PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6 :
C12N 15/24, C07K 14/54, 1/113, 16/24, A61K 38/19, C12N 15/70, 1/21 // (C12N 1/21, C12R 1:19)

A1

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/23616

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 3. Juli 1997 (03.07.97)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP96/05662

(22) Internationales Anmeldedatum: 17. December 1996 (17.12.96)

(30) Prioritätsdaten:

195 48 295.6	22. December 1995 (22.12.95)	DE
196 03 492.2	31. Januar 1996 (31.01.96)	DE
196 13 866.3	6. April 1996 (06.04.96)	DE
196 13 886.8	6. April 1996 (06.04.96)	DE

(71) Anmelder *(für alle Bestimmungsstaaten ausser US)*: BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND, vertreten durch den BUNDESMINISTER FÜR GESUNDHEIT [DE/DE]; D-53108 Bonn (DE). BOEHRINGER MANNHEIM GMBH [DE/DE]; Sandhofer Strasse 112-116, D-68305 Mannheim (DE).

(72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder *(nur für US)*: KURTH, Reinhard [DE/DE]; Erlenweg 4, D-63303 Dreieich (DE). BAIER, Michael [DE/DE]; Eckenheimer Landstrasse 57a, D-60318 Frankfurt am Main (DE). BANNERT, Norbert [DE/DE]; Adickesallee 13, D-60322 Frankfurt am Main (DE). METZNER, Karin [DE/DE]; Brückenstrasse 17, D-60594 Frankfurt am Main (DE). WERNER, Albrecht [DE/DE]; Prankelstrasse 30, D-69469 Weinheim (DE). LANG, Kurt [DE/DE]; Langoner Strasse 10, D-82377 Penzberg (DE).

(74) Anwalt: GRUSSDORF, Jürgen; Zellentin & Partner, Rubensstrasse 30, D-67061 Ludwigshafen (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, ARIPO Patent (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht
Mit internationalem Recherchenbericht.
Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.

(54) Title: POLYPEPTIDES WITH INTERLEUKIN 16 ACTIVITY, PROCESS FOR THE PREPARATION AND USE THEREOF

(54) Bezeichnung: POLYPEPTIDE MIT IL-16-AKTIVITÄT, VERFAHREN ZU IHRER HERSTELLUNG UND VERWENDUNG

(57) Abstract

A nucleic acid can be used to achieve the expression of a polypeptide with interleukin 16 activity in a prokaryotic or eukaryotic host cell. Said nucleic acids in the area coding for said polypeptide corresponds (a) to the DNA sequence of nucleotides 54-1175 from SEQ ID NO:1 or to the complementary strand thereof, (b) hydridises under standard hybridisation conditions with the DNA of the sequence of nucleotides 54-785 of SEQ ID NO:1, (c) hybridises under stringent hydridisation conditions with the DNA of the sequence of nucleotides 786-1175 of SEQ ID NO:1 and starts at the 5' end the DNA sequence of nucleotides 756-785 of SEQ ID NO:1 or a part thereof which codes for a part of the sequence of aminoacids 235-244 of SEQ ID NO: 1, or (d) is a nucleic acid sequence which would hydridise under stringent hybridisation conditions, without the degeneration of the genetic code, with the nucleic acid sequences defined by (a) and (b). Said nucleic acid codes for proteins with improved interleukin 16 activity.

(57) Zusammenfassung

Eine Nukleinsäure, mit welcher die Expression eines Polypeptids mit Interleukin-16-Aktivität in einer prokaryontischen oder eukaryontischen Wirtszelle erreicht werden kann, wobei die genannte Nukleinsäure im für das genannte Polypeptid codierenden Bereich a) der DNA-Sequenz der Nukleotide 54-1175 aus SEQ ID NO:1 oder ihrem komplementären Strang entspricht, b) hybridisiert unter stringenten Bedingungen mit der DNA der Sequenz der Nukleotide 54-785 aus SEQ ID NO:1, c) hybridisiert unter stringenten Bedingungen mit der DNA-Sequenz der Nukleotide 786-1175 aus SEQ ID NO:1 und am 5'-Ende mit den Nukleotiden 756-785 aus SEQ ID NO:1 oder einem Teil davon beginnt, der für einen Teil der Sequenz Aminosäure 235-244 aus SEQ ID NO:1 codiert, oder d) eine Nukleinsäuresequenz ist, die ohne die Degeneration des genetischen Codes mit den durch a) und b) definierten Nukleinsäuresequenzen unter stringenten Bedingungen hybridisieren würde, codiert für Proteine mit verbesserter Interleukin-16-Aktivität.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AM	Armenien	**GB**	Vereinigtes Königreich	**MX**	Mexiko
AT	Österreich	**GE**	Georgien	**NE**	Niger
AU	Australien	**GN**	Guinea	**NL**	Niederlande
BB	Barbados	**GR**	Griechenland	**NO**	Norwegen
BE	Belgien	**HU**	Ungarn	**NZ**	Neuseeland
BF	Burkina Faso	**IE**	Irland	**PL**	Polen
BG	Bulgarien	**IT**	Italien	**PT**	Portugal
BJ	Benin	**JP**	Japan	**RO**	Rumänien
BR	Brasilien	**KE**	Kenya	**RU**	Russische Föderation
BY	Belarus	**KG**	Kirgisistan	**SD**	Sudan
CA	Kanada	**KP**	Demokratische Volksrepublik Korea	**SE**	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	**KR**	Republik Korea	**SG**	Singapur
CG	Kongo	**KZ**	Kasachstan	**SI**	Slowenien
CH	Schweiz	**LI**	Liechtenstein	**SK**	Slowakei
CI	Côte d'Ivoire	**LK**	Sri Lanka	**SN**	Senegal
CM	Kamerun	**LR**	Liberia	**SZ**	Swasiland
CN	China	**LK**	Litauen	**TD**	Tschad
CS	Tschechoslowakei	**LU**	Luxemburg	**TG**	Togo
CZ	Tschechische Republik	**LV**	Lettland	**TJ**	Tadschikistan
DE	Deutschland	**MC**	Monaco	**TT**	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	**MD**	Republik Moldau	**UA**	Ukraine
EE	Estland	**MG**	Madagaskar	**UG**	Uganda
ES	Spanien	**ML**	Mali	**US**	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	**MN**	Mongolei	**UZ**	Usbekistan
FR	Frankreich	**MR**	Mauretanien	**VN**	Vietnam
GA	Gabon	**MW**	Malawi		

Polypeptide mit IL-16-Aktivität, Verfahren zu ihrer Herstellung und Verwendung

Gegenstand der Erfindung sind Polypeptide mit IL-16-Aktivität, Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Verwendung.

IL-16 (Interleukin-16) ist ein Lymphokin, welches auch als "lymphocyte chemoattracting factor" (LCF) oder "immunodeficiency virus suppressing lymphokine" (ISL) bezeichnet wird. IL-16 und seine Eigenschaften sind in der WO 94/28134, der WO 96/31607 sowie von Cruikshank, W.W., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 (1994) 5109-5113 und von Baier, M., et al., Nature 378 (1995) 563 beschrieben. Dort ist auch die rekombinante Herstellung von IL-16 beschrieben. Danach ist IL-16 ein Protein mit einer molekularen Masse von 13,385 D. Von Cruikshank wurde ebenfalls gefunden, daß ISL in einer Molekularsiebchromatographie als multimere Form mit einem Molekulargewicht von 50-60 bzw. 55-60 kD eluiert. Dieser multimeren Form, welche ein kationisches Homotetramer ist (Produktinformation AMS Biotechnology Ltd., Europe, Cat. No. 11177186), wird die "chemoattractant activity" zugeschrieben. Von Baier wird eine homodimere Form von IL-16 mit einem Molekulargewicht von 28 kD beschrieben. Die von Cruikshank et al. in J. Immunol. 146 (1991) 2928-2934 beschriebene "chemoattractant activity" und die von Baier beschriebene Aktivität von rekombinantem humanem IL-16 sind jedoch sehr gering.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, die Aktivität von IL-16 zu verbessern und IL-16-Formen bereitzustellen, die geringe Immunogenität zeigen und vorteilhaft für eine therapeutische Anwendung geeignet sind.

Die Aufgabe der Erfindung wird gelöst durch eine Nukleinsäure, mit welcher die Expression eines Polypeptids mit Interleukin-16-Aktivität in einer prokaryontischen oder eukaryontischen Wirtszelle erreicht werden kann, wobei die genannte Nukleinsäure im für das genannte Polypeptid codierenden Bereich

a) der DNA-Sequenz Nukleotide 54-1175 aus SEQ ID NO:1 oder ihrem komplementären Strang entspricht,

b) mit der DNA der Sequenz Nukleotide 54-785 aus SEQ ID NO:1 unter stringenten Bedingungen hybridisiert,

c) mit der DNA der Sequenz Nukleotide 786-1175 aus SEQ ID NO:1 unter stringenten Bedingungen hybridisiert und am 5'-Ende mit den Nukleotiden 756-785 aus SEQ ID NO:1 oder einem Teil davon beginnt, der für einen Teil der Sequenz Aminosäure 235-244 aus SEQ ID NO:1 codiert, oder

d) eine Nukleinsäuresequenz ist, die ohne die Degeneration des genetischen Codes mit den durch a) oder b) definierten Nukleinsäuresequenzen unter stringenten Bedingungen hybridisieren würde.

In einer bevorzugten Ausführungsform hybridisiert die Nukleinsäure, welche durch b) definiert ist, zusätzlich noch unter stringenten Bedingungen mit der DNA der Nukleotide 786-1175 aus SEQ ID NO:1.

Vorzugsweise codiert eine solche Nukleinsäure ein Polypeptid mit verbesserter IL-16-Aktivität, besonders bevorzugt verbessertes natürliches IL-16 von Primaten, wie humanes IL-16 oder IL-16 einer Affenart oder eines anderen Säugetiers, wie z.B. Maus.

Es hat sich überraschenderweise gezeigt, daß IL-16-Formen mit einer gegenüber den in der WO 94/28134 beschriebenen IL-16 N-terminal verlängerten Sequenz nach wie vor aktiv sind. Solche IL-16-Formen zeigen aufgrund einer verlängerten Halbwertszeit sogar eine erhöhte Aktivität in vivo.

Fig. 2 der WO 94/28134 beschreibt nicht die korrekte Sequenz von IL-16. Das Startcodon "ATG" beginnt nicht mit Nukleotid 783, sondern mit Nukleotid 54. Dieser Leserahmen ergibt sich, wenn nach Nukleotid 156 ein A, nach Nukleotid 398 ein C und nach Nukleotid 780 ein G eingefügt wird. Der korrekte Leserahmen ist in SEQ ID NO:1 gezeigt. Diese Sequenz zeigt noch weitere Unterschiede zu Fig. 2 der WO 94/28134. Dabei handelt es sich allerdings nur um Nukleotidaustausche (z.B. 313 G in A, 717 C in A). Die erfindungsgemäße Nukleinsäure codiert auch für ein Polypeptid, welches bei seiner Herstellung prozessiert werden kann. Ein solches Polypeptid, welches damit gegenüber dem aus der WO 94/28134 bekannten IL-16 verlängert ist, zeigt eine verbesserte Aktivität. Monomeres IL-16 mit verbesserter Aktivität besitzt ein Molekulargewicht von 13,9-39 kD, vorzugsweise ca. 15-35 kD, und ist damit etwa bis zu dreimal so groß wie das in der WO 94/28134 beschriebene C-terminale IL-16-Fragment.

IL-16 kann sich in seiner Sequenz von den von solchen DNA-Sequenzen codierten Proteinsequenzen in gewissem Umfang unterscheiden. Solche Sequenzvariationen von IL-16 Muteinen können Aminosäureaustausche, -deletionen oder -additionen sein. Vorzugsweise ist die Aminosäuresequenz von IL-16 jedoch zu wenigstens 75%, besonders bevorzugt zu wenigstens 90% identisch mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID NO:1. Varianten von Teilen der Amino- und Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO:1 / SEQ ID NO:2 sind beispielsweise in der internationalen Anmeldung WO 96/31607 und der deutschen Patentanmeldung 195 47 933.5 beschrieben.

Besonders bevorzugte IL-16 Muteine mit verbesserter Aktivität beginnen am N-Terminus mit den Aminosäuren 235-244 aus SEQ ID NO:1/2 bzw. einem Teil davon. Besonders bevorzugte N-Termini sind in SEQ ID NO:3-12 beschrieben.

In einer bevorzugten Ausführungsform können die IL-Muteine mit verbesserter Aktivität am C-Terminus um vorzugsweise 1-20 Aminosäuren verkürzt sein.

Unter Nukleinsäuren im Sinne der Erfindung sind beispielsweise DNA, RNA und Nukleinsäurederivate und -Analoga zu verstehen. Bevorzugte Nukleinsäure-Analoga sind solche Verbindungen, bei denen das Zuckerphosphatgerüst durch andere Einheiten, wie z.B. Aminosäuren, ersetzt ist. Solche Verbindungen werden als PNA bezeichnet und sind in der WO 92/20702 beschrieben. Da beispielsweise PNA-DNA-Bindungen stärker als DNA-DNA-Bindungen sind, sind die oben beschriebenen stringenten Bedingungen für PNA-DNA-Hybridisierung nicht anwendbar. Geeignete Hybridisierungsbedingungen sind jedoch in der WO 92/20703 beschrieben.

Unter dem Ausdruck "IL-16" ist im Sinne der Erfindung ein Polypeptid mit der Aktivität von IL-16 oder vorzugsweise mit einer verbesserten Aktivität zu verstehen. Vorzugsweise zeigt IL-16 in dem in der internationalen Anmeldung WO 96/31607 beschriebenen Testverfahren die genannte Wirkung oder stimuliert die Zellteilung gemäß WO 94/28134.

IL-16 bindet an $CD4^+$ Lymphozyten und kann die Replikation von Viren, wie beispielsweise HIV-1, HIV-2 und SIV supprimieren. Die Funktion von IL-16 ist nicht durch seine Präsentation im MHC-Komplex limitiert.

Insbesondere zeigt IL-16 eine oder mehrere der folgenden Eigenschaften:

- Bindung an T-Zellen über den CD4-Rezeptor,
- Stimulierung der Expression von IL-2-Rezeptor und/oder HLA-DR-Antigen auf $CD4^+$-Lymphozyten,
- Stimulierung der Proliferation von T-Helferzellen in Gegenwart von IL-2,
- Suppression der Proliferation von mit Anti-CD3-Antikörpern stimulierten T-Helferzellen,
- Suppression der Replikation von Viren, vorzugsweise von HIV-1, HIV-2 oder SIV.

Der Ausdruck "unter stringenten Bedingungen hybridisieren" bedeutet, daß zwei Nukleinsäurefragmente unter standardisierten Hybridisierungsbedingungen miteinander hybridisieren, wie beispielsweise beschrieben in Sambrook et al., "Expression of cloned genes in E. coli" in Molecular Cloning: A laboratory manual (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA. Solche Bedingungen sind beispielsweise Hybridisierung in 6,0 x SSC bei etwa 45°C, gefolgt durch einen Waschschritt bei 2 x SSC bei 50°C. Zur Auswahl der Stringenz kann die Salzkonzentration im Waschschritt beispielsweise zwischen 2,0 x SSC bei 50°C für geringe Stringenz und 0,2 x SSC bei 50° für hohe Stringenz gewählt werden. Zusätzlich kann die Temperatur des im Waschschritt zwischen Raumtemperatur, ca. 22°C, für geringe Stringenz und 65°C bei hoher Stringenz variiert werden.

IL-16 wird vorzugsweise rekombinant in prokaryontischen oder eukaryontischen Wirtszellen hergestellt. Derartige Herstellverfahren sind beispielsweise beschrieben in WO 94/28134 und WO 96/31607, die auch hierfür Gegenstand der Offenbarung der vorliegenden Erfindung sind. Um allerdings die erfindungsgemäßen Formen von IL-16 durch rekombinante Herstellung definiert und reproduzierbar zu erhalten, müssen über die dem Fachmann geläufigen Verfahren zur rekombinanten Herstellung zusätzliche Maßnahmen ergriffen werden.

Die Herstellung von rekombinantem IL-16 kann nach den dem Fachmann geläufigen Methoden erfolgen. Dazu wird zunächst eine DNA hergestellt, welche in der Lage ist, ein Protein zu produzieren, welches die Aktivität von IL-16 besitzt. Die DNA wird in einen Vektor kloniert, der in eine Wirtszelle transferiert werden kann und dort replizierbar ist. Ein derartiger Vektor enthält zusätzlich zur IL-16-Sequenz Operator-Elemente, die zur Expression der DNA-Sequenz erforderlich sind. Dieser Vektor, der die IL-16-Sequenz und die Operator-Elemente enthält, wird in einen Vektor transferiert, der in der Lage ist, die DNA von IL-16 zu exprimie-

ren. Die Wirtszelle wird unter Bedingungen, die zur Amplifikation des Vektors geeignet sind, kultiviert und IL-16 gewonnen. Dabei wird durch geeignete Maßnahmen sichergestellt, daß das Protein eine aktive tertiäre Struktur einnehmen kann, in der es IL-16-Eigenschaften zeigt.

Dabei ist es nicht erforderlich, daß das exprimierte Protein die exakte IL-16-Aminosäuresequenz aus SEQ ID NO:1 enthält. Ebenso geeignet sind Proteine, welche im wesentlichen die gleiche Sequenz enthalten und analoge Eigenschaften zeigen. Insbesondere geeignet sind Proteine, die N-terminal Aminosäuren deletiert haben.

Auch die Nukleinsäuresequenz des Proteins kann modifiziert sein. Derartige Modifikationen sind beispielsweise:

- Veränderung der Nukleinsäure, um verschiedene Erkennungssequenzen von Restriktionsenzymen zur Erleichterung der Schritte der Ligation, Klonierung und Mutagenese einzuführen

- Veränderung der Nukleinsäure zum Einbau von bevorzugten Codons für die Wirtszelle

- Ergänzung der Nukleinsäure um zusätzliche Operator-Elemente, um die Expression in der Wirtszelle zu optimieren.

Die Expression des Proteins erfolgt vorzugsweise in Mikroorganismen, insbesondere in Prokaryonten, und dort in E. coli.

Die Expressionsvektoren müssen einen Promotor enthalten, der die Expression des Proteins im Wirtsorganismus erlaubt. Derartige Promotoren sind dem Fachmann bekannt und sind beispielsweise lac Promotor (Chang et al., Nature 198 (1977) 1056), trp Promotor (Goeddel et al., Nuc. Acids Res. 8 (1980) 4057), λp_L Promotor (Shimatake et al., Nature 292 (1981) 128) und T5 Promotor (US-Patent Nr. 4,689,406). Ebenfalls geeignet sind synthetische Promotoren wie beispielsweise tac Promotor (US-Patent Nr. 4,551,433). Ebenso geeignet sind gekoppelte Promotorsysteme wie beispielsweise T7-RNA-Polymerase/Promotorsystem (Studier et al., J. Mol. Biol. 189 (1986) 113). Ebenso geeignet sind hybride Promotoren aus einem Bacteriophagen-Promotor und der Operator-Region des Mikroorganismus (EP-A 0 267 851). Zusätzlich zum Promotor ist eine effektive Ribosomenbindungsstelle erforderlich. Für E. coli wird diese Ribosomenbindungsstelle als Shine-Dalgarno (SD)-Sequenz bezeichnet (Sambrook

et al., "Expression of cloned genes in E. coli" in Molecular Cloning: A laboratory manual (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA).

Zur Verbesserung der Expression ist es möglich, das Protein als Fusionsprotein zu exprimieren. In diesem Fall wird üblicherweise eine DNA-Sequenz, welche für den N-terminalen Teil eines endogenen bakteriellen Proteins oder ein anderes stabiles Protein codiert, an das 5'-Ende der für IL-16 codierenden Sequenz fusioniert. Beispiele hierfür sind beispielsweise lacZ (Phillips and Silhavy, Nature 344 (1990) 882-884), trpE (Yansura, Meth. Enzymol. 185 (1990) 161 - 166).

Nach Expression des Vektors, vorzugsweise eines biologisch funktionellen Plasmids oder eines viralen Vektors, werden die Fusionsproteine vorzugsweise mit Enzymen gespalten (Carter P. in Ladisch, M.R. et al. eds., Protein Purification: From Molecular Mechanisms to Large-Scale Processes, ACS Symposium Series No. 427, American Chemical Society (1990) 181-193). Beispiele für Spaltstellen sind die IgA-Protease-Spaltstelle (WO 91/11520, EP-A 0 495 398), die Ubiquitin-Spaltstelle (Miller et al., Bio/Technology 7 (1989) 698), die Enterokinase-Spaltstelle (Maroux et al., J. Biol. Chem. 241 (1971) 5031) und die Faktor-Xa-Spaltstelle (Nagai et al., Nature 309 (1984) 810).

Die auf diese Weise in Bakterien exprimierten Proteine werden durch Aufschluß der Bakterien und Proteinisolierung in üblicher Weise gewonnen.

In einer weiteren Ausführungsform ist es möglich, die Proteine als aktive Proteine aus den Mikroorganismen zu sezernieren. Hierzu wird vorzugsweise ein Fusionsprodukt verwendet, welches aus der Signalsequenz, die für die Sekretion von Proteinen in den verwendeten Wirtsorganismen geeignet ist, und der Nukleinsäure, welche für das Protein codiert, besteht. Das Protein wird dabei entweder in das Medium (bei grampositiven Bakterien) oder in den periplasmatischen Raum (bei gramnegativen Bakterien) sezerniert. Zwischen der Signalsequenz und der für IL-16 codierenden Sequenz ist zweckmäßig eine Spaltstelle angebracht, die entweder bei der Prozessierung oder in einem zusätzlichen Schritt die Abspaltung des Proteins erlaubt. Derartige Signalsequenzen stammen beispielsweise von ompA (Ghrayeb et al., EMBO J. 3 (1984) 2437), phoA (Oka et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 (1985) 7212).

Zusätzlich enthalten die Vektoren noch Terminatoren. Terminatoren sind DNA-Sequenzen, die das Ende eines Transkriptionsvorganges signalisieren. Sie zeichnen sich meist durch zwei strukturelle Eigenarten aus: eine umgekehrt repetitive G/C-reiche Region, die intramolekular

eine Doppelhelix bilden kann, sowie eine Anzahl von U(bzw. T)-Resten. Beispiele sind der Haupt-Terminator in der DNA des Phagen fd (Beck und Zink, Gene 16 (1981) 35-58) sowie rrnB (Brosius et al., J. Mol. Biol. 148 (1981) 107 - 127).

Zusätzlich enthalten die Expressionsvektoren üblicherweise einen selektierbaren Marker, um transformierte Zellen zu selektieren. Derartige selektierbare Marker sind beispielsweise die Resistenzgene für Ampicillin, Chloramphenicol, Erythromycin, Kanamycin, Neomycin und Tetracyclin (Davies et al., Ann. Rev. Microbiol. 32 (1978) 469). Ebenso geeignete selektierbare Marker sind die Gene für essentielle Substanzen der Biosynthese von für die Zelle notwendigen Stoffen wie z.B. Histidin, Tryptophan und Leucin.

Es sind eine Vielzahl von geeigneten bakteriellen Vektoren bekannt. Beispielsweise sind für die folgenden Bakterien Vektoren beschrieben: Bacillus subtilis (Palva et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79 (1982) 5582), E. coli (Aman et al., Gene 40 (1985) 183; Studier et al., J. Mol. Biol. 189 (1986) 113), Streptococcus cremoris (Powell et al., Appl. Environ. Microbiol. 54 (1988) 655), Streptococcus lividans und Streptomyces lividans (US-Patent Nr. 4,747,056).

Weitere gentechnologische Verfahren zur Herstellung und Expression von geeigneten Vektoren sind in J. Sambrook et al., Molecular Cloning: a laboratory manual (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, N.Y. beschrieben.

Eine Expression von rekombinanter IL-16 ist außer in prokaryontischen Mikroorganismen auch in Eukaryonten (wie beispielsweise CHO-Zellen, Hefe oder Insektenzellen) möglich. Als eukaryontisches Expressionssystem wird das Hefesystem oder Insektenzellen bevorzugt. Die Expression in Hefe kann über drei Arten von Hefevektoren (integrierende YIp (yeast integrating plasmids)-Vektoren, replizierende YRp (yeast replicon plasmids)-Vektoren und episomale YEp (yeast episomal plasmids)-Vektoren erfolgen. Näheres hierzu ist beispielsweise in S.M. Kingsman et al, Tibtech 5 (1987) 53-57 beschrieben.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist eine prokaryontische oder eukaryontische Wirtszelle, welche mit einer Nukleinsäure, welche für ein erfindungsgemäßes IL-16-Polypeptid codiert, so transformiert oder transfiziert ist, daß die Wirtszelle das genannte Polypeptid exprimiert. Eine solche Wirtszelle enthält üblicherweise einen biologisch funktionellen Nukleinsäurevektor, vorzugsweise einen DNA-Vektor, eine Plasmid-DNA, welche diese Nukleinsäure enthält.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist humanes Interleukin-16 oder Interleukin-16 aus Primaten, vorzugsweise humanes IL-16 mit verbesserter Aktivität, wie es als Produkt einer prokaryontischen oder eukaryontischen Expression im wesentlichen frei von anderen Humanproteinen erhältlich ist. IL-16 ist ein Protein, welches monomer oder als Multimer bestehend aus monomerem IL-16 (im weiteren auch als Untereinheiten bezeichnet) vorkommt. Das Molekulargewicht einer monomeren IL-16-Untereinheit beträgt vorzugsweise 13,9-39 kD, besonders bevorzugt 15-35 kD. Weiter bevorzugt ist ein monomeres IL-16-Polypeptid mit einem Molekulargewicht von 15-30 kD, welches nicht in weitere Untereinheiten aufspaltbar ist.

Es hat sich überraschenderweise gezeigt, daß die in der WO 94/28134 beschriebene Nukleinsäure und Proteinsequenz von IL-16 nicht den natürlichen humanen Sequenzen entsprechen. Es handelt sich hier lediglich um ein IL-16-Fragment mit nicht-natürlichem N-Terminus. Für eine therapeutische Anwendung ist es jedoch bevorzugt, ein Protein zu verwenden, welches entweder mit dem natürlichen Protein identisch ist oder sich vom natürlichen Protein nur geringfügig unterscheidet und/oder mindestens vergleichbare, vorzugsweise verbesserte Aktivität und Immunogenität zeigt. Überraschenderweise wurde gefunden, daß natürliches unprozessiertes bzw. noch nicht sekretiertes IL-16 entgegen der bisherigen Annahme ein größeres Protein mit einem Molekulargewicht von 13,9-39 kD ist. Seine Sequenz ist in den Sequenzprotokollen enthalten.

Die Nukleinsäuresequenz von IL-16 kann im Rahmen der Erfindung Deletionen, Mutationen und Additionen erhalten. Vorzugsweise ist ein Teil des 5'-Endes in der Größenordnung von 20-240, vorzugsweise 20-90 Codons, vorzugsweise 20-50 Codons, besonders bevorzugt ca. 35, 75, 234, 237 oder 239 Codons deletiert. Ein von einer solchen Nukleinsäure codiertes IL-16 (monomere Form, Untereinheit) hat dann ein Molekulargewicht von ca. 13,9-39 kD. Diese monomere Form von IL-16 kann in einer bevorzugten Ausführungsform multimerisiert sein. Dadurch kann die Aktivität von IL-16 gesteigert werden. Vorzugsweise sind solche multimeren Formen dimere, tetramere oder oktamere Formen.

In einer weiteren Ausführungsform können die Polypeptide der Erfindung zusätzlich einen definierten Gehalt an Metallionen enthalten, wobei die Anzahl der Metallionen pro Untereinheit vorzugsweise 0,5 bis 2 beträgt.

Als Metallionen im Sinne der Erfindung, die bei der Herstellung der multimeren Formen von IL-16 in definierter Menge zugesetzt werden, sind eine Vielzahl von Metallionen geeignet.

Wie sich gezeigt hat, sind sowohl Erdalkalimetalle als auch Elemente der Nebengruppen geeignet. Besonders geeignet sind Erdalkalimetalle, Kobalt, Zink, Selen, Mangan, Nickel, Kupfer, Eisen, Magnesium, Calcium, Molybdän und Silber. Die Ionen können ein-, zwei-, drei- oder vierwertig sein. Besonders bevorzugt werden zweiwertige Ionen wie Cu(II) Ionen. Die Ionen werden vorzugsweise als Lösungen zugesetzt von $MgCl_2$, $CaCl_2$, $MnCl_2$, $BaCl_2$, $LiCl_2$, $Sr(NO_3)_2$, Na_2MoO_4, $AgCl_2$ oder Cu(II)-Acetat.

Solche multimeren Formen, deren Herstellung in Gegenwart von Metallionen und metallionenhaltige Formen von IL-16 sind in der deutschen Patentanmeldung Nr. 195 47 933.5 beschrieben.

Das erfindungsgemäße Polypeptid kann dadurch hergestellt werden, daß eine prokaryontische oder eukaryontische Wirtszelle, die mit einer Nukleinsäuresequenz nach den Ansprüchen 1 oder 2 transformiert oder transfiziert ist, unter geeigneten Nährbedingungen kultiviert wird und das gewünschte Polypeptid gegebenenfalls isoliert wird. Falls die Herstellung des Polypeptids im Rahmen einer gentherapeutischen Behandlung in vivo erfolgen soll, wird das Polypeptid natürlich nicht aus der Zelle isoliert.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist eine pharmazeutische Zusammensetzung, die ein erfindungsgemäßes Polypeptid in einer für eine therapeutische Anwendung ausreichenden Menge und/oder spezifische Aktivität sowie gegebenenfalls ein pharmazeutisch geeignetes Verdünnungsmittel, Adjuvans und/oder Trägermittel enthält.

Die erfindungsgemäßen Polypeptide sind insbesondere geeignet zur Behandlung von pathologischen Zuständen, die durch virale Replikation, insbesondere retrovirale Replikation, verursacht sind, und zur Immunmodulation. Derartige therapeutische Anwendungen sind ebenfalls in der WO 94/28134 sowie der WO 96/31607 beschrieben. In letzterer sind auch diagnostische Testverfahren beschrieben.

Vorzugsweise können die erfindungsgemäßen Polypeptide zur Immunsuppression verwendet werden. Diese Immunsuppression erfolgt vorzugsweise über eine Hemmung der Helferfunktion der TH_0 und/oder TH_1 und TH_2 Zellen. Die erfindungsgemäßen Polypeptide sind demnach bei allen Erkrankungen von therapeutischem Wert, bei denen eine immundisregulatorische Komponente bei der Pathogenese postuiert wird, insbesondere eine Hyperimmunität. Als IL-16-therapierbare Erkrankungen können in der Kardiologie/Angiologie Erkrankungen wie Myokarditis, Endokarditis und Perikarditis in Frage kommen, in der Pulmonologie beispiels-

weise Bronchitis, Asthma, in der Hämatologie Autoimmunneuropenien und Transplantatabstoßung, in der Gastroenterologie chronische Gastritis, in der Endokrinologie Diabetes mellitus Typ I, in der Nephrologie Glomerulonephritis, Erkrankungen im rheumatischen Formenkreis, Erkrankungen in der Ophthalmologie, in der Neurologie, wie Multiple Sklerose, in der Dermatologie Ekzeme. Insbesondere können die erfindungsgemäßen Polypeptide bei Autoimmunerkrankungen, Allergien und zur Vermeidung von Transplantatabstoßungen verwendet werden.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren im Rahmen der Gentherapie. Hierfür geeignete Vektorsysteme sind beispielsweise retrovirale oder nicht-virale Vektorsysteme.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein polyklonaler oder monoklonaler Anti-IL-16-Antikörper oder ein immunoaktives Fragment davon sowie Verfahren zur Herstellung von solchen Antikörpern und ihre Verwendung zur Bestimmung von IL-16 sowie zur Bestimmung von viralen Infektionen in eukaryontischen Zellen und insbesondere in Säugerzellmaterial. Mit IL-16 können auch Virus-aktivierte Säugerzellen, insbesondere T Zellen, bestimmt werden. Die Herstellung solcher Antikörper erfolgt durch Immunisierung mit einem erfindungsgemäßen Polypeptid, welches vorzugsweise im wesentlichen der Sequenz Aminosäuren 1-244 aus SEQ ID NO:1/2 entspricht und welches an ein solches Peptid bindet. Vorzugsweise wird ein Antikörper verwendet, der nicht an das Polypeptid der Sequenz Aminosäuren 245-374 aus SEQ ID NO:1/2 bindet. Die Herstellung eines solchen Antikörpers wird nach den dem Fachmann geläufigen Verfahren durchgeführt.

Die folgenden Beispiele und Publikationen sowie das Sequenzprotokoll erläutern die Erfindung, deren Schutzumfang sich aus den Patentansprüchen ergibt, weiter. Die beschriebenen Verfahren sind als Beispiele zu verstehen, die auch noch nach Modifikationen den Gegenstand der Erfindung beschreiben.

Beispiel 1

Klonierung, Expression und Reinigung von IL-16

1.1 RNA Isolierung

5 x 10^7PBMC (vom Menschen oder Affen) wurden 48 Stunden mit 10 µg/ml Concanavalin A und 180 U/ml IL-2 kultiviert. Zur Herstellung der RNA wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit 5 ml Denaturierungslösung (RNA Isolation Kit, Stratagene)

lysiert. Nach Zugabe von 1 ml Na-Acetat, 5 ml Phenol und 1 ml Chloroform/Isoamyl-Alkohol (24:1) wurde das Lysat 15 min. auf Eis gehalten. Die wäßrige Phase wurde anschließend mit 6 ml Isopropanol vermischt, um die RNA auszufällen, und 2 Stunden bei -20°C gelagert. Das Präzipitat wurde schließlich einmal mit reinem Ethanol gewaschen und in 150 µl H_2O gelöst. Die Ausbeute wurde photometrisch bestimmt und betrug 120 µg.

1.2 cDNA Synthese

Die Mischung für die cDNA Synthese enthielt 10 µg RNA, 0,2 µg Oligo-dT, 13 mM DTT und 5 µl "bulk first strand reaction mix" (First-Strand cDNA Synthesis Kit, Pharmacia) in einer Menge von 15 µl. Die Mischung wurde 1 Stunde bei 37°C inkubiert und anschließend bei -20°C zur späteren Verwendung gelagert.

Amplifikation, Klonierung von IL-16 cDNA und Herstellung eines Expressionsklons erfolgen wie in der WO 94/28134 oder der WO 96/31607 beschrieben, unter Berücksichtigung der veränderten Sequenzen. Für die Reinigung nach Beispiel 3 ist eine N-terminale Verlängerung um mehrere Histidinreste erforderlich.

Beispiel 2

10 l Fermentation eines E. coli Expressionsklons für IL-16 und Hochdruckaufschluß

Aus Stammkulturen (Plattenausstrich oder bei -20°C gelagerten Ampullen) werden Vorkulturen angesetzt, die geschüttelt bei 37°C inkubiert werden. Das Überimpfvolumen in die nächsthöhere Dimension beträgt jeweils 1-10 Vol.-%. Zur Selektion gegen Plasmidverlust wird in Vor- und Hauptkultur Ampicillin (50-100 mg/l) eingesetzt.

Als Nährstoffe werden enzymatisch verdautes Eiweiß und/oder Hefeextrakt als N- und C-Quelle sowie Glycerin und/oder Glucose als zusätzliche C-Quelle verwendet. Das Medium wird auf pH 7 gepuffert und Metallsalze werden zur Stabilisierung des Fermentationsprozesses in physiologisch verträglichen Konzentrationen zugesetzt. Die Fermentation wird als Feed-batch mit einer gemischten Hefeextrakt/C-Quellen-Dosage durchgeführt. Die Fermentationstemperatur beträgt 25-37°C. Über Belüftungsrate, Drehzahlregulierung und Dosagegeschwindigkeit wird der gelöste Sauerstoffpartialdruck (pO_2) < 20% gehalten.

Das Wachstum wird über Ermittlung der optischen Dichte (OD) bei 528 nm bestimmt. Mittels IPTG wird die Expression des IL-16 induziert. Nach einer Fermentationsdauer von ca. 10 Stunden wird bei OD-Stillstand die Biomasse durch Zentrifugation geerntet. Die Biomasse

wird in 50 mM Natriumphosphat, 5 mM EDTA, 100 mM Natriumchlorid, pH 7 aufgenommen und über eine kontinuierliche Hochdruckpresse bei 1000 Bar aufgeschlossen. Die so erhaltene Suspension wird erneut abzentrifugiert und der Überstand, der das gelöste IL-16 enthält, wird weiterverarbeitet.

Beispiel 3

Reinigung von rekombinantem humanem IL-16

550 ml Aufschlußüberstand in 50 mM Natriumphosphat, 5 mM EDTA, 100 mM NaCl, pH 7,2 wurden mit 55 ml 5 M NaCl, 60 mM $MgCl_2$, pH 8,0 versetzt, 30 min. gerührt und anschließend 30 min. bei 20.000 g zentrifugiert. 400 ml des Überstandes wurden auf eine Nickel-Chelat-Sepharose-Säule (V=60 ml; Pharmacia) aufgezogen, die vorher mit 30 µMol $NiCl_2$/ml Gel beladen und mit 50 mM Natriumphosphat, 0,2 M NaCl, pH 8,0 äquilibriert worden war. Die Säule wurde anschließend mit 300 ml 50 mM Natriumphosphat, 0,5 M NaCl, pH 7,0 gespült und das IL-16-Fusionsprotein dann mit einem Gradienten von 0 M bis 300 mM Imidazol, pH 7,0 in 50 mM Natriumphosphat, 0,1 M NaCl, pH 7,0 (2* 0,5 l Gradientenvolumen) eluiert. IL-16 enthaltende Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE identifiziert und vereinigt.

300 mg des so erhaltenen Fusionsproteins wurden bei 4°C gegen 20 l 20 mM Imidazol, pH 5,5 dialysiert und anschließend zur Entfernung von Trübungen 30 min. bei 20.000 g zentrifugiert. Der Überstand der Zentrifugation wurde anschließend mit NaOH auf pH 8,5 eingestellt, mit 0,3 mg Thrombin (Boehringer Mannheim GmbH) versetzt und 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Spaltansatz mit HCl auf pH 6,5 und die Leitfähigkeit durch Verdünnung mit H_2O auf 1,7 mS eingestellt. Die Probe wurde auf eine Q-Sepharose FF-Säule (45 ml; Pharmacia) aufgetragen, die vorher mit 20 mM Imidazol, pH 6,5 äquilibriert worden war. Die Elution von IL-16 erfolgte mit einem Gradienten von 0 bis 0,3 M NaCl in 20 mM Imidazol, pH 6,5. IL-16 enthaltende Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE identifiziert, vereinigt und die IL-16-Identität über Massenanalyse und N-terminale Sequenzanalyse bestätigt.

Das so erhaltene IL-16 wies in der SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen eine Reinheit von mehr als 95% auf. Die analytische Superdex 75 FPLC-Säule (Pharmacia) wurde mit 25 mM Na-Phosphat, 0,5 M NaCl, 10% Glycerin, pH 7,0 und einer Flußrate von 1 ml/min. eluiert. Die aufgetragene Proteinmenge in einem Volumen von 100 bis 150 µl betrug 1,5 bis 15 µg Protein. Die Detektion erfolgte bei 220 nm.

Zur Reinheitsanalyse mittels RP-HPLC wurde eine Vydac, Protein & Peptide C18, 4x180 mm Säule verwendet. Die Elution erfolgt durch einen linearen Gradienten von 0% nach 80% B (Lösungsmittel B: 90% Acetonitril in 0,1% TFA; Lösungsmittel A: 0,1% TFA in H_2O) innerhalb von 30 min. mit einer Flußrate von 1 ml/min. Die Detektion erfolgte bei 220 nm.

Referenzliste

Aman et al., Gene 40 (1985) 183
Baier, M., et al., Nature 378 (1995) 563
Beck und Zink, Gene 16 (1981) 35-58
Brosius et al., J. Mol. Biol. 148 (1981) 107 - 127
Carter P. in Ladisch, M.R. et al. eds., Protein Purification: From Molecular Mechanisms to Large-Scale Processes, ACS Symposium Series No. 427, American Chemical Society (1990) 181-193
Chang et al., Nature 198 (1977) 1056
Cruikshank, W.W., et al., J. Immunol. 146 (1991) 2928-2934
Cruikshank, W.W., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 (1994) 5109-5113
Davies et al., Ann. Rev. Microbiol. 32 (1978) 469
Deutsche Patentanmeldung Nr. 195 47 933.5
EP-A 0 267 851
EP-A 0 495 398
Ghrayeb et al., EMBO J. 3 (1984) 2437
Goeddel et al., Nuc. Acids Res. 8 (1980) 4057
Kingsman, S.M., et al, Tibtech 5 (1987) 53-57
Mack et al., Analyt. Biochem. 200 (1992) 74-80
Maroux et al., J. Biol. Chem. 241 (1971) 5031
Miller et al., Bio/Technology 7 (1989) 698
Nagai et al., Nature 309 (1984) 810
Oka et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 (1985) 7212
Palva et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79 (1982) 5582
Phillips and Silhavy, Nature 344 (1990) 882-884
Powell et al., Appl. Environ. Microbiol. 54 (1988) 655
Sambrook et al., "Expression of cloned genes in E. coli" in Molecular Cloning: A laboratory manual (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA
Shimatake et al., Nature 292 (1981) 128
Studier et al., J. Mol. Biol. 189 (1986) 113

US-Patent Nr. 4,551,433
US-Patent Nr. 4,689,406
US-Patent Nr. 4,747,056
WO 91/11520
WO 92/20702
WO 92/20703
WO 94/28134
WO 96/31607
Yansura, Meth. Enzymol. 185 (1990) 161-166

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:
(A) NAME: Bundesrepublik Deutschland vertreten durch den Bundesminister fuer Gesundheit
(B) STRASSE: -
(C) ORT: Bonn
(E) LAND: Deutschland
(F) POSTLEITZAHL: D-54108

(A) NAME: BOEHRINGER MANNHEIM GMBH
(B) STRASSE: Sandhofer Str. 112-116
(C) ORT: Mannheim
(E) LAND: Deutschland
(F) POSTLEITZAHL: D-68305

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Polypeptide mit IL-16-Aktivitaet, Verfahren zu ihrer Herstellung und Verwendung

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 12

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:
(A) DATENTRÄGER: Floppy disk
(B) COMPUTER: IBM PC compatible
(C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30B (EPA)

(vi) DATEN DER URANMELDUNG:
(A) ANMELDENUMMER: DE 195 48 295.6
(B) ANMELDETAG: 22-DEC-1995

(vi) DATEN DER URANMELDUNG:
(A) ANMELDENUMMER: DE 196 03 492.2
(B) ANMELDETAG: 31-JAN-1996

(vi) DATEN DER URANMELDUNG:
(A) ANMELDENUMMER: DE 196 13 866.3
(B) ANMELDETAG: 06-APR-1996

(vi) DATEN DER URANMELDUNG:
(A) ANMELDENUMMER: DE 196 13 886.8
(B) ANMELDETAG: 06-APR-1996

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 1178 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Doppelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
(B) LAGE:54..1178

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

```
TTCCTCGAGA GCTGTCAACA CAGGCTGAGG AATCTCAAGG CCCAGTGCTC AAG ATG      56
                                                            Met
                                                             1

CCT AGC CAG CGA GCA CGG AGC TTC CCC CTG ACC AGG TCC CAG TCC TGT    104
Pro Ser Gln Arg Ala Arg Ser Phe Pro Leu Thr Arg Ser Gln Ser Cys
              5                  10                  15

GAG ACG AAG CTA CTT GAC GAA AAG ACC AGC AAA CTC TAT TCT ATC AGC    152
Glu Thr Lys Leu Leu Asp Glu Lys Thr Ser Lys Leu Tyr Ser Ile Ser
         20                  25                  30

AGC CAA GTG TCA TCG GCT GTC ATG AAA TCC TTG CTG TGC CTT CCA TCT    200
Ser Gln Val Ser Ser Ala Val Met Lys Ser Leu Leu Cys Leu Pro Ser
     35                  40                  45

TCT ATC TCC TGT GCC CAG ACT CCC TGC ATC CCC AAG GAA GGG GCA TCT    248
Ser Ile Ser Cys Ala Gln Thr Pro Cys Ile Pro Lys Glu Gly Ala Ser
 50                  55                  60                  65

CCA ACA TCA TCA TCC AAC GAA GAC TCA GCT GCA AAT GGT TCT GCT GAA    296
Pro Thr Ser Ser Ser Asn Glu Asp Ser Ala Ala Asn Gly Ser Ala Glu
                 70                  75                  80

ACA TCT GCC TTG GAC ACA GGG TTC TCG CTC AAC CTT TCA GAG CTG AGA    344
Thr Ser Ala Leu Asp Thr Gly Phe Ser Leu Asn Leu Ser Glu Leu Arg
             85                  90                  95

GAA TAT ACA GAG GGT CTC ACG GAA GCC AAG GAA GAC GAT GAT GGG GAC    392
Glu Tyr Thr Glu Gly Leu Thr Glu Ala Lys Glu Asp Asp Asp Gly Asp
        100                 105                 110

CAC AGT TCC CTT CAG TCT GGT CAG TCC GTT ATC TCC CTG CTG AGC TCA    440
His Ser Ser Leu Gln Ser Gly Gln Ser Val Ile Ser Leu Leu Ser Ser
    115                 120                 125

GAA GAA TTA AAA AAA CTC ATC GAG GAG GTG AAG GTT CTG GAT GAA GCA    488
Glu Glu Leu Lys Lys Leu Ile Glu Glu Val Lys Val Leu Asp Glu Ala
130                 135                 140                 145

ACA TTA AAG CAA TTA GAC GGC ATC CAT GTC ACC ATC TTA CAC AAG GAG    536
Thr Leu Lys Gln Leu Asp Gly Ile His Val Thr Ile Leu His Lys Glu
                150                 155                 160

GAA GGT GCT GGT CTT GGG TTC AGC TTG GCA GGA GGA GCA GAT CTA GAA    584
```

```
Glu Gly Ala Gly Leu Gly Phe Ser Leu Ala Gly Gly Ala Asp Leu Glu
                165                 170                 175

AAC AAG GTG ATT ACG GTT CAC AGA GTG TTT CCA AAT GGG CTG GCC TCC   632
Asn Lys Val Ile Thr Val His Arg Val Phe Pro Asn Gly Leu Ala Ser
        180                 185                 190

CAG GAA GGG ACT ATT CAG AAG GGC AAT GAG GTT CTT TCC ATC AAC GGC   680
Gln Glu Gly Thr Ile Gln Lys Gly Asn Glu Val Leu Ser Ile Asn Gly
    195                 200                 205

AAG TCT CTC AAG GGG ACC ACG CAC CAT GAT GCC TTG GCA ATC CTC CGC   728
Lys Ser Leu Lys Gly Thr Thr His His Asp Ala Leu Ala Ile Leu Arg
210                 215                 220                 225

CAA GCT CGA GAG CCC AGG CAA GCT GTG ATT GTC ACA AGG AAG CTG ACT   776
Gln Ala Arg Glu Pro Arg Gln Ala Val Ile Val Thr Arg Lys Leu Thr
                230                 235                 240

CCA GAG GCC ATG CCC GAC CTC AAC TCC TCC ACT GAC TCT GCA GCC TCA   824
Pro Glu Ala Met Pro Asp Leu Asn Ser Ser Thr Asp Ser Ala Ala Ser
            245                 250                 255

GCC TCT GCA GCC AGT GAT GTT TCT GTA GAA TCT ACA GCA GAG GCC ACA   872
Ala Ser Ala Ala Ser Asp Val Ser Val Glu Ser Thr Ala Glu Ala Thr
        260                 265                 270

GTC TGC ACG GTG ACA CTG GAG AAG ATG TCG GCA GGG CTG GGC TTC AGC   920
Val Cys Thr Val Thr Leu Glu Lys Met Ser Ala Gly Leu Gly Phe Ser
    275                 280                 285

CTG GAA GGA GGG AAG GGC TCC CTA CAC GGA GAC AAG CCT CTC ACC ATT   968
Leu Glu Gly Gly Lys Gly Ser Leu His Gly Asp Lys Pro Leu Thr Ile
290                 295                 300                 305

AAC AGG ATT TTC AAA GGA GCA GCC TCA GAA CAA AGT GAG ACA GTC CAG  1016
Asn Arg Ile Phe Lys Gly Ala Ala Ser Glu Gln Ser Glu Thr Val Gln
                310                 315                 320

CCT GGA GAT GAA ATC TTG CAG CTG GGT GGC ACT GCC ATG CAG GGC CTC  1064
Pro Gly Asp Glu Ile Leu Gln Leu Gly Gly Thr Ala Met Gln Gly Leu
            325                 330                 335

ACA CGG TTT GAA GCC TGG AAC ATC ATC AAG GCA CTG CCT GAT GGA CCT  1112
Thr Arg Phe Glu Ala Trp Asn Ile Ile Lys Ala Leu Pro Asp Gly Pro
        340                 345                 350

GTC ACG ATT GTC ATC AGG AGA AAA AGC CTC CAG TCC AAG GAA ACC ACA  1160
Val Thr Ile Val Ile Arg Arg Lys Ser Leu Gln Ser Lys Glu Thr Thr
    355                 360                 365

GCT GCT GGA GAC TCC TAG                                         1178
Ala Ala Gly Asp Ser  *
370                 375
```

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 375 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

```
Met Pro Ser Gln Arg Ala Arg Ser Phe Pro Leu Thr Arg Ser Gln Ser
 1               5                  10                  15

Cys Glu Thr Lys Leu Leu Asp Glu Lys Thr Ser Lys Leu Tyr Ser Ile
            20                  25                  30

Ser Ser Gln Val Ser Ser Ala Val Met Lys Ser Leu Leu Cys Leu Pro
        35                  40                  45

Ser Ser Ile Ser Cys Ala Gln Thr Pro Cys Ile Pro Lys Glu Gly Ala
    50                  55                  60

Ser Pro Thr Ser Ser Ser Asn Glu Asp Ser Ala Ala Asn Gly Ser Ala
65                  70                  75                  80

Glu Thr Ser Ala Leu Asp Thr Gly Phe Ser Leu Asn Leu Ser Glu Leu
                85                  90                  95

Arg Glu Tyr Thr Glu Gly Leu Thr Glu Ala Lys Glu Asp Asp Asp Gly
            100                 105                 110

Asp His Ser Ser Leu Gln Ser Gly Gln Ser Val Ile Ser Leu Leu Ser
        115                 120                 125

Ser Glu Glu Leu Lys Lys Leu Ile Glu Glu Val Lys Val Leu Asp Glu
    130                 135                 140

Ala Thr Leu Lys Gln Leu Asp Gly Ile His Val Thr Ile Leu His Lys
145                 150                 155                 160

Glu Glu Gly Ala Gly Leu Gly Phe Ser Leu Ala Gly Gly Ala Asp Leu
                165                 170                 175

Glu Asn Lys Val Ile Thr Val His Arg Val Phe Pro Asn Gly Leu Ala
            180                 185                 190

Ser Gln Glu Gly Thr Ile Gln Lys Gly Asn Glu Val Leu Ser Ile Asn
        195                 200                 205

Gly Lys Ser Leu Lys Gly Thr Thr His His Asp Ala Leu Ala Ile Leu
    210                 215                 220

Arg Gln Ala Arg Glu Pro Arg Gln Ala Val Ile Val Thr Arg Lys Leu
225                 230                 235                 240
```

```
Thr Pro Glu Ala Met Pro Asp Leu Asn Ser Ser Thr Asp Ser Ala Ala
                245                 250                 255

Ser Ala Ser Ala Ala Ser Asp Val Ser Val Glu Ser Thr Ala Glu Ala
            260                 265                 270

Thr Val Cys Thr Val Thr Leu Glu Lys Met Ser Ala Gly Leu Gly Phe
        275                 280                 285

Ser Leu Glu Gly Gly Lys Gly Ser Leu His Gly Asp Lys Pro Leu Thr
    290                 295                 300

Ile Asn Arg Ile Phe Lys Gly Ala Ala Ser Glu Gln Ser Glu Thr Val
305                 310                 315                 320

Gln Pro Gly Asp Glu Ile Leu Gln Leu Gly Gly Thr Ala Met Gln Gly
                325                 330                 335

Leu Thr Arg Phe Glu Ala Trp Asn Ile Ile Lys Ala Leu Pro Asp Gly
            340                 345                 350

Pro Val Thr Ile Val Ile Arg Arg Lys Ser Leu Gln Ser Lys Glu Thr
        355                 360                 365

Thr Ala Ala Gly Asp Ser  *
    370                 375
```

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 7 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

```
Arg Lys Leu Thr Pro Glu Ala
1               5
```

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 6 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

Arg Lys Leu Thr Pro Glu
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 5 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

Arg Lys Leu Thr Pro
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 4 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

Arg Lys Leu Thr
1

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 3 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

Arg Lys Leu
1

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 7 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

Leu Thr Pro Glu Ala Met Pro
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 9:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 6 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

Leu Thr Pro Glu Ala Met
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 10:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 5 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:

Leu Thr Pro Glu Ala
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 11:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 4 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11:

Leu Thr Pro Glu
1

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 12:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 3 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 12:

Leu Thr Pro
1

Patentansprüche

1. Nukleinsäure, mit welcher die Expression eines Polypeptids mit Interleukin-16-Aktivität in einer prokaryontischen oder eukaryontischen Wirtszelle erreicht werden kann, wobei die genannte Nukleinsäure im für das genannte Polypeptid codierenden Bereich

   a) der DNA-Sequenz Nukleotide 54-1175 SEQ ID NO:1 oder ihrem komplementären Strang entspricht,
   b) hybridisiert unter stringenten Bedingungen mit der DNA der Sequenz Nukleotide 54-785 aus SEQ ID NO:1,
   c) hybridisiert unter stringenten Bedingungen mit der DNA-Sequenz Nukleotide 786-1175 aus SEQ ID NO:1 und am 5'-Ende mit der DNA-Sequenz Nukleotide 756-786 aus SEQ ID NO:1 oder einem Teil davon beginnt, der für einen Teil der Sequenz Aminosäure 235-244 aus SEQ ID NO:1 codiert, oder
   d) eine Nukleinsäuresequenz ist, die ohne die Degeneration des genetischen Codes mit den durch a) und b) definierten Nukleinsäuresequenzen unter stringenten Bedingungen hybridisieren würde.

2. Nukleinsäure nach Anspruch 1, die Interleukin-16 von Primaten codiert.

3. Prokaryontische oder eukaryontische Wirtszelle, welche mit einer Nukleinsäure nach den Ansprüchen 1 oder 2 so transformiert oder transfiziert ist, daß die Wirtszelle das genannte Polypeptid exprimiert.

4. Biologisch funktioneller Nukleinsäurevektor, der eine Nukleinsäure gemäß Anspruch 1 oder 2 enthält.

5. Polypeptid mit IL-16-Aktivität, welches von einer Nukleinsäure codiert wird, welche

   a) der DNA-Sequenz Nukleotide 54-1175 SEQ ID NO:1 oder ihrem komplementären Strang entspricht,
   b) hybridisiert unter stringenten Bedingungen mit der DNA der Sequenz Nukleotide 54-785 aus SEQ ID NO:1,
   c) hybridisiert unter stringenten Bedingungen mit der DNA-Sequenz Nukleotide 786-1175 aus SEQ ID NO:1 und am 5'-Ende mit der DNA-Sequenz Nukleotide 756-

786 aus SEQ ID NO:1 oder einem Teil davon beginnt, der für einen Teil der Sequenz Aminosäure 235-244 aus SEQ ID NO:1 codiert.

6. Polypeptid nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß es gegenüber natürlich vorkommendem humanem IL-16 eine verbesserte Aktivität und ein Molekulargewicht von 13,9-39 kD in der monomeren Form besitzt.

7. Polypeptid nach den Ansprüchen 5 oder 6, wie es als Produkt einer prokaryontischen oder eukaryontischen Expression im wesentlichen frei von anderen Humanproteinen erhältlich ist.

8. Polypeptid mit Interleukin-16-Aktivität, dadurch gekennzeichnet, daß es ein Multimeres aus einer definierten Anzahl von Untereinheiten darstellt, wobei das Polypeptid aus den Ansprüchen 5 bis 7 eine Untereinheit ist.

9. Polypeptid nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß es aus 4 bis 32 Untereinheiten besteht.

10. Verfahren zur Herstellung eines Polypeptids nach den Ansprüchen 5 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß eine prokaryontische oder eukaryontische Wirtszelle, die mit einer Nukleinsäuresequenz nach den Ansprüchen 1 oder 2 transformiert oder transfiziert ist, unter geeigneten Nährbedingungen, gegebenenfalls in Gegenwart von Metallionen, kultiviert wird und das gewünschte Polypeptid gegebenenfalls isoliert wird.

11. Pharmazeutische Zusammensetzung, die ein Polypeptid nach den Ansprüchen 5 bis 9 sowie ein pharmazeutisch geeignetes Verdünnungsmittel, Adjuvans und/oder Trägermittel enthält.

12. Antikörper, welcher an den Teil eines Polypeptids mit Interleukin-16-Aktivität bindet, welches von der Sequenz Aminosäure 1-244 aus SEQ ID NO:1 dargestellt ist.

13. Antikörper nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß er nicht in wesentlichem Umfang an ein Polypeptid der Sequenz Aminosäure 245-374 aus SEQ ID NO:1 bindet.

14. Pharmazeutische Zusammensetzung enthaltend Interleukin-16 nach den Ansprüchen 5 bis 9 in einer für eine therapeutische Anwendung ausreichenden Menge.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte onal Application No
PCT/EP 96/05662

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C12N15/24 C07K14/54 C07K1/113 C07K16/24 A61K38/19
C12N15/70 C12N1/21 //(C12N1/21,C12R1:19)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 C12N C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PROC.NATL.ACAD.SCI.USA, vol. 91, May 1994, pages 5109-5113, XP002028072 CRUIKSHANK W.W. ET AL. : "Molecular and functional analysis of a lymphocyte chemoattractant factor: Association of biologic function with CD4 expression." cited in the application	5-11,14
A	see the whole document, in particular figure 2	1-4,12, 13

X	WO 94 28134 A (UNIV BOSTON) 8 December 1994 cited in the application	5-11,14
A	see the whole document, in particular SEQ.IDs. 1 and 2	1-4,12, 13

	-/--	

[X] Further documents are listed in the continuation of box C.

[X] Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

2

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
14 April 1997	24.04.97
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+ 31-70) 340-3016	Authorized officer Mandl, B

Form PCT ISA/210 (second sheet) (July 1992)

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	NATURE, vol. 378, 7 December 1995, page 563 XP002016117 BAIER M. ET AL. : "HIV suppression by interleukin 16." cited in the application see the whole document	5-11,14
P,X	EP 0 736 600 A (BUNDESREP DEUTSCHLAND) 9 October 1996 see the whole document & WO 96 31607 A cited in the application	5-11,14
T	IMMUNOLOGY TODAY, vol. 17, no. 10, October 1996, pages 476-481, XP002028073 CENTER D.M. ET AL.: "Interleukin 16 and its function as a CD4 ligand." see the whole document	1-14
T	JOURNAL OF ALLERGY AND CLINICAL IMMUNOLOGY, vol. 99, no. 1, part 2, January 1997, page s54 XP000670246 CHUPP G. ET AL.: "Pro-IL-16 is an 80 kDa cytoplasmic protein expressed in blood T-lymphocytes." see abstract 224	1-14
T	JOURNAL OF ALLERGY AND CLINICAL IMMUNOLOGY, vol. 99, no. 1, part 2, January 1997, page s54 XP002028074 WU D.M.H.: "Cloning and functional characterization of the murine CD4 ligand interleukin-16." see abstract 222	1-14

2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Inte onal Application No
PCT/EP 96/05662

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9428134 A	08-12-94	EP 0700439 A	13-03-96
		JP 8510907 T	19-11-96
EP 0736600 A	09-10-96	DE 19513152 A	10-10-96
		AU 5686196 A	23-10-96
		WO 9631607 A	10-10-96

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 96/05662

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 C12N15/24 C07K14/54 C07K1/113 C07K16/24 A61K38/19
C12N15/70 C12N1/21 //(C12N1/21,C12R1:19)

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 6 C12N C07K A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	PROC.NATL.ACAD.SCI.USA, Bd. 91, Mai 1994, Seiten 5109-5113, XP002028072 CRUIKSHANK W.W. ET AL. : "Molecular and functional analysis of a lymphocyte chemoattractant factor: Association of biologic function with CD4 expression." in der Anmeldung erwähnt	5-11,14
A	siehe das ganze Dokument, besonders Abbildung 2	1-4,12, 13

X	WO 94 28134 A (UNIV BOSTON) 8.Dezember 1994 in der Anmeldung erwähnt	5-11,14
A	siehe das ganze Dokument, besonders SEQ.IDs. 1 and 2	1-4,12, 13
	--- -/--	

[X] Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

[X] Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zumVerständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
14.April 1997	24. 04. 97
Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+ 31-70) 340-3016	**Bevollmächtigter Bediensteter** Mandl, B

Formblatt PCT/ISA/210 (Blatt 2) (Juli 1992)

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	NATURE, Bd. 378, 7.Dezember 1995, Seite 563 XP002016117 BAIER M. ET AL. : "HIV suppression by interleukin 16." in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	5-11,14
P,X	EP 0 736 600 A (BUNDESREP DEUTSCHLAND) 9.Oktober 1996 siehe das ganze Dokument & WO 96 31607 A in der Anmeldung erwähnt ---	5-11,14
T	IMMUNOLOGY TODAY, Bd. 17, Nr. 10, Oktober 1996, Seiten 476-481, XP002028073 CENTER D.M. ET AL.: "Interleukin 16 and its function as a CD4 ligand." siehe das ganze Dokument ---	1-14
T	JOURNAL OF ALLERGY AND CLINICAL IMMUNOLOGY, Bd. 99, Nr. 1, part 2, Januar 1997, Seite s54 XP000670246 CHUPP G. ET AL.: "Pro-IL-16 is an 80 kDa cytoplasmic protein expressed in blood T-lymphocytes." siehe Zusammenfassung 224 ---	1-14
T	JOURNAL OF ALLERGY AND CLINICAL IMMUNOLOGY, Bd. 99, Nr. 1, part 2, Januar 1997, Seite s54 XP002028074 WU D.M.H.: "Cloning and functional characterization of the murine CD4 ligand interleukin-16." siehe Zusammenfassung 222 -----	1-14

2

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 96/05662

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9428134 A	08-12-94	EP 0700439 A	13-03-96
		JP 8510907 T	19-11-96
EP 0736600 A	09-10-96	DE 19513152 A	10-10-96
		AU 5686196 A	23-10-96
		WO 9631607 A	10-10-96