis 1:250 zu inokulieren. Die Zellen wurden bis zu einer optischen Dichte von 600 (O.D.⁶⁰⁰) von 0,4 bis 0,6 gezüchtet. IPTG („Isopropyl-B-D-thiogalactopyranosid“) wurde dann zu einer Endkonzentration von 1 mM hinzugefügt. IPTG induziert durch Inaktivierung des lacI-Repressors, wodurch der P/O frei gelegt wird, was zu einer erhöhten Genexpression führt. Die Zellen wurden für weitere 3 bis 4 Stunden gezüchtet. Zellen wurden dann durch Zentrifugation geerntet. Das Zellpellet wurde in dem chaotropen Mittel 6 M Guanidin-HCl solubilisiert. Nach der Klärung wurde solubilisiertes hSca-2 aus dieser Lösung durch Chromatographie auf einer Nickel-Chelatsäule unter Bedingungen gereinigt, die eine starke Bindung durch Proteine ermöglichen, die den 6-His-Marker enthalten (Hochuli, E. et al., *J. Chromatography* 411: 177–184 (1984)). hSca-2 (95% rein wurde aus der Säule in 6 M Guanidin-HCl, pH-Wert 5,0, eluiert und zum Zweck der Renaturierung auf 3 M Guanidin-HCl, 100 mM Natriumphosphat, 10 mM Glutathion (reduziert) und 2 mM Glutathion (oxidiert) eingestellt. Nach der Inkubation in dieser Lösung für 12 Stunden wurde das Protein gegen 10 mM Natriumphosphat dialysiert.

Beispiel 2

Clonierung und Expression von EBI-2 unter Verwendung des Baculovirus-Expressionssystems

[0141] Die DNA-Sequenz, die das Vollängen-EBI-2-Protein, ATCC #209003, codiert, wurde unter Verwendung von PCR-Oligonucleotidprimern amplifiziert, die den 5' und 3'-Sequenzen des Gens entsprechen: Der 5'-Primer hat die Sequenz 5' CCGAGGATCCGCCATCATGCAAGCCGTCGACAAT 3' (SEQ ID NO: 7) und

enthält eine BamHI-Restriktionsenzymstelle (fett gedruckt), gefolgt von 6 Nucleotiden, die einem effizienten Signal für die Translationsinitiation in eukaryontischen Zellen ähneln (Kozak, M., J. Mol. Biol., 196: 947–950 (1987) und die gleich hinter den ersten 18 Nucleotiden des EBI-2-Gens liegen (das Initiationscodon für die Translation „ATG“ ist unterstrichen).

[0142] Der 3'-Primer hat die Sequenz 5' CCGAGGATCCTTACATTGGAGTCTCTTC 3' (SEQ ID NO: 8) und enthält die Schnittstelle für die Restriktionsendonuclease BamHI und 18 Nucleotide die komplementär zu der 3'-translatierten Sequenz des extrazellulären Teils von EBI-2 sind. Die amplifizierten Sequenzen wurden aus einem 1%-Agarosegel unter Verwendung eines im Handel erhältlichen Kits („GeneClean“ BIO 101 Inc. La Jolla, KA) isoliert. Das Fragment wurde dann mit der Endonuclease BamHI gespalten und wieder auf einem 1%-Agarosegel gereinigt. Dieses Fragment wird als F2 bezeichnet.

[0143] Der Vektor pA2 (Modifikation des pVL941-Vektors, nachstehend besprochen) wird für die Expression des EBI-2-Proteins unter Verwendung des Baculovirus-Expressionssystems verwendet (für eine Zusammenfassung siehe: Summers, M. D. und Smith, G. E. 1987, A manual of methods for baculovirus vectors and insect cell culture procedures, Texas Agricultural Experimental Station Bulletin No. 1555).

[0144] Dieser Expressionsvektor enthält den starken Polyhedrin-Promotor des Polyedervirus von *Autographa californica* (AcMNPV), gefolgt von der Erkennungsstelle für die Restriktionsendonuclease BamHI. Die Polyadenylierungsstelle des Affenvirus (SV)40 wird für effiziente Polyadenylierung verwendet. Für eine leichte Auswahl an rekombinantem Virus wird das beta-Galactosidasegen aus *E. coli* in der gleichen Richtung wie der Polyhedrin-Promotor inseriert, gefolgt vom Polyadenylierungssignal des Polyhedringens. Die Polyhedrinsequenzen werden an beiden Seiten von viralen Sequenzen für die Zell-vermittelte homologe Rekombination von co-transfizierter viraler Wildtyp-DNA flankiert. Viele andere Baculovirusvektoren könnten anstatt von pA2 verwendet werden, wie zum Beispiel pRG1 und pA2-GP, in welchem Fall die 5'-Primer entsprechend abgeändert werden, und pAc373, pVL941 und pAcIM1 (Luckow, V. A. und Summers, M. D., Virology, 170: 31–39).

[0145] Das Plasmid wurde mit dem Restriktionsenzym BamHI gespalten und dann unter Verwendung von Kälberdarm-Phosphatase durch im Fachgebiet bekannte Verfahren dephosphoryliert. Die DNA wurde dann aus einem 1% Agarosegel unter Verwendung des im Handel erhältlichen Kits („GeneClean“ BIO Inc., La Jolla, KA) isoliert. Diese Vektor-DNA wird als V2 bezeichnet.

[0146] Fragment F2 und das dephosphorylierte Plasmid V2 wurden mit T4-DNA-Ligase ligiert. *E. coli* HB101-Zellen wurden dann transformiert und Bakterien unter Verwendung des Enzyms BamHI identifiziert, die das Plasmid (pBacEBI-2) mit dem EBI-2 Gen enthielten. Die Sequenz des clonierten Fragments wurde durch DNA-Sequenzierung bestätigt.

[0147] 5 µg des Plasmids pBacEBI-2 wurden mit 1,0 µg eines im Handel erhältlichen linearisierten Baculovirus („BaculoGold Baculovirus DNA“, Pharmigen, San Diego, KA.) unter Verwendung des Lipofektionverfahrens co-transfiziert (Felgner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84: 7413–7417 (1987)).

[0148] 1 µg an BaculoGold-Virus-DNA und 5 µg des Plasmids pBacEBI-2 wurden in einer sterilen Vertiefung einer Mikrotiterplatte gemischt, die 50 µl an serumfreiem Grace-Medium (Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD) enthielt. Danach wurden 10 µl Lipofectin und 90 µl Grace-Medium hinzugefügt, gemischt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde das Transfektionsgemisch tropfenweise zu den Sf9-Insektenzellen (ATCC CRL 1711) hinzugefügt, die in einer 35 mm-Gewebekulturplatte mit 1 ml Grace-Medium ohne Serum ausgesät waren. Die Platte wurde hin und her geschaukelt, um die neu hinzugefügte Lösung zu mischen. Die Platte wurde dann für 5 Stunden bei 27°C inkubiert. Nach 5 Stunden wurde die Transfektionslösung aus der Platte entfernt und 1 ml Grace-Insektenmedium, das mit 10% fötalem Kälberserum ergänzt war, wurde hinzugefügt. Die Platte wurde in einen Inkubator zurückgestellt und die Züchtung bei 27°C für vier Tage fortgesetzt.

[0149] Nach vier Tagen wurde der Überstand gesammelt und eine Plaquetest, ähnlich wie bei Summers und Smith beschrieben (vorstehend), wurde durchgeführt. Als eine Modifikation wurde ein Agarosegel mit „Blue Gal“ (Life Technologies Inc., Gaithersburg) verwendet, das eine einfache Isolierung der blau gefärbten Plaques ermöglicht. (Eine genaue Beschreibung des „Plaquetests“ kann auch im Benutzerhandbuch für Insektenzellkultur und Baculovirologie, vertrieben durch Life Technologies Inc., Gaithersburg, Seite 9–10 gefunden werden).

[0150] Vier Tage nach der seriellen Verdünnung wurde das Virus zu den Zellen hinzugefügt und blau gefärbte

Plaques wurden mit der Spitze einer Eppendorfpipette entnommen. Der Agar, der die rekombinanten Viren enthielt, wurde dann in einem Eppendorfröhrchen resuspendiert, das 200 µl Grace-Medium enthielt. Der Agar wurde durch eine kurze Zentrifugation entfernt und der Überstand, der das rekombinante Baculovirus enthielt, wurde verwendet, um Sf9-Zellen zu infizieren, die in 35 mm-Schalen ausgesät waren. Vier Tage später wurden die Überstände dieser Zellkulturschalen geerntet und dann bei 4°C gelagert.

[0151] Sf9-Zellen wurden in Grace-Medium gezüchtet, das mit 10% hitzeinaktiviertem FBS ergänzt war. Die Zellen wurden mit dem rekombinanten Baculovirus V-EBI-2 bei einer Multiplizität der Infektion (MOI) von 2 infiziert. Sechs Stunden später wurde das Medium entfernt und durch SF900 II-Medium ohne Methionin und Cystein (Life Technologies Inc., Gaithersburg) ersetzt. 42 Stunden später wurden 5 µCi and ³⁵S Methionin und 5 µCi ³⁵S-Cystein (Amersham) hinzugefügt. Die Zellen wurden weiter für 16 Stunden inkubiert, bevor sie durch Zentrifugation geerntet wurden, und die markierten Proteine wurden durch SDS-PAGE und Autoradiographie sichtbar gemacht.

Beispiel 3

Expression der rekombinanten EBI-2 in COS-Zellen

[0152] Die Expression von Plasmid EBI-2 HA stammt aus dem Vektor pcDNA1/Amp (Invitrogen), umfassend: 1) SV40-Replikationsursprung, 2) Ampicillin-Resistenzgen, 3) E. coli-Replikationsursprung, 4) CMV-Promotor, gefolgt von einer Polylinkerregion, einem SV40-Intron und einer Polyadenylierungsstelle. Ein DNA-Fragment, das den gesamten EBI-2-Vorläufer und ein HA-Marker, im Leserahmen fusioniert mit seinem 3'-Ende, codiert, wurde in die Polylinkerregion des Vektors cloniert, daher wird die rekombinante Proteinexpression unter dem CMV-Promotor geleitet. Der HA-Marker entspricht, wie vorstehend beschrieben, einem Epitop, das von dem Influenza-Hämagglutininprotein stammt (I. Wilson, H. Niman, R. Heighen, A. Cherenson, M. Connolly und R. Lerner, 1984, Cell 37: 767, (1984)). Die Fusion des HA-Markers an das Zielprotein ermöglicht den leichten Nachweis des rekombinanten Proteins mit einem Antikörper, der das HA-Epitop erkennt.

[0153] Die Plasmid-Konstruktionsstrategie wird wie folgt beschrieben:

Die EBI-2 codierende DNA-Sequenz, ATCC #209003, wurde durch PCR unter Verwendung von 2 Primern konstruiert: der 5'-Primer 5' CCGAGGATCCGCCATCATGCAAGCCGTCGACAAT 3' (SEQ ID NO: 9) enthält eine BamHI-Stelle, gefolgt von einer EBI-2-Codierungssequenz, die am Initiationscodon beginnt; die 3'-Sequenz 5' CCGATCTAGATTAATCCCATACGACGTCCAGACTACGCTCATTGGAGTCTCTTC 3' (SEQ ID NO: 10) enthält komplementäre Sequenzen zur XbaI-Stelle, dem Translations-Stoppocodon, HA-Marker und der EBI-2-Codierungssequenz (ohne des Stoppcodons). Das PCR-Produkt enthält daher eine BamHI-Stelle, eine EBI-2-Codierungssequenz, gefolgt von einem HA-Marker, das im Leserahmen fusioniert ist, einem Translations-Terminationsstoppcodon neben dem HA-Marker und einer XbaI-Stelle. Das PCR-amplifizierte DNA-Fragment und der Vektor, pcDNA1/Amp, wurden mit dem BamHI- und XbaI-Restriktionsenzym gespalten und ligiert. Das Ligationsgemisch wurde in den E. coli-Stamm SURF transformiert (erhältlich von Stratagene Cloning Systems, 11099 North Torreg Pines Road, La Jolla, CA 92037), die transformierte Kultur wurde auf Ampicillinmedium-Platten plattiert und resistente Kolonien wurden ausgewählt. Plasmid-DNA wurde aus Transformanten isoliert und durch Restriktionsanalyse auf die Anwesenheit von richtigen Fragmenten untersucht. Zur Expression des rekombinanten EBI-2 wurden COS-Zellen mit dem Expressionsvektor durch das DEAE-DEXTRAN-Verfahren (J. Sambrook, E. Fritsch, T. Maniatis, Molecular Cloning; A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989)) transfiziert. Die Expression des EBI-2-HA-Proteins wurde durch radioaktive Markierung und das Immunpräzipitationsverfahren (E. Harlow, D. Lane, Antibodies: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1988)) nachgewiesen. Zellen wurden für 8 Stunden mit ³⁵S-Cystein zwei Tage nach der Transfektion markiert. Kulturmedien wurden dann gesammelt und die Zellen wurden mit Detergens lysiert (RIPA-Puffer (150 mM NaCl, 1% NP-40, 0,1% SDS, 1% NP-40, 0,5% DOC, 50 mM Tris, pH-Wert 7,5) (Wilson, I. et al., ebenda, 37: 767 (1984)). Sowohl Zelllysate als auch Kulturmedien wurden mit HA-spezifischem monoclonalem Antikörper ausgefällt. Die ausgefallenen Proteine wurden auf 15% SDS-PAGE-Gelen analysiert.

Beispiel 4

Expression über Gen-Therapie

[0154] Fibroblasten werden von einem Individuum durch Hautbiopsie entnommen. Das daraus resultierende Gewebe wird in Gewebekulturmedium gegeben und in kleine Stücke zerteilt. Kleine Brocken des Gewebes werden auf eine nasse Oberfläche einer Gewebekulturflasche gelegt, ungefähr zehn Stücke werden in jede Flasche gelegt. Die Flasche wird dann umgedreht, fest geschlossen und bei Raumtemperatur über Nacht ste-

hen gelassen. Nach 24 Stunden bei Raumtemperatur wird die Flasche umgedreht und die Brocken an Gewebe bleiben am Boden der Flasche kleben und frisches Medium (z.B. Ham-F12-Medium mit 10% fötalem Rinderserum, Penicillin und Streptomycin) wird hinzugefügt. Das Ganze wird dann bei 37°C für ungefähr eine Woche inkubiert. Zu dieser Zeit wird frisches Medium hinzugefügt und anschließend alle paar Tage gewechselt. Nach weiteren zwei Wochen in der Zellkultur taucht eine Einzelzellschicht von Fibroblasten auf. Die Einzelzellschicht wird mit Trypsin behandelt und in größere Flaschen abgemessen.

[0155] pMV-7 (Kirschmeier, P. T. et al., DNA, 7: 219–25 (1988), flankiert durch die langen terminalen Wiederholungen des Moloney-Sarcomvirus der Maus wird mit EcoRI und HindIII gespalten und anschließend mit Kälberdarm-Phosphatase behandelt. Der lineare Vektor wird auf einem Agarosegel fraktioniert und unter Verwendung von Glasperlen gereinigt.

[0156] Die cDNA, die das Polypeptid der vorliegenden Erfindung codiert, wird unter Verwendung von PCR-Primern amplifiziert, die den 5' bzw. 3'-Endsequenzen entsprechen. Der 5'-Primer enthält eine EcoRI-Stelle und der 3'-Primer enthält ferner eine HindIII-Stelle. Gleiche Mengen an linearem Rückgrat des Moloney-Sarcomvirus der Maus und der amplifizierten EcoRI- und HindIII-Fragmente werden in der Anwesenheit der T4-DNA-Ligase zusammengefügt. Das daraus resultierende Gemisch wird unter Bedingungen erhalten, die für die Ligierung der zwei Fragmente geeignet sind. Das Ligierungsgemisch wird verwendet, um HB101-Bakterien zu transformieren, die dann zum Zweck der Bestätigung, dass der Vektor das Gen von Interesse richtig inseriert hat, auf Kanamycin enthaltenden Agar plattiert werden.

[0157] Die amphiotrophen pA317- oder GP+am12-Verpackungszellen werden in Dulbecco modifiziertem Eagle-Medium (DMEM) mit 10% Kälberserum (CS), Penicillin und Streptomycin in Gewebekultur bis zu einer konfluenten Dichte gezüchtet. Der MSV-Vektor, der das Gen enthält, wird dann zu den Medien hinzugefügt und die Verpackungszellen werden mit dem Vektor transduziert. Die Verpackungszellen produzieren nun infektiöse virale Partikel, welche das Gen enthalten (die Verpackungszellen werden nun als Erzeugerzellen bezeichnet).

[0158] Frisches Medium wird zu den transduzierten Erzeugerzellen hinzugefügt und anschließend wird das Medium aus einer 10 cm-Platte von konfluenten Erzeugerzellen geerntet. Das verbrauchte Medium, das die infektiösen viralen Partikel enthält, wird durch einen Milipore-Filter gefiltert, um abgelöste Erzeugerzellen zu entfernen, und dieses Medium wird dann verwendet, um Fibroblastenzellen zu infizieren. Medium wird von einer sub-konfluenten Platte an Fibroblasten entfernt und schnell durch das Medium von den Erzeugerzellen ersetzt. Dieses Medium wird entfernt und durch frisches Medium ersetzt. Wenn der Virustiter hoch ist, werden fast alle Fibroblasten infiziert sein und eine Selektion wird nicht benötigt. Wenn der Titer sehr niedrig ist, dann ist es notwendig, einen retroviralen Vektor zu verwenden, der einen selektierbaren Marker wie zum Beispiel neo oder his aufweist.

[0159] Die erzeugten Fibroblasten werden dann, entweder alleine oder nachdem sie bis zur Konfluenz auf Cytodex 3-Mikroträger-Perlen gezüchtet wurden, in den Wirt injiziert.

Beispiel 5

Bakterielle Expression und Reinigung des EDG-1-ähnlichen Polypeptids (Referenzbeispiel)

[0160] Die DNA-Sequenz, die das EDG-1-ähnliche Polypeptid codiert, ATCC #209004, wird anfänglich unter Verwendung von PCR-Oligonucleotidprimern entsprechend den 5'-Sequenzen des prozessierten EDG-1-ähnlichen Polypeptidproteins (ohne der Signalpeptid-Sequenz) und den Vektorsequenzen 3' zum EDG-1-ähnlichen Polypeptidgen amplifiziert. Zusätzliche Nucleotide, die EBI-2 entsprechen, wurden zu den 5'- bzw. 3'-Sequenzen hinzugefügt. Der 5'-Oligonucleotidprimer hat die Sequenz:

5' CCGAGGATCCATGAACGCCACGGGGACC 3' (SEQ ID NO: 11) und enthält eine BamHI-Restriktionsenzymstelle, gefolgt von 18 Nucleotiden der EDG-1-ähnlichen Polypeptid-Codierungssequenz, die von der mutmaßlichen terminalen Aminosäure des prozessierten Proteincodons startet. Die 3'-Sequenz: 5' CCGAGGATCCTCAGATGCTCCGCACGCT 3' (SEQ ID NO: 12) enthält komplementäre Sequenzen zur BamHI-Stelle, auf die 18 Nucleotide des EDG-1-ähnlichen Polypeptids folgen. Die Restriktionsenzymstellen entsprechen den Restriktionsenzymstellen auf dem bakteriellen Expressionsvektor pQE-60 (Quiagen, Inc., Chatsworth, KA, 91311). pQE-60 codiert Antibiotikaresistenz (Amp^r), einen bakteriellen Replikationsursprung (ori), einen IPTG-regulierbaren Promotor-Operator (P/O), eine Ribosomenbindungsstelle (RBS), einen 6-His-Marker und Restriktionsenzymstellen. pQE-60 wurde dann mit BamHI gespalten. Die amplifizierten Sequenzen wurden in pQE-60 ligiert und wurden im Leserahmen mit der Sequenz inseriert, die den Histidin-Marker und die RBS codiert. Das Ligierungsgemisch wurde dann verwendet, um den E. coli Stamm M15/rep 4 (Quiagen, Inc.) durch

das in Sambrook, J. et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) beschriebene Verfahren zu transformieren. M15/rep4 enthält mehrere Kopien des Plasmids pREP4, das den lacI-Repressor exprimiert und auch Kanamycin-Resistenz (Kan^r) verleiht.

[0161] Transformanten werden durch ihre Fähigkeit identifiziert, auf LB-Platten zu wachsen, und Ampicillin und Kanamycin resistente Kolonien wurden ausgewählt. Plasmid-DNA wurde isoliert und durch Restriktionsanalyse bestätigt. Clone, die die gewünschten Konstrukte erzeugen, wurden über Nacht (DIN) in flüssiger Kultur in LB-Medium gezüchtet, das sowohl mit Amp (100 µg/ml) als auch Kan (25 µg/ml) ergänzt war. Die OIN-Kultur wird verwendet, um eine große Kultur bei einem Verhältnis von 1:100 bis 1:250 zu inokulieren. Die Zellen wurden bis zu einer optischen Dichte 600 (O.D.⁶⁰⁰) von zwischen 0,4 und 0,6 gezüchtet. IPTG („Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid“) wurde dann bis zu einer Endkonzentration von 1 mM hinzugefügt. IPTG induziert durch Inaktivierung des lacI-Repressors, wodurch der P/O freigelegt wird, was zu einer erhöhten Genexpression führt. Zellen wurden weitere 3 bis 4 Stunden gezüchtet. Zellen wurden dann durch Zentrifugation geerntet. Das Zellpellet wurde in dem chaotrophen Mittel 6 M Guanidin-HCl solubilisiert. Nach der Klärung wurde solubilisierter EBI-2 aus dieser Lösung durch Chromatographie auf einer Nickel-Chelatsäule unter Bedingungen gereinigt, die eine feste Bindung durch Proteine ermöglichen, die den 6-His-Marker enthalten (Hochuli, E. et al., *J. Chromatography* 411: 177–184 (1984)). EBI-2 (95% rein) wurde aus der Säule in 6 M Guanidin-HCl, pH-Wert 5,0, eluiert und zum Zweck der Renaturierung auf 3 M Guanidin-HCl, 100 mM Natriumphosphat, 10 mM Glutathion (reduziert) und 2 mM Glutathion (oxidiert) eingestellt. Nach Inkubation in dieser Lösung für 12 Stunden wurde das Protein gegen 10 mM Natriumphosphat dialysiert.

Beispiel 6

Clonierung und Expression von EDG-1-ähnlichem Polypeptid unter Verwendung des Baculovirus-Expressionssystems (Referenzbeispiel)

[0162] Die DNA-Sequenz, die das Volllängen-EDG-1-ähnliche Polypeptidprotein, ATCC #209004 codiert, wurde unter Verwendung von PCR-Oligonucleotidprimern, die den 5'- und 3'-Sequenzen des Gens entsprechen, amplifiziert. Der 5'-Primer hat die Sequenz:

5' GCGAGGATCCGCCATCATGAACGCCACGGGGACC 3' (SEQ ID NO: 13) und enthält eine BamHI-Restriktionsenzymstelle (fett gedruckt), gefolgt von 6 Nucleotiden, die einem effizienten Signal für die Translationsinitiation in eukaryontischen Zellen ähneln (Kozak, M. J. *Mol. Biol.*, 196: 947–950 (1987), das gleich nach den ersten 18 Nucleotiden des EDG-1-ähnlichen Polypeptidgens liegt (das Initiationscodon für die Translation „ATG“ ist unterstrichen).

[0163] Der 3'-Primer hat die Sequenz: 5' CCGAGGATCCTCAGATGCTCCGCACGCT 3' (SEQ ID NO: 14) und enthält die Spaltungsstelle für die Restriktionsendonuclease BamHI und 18 Nucleotide, die zu der translatierten 3'-Sequenz des extrazellulären Teils des EDG-1-ähnlichen Polypeptids komplementär sind. Die amplifizierten Sequenzen wurden aus einem 1% Agarosegel unter Verwendung eines im Handel erhältlichen Kits („GeneClean“, BIO 101 Inc., La Jolla, KA) isoliert. Das Fragment wurde dann mit der Endonuclease BamHI gespalten und wieder auf einem 1% Agarosegel gereinigt. Dieses Fragment wird als F2 bezeichnet.

[0164] Der Vektor pA2 (Modifikation des pVL941-Vektors, nachstehend besprochen) wird für die Expression des EDG-1-ähnlichen Polypeptidproteins unter Verwendung des Baculovirus-Expressionssystems verwendet (für eine Zusammenfassung siehe: Summers, M. D. und Smith, G. E. 1987, *A manual of methods for baculovirus vectors and insect cell culture procedures*. Texas Agricultural Experimental Station Bulletin No. 1555). Dieser Expressionsvektor enthält den starken Polyhedrin-Promotor des Kernpolyedervirus von *Autographa californica* (AcMNPV), gefolgt von der Erkennungsstelle für die Restriktionsendonuclease BamHI. Die Polyadenylierungsstelle des Affenvirus (SV)40 wird für effiziente Polyadenylierung verwendet. Für eine einfache Selektion von rekombinantem Virus wird das beta-Galactosidasegen aus *E. coli* in der gleichen Orientierung wie der Polyhedrinpromotor, gefolgt durch das Polyadenylierungssignal des Polyhedringens, inseriert. Die Polyhedrinsequenzen werden an beiden Seiten durch virale Sequenzen für die zellvermittelte homologe Rekombination von co-transfizierter viraler Wildtyp-DNA flankiert. Viele andere Baculovirusvektoren könnten anstelle von pA2 verwendet werden, wie zum Beispiel pRG1 und pA2-GP, wobei der 5'-Primer demgemäß geändert wird, und pAc373, pVL941 und pAcIM1 (Luckow, V. A. und Summers, M. D., *Virology*, 170: 31–39).

[0165] Das Plasmid wurde mit dem Restriktionsenzym BamHI gespalten und dann unter Verwendung von Kälberdarm-Phosphatase durch im Fachgebiet bekannte Verfahren dephosphoryliert. Die DNA wurde dann aus einem 1% Agarosegel unter Verwendung des im Handel erhältlichen Kits („GeneClean“ BIO 101 Inc., La Jolla, KA) isoliert. Dieser Vektor wurde als V2 bezeichnet.

[0166] Fragment F2 und das dephosphorylierte Plasmid V2 wurden mit T4-DNA-Ligase ligiert. *E. coli* HB 101 wurden dann transformiert und Bakterien unter Verwendung des BamHI-Enzyms identifiziert, die das Plasmid (pBacEDG-1-ähnliches Polypeptid) mit dem EDG-1-ähnlichen Polypeptidgen enthielten. Die Sequenz des klonierten Fragments wurde durch DNA-Sequenzierung bestätigt.

[0167] 5 µg des Plasmids pBacEDG-1-ähnliches Polypeptid wurden mit 1,0 µg eines im Handel erhältlichen linearisierten Baculovirus („BaculoGold-Baculovirus-DNA“, Pharmigen, San Diego, KA) unter Verwendung des Lipofektionsverfahrens (Feigner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84: 7413–7417 (1987)) co-transfiziert.

[0168] 1 µg an BaculoGold-Virus-DNA und 5 µg des Plasmids pBacEDG-1-ähnliches Polypeptid wurden in einer sterilen Vertiefung einer Mikrotiterplatte gemischt, die 50 µl an serumfreien Grace-Medium (Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD) enthielt. Danach wurden 10 µl Lipofectin und 90 µl Grace-Medium hinzugefügt, gemischt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde das Transfektionsgemisch tropfenweise zu den Sf9-Insektenzellen (ATCC CRL 1711) hinzugefügt, damit wurde eine 35 mm-Gewebekulturplatte mit 1 ml Grace-Medium ohne Serum beimpft. Die Platte wurde hin und her geschaukelt, um die neu hinzugefügte Lösung zu mischen. Die Platte wurde dann für 5 Stunden bei 27°C inkubiert. Nach 5 Stunden wurde die Transfektionslösung von der Platte entfernt und 1 ml Grace-Insektenmedium, das mit 10% fötalem Kälberserum ergänzt war, wurde hinzugefügt. Die Platte wurde in einen Inkubator zurückgestellt und die Züchtung für 4 Tage bei 27°C fortgesetzt.

[0169] Nach 4 Tagen wurde der Überstand gesammelt und ein Plaquetest durchgeführt, ähnlich wie er von Summers und Smith (vorstehend) beschrieben wurde. Als eine Modifikation wurde ein Agarosegel mit „Blue Gal“ (Life Technologies Inc., Gaithersburg) verwendet, das leichte Isolierung der blau gefärbten Plaques ermöglicht. (Eine genaue Beschreibung eines „Plaque-Tests“ kann auch im Benutzerhandbuch für Insektenzellkultur und Baculovirologie, vertrieben durch Life Technologies Inc., Gaithersburg, Seiten 9–10, gefunden werden).

[0170] Vier Tage nach der seriellen Verdünnung wurde das Virus zu den Zellen hinzugefügt und blau gefärbte Plaques wurden mit der Spitze einer Eppendorfpipette abgenommen. Der die rekombinanten Viren enthaltende Agar wurde dann in einem Eppendorfröhrchen resuspendiert, das 200 µl Grace-Medium enthielt. Der Agar wurde durch kurze Zentrifugation entfernt und der Überstand, der das rekombinante Baculovirus enthielt, wurde verwendet, um Sf9-Zellen zu infizieren, die in die 35 mm-Schalen ausgesät waren. Vier Tage später wurden die Überstände dieser Zellkulturschalen geerntet und bei 4°C gelagert.

[0171] Sf9-Zellen wurden in Grace-Medium gezüchtet, das mit 10% hitzeinaktiviertem FBS ergänzt war. Die Zellen wurden mit dem rekombinanten Baculovirus-V-EDG-1-ähnlichem Polypeptid bei einer Multiplizität der Infektion (MOI) von 2 infiziert. Sechs Stunden später wurde das Medium entfernt und durch SF900 II-Medium ohne Methionin und Cystein (Life Technologies Inc., Gaithersburg) ersetzt. 42 Stunden später wurden 5 µCi an ³⁵S-Methionin und 5 µCi ³⁵S-Cystein (Amersham) hinzugefügt. Die Zellen wurden weiter für 16 Stunden inkubiert, bevor sie durch Zentrifugation geerntet wurden, und die markierten Proteine wurden durch SDS-PAGE und Autoradiographie sichtbar gemacht.

Beispiel 7

Expression von rekombinantem EDG-1-ähnlichem Polypeptid in Cos-Zellen (Referenzbeispiel)

[0172] Die Expression von Plasmid EDG-1-ähnlichem Polypeptid HA erfolgt von dem Vektor pcDNA1/Amp (In-vitrogen), enthaltend: 1) SV40-Replikationsursprung, 2) Ampicillinresistenzgen, 3) *E. coli*-Replikationsursprung, 4) CMV-Promotor, gefolgt von einer Polylinkerregion, einem SV40-Intron und einer Polyadenylierungsstelle. Ein DNA-Fragment, welches den gesamten EDG-1-ähnlichen Polypeptid-Vorläufer codiert, und ein HA-Marker, fusioniert im Leserahmen an sein 3'-Ende, wurden in die Polylinkerregion des Vektors kloniert, daher wurde die rekombinante Proteinexpression unter dem CMV-Promotor gesteuert. Der HA-Marker entspricht einem Epitop, das von dem vorstehend beschriebenen Influenza-Hämagglutininprotein stammt (I. Wilson, H. Niman, R. Heighten, A. Cherenson, M. Connolly und R. Lerner, 1984 Cell 37: 767, (1984)). Die Fusion des HA-Markers mit dem Zielprotein ermöglicht einen leichten Nachweis des rekombinanten Proteins mit einem Antikörper, der das HA-Epitop erkennt.

[0173] Die Plasmidkonstruktionsstrategie wird wie folgt beschrieben:

Die DNA-Sequenz, die das EDG-1-ähnliche Polypeptid, ATCC #209004, codiert, wurde unter Verwendung von zwei Primern durch PCR konstruiert: der 5' Primer 5'CCGAGGATCCGCCATCATGAACGCCACGGGGACC 3'

(SEQ ID NO: 15) enthält eine BamHI-Stelle, gefolgt durch die Codierungssequenz des EDG-1-ähnlichen Polypeptids, beginnend vom Initiationscodon; die 3'-Sequenz 5 CCGATCTAGATCAATCCCATACGACGTCCCA-GACTACGCTGATGCTCCGCACGCT 3' (SEQ ID NO: 16) enthält komplementäre Sequenzen zu der XbaI-Stelle, dem Translations-Stoppocodon, HA-Marker und der EDG-1-ähnliche Polypeptid-codierende Sequenz (ohne das Stopp-Codon). Daher enthält das PCR-Produkt eine BamHI-Stelle, eine EDG-1-ähnliche Polypeptid-Codierungssequenz, gefolgt von dem im Leserahmen fusionierten HA-Marker, einem Translations-Terminations-Stoppocodon neben dem HA-Marker und einer XbaI-Stelle. Das durch PCR amplifizierte DNA-Fragment und der Vektor, pcDNA1/Amp, wurden mit BamHI- und XbaI-Restriktionsenzymen gespalten und ligiert. Das Ligierungsgemisch wurde in den E. coli-Stamm SURF (erhältlich vom Stratagene Cloning Systems, 11099 North Torreg Pines Road, La Jolla, CA 92037) transformiert und die transformierte Kultur wurde auf Ampicillinmedium-Platten ausplattiert und resistente Kolonien wurden ausgewählt. Plasmid-DNA wurde aus Transformanten isoliert und durch Restriktionsanalyse auf die Anwesenheit des richtigen Fragments überprüft. Zur Expression des rekombinanten EDG-1-ähnlichen Polypeptids wurden COS-Zellen mit dem Expressionsvektor durch das DEAE-DEXTRA-Verfahren transfiziert (J. Sambrook, E. Fritsch, T. Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989)). Die Expression des EDG-1-ähnlichen Polypeptid-HA-Proteins wurde durch radioaktive Markierung und ein Immunpräzipitationsverfahren (E. Harlow, D. Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1988)) nachgewiesen. Zellen wurden zwei Tage nach der Transfektion für 8 Stunden mit ³⁵S-Cystein markiert. Kulturmedium wurde dann gesammelt und die Zellen wurden mit Detergens (RIPA-Puffer (150 mM NaCl, 1% NP-40, 0,1% SDS, 1% NP-40, 0,5% DOC, 50 mM Tris, pH-Wert 7,5) lysiert (Wilson, I. et al., ebenda, 37: 767 (1984)): Sowohl Zelllysate als auch Kulturmedien wurden mit einem HA-spezifischen monoclonalen Antikörper ausgefällt. Ausgefällte Proteine wurden auf 15% SDS-PAGE-Gelen analysiert.

Beispiel 8

Expression über Gentherapie

[0174] Fibroblasten wurden aus einem Individuum durch Hautbiopsie erhalten. Das daraus resultierende Gewebe wird in Gewebekulturmedium gelegt und in kleine Stücke zerteilt. Kleine Gewebebrocken werden auf eine nasse Oberfläche einer Gewebekulturflasche gelegt, ungefähr 10 Stücke werden in jede Flasche gelegt. Die Flasche wird dann umgedreht, fest geschlossen und bei Raumtemperatur über Nacht stehen gelassen. Nach 24 Stunden bei Raumtemperatur wird die Flasche umgedreht und die Gewebebrocken bleiben am Boden der Flasche kleben und frisches Medium (z.B. Ham-F12-Medium mit 10% FBS, Penicillin und Streptomycin) wird hinzugefügt. Das Ganze wird dann bei 37°C für ungefähr eine Woche inkubiert. Dann wird frisches Medium hinzugefügt und anschließend alle paar Tage gewechselt. Nach weiteren zwei Wochen in Kultur taucht eine Einzelzellschicht aus Fibroblasten auf. Die Einzelzellschicht wird mit Trypsin behandelt und in größere Flaschen abgemessen.

[0175] pMV-7 (Kirschmeier, P. T. et al., DNA, 7: 219–25 (1988), flankiert durch die langen terminalen Wiederholungen des Moloney-Sarcomvirus der Maus, wird mit EcoRI und HindIII gespalten und anschließend mit Kälberdarm-Phosphatase behandelt. Der lineare Vektor wird auf einem Agarosegel fraktioniert und unter Verwendung von Glasperlen gereinigt.

[0176] Die cDNA, die das Polypeptid der vorliegenden Erfindung codiert, wird unter Verwendung von PCR-Primern amplifiziert, die den 5' bzw. 3'-Endsequenzen entsprechen. Der 5'-Primer enthält eine EcoRI-Stelle und der 3'-Primer enthält ferner eine HindIII-Stelle. Gleiche Mengen an linearem Rückgrat des Moloney-Sarcomvirus der Maus und der amplifizierten EcoRI- und HindIII-Fragmente werden, in der Anwesenheit von T4-DNA-Ligase zusammengefügt. Das daraus resultierende Gemisch wird unter Bedingungen erhalten, die für die Ligierung von zwei Fragmenten geeignet sind. Das Ligierungsgemisch wird verwendet, um HB101-Bakterien zu transformieren, die dann zum Zweck der Bestätigung, dass der Vektor das Gen von Interesse richtig inseriert hat, auf Kanamycin enthaltenden Agar ausplattiert werden.

[0177] Die amphiotrophen pA317- oder GP+am12-Verpackungszellen werden in Dulbecco modifiziertem Eagle-Medium (DMEM) mit 10% Kälberserum (CS), Penicillin und Streptomycin in Gewebekultur bis zu einer konfluenten Dichte gezüchtet. Der MSV-Vektor, der das Gen enthält, wird dann zu den Medien hinzugefügt und die Verpackungszellen werden mit dem Vektor transduziert. Die Verpackungszellen produzieren nun infektiöse virale Partikel, welche das Gen enthalten (die Verpackungszellen werden nun als Erzeugerzellen bezeichnet).

[0178] Frisches Medium wird zu den transduzierten Erzeugerzellen hinzugefügt und anschließend wird das Medium von einer 10 cm-Platte von konfluenten Erzeugerzellen geerntet. Das verbrauchte Medium, das die

infektiösen viralen Partikel enthält, wird durch einen Milipore-Filter gefiltert, um abgelöste Erzeugerzellen zu entfernen, und dieses Medium wird dann verwendet, um Fibroblastenzellen zu infizieren. Medium wird von einer sub-konfluenten Platte mit Fibroblasten entfernt und schnell durch das Medium von den Erzeugerzellen ersetzt. Dieses Medium wird entfernt und durch frisches Medium ersetzt. Wenn der Virustiter hoch ist, werden fast alle Fibroblasten infiziert sein und eine Selektion wird nicht benötigt. Wenn der Titer sehr niedrig ist, dann ist es notwendig, einen retroviralen Vektor zu verwenden, der einen selektierbaren Marker wie zum Beispiel neo oder his aufweist.

[0179] Die erzeugten Fibroblasten werden dann, entweder alleine oder nachdem sie bis zur Konfluenz auf Cytodex 3-Mikroträger-Perlen gezüchtet wurden, in den Wirt injiziert. Die Fibroblasten erzeugen nun das Proteinprodukt.

[0180] Zahlreiche Modifikationen und Variationen der vorliegenden Erfindung sind im Lichte der vorstehenden Lehren möglich und daher innerhalb des Geltungsbereiches der beigefügten Ansprüche. Die Erfindung kann anders ausgeübt werden, als spezifisch beschrieben.

SEQUENZPROTOKOLL

- (1) Allgemeine Information:
- (i) Anmelder: Human Genome Sciences, Inc., et al.
 - (ii) Titel der Erfindung: G-Protein-gekoppelter Rezeptor
 - (iii) Zahl der Sequenzen: 18
 - (iv) Korrespondenzadresse:
 - (A) Adressat: Human Genome Sciences, Inc.
 - (B) Straße: 9410 Key West Avenue
 - (C) Stadt: Rockville
 - (D) Staat: Maryland
 - (E) Land: USA
 - (F) PLZ: 20850
 - (v) Computerlesbare Form:
 - (A) Medium: 3,5 Zoll-Diskette
 - (B) Computer: IBM PS/2
 - (C) Betriebssystem: MS-DOS
 - (D) Software: Word Perfect 5,1
 - (vi) Daten der vorliegenden Anmeldung:
 - (A) Anmeldenummer: PCT/US98/09048
 - (B) Anmeldedatum: 7. Mai 1998
 - (C) Klassifizierung:
 - (vii) Daten der vorherigen Anmeldung:
 - (A) Anmeldenummer: 08/852.824
 - (B) Anmeldedatum: 7. Mai 1997
 - (viii) Informationen zum Anwalt/Vertreter:
 - (A) Name: A. Anders, Brookes
 - (B) Registrierungsnummer: 36.373
 - (C) Referenz-/Aktenummer: PF351PCT.LIC
 - (xi) Informationen zur Fernmeldeverbindung:
 - (A) Telephon: 301-309-8504
 - (B) Telefax: 301-309-8439

(2) Informationen fg SEQ ID NO: 1:

- (i) Sequenzmerkmale:
 - (A) Länge: 2249 Basenpaare
 - (B) Typ: Nucleinsäure
 - (C) Strangform: Einzelstrang
 - (D) Topologie: linear
- (ii) Molekültyp: cDNA
- (xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 1:

```
GCACGAGGAA CAGAACACTT TCTCATGTCC AGGGTCAGAT TACAAGAGCA CTCAAGACTT      60
TACTGACGAA AACTCAGGAA ATCCTCTATC ACAAAGAGGT TTGGCAACTA AACTAAGACA      120
```

40

TTAAAAGGAA AATACCAGAT GCCACTCTGC AGGCTGCAAT AACTACTACT TACTGGATAC	180
ATTCAAACCC TCCAGAATCA ACAGTTATCA GGTAACCAAC AAGAA ATG CAA GCC GTC	237
	Met Gln Ala Val
GAC ATT CTC ACC TCT GCG CCT GGG AAC AAC AGT CTG TGC ACC AGA	282
Asp Asn Leu Thr Ser Ala Pro Gly Asn Thr Ser Leu Cys Thr Arg	
5 10 15	
GAC TAC AAA ATC ACC CAG GTC CTC TTC CCA CTG CTC TAC ACT GTC	327
Asp Tyr Lys Ile Thr Gln Val Leu Phe Pro Leu Leu Tyr Thr Val	
20 25 30	
CTG TTT TTT GTT GGA CTT ATC ACA AAT GGC CTG GCG ATG AGG ATT	372
Leu Phe Phe Val Gly Leu Ile Thr Asn Gly Leu Ala Met Arg Ile	
35 40 45	
TTC TTT CAA ATC CGG AGT AAA TCA AAC TTT ATT ATT TTT CTT AAG	417
Phe Phe Gln Ile Arg Ser Lys Ser Asn Phe Ile Ile Phe Leu Lys	
50 55 60	
AAC ACA GTC ATT TCT GAT CTT CTC ATG ATT CTG ACT TTT CCA TTC	462
Asn Thr Val Ile Ser Asp Leu Leu Met Ile Leu Thr Phe Pro Phe	
65 70 75	
AAA ATT CTT AGT GAT GCC AAA CTG GGA ACA GGA CCA CTG AGA ACT	507
Lys Ile Leu Ser Asp Ala Lys Leu Gly Thr Gly Pro Leu Arg Thr	
80 85 90	
TTT GTG TGT CAA GTT ACC TCC GTC ATA TTT TAT TTC ACA ATG TAT	552
Phe Val Cys Gln Val Thr Ser Val Ile Phe Tyr Phe Thr Met Tyr	
95 100 105	
ATC AGT ATT TCA TTC CTG GGA CTG ATA ACT ATC GAT CGC TAC CAG	597
Ile Ser Ile Ser Phe Leu Gly Leu Ile Thr Ile Asp Arg Tyr Gln	
110 115 120	
AAG ACC ACC AGG CCA TTT AAA ACA TCC AAC CCC AAA AAT CTC TTG	642
Lys Thr Thr Arg Pro Phe Lys Thr Ser Asn Pro Lys Asn Leu Leu	
125 130 135	
GGG GCT AAG ATT CTC TCT GTT GTC ATC TGG GCA TTC ATG TTC TTA	687
Gly Ala Lys Ile Leu Ser Val Val Ile Trp Ala Phe Met Phe Leu	
140 145 150	
CTC TCT TTG CCT AAC ATG ATT CTG ACC AAC AGG CAG CCG AGA GAC	732
Leu Ser Leu Pro Asn Met Ile Leu Thr Asn Arg Gln Pro Arg Asp	
155 160 165	
AAG AAT GTG AAG AAA TGC TCT TTC CTT AAA TCA GAG TTC GGT CTA	777
Lys Asn Val Lys Lys Cys Ser Phe Leu Lys Ser Glu Phe Gly Leu	
170 175 180	
GTC TGG CAT GAA ATA GTA AAT TAC ATC TGT CAA GTC ATT TTC TGG	822
Val Trp His Glu Ile Val Asn Tyr Ile Cys Gln Val Ile Phe Trp	
185 190 195	
ATT AAT TTC TTA ATT GTT ATT GTA TGT TAT ACA CTC ATT ACA AAA	867

Ile Asn Phe Leu Ile Val Ile Val Cys Tyr Thr Leu Ile Thr Lys 200 205 210	
GAA CTG TAC CGG TCA TAC GTA AGA ACG AGG GGT GTA GGT AAA GTC Glu Leu Tyr Arg Ser Tyr Val Arg Thr Arg Gly Val Gly Lys Val 215 220 225	912
CCC AGG AAA AAG GTG AAC GTC AAA GTT TTC ATT ATC ATT GCT GTA Pro Arg Lys Lys Val Asn Val Lys Val Phe Ile Ile Ile Ala Val 230 235 240	957
TTC TTT ATT TGT TTT GTT CCT TTC CAT TTT GCC CGA ATT CCT TAC Phe Phe Ile Cys Phe Val Pro Phe His Phe Ala Arg Ile Pro Tyr 245 250 255	1002
ACC CTG AGC CAA ACC CGG GAT GTC TTT GAC TGC ACT GCT GAA AAT Thr Leu Ser Gln Thr Arg Asp Val Phe Asp Cys Thr Ala Glu Asn 260 265 270	1047
ACT CTG TTC TAT GTG AAA GAG AGC ACT CTG TGG TTA ACT TCC TTA Thr Leu Phe Tyr Val Lys Glu Ser Thr Leu Trp Leu Thr Ser Leu 275 280 285	1092
AAT GCA TGC CTG GAT CCG TTC ATC TAT TTT TTC CTT TGC AAG TCC Asn Ala Cys Leu Asp Pro Phe Ile Tyr Phe Phe Leu Cys Lys Ser 290 295 300	1137
TTC AGA AAT TCC TTG ATA AGT ATG CTG AAG TGC CCC AAT TCT GCA Phe Arg Asn Ser Leu Ile Ser Met Leu Lys Cys Pro Asn Ser Ala 305 310 315	1182
ACA TCT CTG TCC CAG GAC AAT AGG AAA AAA GAA CAG GAT GGT GGT Thr Ser Leu Ser Gln Asp Asn Arg Lys Lys Glu Gln Asp Gly Gly 320 325 330	1227
GAC CCA AAT GAA GAG ACT CCA ATG TAA ACAAATTAAC TAAGGAAATA Asp Pro Asn Glu Glu Thr Pro Met 335 340	1274
TTTCAATCTC TTTGTGTTC GAACCTCGTTA AAGCAAAGCG CTAAGTAAAA ATATTAAGT	1334
ACGAAGAAGC AACTAAGTTA ATAATAATGA CTCTAAAGAA ACAGAAGATT ACAAAGCAA	1394
TTTTCATTTA CCTTTCCAGT ATGAAAAGCT ATCTTAAAAT ATAGAAAAGT AATCTAAAAGT	1454
GTAGCTGTAT TAGCAGCAAA ACAAACGACA TCCAATTGTC ATGCTGCATG CAAAAGTACA	1514
CAGAATTCAT GTTTTGGCAG AGTTTTGGCA AAATGAGTAA TCATATAATA TTTACTGTAA	1574
TTTTTAAAAT ACATTATCGT TCACAATTTT ATTTTTTCAT AATCAACTAA GGAAGAACGA	1634
TCAATTGGAT ATAATCTTCT TACCAAAAAT GATAGTTAAA ATGTATATAT ATCCTAGTCC	1694
CCTAACCAAA TCCTGACCTA TTGGGATACT TATAAAAATT TAAGTAAGTG GGATACACAA	1754
AGAATAATAA CTATTAAGTT TTCATTATTA GCCAAAAACC TAAGGGATTT AAATAATTG	1814
AAACTGTATT TGATTGGACT TAATTTTTTA TGTTTATTTA GAAGATAAAG ATTTATAGAA	1874

```

GACCTTTACA ATAAAGAGAA GAAATATCGA AGTCATTAAA ATAAGGAGAC TTACTTTTAT 1934
GACATTCTAA TACTAAAAAA TATAGAAATA TTTCCTTAAT TCTAGAGAAA CTAGTTTAC 1994
TAATTTTTTA CAACTTCAAT AATACCATCA CTGACACTTA CCTTTATTAA TTAGCTTCTA 2054
GAAAATAGCT GCTAATTAGG TTAATGAACA TTTTACCTTA GTGAAAAAAA ATTAATTAAA 2114
TATGATTACA AAGTTGCACA GCATAACTAC TGAGAGGAAA GTGATTGATC TGTTTGTAAT 2174
TACTTGTTTG TATTGGTGTG TATAAAATAC AANATTTACA TTAAACTCTA AATCATTAAA 2234
AAAAAAAAAA AAAAAA 2249

```

(2) Information für SEQ ID NO: 2:

- (A) Länge: 342 Aminosäuren
- (B) Typ: Aminosäure
- (C) Strangform:
- (D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: Protein

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 2:

```

Met Gln Ala Val Asp Asn Leu Thr Ser Ala Pro Gly Asn Thr Ser
      5                      10                      15
Leu Cys Thr Arg Asp Tyr Lys Ile Thr Gln Val Leu Phe Pro Leu
      20                      25                      30
Leu Tyr Thr Val Leu Phe Phe Val Gly Leu Ile Thr Asn Gly Leu
      35                      40                      45
Ala Met Arg Ile Phe Phe Gln Ile Arg Ser Lys Ser Asn Phe Ile
      50                      55                      60
Ile Phe Leu Lys Asn Thr Val Ile Ser Asp Leu Leu Met Ile Leu
      65                      70                      75
Thr Phe Pro Phe Lys Ile Leu Ser Asp Ala Lys Leu Gly Thr Gly
      80                      85                      90
Pro Leu Arg Thr Phe Val Cys Gln Val Thr Ser Val Ile Phe Tyr
      95                      100                     105
Phe Thr Met Tyr Ile Ser Ile Ser Phe Leu Gly Leu Ile Thr Ile
      110                     115                     120
Asp Arg Tyr Gln Lys Thr Thr Arg Pro Phe Lys Thr Ser Asn Pro
      125                     130                     135
Lys Asn Leu Leu Gly Ala Lys Ile Leu Ser Val Val Ile Trp Ala
      140                     145                     150
Phe Met Phe Leu Leu Ser Leu Pro Asn Met Ile Leu Thr Asn Arg
      155                     160                     165
Gln Pro Arg Asp Lys Asn Val Lys Lys Cys Ser Phe Leu Lys Ser
      170                     175                     180
Glu Phe Gly Leu Val Trp His Glu Ile Val Asn Tyr Ile Cys Gln
      185                     190                     195
Val Ile Phe Trp Ile Asn Phe Leu Ile Val Ile Val Cys Tyr Thr
      200                     205                     210
Leu Ile Thr Lys Glu Leu Tyr Arg Ser Tyr Val Arg Thr Arg Gly
      215                     220                     225

```

Val	Gly	Lys	Val	Pro	Arg	Lys	Lys	Val	Asn	Val	Lys	Val	Phe	Ile
				230					235					240
Ile	Ile	Ala	Val	Phe	Phe	Ile	Cys	Phe	Val	Pro	Phe	His	Phe	Ala
				245					250					255
Arg	Ile	Pro	Tyr	Thr	Leu	Ser	Gln	Thr	Arg	Asp	Val	Phe	Asp	Cys
				260					265					270
Thr	Ala	Glu	Asn	Thr	Leu	Phe	Tyr	Val	Lys	Glu	Ser	Thr	Leu	Trp
				275					280					285
Leu	Thr	Ser	Leu	Asn	Ala	Cys	Leu	Asp	Pro	Phe	Ile	Tyr	Phe	Phe
				290					295					300
Leu	Cys	Lys	Ser	Phe	Arg	Asn	Ser	Leu	Ile	Ser	Met	Leu	Lys	Cys
				305					310					315
Pro	Asn	Ser	Ala	Thr	Ser	Leu	Ser	Gln	Asp	Asn	Arg	Lys	Lys	Glu
				320					325					330
Gln	Asp	Gly	Gly	Asp	Pro	Asn	Glu	Glu	Thr	Pro	Met			
				335					340					

(2) Informationen fg SEQ ID NO: 3:

- (i) Sequenzmerkmale:
- (A) Länge: 1737 Basenpaare
 - (B) Typ: Nucleinsäure
 - (C) Strangform: Einzelstrang
 - (D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: cDNA

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 3:

G	GCA	CGA	GCC	CAC	CCT	GCG	TCG	GGC	CTC	AGT	CAG	CCC	CCG	GGG	43
	Ala	Arg	Ala	His	Pro	Ala	Ser	Gly	Leu	Ser	Gln	Pro	Pro	Gly	
		-15					-10					-5			
GAG	GCC	ATG	AAC	GCC	ACG	GGG	ACC	CCG	GTG	GCC	CCC	GAG	TCC	TGC	88
	Glu	Ala	Met	Asn	Ala	Thr	Gly	Thr	Pro	Val	Ala	Pro	Glu	Ser	Cys
		1				5					10				
CAA	CAG	CTG	GCG	GCC	GGC	GGG	CAC	AGC	CGG	CTC	ATT	GTT	CTG	CAC	133
	Gln	Gln	Leu	Ala	Ala	Gly	Gly	His	Ser	Arg	Leu	Ile	Val	Leu	His
		15				20					25				
TAC	AAC	CAC	TCG	GGC	CGG	CTG	GCC	GGG	CGC	GGG	GGG	CCG	GAG	GAT	178
	Tyr	Asn	His	Ser	Gly	Arg	Leu	Ala	Gly	Arg	Gly	Gly	Pro	Glu	Asp
		30				35					40				
GGC	GGC	CTG	GGG	GCC	CTG	CGG	GGG	CTG	TCG	GTG	GCC	GCC	AGC	TGC	223
	Gly	Gly	Leu	Gly	Ala	Leu	Arg	Gly	Leu	Ser	Val	Ala	Ala	Ser	Cys
		45				50					55				
CTG	GTG	GTG	CTG	GAG	AAC	TTG	CTG	GTG	CTG	GCG	GCC	ATC	ACC	AGC	268
	Leu	Val	Val	Leu	Glu	Asn	Leu	Leu	Val	Leu	Ala	Ala	Ile	Thr	Ser
		60				65					70				
CAC	ATG	CGG	TCG	CAA	CGC	TGG	GTC	TAC	TAT	TGC	CTG	GTG	AAC	ATT	313
	His	Met	Arg	Ser	Gln	Arg	Trp	Val	Tyr	Tyr	Cys	Leu	Val	Asn	Ile
		75				80					85				

DE 698 38 254 T2 2008.05.08

ACG ATG AGT GAC CTG CTC ACG GGC GCG GCC TAC CTG GCC AAC GTG	358
Thr Met Ser Asp Leu Leu Thr Gly Ala Ala Tyr Leu Ala Asn Val	
90 95 100	
CTG CTG TCG GGG GCC CGC ACC TTC CGT CTG GCG CCC GCC CAG TGG	403
Leu Leu Ser Gly Ala Arg Thr Phe Arg Leu Ala Pro Ala Gln Trp	
105 110 115	
TTC CTA CGG AAG GGC CTG CTC TTC ACC GCC CTG GCC GCC TCC ACC	448
Phe Leu Arg Lys Gly Leu Leu Phe Thr Ala Leu Ala Ala Ser Thr	
120 125 130	
TTC AGC CTG CTC TTC ACT GCA GGG TTG CGC TTT GCC ACC ATG GTG	493
Phe Ser Leu Leu Phe Thr Ala Gly Leu Arg Phe Ala Thr Met Val	
135 140 145	
CGG CCG GTG GCC GAG AGC GGG GCC ACC AAG ACC AGC CGC GTC TAC	538
Arg Pro Val Ala Glu Ser Gly Ala Thr Lys Thr Ser Arg Val Tyr	
150 155 160	
GGC TTC ATC GGC CTC TGC TGG CTG CTG GCC GCG CTG CTG GGG ATG	583
Gly Phe Ile Gly Leu Cys Trp Leu Leu Ala Ala Leu Leu Gly Met	
165 170 175	
CTG CCT TTG CTG GGC TGG AAC TGC CTG TGC GCC TTT GAC CGC TGC	628
Leu Pro Leu Leu Gly Trp Asn Cys Leu Cys Ala Phe Asn Arg Cys	
180 185 190	
TCC AGC CTT CTG CCC CTC TAC TCC AAG CGC TAC ATC CTC TTC TGC	673
Ser Ser Leu Leu Pro Leu Tyr Ser Arg Arg Thr Ile Leu Phe Cys	
195 200 205	
CTG GTG ATC TTC GCC GGC GTC CTG GCC ACC ATC ATG GGC CTC TAT	718
Leu Val Ile Phe Ala Gly Val Leu Ala Thr Ile Met Gly Leu Tyr	
210 215 220	
GGG GCC ATC TTC CGC CTG GTG CAG GCC AGC GGG CAG AAG GCC CCA	763
Gly Ala Ile Phe Arg Leu Val Gln Ala Ser Gly Gln Lys Ala Pro	
225 230 235	
CGC CCA GCG GCC CGC CGC AAG GCC CGC CGC CTG CTG AAG ACG GTG	808
Arg Pro Ala Ala Arg Arg Lys Ala Arg Arg Leu Leu Lys Thr Val	
240 245 250	
CTG ATG ATC CTG CTG GCC TCC TAG GTGTGCTGGG GACCACTCTT CGGGCTGCTG	862
Leu Met Ile Leu Leu Ala Ser	
255 260	
CTGGCCGACG TCTTTGGCTC CAACCTCTGG GCCCAGGAGT ACCTGCGGGG CATGGACTGG	922
ATCCTGGCCC TGGCCGTCCT CAACTCGGCG GTCAACCCCA TCATCTACTC CTTCGCAGC	982
AGGGAGGTGT GCAGAGCCGT GCTCAGCTTC CTCTGCTGCG GGTGTCTCCG GCTGGGCATG	1042
CGAGGGCCCG GGGACTGCCT GGCCCCGGCC GTCGAGGCTC ACTCCGGAGC TTCCACCACC	1102

GACAGCTCTC TGAGGCCAAG GGACAGCTTT CGCGGCTCCC GCTCGCTCAG CTTTCGGATG 1162
 CGGGAGCCCC TGTCCAGCAT CTCCAGCGTG CGGAGCATCT GAAGTTGCAG TCTTGCCTGT 1222
 GGATGGTGCA ACCACCGGGT GCGTGCCAGG CAGGCCCTCC TGGGGTACAG GAAGCTGTGT 1282
 GCACGCAACC TCGCCCTGTA TGGGGAGCAG GGAACGGGAC AGGCCCCCAT GGACTTGCCC 1342
 GGTGGCCTCT CGGGGCTTCT GACGCCATAT GGACTTGCCC ATTGCCTATG GCTCACCTG 1402
 GACAAGGAGG CAACCACCCC ACCTCCCCGT AGGAGCAGAG AGCACCTGG TGTGGGGGCG 1462
 AGTGGGTTCC CCACAACCCC GCTTCTGTGT GATTCTGGGG AAGTCCCGGC CCCTCTCTGG 1522
 GCCTCAGTAG GGCTCCAGG CTGCAAGGGG TGGACTGTGG GATGCATGCC CTGGCAACAT 1582
 TGAAGTTCGA TCATGGTAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAA 1637

(2) Information für SEQ ID NO: 4:

- (A) Länge: 276 Aminosäuren
- (B) Typ: Aminosäure
- (C) Strangform:
- (D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: Protein

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 4:

Ala	Arg	Ala	His	Pro	Ala	Ser	Gly	Leu	Ser	Gln	Pro	Pro	Gly	Glu
	-15					-10					-5			
Ala	Met	Asn	Ala	Thr	Gly	Thr	Pro	Val	Ala	Pro	Glu	Ser	Cys	Gln
	1				5					10				
Gln	Leu	Ala	Ala	Gly	Gly	His	Ser	Arg	Leu	Ile	Val	Leu	His	Tyr
	15				20					25				
Asn	His	Ser	Gly	Arg	Leu	Ala	Gly	Arg	Gly	Gly	Pro	Glu	Asp	Gly
	30				35					40				
Gly	Leu	Gly	Ala	Leu	Arg	Gly	Leu	Ser	Val	Ala	Ala	Ser	Cys	Leu
	45				50					55				
Val	Val	Leu	Glu	Asn	Leu	Leu	Val	Leu	Ala	Ala	Ile	Thr	Ser	His
	60				65					70				
Met	Arg	Ser	Gln	Arg	Trp	Val	Tyr	Tyr	Cys	Leu	Val	Asn	Ile	Thr
	75				80					85				
Met	Ser	Asp	Leu	Leu	Thr	Gly	Ala	Ala	Tyr	Leu	Ala	Asn	Val	Leu
	90				95					100				
Leu	Ser	Gly	Ala	Arg	Thr	Phe	Arg	Leu	Ala	Pro	Ala	Gln	Trp	Phe
	105				110					115				
Leu	Arg	Lys	Gly	Leu	Leu	Phe	Thr	Ala	Leu	Ala	Ala	Ser	Thr	Phe
	120				125					130				
Ser	Leu	Leu	Phe	Thr	Ala	Gly	Leu	Arg	Phe	Ala	Thr	Met	Val	Arg
	135				140					145				
Pro	Val	Ala	Glu	Ser	Gly	Ala	Thr	Lys	Thr	Ser	Arg	Val	Tyr	Gly
	150				155					160				
Phe	Ile	Gly	Leu	Cys	Trp	Leu	Leu	Ala	Ala	Leu	Leu	Gly	Met	Leu
	165				170					175				
Pro	Leu	Leu	Gly	Trp	Asn	Cys	Leu	Cys	Ala	Phe	Asn	Arg	Cys	Ser

180		185		190										
Ser	Leu	Leu	Pro	Leu	Tyr	Ser	Arg	Arg	Thr	Ile	Leu	Phe	Cys	Leu
195		200		205										
Val	Ile	Phe	Ala	Gly	Val	Leu	Ala	Thr	Ile	Met	Gly	Leu	Tyr	Gly
210		215		220										
Ala	Ile	Phe	Arg	Leu	Val	Gln	Ala	Ser	Gly	Gln	Lys	Ala	Pro	Arg
225		230		235										
Pro	Ala	Ala	Arg	Arg	Lys	Ala	Arg	Arg	Leu	Leu	Lys	Thr	Val	Leu
240		245		250										
Met	Ile	Leu	Leu	Ala	Ser									
255		260												

(2) Informationen fg SEQ ID NO: 5:

- (i) Sequenzmerkmale:
 - (A) Länge: 28 Basenpaare
 - (B) Typ: Nucleinsäure
 - (C) Strangform: Einzelstrang
 - (D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: Oligonucleotid

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 5:

CCGAGGATCC ATGCAAGCCG TCGACAAT

28

(2) Informationen fg SEQ ID NO: 6:

- (i) Sequenzmerkmale:
 - (A) Länge: 28 Basenpaare
 - (B) Typ: Nucleinsäure
 - (C) Strangform: Einzelstrang
 - (D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: Oligonucleotid

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 6:

CCGAGGATCC TTACATTGGA GTCTCTTC

28

(2) Informationen fg SEQ ID NO: 7:

- (i) Sequenzmerkmale:
 - (A) Länge: 34 Basenpaare
 - (B) Typ: Nucleinsäure
 - (C) Strangform: Einzelstrang
 - (D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: Oligonucleotid

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 7:

CCGAGGATCC GCCATCATGC AAGCCGTCGA CAAT

34

(2) Informationen fg SEQ ID NO: 8:

- (i) Sequenzmerkmale:
 (A) Länge: 28 Basenpaare
 (B) Typ: Nucleinsäure
 (C) Strangform: Einzelstrang
 (D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: Oligonucleotid

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 8:

CCGAGGATCC TTACATTGGA GTCTCTTC

28

(2) Informationen fg SEQ ID NO: 9:

- (i) Sequenzmerkmale:
 (A) Länge: 34 Basenpaare
 (B) Typ: Nucleinsäure
 (C) Strangform: Einzelstrang
 (D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: Oligonucleotid

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 9:

CCGAGGATCC GCCATCATGC AAGCCGTCGA CAAT

34

(2) Informationen fg SEQ ID NO: 10:

- (i) Sequenzmerkmale:
 (A) Länge: 55 Basenpaare
 (B) Typ: Nucleinsäure
 (C) Strangform: Einzelstrang
 (D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: Oligonucleotid

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 10:

CCGATCTAGA TTAATCCCAT ACGACGTCCC AGACTACGCT CATTGGAGTC TCTTC

55

(2) Informationen fg SEQ ID NO: 11:

- (i) Sequenzmerkmale:
 (A) Länge: 28 Basenpaare
 (B) Typ: Nucleinsäure
 (C) Strangform: Einzelstrang
 (D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: Oligonucleotid

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 11:

CCGAGGATCC ATGAACGCCA CGGGGACC

28

(2) Informationen fg SEQ ID NO: 12:

- (i) Sequenzmerkmale:
 (A) Länge: 28 Basenpaare
 (B) Typ: Nucleinsäure
 (C) Strangform: Einzelstrang
 (D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: Oligonucleotid

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 12:

CCGAGGATCC TCAGATGCTC CGCACGCT

28

(2) Informationen fg SEQ ID NO: 13:

- (i) Sequenzmerkmale:
 (A) Länge: 34 Basenpaare
 (B) Typ: Nucleinsäure
 (C) Strangform: Einzelstrang
 (D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: Oligonucleotid

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 13:

CCGAGGATCC GCCATCATGA ACGCCACGGG GACC

34

(2) Informationen fg SEQ ID NO: 14:

- (i) Sequenzmerkmale:
 (A) Länge: 28 Basenpaare
 (B) Typ: Nucleinsäure
 (C) Strangform: Einzelstrang
 (D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: Oligonucleotid

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 14:

CCGAGGATCC TCAGATGCTC CGCACGCT

28

(2) Informationen fg SEQ ID NO: 15:

- (i) Sequenzmerkmale:
 (A) Länge: 34 Basenpaare
 (B) Typ: Nucleinsäure
 (C) Strangform: Einzelstrang
 (D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: Oligonucleotid

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 15:

CCGAGGATCC GCCATCATGA ACGCCACGGG GACC

34

(2) Informationen fg SEQ ID NO: 16:

- (i) Sequenzmerkmale:
 - (A) Länge: 55 Basenpaare
 - (B) Typ: Nucleinsäure
 - (C) Strangform: Einzelstrang
 - (D) Topologie: linear
- (ii) Molekültyp: Oligonucleotid

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 16:

CCGATCTAGA TCAATCCCAT ACGACGTCCC AGACTACGCT GATGCTCCGC ACGCT

55

(2) Informationen fg SEQ ID NO: 17:

- (i) Sequenzmerkmale:
 - (A) Länge: 348 Aminosäuren
 - (B) Typ: Aminosäure
 - (C) Strangform:
 - (D) Topologie: linear
- (ii) Molekültyp: Protein

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 17:

Ile	Gln	Met	Ala	Asn	Asn	Phe	Thr	Pro	Pro	Ser	Ala	Thr	Pro	Gln
				5					10					15
Asn	Asp	Cys	Asp	Leu	Tyr	Ala	His	His	Ser	Thr	Ala	Arg	Ile	Val
				20					25					30
Met	Pro	Leu	His	Tyr	Ser	Leu	Val	Phe	Ile	Ile	Gly	Leu	Val	Gly
				35					40					45
Asn	Leu	Leu	Ala	Leu	Val	Val	Ile	Val	Gln	Asn	Arg	Lys	Lys	Ile
				50					55					60
Asn	Ser	Thr	Thr	Leu	Tyr	Ser	Thr	Asn	Leu	Val	Ile	Ser	Asp	Ile
				65					70					75
Leu	Phe	Thr	Thr	Ala	Leu	Pro	Thr	Arg	Ile	Ala	Tyr	Tyr	Ala	Met
				80					85					90
Gly	Phe	Asp	Trp	Arg	Ile	Gly	Asp	Ala	Leu	Cys	Arg	Ile	Thr	Ala
				95					100					105
Leu	Val	Phe	Tyr	Ile	Asn	Thr	Tyr	Ala	Gly	Val	Asn	Phe	Met	Thr
				110					115					120
Cys	Leu	Ser	Ile	Asp	Arg	Phe	Ile	Ala	Val	Val	His	Pro	Leu	Arg
				125					130					135
Tyr	Asn	Lys	Ile	Lys	Arg	Ile	Glu	His	Ala	Lys	Gly	Val	Cys	Ile
				140					145					150
Phe	Val	Trp	Ile	Leu	Val	Phe	Ala	Gln	Thr	Leu	Pro	Leu	Leu	Ile
				155					160					165
Asn	Pro	Met	Ser	Lys	Gln	Glu	Ala	Glu	Arg	Ile	Thr	Cys	Met	Glu
				170					175					180
Tyr	Pro	Asn	Phe	Glu	Glu	Thr	Lys	Ser	Leu	Pro	Trp	Ile	Leu	Leu
				185					190					195
Gly	Ala	Cys	Phe	Ile	Gly	Tyr	Val	Leu	Pro	Leu	Ile	Ile	Ile	Lys

	200		205		210
Ile Cys Tyr Ser Gln	Ile Cys Cys Lys	Leu Phe Arg Thr Ala	Lys		
	215		220		225
Gln Asn Pro Leu Thr	Glu Lys Ser Gly	Val Asn Lys Lys Ala	Leu		
	230		235		240
Asn Thr Ile Ile Leu	Ile Ile Val Val	Phe Val Leu Cys Phe	Thr		
	245		250		255
Pro Tyr His Val Ala	Ile Ile Gln His	Met Ile Lys Lys Leu	Arg		
	260		265		270
Phe Ser Asn Phe Leu	Glu Cys Ser Gln	Arg His Ser Phe Gln	Ile		
	275		280		285
Ser Leu His Phe Thr	Val Cys Leu Met	Asn Phe Asn Cys Cys	Met		
	290		295		300
Asp Pro Phe Ile Tyr	Phe Phe Ala Cys	Lys Gly Tyr Lys Arg	Lys		
	305		310		315
Val Met Arg Met Leu	Lys Arg Gln Val	Ser Val Ser Ile Ser	Ser		
	320		325		330
Ala Val Lys Ser Ala	Pro Glu Glu Asn	Ser Arg Glu Met Thr	Glu		
	335		340		345
Thr Gln Met					

(2) Informationen fg SEQ ID NO: 18:

- (i) Sequenzmerkmale:
- (A) Lnge: 381 Aminosuren
 - (B) Typ: Aminosure
 - (C) Strangform:
 - (D) Topologie: linear

- (ii) Molekültyp: Protein

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 18:

Met Gly Pro Thr Ser	Val Pro Leu Val Lys	Ala His Arg Ser Ser		
	5	10		15
Val Ser Asp Tyr Val	Asn Tyr Asp Ile Ile	Val Arg His Tyr Asn		
	20	25		30
Tyr Thr Gly Lys Leu	Asn Ile Ser Ala Asp	Lys Glu Asn Ser Ile		
	35	40		45
Lys Leu Thr Ser Val	Val Phe Ile Leu Ile	Cys Cys Phe Ile Ile		
	50	55		60
Leu Glu Asn Ile Phe	Val Leu Leu Thr Ile	Trp Lys Thr Lys Lys		
	65	70		75
Phe His Arg Pro Met	Tyr Tyr Phe Ile Gly	Asn Leu Ala Leu Ser		
	80	85		90
Asp Leu Leu Ala Gly	Val Ala Tyr Thr Ala	Asn Leu Leu Leu Ser		
	95	100		105
Gly Ala Thr Thr Tyr	Lys Leu Thr Pro Ala	Gln Trp Phe Leu Arg		
	110	115		120
Glu Gly Ser Met Phe	Val Ala Leu Ser Ala	Ser Val Phe Ser Leu		
	125	130		135
Leu Ala Ile Ala Ile	Glu Arg Tyr Ile Thr	Met Leu Lys Met Lys		
	140	145		150
Leu His Asn Gly Ser	Asn Asn Phe Arg Leu	Phe Leu Leu Ile Ser		
	155	160		165
Ala Cys Trp Val Ile	Ser Leu Ile Leu Gly	Gly Leu Pro Ile Met		
	170	175		180

Gly	Trp	Asn	Cys	Ile	Ser	Ala	Leu	Ser	Ser	Cys	Ser	Thr	Val	Leu	185	190	195
Pro	Leu	Tyr	His	Lys	His	Tyr	Ile	Leu	Phe	Cys	Thr	Thr	Val	Phe	200	205	210
Thr	Leu	Leu	Leu	Leu	Ser	Ile	Val	Ile	Leu	Tyr	Cys	Arg	Ile	Tyr	215	220	225
Ser	Leu	Val	Arg	Thr	Arg	Ser	Arg	Arg	Leu	Thr	Phe	Arg	Lys	Asn	230	235	240
Ile	Ser	Lys	Ala	Ser	Arg	Ser	Ser	Glu	Asn	Val	Ala	Leu	Leu	Lys	245	250	255
Thr	Val	Ile	Ile	Val	Leu	Ser	Val	Phe	Ile	Ala	Cys	Trp	Ala	Pro	260	265	270
Leu	Phe	Ile	Leu	Leu	Leu	Leu	Asp	Val	Gly	Cys	Lys	Val	Lys	Thr	275	280	285
Cys	Asp	Ile	Leu	Phe	Arg	Ala	Glu	Tyr	Phe	Leu	Val	Leu	Ala	Val	290	295	300
Leu	Asn	Ser	Gly	Thr	Asn	Pro	Ile	Ile	Tyr	Thr	Leu	Thr	Asn	Lys	305	310	315
Glu	Met	Arg	Arg	Ala	Phe	Ile	Arg	Ile	Met	Ser	Cys	Cys	Lys	Cys	320	325	330
Pro	Ser	Gly	Asp	Ser	Ala	Gly	Lys	Phe	Lys	Arg	Pro	Ile	Ile	Ala	335	340	345
Gly	Met	Glu	Phe	Ser	Arg	Ser	Lys	Ser	Asp	Asn	Ser	Ser	His	Pro	350	355	360
Gln	Lys	Asp	Glu	Gly	Asp	Asn	Pro	Glu	Thr	Ile	met	Ser	Ser	Gly	365	370	375
Asn	Val	Asn	Ser	Ser	Ser												

Patentansprüche

1. Polynucleotid ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus:

- (a) Polynucleotiden, die ein Polypeptid codieren, das die Aminosäuresequenz umfasst, die von der in ATCC-Hinterlegungs-nr. 209003 enthaltenen cDNA codiert wird;
- (b) Polynucleotiden, die die codierende Sequenz der in ATCC-Hinterlegungs-nr. 209003 enthaltenen cDNA umfassen;

- (c) Polynucleotiden, die zu mindestens 90% mit einem wie unter einem der Punkte (a) bis (b) definierten Polynucleotid identisch sind und ein Polypeptid codieren, das G-Protein-gekoppelte Rezeptoraktivität aufweist;
- (d) Polynucleotiden, die zu mindestens 95% mit einem wie unter einem der Punkte (a) bis (b) definierten Polynucleotid identisch sind und ein Polypeptid codieren, das G-Protein-gekoppelte Rezeptoraktivität aufweist; und
- (e) Polynucleotiden, umfassend eine Nucleotidsequenz, die ein Fragment eines Polypeptids codiert, das von einem Polynucleotid gemäß einem der Punkte (a) bis (d) codiert wird, wobei das Fragment G-Protein-gekoppelte Rezeptoraktivität aufweist;

oder der komplementäre Strang eines solchen Polynucleotids;

mit der Maßgabe, dass das Polynucleotid nicht die folgende Nucleotidsequenz umfasst:

```
gcaagatgga cgcgggattt ttccgcgga caagtgcaga acaggataat cggttcagca acaaacagaa gaaactactg aagcagctga
aattcgcaga atgcctagaa aaaaaggtgg acatgagcaa agtaaatttg gaggtataa agccttgat aacaaaaaga gtaacgggat
gtctttgact gactgctga aaataactctg ttctatgtga aagagagcac tctgtggtta acttcctaa atgcatgcct gg.
```

2. Polynucleotid ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus:

- (a) Polynucleotiden, die ein Polypeptid codieren, das die Aminosäuren 1 bis 342 der SEQ ID NO: 2 umfasst;
- (b) Polynucleotiden, die ein Polypeptid codieren, das die Aminosäuren 2 bis 342 der SEQ ID NO: 2 umfasst;
- (c) Polynucleotiden, die zu mindestens 90% mit einem wie unter einem der Punkte (a) bis (b) definierten Polynucleotid identisch sind und ein Polypeptid codieren, das G-Protein-gekoppelte Rezeptoraktivität aufweist;
- (d) Polynucleotiden, die zu mindestens 95% mit einem wie unter einem der Punkte (a) bis (b) definierten Polynucleotid identisch sind und ein Polypeptid codieren, das G-Protein-gekoppelte Rezeptoraktivität aufweist; und

(e) Polynucleotiden, umfassend eine Nucleotidsequenz, die ein Fragment eines Polypeptids codiert, das von einem Polynucleotid gemäß einem der Punkte (a) bis (d) codiert wird, wobei das Fragment G-Protein-gekoppelte Rezeptoraktivität aufweist;

oder der komplementäre Strang eines solchen Polynucleotids; mit der Maßgabe, dass das Polynucleotid nicht die folgende Nucleotidsequenz umfasst:

```
gcaagatgga cgcgggatt ttccgcgga caagtgcaga acaggataat cggttcagca acaaacagaa gaaactactg aagcagctga
aattgcaga atgcctagaa aaaaagggtg acatgagcaa agtaaattg gaggtataa agccttgat aacaaaaaga gtaacgggat
gtcttgact gcaactgctga aaatactctg ttctatgtga aagagagcac tctgtggtta acttcctaa atgcatcct gg.
```

3. Polynucleotid nach Anspruch 1 oder 2, wobei das Polynucleotid DNA ist.
4. Polynucleotid nach Anspruch 1 oder 2, wobei das Polynucleotid RNA ist.
5. Verfahren zur Herstellung eines Vektors, umfassend das Insertieren des Polynucleotids nach einem der Ansprüche 1 bis 3 in einen Vektor.
6. Vektor, der das Polynucleotid nach einem der Ansprüche 1 bis 4 umfasst.
7. Rekombinante Wirtszelle, die das Polynucleotid nach einem der Ansprüche 1 bis 4 oder den Vektor nach Anspruch 6 umfasst.
8. Verfahren zur Herstellung eines G-Protein-gekoppelte Rezeptoraktivität aufweisenden Polypeptids, umfassend die Expression des vom Polynucleotid codierten Polypeptids aus der rekombinanten Wirtszelle nach Anspruch 7.
9. Polypeptid, das von dem Polynucleotid nach einem der Ansprüche 1 bis 4 codiert wird oder mit Hilfe des Verfahrens nach Anspruch 8 erhältlich ist.
10. Antikörper gegen das Polypeptid nach Anspruch 9.
11. Antagonist gegen das Polypeptid nach Anspruch 9, umfassend den Antikörper nach Anspruch 10, ein Antisense-Konstrukt, das spezifisch mit dem Polynucleotid nach einem der Ansprüche 1 bis 4 hybridisiert, oder eine lösliche Form des Polypeptids.
12. In-vitro-Verfahren für die Diagnose einer Krankheit oder einer Prädisposition für eine Krankheit, die mit einer Unterexpression des Polypeptids nach Anspruch 9 in Zusammenhang steht, umfassend das Bestimmen einer Mutation in einer das Polypeptid codierenden Nucleinsäuresequenz.
13. Arzneimittel, umfassend das Polynucleotid nach einem der Ansprüche 1 bis 4, das Polypeptid nach Anspruch 9, eine DNA, die das Polypeptid oder den Antagonisten nach Anspruch 11 codiert und zu deren Expression fähig ist, sowie gegebenenfalls einen pharmazeutisch verträglichen Träger.
14. Diagnostische Zusammensetzung, umfassend das Polynucleotid nach einem der Ansprüche 1 bis 4 oder den Antikörper nach Anspruch 10.
15. Verfahren zum Screenen von Antagonisten des Polypeptids nach Anspruch 9, umfassend:
 - (a) Expression des Polypeptids auf der Oberfläche einer Zelle;
 - (b) Inkontaktbringen der Zelle mit einem Liganden des Polypeptids und einer zu screenenden Verbindung; und
 - (c) Bestimmen, ob das vom Liganden erzeugte Signal durch die Verbindung gehemmt wird.
16. Verfahren zum Screenen von Agonisten des Polypeptids nach Anspruch 9, umfassend:
 - (a) Expression des Polypeptids auf der Oberfläche einer Zelle;
 - (b) Inkontaktbringen der Zelle mit einem Liganden des Polypeptids und einer zu screenenden Verbindung; und
 - (c) Bestimmen, ob die Verbindung ein Signal erzeugt.
17. Verfahren zum Bestimmen, ob ein Ligand, von dem nicht bekannt ist, ob er fähig ist, das Polypeptid nach Anspruch 9 zu binden, das Polypeptid binden kann, umfassend:
 - (a) Inkontaktbringen einer Säugerzelle, die das Polypeptid exprimiert, mit einem potenziellen Liganden;
 - (b) Nachweis des Vorhandenseins eines Liganden, der an das Polypeptid bindet; und

(c) Bestimmen, ob der Ligand an das Polypeptid nach Anspruch 9 bindet.

Es folgen 7 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

GCACGAGGAA CAGAACACTT TCTCATGTCC AGGGTCAGAT TACAAGAGCA CTCAAGACTT 60
TACTGACGAA AACTCAGGAA ATCCTCTATC ACAAAGAGGT TTGGCAACTA AACTAAGACA 120
TTAAAAGGAA AATACCAGAT GCCACTCTGC AGGCTGCAAT AACTACTACT TACTGGATAC 180
ATTCAAACCC TCCAGAATCA ACAGTTATCA GGTAACCAAC AAGAA ATG CAA GCC GTC 237
Met Gln Ala Val

GAC ATT CTC ACC TCT GCG CCT GGG AAC AAC AGT CTG TGC ACC AGA 282
Asp Asn Leu Thr Ser Ala Pro Gly Asn Thr Ser Leu Cys Thr Arg
5 10 15

GAC TAC AAA ATC ACC CAG GTC CTC TTC CCA CTG CTC TAC ACT GTC 327
Asp Tyr Lys Ile Thr Gln Val Leu Phe Pro Leu Leu Tyr Thr Val
20 25 30

CTG TTT TTT GTT GGA CTT ATC ACA AAT GGC CTG GCG ATG AGG ATT 372
Leu Phe Phe Val Gly Leu Ile Thr Asn Gly Leu Ala Met Arg Ile
35 40 45

TTC TTT CAA ATC CGG AGT AAA TCA AAC TTT ATT ATT TTT CTT AAG 417
Phe Phe Gln Ile Arg Ser Lys Ser Asn Phe Ile Ile Phe Leu Lys
50 55 60

AAC ACA GTC ATT TCT GAT CTT CTC ATG ATT CTG ACT TTT CCA TTC 462
Asn Thr Val Ile Ser Asp Leu Leu Met Ile Leu Thr Phe Pro Phe
65 70 75

AAA ATT CTT AGT GAT GCC AAA CTG GGA ACA GGA CCA CTG AGA ACT 507
Lys Ile Leu Ser Asp Ala Lys Leu Gly Thr Gly Pro Leu Arg Thr
80 85 90

TTT GTG TGT CAA GTT ACC TCC GTC ATA TTT TAT TTC ACA ATG TAT 552
Phe Val Cys Gln Val Thr Ser Val Ile Phe Tyr Phe Thr Met Tyr
95 100 105

ATC AGT ATT TCA TTC CTG GGA CTG ATA ACT ATC GAT CGC TAC CAG 597
Ile Ser Ile Ser Phe Leu Gly Leu Ile Thr Ile Asp Arg Tyr Gln
110 115 120

AAG ACC ACC AGG CCA TTT AAA ACA TCC AAC CCC AAA AAT CTC TTG 642
Lys Thr Thr Arg Pro Phe Lys Thr Ser Asn Pro Lys Asn Leu Leu
125 130 135

GGG GCT AAG ATT CTC TCT GTT GTC ATC TGG GCA TTC ATG TTC TTA 687
Gly Ala Lys Ile Leu Ser Val Val Ile Trp Ala Phe Met Phe Leu
140 145 150

CTC TCT TTG CCT AAC ATG ATT CTG ACC AAC AGG CAG CCG AGA GAC 732
Leu Ser Leu Pro Asn Met Ile Leu Thr Asn Arg Gln Pro Arg Asp
155 160 165

AAG AAT GTG AAG AAA TGC TCT TTC CTT AAA TCA GAG TTC GGT CTA 777
Lys Asn Val Lys Lys Cys Ser Phe Leu Lys Ser Glu Phe Gly Leu
170 175 180

FIG. 1A

GTC TGG CAT GAA ATA GTA AAT TAC ATC TGT CAA GTC ATT TTC TGG Val Trp His Glu Ile Val Asn Tyr Ile Cys Gln Val Ile Phe Trp 185 190 195	822
ATT AAT TTC TTA ATT GTT ATT GTA TGT TAT ACA CTC ATT ACA AAA Ile Asn Phe Leu Ile Val Ile Val Cys Tyr Thr Leu Ile Thr Lys 200 205 210	867
GAA CTG TAC CGG TCA TAC GTA AGA ACG AGG GGT GTA GGT AAA GTC Glu Leu Tyr Arg Ser Tyr Val Arg Thr Arg Gly Val Gly Lys Val 215 220 225	912
CCC AGG AAA AAG GTG AAC GTC AAA GTT TTC ATT ATC ATT GCT GTA Pro Arg Lys Lys Val Asn Val Lys Val Phe Ile Ile Ile Ala Val 230 235 240	957
TTC TTT ATT TGT TTT GTT CCT TTC CAT TTT GCC CGA ATT CCT TAC Phe Phe Ile Cys Phe Val Pro Phe His Phe Ala Arg Ile Pro Tyr 245 250 255	1002
ACC CTG AGC CAA ACC CGG GAT GTC TTT GAC TGC ACT GCT GAA AAT Thr Leu Ser Gln Thr Arg Asp Val Phe Asp Cys Thr Ala Glu Asn 260 265 270	1047
ACT CTG TTC TAT GTG AAA GAG AGC ACT CTG TGG TTA ACT TCC TTA Thr Leu Phe Tyr Val Lys Glu Ser Thr Leu Trp Leu Thr Ser Leu 275 280 285	1092
AAT GCA TGC CTG GAT CCG TTC ATC TAT TTT TTC CTT TGC AAG TCC Asn Ala Cys Leu Asp Pro Phe Ile Tyr Phe Phe Leu Cys Lys Ser 290 295 300	1137
TTC AGA AAT TCC TTG ATA AGT ATG CTG AAG TGC CCC AAT TCT GCA Phe Arg Asn Ser Leu Ile Ser Met Leu Lys Cys Pro Asn Ser Ala 305 310 315	1182
ACA TCT CTG TCC CAG GAC AAT AGG AAA AAA GAA CAG GAT GGT GGT Thr Ser Leu Ser Gln Asp Asn Arg Lys Lys Glu Gln Asp Gly Gly 320 325 330	1227
GAC CCA AAT GAA GAG ACT CCA ATG TAA ACAAATTAAC TAAGGAAATA Asp Pro Asn Glu Glu Thr Pro Met 335 340	1274
TTTCAATCTC TTTGTGTTCA GAÅCTCGTTA AAGCAAAGCG CTAAGTAAAA ATATTAACTG	1334
ACGAAGAAGC AACTAAGTTA ATAATAATGA CTCTAAAGAA ACAGAAGATT ACAAAAAGCAA	1394
TTTTCAATTTA CCTTTCCAGT ATGAAAAGCT ATCTTAAAAT ATAGAAAAC TAACTAAACT	1454
GTAGCTGTAT TAGCAGCAAA ACAAACGACA TCCAATTGTC ATGCTGCATG CAAAAC TACA	1514
CAGAATTCAT GTTTTGGCAG AGTTTTGGCA AAATGAGTAA TCATATAATA TTTACTGTAA	1574
TTTTTAAAAT ACATTATCGT TCACAATTTT ATTTTTTCAT AATCAACTAA GGAAGAACGA	1634
TCAATTGGAT ATAATCTTCT TACCAAAAAT GATAGTTAAA ATGTATATAT ATCCTAGTCC	1694

FIG. 1B

CCTAACCAAA TCCTGACCTA TTGGGATACT TATAAAAATT TAAGTAAGTG GGATACACAA 1754
AGAATAATAA CTATTAACCTT TTCATTATTA GCCAAAAACC TAAGGGATTT AAACCTAATTG 1814
AAACTGTATT TGATTGGACT TAATTTTTTA TGTTTATTTA GAAGATAAAG ATTTATAGAA 1874
GACCTTTACA ATAAAGAGAA GAAATATCGA AGTCATTAAG ATAAGGAGAC TTACTTTTAT 1934
GACATTCTAA TACTTAAAAA TATAGAAATA TTTCCCTAAT TCTAGAGAAA CTAGTTTTAC 1994
TAATTTTTTA CAACTTCAAT AATACCATCA CTGACACTTA CCTTTATTAA TTAGCTTCTA 2054
GAAAATAGCT GCTAATTAGG TTAATGAACA TTTTACCTTA GTGAAAAAAA ATTAATTAAA 2114
TATGATTACA AAGTTGCACA GCATAACTAC TGAGAGGAAA GTGATTGATC TGTTTGTAAT 2174
TACTTGTTTG TATTGGTGTG TATAAAATAC AAXATTTACA TTAAACTCTA AATCATTAAG 2234
AAAAAAAAAA AAAAAA 2249

FIG. 1C

1 MQAVDNLTSA...GNTSLCTRDKITQVLFPLLYTVLFFVGLITNGLA 46
:|.:|:|.:| |.:|:|:|.:|:|:|:| | |
3 IQMANNFTPPSATPQGNDCDLYAHHSTARIVMPLHYSLVFIIIGLVGNLLA 52

47 MRIFQIRSKSN.FIIFLKNTVISDLLMILTFPFKILSDAKLGTGPLRTF 95
: : : | | . | | . : : | | | | : : : | : | | . : : .
53 LVVIVQNRKKINSTTLYSTNLVISEDILFTTALPTRIAYYAMGFDWRIGDA 102

96 VCQVTSVIFYFTMYISISFLGLITIDRYQKTRPFKTSNPKNLLGAKILS 145
:|.:|:|:|:|:| | :.:|:|:|:|:|:| :.:|:|:|:|:|:| | :.: | | :.:
103 LCRITALVFYINTYAGVNFMTCLSIDRFIAVVHPLRYNKKIKRIEHAKGVC 152

146 VVIWAFMFLSLPNMI...LTNRQPRDKNVKCSFLKSEFGLVWHEIVNYI 193
: : : | : : | | | : | : : : : : : : : : : : | : : : : : : : : : :
153 IFVWILVFAQTLPLLINPMSKQEAERITCMEYPNFEETKSLPWILLGACF 202

194 CQVIFWINFLIVIVCYTLITKELYRSYVRTRGVGK..VPRKKVNVKVFII 241
.. : : : : : | : : : | | . | . | : | : | | : | : | : : | |
203 IGYVL..PLIIILICYSQICCKLFRYAKONPLTEKSGVKKALNTIILII 250

242 IAVFFICFVPFHFARIPYTLSQTR..DVFDCYTAENTLFYVKESTLWLTSL 289
: | | : | | : | | | | | : : : | . . : : . . | : | : :
251 V.VFVLCFTPYHVAIIQHMIKKLRFSNFLECSQRHSFQISLHFTVCLMNF 299

290 NACLDPFIYFFLCKSFRNSLISMLKCPNSATSLSQDNRRKKEODGGDPNEE 339
|.:|:|:|:|:| | |:|:|:|:|:|:| | . | :|:| . . . : : : . . |
300 NCCMDPFIYFFACKGYKRKVMRMLKRQVS.VSISSAVKSAPEENSREMT 348

340 TPM 342
|. |
349 TQM 351

FIG.2

G GCA CGA GCC CAC CCT GCG TCG GGC CTC AGT CAG CCC CCG GGG Ala Arg Ala His Pro Ala Ser Gly Leu Ser Gln Pro Pro Gly -15 -10 -5	43
GAG GCC ATG AAC GCC ACG GGG ACC CCG GTG GCC CCC GAG TCC TGC Glu Ala Met Asn Ala Thr Gly Thr Pro Val Ala Pro Glu Ser Cys 1 5 10	88
CAA CAG CTG GCG GCC GGC GGG CAC AGC CGG CTC ATT GTT CTG CAC Gln Gln Leu Ala Ala Gly Gly His Ser Arg Leu Ile Val Leu His 15 20 25	133
TAC AAC CAC TCG GGC CGG CTG GCC GGG CGC GGG GGG CCG GAG GAT Tyr Asn His Ser Gly Arg Leu Ala Gly Arg Gly Gly Pro Glu Asp 30 35 40	178
GGC GGC CTG GGG GCC CTG CGG GGG CTG TCG GTG GCC GCC AGC TGC Gly Gly Leu Gly Ala Leu Arg Gly Leu Ser Val Ala Ala Ser Cys 45 50 55	223
CTG GTG GTG CTG GAG AAC TTG CTG GTG CTG GCG GCC ATC ACC AGC Leu Val Val Leu Glu Asn Leu Leu Val Leu Ala Ala Ile Thr Ser 60 65 70	268
CAC ATG CGG TCG CAA CGC TGG GTC TAC TAT TGC CTG GTG AAC ATT His Met Arg Ser Gln Ars Trp Val Tyr Tyr Cys Leu Val Asn Ile 75 80 85	313
ACG ATG AGT GAC CTG CTC ACG GGC GCG GCC TAC CTG GCC AAC GTG Thr Met Ser Asp Leu Leu Thr Gly Ala Ala Tyr Leu Ala Asn Val 90 95 100	358
CTG CTG TCG GGG GCC CGC ACC TTC CGT CTG GCG CCC GCC CAG TGG Leu Leu Ser Gly Ala Arg Thr Phe Arg Leu Ala Pro Ala Gln Trp 105 110 115	403
TTC CTA CGG AAG GGC CTG CTC TTC ACC GCC CTG GCC GCC TCC ACC Phe Leu Arg Lys Gly Leu Leu Phe Thr Ala Leu Ala Ala Ser Thr 120 125 130	448
TTC AGC CTG CTC TTC ACT GCA GGG TTG CGC TTT GCC ACC ATG GTG Phe Ser Leu Leu Phe Thr Ala Gly Leu Arg Phe Ala Thr Met Val 135 140 145	493
CGG CCG GTG GCC GAG AGC GGG GCC ACC AAG ACC AGC CGC GTC TAC Arg Pro Val Ala Glu Ser Gly Ala Thr Lys Thr Ser Arg Val Tyr 150 155 160	538
GGC TTC ATC GGC CTC TGC TGG CTG CTG GCC GCG CTG CTG GGG ATG Gly Phe Ile Gly Leu Cys Trp Leu Leu Ala Ala Leu Leu Gly Met 165 170 175	583
CTG CCT TTG CTG GGC TGG AAC TGC CTG TGC GCC TTT GAC CGC TGC Leu Pro Leu Leu Gly Trp Asn Cys Leu Cys Ala Phe Asn Arg Cys 180 185 190	628

FIG.3A

TCC AGC CTT CTG CCC CTC TAC TCC AAG CGC TAC ATC CTC TTC TGC	673
Ser Ser Leu Leu Pro Leu Tyr Ser Arg Arg Thr Ile Leu Phe Cys	
195 200 205	
CTG GTG ATC TTC GCC GGC GTC CTG GCC ACC ATC ATG GGC CTC TAT	718
Leu Val Ile Phe Ala Gly Val Leu Ala Thr Ile Met Gly Leu Tyr	
210 215 220	
GGG GCC ATC TTC CGC CTG GTG CAG GCC AGC GGG CAG AAG GCC CCA	763
Gly Ala Ile Phe Arg Leu Val Gln Ala Ser Gly Gln Lys Ala Pro	
225 230 235	
CGC CCA GCG GCC CGC CGC AAG GCC CGC CGC CTG CTG AAG ACG GTG	808
Arg Pro Ala Ala Arg Arg Lys Ala Arg Arg Leu Leu Lys Thr Val	
240 245 250	
CTG ATG ATC CTG CTG GCC TCC TAG GTGTGCTGGG GACCACTCTT CGGGCTGCTG	862
Leu Met Ile Leu Leu Ala Ser	
255 260	
CTGGCCGACG TCTTTGGCTC CAACCTCTGG GCCCAGGAGT ACCTGCGGGG CATGGACTGG	922
ATCCTGGCCC TGGCCGTCTT CAACTCGGCG GTCAACCCCA TCATCTACTC CTTCCGCAGC	982
AGGGAGGTGT GCAGAGCCGT GCTCAGCTTC CTCTGCTGCG GGTGTCTCCG GCTGGGCATG	1042
CGAGGGCCCG GGGACTGCCT GGCCCGGGCC GTCGAGGCTC ACTCCGGAGC TTCCACCACC	1102
GACAGCTCTC TGAGGCCAAG GGACAGCTTT CGGGCTCCC GCTCGCTCAG CTTTCGGATG	1162
CGGGAGCCCC TGTCCAGCAT CTCCAGCGTG CGGAGCATCT GAAGTTGCAG TCTTGCCTGT	1222
GGATGGTGCA ACCACCGGGT GCGTGCCAGG CAGGCCCTCC TGGGGTACAG GAAGCTGTGT	1282
GCACGCAACC TCGCCCTGTA TGGGGAGCAG GGAACGGGAC AGGCCCCCAT GGAATTGCCC	1342
GGTGGCCTCT CGGGGCTTCT GACGCCATAT GGAATTGCCC ATTGCCTATG GCTCACCTG	1402
GACAAGGAGG CAACCACCCC ACCTCCCCGT AGGAGCAGAG AGCACCTGG TGTGGGGGGC	1462
AGTGGGTTCC CCACAACCCC GCTTCTGTGT GATTCTGGGG AAGTCCCGGC CCCTCTCTGG	1522
GCCTCAGTAG GGCTCCCAGG CTGCAAGGGG TGGACTGTGG GATGCATGCC CTGGCAACAT	1582
TGAAGTTCGA TCATGGTAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAA	1637

FIG.3B

1	MNATGTPVAPESCOQLAAGGHSRLIVLHYNHSGRLAGRGGPEDGGLGALR	50
1	MGPTSVPLVKAHRSSVSDYVNYDIIVRHYNVTGKLNISADKEN.SIKLTS	49
51	GLSVAASCLVLENLLVLAITSHMRSQRWVYCLVNITMSDLLTGAAYL	100
50	VVFILICCFIILENIFVLLTIWTKKFHRPMYYFIGNLALSDDLAVAYT	99
101	ANVLLSGARTFRLAPAQWFLRKGLLFTALAASTFSLLFTAGLRFATMVRP	150
100	ANLLLSGATTYKLTPAQWFLREGSMFVALSASVFSLLAIAIERYITMLKM	149
151	VAESGATKTSRVYGFIGLCWLLAALLGMLPLLGNCLCAFDRCSLLPLY	200
150	KLHNGS.NNFRLFLLISACWVISLILGGLPIMGWNCISALSSCSTVLPY	198
201	SKRYILFCLVIFAGVLATIMGLYGAIIFRLVQASGQAPRPAARRKARR..	248
199	HKHYILFCTTVFTLLLLSIVILYCRIYSLVRTSRRLTFRKNISKASRSS	248
249LLKTVLMILLAFLVCWGPLFGLLLADVFGSNLWAEYLRGMDWILA	294
249	ENVALLKTVIIVLSVFIACWAPLFIILLLDV.GCKVKTCDILFRAEYFLV	297
295	LAVLNSAVNPIIYSFRSREVCRAVLSFLCCGCLRLGMRGPGDCLARAVEA	344
298	LAVLNSGTNPIIYTLTNKEMRRAFIRIMSCCKCPGS.DSAGKFKRPIIA	345
345	...HSGASTTDSCLRPROSFRGSRSLSFRMREPLSSIS	379
346	GMEFSRSKSDNSSHPQKDE.GDNPETIMSSGNVNSSS	381

FIG.4