



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 698 37 897 T2** 2008.03.06

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 481 990 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **698 37 897.0**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **04 010 433.3**

(96) Europäischer Anmeldetag: **20.11.1998**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **01.12.2004**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **06.06.2007**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **06.03.2008**

(51) Int Cl.⁸: **C07K 14/705** (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

66364 P **21.11.1997** **US**

78936 P **20.03.1998** **US**

PCT/US98/19437 **17.09.1998** **WO**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(73) Patentinhaber:

Genentech Inc., San Francisco, Calif., US

(72) Erfinder:

**Ashkenazi, Avi, San Mateo, CA 94402, US; Fong,
Sherman, Alameda, CA 94502, US; Goddard,
Audrey, San Francisco, CA 94131, US; Gurney,
Austin L., Belmont, CA 94002, US; Napier, Mary A.,
Hillsborough, CA 94010, US; Tumas, Daniel,
Orinda, CA 94563, US; Wood, William I.,
Hillsborough, CA 94010, US**

(74) Vertreter:

LEINWEBER & ZIMMERMANN, 80331 München

(54) Bezeichnung: **Mit A33 verwandte Antigene und deren pharmazeutische Verwendungen**

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

FACHGEBIET DER ERFINDUNG

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft im Allgemeinen die Identifikation, Isolierung und rekombinante Produktion von neuer DNA und neuen Polypeptiden, deren Gegenwart mit Entzündungserkrankungen (mit Entzündung assoziierten Antigenen) und/oder Krebs assoziiert ist, und Zusammensetzungen und Verfahren zur Diagnose und Behandlung von Leiden, die durch solche Antigene charakterisiert sind.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0002] Die Entzündungsreaktion ist komplex und wird durch eine Vielzahl von Signalmolekülen vermittelt, die lokal durch Mastzellen, Nervenendungen, Plättchen, Leukozyten und Komplementaktivierung produziert werden. Bestimmte dieser Signalgebungsmoleküle verursachen, dass die Endothelzellanordnung poröser wird und/oder Selectine exprimiert, die als Zelloberflächenmoleküle wirken, die Leukozyten erkennen und durch spezifische Kohlenhydraterkennung anziehen. Stärkere Leukozytenbindung wird durch Integrine vermittelt, welche die Leukozytenbewegung durch das Endothel vermitteln. Weitere Signalgebungsmoleküle wirken als chemische Lockstoffe, was zur Folge hat, dass gebundene Leukozyten sich in Richtung der Quelle des Lockstoffs bewegen. Andere Signalgebungsmoleküle, die im Verlauf einer Entzündungsreaktion gebildet werden, entweichen in das Blut und stimulieren das Knochenmark, um mehr Leukozyten zu produzieren und sie in den Blutstrom freizusetzen.

[0003] Entzündung wird typischerweise durch ein Antigen initiiert, das im Wesentlichen jegliches Molekül sein kann, das in der Lage ist, eine Immunantwort zu initiieren. Unter normalen physiologischen Bedingungen sind diese fremde Moleküle, aber Moleküle, die vom Organismus selbst erzeugt werden, können als Katalysator dienen, wie es, wie bekannt ist, bei verschiedenen Erkrankungszuständen auftritt.

[0004] T-Zellproliferation in einer gemischten Lymphozytenkultur oder gemischten Lymphozytenreaktion (MLR) ist ein etabliertes Anzeichen für die Fähigkeit einer Verbindung, das Immunsystem zu stimulieren. In einer Entzündungsreaktion können die entsprechenden Leukozyten neurophil, eosinophil, monozytisch oder lymphozytisch sein. Histologische Untersuchung der betroffenen Gewebe stellt Beweise für eine immunstimulierende oder hemmende Antwort bereit. Siehe Current Protocols in Immunology, Hrsg. John E. Coligan, John Wiley and Sons, Inc. (1994).

[0005] Entzündliche Darmerkrankung (IBD) ist ein Begriff, der verwendet wird, um kollektiv Darmerkrankungen zu beschreiben, die sowohl Colitis ulcerosa (UC) und Crohn-Erkrankung umfassen, wovon beide als unterschiedliche Erkrankungen klassifiziert sind, aber gemeinsame Eigenschaften und wahrscheinlich Pathologie teilen. Die Gemeinsamkeit der diagnostischen Kriterien kann es schwierig machen, genau zu bestimmen, welche der beiden Erkrankungen ein Patient aufweist, jedoch unterscheiden sich Art und Ort der Läsion in jedem Fall typischerweise voneinander. UC-Läsionen sind charakteristischerweise ein oberflächliches Geschwür der Mucosa und treten im Colon, nahe dem Rektum, auf. CD-Läsionen sind charakteristischerweise ausgedehnte lineare Risse und können irgendwo im Darm auftreten, gelegentlich sind Magen, Speiseröhre und Duodenum involviert.

[0006] Herkömmliche Behandlungen für IBD umfassen für gewöhnlich die Verabreichung eines entzündungshemmenden oder immunsupprimierenden Mittels, wie z.B. Sulfasalazin, Corticosteroide, 6-Mercaptopurin/Azathioprin oder Cyclosporin, wovon alle nur eine partielle Entlastung für den betroffenen Patienten erbringen. Wenn jedoch entzündungshemmende/Immunsuppressiva-Therapien versagen, sind Kolektomien die letzte Verteidigungsmaßnahme. Chirurgie ist bei etwa 30 % der CD-Patienten innerhalb des ersten Jahres nach Diagnose erforderlich, mit der Wahrscheinlichkeit eines operativen Verfahrens, die danach jährlich um etwa 5 % steigt. Leider weist CD auch eine hohe Wiederauftretensrate auf, da etwa 5 % der Patienten nach dem ersten Jahr nachfolgende Chirurgie benötigen. UC-Patienten weisen weiters ein im Wesentlichen erhöhtes Risiko auf, kolorektalen Krebs zu entwickeln. Vermutlich ist dies auf die wiederkehrenden Zyklen von Schäden am Epithel zurückzuführen, gefolgt von erneutem Wachstum, das kontinuierlich das Risiko von neoplastischer Transformation erhöht.

[0007] Ein jüngst entdeckter Angehöriger der Immunglobulinüberfamilie, der als Verbindungadhäsionsmolekül (Junctional Adhesion Molecule, JAM) bekannt ist, ist identifiziert worden, um selektiv an interzellulären Kontaktstellen von Endothel- und Epithelzellen von unterschiedlichen Ursprüngen konzentriert zu werden. I. Martin-Padura et al., J. Cell Biol. 142 (1), 117-27 (1998). JAM ist ein Typ-I Integralmembranprotein mit zwei extra-

zellulären Intrakettendisulfidschleifen vom V-Typ. JAM trägt wesentliche Homologie zu A33-Antigen (**Fig. 1** oder **Fig. 18**). Es wurde festgestellt, dass ein monoklonaler Antikörper, der gegen JAM gerichtet ist, diese spontane und chemokininduzierte Monozytentransmigration durch eine Endothelzellmonoschicht *in vitro* hemmt. Martin-Padura, siehe oben.

[0008] Es ist vor kurzem festgestellt worden, dass JAM-Expression im Colon von CRF-2-4(-/-)-Mäusen mit Colitis erhöht wird. CRF 2-4 -/- (IL-10R-Untereinheitknockoutmäuse) entwickeln eine spontane Colitis, die durch Lymphozyten, Monozyten und Neutrophile vermittelt wird. Mehrere der Tiere entwickelten auch Colondenokarzinom. Als Folge ist es vorhersehbar wahrscheinlich, dass die Verbindungen der Erfindung in erhöhten Ausmaßen bei menschlichen Erkrankungen exprimiert werden oder auf andere Weise mit diesen assoziiert sind, wie z.B. entzündlicher Darmerkrankung, anderen entzündlichen Erkrankungen des Darms sowie kolorektalem Karzinom.

[0009] Die Verbindungen der Erfindung tragen auch signifikante Homologie zu A33-Antigen, einem bekannten kolorektalen krebsassoziierten Marker. Das A33-Antigen wird in mehr als 90 % von primärem oder metastatischem Colonkrebs sowie normalem Colonepithel exprimiert. Bei Karzinomen, die aus der Colonmucosa entstanden sind, wird das A33-Antigen in mehr als 95 % der Fälle homogen exprimiert. Das A33-Antigen wurde jedoch nicht in einem großen Bereich anderer normaler Gewebe nachgewiesen, d.h. seine Expression scheint organspezifisch zu sein. Deshalb scheint das A33-Antigen eine wichtige Rolle in der Induktion von kolorektalem Krebs zu spielen.

[0010] Da Colonkrebs eine weitverbreitete Erkrankung ist, ist die frühe Diagnose und Behandlung ein wichtiges medizinisches Ziel. Diagnose und Behandlung von Colonkrebs können unter Einsatz monoklonaler Antikörper (mAk), welche dafür spezifisch sind und über Fluoreszenz, kernmagnetische oder radioaktive Markierungen verfügen, implementiert werden. Ein radioaktives Gen, Toxine und/oder arzneimittelmarkierte MAK können zur In-situ-Behandlung mit minimaler Patientenbeschreibung verwendet werden. MAKs können auch zur Diagnose während der Diagnose und Behandlung von Colonkrebs verwendet werden. Zum Beispiel wenn die Serumspiegel des A33-Antigens bei einem Patienten erhöht sind, zeigt ein Abfallen der Werte nach Chirurgie, dass die Tumoresektion erfolgreich war. Andererseits zeigt ein nachfolgender Anstieg der Serum-A33-Antigenwerte nach Chirurgie, dass sich Metastasen des ursprünglichen Tumors gebildet haben oder dass neue primäre Tumoren aufgetreten sind.

[0011] Solche monoklonalen Antikörper können anstelle von oder in Verbindung mit Chirurgie und/oder anderen Chemotherapien verwendet werden. Zum Beispiel sind präklinische Analyse- und Lokalisierungsstudien bei Patienten, die mit kolorektalem Karzinom mit einem mAk gegen A33 infiziert sind, in Welt et al., J. Clon. Oncol. 8, 1894-1906 (1990), und Welt et al., J Clin. Oncol. 12, 1561-1571 (1994), beschrieben, während US 4.579.827 und USSN 424.991 (EP 199.141) auf die therapeutische Verabreichung von monoklonalen Antikörpern ausgerichtet sind, wovon Letztere die Anwendung von Anti-A33-mAk betrifft.

[0012] WO98/40483 und WO 98/42739, welche am oder nach dem dritten Prioritätsdatum der vorliegenden Anmeldung veröffentlicht wurden, offenbaren Sequenzen, die jenen von PRO245 ähnlich sind.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0013] Die vorliegende Erfindung betrifft weiters Zusammensetzungen und Verfahren zur Diagnose und Behandlung von Entzündungserkrankungen bei Säugetieren, einschließlich Menschen. Die vorliegende Erfindung basiert auf der Identifikation von Proteinen (einschließlich Agonisten- und Antagonistenantikörpern), welche die Immunantwort bei Säugetieren entweder stimulieren oder hemmen. Entzündungserkrankungen können durch die Unterdrückung der Entzündungsreaktion behandelt werden. Moleküle, die eine Entzündungsreaktion verstärken, stimulieren oder potenzieren die Immunantwort auf ein Antigen. Moleküle, die eine Immunantwort stimulieren, können gehemmt werden, wo eine Unterdrückung der Entzündungsreaktion von Vorteil ist. Moleküle, welche die Immunantwort stimulieren, können therapeutisch verwendet werden, wo die Verstärkung der Immunantwort vorteilhaft ist. Solche stimulierenden Moleküle können auch gehemmt werden, wo die Suppression der Entzündungsreaktion von Vorteil ist. Neutralisierende Antikörper sind Beispiele für Moleküle, die Moleküle hemmen, die über eine immunstimulierende Aktivität verfügen und die in der Behandlung von Entzündungserkrankungen vorteilhaft sind. Moleküle, welche die Entzündungsreaktion hemmen, können ebenfalls verwendet werden (Proteine, direkt oder über die Verwendung von Antikörperagonisten), um die Entzündungsreaktion zu hemmen und daher Entzündungserkrankungen zu lindern.

[0014] Dementsprechend dienen die Proteine der Erfindung der Diagnose und/oder Behandlung (einschließ-

lich Prävention) von immunassoziierten Erkrankungen. Antikörper, die sich an stimulierende Proteine binden, dienen der Unterdrückung der Immunantwort. Antikörper, die sich an Hemmpoteine binden, sind zur Stimulation der Entzündungsreaktion und des Immunsystems nützlich. Die Proteine und Antikörper der Erfindung dienen der Herstellung von Arzneimitteln und Medikamenten zur Behandlung von entzündlichen und immunassoziierten Erkrankungen.

[0015] Wie in den Ansprüchen definiert betrifft die Erfindung medizinische Anwendungen von PRO245-Polypeptid und Antagonisten von PRO254-Polypeptid, der eine oder mehrere Funktionen oder Aktivitäten von PRO301-, PRO362- oder PRO245-Polypeptid hemmt, zur Verwendung in einem Behandlungsverfahren.

[0016] Der PRO245-Antagonist kann zur Verwendung bei der Behandlung einer entzündlichen Erkrankung durch Verabreichung einer wirksamen therapeutischen Menge an einen Patienten dienen, der eine solche benötigt, um eine aus dem Folgenden ausgewählte Erkrankung zu behandeln: entzündliche Darmerkrankung, systemischer Lupus erythematodes, rheumatoide Arthritis, juvenile chronische Arthritis, Spondyloarthropathien, systemische Sklerose (Sclerodermia), idiopathische entzündliche Myopathien (Dermatomyositis, Polymyositis), Sjögren-Syndrom, systemische Vaskulitis, Sarkoidose, hämolytische Autoimmunämie (Immunpanzytopenie, paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie), Autoimmunthrombozytopenie (idiopathische thrombozytopenische Purpurs, immunvermittelte Thrombozytopenie), Thyreoiditis (Basedow-Krankheit, Hashimoto-Thyreoiditis, juvenile lymphozytische Thyreoiditis, atrophische Thyreoiditis), Diabetes mellitus, immunvermittelte Nierenerkrankung (Glomerulonephritis, tubulointerstitielle Nephritis), Entmarkungskrankheiten des zentralen und peripheren Nervensystems, wie z.B. multiple Sklerose, idiopathische Polyneuropathie, Leber-Gallen-Erkrankungen, wie z.B. infektiöse Hepatitis (Hepatitis A, B, C, D, E und andere nicht-hepatotrope Viren), chronische aktive Autoimmunhepatitis, primäre biliäre Leberzirrhose, granulomatöse Hepatitis und sklerosierende Cholangitis, entzündliche und fibrotische Lungenerkrankungen (z.B. zystische Fibrose, Eosinophilenpneumonien, idiopathische Lungenfibrose und exogen-allergische Alveolitis), Zöliakie, Whipple-Krankheit, Autoimmun- oder immunvermittelte Hauterkrankungen, einschließlich bullöse Hauterkrankungen, Erythema multiforme und Kontaktdermatitis, Psoriasis, allergische Erkrankungen der Lunge, wie z.B. Eosinophilenpneumonien, idiopathische Lungenfibrose und exogen-allergische Alveolitis, mit Transplantation assoziierte Erkrankungen, einschließlich Transplantatabstoßung und Transplantat-gegen-Wirt-Erkrankung.

KURZBESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0017] **Fig. 1** zeigt einen Vergleich zwischen den Polypeptiden, für welche das A33-Antigen (Seq.-ID Nr. 6), DNA40628 (Seq.-ID Nr. 1), DNA45416 (Seq.-ID Nr. 2), DNA35638 (Seq.-ID Nr. 9) und JAM (Seq.-ID Nr. 10) kodieren. DNA35638 ist hierin offenbart. DNA40628 und DNA 45416 sind in WO99/27098 offenbart, von welcher diese Anmeldung eine Teilanmeldung ist.

[0018] **Fig. 2** zeigt die Nucleotidsequenz (Seq.-ID Nr. 8) einer Nativsequenz-PRO245-cDNA, worin die Nucleotidsequenz „UNQ219“ und/oder "DNA35638" genannt wird.

[0019] **Fig. 3** zeigt die Aminosäuresequenz, die von einem Nativsequenz-PRO245-Polypeptid einer abstammt (Seq.-ID Nr. 9), für welche die Nucleotidsequenz aus **Fig. 2** kodiert (DNA35638, Seq.-ID Nr. 8).

[0020] **Fig. 4** zeigt eine Identität von 24,3 % zwischen der Aminosäuresequenz, für welche die DNA35638 (Seq.-ID Nr. 9) und A33-Antigen (Seq.-ID Nr. 6) kodiert.

[0021] **Fig. 5** zeigt eine Identität von 34,2 % zwischen der Aminosäuresequenz, für welche DNA35638 (Seq.-ID Nr. 9) und JAM (Seq.-ID Nr. 10) kodiert.

[0022] **Fig. 6** zeigt eine Identität von 26 % zwischen der Aminosäuresequenz, für welche A33-Antigen (Seq.-ID Nr. 6) und JAM (Seq.-ID Nr. 10) kodiert.

[0023] **Fig. 7** zeigt die Ergebnisse des Taqman-mRNA-Expressionstests, der in Beispiel 5 beschrieben ist.

DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER BEVORZUGTEN AUSFÜHRUNGSFORMEN

1. Definitionen

[0024] Die Begriffe „PRO245“ oder „PRO245-Polypeptid“ und „krebsassoziiertes Antigen“ umfassen bei der Verwendung hierin die Nativsequenz PRO245 und Varianten davon (die hierin weiter definiert sind). Das

PRO245 kann aus einer Vielzahl von Quellen isoliert werden, zum Beispiel aus menschlichen Gewebstypen oder aus einer anderen Quelle, oder durch Rekombinations- oder synthetische Verfahren hergestellt werden.

[0025] Die Begriffe „Entzündungserkrankung“ stehen für eine Erkrankung, bei welcher eine Komponente des Immunsystems eines Säugetiers eine Entzündungsreaktion verursacht, vermittelt oder aber dazu beiträgt, die zur Morbidität des Säugetiers führt. Es sind auch Erkrankungen enthalten, bei welchen die Stimulation oder Intervention der Entzündungsreaktion eine lindernde Wirkung auf das Fortschreiten der Erkrankung zeigt. Dieser Begriff umfasst immunvermittelte Entzündungserkrankungen.

[0026] Der Begriff „T-zellenvermittelte Erkrankung“ steht für eine Erkrankung, bei welcher T-Zellen direkt oder indirekt die Morbidität eines Säugetiers vermitteln oder aber dazu beitragen. Die T-zellvermittelte Erkrankung kann mit zellvermittelten Wirkungen, lymphokinvermittelten Wirkungen etc. und sogar Wirkungen assoziiert sein, die mit B-Zellen assoziiert sind, wenn die B-Zellen stimuliert werden, zum Beispiel von dem Lymphokinen, die von T-Zellen sekretiert werden.

[0027] Beispiele für solche immunassoziierten und entzündlichen Erkrankungen, wovon einige T-zellvermittelt sind, die gemäß der Erfindung behandelt werden können, umfassen Folgende: entzündliche Darmerkrankung, systemischer Lupus erythematodes, rheumatoide Arthritis, juvenile chronische Arthritis, Spondyloarthropathien, systemische Sklerose (Sclerodermia), idiopathische entzündliche Myopathien (Dermatomyositis, Polymyositis), Sjögren-Syndrom, systemische Vaskulitis, Sarkoidose, hämolytische Autoimmunanämie (Immundefizienz, paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie, Autoimmunthrombozytopenie (idiopathische thrombozytopenische Purpurs, immunvermittelte Thrombozytopenie), Thyreoiditis (Basedow-Krankheit, Hashimoto-Thyreoiditis, juvenile lymphozytische Thyreoiditis, atrophische Thyreoiditis), Diabetes mellitus, immunvermittelte Nierenerkrankung (Glomerulonephritis, tubulointerstitielle Nephritis), Entmarkungskrankheiten des zentralen und peripheren Nervensystems, wie z.B. multiple Sklerose, idiopathische Polyneuropathie, Leber-Gallen-Erkrankungen, wie z.B. infektiöse Hepatitis (Hepatitis A, B, C, D, E und andere nicht-hepatotrope Viren), chronische aktive Autoimmunhepatitis, primäre biliäre Leberzirrhose, granulomatöse Hepatitis und sklerosierende Cholangitis, entzündliche und fibrotische Lungenerkrankungen (z.B. zystische Fibrose), Zöliakie, Whipple-Krankheit, Autoimmun- oder immunvermittelte Hauterkrankungen, einschließlich bullöse Hauterkrankungen, Erythema multiforme und Kontaktdermatitis, Psoriasis, allergische Erkrankungen der Lunge, wie z.B. Eosinophilenpneumonien, idiopathische Lungenfibrose und exogen-allergische Alveolitis, mit Transplantation assoziierte Erkrankungen, einschließlich Transplantatabstoßung und Transplantat-gegen-Wirt-Erkrankung.

[0028] „Tumor“ bezeichnet wie hierin verwendet das gesamte neoplastische Zellwachstum und Proliferation, ob gut- oder bösartig, und alle präkanzerösen Zellen und Gewebe.

[0029] Die Begriffe „Krebs“ und „kanzerös“ bezeichnen oder beschreiben das physiologische Leiden bei Säugetieren, das typischerweise durch ein unregelmäßiges Zellwachstum gekennzeichnet ist. Beispiele für Krebs umfassen unter anderem Karzinom, Lymphom, Blastom, Sarkom und Leukämie. Genauere Beispiele für solche Krebsarten sind Brustkrebs, Prostatakrebs, Colonkrebs, Plattenepithelkarzinom, kleinzelliger Lungenkrebs, nicht-kleinzelliger Lungenkrebs, Magendarmkrebs, Pankreaskrebs, Glioblastom, Zervixkrebs, Eierstockkrebs, Leberkrebs, Blasenkrebs, Hepatom, kolorektaler Krebs, Endometriumkarzinom, Speicheldrüsenkarzinom, Nierenkrebs, Leberkrebs, Vulvakarzinom, Schilddrüsenkrebs, Leberkarzinom und verschiedene Formen von Krebs im Kopf- und Halsbereich.

[0030] „Behandlung“ ist eine Intervention, die mit der Erfindung durchgeführt wird, um die Entwicklung einer Erkrankung zu vermeiden oder Pathologie einer Erkrankung zu verändern. Dementsprechend bezeichnet „Behandlung“ sowohl die therapeutische Behandlung als auch prophylaktische oder präventive Maßnahmen. Jene, die eine Behandlung benötigen, umfassen jene, die schon eine Erkrankung aufweisen, sowie jene, bei welchen die Erkrankung vermieden werden soll. Bei der Behandlung einer immunassoziierten Erkrankung kann ein therapeutisches Mittel direkt das Ausmaß der Antwort einer Komponente der Immunantwort erhöhen oder verringern oder die Erkrankung empfindlicher auf Behandlung mit anderen therapeutischen Mitteln machen, z.B. Antibiotika, Antipilzmittel, entzündungshemmende Mittel, Chemotherapeutika etc.

[0031] Die „Pathologie“ einer immunassoziierten Erkrankung umfasst alle Phänomene, die das Wohlbefinden des Patienten umfassen. Dies umfasst ohne Einschränkung abnormes oder nicht kontrollierbares Zellwachstum (neurophile, eosinophile, monozytische, lymphozytische Zellen), Antikörperproduktion, Autoantikörperproduktion, Komplementproduktion, Interferenz mit dem normalen Funktionieren der benachbarten Zellen, Freisetzung von Cytokinen oder anderen sekretorischen Produkten bei abnormen Ausmaßen, Suppression oder Verschlechterung einer beliebigen entzündlichen oder immunologischen Antwort, Infiltration von entzündlichen

Zellen (neutrophilen, eosinophilen, monozytischen, lymphozytischen Zellen) in Zellräume etc.

[0032] Der Begriff „Säugetier“ wie hierin verwendet bezeichnet ein beliebiges Säugetier, einschließlich Menschen, Haustiere und Nutztiere und Zoo-, Sport- oder Heimtiere wie Pferde, Schweine, Rinder, Hunde, Katzen und Frettchen etc. In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist das Säugetier ein Mensch.

[0033] Verabreichung „in Kombination mit“ einem oder mehreren weiteren therapeutischen Mitteln umfasst die simultane (gleichzeitige) und aufeinander folgende Verabreichung in einer beliebigen Reihenfolge.

[0034] Der Begriff „zytotoxische Mittel“ bezeichnet wie hierin verwendet eine Substanz, welche die Funktion von Zellen hemmt oder vermeidet und/oder die Zerstörung von Zellen verursacht. Der Begriff soll radioaktive Isotope (z.B. I^{131} , I^{125} , Y^{90} und Re^{186}), Chemotherapeutika und Toxine, wie z.B. enzymatisch aktive Toxine bakteriellen, Pilz-, Pflanzen- oder tierischen Ursprungs, oder Fragmente davon umfassen.

[0035] Ein „chemotherapeutisches Mittel“ ist eine Verbindung, die zur Behandlung von Krebs nützlich ist. Beispiele für chemotherapeutische Mittel umfassen Adriamycin, Doxorubicin, Epirubicin, 5-Fluoruracil, Cytosinarabinosid („Ara-C“), Cyclophosphamid, Thiotepe, Busulfan, Cytoxin, Taxoide, z.B. Paclitaxel (Taxol[®], Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, New Jersey) und Doxetacel (Taxotere[®], Rhône-Poulenc Roher, Antony, Frankreich), Toxoter, Methotrexat, Cisplatin, Melphalan, Vinblastin, Bleomycin, Etoposid, Ifosfamid, Mitomycin-C, Mitoxantron, Vincristin (Loucristin), Vinorelbin, Carboplatin, Teniposid, Daunomycin, Carminomycin, Aminopterin, Dactinomycin, Mitomycine, Esperamicine (siehe US-Patent Nr. 4.675.187), Melphalan und andere verwandte Stickstoff-Senfgase. Diese Definition umfasst auch Hormonmittel, die wirken, um Hormonwirkung auf Tumoren zu regulieren oder zu hemmen, wie z.B. Tamoxifen und Onapriston.

[0036] Ein „wachstumshemmendes Mittel“ bezeichnet wie hierin verwendet eine Verbindung oder Zusammensetzung, die das Wachstum einer Zelle hemmt, insbesondere von Krebszellen, die beliebige der hierin identifizierten Gene exprimieren oder überexprimieren, entweder in vitro oder in vivo. Daher ist das wachstumshemmende Mittel ein Mittel, das den Prozentsatz der Zellen, die solche Gene in der S-Phase exprimieren oder überexprimieren, signifikant reduziert. Beispiele für wachstumshemmende Mittel umfassen Mittel, die das Fortschreiten des Zellzyklus (an einer anderen Stelle als die S-Phase) blockieren, wie z.B. Mittel, die G1-Stillstand und M-Phasenstillstand induzieren. Klassische M-Phasenblocker umfassen die Vincaalkaloide (Vincristin und Vinblastin), Taxol und Topo-II-Inhibitoren, wie z.B. Doxorubicin, Epirubicin, Daunorubicin, Etoposid und Bleomycin. Diese Mittel, die G1 anhalten, gehen auch in den S-Phasenstillstand über, z.B. DNA-Alkylierungsmittel, wie z.B. Tamoxifen, Prednison, Dacarbazin, Mechlorethamin, Cisplatin, Methotrexat, 5-Fluoruracil und Ara-C. Weitere Informationen sind in *The Molecular Basis of Cancer*, Mendelsohn und Israel, Hrsg., Kapitel 1 mit dem Titel „Cell cycle regulation, oncogens and antineoplastic drugs“, von Murakami et al. (WB Saunders, Philadelphia (1995)), insbesondere Seite 13, zu finden.

[0037] Der Begriff „Cytokin“ ist ein generischer Begriff für Proteine, die aus einer Zellpopulation freigesetzt werden, die auf eine andere Zelle als interzelluläre Vermittler einwirken. Beispiele für solche Cytokine sind Lymphokine, Monokine und herkömmliche Polypeptid-Hormone. Zu den Cytokinen gehören Wachstumshormon, wie z.B. menschliches Wachstumshormon, menschliches N-Methionyl-Wachstumshormon und Rinderwachstumshormon, Parathormon, Thyroxin, Insulin, Proinsulin, Relaxin, Prorelaxin, Glykoproteinhormone, wie z.B. follikelstimulierendes Hormon (FSH), thyreoidstimulierendes Hormon (TSH) und Luteinisierungshormon (LH), Leberwachstumsfaktor, Fibroblastenwachstumsfaktor, Prolactin, Placenta-Lactogen, Tumornekrosefaktor- α und - β , Müllersche hemmende Substanz, Maus-Gonadotropinassoziertes Peptid, Inhibin, Activin, Gefäßendothelwachstumsfaktor, Integrin, Thrombopoietin (TPO), Nervenwachstumsfaktoren, wie z.B. NGF- β . Blutplättchenwachstumsfaktor, transformierende Wachstumsfaktoren (TGFs), wie z.B. TGF- α und TGF- β , insulinähnlicher Wachstumsfaktor-I und -II, Erythropoietin (EPO), osteoinduktive Faktoren, Interferone wie z.B. Interferon- α , - β und - γ , koloniestimulierende Faktoren (CSFs), wie z.B. Makrophagen-CSF (M-CSF), Granulozytenmakrophagen-CSF (GM-CSF) und Granulozyten-CSF (G-CSF), Interleukine (ILs), wie z.B. IL-1, IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12, ein Tumornekrosefaktor, wie z.B. TNF- α oder TNF- β , und andere Polypeptidfaktoren, einschließlich LIF und kit-Ligand (KL). Wie hierin verwendet umfasst der Begriff Cytokin Proteine aus natürlichen Quellen oder aus rekombinanter Zellkultur und biologisch aktive Äquivalente der Cytokine mit nativer Sequenz.

[0038] Die „therapeutisch wirksame Menge“ ist die Menge von aktivem PRO245 oder -Antagonisten, die erforderlich ist, um eine messbare Inhibition oder Stimulation, je nach Fall, der entzündlichen Antwort zu erreichen.

[0039] Ein „Nativsequenz-PRO245“ umfasst ein Polypeptid mit derselben Aminosäuresequenz wie PRO245, das aus der Natur stammt. Ein solches Nativsequenz-PRO245 kann aus der Natur isoliert werden oder durch Rekombinations- oder synthetische Mittel produziert werden. Der Begriff „Nativsequenz-PRO245“ umfasst insbesondere natürlich auftretende trunkeerte oder sekretierte Formen von PRO245 (z.B. eine extrazelluläre Domänensequenz), natürlich auftretende Variantenformen (z.B. alternativ gespleißte Formen) und natürlich auftretende Allelvarianten von PRO245.

[0040] In einer Ausführungsform ist das Nativsequenz-PRO245-Polypeptid ein reifes oder Vollängen-Nativsequenz-PRO245-Polypeptid, das die Aminosäuren 1 bis 312 von [Fig. 3](#) (Seq.-ID Nr. 9) umfasst.

[0041] Die „PRO245“-Variante“ steht für ein aktives PRO245, wie nachstehend definiert, mit zumindest etwa 80 % Aminosäuresequenzidentität mit einem PRO245 mit der abgeleiteten Aminosäuresequenz, die in [Fig. 3](#) dargestellt ist (Seq.-ID Nr. 9), für ein Nativsequenz-PRO245-Polypeptid voller Länge mit oder ohne seine(r) native(n) Signalsequenz, mit oder ohne Startmethionin, mit oder ohne der/die potenzielle(n) Transmembrandomäne und mit oder ohne der/die intrazelluläre(n) Domäne. Solche PRO245-Varianten umfassen zum Beispiel PRO245-Polypeptide, worin ein oder mehrere Aminosäurereste am N- oder C-Terminus der Sequenz von [Fig. 3](#) (Seq.-ID Nr. 9) hinzugegeben oder deletiert sind. Vorzugsweise beträgt die Aminosäuresequenzidentität zumindest etwa 85 %, noch bevorzugter zumindest etwa 90 % und noch bevorzugter zumindest etwa 95 %.

[0042] „Prozentuelle (%) Aminosäuresequenzidentität“ unter Berücksichtigung von PRO245-Sequenzen, die hierin identifiziert sind, wird als Prozentsatz der Aminosäurereste in einer Kandidatensequenz definiert, die mit den Aminosäureresten in der PRO245-Sequenz identisch sind, nach Anordnung der Sequenzen und Einführung von Lücken, wenn notwendig, um die maximale prozentuelle Sequenzidentität zu erreichen, und ohne Berücksichtigung jeglicher konservativer Substitutionen als Teil der Sequenzidentität. Anordnung zum Zwecke der Bestimmung der prozentuellen Aminosäuresequenzidentität kann auf verschiedenste Arten erreicht werden, die im Fachgebiet bekannt sind, zum Beispiel unter Verwendung von öffentlich zugänglicher Computersoftware, wie z.B. BLAST, BLAST-2, ALIGN oder Megalign-Software (DNASTAR). Fachleute können geeignete Parameter zur Messung der Anordnung bestimmen, einschließlich beliebiger Algorithmen, die erforderlich sind, um maximale Anordnung über die volle Länge der verglichenen Sequenzen zu erreichen.

[0043] „Prozentuelle (%) Nucleinsäuresequenzidentität“ unter Berücksichtigung der für PRO245 kodierenden Sequenzen, die hierin identifiziert sind (DNA35638), wird als Prozentsatz der Nucleotide in einer Kandidatensequenz definiert, die mit den Nucleotiden in der für PRO245 kodierenden Sequenz identisch sind, nach Anordnung der Sequenzen und Einführung von Lücken, wenn notwendig, um die maximale prozentuelle Sequenzidentität zu erreichen. Anordnung zum Zwecke der Bestimmung der prozentuellen Nucleinsäuresequenzidentität kann auf verschiedenste Arten erreicht werden, die im Fachgebiet bekannt sind, zum Beispiel unter Verwendung von öffentlich zugänglicher Computersoftware, wie z.B. BLAST, BLAST-2, ALIGN oder Megalign-Software (DNASTAR). Fachleute können geeignete Parameter zur Messung der Anordnung bestimmen, einschließlich beliebiger Algorithmen, die erforderlich sind, um maximale Anordnung über die volle Länge der verglichenen Sequenzen zu erreichen.

[0044] „Isoliert“, wenn es zur Beschreibung der verschiedenen hierin offenbarten Polypeptide verwendet wird, steht für ein Polypeptid, das identifiziert und getrennt worden ist und/oder aus einer Komponente ihrer natürlichen Umgebung gewonnen wurde. Kontaminierende Komponenten ihrer natürlichen Umwelt sind Materialien, die typischerweise die diagnostischen oder therapeutischen Verwendungen des Polypeptids stören, und können Enzyme, Hormone und andere proteinhaltige oder nicht-proteinhaltige gelöste Stoffe umfassen. In bevorzugten Ausführungsformen wird das Polypeptid (1) durch die Verwendung eines Zentrifugenröhrchensequenzierers auf einen Grad gereinigt, der ausreichend ist, um zumindest 15 Reste von N-terminaler oder interner Aminosäuresequenz zu erhalten, oder (2) durch SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden oder reduzierenden Bedingungen unter Einsatz von Coomassie-Blau oder vorzugsweise Silberfärbung zu Homogenität gereinigt. Isoliertes Polypeptid umfasst Polypeptide in situ in rekombinanten Zellen, da zumindest eine Komponente der natürlichen Umwelt von PRO245 nicht gegenwärtig ist. Für gewöhnlich wird jedoch das isolierte Polypeptid durch zumindest einen Reinigungsschritt hergestellt.

[0045] Ein „isoliertes“, für PRO245-Polypeptid kodierendes Nucleinsäuremolekül ist ein Nucleinsäuremolekül, das aus zumindest einem kontaminierenden Nucleinsäuremolekül identifiziert und getrennt wird, mit welchem es üblicherweise in der natürlichen Quelle der Nucleinsäure assoziiert ist, die für das PRO245-Polypeptid kodiert. Ein isoliertes, für PRO245-Polypeptid kodierendes Nucleinsäuremolekül ist anders als in der Form oder Umgebung, in welcher es in Natur zu finden ist. Isolierte, für PRO245 kodierende Nucleinsäuremoleküle werden daher von dem DNA40628-Nucleinsäuremolekül unterschieden, wie es in natürlichen T-Zellen besteht.

Jedoch umfasst ein isoliertes, für PRO245-Polypeptid kodierendes Nucleinsäuremolekül für PRO245-Polypeptide kodierende Nucleinsäuremoleküle, die in Zellen enthalten sind, die PRO245-Polypeptid, für das kodiert wird, ordnungsgemäß exprimieren, wo zum Beispiel das Nucleinsäuremolekül an einem Chromosomenort vorliegt, der sich von jenem der natürlichen Zellen unterscheidet.

[0046] Der Begriff „Kontrollsequenzen“ bezieht sich auf DNA-Sequenzen, die für die Expression einer operabel gebundenen kodierenden Sequenz in einem bestimmten Wirtsorganismus notwendig sind. Die Kontrollsequenzen, die für Prokaryoten geeignet sind, umfassen zum Beispiel einen Promotor, gegebenenfalls eine Operatorsequenz und eine Ribosomenbindungsstelle. Es ist bekannt, dass eukaryotische Zellen Promotoren, Polyadenylierungssignale und Enhancer verwenden.

[0047] Nucleinsäure ist „operabel gebunden“, wenn sie in eine funktionale Beziehung mit einer anderen Nucleinsäuresequenz gesetzt wird. Zum Beispiel ist DNA für eine Präsequenz oder einen sekretorischen Leader operabel an DNA für ein Polypeptid gebunden, wenn es als Präprotein exprimiert wird, das an der Sekretion des Polypeptids teilnimmt; ein Promotor oder Enhancer ist operabel an eine kodierende Sequenz gebunden, wenn er die Transkription der Sequenz beeinflusst; eine Ribosomenbindungsstelle ist operabel an eine kodierende Sequenz gebunden, wenn sie die Transkription der Sequenz beeinflusst; oder eine Ribosomenbindungsstelle ist operabel an eine kodierende Sequenz gebunden, wenn sie positioniert ist, um Translation zu erleichtern. Im Allgemeinen steht „operabel gebunden“ dafür, dass die gebundenen DNA-Sequenzen zusammenhängend sind und im Fall eines sekretorischen Leaders zusammenhängend und in Lesephase sind. Enhancer müssen jedoch nicht zusammenhängend sein. Bindung wird durch Ligation an herkömmliche Restriktionsstellen erreicht. Wenn es solche Stellen nicht gibt, werden die synthetischen Oligonucleotidadaptoren oder -Linker gemäß herkömmlicher Praxis verwendet.

[0048] Der Begriff „Antikörper“ wird hierin im weitesten Sinn verwendet und deckt insbesondere einzelne monoklonale Anti-PRO245-Antikörper ab (einschließlich Agonist, Antagonist und neutralisierende Antikörper) und Anti-PRO245-Antikörperzusammensetzungen mit polyepitoper Spezifität. Der Begriff „monoklonaler Antikörper“ bezieht sich wie hierin verwendet auf einen Antikörper, der aus einer Population von im Wesentlichen homogenen Antikörpern gewonnen wird, d.h. die einzelnen Antikörper, aus denen die Population besteht, sind identisch mit der Ausnahme von möglichen natürlich auftretenden Mutationen, die in geringeren Mengen gegenwärtig sein können.

[0049] „Aktiv“ oder „Aktivität“ für die hierin erwähnten Zwecke betrifft Form(en) von PRO245, welche die biologischen und/oder immunologischen Aktivitäten von nativem oder natürlich auftretendem PRO245 beibehalten. Eine bevorzugte Aktivität ist die Fähigkeit, sich an die Aktivität der Antigenbindung zu binden und diese zu beeinflussen, z.B. zu blockieren oder auf andere Weise zu modulieren. Die Aktivität umfasst vorzugsweise die Regulation, Aktivität von Krebs und/oder assoziierten Virusantigenen.

[0050] „Stringenz“ von Hybridisierungsreaktionen ist einfach von einem Fachmann zu bestimmen und ist im Allgemeinen eine empirische Berechnung abhängig von der Sondenlänge, Waschtemperatur und Salzkonzentration. Im Allgemeinen erfordern längere Sonden höhere Temperaturen für geeignetes Annealing, während kürzere Sonden niedrigere Temperaturen benötigen. Hybridisierung hängt im Allgemeinen von der Fähigkeit denaturierter DNA ab, sich erneut zu annealen, wenn komplementäre Stränge in einem Umfeld unter ihrer Schmelztemperatur gegenwärtig sind. Je höher der Grad der gewünschten Homologie zwischen der Sonde und hybridisierbaren Sequenz, desto höher die relative Temperatur, die verwendet werden kann. Als Folge zeigt sich, dass höhere relative Temperaturen die Reaktionsbedingungen stringenter machen würden, während geringere Temperaturen weniger. Für weitere Details und eine Erklärung der Stringenz von Hybridisierungsreaktionen siehe Ausubel et al., Current Protocol in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers (1995).

[0051] „Stringente Bedingungen“ oder „hohe Stringenzbedingungen“ können wie hierin definiert durch jene identifiziert werden, die (1) geringe Ionenstärke und hohe Temperatur für Waschung verwenden, zum Beispiel 0,015 M Natriumchlorid/0,0015-M Natriumcitrat/0,1 % Natriumdodecylsulfat bei 50 °C; (2) während der Hybridisierung ein Denaturierungsmittel verwenden, wie z.B. Formamid, 50 Vol-% Formamid mit 0,1 % Rinderseumalbumin/0,1 % Ficoll/0,1 % Polyvinylpyrrolidon/50 mM Natriumphosphatpuffer bei pH 6,5 mit 750 mM Natriumchlorid, 75 mM Natriumcitrat bei 42 °C, oder (3) 50 % Formamid, 5 × SSC (0,75 M NaCl, 0,075 M Natriumcitrat), 50 mM Natriumphosphat (pH 6,8), 0,1 % Natriumpyrophosphat, 5 × Denhardt-Lösung, beschallte Lachsspermien-DNA (50 µg/ml), 0,1 % SDS und 10 % Dextransulfat bei 42°C verwenden, mit Waschungen bei 42 °C in 0,2 × SSC (Natriumchlorid/Natriumcitrat) und 50 % Formamid bei 55 °C, gefolgt von einer Waschung bei hoher Stringenz bestehend aus 0,1 × SSC, die EDTA bei 55 °C enthielt.

[0052] „Moderat stringente Bedingungen“ können wie von Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, New York, Cold Spring Harbor Press (1989), beschrieben identifiziert werden und umfassen die Verwendung der Waschlösung und Hybridisierungsbedingungen (z.B. Temperatur, Ionenstärke und % SDS), die weniger stringent sind als die oben beschriebenen. Ein Beispiel für moderat stringente Bedingungen ist die Inkubation bei 37 °C über Nacht in einer Lösung, die Folgendes umfasst; 20 % Formamid, 5 × SSC (150 mM NaCl, 15 mM Trinatriumcitrat), 50 mM Natriumphosphat (pH 7,6), 5 × Denhardt-Lösung, 10 % Dextransulfat und 20 mg/ml denaturierter gescherter Lachsspermien-DNA, gefolgt von Waschung der Filter in 1 × SSC bei etwa 37-50 °C. Der Fachmann erkennt, wie die Temperatur, Ionenstärke etc. anzupassen sind, wie es notwendig ist, um Faktoren wie z.B. Sondenlänge und dergleichen Rechnung zu tragen.

[0053] Der Begriff „epitopmarkiert“ bezieht sich wie hierin verwendet auf ein chimäres Polypeptid, das ein Polypeptid der Erfindung umfasst, das an ein „Markierungspolypeptid“ fusioniert ist. Das Markierungspolypeptid hat genügend Reste, um ein Epitop bereitzustellen, gegen welches ein Antikörper hergestellt werden kann, es ist aber auch kurz genug, sodass es nicht mit der Aktivität des Polypeptids überlagert, an welches es fusioniert ist. Das Markierungspolypeptid ist vorzugsweise auch ziemlich einzigartig, sodass der Antikörper im Wesentlichen nicht mit anderen Epitopen kreuzreagiert. Geeignete Markierungspolypeptide verfügen im Allgemeinen über zumindest sechs Aminosäurereste und für gewöhnlich über zwischen etwa 8 und 50 Aminosäureresten (vorzugsweise zwischen etwa 10 und 20 Aminosäureresten).

[0054] „Aktiv“ oder „Aktivität“ im Kontext der Varianten des Polypeptids der Erfindung bezieht sich auf Form(en) der Proteine der Erfindung, welche die biologischen und/oder immunologischen Aktivitäten eines nativen oder natürlich auftretenden Polypeptids der Erfindung beibehalten.

[0055] „Biologische Aktivität“ im Kontext eines Antikörpers oder eines anderen Moleküls, das durch die hierin offenbarten Screeningtests identifiziert werden kann (z.B. ein organisches oder anorganisches kleines Molekül, Peptid etc.), wird dazu verwendet, die Fähigkeit solcher Moleküle zu beschreiben, um Infiltration von entzündlichen Zellen in ein Gewebe zu induzieren oder zu hemmen, T-Zellproliferation zu stimulieren oder zu hemmen und Lymphokinfreisetzung durch Zellen zu stimulieren oder zu hemmen. Eine andere bevorzugte Aktivität ist erhöhte vaskuläre Permeabilität oder Inhibition davon.

[0056] Der Begriff „Antagonist“ wird im breitesten Sinn verwendet und umfasst ein beliebiges Molekül, das eine biologische Aktivität eines nativen Polypeptids der hierin offenbarten Erfindung teilweise oder vollständig blockiert, hemmt oder neutralisiert. Auf ähnliche Weise wird der Begriff „Agonist“ im weitesten Sinn verwendet und umfasst ein beliebiges Molekül, das eine biologische Aktivität eines nativen Polypeptids der hierin offenbarten Erfindung nachahmt. Geeignete Agonisten- oder Antagonistenmoleküle umfassen spezifisch Agonisten- oder Antagonisten-Antikörper oder -Antikörperfragmente, Fragmente oder Aminosäuresequenzvarianten von nativen Polypeptiden der Erfindung, Peptide, kleine organische Moleküle etc.

[0057] Ein „kleines Molekül“ wird hierin so definiert, dass es ein Molekulargewicht von unter etwa 600 Dalton umfasst.

[0058] „Antikörper“ (Ak) und „Immunglobuline“ (IgG) sind Glykoproteine mit denselben strukturellen Eigenschaften. Während Antikörper Bindungsspezifität an ein spezifisches Antigen erzeugen, umfassen Immunglobuline sowohl Antikörper als auch antikörperähnliche Moleküle, denen die Antigen-Spezifität fehlt. Polypeptide letzterer Art werden z.B. in geringeren Ausmaßen durch das Lymphsystem und in erhöhten Ausmaßen durch Myelome produziert. Der Begriff „Antikörper“ wird im weitesten Sinn verwendet und deckt ohne Einschränkung spezifisch intakte monoklonale Antikörper, polyklonale Antikörper, multispezifische Antikörper (z.B. bispezifische Antikörper), die aus zumindest zwei intakten Antikörpern gebildet werden, und Antikörperfragmente ab, solange sie die gewünschte biologische Aktivität zeigen.

[0059] „Native Antikörper“ und „native Immunglobuline“ sind für gewöhnlich heterotetramere Glykoproteine von etwa 150.000 Dalton, bestehend aus zwei identischen Leicht- (L-) Ketten und zwei identischen Schwer- (H-) Ketten. Jede Leichtkette ist an eine Schwereketten durch eine kovalente Disulfidbindung gebunden, während die Zahl der Disulfidbindungen unter den Schwereketten von verschiedenen Immunglobulinisotypen variiert. Jede Schwer- und Leichtkette hat auch regelmäßig beabstandete Disulfidbrücken zwischen den Ketten. Jede Schwereketten hat an einem Ende eine variable Domäne (V_H) gefolgt von einer Reihe von konstanten Domänen. Jede Leichtkette hat eine variable Domäne an einem Ende (V_L) und eine konstante Domäne an ihrem anderen Ende; die konstante Domäne der Leichtkette wird mit der ersten konstanten Domäne der Schwereketten angeordnet, und die variable Domäne der Leichtkette wird mit der variablen Domäne der Schwereketten angeordnet. Von besonderen Aminosäureresten wird angenommen, dass sie eine Schnittfläche zwischen den variablen

Leicht- und Schwereketten Domänen bilden.

[0060] Der Begriff „variabel“ bezieht sich auf die Tatsache, dass bestimmte Abschnitte der variablen Domäne bei Antikörpern sich in der Sequenz umfassend unterscheiden, und werden in der Bindung und Spezifität jedes besonderen Antikörpers für sein besonderes Antigen verwendet. Jedoch ist die Variabilität nicht gleichmäßig innerhalb der variablen Domänen von Antikörpern verteilt. Sie ist in drei Segmenten konzentriert, die komplementaritätsbestimmende Regionen (CDRs) oder hypervariable Regionen genannt werden, sowohl in den variablen Leichtketten- als auch Schwereketten Domänen. Die höher konservierten Abschnitte der variablen Domänen werden Gerüst (FR) genannt. Die variablen Domänen der nativen Schwer- und Leichtketten umfassen jeweils vier FR-Regionen, die im Wesentlichen eine Beta-Faltblatt-Konfiguration annehmen, verbunden durch drei CDRs, die Schleifen bilden, welche die Beta-Faltblattstruktur verbinden und in einigen Fällen Teil davon sind. Die CDRs in jeder Kette werden durch die FR-Regionen in enger Nähe zusammengehalten und tragen mit den CDRs aus der anderen Kette zur Bildung der Antigenbindungsstelle von Antikörpern bei (siehe Kabat et al., NIH Publ. Nr. 91-3242, Band 1, 647-669 (1991)). Die konstanten Domänen sind nicht direkt in die Bindung eines Antikörpers an ein Antigen involviert, zeigen aber verschiedene Effektorfunktionen, wie z.B. Teilnahme des Antikörpers an einer antikörperabhängigen zellulären Toxizität.

[0061] „Antikörperfragmente“ umfassen einen Abschnitt eines intakten Antikörpers, vorzugsweise die Antigenbindungs- oder variable Region des intakten Antikörpers. Beispiele für Antikörperfragmente umfassen Fab-, Fab'-, F(ab')₂- und Fv-Fragmente, Diakörper, lineare Antikörper (Zapata et al., Protein Eng. 8 (10), 1057-1062 (1995)), einkettige Antikörpermoleküle und multispezifische Antikörper, die aus Antikörperfragmenten gebildet werden.

[0062] Papainverdau von Antikörpern produziert zwei identische Antigenbindungsfragmente, die „Fab“-Fragmente genannt werden, jeweils mit einer Antigenbindungsstelle und einem übrigbleibenden „Fc“-Fragment. Die Bezeichnung „Fc“ reflektiert die Fähigkeit, leicht zu kristallisieren. Pepsinbehandlung ergibt ein F(ab')₂-Fragment, das zwei Antigenkombinationsstellen aufweist und immer noch in der Lage ist, Antigen zu vernetzen.

[0063] „Fv“ ist das minimale Antikörperfragment, das eine vollständige Antigenerkennungs- und -bindungsstelle enthält. Diese Region besteht aus einem Dimer einer variablen Schwereketten- und einer variablen Leichtketten Domäne in enger, nicht-kovalenter Assoziation. Es geschieht in dieser Konfiguration, dass die drei CDRs jeder variablen Domäne Wechselwirken, um eine Antigenbindungsstelle auf der Oberfläche des V_H-V_L-Dimers zu definieren. Gemeinsam verleihen die sechs CDRs dem Antikörper Antigenbindungsspezifität. Jedoch hat sogar eine einzelne variable Domäne (oder die Hälfte eines Fv, das nur drei CDRs umfasst, die für ein Antigen spezifisch sind) die Fähigkeit, Antigen zu erkennen und zu binden, obgleich in einer geringeren Affinität als die gesamte Bindungsstelle.

[0064] Das Fab-Fragment enthält auch die konstante Domäne der Leichtkette und die erste konstante Domäne (CH1) der Schwerekette. Fab'-Fragmente unterscheiden sich von Fab-Fragmenten durch die Hinzufügung einiger weniger Reste am Carboxyterminus der Schwereketten-CH1-Domäne, einschließlich ein oder mehrere Cysteine aus der Antikörpergelenksregion. Fab'-SH ist die hierin verwendete Bezeichnung für Fab', in welcher der/die Cysteinrest(e) der konstanten Domänen eine freie Thiolgruppe trägt/tragen. F(ab')₂-Antikörperfragmente wurden ursprünglich als Paar von Fab'-Fragmenten produziert, die Gelenkscysteine dazwischen aufweisen. Es sind ebenfalls andere chemische Bindungen von Antikörperfragmenten bekannt.

[0065] Die „Leichtketten“ von Antikörpern (Immunglobuline) aus einer beliebigen Wirbeltierspezies können einer oder zwei verschiedenen Arten zugeordnet werden, die kappa (κ) und lambda (λ) genannt werden, basierend auf den Aminosäuresequenzen ihrer konstanten Domänen.

[0066] Abhängig von der Aminosäuresequenz der konstanten Domäne ihrer Schwereketten können Immunglobuline verschiedenen Klassen zugeordnet werden. Es gibt fünf Hauptklassen von Immunglobulinen: IgA, IgD, IgE, IgG und IgM, und mehrere dieser können weiters in Unterklassen (Isotypen) unterteilt werden, z.B. IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA und IgA2. Die konstanten Schwereketten Domänen, die den verschiedenen Klassen von Immunglobulinen entsprechen, werden α, β, ε, γ bzw. μ genannt. Es sind die Untereinheitsstrukturen und dreidimensionalen Konfigurationen von verschiedenen Klassen von Immunglobulinen bekannt.

[0067] Der Begriff „monoklonaler Antikörper“ wie hierin verwendet bezeichnet einen Antikörper, der aus einer Population von im Wesentlichen homogenen Antikörpern gewonnen wird, d.h. die individuellen Antikörper, welche die Population umfassen, sind identisch, mit Ausnahme von möglichen natürlich auftretenden Mutationen,

die in geringeren Mengen gegenwärtig sein können. Monoklonale Antikörper sind höchst spezifisch und sind auf eine einzelne Antigenstelle ausgerichtet. Weiters ist im Gegensatz zu herkömmlichen (polyklonalen) Antikörperformulierungen, die typischerweise verschiedene Antikörper umfassen, die gegen verschiedene Determinanten (Epitope) gerichtet sind, jeder monoklonale Antikörper gegen eine einzelne Determinante auf dem Antigen ausgerichtet. Zusätzlich zu ihrer Spezifität sind die monoklonalen Antikörper insofern vorteilhaft, als dass sie durch die Hybridomkultur synthetisiert werden, nicht verunreinigt durch andere Immunglobuline. Der Modifikator „monoklonal“ zeigt den Charakter des Antikörpers an, das er aus einer im Wesentlichen homogenen Population von Antikörpern erhalten wird, und soll nicht so ausgelegt werden, dass die Produktion des Antikörpers durch ein beliebiges spezielles Verfahren erforderlich ist. Zum Beispiel können die gemäß der vorliegenden Erfindung zu verwendenden monoklonalen Antikörper durch das zuerst von Kohler et al., Nature 256, 495 (1975), beschriebene Verfahren oder durch DNA-Rekombinationsverfahren (siehe z.B. US-Patent Nr. 4.816.567) hergestellt werden. Die „monoklonalen Antikörper“ können auch aus Phagenantikörperbibliotheken unter Einsatz der z.B. von Clackson et al., Nature 352, 624-628 (1991), und Marks et al., J. Mol. Biol. 222, 581-597 (1991), beschriebenen Verfahren isoliert werden. Siehe auch US-Patent Nr. 5.750.373; 5.571.698; 5.403.484 und 5.223.409, welche die Formulierung von Antikörpern unter Einsatz von Phagemid- und Phagenvektoren beschreiben.

[0068] Die hierin angeführten monoklonalen Antikörper umfassen spezifisch „chimäre“ Antikörper (Immunglobuline), in welchen ein Abschnitt der Schwer- und/oder Leichtkette mit den entsprechenden Sequenzen in Antikörpern identisch ist oder homolog zu ihnen ist, die von einer besonderen Spezies abstammen oder einer besonderen Antikörperklasse oder -Unterklasse angehören, während der Rest der Kette(n) identisch mit oder homolog zu den entsprechenden Sequenzen in Antikörpern ist, die von einer anderen Spezies abstammen oder einer anderen Antikörperklasse oder -Unterklasse angehören, sowie Fragmente solcher Antikörper, solange sie die gewünschte biologische Aktivität zeigen (US-Patent Nr. 4.816.567; Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 6851-6855 (1984)).

[0069] „Humanisierte“ Formen von nicht-menschlichen (z.B. murinen) Antikörpern sind chimäre Immunglobuline, Immunglobulinketten oder Fragmente davon (wie z.B. Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ oder andere antigenbindende Untersequenzen von Antikörpern), welche eine minimale Sequenz enthalten, die von einem nicht-menschlichen Immunglobulin stammen. Meistens sind humanisierte Antikörper menschliche Immunglobuline (Empfängerantikörper), in welchen mehrere oder alle Reste einer komplementaritätsbestimmenden Region (CDR) des Empfängers durch Reste aus einer CDR einer nicht-menschlichen Spezies (Spenderantikörper), wie z.B. einer Maus, Ratte oder eines Kaninchens, mit der gewünschten Spezifität, Affinität und Kapazität ersetzt sind. In einigen Fällen können auch bestimmte Fv-Gerüstregionenreste (FR) des menschlichen Immunglobulins durch entsprechende nicht-menschliche Reste ersetzt sein. Weiters können humanisierte Antikörper Reste umfassen, die weder in den Empfängerantikörpern noch in den importierten CDR- oder Gerüstsequenzen zu finden sind. Diese Modifikationen werden gemacht, um die Antikörperleistung weiter zu verfeinern und zu maximieren. Im Allgemeinen umfasst der humanisierte Antikörper im Wesentlichen die gesamte von zumindest einer und typischerweise zwei variablen Domänen, in welchen alle oder im Wesentlichen alle der CDR-Regionen jenen eines nicht-menschlichen Immunglobulins entsprechen und alle oder im Wesentlichen alle FR-Regionen jene einer menschlichen Immunglobulinsequenz sind. Der humanisierte Antikörper umfasst auch optimalerweise zumindest einen Abschnitt einer konstanten Immunglobulinregion (Fc), typischerweise jene eines menschlichen Immunglobulins. Für weitere Details siehe Jones et al., Nature 321, 522-525 (1986); Reichmann et al., Nature 332, 323-329 (1988), und Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2, 593-596 (1992). Der humanisierte Antikörper umfasst einen „primatisierten“ Antikörper, wo die Antigenbindungsregion des Antikörpers von einem Antikörper stammt, der durch die Immunisierung von Makakenaffen mit dem Antigen von Interesse produziert wird. Antikörper, die Reste aus Alte-Welt-Affen enthalten, sind innerhalb dieser Erfindung ebenfalls möglich. Siehe zum Beispiel US-Patent Nr. 5.658.570; 5.693.780; 5.681.722; 5.750.105 und 5.756.096.

[0070] „Einzelkettige Fv-“ oder „sFv“-Antikörperfragmente umfassen die V_H- und V_L-Domänen des Antikörpers, worin diese Domänen in einer einzigen Polypeptidkette gegenwärtig sind. Vorzugsweise umfasst das Fv-Polypeptid weiters einen Polypeptidlinker zwischen den V_H- und V_L-Domänen, die dem sFv ermöglichen, die gewünschte Struktur für die Antigenbindung zu bilden. Für einen Überblick über sFv siehe Pluckthun in: The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, Band 113, Rosenberg und Moore (Hrsg.), Springer-Verlag, New York, 269-315 (1994).

[0071] Der Begriff „Diakörper“ bezeichnet kleine Antikörperfragmente mit zwei Antigenbindungsstellen, wobei die Fragmente eine variable Schwereketten-domäne (V_H), umfassen, die an eine variable Leichtketten-domäne (V_L) in derselben Polypeptidkette gebunden ist (V_H-V_L). Durch die Verwendung eines Linkers, der zu kurz ist, um Paarung zwischen den zwei Domänen auf derselben Kette zu ermöglichen, werden die Domänen dazu ge-

zwungen, sich mit den komplementären Domänen einer anderen Kette zu paaren und zwei Antigenbindungsstellen zu schaffen. Diakörper werden detaillierter in z.B. EP 404.097; WO 93/11161 und Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 90, 6444-6448 (1993), beschrieben.

[0072] Ein „isolierter Antikörper“ ist einer, der identifiziert und aus einer Komponente seiner natürlichen Umwelt getrennt und/oder gewonnen wurde. Kontaminierende Komponenten ihrer natürlichen Umwelt sind Materialien, die in die diagnostischen oder therapeutischen Verwendungen des Antikörpers eingreifen, und können Enzyme, Hormone und andere proteinhaltige oder nichtproteinhaltige gelöste Stoffe umfassen. In bevorzugten Ausführungsformen wird die Verbindung der Erfindung (1) auf mehr als 95 Gew.-% der Verbindung gereinigt, wie durch das Lowry-Verfahren bestimmt wird, und am bevorzugtesten mehr als 99 Gew.-%, (2) auf einen ausreichenden Grad unter Verwendung eines Zentrifugenröhrchensequenzierers gereinigt, um zumindest 15 Reste der N-terminalen oder internen Aminosäuresequenz zu erhalten; oder (3) auf Homogenität durch SDS-PAGE unter reduzierenden oder nicht-reduzierenden Bedingungen unter Einsatz von Coomassie-Blau oder vorzugsweise Silberfärbung gereinigt. Eine isolierte Verbindung, z.B. Antikörper oder Polypeptid, umfasst die Verbindung in situ innerhalb rekombinanter Zellen, da zumindest eine Komponente der natürlichen Umgebung der Verbindung nicht gegenwärtig ist. Üblicherweise wird jedoch eine isolierte Verbindung durch zumindest einen Reinigungsschritt hergestellt.

[0073] Das Wort „Markierung“ bezieht sich wie hierin verwendet auf eine detektierbare Verbindung oder Zusammensetzung, die direkt oder indirekt an die Verbindung konjugiert ist, z.B. Antikörper oder Polypeptid, um eine „markierte“ Verbindung zu erzeugen. Die Markierung kann selbst detektiert werden (z.B. Radioisotopmarkierungen oder Fluoreszenzmarkierungen) oder im Fall einer enzymatischen Markierung chemische Änderung einer Substratverbindung oder -Zusammensetzung katalysieren, die detektierbar ist.

[0074] Unter „Festphase“ versteht man eine nicht-wässrige Matrix, an welcher die Verbindung der vorliegenden Erfindung anhaften kann. Beispiele für Festphasen, die hierin enthalten sind, umfassen jene, die teilweise oder vollständig aus Glas (z.B. Glas mit gesteuerter Porengröße), Polysacchariden (z.B. Agarose), Polyacrylamid, Polystyrol, Polyvinylalkohol und Silikonen gebildet sind. In bestimmten Ausführungsformen kann die Festphase abhängig vom Kontext das Well einer Testplatte umfassen, in anderen ist sie eine Reinigungssäule (z.B. eine Affinitätschromatographiesäule). Dieser Begriff umfasst auch eine diskontinuierliche Festphase von diskreten Teilchen, wie beispielsweise die in US-Patent Nr. 4.275.149 beschriebenen.

[0075] Ein „Liposom“ ist ein kleines Vesikel, bestehend aus verschiedenen Formen von Lipiden, Phospholipiden und/oder Tensid, das zur Verabreichung eines Arzneimittels (wie z.B. der hierin offenbarten Anti-ErbB2-Antikörper und optional eines chemotherapeutischen Mittels) an ein Säugetier nützlich ist. Die Komponenten des Liposoms werden üblicherweise in einer Doppelschichtformation angeordnet, ähnlich der Lipidordnung von biologischen Membranen.

[0076] Wie hierin verwendet bezeichnet der Begriff „Immunadhäsine“ antikörperähnliche Moleküle, welche die Bindungsspezifität eines heterologen Proteins (eines „Adhäsins“) mit den Effektorfunktionen von konstanten Immunglobulindomänen kombinieren. Strukturell umfassen die Immunadhäsine eine Fusion einer Aminosäuresequenz mit der gewünschten Bindungsspezifität, die eine andere ist als die Antigenerkennungs- und -bindungsstelle eines Antikörpers (d.h. ist „heterolog“), und einer konstanten Domänensequenz von Immunglobulin. Der Adhäsinteil eines Immunadhäsinsmoleküls ist typischerweise eine zusammenhängende Aminosäuresequenz, die zumindest die Bindungsstelle eines Rezeptors oder eines Liganden umfasst. Die konstante Domänensequenz von Immunglobulin im Immunadhäsine kann aus einem Immunglobulin erhalten werden, wie z.B. IgG-1-, IgG-2-, IgG-3-, oder IgG-4-Unterarten, IgA (einschließlich IgA-1 und IgA-2), IgE, IgD oder IgM.

II. Zusammensetzungen und Verfahren der Erfindung

A. Herstellung der PRO245-Polypeptide

1. PRO245-Polypeptide voller Länge

[0077] Gemeinsam mit WO99/27098, von welcher die vorliegende Anmeldung eine Teilanmeldung ist, identifiziert und isoliert sie Nucleotidsequenzen, die für Polypeptide kodieren, die in der vorliegenden Anmeldung als PRO301, PRO362 oder PRO245 bezeichnet werden. Insbesondere haben Anmelder cDNA identifiziert und isoliert, die für ein PRO245-Polypeptid kodiert, wie in den nachstehenden Beispielen detaillierter offenbart wird. Unter Einsatz von BLAST- und FastA-Sequenzanordnungscomputerprogrammen stellten die Anmelder fest, dass ein Vollängen-Nativsequenz-PRO301 voller Länge (Seq.-ID Nr. 1), -PRO362 (Seq.-ID Nr. 3) und

-PRO245 (Fig. 3, Seq.-ID Nr. 9) signifikante Homologie sowohl mit A33-Antigen als auch JAM zeigt (siehe Fig. 1, Fig. 4-Fig. 6). Dementsprechend wird derzeit davon ausgegangen, dass PRO301, das in der vorliegenden Anmeldung offenbart ist, ein neu identifiziertes Mitglied der A33-Antigenproteinfamilie ist und mit Entzündungserkrankungen, wie z.B. entzündlicher Darmerkrankung, sowie menschlichen neoplastischen Erkrankungen, wie z.B. kolorektalem Krebs, assoziiert sein kann.

2. PRO245-Varianten

[0078] Zusätzlich zu Nativsequenz-PRO245 voller Länge, das hierin beschrieben ist, ist zu nennen, dass PRO245-Varianten hergestellt werden können. PRO245-Varianten können durch die Einführung von geeigneten Nucleotidänderungen in die PRO245-DNA oder durch Synthese der gewünschten PRO245-Polypeptide erreicht werden. Für Fachleute versteht sich, dass Aminosäureänderungen Posttranslationsprozesse von PRO245, wie z.B. die Veränderung der Zahl oder Position von Glykosylierungsstellen oder Änderungen der Membranverankerungseigenschaften, verändern können.

[0079] Variationen von Nativsequenz-PRO245 voller Länge oder in verschiedenen Domänen des hierin beschriebenen PRO245 können zum Beispiel unter Verwendung beliebiger Verfahren und Richtlinien für konservative und nicht-konservative Mutationen, die z.B. in US-Patent Nr. 5.364.934 dargelegt sind, hergestellt werden. Variationen können eine Substitution, Deletion oder Insertion eines oder mehrerer Codons sein, die für das PRO245 kodieren, was im Vergleich mit Nativsequenz-PRO245 zu einer Veränderung der Aminosäuresequenz von PRO245 führt. Gegebenenfalls erfolgt die Variation durch Substitution von zumindest einer Aminosäure durch eine andere Aminosäure in einer oder mehreren Domänen von PRO245. Hinweise zur Bestimmung, welcher Aminosäurerest insertiert, substituiert oder deletiert werden kann, ohne die gewünschte Aktivität negativ zu beeinflussen, sind durch den Vergleich der Sequenz von PRO245 mit jener der homologen bekannten Proteinmoleküle und das Minimieren der Zahl der Aminosäuresequenzänderungen, die in den Regionen hoher Homologie erfolgen, zu finden. Aminosäuresubstitutionen können das Ergebnis des Ersetzens einer Aminosäure durch eine andere Aminosäure mit ähnlichen strukturellen und/oder chemischen Eigenschaften sein, wie z.B. das Ersetzen eines Leucins durch ein Serin, d.h. konservatives Ersetzen von Aminosäuren. Insertionen oder Deletionen können gegebenenfalls im Bereich von 1 bis 5 Aminosäuren liegen. Die erlaubte Variation kann durch die systematische Herstellung von Insertionen, Deletionen oder Substitutionen von Aminosäuren in der Sequenz und das Testen der resultierenden Varianten auf Aktivität in den nachstehenden Beispielen beschriebenen In-vitro-Tests bestimmt werden.

[0080] Die Variationen können unter Verwendung fachbekannter Verfahren, wie z.B. oligonucleotidvermittelter (ortsgerichteter) Mutagenese, Alaninscanning und PCR-Mutagenese, hergestellt werden. Ortsgerichtete Mutagenese [Carter et al., Nucl. Acids Res., 13, 4331 (1986), Zoller et al., Nucl. Acids Res. 10, 6487 (1987)], Kassettenmutagenese [Wells et al., Gene 34, 315 (1985)], Restriktions-Selektions-Mutagenese [Wells et al., Philos. Trans. R. Soc. London SerA 317, 415 (1986)] oder andere bekannte Verfahren können auf der klonierten DNA durchgeführt werden, um die PRO245-DNA-Variante zu produzieren.

[0081] Scanning-Aminosäureanalyse kann ebenfalls verwendet werden, um eine oder mehrere Aminosäuren entlang einer zusammenhängenden Sequenz zu identifizieren. Unter den bevorzugten Scanningaminosäuren sind relativ kleine neutrale Aminosäuren. Solche Aminosäuren umfassen Alanin, Glycin, Serin und Cystein. Alanin ist typischerweise eine bevorzugte Scanning-Aminosäure in dieser Gruppe, weil sie die Seitenketten über den Beta-Kohlenstoff hinaus eliminiert und weniger wahrscheinlich die Hauptkettenkonformation der Variante ändert. Alanin wird typischerweise auch bevorzugt, weil es die häufigste Aminosäure ist. Weiters ist es häufig sowohl an versteckten als auch exponierten Positionen zu finden [Creighton, The Proteins (W.H. Freeman & Co., N Y.); Chothia, J. Mol. Biol. 150, 1 (1976)]. Wenn Alaninsubstitution keine adäquaten Mengen von Varianten erbringt, kann eine isoterische Aminosäure verwendet werden.

3. Modifikationen von PRO245

[0082] Kovalente Modifikationen von PRO245 sind im Schutzzumfang dieser Erfindung enthalten. Eine Form von kovalenter Modifikation umfasst das Umsetzen von Aminosäureresten von PRO245, auf die abgezielt wird, mit einem organischen derivatisierenden Mittel, das in der Lage ist, mit ausgewählten Seitenketten oder N- oder C-terminalen Resten von PRO245 zu reagieren. Derivatisierung mit bifunktionalen Mitteln ist nützlich, zum Beispiel zur Vernetzung von PRO245 mit einer wasserunlöslichen Trägermatrix oder Oberfläche zur Verwendung im Verfahren zur Reinigung von Anti-PRO245-Antikörpern und vice-versa. Häufig verwendete Vernetzungsmittel umfassen z.B. 1,1-Bis(diazoacetyl)-2-phenylethan, Glutaraldehyd, N-Hydroxysuccinimidester, z.B. Ester mit 4-Azidosalicylsäure, homobifunktionale Imidoester, einschließlich Disuccinimidylester, wie z.B.

3,3'-Dithiobis(suceinimidylpropionat), bifunktionale Maleinimide, wie z.B. Bis-N-maleinimid-1,8-octan, und Mittel, wie z.B. Methyl-3-[(p-azidophenyl)dithio]propionimidat.

[0083] Andere Modifikationen umfassen Deamidierung von Glutaminy- und Asparaginyresten zu den entsprechenden Glutamyl- bzw. Aspartylresten, Hydroxylierung von Prolin und Lysin, Phosphorylierung von Hydroxylgruppen von Seryl- oder Threonylresten, Methylierung der α -Aminogruppen von Lysin-, Arginin-, und Histidinseitenketten [T.E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W.H: Freeman & Co., San Francisco, 79-86 (1983)], Acetylierung des N-terminalen Amins und Amidierung einer beliebigen C-terminalen Carboxylgruppe.

[0084] Eine andere Form von kovalenter Modifikation des PRO245-Polypeptids, das im Schutzzumfang dieser Erfindung enthalten ist, umfasst die Änderung des nativen Glykosylierungsmusters des Polypeptids. „Änderung des nativen Glykosylierungsmusters“ dient den hierin angeführten Zwecken und soll für die Deletion einer oder mehrerer Kohlenhydratgruppierungen, die in dem Nativsequenz-PRO245 zu finden sind, und/oder Hinzufügung von einer oder mehreren Glykosylierungsstellen, die im Nativsequenz-PRO245 nicht gegenwärtig sind, und/oder Änderung des Verhältnisses und/oder der Zusammensetzung von Zuckerresten, die an die Glykosylierungssteile(n) angeheftet sind, stehen.

[0085] Hinzufügung von Glykosylierungsstellen an das PRO245-Polypeptid kann durch Änderung der Aminosäuresequenz erreicht werden. Die Änderung kann zum Beispiel durch die Hinzufügung von oder Substitution durch einen oder mehrere Serin- oder Threoninreste zu Nativsequenz-PRO245 (für O-gebundene Glykosylierungsstellen) erreicht werden. Die PRO245-Aminosäuresequenz kann gegebenenfalls durch Veränderungen auf DNA-Ebene erreicht werden, insbesondere durch Mutation der DNA, die für das PRO245-Polypeptid kodiert, an vorausgewählten Basen, sodass Codons erzeugt werden, die sich in die gewünschten Aminosäuren translatieren.

[0086] Ein anderes Mittel zur Steigerung der Zahl von Kohlenhydratgruppierungen auf dem PRO245-Polypeptid erfolgt durch chemische oder enzymatische Bindung von Glykosiden an das Polypeptid. Solche Verfahren sind fachbekannt, z.B. in WO 87/05330, veröffentlicht am 11. September 1987, und in Aplin und Wriston, *CRC Crit. Rev. Biochem.* 259-306 (1981).

[0087] Entfernung von Kohlenhydratgruppierungen, die auf dem PRO245-Polypeptid gegenwärtig sind, kann chemisch oder enzymatisch oder durch Mutationsubstitution von Codons erreicht werden, die für Aminosäurereste kodierten, die als Targets für die Glykosylierung dienen. Chemische Deglykosylierungsverfahren sind fachbekannt und werden zum Beispiel von Hakimuddin et al., *Arch. Biochem. Biophys.* 259, 52 (1987), und von Edge et al., *Anal. Biochem.* 118, 131 (1981), beschrieben. Enzymatische Spaltung von Kohlenhydratgruppierungen auf Polypeptiden kann durch die Verwendung einer Vielzahl von Endo- und Exoglykosidasen wie von Thotakura et al., *Meth. Enzymol.* 138, 350 (1987), beschrieben, erreicht werden.

[0088] Eine andere Form von kovalenter Modifikation von PRO245 umfasst die Bindung des PRO245-Polypeptids an eine Vielzahl von nicht-proteinhaltigen Polymeren, z.B. Polyethylenglykol, Polypropylenglykol oder Polyoxyalkylenen, in der Art und Weise, wie es in US-Patent Nr. 4.640.835, 4.496.689; 4.301.144; 4.670.417, 4.791.192 oder 4.179.337 dargelegt ist.

[0089] PRO245 der vorliegenden Erfindung kann auch so modifiziert werden, dass ein chimäres Molekül gebildet wird, das PRO245 an ein(e) andere(s) heterologe(s) Polypeptid oder Aminosäuresequenz fusioniert umfasst. In einer Ausführungsform umfasst ein solches chimäres Molekül eine Fusion von PRO245 mit einem Markierungspolypeptid, das ein Epitop bereitstellt, an welches sich ein Anti-Markierungs-Antikörper selektiv binden kann. Die Epitopmarkierung wird im Allgemeinen an den Amino- oder Carboxylterminus von PRO245 positioniert. Die Gegenwart solcher epitopmarkierter Formen von PRO245 kann unter Einsatz eines Antikörpers gegen das Markierungspolypeptid detektiert werden. Die Bereitstellung der Epitopmarkierung ermöglicht PRO245 auch, einfach durch Affinitätsreinigung unter Einsatz eines Anti-Markierungsantikörpers oder einer anderen Form von Affinitätsmatrix, die sich an die Epitopmarkierung bindet, gereinigt zu werden. In einer alternativen Ausführungsform kann das chimäre Molekül eine Fusion von PRO245 mit einem Immunglobulin oder einer bestimmten Region eines Immunglobulins umfassen. Für eine bivalente Form des chimären Moleküls kann eine solche Fusion an die Fc-Region eines IgG-Moleküls erfolgen.

[0090] Verschiedene Markierungspolypeptide und ihre jeweiligen Antikörper sind fachbekannt. Beispiele umfassen Polyhistidin- (poly-his-) oder Polyhistidinglycin- (poly-his-gly-) Markierungen, das flu-HA-Markierungspolypeptid und seinen Antikörper 12CA5 [Field et al., *Mol. Cell Biol.* 8, 2159-2165 (1988)], die c-myc-Markie-

rung und die 8F9-, 3C7-, 6E10, G4-, B7- und 9E10-Antikörper dagegen [Evan et al., *Molecular and Cellular Biology* 5, 3610-3616 (1985)] und die Herpes-simplex-Virus-Glykoprotein-D- (gD) Markierung und ihre Antikörper [Paborsky et al., *Protein Engineering* 3(6), 547-553 (1990)]. Andere Markierungspolypeptide umfassen das Flag-Peptid [Hopp et al., *Biotechnology* 6, 1204-1210 (1988)], das KT3-Epitopeptid [Martin et al., *Science* 255, 192-194 (1992)], ein α -Tubulinepitopeptid [Skinner et al., *J. Biol. Chem.* 266, 15163-15166 (1991)] und die T7-Gen-10-Proteinpeptidmarkierung [Lutz-Freyermuth et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 6393-6397 (1990)].

4. Produktion und Isolation von PRO245

[0091] Die nachstehende Beschreibung betrifft primär die Produktion von PRO245 durch die Kultivierung von Zellen, die mit einem Vektor transformiert oder transfiziert sind, der die PRO245-Nucleinsäure enthält. Es versteht sich daher, dass alternative fachbekannte Verfahren dazu verwendet werden können, PRO245 herzustellen. Zum Beispiel kann die PRO245-Sequenz oder Abschnitte davon durch direkte Peptidsynthese unter Einsatz von Festphasenverfahren [siehe z.B. Stewart et al., *Solid Phase Peptide Synthesis*, W.H. Freeman Co., San Francisco, Kalifornien (1969), Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* 85, 2149-2154 (1963)] hergestellt werden. In-vitro-Proteinsynthese kann unter Einsatz von manuellen Verfahren oder durch Automatisierung durchgeführt werden. Automatisierte Synthese kann zum Beispiel unter Einsatz eines Peptidsynthesegeräts von Applied Biosystems (Foster City, Kalifornien) unter Verwendung der Gebrauchsanweisungen des Herstellers erreicht werden. Verschiedene Abschnitte von PRO245 können separat chemisch synthetisiert werden und unter Einsatz chemischer oder enzymatischer Verfahren kombiniert werden, um PRO245 voller Länge zu produzieren.

a. Isolation von DNA, die für PRO245 kodiert

[0092] DNA, die für PRO245 kodiert, kann aus einer cDNA-Bibliothek gewonnen werden, die aus Gewebe hergestellt wurde, von dem angenommen wird, dass es PRO245-mRNA besitzt und sie in einem detektierbaren Ausmaß exprimiert. Dementsprechend kann menschliche PRO245-DNA einfach aus einer cDNA-Bibliothek gewonnen werden, die aus menschlichem Gewebe hergestellt wurde, wie in den Beispielen beschrieben. Das für PRO245 kodierende Gen kann auch aus einer genomischen Bibliothek oder durch Oligonucleotidsynthese erhalten werden.

[0093] Bibliotheken können mit Sonden gescreent werden (wie z.B. Antikörpern zu PRO245 oder Oligonucleotiden von zumindest etwa 20-80 Basen), die zur Identifikation des Gens von Interesse oder des davon kodierten Proteins entworfen wurden. Screening der cDNA oder genomischen Bibliothek mit der ausgewählten Sonde kann unter Einsatz von Standardverfahren durchgeführt werden, wie z.B. den in Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (New York; Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)) beschriebenen. Ein alternatives Mittel zur Isolierung des Gens, das für PRO245 kodiert, ist, PCR-Methodologie zu verwenden [Sambrook et al., siehe oben, Dieffenbach et al., *PCR Primer: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1995)].

[0094] Die nachstehenden Beispiele beschreiben Verfahren zum Screening einer cDNA-Bibliothek. Die Oligonucleotidsequenzen, die als Sonden ausgewählt werden, sollen ausreichend lang und ausreichend unzweideutig sein, sodass falsche Positive minimiert werden. Das Oligonucleotid wird bevorzugt so markiert, dass es nach Hybridisierung an DNA in der zu screenenden Bibliothek detektiert werden kann. Verfahren zur Markierung sind fachbekannt und umfassen die Verwendung von Radiomarkierungen wie ³²P-markiertes ATP, Biotinylierung oder Enzymmarkierung. Hybridisierungsbedingungen, einschließlich moderate Stringenz und hohe Stringenz, sind in Sambrook et al., siehe oben, bereitgestellt.

[0095] Sequenzen, die in solchen Bibliothekscreeningverfahren identifiziert werden, können verglichen und an andere bekannte Sequenzen, die in öffentlichen Datenbanken, wie z.B. GenBank, oder anderen privaten Sequenzdatenbanken hinterlegt und zugänglich sind, angeordnet werden. Sequenzidentität (entweder auf Aminosäure- oder Nucleotidebene) innerhalb definierter Regionen des Moleküls oder über die Sequenz voller Länge kann durch Sequenzanordnung unter Einsatz von Computersoftwareprogrammen wie BLAST, BLAST-2, ALIGN, DNASTAR und INHERIT bestimmt werden, die verschiedene Algorithmen verwenden, um Homologie zu messen.

[0096] Nucleinsäure mit einer für Protein kodierenden Sequenz kann durch Screening von ausgewählten cDNA- oder genomischen Bibliotheken unter Einsatz der abgeleiteten Aminosäuresequenz, die hierin zum ersten Mal offenbart ist, und wenn notwendig unter Einsatz herkömmlicher Primerextensionsverfahren, wie sie in

Sambrook et al., siehe oben, beschrieben sind, um Vorläufer zu detektieren, und Verarbeiten der Zwischenprodukte von mRNA, die nicht in cDNA umkehrtranskribiert worden sind, erhalten werden.

b. Auswahl und Transformation von Wirtszellen

[0097] Wirtszellen werden mit den hierin für die PRO245-Produktion beschriebenen Expressions- oder Klonierungsvektoren transfiziert oder transformiert und in herkömmlichen Nährstoffmedien, die in geeigneter Weise zur Induktion von Promotoren, Auswahl von Transformanten oder Amplifikation der Gene, die für die gewünschten Sequenzen kodieren, modifiziert sind, kultiviert. Die Kulturbedingungen, wie z.B. Medium, Temperatur, pH und dergleichen, können vom Fachmann ohne übermäßiges Experimentieren ausgewählt werden. Im Allgemeinen sind die Prinzipien, Protokolle und praktischen Verfahren zur Maximierung der Produktivität von Zellkulturen in *Mammalian Cell Biotechnology: A Practical Approach*, M. Butler, Hrsg. IRL Press (1991), und Sambrook et al., siehe oben, zu finden.

[0098] Transfektionsverfahren sind dem Fachmann bekannt, z.B. CaPO₄ und Elektroporation. Abhängig von der verwendeten Wirtszelle wird Transformation unter Verwendung von Standardverfahren durchgeführt, die für solche Zellen geeignet sind. Die Kalziumbehandlung, die Kalziumchlorid verwendet, wie in Sambrook et al., siehe oben, beschrieben ist, oder Elektroporation wird im Allgemeinen für Prokaryoten oder andere Zellen verwendet, die wesentliche Zellwandbarrieren enthalten. Infektion mit *Agrobacterium tumefaciens* wird zur Transformation von bestimmten Pflanzenzellen wie von Shaw et al., *Gene* 23, 315 (1983), und WO89/05859, veröffentlicht am 29. Juni 1989, beschrieben verwendet. Für Säugetierzellen ohne solche Zellwände kann das Kalziumphosphatpräzipitationsverfahren von Graham und Van der Eb, *Virology* 52, 456-457 (1978), verwendet werden. Allgemeine Aspekte der Säugetierwirtszelltransformationen sind in US-Patent Nr. 4.399.216 beschrieben worden. Transformationen in Hefe werden typischerweise gemäß dem Verfahren von Van Solingen et al., *J. Bact.* 130, 946 (1977), und Hsiao et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 76, 3829 (1979), durchgeführt. Jedoch können auch andere Verfahren zur Einführung von DNA in Zellen, wie z.B. nukleare Mikroinjektion, Elektroporation, bakterielle Protoplastenfusion mit intakten Zellen oder Polykationen, z.B. Polybren, Polylornithin, verwendet werden. Für verschiedene Verfahren zur Transformation von Säugetierzellen siehe Keown et al., *Methods in Enzymology* 185, 527-537 (1990), und Mansour et al., *Nature* 336, 348-352 (1988).

[0099] Geeignete Wirtszellen zum Klonieren oder Exprimieren von DNA in den hierin beschriebenen Vektoren umfassen Prokaryoten, Hefe oder höhere Eukaryotenzellen. Geeignete Prokaryoten umfassen unter anderem Eubakterium, wie z.B. gramnegative oder grampositive Organismen, z.B. Enterobacteriaceae, wie z.B. *E. coli*. Verschiedene *E.-coli*-Stämme sind öffentlich verfügbar, wie z.B. *E.-coli*-K12-Stamm MM294 (ATCC 31.446), *E. coli* X1776 (ATCC 31.537), *E.-coli*-Stamm W3110 (ATCC 27.325) und K5 772 (ATCC 53.635).

[0100] Zusätzlich zu Prokaryoten sind eukaryotische Mikroben, wie z.B. fädige Pilze oder Hefe, geeignete Klonierungs- oder Expressionswirte für die für PRO245 kodierenden Vektoren. *Saccharomyces cerevisiae* ist ein häufig verwendeter niedriger eukaryotischer Wirtsorganismus.

[0101] Geeignete Wirtszellen für die Expression von glykosyliertem PRO245 stammen von multizellulären Organismen. Beispiele für Invertebratenzellen umfassen Insektenzellen, wie z.B. *Drosophila* S12 und *Spodoptera* Sf9, sowie Pflanzenzellen. Beispiele für geeignete Säugetierwirtszelllinien umfassen Chinahamster-Eierstockzellen (CHO) und COS-Zellen. Spezifischere Beispiele umfassen Affennieren-CV1-Linie, transformiert durch SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651), menschliche embryonale Nierenlinie (293- oder 293-Zellen, die für Wachstum in Suspensionskultur subkloniert wurden, Graham et al., *J. Gen. Virol.* 36, 59 (1977)), Chinahamster-Eierstockzellen/-DHFR (CHO, Urlaub und Chasin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 4216 (1980)); Mausretinazellen (TM4, Mather, *Biol. Reprod.* 23, 243-251 (1980)), menschliche Lungenzellen (W138, ATCC CCL 75), menschliche Leberzellen (Hep G2, HB 8065) und Mausmammatumoren (MMT 060562, ATCC CCL51). Es wird davon ausgegangen, dass die Auswahl der geeigneten Wirtszelle innerhalb des Fachgebiets liegt.

c. Auswahl und Verwendung eines replizierbaren Vektors

[0102] Die Nucleinsäure (z.B. cDNA oder genomische DNA), die für PRO245 kodiert, kann in einen replizierbaren Vektor zum Klonieren (Amplifikation der DNA) oder zur Expression inseriert werden. Verschiedene Vektoren sind öffentlich erhältlich. Der Vektor kann z.B. in Form eines Plasmids, Cosmids, Virusteilchens oder Phagen vorliegen. Die geeignete Nucleinsäuresequenz kann mithilfe einer Reihe von Verfahren in den Vektor inseriert werden. Im Allgemeinen wird DNA unter Verwendung von fachbekannten Verfahren in (eine) geeignete Restriktionsendonucleasestelle(n) eingeführt. Vektorkomponenten umfassen im Allgemeinen unter anderem eine oder mehrere von einer Signalsequenz, einem Replikationsstartpunkt, einem oder mehreren Markerge-

nen, einem Enhancerelement, einem Promotor und einer Transkriptionsterminationssequenz. Herstellung geeigneter Vektoren, die eine oder mehrere dieser Komponenten enthalten, verwendet Standardligationsverfahren, die dem Fachmann bekannt sind.

[0103] PRO245 kann rekombinant nicht nur direkt, sondern auch als Fusionspolypeptid mit einem heterologen Polypeptid, das eine Signalsequenz oder ein anderes Polypeptid mit einer spezifischen Spaltstelle am N-Terminus des reifen Proteins oder Polypeptids sein kann, hergestellt werden. Im Allgemeinen kann die Signalsequenz eine Komponente des Vektors sein oder Teil der PRO245-DNA, die in den Vektor insertiert ist. Die Signalsequenz kann eine prokaryotische Signalsequenz sein, die z.B. aus der Gruppe von alkalischer Phosphatase, Penicillinase, Ipp oder hitzestabilem Enterotoxin-II-Leader ausgewählt ist. Zur Hefeseekretion kann die Signalsequenz z.B. der Hefeinvertaseleader, Alphafaktorleader (einschließlich *Saccharomyces* und *Kluyveromyces*- α -Faktorleader, Letzterer ist in US-Patent Nr. 5.010.182 beschrieben) oder saure-Phosphataseleader, der *C.-Albicans*-Glucoamylaseleader (EP 362.179, veröffentlicht am 4. April 1990) oder das in WO 90/13646, veröffentlicht am 15. November 1990, beschriebene Signal sein. Bei der Säugetierzelleexpression können die Säugetiersignalsequenzen dazu verwendet werden, die Sekretion des Proteins zu steuern, wie z.B. Signalsequenzen aus sekretierten Polypeptiden derselben oder verwandter Spezies, wie auch virale sekretorische Leader.

[0104] Sowohl die Expressions- als auch Klonierungsvektoren enthalten eine Nucleinsäuresequenz, die dem Vektor ermöglicht, sich in einer oder mehreren ausgewählten Wirtszellen zu replizieren. Solche Sequenzen sind für eine Vielzahl von Bakterien, Hefe und Viren bekannt. Der Replikationsstartpunkt aus dem Plasmid pBR322 ist für die meisten gramnegativen Bakterien geeignet, der 2 μ -Plasmidursprung ist für Hefe geeignet, und verschiedene Virusstartpunkte (SV40, Polyom, Adenovirus, WS oder BPV) sind für Klonierungsvektoren in Säugetierzellen geeignet.

[0105] Expressions- und Klonierungsvektoren umfassen typischerweise ein Selektionsgen, auch selektierbarer Marker genannt. Typische Selektionsgene kodieren für Proteine, die (a) Resistenz gegen Antibiotika oder anderen Toxinen, z.B. Ampicillin, Neomycin, Metotrexat oder Tetracyclin, verleihen, (b) auxotrophe Defizienzen komplementieren oder (c) kritische Nährstoffe zur Verfügung stellen, die aus komplexen Medien nicht verfügbar sind, z.B. das Gen, das für D-Alaninracemase für *Bacilli* kodiert.

[0106] Ein Beispiel für geeignete selektierbare Marker für Säugetierzellen sind jene, welche die Identifikation von Zellen ermöglichen, die in der Lage sind, die PRO245-Nucleinsäure aufzunehmen, wie z.B. DHFR oder Thymidinkinase. Eine geeignete Wirtszelle, wenn Wildtyp-DHFR verwendet wird, ist die CHO-Zelllinie, die defizient an DHFR-Aktivität ist und wie von Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 4216 (1980), beschrieben hergestellt und vermehrt wird. Ein geeignetes Selektionsgen zur Verwendung in Hefe ist das *trp1*-Gen, das im Hefepiasmid YRp7 gegenwärtig ist [Stinchcomb et al., Nature 282, 39 (1979), Kingsman et al., Gene 7, 141 (1979); Tschemper et al., Gene 10, 157 (1980)]. Das *trp1*-Gen stellt einen selektierbaren Marker für einen Mutantstamm von Hefe bereit, dem die Fähigkeit fehlt, in Tryptophan zu wachsen, z.B. ATCC Nr. 44076 oder PEP4-1 [Jones, Genetics 85, 12 (1977)].

[0107] Expressions- und Klonierungsvektoren enthalten üblicherweise einen Promotor, der operabel mit der PRO245-Nucleinsäuresequenz verbunden ist, um mRNA-Synthese zu steuern. Promotoren, die von einer Vielzahl von potenziellen Wirtszellen erkannt werden, sind bekannt. Promotoren, die zur Verwendung mit prokaryotischen Wirten geeignet sind, umfassen die β -Lactamase- und Lactosepromotorsysteme [Chang et al., Nature 275, 615 (1987); Goeddel et al., Nature 281, 544 (1979)], alkalische Phosphatase, ein Tryptophan- (*trp*-) Promotorsystem [Goeddel, Nucleic Acids Res. 8, 4057 (1980), EP 36.776] und Hybridpromotoren, wie z.B. den *tac*-Promotor [deBoer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 21-25 (1983)]. Promotoren zur Verwendung in bakteriellen Systemen enthalten auch eine Shine-Dalgarno- (SD-) Sequenz, die operabel mit der DNA verbunden ist, die für PRO245 kodiert.

[0108] Beispiele für geeignete Promotingsequenzen zur Verwendung mit Hefewirten umfassen die Promotoren für 3-Phosphoglyceratkinase [Hitzeman et al., J. Biol. Chem. 255, 2073 (1980)] oder andere glykolytische Enzyme [Ness et al., J. Adv. Enzyme Reg. 7, 149 (1968); Holland, Biochemistry 17, 4900 (1978)], wie z.B. Enolase, Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase, Hexokinase, Pyruvatdecarboxylase, Phosphofruktokinase, Glucose-6-phosphatisomerase, 3-Phosphoglyceratmutase, Pyruvatkinase, Triosephosphatisomerase, Phosphoglucoseisomerase und Glucokinase.

[0109] Andere Hefepromotoren, die induzierbare Promotoren sind, die über den zusätzlichen Vorteil von durch Wachstumsbedingungen kontrollierter Transkription verfügen, sind die Promotorregionen für Alkoholde-

hydrogenase 2, Isocytochrom C, saure Phosphatase, Abbauenzyme, die mit Stickstoffmetabolismus assoziiert sind, Metallothionein, Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase und Enzyme, die für Maltose- und Galactoseverwertung nützlich sind. Geeignete Vektoren und Promotoren zur Verwendung in Hefeexpression sind weiters in EP 73.657 beschrieben.

[0110] PRO245-Transkription aus Vektoren in Säugetierwirtszellen wird zum Beispiel durch Promotoren kontrolliert, die aus den Genomen von Viren, wie z.B. Polyomavirus, Geflügelpockenvirus (UK 2.211.504, veröffentlicht am 5. Juli 1989), Adenovirus (wie z.B. Adenovirus 2), Rinderpapillomavirus, Geflügelsarkomvirus, Cytomegalievirus, ein Retrovirus, Hepatitis-B-Virus, und Simian-Virus-40 (SV-40), aus heterologen Säugetierpromotoren, z.B. dem Actinpromotor oder einem Immunglobulinpromotor, und aus Hitzeschockpromotoren erhalten werden, vorausgesetzt solche Promotoren sind mit den Wirtszellsystemen kompatibel.

[0111] Transkription von DNA, die für PRO245 kodiert, durch höhere Eukaryoten, kann durch Insertion einer Enhancersequenz in den Vektor erhöht werden. Enhancer sind cis-wirkende Elemente von DNA, für gewöhnlich von etwa 10 bis 300 bp, die auf einen Promotor einwirken, um ihre Transkription zu erhöhen. Viele Enhancersequenzen sind von Säugetiergenen bekannt (Globin, Elastase, Albumin, α -Fötoprotein und Insulin). Typischerweise wird jedoch ein Enhancer aus einem eukaryotischen Zellvirus verwendet. Beispiele umfassen den SV40-Enhancer auf der späten Seite des Replikationsstartpunkts (bp 100-270), den frühen Promotorenhancer von Cytomegalievirus, den Polyomaenhancer auf der späten Seite des Replikationsstartpunkts und Adenovirusenhancer. Die Enhancer können in den Vektor an einer Position 5' oder 3' zur kodierenden PRO245-Sequenz gespleißt werden, befindet sich aber bevorzugt an einer Position 5' vom Promotor.

[0112] Expressionsvektoren, die in eukaryotischen Wirtszellen (Hefe, Pilze, Insekten, Pflanzen, Tiere, Menschen oder kernhaltige Zellen aus anderen multizellulären Organismen) verwendet werden, enthalten auch Sequenzen, die zur Termination von Transkription und zur Stabilisierung von mRNA notwendig sind. Solche Sequenzen sind üblicherweise aus den 5'- und gelegentlich 3'-nicht-translatierten Regionen von eukaryotischen oder viralen DNAs oder cDNAs erhältlich. Diese Regionen enthalten Nucleotidsegmente, die als polyadenylierte Fragmente transkribiert werden, im nicht-translatierten Abschnitt der mRNA, die für PRO245 kodiert.

[0113] Andere Verfahren, Vektoren und Wirtszellen, die zur Anpassung an die Synthese von PRO245 in rekombinanter Vertebratenzellkultur geeignet sind, sind in Gething et al., Nature 293, 620-625 (1981); Mantei et al., Nature 281, 40-46 (1979), EP 117.060 und EP 117.058 beschrieben.

d. Detektion von Genamplifikation/-expression

[0114] Genamplifikation und/oder -expression kann in einer Probe direkt z.B. durch herkömmliches Southern-Blotting, Northern-Blotting, um die Transkription von mRNA zu quantifizieren [Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 77, 5201-5205 (1980)], Dot-Blotting (DNA-Analyse) oder In-situ-Hybridisierung unter Einsatz einer geeignet markierten Sonde, basierend auf den hierin bereitgestellten Sequenzen, gemessen werden. Alternativ dazu können Antikörper verwendet werden, die spezifische Duplexe erkennen können, einschließlich DNA-Duplexe, RNA-Duplexe und DNA-RNA-Hybridduplexe oder DNA-Proteinduplexe. Die Antikörper können wiederum markiert sein, und der Test kann ausgeführt werden, wo der Duplex an eine Oberfläche gebunden ist, sodass nach Bildung des Duplexes auf der Oberfläche die Gegenwart von Antikörper, der an den Duplex gebunden ist, detektiert werden kann.

[0115] Genexpression kann alternativ dazu durch immunologische Verfahren gemessen werden, wie z.B. immunhistochemische Färbung von Zellen oder Gewebsektionen und Test von Zellkultur oder Körperflüssigkeiten, um direkt die Expression des Genprodukts zu quantifizieren. Antikörper, die zur immunhistochemischen Färbung und/oder zum Test von Fluidproben geeignet sind, können entweder monoklonal oder polyklonal sein und können in einem beliebigen Säugetier hergestellt werden. In geeigneter Weise können Antikörper gegen das Nativsequenz-PRO245-Polypeptid oder gegen ein synthetisches Peptid, basierend auf den hierin bereitgestellten DNA-Sequenzen, oder gegen eine exogene Sequenz, fusioniert an PRO245-DNA und für ein spezifisches Antikörperepitop kodierend, hergestellt werden.

e. Reinigung von Polypeptid

[0116] Formen von PRO245 können aus dem Kulturmedium oder aus Wirtszelllysaten gewonnen werden. Wenn sie membrangebunden sind, können sie aus der Membran unter Einsatz einer geeigneten Detergenzlösung (z.B. Triton-X-100) oder durch enzymatische Spaltung gewonnen werden. Zellen, die in der Expression von PRO245 verwendet werden, können durch verschiedene physikalische oder chemische Mittel wie z.B. Ge-

frier-Auftau-Zyklus, Beschallung, mechanischer Unterbrechung oder Zellysemittel, zerstört werden.

[0117] Es kann wünschenswert sein, PRO245 aus rekombinanten Zellproteinen oder Polypeptiden zu reinigen. Die folgenden Verfahren sind exemplarisch für geeignete Reinigungsverfahren: Fraktionierung auf einer Ionenaustauschsäule, Ethanolpräzipitation, Umkehrphasen-HPLC, Chromatographie auf Kieselgel oder auf einem Kationenaustauschharz, wie z.B. DEAE, Chromatofokussierung, SDS-PAGE, Ammoniumsulfatpräzipitation, Gelfiltration unter Verwendung von z.B. Sephadex-G-75, Protein-A-Sepharose-Säulen zur Entfernung von Kontaminanten, wie z.B. IgG, und Metalchelatierungssäulen, um epitopmarkierte Formen von PRO245 zu binden. Verschiedene Verfahren zur Proteinreinigung können verwendet werden, und solche Verfahren sind fachbekannt und zum Beispiel in Deutscher, *Methods in Enzymology* 182 (1990), Scopes, *Protein Purification; Principles and Practice*, Springer-Verlag, New York (1982), beschrieben. Der/die ausgewählten Reinigungsschritt(e) hängen z.B. vom Wesen des verwendeten Produktionsverfahrens und dem besonderen produzierten PRO245 ab.

2. Gewebsverteilung

[0118] Die Stelle der Gewebe, welche die Polypeptide der Erfindung exprimieren, kann durch Bestimmung der mRNA-Expression in verschiedenen menschlichen Geweben bestimmt werden. Der Ort solcher Gene stellt Informationen darüber bereit, welche Gewebe am wahrscheinlichsten von den stimulierenden und hemmenden Aktivitäten der Polypeptide der Erfindung beeinflusst sind. Der Ort eines Gens in einem spezifischen Gewebe stellt auch Probengewebe für die aktivitätsblockierenden, hierin diskutierten Tests bereit.

[0119] Genexpression in verschiedenen Geweben kann durch herkömmliches Southern-Blotting, Northern-Blotting, um die Transkription von mRNA zu quantifizieren (Thomas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 5201-5205 (1980)), Dot-Blotting (DNA-Analyse) oder In-situ-Hybridisierung unter Einsatz einer geeignet markierten Sonde, basierend auf den hierin bereitgestellten Sequenzen, gemessen werden. Alternativ dazu können Antikörper verwendet werden, die spezifische Duplexe erkennen, einschließlich DNA-Duplexe, RNA-Duplexe und DNA-RNA-Hybridduplexe oder DNA-Protein-Duplexe.

[0120] Genexpression in verschiedenen Geweben kann alternativ dazu durch immunologische Verfahren, wie z.B. immunhistochemische Färbung von Gewebssektionen, und Test von Zellkultur oder Körperfluiden gemessen werden, um direkt die Expression von Genprodukt zu quantifizieren. Antikörper, die zur immunhistochemischen Färbung und/oder zum Testen von Fluidproben geeignet sind, können entweder monoklonal oder polyklonal sein und können in einem Säugetier hergestellt werden. Geeigneterweise können die Antikörper gegen eine native Sequenz eines Polypeptids der Erfindung oder gegen ein synthetisches Peptid basierend auf den DNA-Sequenzen, die für das Polypeptid der Erfindung kodieren, oder gegen eine exogene Sequenz, die an eine DNA fusioniert ist, die für ein Polypeptid der Erfindung kodiert und für ein spezifisches Antikörperepitop kodiert, hergestellt werden. Allgemeine Verfahren zur Erzeugung von Antikörpern und spezielle Protokolle für Northern-Blotting und In-situ-Hybridisierung sind nachstehend bereitgestellt.

3. Antikörperbindungsstudien

[0121] Die Aktivität der Polypeptide der Erfindung kann weiters durch Antikörperbindungsstudien verifiziert werden, in welchen die Fähigkeit von Anti-PRO245-Antikörpern, die Wirkung von PRO245-Polypeptiden auf Gewebszellen zu hemmen, getestet wird. Exemplarische Antikörper umfassen polyklonale, monoklonale, humanisierte, bispezifische und Heterokonjugatantikörper, deren Herstellung hierin nachstehend beschrieben ist.

[0122] Antikörperbindungsstudien können in einem beliebigen Testverfahren durchgeführt werden, wie z.B. kompetitive Bindungstests, direkte und indirekte Sandwichtests und Immunpräzipitationstests. Zola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, 147-158, CRC Press, Inc. (1987).

[0123] Kompetitive Bindungstests basieren auf der Fähigkeit eines markierten Standards, mit dem Testprobenanalyt um die Bindung mit einer begrenzten Menge von Antikörper zu konkurrieren. Die Menge von Targetprotein in der Testprobe ist umgekehrt proportional zur Menge des Standards, der an die Antikörper gebunden wird. Um die Bestimmung der Menge des Standards zu erleichtern, der gebunden wird, werden die Antikörper vor oder nach der Konkurrenz vorzugsweise unlöslich gemacht, sodass der Standard und Analyt, die an die Antikörper gebunden sind, in geeigneter Weise von dem Standard und Analyt getrennt werden können, die ungebunden bleiben.

[0124] Sandwichtest umfassen die Verwendung von zwei Antikörpern, wobei jeder in der Lage ist, sich an

ein(en) anderen/s immunogenen/s Abschnitt oder Epitop des zu detektierenden Proteins zu binden. In einem Sandwichtest wird der Testprobenanalyt durch einen ersten Antikörper gebunden, der auf einem festen Träger immobilisiert ist, und danach bindet sich ein zweiter Antikörper an den Analyt, wodurch ein unlöslicher dreiteiliger Komplex gebildet wird. Siehe z.B. US-Patent Nr. 4.376.110. Der zweite Antikörper kann selbst mit einer detektierbaren Gruppierung markiert werden (direkter Sandwichtest) oder kann unter Einsatz eines Anti-Immunglobulinantikörpers gebunden werden, der mit einer detektierbaren Gruppierung markiert ist (indirekter Sandwichtest). Zum Beispiel ist eine Form von Sandwichtests ein ELISA-Test, in welchem die detektierbare Gruppierung ein Enzym ist.

[0125] Zur Immunhistochemie kann die Gewebeprobe frisch oder gefroren oder in Paraffin eingebettet sein und mit einem Konservierungsmittel wie z.B. Formalin fixiert sein.

4. Auf Zellen basierende Tests

[0126] Auf Zellen basierende Tests und Tiermodelle für immunassoziierte Erkrankungen können verwendet werden, um die Beziehung zwischen den Genen und Polypeptiden, die hierin identifiziert werden, und die Entwicklung und Pathogenese von immunassoziierten Erkrankungen besser zu verstehen.

[0127] In einem anderen Ansatz werden Zellen eines Zelltyps, von dem bekannt ist, dass er in eine bestimmte immunassoziierte Erkrankung involviert ist, mit den hierin beschriebenen cDNAs transfiziert, und es wird die Fähigkeit dieser cDNAs analysiert, Immunfunktion zu stimulieren oder zu hemmen. Geeignete Zellen können mit dem gewünschten Gen transfiziert werden und werden auf Immunfunktionsaktivität beobachtet. Derartige transfizierte Zelllinien können dann verwendet werden, um die Fähigkeit von poly- oder monoklonalen Antikörpern oder Antikörperzusammensetzungen zu testen, Immunfunktion zu hemmen oder zu stimulieren, z.B. um die T-Zellproliferation oder Infiltration in die entzündete Zelle zu modulieren. Mit den kodierenden Sequenzen der hierin identifizierten Gene transfizierte Zellen können weiter verwendet werden, um Medikament-Kandidaten für die Behandlung von immunassoziierten Erkrankungen zu identifizieren.

[0128] Außerdem können Primärkulturen, die aus transgenen Tieren stammen (wie unten beschrieben), in den auf Zellen basierenden Tests hierin verwendet werden, obgleich stabile Zelllinien bevorzugt sind. Techniken zur Herleitung kontinuierlicher Zelllinien aus transgenen Tieren sind auf dem Gebiet der Erfindung wohlbekannt (siehe z.B. Small et al., *Mol. Cell. Biol.* 5, 642-648 (1985)).

[0129] Ein geeigneter, auf Zellen basierender Test ist die gemischte Lymphozytenreaktion (MLR). *Current Protocols in Immunology*, Kapitel 3.12, herausgegeben von J.E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Marglies, E. M. Shevach, W. Strober, National Institutes of Health, veröffentlicht von John Wiley & Sons, Inc. In diesem Test wird die Fähigkeit einer Testverbindung, die Proliferation von aktivierten T-Zellen zu stimulieren, getestet. Eine Suspension von Responder-T-Zellen wird mit allogenen Stimulatorzellen getestet, und die Proliferation von T-Zellen wird durch die Aufnahme von tritiiertem Thymidin gemessen. Dieser Test ist eine allgemeine Messung der T-Zellreaktivität. Da die Mehrheit von T-Zellen auf IL-2 reagiert und nach Aktivierung IL-2 produziert, reflektieren Unterschiede der Reaktion in diesem Test teilweise die Unterschiede bei der IL-2-Produktion durch die entsprechenden Zellen. Die MLR-Ergebnisse können durch Standard-Lymphokin (IL-2-) Detektionstest verifiziert werden. *Current Protocols in Immunology*, siehe oben, 3.15, 6.3.

[0130] Eine proliferative T-Zellantwort in einem MLR-Test kann auf eine mitogene Antwort oder eine Stimulationsantwort der T-Zellen zurückzuführen sein. Zusätzliche Verifikation der T-Zellstimulationsaktivität der Polypeptide der Erfindung kann durch einen Co-Stimulationstest erhalten werden. T-Zellaktivierung erfordert ein antigenspezifisches Signal, das durch den Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) und ein costimulierendes Signal vermittelt wird, das durch eine zweite Ligandenbindungswechselwirkung vermittelt wird, wie z.B. die B7(CD80, CD86)/CD28-Bindungswechselwirkung. CD28-Vernetzung erhöht die Lymphokinsekretion durch aktivierte T-Zellen. T-Zellaktivierung weist durch die Bindung von Liganden, die eine negative oder positive Wirkung haben, sowohl negative als auch positive Kontrollen auf. CD28 und CTLA-4 sind verwandte Glykoproteine in der Ig-Überfamilie, die sich an B7 binden. CD28-Bindung an B7 hat eine positive costimulierende Wirkung von T-Zellaktivierung; hingegen weist die CTLA-4-Bindung an B7 eine negative T-zelldeaktivierende Wirkung auf. C.A. Chambers und J.P. Allison, *Curr. Opin. Immunol.* 9, 396 (1997), R.H. Schwartz, *Cell* 71, 1065 (1992), P.S. Linsey und J.A. Ledbetter, *Annu. Rev. Immunol.* 11, 191 (1993), C.H. June et al., *Immunol. Today* 15, 321 (1994), M. K. Jenkins, *Immunity* 1, 405 (1994). In einem Costimulationstest werden die Polypeptide der Erfindung auf T-Zellcostimulations- oder -Hemmaktivität getestet.

[0131] Polypeptide der Erfindung sowie andere Verbindungen der Erfindung, die Stimulatoren (Costimulato-

ren) von T-Zellproliferation sind, wie z.B. durch MLR und Costimulationstest bestimmt, sind zur Behandlung von immunassoziierten Erkrankungen nützlich, die durch schlechte, suboptimale oder inadäquate Immunfunktion charakterisiert sind. Diese Erkrankungen werden durch Stimulation der Proliferation und Aktivierung von T-Zellen (und T-zellvermittelter Immunität) und durch die Verstärkung der Immunantwort in einem Säugetier durch Verabreichung einer stimulierenden Verbindung, wie z.B. den stimulierenden Polypeptiden der Erfindung, behandelt. Das stimulierende Polypeptid kann ein PRO301-, PRO361- oder PRO245-Polypeptid oder ein Agonistenantikörper dafür sein. Immunadjuvanttherapie zur Behandlung von Tumoren, die nachstehend detailliert beschrieben sind, ist ein Beispiel für diese Verwendung der stimulierenden Verbindungen der Erfindung. Antikörper, die sich an Hemmpolypeptide binden, wirken, um die Immunantwort zu verstärken, indem die Hemmwirkung der hemmenden Polypeptide entfernt wird. Diese Wirkung ist in Versuchen zu sehen, die Anti-CTLA-4-Antikörper verwenden, die T-Zellproliferation verstärken, vermutlich durch Entfernung des Hemmsignals, das durch CTLA-4-Bindung verursacht ist. T.L. Walunas et al., *Immunity* 1, 405 (1994). Diese Verwendung wird auch in Versuchen mit 4-1 BB-Glykoprotein, einem Mitglied der Tumornekrosefaktorrezeptorfamilie, das sich an einen Liganden (4-1 BBL) bindet, der auf geprimten T-Zellen exprimiert wird, und T-Zellaktivierung und -Wachstum signalisiert, bestätigt. M.E. Alderson et al., *J. Immunol.* 24, 2219 (1994). Hemmung von 4-1BB-Bindung durch Behandlung mit einem Anti-4-1BB-Antikörper erhöht die Schwere der Transplantatgegen-Wirt-Erkrankung und kann verwendet werden, um Tumoren auszulöschen. I. Hellstrom und K.E. Hellstrom, *Crit. Rev. Immunol.* 18, 1 (1998).

[0132] Andererseits können Polypeptide der Erfindung sowie andere Verbindungen der Erfindung, die Inhibitoren von T-Zellproliferation/-aktivierung und/oder Lymphokinsekretion sind, direkt dazu verwendet werden, die Immunantwort zu unterdrücken. Diese Verbindungen sind dazu nützlich, den Grad der Immunantwort zu reduzieren und immunassoziierte Erkrankungen zu behandeln, die durch hyperaktive, superoptimale oder Autoimmunantwort charakterisiert sind. Alternativ dazu können Antikörper, die sich an die stimulierenden Polypeptide der Erfindung binden und die stimulierende Wirkung dieser Moleküle blockieren, dazu verwendet werden, die T-zellvermittelte Immunantwort durch Hemmung der T-Zellproliferation/-aktivierung und/oder Lymphokinsekretion zu unterdrücken.

5. Tiermodelle

[0133] Die Ergebnisse der auf Zellen basierenden In-vitro-Tests können weiter unter Einsatz von In-vivo-Tiermodellen und Tests auf T-Zellfunktion untersucht werden. Es kann eine Vielzahl wohlbekannter Tiermodelle verwendet werden, um die Rolle der hierin identifizierten Gene bei der Entwicklung und Pathogenese von immunassoziierten Erkrankungen besser zu verstehen und die Wirksamkeit von therapeutischen Kandidatenmitteln, einschließlich Antikörpern und anderen Antagonisten der nativen Polypeptide, einschließlich kleiner Antagonisten-Moleküle, zu testen. Der In-vivo-Charakter derartiger Modelle macht diese besonders prognostisch für Antworten in menschlichen Patienten. Tiermodelle von immunassoziierten Erkrankungen umfassen nicht-rekombinante sowie rekombinante (transgene) Tiere. Nicht-rekombinante Tiermodelle umfassen beispielsweise Nager-, z.B. Mausmodelle. Derartige Modelle können durch Einführen von Zellen in syngenetische Mäuse unter Verwendung von Standardverfahren, z.B. subkutane Injektion, Schwanzveneninjektion, Milzimplantation, intraperitoneale Implantation, Implantation unter die Nierenkapsel etc., erzeugt werden.

[0134] Kontakthypersensibilität ist ein einfacher In-vivo-Test von zellvermittelter Immunfunktion. In diesem Verfahren werden epidermale Zellen gegenüber exogenen Haptenen exponiert, die eine Überempfindlichkeitsreaktion verspäteter Art entstehen lassen, die gemessen und quantifiziert wird. Kontaktsensibilität umfasst eine anfängliche Sensibilisierungsphase gefolgt von einer Auslösungsphase. Die Auslösungsphase tritt ein, wenn epidermale Zellen auf ein Antigen treffen, mit welchem sie zuvor Kontakt hatten. Schwellung und Entzündung treten ein, wobei dies ein exzellentes Modell für menschliche allergische Kontaktdermatitis ist. Ein geeignetes Verfahren ist in *Current Protocols in Immunology*, Hrsgs. J.E. Coligan, A.M. Kruisbeek, D.H. Margulies, E.M. Shevach und W. Strober, John Wiley & Sons Inc., Kapitel 4.2 (1994), beschrieben. Siehe auch S. Grabbe und T. Schwarz, *Immun. Today* 19 (1), 37-44 (1998).

[0135] Eine Transplantat-gegen-Wirt-Erkrankung tritt ein, wenn immunkompetente Zellen in immunsupprimierte oder tolerante Patienten transplantiert werden. Die Spenderzellen erkennen und reagieren auf Wirtsantigene. Die Antwort kann von lebensbedrohlicher schwerer Entzündung bis hin zu schwachen Fällen von Durchfall und Gewichtsverlust führen. Transplantat-gegen-Wirt-Erkrankungsmodelle stellen ein Mittel zur Beurteilung der T-Zellreaktivität gegen MHC-Antigen und Transplantat-Nebenantigene bereit. Ein geeignetes Verfahren ist in *Current Protocols in Immunology*, siehe oben, Kapitel 4.3, beschrieben.

[0136] Ein Tiermodell für Hautallotransplantatabstoßung ist ein Mittel zum Testen der Fähigkeit von T-Zellen,

In-vivo-Gewebszerstörung zu vermitteln, das deren Rolle in antiviraler und Tumorimmunität anzeigt und ein Maß dieser Rolle ist. Die häufigsten und am meisten akzeptierten Modelle verwenden Mausschwanzhauttransplantate. Wiederholte Versuche haben gezeigt, dass Hautallotransplantatabstoßung durch T-Zellen, Helfer-T-Zellen, und Killer-Effektor-T-Zellen vermittelt wird und nicht durch Antikörper. H. Auchincloss jr. und D.H. Sachs, *Fundamental Immunology*, 2. Auflage, W.E. Paul, Hrsg., Raven Press, New York, 889-992 (1989). Ein geeignetes Verfahren ist in *Current Protocols in Immunology*, siehe oben, Kapitel 4.4., detailliert beschrieben. Andere Transplantatabstoßungsmodelle, die verwendet werden können, um die Verbindungen der Erfindung zu testen, sind die allogenen Herztransplantatmodelle, die von M. Tanabe et al., *Transplantation* 58, 23 (1994), und S.A. Tinubu et al., *J. Immunol.*, 4330-4338 (1994), beschrieben sind.

[0137] Tiermodelle für Hypersensibilität der verspäteten Art stellen ebenfalls einen Test der zellvermittelten Immunfunktion bereit. Hyperempfindlichkeitsreaktionen verspäteter Art sind eine T-zellvermittelte In-vivo-Immunantwort, die durch Entzündung charakterisiert ist, die keinen Höhepunkt erreicht, bis ein gewisser Zeitraum nach Provokation mit einem Antigen vergangen ist. Diese Reaktionen treten auch bei gewebsspezifischen Autoimmunerkrankungen, wie z.B. Multipler Sklerose (MS) und experimenteller Autoimmunenkephalomyelitis (EEA, ein Modell für MS), auf. Ein geeignetes Verfahren ist in *Current Protocols in Immunology*, oben, Kapitel 4.5, detaillierter beschrieben.

[0138] EAE ist eine T-zellvermittelte Autoimmunerkrankung, die durch T-Zell- und mononukleare Zellentzündung und nachfolgende Demyelinierung von Axonen im zentralen Nervensystem charakterisiert ist. EAE soll im Allgemeinen ein relevantes Tiermodell für MS beim Menschen sein. C. Bolton, *Multiple Sclerosis* 1, 143 (1995). Sowohl akute als auch rückfallverhindernde Modelle sind entwickelt worden. Die Verbindungen der Erfindung können auf T-zellstimulierende oder -Hemmaktivität gegen immunvermittelte Entmarkungserkrankung unter Einsatz des in *Current Protocols in Immunology*, siehe oben, Kapitel 15.1 und 15.2, beschriebenen Arbeitsverfahrens getestet werden. Siehe auch die Modelle für Myelinerkrankung, bei welchen Oligodendrozyten der Schwann-Zellen in das zentrale Nervensystem transplantiert werden, wie in I.D. Duncan et al., *Molec. Med. Today*, 554-561 (1997), beschrieben.

[0139] Ein Tiermodell für Arthritis ist kollageninduzierte Arthritis. Dieses Modell stellt klinische histologische oder immunologische Eigenschaften von menschlicher autoimmuner rheumatoider Arthritis bereit und ist ein annehmbares Modell für menschliche Autoimmunarthritis. Maus- und Rattenmodelle sind durch Synovitis, Knorpelerosion und subchondralem Knochen charakterisiert. Die Verbindungen der Erfindung können auf Aktivität gegen Autoimmunarthritis unter Einsatz der in *Current Protocols in Immunology*, oben, Kap. 15.5, beschriebenen Arbeitsvorschriften getestet werden. Siehe auch das Modell, das einen monoklonalen Antikörper gegen CD18- und VLA-4-Integrine verwendet, wie in A.C. Issekutz et al., *Immunology* 88, 569 (1996), beschrieben.

[0140] Ein Asthmodell ist beschrieben worden, in welchem antigeninduzierte Atemweghyperreaktivität, Lungeneosinophilie und Entzündung durch Sensibilisierung eines Tiers mit Ovalbumin induziert wird und dann das Tier mit demselben Protein provoziert wird, das durch Aerosol geliefert wird. Verschiedene Tiermodelle (Meerschweinchen, Ratte, nichtmenschlicher Primat) zeigten ähnliche Symptome zu atopischem Asthma bei Menschen nach Provokation mit Aerosolantigenen. Murine Modelle haben viele der Eigenschaften von menschlichem Asthma. Geeignete Verfahren zum Testen der Verbindungen der Erfindung auf Aktivität und Wirksamkeit in der Behandlung von Asthma sind von W.W. Wolyniec et al., *Am J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 18, 777 (1998), und den hierin zitierten Referenzen beschrieben.

[0141] Zusätzlich dazu können die Verbindungen der Erfindung bei Tiermodellen für Psoriasis-ähnliche Erkrankungen getestet werden. Beweise lassen eine T-Zellpathogenese für Psoriasis vermuten. Die Verbindungen der Erfindung können im scid/scid-Mausmodell, das von M.P. Schon et al., *Nat. Med.* 3, 183 (1997), beschrieben wurde, in welchem die Mäuse histopathologische Hautläsionen zeigen, die Psoriasis ähneln, getestet werden. Ein anderes geeignetes Modell ist die menschliche Haut-/scid-Mauschimäre, die wie von B.J. Nickoloff et al., *Am. J. Path.* 146, 580 (1995), beschrieben hergestellt worden ist.

[0142] Rekombinante (transgene) Tiermodelle können durch Einführung des kodierenden Abschnitts der hierin identifizierten Gene in das Genom des Tiers von Interesse unter Einsatz von Standardverfahren zur Produktion von transgenen Tieren erzeugt werden. Tiere, die als Target für transgene Manipulation dienen, umfassen unter anderem Mäuse, Ratten, Kaninchen, Meerschweinchen, Schafe, Ziegen, Schweine und nicht-menschliche Primaten, z.B. Paviane, Schimpansen und Affen. Fachbekannte Verfahren zur Einführung eines Transgens in solche Tiere umfassen Mikroinjektion in den Pronukleus (Hoppe und Wanger, US-Patent Nr. 4.873.191), retrovirusvermittelten Gentransfer in Keimlinien (z.B. Van der Putten et al., *Proc. Natl. Acad.*

Sci. USA 82, 6148-615 (1985)), Gentargeting in embryonalen Stammzellen (Thompson et al., Cell 56, 313-321 (1989)), Elektroporation von Embryos (Lo, Mol. Cell Biol. 3, 1803-1814 (1983)), spermavermittelten Gentransfer (Lavitrano et al., Cell 57, 717-73 (1989)). Für einen Überblicksartikel siehe z.B. US-Patent Nr. 4.736.866.

[0143] Für den Zweck der vorliegenden Erfindung umfassen transgene Tiere jene, die das Transgen nur in einem Teil ihrer Zellen tragen („Mosaiktier“). Das Transgen kann entweder als einzelnes Transgen oder in Concatemeren, z.B. Kopf-zu-Kopf- oder Kopf-zu-Schwanz-Tandems, integriert werden. Selektive Einführung eines Transgens in einen besonderen Zelltyp ist auch durch Folgendes möglich, zum Beispiel das Verfahren von Lasko et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 623-636 (1992).

[0144] Die Expression des Transgens in transgenen Tieren kann durch Standardverfahren überwacht werden. Zum Beispiel kann Southern-Blot-Analyse oder PCR-Amplifikation verwendet werden, um die Integration des Transgens zu verifizieren. Der Grad der mRNA-Expression kann dann unter Einsatz von Verfahren, wie z.B. In-situ-Hybridisierung, Northern-Blot-Analyse, PCR oder Immunzytochemie, analysiert werden.

[0145] Die Tiere können weiter auf Zeichen für Immunerkrankungspathologie untersucht werden, zum Beispiel durch histologische Untersuchung, um die Infiltration von Immunzellen in spezifische Gewebe zu bestimmen. Blockierungsversuche können ebenfalls durchgeführt werden, in welchen die transgenen Tiere mit den Verbindungen der Erfindung behandelt werden, um das Ausmaß der T-Zellproliferationsstimulation oder -inhibition der Verbindungen zu bestimmen. In diesen Versuchen werden blockierende Antikörper, die sich an das Polypeptid der Erfindung binden, die wie nachstehend beschrieben hergestellt wurden, an das Tier verabreicht, und die Wirkung auf Immunfunktion wird bestimmt.

[0146] Alternativ dazu können „Knock-out“-Tiere hergestellt werden, die ein defektes oder geändertes Gen besitzen, das für ein hierin identifiziertes Polypeptid kodiert, als Folge einer homologen Rekombination zwischen dem endogenen Gen, das für das Polypeptid kodiert, und geänderter genomischer DNA, die für dasselbe Polypeptid kodiert, das in eine embryonale Zelle des Tiers eingeführt wird. Zum Beispiel kann cDNA, die für ein bestimmtes Polypeptid kodiert, verwendet werden, um genomische DNA, die für dieses Polypeptid kodiert, gemäß etablierter Verfahren zu klonieren. Ein Abschnitt der genomischen DNA, die für ein besonderes Polypeptid kodiert, kann deletiert oder durch ein anderes Gen ersetzt werden, wie z.B. ein Gen, das für einen selektierbaren Marker kodiert, der dazu verwendet werden kann, Integration zu überwachen. Typischerweise sind mehrere Kilobasen von nicht-geänderter flankierender DNA (sowohl an den 5'- als auch 3'-Enden) im Vektor enthalten (siehe z.B. Thomas und Capecchi, Cell 51, 503 (1987), für eine Beschreibung von homologen Rekombinationsvektoren). Der Vektor wird in eine embryonale Stammzellenlinie (z.B. durch Elektroporation) eingeführt, und Zellen, in welchen sich die eingeführte DNA homolog mit der endogenen DNA rekombiniert hat, werden ausgewählt [siehe z.B. Li et al., Cell 69, 915 (1992)]. Die ausgewählten Gene werden dann in eine Blastozyste eines Tiers (z.B. eine Maus oder Ratte) eingeführt, um Aggregationschimären zu bilden [siehe z.B. Bradley, in Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, E.J. Robertson, Hrsg., IRL Oxford, 113-152 (1987)]. Ein chimärer Embryo kann dann in ein geeignetes scheinchwangeres weibliches Pflügetier implantiert werden und der Embryo ausgetragen werden, um ein „Knock-out“-Tier zu schaffen. Nachkommen, welche die homolog rekombinierte DNA in ihren Keimzellen beherbergen, können durch Standardverfahren identifiziert werden und dazu verwendet werden, Tiere zu züchten, in welchen alle Zellen des Tiers die homolog rekombinierte DNA beinhalten. Knockout-Tiere können zum Beispiel aufgrund ihrer Fähigkeit charakterisiert sein, sich gegen bestimmte pathologische Leiden und ihre Entwicklung von pathologischen Leiden aufgrund des Fehlens des Polypeptids zu verteidigen.

6. Immunadjuvanstherapie

[0147] In einer Ausführungsform können Verbindungen der Erfindung, die eine immunstimulierende Wirkung zeigen, in Immunadjuvanstherapie zur Behandlung von Tumoren (Krebs) verwendet werden. Es versteht sich nun, dass T-Zellen menschliches tumor-spezifisches Antigen erkennen. Eine Gruppe von Tumorantigenen, für welche MAGE, BAGE und GAGE-Genfamilien kodieren, sind in allen normalen erwachsenen Geweben stumm, aber werden in Tumoren in signifikanten Mengen exprimiert, wie z.B. in Melanomen, Lungentumoren, Tumoren im Kopf- und Nackenbereich und Blasenkarzinomen. C. Desmet et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 7149 (1996). Es ist gezeigt worden, dass die Costimulierung von T-Zellen Tumorregression und eine Antitumorantwort sowohl in vitro als auch in vivo induziert. I. Melero et al., Nature Medicine 3, 682 (1997), E.D. Kwon et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 8099 (1997), D.H. Lynch et al., Nature Medicine 3, 625 (1997), O.J. Finn und M.T. Lotze, J. Immunol. 21, 114 (1998). Die stimulierenden Verbindungen der Erfindung können als Adjuvantien alleine oder gemeinsam mit einem wachstumsregulierenden Mittel, zytotoxischen Mittel oder chemotherapeutischen Mittel verabreicht werden, um T-Zellproliferation/-aktivierung und eine Antitumorantwort auf

Tumorantigene zu stimulieren. Das wachstumsregulierende zytotoxische oder chemotherapeutische Mittel wird in herkömmlichen Mengen unter Einsatz bekannter Verabreichungspläne verabreicht. Immunstimulierende Aktivität durch die Verbindungen der Erfindung ermöglicht reduzierte Mengen von wachstumsregulierenden, zytotoxischen oder chemotherapeutischen Mitteln, wodurch die Toxizität für den Patienten potenziell verringert wird.

[0148] Krebs ist durch den Anstieg der Zahl von abnormen oder neoplastischen Zellen, die von einem normalen Gewebe abstammen und proliferieren, um eine Tumormasse zu bilden, die Invasion der angrenzenden Gewebe durch diese neoplastischen Tumorzellen und die Erzeugung von malignen Zellen charakterisiert, die sich letztendlich über das Blut- oder lymphatische System bis hin zu den regionalen Lymphknoten und in entfernte Stellen (Metastasen) erstrecken. In einem kanzerösen Zustand proliferiert eine Zelle unter Bedingungen, unter welchen normale Zellen nicht wachsen würden. Krebs manifestiert sich in einer Vielzahl von Formen, die durch verschiedene Grade von Invasivität und Aggressivität charakterisiert sind.

[0149] Änderung der Genexpression ist eng mit dem unkontrollierten Zellwachstum und der Dedifferenzierung verbunden, die eine häufige Eigenschaft aller Krebsformen ist. Es hat sich gezeigt, dass die Genome bestimmter gut studierter Tumoren verringerte Expression rezessiver Gene, die für gewöhnlich als Tumorsuppressionsgene bezeichnet werden, die normalerweise wirken, um malignes Zellwachstum zu vermeiden, und/oder Überexpression bestimmter dominanter Gene, wie z.B. Onkogene, die wirken, um malignes Wachstum zu fördern, zeigen. Jede dieser Genänderungen scheint für den Import einiger Merkmale verantwortlich zu sein, die zusammen einen vollständigen neoplastischen Phänotyp repräsentieren (Hunter, Cell 64, 1129 (1991), Bishop, Cell 64, 235-248 (1991)).

[0150] Ein bekannter Mechanismus von Gen- (z.B. Onkogen-) Überexpression in Krebszellen ist die Genamplifikation. Dies ist ein Verfahren, wo im Chromosom der Stammzelle multiple Kopien eines besonderen Gens produziert werden. Der Prozess umfasst die außerplanmäßige Replikation der Region des Chromosoms, welches das Gen umfasst, gefolgt von Rekombination der replizierten Segmente zurück in das Chromosom (Alitalo et al., Adv. Cancer Res. 47, 235-281 (1986)). Es wird davon ausgegangen, dass die Überexpression des Gens Genamplifikation parallelisiert, d.h. zur Zahl der hergestellten Kopien proportional ist.

[0151] Es ist festgestellt worden, dass Proto-Onkogene, die für Wachstumsfaktoren und Wachstumsfaktorrezeptoren kodieren, wichtige Rollen in der Pathogenese verschiedener menschlicher Malignitäten spielen, einschließlich Brustkrebs. Zum Beispiel ist herausgefunden worden, dass das menschliche ErbB2-Gen (erbB2, auch bekannt als her2 oder c-erbB-2), das für einen 185-kd-Transmembrannglykoproteinrezeptor kodiert (p185^{Her2}, Her2), verwandt mit dem Epidermiswachstumsfaktorrezeptor (EGFR), in etwa 25 % bis 30 % des menschlichen Brustkrebs überexprimiert wird (Slamon et al., Science 235, 177-182 (1987), Slamon et al., Science 244, 707-712 (1989)).

[0152] Es ist berichtet worden, dass Genamplifikation eines Protoonkogens ein Ereignis ist, das typischerweise in die maligneren Formen von Krebs involviert ist und als Anzeichen für das klinische Ergebnis wirken kann (Schwab et al., Genes Chromosomes Cancer 1, 181-193 (1990), Alitalo et al., siehe oben). Daher wird die erbB2-Überexpression für gewöhnlich als Anzeichen für eine schlechte Prognose angesehen, besonders bei Patienten mit einer Primärerkrankung, die axillare Lymphknoten umfasst (Slamon et al. (1987) und (1989), siehe oben, Ravdin und Chamness, Gene 159, 19-27 (1995), und Hynes und Stern, Biochim. Biophys. Acta 1198, 165-184 (1994)), und mit Empfindlichkeit und/oder Resistenz gegenüber Hormontherapie und chemotherapeutischen Behandlungsplänen verbunden ist, einschließlich CMF (Cyclophosphamid, Methotrexat und Fluoruracil) und Anthracycline (Baselga et al., Oncology 11 (3 Beilage 1), 43-48 (1997)). Jedoch waren trotz der Assoziation von erbB2-Überexpression mit schlechter Prognose die Chancen von HER2-positiven Patienten, klinisch auf Behandlung mit Taxanen zu reagieren, dreimal so hoch wie jene von HER2-negativen Patienten (ebenda). Ein rekombinanter humanisierter monoklonaler Anti-ErbB2- (Anti-Her2-) Antikörper (eine humanisierte Version des murinen AntiErbB2-Antikörpers 4D5, der als rhuMAK HER2 oder Herceptin7 bezeichnet wird) ist bei Patienten mit ErbB2-überexprimierendem Metastasenbrustkrebs, der ausgedehnte vorherige Antikrebstherapie erhielt, klinisch aktiv gewesen (Baselga et al., J. Clin. Oncol. 14, 737-744 (1996)).

7. Screeningtests für Arzneimittelkandidaten

[0153] Screeningtests für Arzneimittelkandidaten sind so entworfen, dass sie Verbindungen identifizieren, die Polypeptide binden oder mit ihnen Komplexe bilden, für welche die hierin identifizierten Gene oder ein biologisch aktives Fragment davon kodieren, oder aber in die Wechselwirkung der kodierten Polypeptide mit anderen zellulären Proteinen eingreifen. Solche Screeningtests umfassen Tests, die für Hochdurchsatzverfahren

von chemischen Bibliotheken zugänglich sind, was sie besonders geeignet zur Identifizierung von kleinen Wirkstoffkandidaten macht. Kleine in Betracht gezogene Moleküle umfassen synthetische organische oder anorganische Verbindungen, einschließlich Peptide, vorzugsweise lösliche Peptide, (Poly)Peptid-Immunglobulininfusionen und insbesondere Antikörper, die unter anderem poly- und monoklonale Antikörper und Antikörperfragmente, einkettige Antikörper, antiidiotypische Antikörper und chimäre oder humanisierte Versionen solcher Antikörper oder Fragmente umfassen, sowie menschliche Antikörper als auch Antikörperfragmente. Die Tests können in einer Vielzahl von Formaten durchgeführt werden, einschließlich Protein-Proteinbindungstests, biochemischer Screeningtests, Immuntests und zellbasierter Tests, die alle im Fachgebiet gut beschrieben sind.

[0154] Alle Tests sind insofern gleich, als dass sie ein Kontaktieren des Arzneimittelkandidaten mit einem Polypeptid verlangen, für welches eine hierin identifizierte Nucleinsäure kodiert, unter Bedingungen und für einen ausreichenden Zeitraum, um diesen zwei Komponenten zu ermöglichen, wechselzuwirken.

[0155] In Bindungstests ist die Wechselwirkung Bindung, und der gebildete Komplex kann isoliert oder im Reaktionsgemisch detektiert werden. In einer besonderen Ausführungsform wird das Polypeptid, das vom hierin identifizierten Gen kodiert wird, oder der Arzneimittelkandidat auf einer Festphase, z.B. einer Mikrotiterplatte, durch kovalente oder nicht-kovalente Anheftungen, immobilisiert. Nicht-kovalente Anheftung wird im Allgemeinen durch Beschichtung der festen Oberfläche mit einer Lösung des Polypeptids und Trocknung erreicht. Alternativ dazu kann ein immobilisierter Antikörper, z.B. ein monoklonaler Antikörper, der für das zu immobilisierende Polypeptid spezifisch ist, dazu verwendet werden, es an einer festen Oberfläche zu verankern. Der Test wird durch Hinzufügung der nicht-immobilisierten Komponente, die durch eine detektierbare Markierung markiert werden kann, zur immobilisierten Komponente, z.B. die beschichtete Oberfläche, welche die verankerte Komponente enthält, durchgeführt. Wenn die Reaktion vollständig ist, werden nicht-umgesetzte Komponenten entfernt, z.B. durch Waschung, und Komplexe, die auf der festen Oberfläche verankert sind, werden detektiert. Wenn die ursprüngliche nicht-immobilisierte Komponente eine detektierbare Markierung trägt, zeigt die Detektion der Markierung, die auf der Oberfläche immobilisiert ist, dass Komplexierung eintrat. Wo die ursprüngliche nicht-immobilisierte Komponente keine Markierung trägt, kann Komplexierung z.B. durch Verwendung eines markierten Antikörpers, der spezifisch den immobilisierten Komplex bindet, detektiert werden.

[0156] Wenn die Kandidatenverbindung mit einem bestimmten Protein, für welches ein hierin identifiziertes Gen kodiert, wechselwirkt aber sich nicht daran bindet, kann seine Wechselwirkung mit dem Protein durch wohlbekannte Verfahren zur Detektion von Protein-Protein-Wechselwirkungen getestet werden. Solche Tests umfassen traditionelle Ansätze, wie z.B. Vernetzung, Co-Immunpräzipitation und Co-Reinigung durch Gradienten oder chromatographische Säulen. Zusätzlich dazu können Protein-Proteinwechselwirkungen durch Verwendung eines hefebasierten, von Fields und Mitarbeitern beschriebenen genetischen Systems überwacht werden [Fields und Song, *Nature (London)* 340, 245-246 (1989); Chien et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 9578-9582 (1991)], wie von Chevray und Nathans offenbart [*Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 89, 5789-5793 (1991)]. Viele Transkriptionsaktivatoren, wie z.B. Hefe GAL4, bestehen aus zwei physikalisch diskreten Modularomänen, wovon eine als DNA-Bindungsdomäne wirkt, während die andere als Transkriptionsaktivierungsdomäne wirkt. Das Hefeexpressionssystem, das in den vorangegangenen Veröffentlichungen beschrieben worden ist (im Allgemeinen als „Zweihybridsystem“ bezeichnet), zieht aus dieser Eigenschaft Vorteil und verwendet zwei hybride Proteine, eines, in welchem das Targetprotein an die DNA-Bindungsdomäne von GAL4 fusioniert ist, und ein anderes, in welchem das Kandidaten-Aktivierungsprotein an die Aktivierungsdomäne fusioniert ist. Die Expression eines GAL4-lacZ-Reportergens unter Kontrolle eines GAL4-aktivierten Promotors hängt von der Rekonstitution von GAL4-Aktivität über Protein-Protein-Wechselwirkung ab. Kolonien, die wechselwirkende Polypeptide enthalten, werden mit einem chromogenen Substrat für β -Galactosidase detektiert. Ein vollständiges Set (MATCHMAKER™) zur Identifikation von Protein-Protein-Wechselwirkungen zwischen zwei spezifischen Proteinen, welche die Zweihybridverfahren benutzen, ist kommerziell von Clontech zu beziehen. Dieses System kann auch ausgedehnt werden, um Proteindomänen anzugleichen, die in spezifische Proteinwechselwirkungen involviert sind, sowie um Aminosäurereste zu lokalisieren, die für diese Wechselwirkungen entscheidend sind.

[0157] Um Verbindungen zu finden, welche die Wechselwirkung eines hierin identifizierten Gens und anderer intra- oder extrazellulärer Komponenten beeinflusst, wird für gewöhnlich ein Reaktionsgemisch, welches das Produkt des Gens und die intra- oder extrazelluläre Komponenten enthält, unter Bedingungen und für einen Zeitraum, die Wechselwirkung und die Bindung von zwei Produkten ermöglichen, hergestellt. Um die Fähigkeit einer Testverbindung zu testen, Bindung zu hemmen, wird die Reaktion in Abwesenheit und in Gegenwart der Testverbindung laufen gelassen. Zusätzlich dazu kann ein Placebo zu einem dritten Reaktionsgemisch zugegeben werden, um als positive Kontrolle zu dienen. Die Bindung (Komplexbildung) zwischen der Testverbindung und der intra- oder extrazellulären Komponente, die im Gemisch gegenwärtig ist, wurde wie oben be-

schrieben überwacht. Die Bildung eines Komplexes in der/den Kontrollreaktion(en), aber nicht im Reaktionsgemisch, das die Testverbindung enthält, zeigt, dass die Testverbindung die Wechselwirkung der Testverbindung und ihrer Reaktionspartner beeinflusst.

B. Zusammensetzungen und Verfahren zur Behandlung von immunassoziierten Erkrankungen

[0158] Die Zusammensetzungen, die zur Behandlung von immunassoziierten Erkrankungen zweckdienlich sind, umfassen ohne Einschränkung Antikörper, kleine organische und anorganische Moleküle, Peptide, Phosphopeptide, Antisense- und Ribozym-Moleküle, Tripelhelixmoleküle usw., welche die Immunfunktion, z.B. die T-Zellproliferation/-aktivierung, Lymphokinfreisetzung oder Immunzellfiltration, hemmen oder stimulieren.

[0159] Beispielsweise wirken Antisense-RNA und RNA-Molekül, um die Translation von mRNA durch Hybridisieren an abgezielte mRNA und Verhinderung der Proteintranslation direkt zu blockieren. Wenn Antisense-DNA verwendet wird, sind Oligodesoxyribonucleotide bevorzugt, die von der Translationsinitiationsstelle stammen, z.B. von einer Position zwischen ungefähr -10 und +10 der Ziel-Gen-Nucleotidsequenz.

[0160] Ribozyme sind enzymatische RNA-Moleküle, die fähig sind, die spezifische Spaltung von RNA zu katalysieren. Ribozyme agieren durch sequenzspezifische Hybridisierung an die komplementäre Ziel-RNA, gefolgt von endonucleolytischer Spaltung. Spezifische Ribozym-Spaltstellen innerhalb eines potentiellen RNA-Ziels können mithilfe bekannter Techniken identifiziert werden. Für weitere Einzelheiten siehe z.B. Rossi, *Current Biology* 4, 469-471 (1994), und PCT-Veröffentlichung Nr. WO 97/33551 (veröffentlicht am 18. September 1997).

[0161] Nucleinsäuremoleküle in Tripelhelix-Formation, die zur Hemmung der Transkription verwendet werden, sollten einzelsträngig und aus Desoxynucleotiden zusammengesetzt sein. Die Basenzusammensetzung dieser Oligonucleotide ist so konstruiert, dass sie die Tripelhelix-Bildung über Hoogsteen-Basenpaarungsgesetze fördert, was im Allgemeinen beträchtliche Abschnitte von Purinen oder Pyrimidinen an einem Strang eines Duplex erfordert. Für weitere Einzelheiten siehe z.B. PCT-Veröffentlichung Nr. WO 97/33551, s.o.

[0162] Diese Moleküle können durch ein beliebiges oder durch jegliche Kombination der hierin oben erörterten Screeningtests und/oder durch jegliche andere Screeningtests identifiziert werden, die dem Fachkundigen auf dem Gebiet der Erfindung wohlbekannt sind.

9. Antikörper

[0163] Einige der aussichtsreichsten Medikament-Kandidaten gemäß der vorliegenden Erfindung sind Antikörper und Antikörperfragmente, welche die Proliferation von T-Zellen, Leukozyteninfiltration etc. hemmen (Antagonisten) oder stimulieren (Agonisten) können. Exemplarische Antikörper umfassen polyklonale, monoklonale, humanisierte, bispezifische und Heterokonjugatantikörper.

a. Polyklonale Antikörper

[0164] Verfahren zur Herstellung polyklonaler Antikörper sind dem Fachmann bekannt. Polyklonale Antikörper können in einem Säugetier hergestellt werden, beispielsweise durch eine oder mehrere Injektionen eines immunisierenden Mittels und, falls erwünscht, eines Adjuvans. Typischerweise wird das immunisierende Mittel und/oder Adjuvans durch mehrfache subkutane oder intraperitoneale Injektionen in das Säugetier injiziert. Das immunisierende Mittel kann das PRO301-, PRO362- oder PRO245-Polypeptid der Erfindung oder ein Fusionsprotein davon umfassen. Es kann zweckdienlich sein, das immunisierende Mittel an ein Protein zu konjugieren, das im zu immunisierenden Säugetier bekanntermaßen immunogen ist. Beispiele derartiger immunogener Proteine umfassen, sind jedoch nicht beschränkt auf, Schlüsselloch-Napfschnecken-Hämocyanin, Serumalbumin, Rinderthyreoglobulin und Sojabohnen-Trypsininhibitor. Beispiele für Adjuvanzen, die eingesetzt werden können, umfassen Freundesches komplettes Adjuvans und MPL-TDM-Adjuvans (Monophosphoryl-Lipid A, synthetisches Trehalose-Dicorynomycolat). Das Immunisierungsprotokoll kann von einem Fachmann auf dem Gebiet der Erfindung ohne übermäßiges Experimentieren gewählt werden.

b. Monoklonale Antikörper

[0165] Antikörper, die Polypeptide der Erfindung erkennen oder als Antagonisten dazu wirken, können alternativ dazu monoklonale Antikörper sein. Monoklonale Antikörper können unter Verwendung von Hybridomverfahren, wie z.B. jenen von Kohler und Milstein, *Nature* 256, 495 (1975), beschriebenen, hergestellt werden. Bei

einem Hybridomverfahren wird eine Maus, ein Hamster oder ein anderes geeignetes Wirtstier typischerweise mit einem immunisierenden Mittel immunisiert, um Lymphozyten hervorzurufen, die Antikörper produzieren oder dazu fähig sind, Antikörper zu produzieren, die spezifisch an das immunisierende Mittel binden. Alternativ dazu können die Lymphozyten *in vitro* immunisiert werden.

[0166] Das immunisierende Mittel wird typischerweise das PRO301-, PRO362- oder PRO245-Polypeptid der Erfindung, ein Antigenfragment oder ein Fusionsprotein davon umfassen. Im Allgemeinen werden entweder Peripherblut-Lymphozyten („PBLs“) verwendet, falls Zellen menschlichen Ursprungs gewünscht sind, oder Milzzellen oder Lymphknotenzellen, falls nicht-menschliche Säugetierquellen gewünscht sind. Die Lymphozyten werden dann mit einer immortalisierten Zelllinie unter Verwendung eines geeigneten Fusionierungsmittels, wie z.B. Polyethylenglykol, fusioniert, um eine Hybridomzelle zu bilden (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, S. 59-103 (1986)). Immortalisierte Zelllinien sind üblicherweise transformierte Säugetierzellen, insbesondere Myelomzellen von Nagetieren, Rindern oder menschlichen Ursprungs. Üblicherweise werden Ratten- oder Maus-Myelomzelllinien eingesetzt. Die Hybridomzellen können in einem geeigneten Kulturmedium kultiviert werden, das vorzugsweise eine oder mehrere Substanzen enthält, die das Wachstum oder Überleben nicht fusionierter, immortalisierter Zellen hemmt. Wenn beispielsweise den elterlichen Zellen das Enzym Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HGPRT oder HPRT) fehlt, wird das Kulturmedium für die Hybridome typischerweise Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin („HAT-Medium“) umfassen, wobei diese Substanzen das Wachstum HGPRT-defizienter Zellen verhindert.

[0167] Bevorzugte immortalisierte Zelllinien sind jene, die effizient fusionieren, eine stabile Expression des Antikörpers durch die selektierten Antikörper-produzierenden Zellen im hohen Ausmaß aufrechterhalten und gegen ein Medium, wie z.B. HAT-Medium, empfindlich sind. Bevorzugtere immortalisierte Zelllinien sind Maus-Myelomlinien, die beispielsweise vom Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, Kalifornien, und der American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, Maryland, erhalten werden können. Menschliche Myelom- und Maus-Mensch-Heteromyelomzelllinien sind zur Produktion menschlicher monoklonaler Antikörper ebenfalls beschrieben worden (Kozbor, *J. immunol.* 133, 3001 (1984); Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, Marcel Dekker Inc., New York, S. 51-63 (1987)).

[0168] Das Kulturmedium, in dem die Hybridomzellen kultiviert werden, kann dann auf die Gegenwart von monoklonalen Antikörpern getestet werden, die gegen das Polypeptid der Erfindung gerichtet sind und ähnliche Aktivität wie das Polypeptid der Erfindung haben. Vorzugsweise wird die Bindungsspezifität der von den Hybridomzellen produzierten monoklonalen Antikörper mittels Immunopräzipitation oder durch einen *In-vitro*-Bindungstest, wie z.B. Radioimmuntest (RIA) oder enzymgekoppelte Immunadsorptionsbestimmung (ELISA), ermittelt. Derartige Techniken und Tests sind auf dem Gebiet der Erfindung bekannt. Die Bindungsaffinität des monoklonalen Antikörpers kann beispielsweise mittels Scatchard-Analyse von Munson und Pollard, *Anal. Biochem.* 107, 220 (1980), ermittelt werden.

[0169] Nachdem die gewünschten Hybridomzellen identifiziert worden sind, können die Klone durch Grenzverdünnungsverfahren subkloniert und mittels Standardverfahren gezüchtet werden (Goding, s.o.). Geeignete Kulturmedien zu diesem Zweck umfassen beispielsweise Dulbecco's Modified Eagle's Medium und RPMI-1640-Medium. Alternativ dazu können die Hybridomzellen *in vivo* als Aszites in einem Säugetier gezüchtet werden.

[0170] Die von den Subklonen sekretierten monoklonalen Antikörper können durch herkömmliche Immunglobulin-Reinigungsverfahren, wie z.B. Protein-A-Sepharose, Hydroxylapatitchromatographie, Gelelektrophorese, Dialyse oder Affinitätschromatographie, aus dem Kulturmedium oder Aszites isoliert oder gereinigt werden.

[0171] Die monoklonalen Antikörper können außerdem durch DNA-Rekombinationsverfahren hergestellt werden, wie z.B. jene, die im US-Patent Nr. 4.816.567 beschrieben sind. Für die monoklonalen Antikörper der Erfindung kodierende DNA kann unter Verwendung herkömmlicher Verfahren (z.B. durch Verwendung von Oligonucleotidsonden, die fähig sind, spezifisch an Gene zu binden, die für die Schwer- und Leichtketten von Maus-Antikörpern kodieren) leicht isoliert und sequenziert werden. Die Hybridomzellen der Erfindung dienen als bevorzugte Quelle derartiger DNA. Wenn sie einmal isoliert ist, kann die DNA in Expressionsvektoren gesetzt werden, die dann in Wirtszellen, wie z.B. Simian-COS-Zellen, Chinahamster-Eierstock- (CHO-) Zellen oder Myelomzellen transfiziert werden, die ansonsten kein Immunglobulinprotein produzieren, um die Synthese monoklonaler Antikörper in den rekombinanten Wirtszellen zu erzielen. Die DNA kann auch modifiziert werden, beispielsweise durch Substituieren der kodierenden Sequenz für menschliche konstante Schwer- und Leichtkettendomänen anstelle der homologen Maus-Sequenzen (US-Patent Nr. 4.816.567; Morrison et al., s.o.) oder durch kovalentes Verbinden der gesamten oder eines Teils der kodierenden Sequenz für ein

Nicht-Immunglobulin-Polypeptid mit der für Immunglobulin kodierenden Sequenz. Die konstanten Domänen eines Antikörpers der Erfindung oder die variablen Domänen einer der Antigen-kombinierenden Stellen eines Antikörpers der Erfindung können durch ein derartiges Nicht-Immunglobulin-Polypeptid ersetzt werden, um einen chimären bivalenten Antikörper zu erzeugen.

[0172] Die Antikörper können monovalente Antikörper sein. Verfahren zur Herstellung monovalenter Antikörper sind auf dem Gebiet der Erfindung wohlbekannt. Beispielsweise umfasst eines der Verfahren die rekombinante Expression der Immunglobulin-Leichtkette und der modifizierten Schwereketten. Die Schwereketten sind im Allgemeinen an einer beliebigen Stelle in der Fc-Region trunziert, um die Schwerekettenvernetzung zu verhindern. Alternativ dazu werden die maßgeblichen Cysteinreste mit einem anderen Aminosäurerest substituiert oder werden deletiert, um eine Vernetzung zu verhindern.

[0173] In-vitro-Verfahren sind zur Herstellung monovalenter Antikörper ebenfalls geeignet. Der Verdau von Antikörpern, um Fragmente davon, insbesondere Fab-Fragmente, herzustellen, kann unter Verwendung von Routineverfahren, die auf dem Gebiet der Erfindung bekannt sind, erzielt werden.

C. Menschliche und humanisierte Antikörper

[0174] Die Antikörper der Erfindung können außerdem humanisierte oder menschliche Antikörper umfassen. Humanisierte Formen nicht-menschlicher (z.B. Maus-) Antikörper sind chimäre Immunglobuline, Immunglobulinketten oder Fragmente davon (wie z.B. Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ oder andere antigenbindende Untersequenzen von Antikörpern), die eine vom nicht-menschlichen Immunglobulin stammende Minimalsequenz enthalten. Humanisierte Antikörper umfassen menschliche Immunglobuline (Empfänger-Antikörper), in denen Reste einer komplementaritätsbestimmenden Region (CDR) des Empfängers durch Reste einer CDR einer nicht-menschlichen Spezies (Spender-Antikörper), wie z.B. Maus, Ratte oder Kaninchen, mit der gewünschten Spezifität, Affinität und Kapazität ersetzt sind. In manchen Fällen werden Fv-Gerüstregionreste des menschlichen Immunglobulins durch entsprechende nicht-menschliche Reste ersetzt. Humanisierte Antikörper können außerdem Reste umfassen, die sich weder im Empfänger-Antikörper noch in den importierten CDR- oder Gerüstsequenzen finden. Im Allgemeinen umfasst der humanisierte Antikörper im Wesentlichen alle von zumindest einer und typischerweise zwei variablen Domänen, in denen alle oder im Wesentlichen alle der CDR-Regionen jenen des nicht-menschlichen Immunglobulins entsprechen und alle oder im Wesentlichen alle der FR-Regionen jene einer menschlichen Immunglobulin-Konsensussequenz sind. Der humanisierte Antikörper umfasst im Optimalfall außerdem zumindest einen Teil einer konstanten Immunglobulinregion (Fc), typischerweise jenen eines menschlichen Immunglobulins (Jones et al., Nature 321, 522-525 (1986); Riechmann et al., Nature 332, 323-329 (1988); und Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2, 593-596 (1992)).

[0175] Verfahren zur Humanisierung nicht-menschlicher Antikörper sind auf dem Gebiet der Erfindung wohlbekannt. Im Allgemeinen weist ein humanisierter Antikörper einen oder mehrere Aminosäurereste auf, die aus einer nicht-menschlichen Quelle in diesen eingeführt sind. Diese nicht-menschlichen Aminosäurereste werden häufig als „Import“-Reste bezeichnet, die typischerweise einer variablen „Import“-Domäne entnommen sind. Die Humanisierung kann im Wesentlichen nach dem Verfahren von Winter und Mitarbeitern (Jones et al., Nature 321, 522-525 (1986); Riechmann et al., Nature 332, 323-327 (1988); Verhoeyen et al., Science 239, 1534-1536 (1988)) durchgeführt werden, indem die entsprechenden Sequenzen eines menschlichen Antikörpers durch Nagetier-CDRs oder -CDR-Sequenzen substituiert werden. Dementsprechend sind derartige „humanisierte“ Antikörper chimäre Antikörper (US-Patent Nr. 4.816.567), worin im Wesentlichen weniger als eine intakte menschliche variable Domäne mit der entsprechenden Sequenz aus einer nicht-menschlichen Spezies substituiert worden ist. In der Praxis sind humanisierte Antikörper typischerweise menschliche Antikörper, bei denen einige CDR-Reste und möglicherweise einige FR-Reste durch Reste aus analogen Stellen in Nager-Antikörpern substituiert sind.

[0176] Menschliche Antikörper können ebenfalls hergestellt werden, und zwar unter Verwendung verschiedener, auf dem Gebiet der Erfindung bekannter Techniken, einschließlich Phagen-Display-Bibliotheken (Hoogenboom und Winter, J. Mol. Biol. 227, 381 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol. 222, 581 (1991)). Die Techniken von Cole et al. und Boerner et al. sind zur Herstellung menschlicher monoklonaler Antikörper ebenfalls verfügbar (Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, S. 77 (1985), und Boerner et al., J. Immunol. 147(1), 86-95 (1991); US 5.750.373). Gleichermaßen können menschliche Antikörper durch Einführen menschlicher Immunglobulin-Loci in transgene Tiere hergestellt werden, z.B. in Mäuse, bei denen die endogenen Immunglobulingene teilweise oder vollständig inaktiviert worden sind. Bei Exposition wird eine Produktion menschlicher Antikörper beobachtet, die der im Menschen beobachteten in allen Aspekten, einschließlich Gen-Umordnung, Assemblierung und Antikörper-Repertoire, sehr nahe kommt. Dieser Ansatz wird beispiels-

weise in den US-Patenten Nr. 5.545.807; 5.545.806; 5.569.852; 5.625.126; 5.633.425; 5.661.016 und in den folgenden wissenschaftlichen Veröffentlichungen beschrieben: Marks et al., Bio/Technology 10, 779-783 (1992); Lonberg et al., Nature 368, 856-859 (1994); Morrison, Nature 368, 812-13 (1994); Fishwild et al., Nature Biotechnology 14, 845-51 (1996); Neuberger, Nature Biotechnology 14, 826 (1996); Lonberg und Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13, 65-93 (1995).

d. Bispezifische Antikörper

[0177] Eispezifische Antikörper sind monoklonale, vorzugsweise menschliche oder humanisierte, Antikörper, die Bindungsspezifitäten für zumindest zwei verschiedene Antigene aufweisen. Im vorliegenden Fall kann eine der Bindungsspezifitäten für das Polypeptid der Erfindung sein, die andere ist für jedes beliebige andere Antigen, und vorzugsweise für ein(en) Zelloberflächen-Protein oder -Rezeptor oder eine -Rezeptoruntereinheit.

[0178] Verfahren zur Herstellung bispezifischer Antikörper sind auf dem Gebiet der Erfindung bekannt. Herkömmlicherweise basiert die rekombinante Produktion von bispezifischen Antikörpern auf der Co-Expression von zwei Immunglobulin-Schwerketten/Leichtketten-Paaren, worin die zwei schweren Ketten unterschiedliche Spezifitäten aufweisen (Milstein & Cuello, Nature 305, 537-539 (1983)). Aufgrund der zufälligen Auswahl an Immunglobulinschwer- und -leichtketten produzieren diese Hybridome (Quadrome) ein potenzielles Gemisch von zehn verschiedenen Antikörpermolekülen, von denen nur eines die korrekte bispezifische Struktur aufweist. Die Reinigung des korrekten Moleküls erfolgt üblicherweise durch Affinitätschromatographieschritte. Ähnliche Verfahren sind in der WO 93/08829, veröffentlicht am 13. Mai 1993, und in Trauneker et al., EMBO J. 10, 3655-3659 (1991), offenbart.

[0179] Variable Antikörperdomänen mit den erwünschten Bindungsspezifitäten (Antikörper-Antigen-Kombinationsstellen) können an Immunglobulinkonstantdomänen-Sequenzen fusioniert werden. Die Fusion erfolgt vorzugsweise mit einer Immunglobulin-Schwerkettenkonstantdomäne, umfassend zumindest einen Teil der Gelenks-, CH2- und CH3-Regionen. Es wird bevorzugt, dass die erste Schwerketten-Konstantregion (CH1) die Stelle enthält, die für Leichtkettenbindung, vorhanden in zumindest einer der Fusionen, erforderlich ist. DNAs, die für die Immunglobulin-Schwerkettenfusionen und, sofern erwünscht, für die Immunglobulin-Leichtkette kodieren, werden in getrennte Expressionsvektoren inseriert und werden in einen geeigneten Wirtsorganismen co-transfiziert. Für nähere Details zur Herstellung von bispezifischen Antikörpern siehe beispielsweise Suresh et al., Methods in Enzymology 121, 210 (1986).

e. Heterokonjugierte Antikörper

[0180] Heterokonjugierte Antikörper setzen sich aus zwei kovalent gebundenen Antikörpern zusammen. Solche Antikörper wurden beispielsweise vorgeschlagen, um Immunsystemzellen auf unerwünschte Zellen zu richten [US-Patent Nr. 4.676.980], sowie zur Behandlung von HIV-Infektion [WO 91/00360; WO 92/200373; EP 03089]. Es wird erwogen, dass die Antikörper in vitro unter Verwendung von Verfahren, die auf dem Gebiet der synthetischen Proteinchemie bekannt sind, hergestellt werden können, einschließlich jener, die Vernetzungsmittel einbinden. Beispielsweise können Immunotoxine unter Verwendung einer Disulfid-Austauschreaktion oder durch Bildung einer Thioetherbindung konstruiert werden. Beispiele für geeignete Reagenzien für diesen Zweck umfassen Iminothiolat und Methyl-4-mercaptobutyrimidat sowie jene Reagenzien, die beispielsweise im US-Patent Nr. 4.676.980 offenbart sind.

f. Effektorfunktionsbearbeitung

[0181] Es kann wünschenswert sein, den Antikörper der Erfindung hinsichtlich der Effektorfunktion zu modifizieren, um z.B. die Wirksamkeit des Antikörpers bei der Behandlung von immunassoziierter Erkrankung zu steigern. Beispielsweise können ein oder mehrere Cysteinreste in die Fc-Region eingeführt werden, wodurch die Bildung von Disulfidbindungen zwischen den Ketten in dieser Region ermöglicht wird. Der so gebildete homodimere Antikörper kann verbesserte Internalisierungsfähigkeit und/oder gesteigerte komplementvermittelte Zellabtötung und antikörpervermittelte zelluläre Zytotoxizität (ADCC) aufweisen. Siehe Caron et al., J. Exp. Med. 176, 1191-1195 (1992), und B. Shopes, J. Immunol. 148, 2918-2922 (1992). Homodimere Antikörper mit gesteigerter Anti-Tumor-Aktivität können auch unter Verwendung heterobifunktionaler Vernetzer hergestellt werden, wie in Wolff et al., Cancer Research 53, 2560-2565 (1993), beschrieben wird. Alternativ dazu kann ein Antikörper so gentechnisch verändert werden, dass er duale Fc-Regionen aufweist und dadurch über gesteigerte Komplementlyse- und ADCC-Fähigkeiten verfügen kann. Siehe Stevenson et al., Anti-Cancer Drug Design 3, 219-230 (1989).

g. Immunkonjugate

[0182] Die Erfindung betrifft auch Immunkonjugate, die einen Antikörper umfassen, der an ein zytotoxisches Mittel wie beispielsweise ein chemotherapeutisches Mittel, Toxin (z.B. ein enzymatisch aktives Toxin oder ein Toxin bakteriellen, pflanzlichen oder tierischen Ursprungs oder auch von Pilzen oder Fragmente davon) oder ein radioaktives Isotop (d.h. ein Radiokonjugat) konjugiert ist.

[0183] Chemotherapeutische Mittel, die zur Herstellung solcher Immunkonjugate nützlich sind, wurden oben beschrieben. Enzymatisch aktive Toxine und Fragmente davon, die verwendet werden können, umfassen Diphtherie-A-Kette, nichtbindende aktive Fragmente von Diphtherietoxin, Exotoxin-A-Kette (aus *Pseudomonas aeruginosa*), Ricin-A-Kette, Abrin-A-Kette, Modeccin-A-Kette, α -Sarcin, Aleurites-fordii-Proteine, Dianthin-Proteine, *Phytolaca-america*-Proteine (PAPI, PAPII und PAP-S), *Momordica-charantia*-Inhibitor, Curcin, Crotin, *Sapaonaria-officinalis*-Inhibitor, Gelonin, Saporin, Mitogellin, Restrictocin, Phenomycin, Enomycin und die Tricothecene. Zahlreiche verschiedene Radionucleide sind zur Herstellung von radiokonjugierten Antikörpern erhältlich. Beispiele umfassen ^{212}Bi , ^{131}I , ^{131}In , ^{90}Y und ^{186}Re .

[0184] Konjugate des Antikörpers und des zytotoxischen Mittels werden unter Verwendung zahlreicher verschiedener bifunktionaler Proteinbindungsmittel wie z.B. N-Succinimidyl-3-(2-pyridyldithiol)propionat (SPDP), Iminothiolan (IT), bifunktionaler Derivate von Imidoestern (wie z.B. Dimethyladipimidat-HCl), aktiver Ester (wie z.B. Disuccinimidylsuberat), Aldehyden (wie Glutaraldehyd), Bisazido-Verbindungen (wie z.B. Bis(p-azidobenzoyl)hexandiamin), Bisdiazonium-Derivaten (wie z.B. Bis(p-diazoniumbenzoyl)ethylendiamin), Diisocyanaten (wie Toluol-2,6-diisocyanat) und bis-aktiver Fluorverbindungen (wie z.B. 1,5-Difluor-2,4-dinitrobenzol) hergestellt. Beispielsweise kann ein Ricinimmunotoxin wie in Vitetta et al., *Science* 238, 1098 (1987), beschrieben hergestellt werden. C-14-markierte 1-Isothiocyantobenzyl-3-methyl-diethylentriaminpentaessigsäure (MX-DTPA) ist ein beispielhafter Chelatbildner zur Konjugation von Radionucleotid an den Antikörper. Siehe die WO 94/11026.

[0185] In einer anderen Ausführungsform kann der Antikörper an einen „Rezeptor“ (wie Streptavidin) zur Verwendung bei Gewebs-Pretargeting konjugiert werden, worin das Antikörper-Rezeptor-Konjugat dem Patienten verabreicht wird, gefolgt von der Entfernung ungebundenen Konjugats aus dem Blutkreislauf unter Verwendung eines Klärungsmittels und der anschließenden Verabreichung eines „Liganden“ (z.B. Avidin), der an ein zytotoxisches Mittel (z.B. ein Radionucleotid) konjugiert ist.

h. Immunoliposomen

[0186] Die hierin offenbarten Proteine, Antikörper usw. können auch als Immunoliposomen formuliert werden. Liposomen, die den Antikörper enthalten, werden durch auf dem Gebiet der Erfindung bekannte Verfahren hergestellt, wie sie beispielsweise in Epstein et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 3688 (1985); Hwang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 4030 (1980); und den US-Patenten Nr. 4.485.045 und 4.544.545 beschrieben werden. Liposomen mit gesteigerter Zirkulationsdauer sind im US-Patent Nr. 5.013.556 offenbart.

[0187] Besonders nützliche Liposomen können durch das Umkehrphasen-Verdampfungsverfahren mit einer Lipidzusammensetzung, die Phosphatidylcholin, Cholesterin und PEG-derivatisiertes Phosphatidylethanolamin (PEG-PE) umfasst, hergestellt werden. Liposomen werden durch Filter von definierter Porengröße filtriert, um Liposomen mit dem erwünschten Durchmesser zu ergeben. Fab'-Fragmente des Antikörpers der vorliegenden Erfindung können an die Liposomen wie in Martin et al., *J. Biol. Chem.* 257, 286-288 (1982), beschrieben mittels einer Disulfid-Austauschreaktion konjugiert werden. Ein Chemotherapeutikum (wie beispielsweise Doxorubicin) ist gegebenenfalls im Liposom enthalten. Siehe Gabizon et al., *J. National Cancer Inst.* 81(19), 1484 (1989).

10. Pharmazeutische Zusammensetzungen

[0188] Die aktiven Moleküle der Erfindung, Polypeptide und Antikörper, sowie andere Moleküle, die durch die oben offenbarten Screeningtests identifiziert werden, können zur Behandlung von Entzündungserkrankungen in Form von pharmazeutischen Zusammensetzungen verabreicht werden.

[0189] Therapeutische Formulierungen des aktiven Moleküls, vorzugsweise eines PRO245-Antikörpers der Erfindung, für die Lagerung werden hergestellt, indem das aktive Molekül mit dem gewünschten Reinheitsgrad gegebenenfalls mit pharmazeutisch annehmbaren Trägern, Exzipienten oder Stabilisatoren vermischt werden (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16. Aufl., A. Osol (Hrsg.) (1980)), und zwar in Form von lyophilisierten

Formulierungen oder wässrigen Lösungen. Annehmbare Träger, Exzipienten oder Stabilisatoren sind für Empfänger bei den eingesetzten Dosierungen und Konzentrationen nicht toxisch und umfassen Puffer, wie z.B. Phosphat, Citrat und andere organische Säuren; Antioxidantien, einschließlich Ascorbinsäure und Methionin; Konservierungsmittel (wie z.B. Octadecyldimethylbenzylammoniumchlorid; Hexamethoniumchlorid; Benzalkoniumchlorid, Benzethoniumchlorid; Phenol; Butyl- oder Benzylalkohol; Alkylparabene, wie z.B. Methyl- oder Propylparaben; Catechin; Resorcin; Cyclohexanol; 3-Pentanol; und m-Cresol); niedermolekulare (weniger als etwa 10 Reste) Polypeptide; Proteine, wie z.B. Serumalbumin, Gelatine oder Immunglobuline; hydrophile Polymere, wie z.B. Polyvinylpyrrolidon; Aminosäuren, wie z.B. Glycin, Glutamin, Asparagin, Histidin, Arginin oder Lysin; Monosaccharide, Disaccharide und andere Kohlenhydrate, einschließlich Glucose, Mannose oder Dextrine; Chelatierungsmittel, wie z.B. EDTA; Zucker, wie z.B. Saccharose, Mannit, Trehalose oder Sorbit; salzbildende Gegenionen, wie z.B. Natrium; Metallkomplexe (z.B. Zn-Protein-Komplexe); und/oder nichtionische Tenside, wie z.B. TWEEN™, PLURONICS™ oder Polyethylenglykol (PEG).

[0190] Verbindungen, die von Screeningtests der vorliegenden Erfindung identifiziert wurden, können auf analoge Weise unter Anwendung von Standardtechniken formuliert werden, die auf dem Gebiet der Erfindung wohlbekannt sind.

[0191] Jedoch können auch Lipofektionen oder Liposomen verwendet werden, um das Polypeptid, den Antikörper oder ein Antikörperfragment an Zellen abzugeben. Wenn Antikörperfragmente verwendet werden, ist das kleinste hemmende Fragment, das spezifisch an die Bindungsdomäne des Zielproteins bindet, bevorzugt. Beispielsweise können auf Basis der Sequenzen der variablen Regionen eines Antikörpers Peptidmoleküle konstruiert werden, welche die Fähigkeit zur Bindung der Ziel-Proteinsequenz beibehalten. Derartige Peptide können chemisch synthetisiert und/oder mittels DNA-Rekombinationstechnologie hergestellt werden (siehe z.B. Marasco et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 7889-7893 (1993)).

[0192] Die Formulierung hierin kann außerdem mehr als eine aktive Verbindung enthalten, die für die jeweilige behandelte Indikation notwendig sind, vorzugsweise jene mit komplementären Aktivitäten, welche sich gegenseitig nicht nachteilig beeinflussen. Alternativ oder zusätzlich dazu kann die Zusammensetzung ein zytotoxisches Mittel, Cytokin oder wachstumshemmendes Mittel umfassen. Derartige Moleküle sind in geeigneter Weise in Kombination in Mengen vorhanden, die für den beabsichtigten Zweck wirksam sind.

[0193] Die aktiven Moleküle können auch in Mikrokapseln eingeschlossen sein, die beispielsweise durch Koazervationstechniken oder durch Grenzflächenpolymerisation, beispielsweise Hydroxymethylcellulose- oder Gelatine-Mikrokapseln bzw. Poly(methylmethacrylat)-Mikrokapseln, in kolloidalen Arzneimittel-Abgabesystemen (beispielsweise Liposomen, Albumin-Mikrokügelchen, Mikroemulsionen, Nanopartikeln und Nanokapseln) oder in Makroemulsionen hergestellt werden. Derartige Techniken werden in Remington's Pharmaceutical Sciences, 16. Aufl., A. Osol (Hrsg.) (1980), offenbart.

[0194] Die zur In-vivo-Verabreichung verwendeten Formulierungen müssen steril sein. Dies kann leicht mittels Filtration durch Sterilfiltrationsmembranen erzielt werden.

[0195] Es können Präparate mit nachhaltiger Freisetzung hergestellt werden. Geeignete Beispiele von Präparaten mit nachhaltiger Freisetzung umfassen semipermeable Matrices fester hydrophober Polymere, die den Antikörper enthalten, wobei die Matrices in Form von Formteilen, z.B. Filmen oder Mikrokapseln, vorliegen. Beispiele für Matrices für nachhaltige Freisetzung umfassen Polyester, Hydrogele (beispielsweise Poly(2-hydroxyethyl-methacrylat) oder Poly(vinylalkohol)), Polylactide (US-Patent Nr. 3.773.919), Copolymere von L-Glutaminsäure und γ -Ethyl-L-glutamat, nicht abbaubares Ethylenvinylacetat, abbaubare Milchsäure-Glykolsäure-Copolymere, wie z.B. das LUPRON DEPOT™ (injizierbare Mikrokügelchen, die aus Milchsäure-Glykolsäure-Copolymer und Leuprolid-Acetat zusammengesetzt sind) und Poly-D(-)-3-hydroxybuttersäure. Während Polymere, wie z.B. Ethylenvinylacetat und Milchsäure-Glykolsäure, die Freisetzung von Molekülen für über 100 Tage ermöglichen, setzen gewisse Hydrogele Protein über kürzere Zeiträume frei. Wenn verkapselte Antikörper für lange Zeit im Körper verbleiben, können sie als Ergebnis des Aussetzens gegenüber Feuchtigkeit bei 37°C denaturieren oder aggregieren, was in einem Verlust biologischer Aktivität und möglichen Veränderungen der Immunogenität resultiert. Es können rationale Strategien zur Stabilisierung in Abhängigkeit vom beteiligten Mechanismus entwickelt werden. Wenn beispielsweise der Aggregationsmechanismus als Bildung intermolekularer S-S-Bindungen über Thio-Disulfid-Austausch erkannt wird, kann eine Stabilisierung durch Modifizieren von Sulfhydrylresten, Lyophilisieren aus sauren Lösungen, Kontrolle des Feuchtigkeitsgehalts, Verwendung geeigneter Zusätze und Entwickeln spezieller Polymermatrix-Zusammensetzungen erzielt werden.

11. Behandlungsverfahren

[0196] Es ist vorgesehen, dass die Polypeptide, Antikörper und andere aktive Verbindungen der vorliegenden Erfindung verwendet werden können, um verschiedene Entzündungserkrankungen und -leiden zu behandeln, einschließlich jener, die durch Infiltration von Leukozytenzellen in ein Gewebe, Stimulation der Proliferation von T-Zellen, Inhibition der Proliferation von T-Zellen, erhöhte oder verringerte vaskuläre Permeabilität oder Inhibition davon gekennzeichnet sind.

[0197] Die hierin und in WO 99/27098 beschriebenen Verbindungen (z.B. PRO301, PRO362, PRO245) kodieren für neue Mitglieder einer Familie von Proteinen, die durch Homologie zu einem A33-Antigen gekennzeichnet sind. Die proentzündliche Natur der Verbindungen der Erfindung ist in den nachstehenden In-vitro-Tests angezeigt.

[0198] Die Proteine, für welche die DNA40628-, DNA45416- und DNA35638-Moleküle, die hierin und in WO 99/27098 offenbart sind, kodieren (Seq.-ID Nr. 1, Seq.-ID Nr. 2 bzw. Seq.-ID Nr. 9), teilen Homologie mit der Identität mit Bindungsadhäsionsmolekülen (JAM), Martin-Padura et al., J. Cell Biol. 142 (1), 117-27 (1998). JAM ist in die Gewinnung von Monozyten als Reaktion auf MCP-1, MCP-3 und LPS in vivo involviert. Antikörper zu JAM blockieren Monozytentransmigration in vivo. JAM befindet sich am Mausepithel und -endothel als Bindungsadhäsionsmolekül für Monozytentransmigration. Andere Leukozyten können ebenfalls JAM verwenden, aber es gibt keine Informationen, die diese Annahme unterstützen. JAM ist im Colon von Mäusen mit Colitis erhöht und spielt wahrscheinlich eine Rolle in der Gewinnung von Monozyten oder Leukozyten in die Colonläsion.

[0199] Exemplarische Leiden oder Erkrankungen, die mit den Polypeptiden, Antikörpern und anderen Verbindungen der Erfindung behandelt werden, umfassen unter anderem entzündliche Darmerkrankung (z.B. Colitis ulcerosa, Crohn-Krankheit), systemischen Lupus erythematodes, rheumatoide Arthritis, juvenile chronische Arthritis, Spondyloarthropathien, systemische Sklerose (Sclerodermia), idiopathische entzündliche Myopathien (Dermatomyositis, Polymyositis), Sjögren-Syndrom, systemische Vaskulitis, Sarkoidose, hämolytische Autoimmunanämie (Immunpanzytopenie, paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie), Autoimmunthrombozytopenie (idiopathische thrombozytopenische Purpurs, immunvermittelte Thrombozytopenie), Thyreoiditis (Basedow-Krankheit, Hashimoto-Thyreoiditis, juvenile lymphozytische Thyreoditis, atrophische Thyreoditis), Diabetes mellitus, immunvermittelte Nierenerkrankung (Glomerulonephritis, tubulointerstitielle Nephritis), Entmarkungskrankheiten des zentralen und peripheren Nervensystems, wie z.B. multiple Sklerose, idiopathische Entmarkungspolyneuropathie oder Guillain-Barre-Syndrom und chronische entzündliche Entmarkungspolyneuropathie, Leber-Gallen-Erkrankungen, wie z.B. infektiöse Hepatitis (Hepatitis A, B, C, D, E und andere nicht-hepatotrope Viren), chronische aktive Autoimmunhepatitis, primäre biliäre Leberzirrhose, granulomatöse Hepatitis und sklerosierende Cholangitis, entzündliche und fibrotische Lungenerkrankungen (z.B. zystische Fibrose, Zöliakie und Whipple-Krankheit, Autoimmun- oder immunvermittelte Hauterkrankungen, einschließlich bullöse Hauterkrankungen, Erythema multiforme und Kontaktdermatitis, Psoriasis, allergische Erkrankungen der Lunge, wie z.B. Asthma, allergische Rhinitis, atopische Dermatitis, Lebensmittelüberempfindlichkeit und Urtikaria, immunologische Krankheiten der Lunge, wie z.B. Eosinophilenpneumonien, idiopathische Lungenfibrose und exogen-allergische Alveolitis, mit Transplantation assoziierte Erkrankungen, einschließlich Transplantatabstoßung und Transplantat-gegen-Wirt-Erkrankung.

[0200] Bei systemischem Lupus erythematodes ist der Hauptvermittler von Erkrankung die Produktion von selbstreagierenden Antikörpern zu Selbstproteinen/Geweben und die folgende Erzeugung von immunvermittelter Entzündung. Antikörper vermitteln entweder direkt oder indirekt Gewebsschäden. Obwohl sich nicht gezeigt hat, dass T-Lymphozyten direkt in Gewebsschäden involviert sind, sind T-Lymphozyten für die Entwicklung von selbstreagierenden Antikörpern erforderlich. Die Genese von Erkrankung ist daher T-lymphozytenabhängig. Mehrere Organe und Systeme sind klinisch betroffen, einschließlich Nieren, Lungen, das Muskelskelettsystem, das mukokutane, Aug-, zentrale Nervensystem, kardiovaskuläre System, der gastrointestinale Trakt, das Knochenmark und Blut.

[0201] Rheumatoide Arthritis (RA) ist eine chronische systemische Autoimmunentzündungserkrankung, die hauptsächlich die Membrana synovialis mehrerer Gelenke mit resultierender Verletzung am Gelenksknorpel umfasst. Die Pathogenese ist T-lymphozytenabhängig und mit der Produktion von rheumatoiden Faktoren assoziiert, Auto-Antikörpern, die gegen Selbst-IgG gerichtet sind, mit der resultierenden Bildung von Immunkomplexen, die ein hohes Ausmaß in Gelenksflüssigkeit und Blut erreichen. Diese Komplexe im Gelenk können das spezielle Infiltrat von Lymphozyten und Monozyten im Synovium und nachfolgende deutliche Synovialveränderungen induzieren; der Gelenksraum/fluid, wenn es durch ähnliche Zellen unter Zugabe von zahlreichen

Neurophilen infiltriert wird. Die betroffenen Gewebe sind primär die Gelenke, oft in einem symmetrischen Muster. Jedoch treten extraartikuläre Erkrankungen auch in zwei Hauptformen auf. Eine Form ist die Entwicklung von extraartikulären Läsionen mit anhaltender progressiver Gelenkserkrankung und typischen Läsionen von Lungenfibrose, Vaskulitis und kutanen Geschwüren. Die zweite Form von extraartikulärer Erkrankung ist das so genannte Felty-Syndrom, das spät im Krankheitsverlauf von RA auftritt, manchmal nachdem Gelenkserkrankung ruhend geworden ist, und umfasst die Gegenwart von Neutropenie, Thrombozytopenie und Splenomegalie. Dies kann von Vaskulitis in mehreren Organen mit Bildungen von Infarkten, Hautgeschwüren und Gangrän begleitet sein. Patienten entwickeln oft auch Rheumaknoten im Subcutis-Gewebe, das die betroffenen Gelenke überlagert, die Knoten im späten Stadium haben nekrotische Zentren, umgeben von einem gemischten entzündlichen Zellinfiltrat. Andere Manifestationen, die bei RA auftreten können, umfassen Pericarditis, Pleuritis, Koronararteriitis, interstitielle Pneumonie mit Lungenfibrose, Keratokonjunktivitis sicca und Rheumaknoten.

[0202] Juvenile chronische Arthritis ist eine chronische idiopathische entzündliche Erkrankung, die oft im Alter von unter 16 Jahren beginnt. Ihr Phänotyp hat gewisse Ähnlichkeiten mit RA, einige Patienten, die rheumatoidfaktorpositiv sind, werden als Patienten klassifiziert, die juvenile rheumatoide Arthritis aufweisen. Die Erkrankung wird in drei Hauptkategorien unterteilt: pauciartikulär, polyartikulär und systemisch. Die Arthritis kann schwer sein und ist typischerweise schädlich und führt zu Gelenksankylose und verspätetem Wachstum. Andere Manifestationen können chronische Uveitis anterior und systemische Amyloidose umfassen.

[0203] Spondyloarthropathien sind eine Gruppe von Erkrankungen mit gewissen gemeinsamen klinischen Eigenschaften und der gemeinsamen Assoziation mit der Expression von HLA-627-Genprodukt. Die Erkrankungen umfassen: Bechterew-Krankheit, Reiter-Syndrom (reaktive Arthritis), Arthritis, die mit entzündlicher Darmerkrankung assoziiert ist; Spondylitis, die mit Psoriasis assoziiert ist, juvenile Spondyloarthropathie und nicht-differenzierte Spondyloarthropathie. Unterscheidungsmerkmale umfassen Sacroileitis mit oder ohne Spondylitis, entzündliche asymmetrische Arthritis; Assoziation mit HLA-B27 (ein serologisch definiertes Allel des HLA-B-Lokus von Klasse-I-MHC), Augenentzündung und Fehlen von Autoantikörpern, die mit einer anderen Rheumaerkrankung assoziiert sind. Die Zelle, die als Schlüssel zur Induktion der Erkrankung am meisten impliziert ist, ist der CD8+-T-Lymphozyt, eine Zelle, die auf ein Antigen abzielt, das von Klasse-I-MHC-Molekülen präsentiert wird. CD8+-T-Zellen können gegen das Klasse-I-MHC-Allel HLA-B27 reagieren, als ob es ein Fremdpeptid ist, das von MHC-Klasse-I-Molekülen exprimiert wird. Es ist die Hypothese aufgestellt worden, dass ein Epitop von HLA-B27 ein bakterielles oder anderes Mikrogenepitop nachahmt und daher eine CD8+-T-Zellreaktion induziert.

[0204] Systemische Sklerose (Scleroderma) hat eine unbekannte Ätiologie. Ein Kennzeichen der Erkrankung ist die Induration der Haut, wahrscheinlich wird diese durch einen aktiven Entzündungsprozess induziert. Scleroderma kann lokal oder systemisch sein, vaskuläre Läsionen sind häufig, und endothelialer Zellschaden in der Mikrovaskulatur ist ein frühes und wichtiges Ereignis in der Entwicklung von systemischer Sklerose, der vaskuläre Schaden kann immunvermittelt sein. Eine immunologische Basis ist durch die Gegenwart von mononuklearen Zellinfiltraten in den kutanen Läsionen und die Gegenwart von antinuklearen Antikörpern bei vielen Patienten impliziert. ICAM-1 wird oft auf der Zelloberfläche von Fibroblasten in Hautläsionen hinaufreguliert, was vermuten lässt, dass die T-Zellwechselwirkung mit diesen Zellen eine Rolle in der Pathogenese der Erkrankung spielt. Andere involvierte Organe umfassen: den Gastrointestinaltrakt: Atrophie glatter Muskulatur und Fibrose, was zu abnormer Peristaltik/Motilität führt; Niere: konzentrische subendotheliale Intimaproliferation, die kleine gebogene und interlobuläre Arterien mit resultierendem reduziertem Nierenkortexblutfluß betreffen, resultieren in Proteinurie, Azotämie und Hypertonie; Skelettmuskel: Atrophie, interstitielle Fibrose; Entzündung; Lunge: interstitielle Pneumonitis und interstitielle Fibrose; und Herz: Kontraktionsbandnekrose, Vernarbung/Fibrose.

[0205] Idiopathische entzündliche Myopathien, einschließlich Dermatomyositis, Polymyositis und anderer, sind Erkrankungen der chronischen Muskelentzündung von unbekannter Ätiologie, die zu Muskelschwäche führen. Muskelschaden/-entzündung ist oft symmetrisch und progressiv. Autoantikörper sind mit den meisten Formen assoziiert. Diese myositispezifischen Autoantikörper sind gegen die Funktion von Komponenten, Proteinen und RNAs gerichtet, die in die Proteinsynthese involviert sind.

[0206] Das Sjögren-Syndrom ist auf immunvermittelte Entzündung und nachfolgende funktionelle Zerstörung von Tränendrüsen und Speicheldrüsen zurückzuführen. Die Erkrankung kann mit entzündlichen Bindegeweberkrankungen assoziiert sein oder davon begleitet sein. Die Erkrankung ist mit Autoantikörperproduktion gegen Ro- und La-Antigene assoziiert, wovon beide kleine RNA-Proteinkomplexe sind. Läsionen führen zu Keratokonjunktivitis sicca, Xerostomie, mit anderen Manifestationen oder Assoziationen, einschließlich biliärer

Leberzirrhose, peripherer oder sensorischer Neuropathie und palpabler Purpurs.

[0207] Systemische Vaskulitis sind Erkrankungen, bei welchen die primäre Läsion Entzündung und nachfolgender Schaden an Blutgefäßen ist, die zu Ischämie/Nekrose/Abbau bei Geweben führt, die mit den betroffenen Geweben und in manchen Fällen schlussendlicher Endorgandysfunktion einhergehen. Vaskulitiden können ebenso als sekundäre Läsion oder Folgewirkungen zu anderen immun-entzündungsvermittelten Erkrankungen auftreten, wie z.B. rheumatoide Arthritis, systemische Sklerose etc., insbesondere bei Erkrankungen, die auch mit der Bildung von Immunkomplexen assoziiert sind. Erkrankungen in der primären systemischen Vaskulitisgruppe umfassen: systemische nekrotisierende Vaskulitis, Polyarteritis nodosa, allergische Angiitis und Granulomatose, Polyangiitis, Wegener-Granulomatose, lymphomatoide Granulomatose und Riesenzellarteritis. Verschiedenartige Vaskulitides umfassen: mukokutanes Lymphknotensyndrom (MLNS oder Kawasaki-Syndrom), isolierte ZNS-Vaskulitis, Gehet-Erkrankung, Thromboangitis obliterans (Bürger-Erkrankung) und kutane nekrotisierende Venulitis. Der pathogene Mechanismus der meisten angeführten Formen von Vaskulitis soll primär auf die Ablagerung von Immunglobulinkomplexen in der Gefäßwand und nachfolgende Induktion einer Entzündungsreaktion entweder über ADCC, Komplementaktivierung oder beide zurückzuführen sein.

[0208] Sarkoidose ist ein Leiden von unbekannter Ätiologie, das durch die Gegenwart von epitheloiden Granulomen in nahezu jedem beliebigen Gewebe im Körper charakterisiert ist; die Involvierung der Lunge ist am häufigsten. Die Pathogenese umfasst die Persistenz von aktivierten Makrophagen und Lymphoidzellen an Stellen der Erkrankung mit nachfolgenden chronischen Anzeichen, die sich aus der Freisetzung von lokal und systemisch aktiven Produkten ergeben, die von diesen Zelltypen freigesetzt werden.

[0209] Hämolytische Autoimmunanämie, die hämolytische Autoimmunanämie, Immunpancytopenie und paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie umfasst, ist eine Folge der Produktion von Antikörpern, die mit Antigenen reagieren, die auf der Oberfläche der roten Blutzellen exprimiert werden (und in manchen Fällen anderen Blutzellen, die auch Plättchen umfassen), und ist eine Reflektion der Entfernung dieser mit Antikörper umhüllten Zellen über komplementvermittelte Lyse und/oder ADCC/Fc-Rezeptorvermittelte Mechanismen.

[0210] Bei Autoimmunthrombozytopenie, einschließlich thrombozytopenischer Purpurs und immunvermittelter Thrombocytopenie in anderen klinischen Bereichen, tritt Plättchenzerstörung/-entfernung als Folge von entweder Antikörper- oder Komplement-Bindung an Plättchen und nachfolgende Entfernung durch Komplementlyse, ADCC oder FC-rezeptorvermittelte Mechanismen auf.

[0211] Thyreoiditis, einschließlich Basedow-Krankheit, Hashimoto-Thyreoiditis, juvenile lymphozytische Thyreoiditis und atrophische Thyreoiditis, sind das Ergebnis einer Autoimmunantwort gegen Thyreoidantigene mit Produktion von Antikörpern, die mit Proteinen reagieren, die in der Schilddrüse gegenwärtig sind und oft für diese spezifisch sind. Es bestehen Versuchsmodelle, die spontane Modelle umfassen: Ratten (BUF- und BB-Ratten) und Hühner (Stamm fettleibiger Hühner); induzierbare Modelle: Immunisierung von Tieren entweder mit Thyreoglobulin oder Schilddrüsenmikrosomenantigen (Thyreoidperoxidase).

[0212] Diabetes mellitus Typ 1 oder insulinabhängiger Diabetes ist die Autoimmunzerstörung von β -Inselzellen des Pankreas; diese Zerstörung wird durch Autoantikörper und autoreaktive T-Zellen vermittelt. Antikörper gegen Insulin oder den Insulinrezeptor können auch den Phänotyp von Insulinresistenz produzieren.

[0213] Immunvermittelte Nierenerkrankungen, einschließlich Glomerulonephritis und tubulointerstitielle Nephritis, sind das Ergebnis von Antikörper- oder T-lymphozytenvermittelten Schäden an Nierengewebe entweder direkt als Ergebnis der Produktion von autoreaktiven Antikörpern oder T-Zellen gegen Nierenantigen oder indirekt als Ergebnis der Ablagerung von Antikörpern und/oder Immunkomplexen in der Niere, die gegen andere Nichtnierenantigene reagieren. Daher können andere immunvermittelte Erkrankungen, die zur Bildung von Immunkomplexen führen, auch eine immunvermittelte Nierenerkrankung als direktes Folge besitzen. Sowohl direkte als auch indirekte Immunmechanismen führen zu einer Entzündungsreaktion, die Läsionsentwicklung von Nierengeweben mit resultierendem Schaden an der Organfunktion und in manchen Fällen Fortschreiten bis zum Nierenversagen produziert/induziert. Sowohl humorale als auch zelluläre Immunmechanismen können in die Pathogenese von Läsionen involviert sein.

[0214] Von Entmarkungskrankheiten der zentralen und peripheren Nervensysteme, wie z.B. multiple Sklerose, idiopathische Entmarkungspolyneuropathie oder Guillain-Barre-Syndrom und chronische entzündliche Entmarkungspolyneuropathie, wird angenommen, dass sie eine Autoimmunbasis haben und zu Nervenentmarkung als Folge von Schäden direkt an Oligodendrozyten oder Myelin haben. Bei MS gibt es Beweise, die vermuten lassen, dass Krankheitsinduktion und -progression von T-Lymphozyten abhängen. Multiple Sklerose

ist eine Entmarkungskrankheit, die T-Lymphozytenabhängig ist und entweder einen rückfallverhindernden Verlauf oder einen chronisch progressiven Verlauf nimmt. Die Ätiologie ist unbekannt, jedoch tragen Virusinfektionen, genetische Prädisposition, Umwelt und Autoimmunität alle dazu bei. Läsionen enthalten Infiltrate von vorherrschend durch T-Lymphozyten vermittelten Mikroglia und infiltrierenden Makrophagen; CD4+-T-Lymphozyten sind der vorherrschende Zelltyp an Läsionen. Der Mechanismus des Oligodendrozytenzelltods und nachfolgende Entmarkung ist nicht bekannt, aber vermutlich T-Lymphozytengesteuert.

[0215] Entzündliche und fibrotische Lungenerkrankung, einschließlich Eosinophilenpneumonien, idiopathischer Lungenfibrose und Hypersensibilisierungs-pneumonitis, kann eine deregulierte immunentzündliche Erkrankung umfassen. Die Inhibition dieser Antwort kann von therapeutischem Nutzen sein.

[0216] Autoimmun- oder immunvermittelte Hauterkrankung, einschließlich bullöser Hauterkrankungen, Erythema multiforme und Kontaktdermatitis, werden durch Autoantikörper vermittelt, deren Genese T-Lymphozytenabhängig ist.

[0217] Psoriasis ist eine T-Lymphozytenvermittelte Entzündungsreaktion. Läsionen enthalten Infiltrate von T-Lymphozyten, Makrophagen und antigenverarbeitenden Zellen und einige Neutrophile.

[0218] Allergische Erkrankungen, einschließlich Asthma, Rhinitis allergica, atopischer Dermatitis, Nahrungsmittelhypersensibilität und Urtikaria, sind T-Lymphozytenabhängig. Diese Erkrankungen werden vorrangig durch T-Lymphozyteninduzierte Entzündung, IgE-vermittelte Entzündung oder eine Kombination von beiden vermittelt.

[0219] Transplantationsassoziierte Erkrankungen, einschließlich Transplantatabstoßung und Transplantat-gegen-Wirt-Erkrankung (GVHD), sind T-Lymphozytenabhängig, die Inhibition von T-Lymphozytenfunktion ist meliorativ.

[0220] Andere Erkrankungen, bei welchen die Intervention der Immunität und/oder Entzündungsreaktion Vorteil haben, sind Infektionskrankheiten, einschließlich von unter anderem Virusinfektion (einschließlich von u.a. Aids, Hepatitis A, B, C, D, E), bakterielle Infektion, Pilzinfektion und Protozoen- und Parasiteninfektionen (Moleküle (oder Derivate/Agonisten), die MLR stimulieren, können therapeutisch verwendet werden, um die Immunantwort auf Infektionsmittel zu verstärken), Immundefizienzkrankheiten (Moleküle/Derivate/Agonisten, die MLR stimulieren, können therapeutisch verwendet werden, um die Immunantwort für erbliche, erworbene, infektiöse induzierte (wie bei HIV-Infektion) oder iatrogene Leiden (d.h. aus Chemotherapie) Immundefizienz zu verstärken) und Neoplasie.

[0221] Es ist gezeigt worden, dass manche menschliche Krebspatienten einen Antikörper und/oder T-Lymphozytenantwort auf Antigene auf neoplastischen Zellen entwickeln. Es ist auch in Tiermodellen von Neoplasie gezeigt worden, dass die Verstärkung der Immunantwort zu einer Abstoßung oder Regression dieses besonderen Neoplasmas führt. Moleküle, welche die T-Lymphozytenantwort in MLR verstärken, sind in-vivo in der Verstärkung der Immunantwort gegen Neoplasie nützlich. Moleküle, welche die T-Lymphozytenproliferative Antwort in MLR (oder kleine Molekülagonisten oder Antikörper, die denselben Rezeptor auf agonistische Art beeinflussten) verstärken, können dazu verwendet werden, Krebs therapeutisch zu behandeln. Moleküle, die die Lymphozytenantwort in MLR hemmen, wirken während Neoplasie auch in vivo, um die Immunantwort auf ein Neoplasma zu unterdrücken; solche Moleküle können entweder von den neoplastischen Zellen selbst exprimiert werden, oder ihre Expression kann von Neoplasma in anderen Zellen induziert werden. Antagonismus solcher Hemmmoleküle (entweder mit Antikörpern, kleinen Molekülantagonisten oder anderen Mitteln) verstärkt immunvermittelte Tumorabstoßung.

[0222] Weiters zeigt die Inhibition von Molekülen mit proentzündlichen Eigenschaften therapeutischen Nutzen bei Reperfusionsschädigung, Schlaganfall, Myokardinfarkt, Atherosklerose, akuter Lungenschädigung, hämorrhagischem Schock, Verbrennung, Sepsis/septischem Schock, akuter tubulärer Nekrose, Endometriose, degenerativer Gelenkerkrankung und Pankreatitis.

[0223] Die PRO245-Verbindungen der vorliegenden Erfindung, z.B. Antikörper, werden einem Säugetier, vorzugsweise einem Menschen, nach bekannten Verfahren, wie z.B. intravenöser Verabreichung als Bolus- oder kontinuierliche Infusion über einen Zeitraum, durch intramuskuläre, intraperitoneale, intrazerebrospinale, subkutane, intraartikuläre, intrasynoviale, intrathekale, orale, topische oder inhalative Wege (intranasal, intrapulmonär) verabreicht. Die intravenöse oder inhalierte Verabreichung von Polypeptiden und Antikörpern ist bevorzugt.

[0224] In der Immunadjuvanstherapie können andere therapeutische Regime, wie beispielsweise Verabreichung der Anti-Krebs-Mittel, mit der Verarbeitung der Proteine, Antikörper oder Verbindungen der vorliegenden Erfindung kombiniert werden. Beispielsweise kann der mit Immunadjuvanzen der Erfindung zu behandelnde Patient außerdem ein Anti-Krebsmittel (chemotherapeutisches Mittel) oder Bestrahlungstherapie erhalten. Herstellungs- und Dosierungspläne für derartige chemotherapeutische Mittel können nach Anleitungen des Herstellers verwendet oder vom geübten Praktiker empirisch ermittelt werden. Herstellungs- und Dosierungspläne für eine derartige Chemotherapie werden auch in *Chemotherapy Service Ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992)*, beschrieben. Das chemotherapeutische Mittel kann der Verabreichung des Immunadjuvans vorangehen oder folgen oder kann gleichzeitig damit verabreicht werden. Der Antikörper kann zusätzlich dazu mit einer Anti-Ostrogen-Verbindung, wie z.B. Tamoxifen, oder einem Anti-Progesteron, wie z.B. Onapriston (siehe EP 616812), in Dosierungen kombiniert werden, die für derartige Moleküle bekannt sind.

[0225] Es kann wünschenswert sein, außerdem Antikörper gegen andere Tumor-assoziierte Antigene zu verabreichen, wie z.B. Antikörper, die an CD20, CD11a, CD18, ErbB2, EGFR, ErbB3, ErbB4 oder Gefäßendothelfaktor (VEGF) binden. Alternativ oder zusätzlich dazu können dem Patienten gleichzeitig zwei oder mehr Antikörper verabreicht werden, die dasselbe oder zwei oder mehrere verschiedene hierin offenbarte Antigene binden. Manchmal kann es vorteilhaft sein, dem Patienten auch ein oder mehrere Cytokine zu verabreichen. In einer Ausführungsform werden die Polypeptide der Erfindung gemeinsam mit einem wachstumshemmenden Mittel verabreicht. Beispielsweise kann das wachstumshemmende Mittel zuerst verabreicht werden, gefolgt von einem Polypeptid der vorliegenden Erfindung. Jedoch ist die gleichzeitige Verabreichung oder die Verabreichung des Polypeptids der vorliegenden Erfindung als Erstes ebenfalls vorgesehen. Geeignete Dosierungen für das wachstumshemmende Mittel sind jene, die gegenwärtig verwendet werden, und können aufgrund der kombinierten Wirkung (Synergie) des wachstumshemmenden Mittels und des Polypeptids der Erfindung erniedrigt werden.

[0226] Zur Behandlung oder Reduktion der Schwere einer immunassoziierten Krankheit wird die geeignete Dosierung einer Verbindung der Erfindung von der Art der zu behandelnden Krankheit, wie oben definiert, der Schwere und dem Verlauf der Krankheit abhängen, davon, ob das Mittel zu präventiven oder therapeutischen Zwecken verabreicht wird, von der vorhergehenden Therapie, der Krankengeschichte des Patienten und Reaktion auf das Mittel und dem Ermessen des behandelnden Arztes. Die Verbindung wird dem Patienten in geeigneter Weise auf einmal oder über eine Reihe von Behandlungen verabreicht. Vorzugsweise ist es wünschenswert, die Dosis-Reaktionskurve und die pharmazeutische Zusammensetzung der Erfindung zuerst in vitro und dann in nützlichen Tiermodellen vor dem Testen am Menschen zu bestimmen.

[0227] Beispielsweise sind in Abhängigkeit von der Art und Schwere der Krankheit ungefähr 1 µg/kg bis 15 mg/kg (z. B. 0,1-20 mg/kg) Polypeptid oder Antikörper eine mögliche anfängliche Dosierung für die Verabreichung an den Patienten, sei es beispielsweise durch eine oder mehrere gesonderte Verabreichungen oder durch kontinuierliche Infusion. Eine typische tägliche Dosierung kann in Abhängigkeit von den oben erwähnten Faktoren von etwa 1 µg/kg bis 100 mg/kg oder mehr reichen. Für wiederholte Verabreichungen über mehrere Tage oder länger wird die Behandlung in Abhängigkeit vom Zustand aufrechterhalten, bis eine gewünschte Unterdrückung von Krankheitssymptomen auftritt. Jedoch können andere Dosierungsregime zweckdienlich sein. Der Fortschritt dieser Therapie kann durch herkömmliche Techniken und Tests leicht überwacht werden.

12. Fertigartikel

[0228] In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung wird ein Fertigartikel bereitgestellt, der Materialien enthält, die zur Diagnose oder Behandlung der oben beschriebenen Störungen zweckdienlich sind. Der Fertigartikel umfasst einen Behälter und ein Etikett. Geeignete Behälter umfassen beispielsweise Flaschen, Fläschchen, Spritzen und Teströhrchen. Die Behälter können aus einer Vielzahl von Materialien, wie z.B. Glas oder Kunststoff, bestehen. Der Behälter enthält eine Zusammensetzung, die zur Diagnose oder Behandlung des Leidens wirksam ist, und kann eine sterile Füllöffnung aufweisen (beispielsweise kann der Behälter ein Beutel für intravenöse Lösungen oder ein Fläschchen sein, das einen von einer subkutanen Injektionsnadel durchstechbaren Stopfen aufweist). Das aktive Mittel in der Zusammensetzung ist üblicherweise ein Polypeptid oder ein Antikörper der Erfindung. Das Etikett, das am Behälter angebracht oder diesem beigefügt ist, weist darauf hin, dass die Zusammensetzung zur Diagnose oder Behandlung des Leidens der Wahl verwendet wird. Der Fertigartikel kann weiters einen zweiten Behälter umfassen, der einen pharmazeutisch annehmbaren Puffer, wie z.B. phosphatgepufferte Salzlösung, Ringerlösung und Dextrose-Lösung, umfasst. Er kann weiters andere Materialien umfassen, die vom kommerziellen Standpunkt oder Standpunkt des Anwenders wünschenswert sind, einschließlich anderer Puffer, Verdüner, Filter, Nadeln, Spritzen und Packungsbeilagen mit Gebrauchs-

anweisungen.

13. Diagnose und Prognose von immunassoziierten Erkrankungen

[0229] Zelloberflächenproteine, wie z.B. Proteine, die in bestimmten immunassoziierten Erkrankungen überexprimiert werden, sind exzellente Ziele für Arzneimittelkandidaten oder Krankheitsbehandlung. Gemeinsam mit sekretierten, von den in immunassoziierten Krankheitszuständen amplifizierten Genen kodierten Proteinen finden dieselben Proteine weitere Anwendungen bei der Diagnose und Prognose dieser Erkrankungen. Beispielsweise können Antikörper, die gegen Proteinprodukte von Genen, die in multipler Sklerose, rheumatoider Arthritis oder einer anderen immunassoziierten Erkrankung amplifiziert werden, als Tumor-Diagnostika oder -Prognostika verwendet werden.

[0230] Beispielsweise können Antikörper, einschließlich Antikörperfragmente, verwendet werden, um die Expression der von den amplifizierten oder überexprimierten Genen kodierten Proteine qualitativ oder quantitativ nachzuweisen („Markergenprodukte“). Der Antikörper ist vorzugsweise mit einem detektierbaren, z.B. fluoreszierenden, Marker ausgestattet, und die Bindung kann mittels Lichtmikroskopie, Durchflusszytometrie, Fluorimetrie oder anderen auf dem Gebiet der Erfindung bekannten Techniken beobachtet werden. Diese Techniken sind besonders geeignet, wenn das überexprimierte Gen für ein Zelloberflächenprotein kodiert. Derartige Bindungstests werden im Wesentlichen wie oben beschrieben durchgeführt.

[0231] Der In-situ-Nachweis der Antikörperbindung an die Markergenprodukte kann beispielsweise mittels Immunfluoreszenz oder Immunelektronenmikroskopie durchgeführt werden. Zu diesem Zweck wird eine histologische Probe aus dem Patienten entfernt und ein markierter Antikörper auf diese vorzugsweise durch Überschichten der biologischen Probe mit dem Antikörper aufgebracht. Dieses Verfahren ermöglicht die Bestimmung der Verteilung des Markergenprodukts im untersuchten Gewebe. Für den qualifizierten Fachmann ist offensichtlich, dass eine breite Vielfalt an histologischen Verfahren für den In-situ-Nachweis leicht verfügbar ist.

[0232] Die folgenden Beispiele werden ausschließlich zu illustrativen Zwecken bereitgestellt und beabsichtigen in keiner Weise eine Einschränkung des Schutzzumfangs der vorliegenden Erfindung.

BEISPIELE

[0233] Im Handel erhältliche Reagenzien, auf die in den Beispielen Bezug genommen wird, wurden, sofern nicht anders angegeben, gemäß den Anleitungen des Herstellers verwendet. Die Quelle jener Zellen, die in den folgenden Beispielen und in der gesamten Patentbeschreibung durch ATCC-Zugangsnummern gekennzeichnet sind, ist die American Type Culture Collection, Rockville, Maryland.

BEISPIEL 1

Isolierung von cDNA-Klonen, die für menschliches PRO245 kodieren

[0234] Die extrazellulären Domänen- (ECD-) Sequenzen (einschließlich des Sekretionssignals, sofern vorhanden) aus etwa 950 bekannten sekretierten Proteinen aus der öffentlich zugänglichen Swiss-Prot-Proteindatenbank wurden verwendet, um EST-Datenbanken zu durchsuchen. Die EST-Datenbanken umfassten öffentliche EST-Datenbanken (z.B. GenBank) und eine private EST-DNA-Datenbank (z.B. LIFESEQ™, Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA). Die Suche wurde unter Verwendung des Computerprogramms BLAST oder BLAST-2 (z.B. Altschul et al., Methods in Enzymology 266, 460-480 (1996)) in Form eines Vergleichs der ECD-Proteinsequenzen mit einer 6-Raster-Translation der EST-Sequenz durchgeführt. Diese Vergleiche mit einem BLAST-Score von 70 (oder in manchen Fällen von 90) oder mehr, die nicht für bekannte Proteine kodierten, wurden gruppiert und mit dem Programm „phrap“ (Phil Green, University of Washington, Seattle, WA) zu Consensus-DNA-Sequenzen zusammengebaut.

[0235] Eine Consensus-DNA-Sequenz wurde in Bezug auf die anderen EST-Sequenzen zusammengebaut, worin die Consensus-Sequenz hierin DNA30954 genannt wird (Seq.-ID Nr. 27). Basierend auf der DNA30954-Consensussequenz wurden Oligonucleotide synthetisiert, um durch PCR eine cDNA-Bibliothek zu identifizieren, welche die Sequenz von Interesse enthielt und zur Verwendung als Sonden zur Isolierung eines Klons der für PRO245 kodierenden Sequenz voller Länge diente.

[0236] Ein Paar von PCR-Primern (Vorwärts- und Rückwärts-) wurde synthetisch hergestellt: Vorwärts-PCR-Primer: 5'-ATCGTTGTGAAGTTAGTGCCCC-3' (Seq.-ID Nr. 28)

Rückwärts-PCR-Primer: 5'-ACCTGCGATATCCAACAGAATTG-3' (Seq.-ID Nr. 29)

[0237] Vorwärts- und Rückwärts-PCR-Primer reichen im Allgemeinen von 20 bis 30 Nucleotiden und sind oft so entworfen, dass sie ein PCR-Produkt von etwa 10-1000 bp Länge ergeben. Die SONDENSEQUENZEN sind typischerweise 40-55 bp lang. In manchen Fällen werden zusätzliche Oligonucleotide synthetisiert, wenn die Consensussequenz größer als etwa 1-1,5 kbp ist. Um mehrere Bibliotheken für einen Klon voller Länge zu screenen, wurde DNA aus den Bibliotheken durch PCR-Amplifikation mit dem PCR-Primerpaar gescreent, wie von Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, beschrieben.

[0238] Zusätzlich dazu wurde eine synthetische Oligonucleotidhybridisierungssonde aus den DNA30954-Consensussequenzen hergestellt, die folgende Nucleotidsequenz aufwies:

Hybridisierungssonde:

5'-GGAAGAGGATACAGTCACTCTGGAAGTATTAGTGGCTCCAGCAGTTCC-3' (Seq.-ID Nr. 30)

[0239] Um mehrere Bibliotheken auf eine Quelle eines Klons voller Länge zu screenen, wurde DNA aus den Bibliotheken durch PCR-Amplifikation mit dem oben identifizierten PCR-Primerpaar gescreent. Eine positive Bibliothek wurde dann verwendet, um Klone, die für das PRO245-Gen kodierten, unter Verwendung des Sondenoligonucleotide und eines der PCR-Primer zu isolieren.

[0240] RNA zur Herstellung der cDNA-Bibliotheken wurde aus Lebergewebe eines menschlichen Fötus isoliert. Die cDNA-Bibliotheken, die verwendet wurden, um die cDNA-Klone zu isolieren, wurden durch Standardverfahren unter Einsatz von im Handel erhältlichen Reagenzien, wie jenen von Invitrogen, San Diego, CA, hergestellt. Die cDNA wurde mit Oligo-cT geprimt, das eine NotI-Stelle enthielt, mit dem stumpfen Ende an SalI-Hämokinaseadapto ren gebunden, mit NotI gespalten, durch Gelektrophorese geeignet klassiert und in einer definierten Orientierung in den einzigartigen XhoI- und NotI-Stellen in einen geeigneten Klonierungsvektor kloniert (wie z.B. pRKB oder pRKD, pRK5B ist ein Vorläufer von pRK5D, der keine SfiI-Stelle enthält; siehe Holmes et al., Science 253, 1278-1280 (1991)).

[0241] DNA-Sequenzierung der Klone, die wie oben beschrieben isoliert wurden, ergab die DNA-Sequenz voller Länge für ein Nativsequenz-PRO245 [hierin UNQ219 (DNA35638) (Seq.-ID Nr. 8) genannt] und die abgeleitete Proteinsequenz (Seq.-ID Nr. 9).

[0242] Die gesamte Nucleotidsequenz von UNQ219 (DNA35638) ist in [Fig. 2](#) dargestellt (Seq.-ID Nr. 8). Klon UNQ219 (DNA35638) (Seq.-ID Nr. 8) enthält einen einzigen offenen Leseraster mit einer offensichtlichen Translationsinitiationsstelle an Nucleotidpositionen 89-91 [Kozak et al., siehe oben] und mit Ende am Stop-Codon an den Nucleotidpositionen 1025-1027 ([Fig. 2](#), Seq.-ID Nr. 8). Der vorhergesagte Polypeptidvorläufer ist 312 Aminosäuren lang ([Fig. 3](#)) (Seq.-ID Nr. 9). Klon UNQ219 (DNA35638) ist bei der ATCC am 17. September 1997 hinterlegt worden, und es wurde ihm die ATCC-Hinterlegungsnummer 209265 zugeteilt.

BEISPIEL 2 (HINTERGRUND)

Inhibition von VEGF-stimulierter Proliferation des Wachstums von Endothelzellen

[0243] Adrenokortikale Rinderkapillarendothelzellen (ACE) (aus primärer Kultur, maximal 12-14 Passagen) wurden auf 96-Well-Mikrotiterplatten (Amersham Life Science) bei einer Dichte von 500 Zellen/Well pro 100 µl in DMEM mit wenig Glukose, 10 % Kälberserum, 2 mM Glutamin, 1 × pen/strept und Fungizon, ergänzt mit 3 ng/ml VEGF, ausplattiert. Kontrollen wurden auf dieselbe Art und Weise ausplattiert, manche umfassten aber kein VEGF. Eine Testprobe des PRO301- und PRO245-Polypeptids wurde in einem Volumen von 100 µl für ein Endvolumen von 200 µl hinzugefügt. Zellen wurden 6-7 Tage lang bei 37 °C inkubiert. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Ein Saure-Phosphatasereaktionsgemisch (100 µl, 0,1 M Natriumacetat, pH 5,5, 0,1 % Triton-100, 10 mM p-Nitrophenylphosphat) wurde hinzugegeben. Nach Inkubation 2 Stunden lang bei 37 °C wurde die Reaktion durch Hinzufügung von 10 µl 1 N NaOH gestoppt. OD wurde auf einem Mikrotiterplattenlesegerät bei 405 nm gemessen. Die Kontrollen waren keine Zellen, Zellen alleine, Zellen + FGF (5 ng/ml), Zellen + VEGF (3 ng/ml), Zellen + VEGF (3 ng/ml) + TGF-β (1 ng/ml) und Zellen + VEGF (3 ng/ml) + LIF (5 ng/ml). (Von TGF-β bei einer Konzentration von 1 ng/ml ist bekannt, dass es 70-90 % von VEGF-stimulierter Zellproliferation blockiert.)

[0244] Die Ergebnisse wurden durch Berechnung der prozentuellen Hemmung von mit VEGF (3 ng/ml) stimulierter Zellproliferation beurteilt, bestimmt durch die Messung der Aktivität von saurer Phosphatase bei OD₄₀₅ nm, (1) in Bezug auf Zellen ohne Stimulation und (2) in Bezug auf die Referenz-TGF-β-Inhibition von

VEGF-stimulierter Aktivität. Die Ergebnisse, die in Tabelle 1 dargestellt sind, zeigen die Nützlichkeit des PRO245-Polypeptids in der Inhibition von Zellwachstum, insbesondere Krebstherapie und insbesondere Hemmung von Tumorangiogenese.

Tabelle 1

Behandelte Verbindung	Konzentration	% Proliferation in Bezug auf die Kontrolle
DNA35638-Protein (Seq.-ID Nr. 9)	0,01 %	0,76
DNA35638-Protein (Seq.-ID Nr. 9)	0,1 %	0,35
DNA35638-Protein (Seq.-ID Nr. 9)	1,0 %	0,11
DNA35638-Protein (Seq.-ID Nr. 9)	0,48 nM	1,03
DNA35638-Protein (Seq.-ID Nr. 9)	4,8 nM	0,95
DNA35638-Protein (Seq.-ID Nr. 9)	48,0 nM	0,49

BEISPIEL 3

Stimulationsaktivität in einem Test der Reaktion gemischter Lymphozyten (MLR)

[0245] Dieses Beispiel zeigt, dass die Polypeptide der Erfindung als Stimulator der Proliferation von stimulierten T-Lymphozyten aktiv sind. Verbindungen, welche die Proliferation von Lymphozyten stimulieren, sind therapeutisch nützlich, wo die Verstärkung einer Entzündungsreaktion vorteilhaft ist. Verbindungen, welche die Proliferation von Lymphozyten hemmen, sind therapeutisch nützlich, wo eine Unterdrückung der Entzündungsreaktion besteht. Ein therapeutisches Mittel kann die Form von Antagonisten des Polypeptids der Erfindung annehmen, z.B. murin-menschlicher chimärer, humanisierter oder menschlicher Antikörper gegen das Polypeptid.

[0246] Das Basisprotokoll für diesen Test ist in Current Protocol in Immunology, Kapitel 3.12, J.E. Coligan, A.M. Kruisbeek, D.H. Marglies, E.M. Shevach und W. Strober, Hrsg., National Institutes of Health, veröffentlicht von John Wiley & Sons, Inc., beschrieben.

[0247] Genauer werden in einer Testvariante mononukleare periphere Blutzellen (PBMC) aus Säugetieren, z.B. einem freiwilligen Menschen, durch Leukophorese isoliert (ein Spender stellt stimulierende PBMCs bereit, der andere Responder-PBMCs). Wenn erwünscht werden die Zellen in fötalem Rinderserum und DMSO nach Isolierung gefroren. Gefrorene Zellen können über Nacht in Testmedium (37 °C, 5 % CO₂) aufgetaut und dann gewaschen und auf 3 × 10⁶ Zellen/ml Testmedium (RPMI, 10 % fötales Rinderserum, 1 % Penicillin/Streptomycin, 1 % Glutamin, 1 % HEPES, 1 % nicht-essentielle Aminosäuren, 1 % Pyruvat) resuspendiert werden.

[0248] Die Stimulatoren von PBMCs werden durch Bestrahlung der Zellen (etwa 3000 Rad) hergestellt. Der Test wird durch dreifache Ausplattierung von Wells eines Gemisches von: 100 µl Testprobe, verdünnt auf 1 % von 0,1 %, 50 µl bestrahlter Stimulatorzellen und 50 µl von Responder-PBMC-Zellen hergestellt. 100 µl von Zellkulturmedium oder 100 µl von CD4-IgG wird als Kontrolle verwendet. Die Wells werden dann bei 37 °C, 5 % CO₂ 4 Tage lang inkubiert. Am Tag 5 wird jedes Well mit tritiiertem Thymidin (1,0 mCi/Well, Amersham) pulsiert. Nach Stunden werden die Zellen dreimal gewaschen, und dann wird die Aufnahme der Markierung bewertet.

[0249] in einer anderen Variante dieses Tests werden PBMCs aus den Milzen von Balb/c-Mäusen und C57B6-Mäusen isoliert. Die Zellen werden aus frisch geernteten Milzen in Testmedium (RPMI, 10 % fötales Rinderserum, 1 % Penicillin/Streptomycin, 1 % Glutamin, 1 % HEPES, 1 % nicht-essentielle Aminosäuren, 1 % Pyruvat) gewonnen und die PBMCs durch Überlagerung dieser Zellen über Lympholyt-M (Organon Teknika), Zentrifugieren bei 2000 U/min 20 min lang, Gewinnung und Waschung der mononuklearen Zellschicht in

Testmedium und Resuspension der Zellen auf 1×10^7 Zellen/ml Testmedium isoliert. Der Test wird dann wie oben beschrieben durchgeführt. Die Ergebnisse dieses Tests für Verbindungen der Erfindung sind in Tabelle 2 dargestellt. Positive Zunahmen in Bezug auf die Kontrolle werden mit Zunahmen von mehr als oder gleich viel wie 180 %, was bevorzugt ist, als positiv erachtet. Jedoch zeigt jeder Wert über jenem der Kontrolle eine stimulierende Wirkung für das Testprotein an.

Tabelle 2

Verbindung	Konzentration	Prozentueller Anstieg in Bezug auf die Kontrolle
DNA35638-Protein (Seq.-ID Nr. 9)	0,1 %	189,7
DNA35638-Protein (Seq.-ID Nr. 9)	0,1 %	193,7
DNA35638-Protein (Seq.-ID Nr. 9)	1,0 %	212,5
DNA35638-Protein (Seq.-ID Nr. 9)	1,0 %	300,5

BEISPIEL 4

Entzündete Zelle infiltriert in Meerschweinchenhaut

[0250] Das folgende Beispiel zeigt, dass die Polypeptide der Erfindung proentzündlich sind, insofern, als dass sie Infiltrate von entzündeten Zellen (d.h. neutrophile, eosinophile, monozytische oder lymphozytische) in Meerschweinchenhaut stimulieren. Der hierin beschriebene Test überwacht die Kapazität jedes Proteins, ein Infiltrat einer entzündeten Zelle in die Haut eines Meerschweinchens zu induzieren. Verbindungen, die Entzündungsinfiltration stimulieren, sind therapeutisch nützlich, wo eine Verstärkung einer Entzündungsreaktion von Vorteil ist. Verbindungen, welche die Proliferation von Lymphozyten hemmen, sind therapeutisch nützlich, wo die Unterdrückung einer Entzündungsreaktion von Vorteil ist. Ein therapeutisches Mittel kann die Form von Antagonisten der Polypeptide der Erfindung annehmen, zum Beispiel murin-menschliche chimäre, humanisierte oder menschliche Antikörper gegen das Polypeptid.

[0251] Haarlose Meerschweinchen (Charles River Labs), die 350 Gramm oder mehr wiegen, werden mit Ketamin (75-80 mg/kg Körpergewicht) und Xylazin (5 mg/kg Körpergewicht) intramuskulär anästhesiert. Die Proteinproben werden intradermal auf die Rücken jedes Tiers in einem Volumen von 100 µl pro Injektionsstelle injiziert. Es gibt etwa 16-24 Injektionsstellen pro Tier. Ein ml von Evans-Blau-Farbstoff (1 % in physiologischer gepufferter Salzlösung) wird intrakardial injiziert. Die Tiere werden nach 6 Stunden getötet. Jede Hautinjektionsstelle wird biopsiert und in Formalin fixiert. Die Häute werden für histopathologische Evaluierung vorbereitet. Jede Stelle wird auf Infiltration von entzündeten Zellen in die Haut überprüft. Haut mit sichtbaren entzündeten Zellen wird als positiv bewertet. Proben, die ein Infiltrat von entzündeten Zellen induzieren, werden als proentzündliche Substanzen bewertet.

Tabelle 3

Verbindung	Proentzündliche Aktivität
DNA35638-Protein (Seq.-ID Nr. 9)	+
Negative Kontrolle	-

BEISPIEL 5

Genproduktüberexpression

[0252] Dieses Beispiel zeigt, dass Gene, die für verschiedene Proteine kodieren, die in [Fig. 7](#) angezeigt sind, in Kolitiscolon von CRF2-4-(-/-)-„Knockout“-Mäusen überexprimiert werden. Therapeutische Mittel können die Form von Antagonisten der angegebenen Genprodukte annehmen, zum Beispiel murin-humane chimäre, humanisierte oder menschliche Antikörper dagegen.

[0253] CRF2-4-(-/-)-Mäuse (Spencer et al., J. Exp. Med. 187, 571-578 (1998)) sind Tiere, die eine Untereinheit des Gens aufweisen, das für den entfernten IL-10-Rezeptor kodiert. Die Mäuse reagieren nicht auf die herabregulierende Funktion von IL-10 für Makrophagenaktivierung und können eine Antwort auf Lipopolysaccharidauslösung der Makrophagen-TNF- α -Sekretion nicht herabregulieren. Sie entwickeln eine chronische Colitis, die zu Colonadenokarzinom führen kann.

[0254] Die Sonden für die in [Fig. 7](#) angegebenen Proteine wurden aus mRNA-Matrizen für die angegebenen

Genprodukte geschaffen und im 5'-Nucleasetest (z.B. TaqMan™) und quantitativer Echtzeit-PCR (z.B. ABI Prizm 7700 Sequence Detection System™ (Perkin-Elmer, Applied Biosystems Division, Foster City, CA)) verwendet. Die Ergebnisse sind in Delta-CT-Einheiten dargestellt. Eine Einheit entspricht 1 PCR-Zyklus oder etwa einer doppelten Amplifikation in Bezug zum Normalen, zwei Einheiten entsprechen 4fach, 3 Einheiten 8fach etc. Quantifizierung wurde unter Einsatz von Primern und einer fluoreszenzmarkierten TaqMan™-mRNA erhalten, die von den getesteten, mit Entzündung in Verbindung stehenden Genprodukten abstammen, die in [Fig. 7](#) gezeigt werden. Regionen der angezeigten Genprodukte, die am wahrscheinlichsten einzigartige Nucleinsäuresequenzen sind und am wenigsten wahrscheinlich Introns ausgespleißt haben, sind für die Primerderivatisierung bevorzugt, z.B. nichttranslatierte 3'-Region.

[0255] Die 5'-Nucleasetestreaktion ist ein auf Fluoreszenz-PCR basierendes Verfahren, das die 5'-Exonucleaseaktivität von Taq-DNA-Polymeraseenzym verwendet, um Amplifikation in Echtzeit zu überwachen. Zwei Oligonucleotidprimer werden dazu verwendet, ein Amplicon zu erzeugen, das für eine PCR-Reaktion typisch ist. Es wurde ein drittes Oligonucleotid oder Sonde hergestellt, um die Nucleotidsequenz zu detektieren, die sich zwischen den zwei PCR-Primern befindet. Die Sonde ist durch Taq-DNA-Polymeraseenzym nicht verlängerbar und wird mit einem ausgewiesenen Fluoreszenzfarbstoff und einem Quencherfluoreszenzfarbstoff markiert. Jegliche laserinduzierte Emission aus dem Reporterfarbstoff wird durch Quenching-Farbstoff gequencht, wenn sich die zwei Farbstoffe nahe beieinander befinden wie auf der Sonde. Während der Amplifikationsreaktion wird die Sonde durch Taq-DNA-Polymeraseenzym in einer matrizenabhängigen Art gespalten. Die resultierenden Sondenfragmente trennen sich in Lösung, und das Signal aus dem Freisetzungreporterfarbstoff ist frei von der Quenchingwirkung des zweiten Fluoreszenzfarbstoffs. Ein Molekül des Reporterfarbstoffs wird für jedes synthetisierte neue Molekül freigesetzt, und die Detektion des nicht gequenchten Reporterfarbstoffs stellt die Grundlage für die quantitative Dateninterpretation bereit.

[0256] Das 5'-Nucleaseverfahren wird auf einem quantitativen PCR-Gerät in Echtzeit laufen gelassen, wie z.B. ABI Prizm 770™ Sequence Detection. Das System besteht aus einem Thermocycler, Laser, einer Kamera mit hochauflösendem Bildpunktfeld (CDD) und Computer. Das System amplifiziert Proben in einem 96-Well-Format auf einem Thermocycler. Während der Amplifikation wird ein laserinduziertes Fluoreszenzsignal in Echtzeit durch Faseroptikkabel für alle 96 Wells gewonnen und am CCD detektiert. Das System umfasst Software zum Betreiben des Geräts und zur Analyse der Daten.

[0257] Die 5'-Nucleasetestdaten werden anfänglich als Ct oder Schwellenzyklus ausgedrückt. Dies wird als jener Zyklus definiert, an welchem sich das Reportersignal über dem Hintergrundausmaß von Fluoreszenz akkumuliert. Die Ct-Werte werden als quantitatives Maß der relativen Zahl von Startkopien einer bestimmten Targetsequenz in einer Nucleinsäureprobe verwendet.

[0258] Die Ergebnisse der mRNA-Amplifikation sind in [Fig. 7](#) dargestellt. Expression in Wildtyptieren wurde mit CRF2.4-KO-Tieren mit Beta-Actin als Referenzstandard verglichen. In jeder Gruppe wurden vier Tiere gemessen. Bei allen vier KO-Tieren wurde Colitis festgestellt, und zusätzlich dazu wiesen drei davon ein Coladenokarzinom auf.

[0259] [Fig. 7](#) zeigt, dass JAM-mRNA 3,3fach im Colon von CRF2-4(-/-)-Mäusen mit Colitis erhöht ist. Diese Mäuse sind IL-10-Rezeptorknockouts, die eine spontane Colitis entwickeln, die durch Lymphozyten, Monozyten und Neutrophile vermittelt wird. IL-10 unterdrückt die Entzündungsreaktion durch Modulation der Expression bestimmter entzündlicher Cytokine.

[0260] Als Ergebnis ist es wahrscheinlich, dass PRO245 auch erhöhte Expression bei menschlichen Entzündungskrankheiten aufweist, wie z.B. entzündliche Darmerkrankung und andere Entzündungserkrankungen des Darms.

BEISPIEL 6 (HINTERGRUND)

Induktion von Endothelzellapoptose

[0261] Die Fähigkeit der Polypeptide der Erfindung, Apoptose in Endothelzellen zu induzieren, wurde in Endothelzellen einer menschlichen Nabelschnurvene (HUVEC, Cell Systems) getestet. Am ersten Tag wurden die Zellen auf 96-Well-Mikrotiterplatten (Amersham Life Science, Cytostar-T-Szintillationsmikroplatte, RPNQ160, steril, gewebskulturbehandelt, individuell verpackt) in 10 % Serum (CSG-Medium, Cell Systems) bei einer Dichte von 2×10^4 Zellen pro Well in einem Gesamtvolumen von 100 µl ausplattiert. Am zweiten Tag wurde das PRO245-Polypeptid, für welches die DNA35638 kodierte, in dreifacher Form in Verdünnungen von

1 %, 0,33 % und 0,11 % hinzugefügt. Am dritten Tag wurde die Fähigkeit des PRO245-Polypeptids, Apoptose zu induzieren, unter Verwendung eines im Handel erhältlichen Sets bestimmt.

[0262] Ein Apoptose-Detektionsset (R&D Systems, Minnesota), in welchem Annexin-V, ein Mitglied der Kalzium- und Phospholipidbindungsproteine, zur Detektion von Apoptose gemäß dem vom Hersteller empfohlenen Protokoll eingesetzt wurde. Fluorescein-markiertes Annexin-V und Propidiumiodid wurden zu den Zellen hinzugefügt. Analyse wurde mit Cytometern durchgeführt, die mit einem einzelnen Laser ausgestattet waren, der Anregungslicht bei 488 nm emittiert. In diesem Test werden lebende Zellen mit keinem Fluoreszenzfarbstoff gefärbt, nekrotische Zellen werden mit beiden Fluoreszenzfarbstoffen gefärbt, und Zellen, die Apoptose unterworfen werden, werden mit Annexin-V-FITC-Reagens gefärbt. Das durch Annexin-V-FITC erzeugte Signal wurde im FITC-Signaldetektor detektiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 nachstehend angeführt.

Tabelle 4

Getestete Verbindung	Konzentration	% im Vergleich zur Hintergrundfluoreszenz
DNA35638-Protein (Seq.-ID Nr. 9)	0,11 %	77,6
DNA35638-Protein (Seq.-ID Nr. 9)	0,33 %	143,7
DNA35638-Protein (Seq.-ID Nr. 9)	1,0 %	146,0
DNA35638-Protein (Seq.-ID Nr. 9)	6,82 nM	67,2
DNA35638-Protein (Seq.-ID Nr. 9)	20,46 nM	102,6
DNA35638-Protein (Seq.-ID Nr. 9)	62,0 nM	118,8

[0263] Die Fähigkeit der Proteinverbindungen der Erfindung, Endothelzellapoptose zu induzieren, insbesondere in Kombination mit der Zerstörung der Zellbindungsformation, wie in Beispiel 2 beschrieben, zeigt, dass die Verbindungen Rollen in der Zelladhäsion und -Transmigration spielen. Ähnlich wie murines JAM sind die Verbindungen wahrscheinliche Zellbindungsmoleküle in Epithel und Endothel, was ihre ausgedehnte Gewebsverteilung erklärt. Die Zerstörung der Induktion von Endothelzellapoptose unterstützt eine Rolle in Zellwachstum und Apoptose.

BEISPIEL 7 (HINTERGRUND)

In-vitro-Antitumortest

[0264] Die antiproliferative Aktivität der PRO245-Polypeptide der Erfindung wurde im investigativen, krankheitsorientierten In-vitro-Antikrebsarzneimittellentdeckungstest des National Cancer Institutes (NCI) unter Verwendung von Sulforhodamin-B- (SRB-) Farbstoffbindungstest bestimmt, im Wesentlichen wie von Skehan et al., J. Natl. Cancer Inst. 82, 1107-1112 (1990), beschrieben. Die 60 Tumorzelllinien, die in dieser Studie verwendet wurden („das NCI-Panel“) sowie die Bedingungen für deren Aufrechterhaltung und In-vitro-Kultur sind von Monks et al., J. Natl. Cancer Inst. 83, 757-766 (1991), beschrieben worden. Der Zweck dieses Screens ist es, anfänglich die zytotoxische und/oder zytostatische Aktivität der Testverbindungen gegen verschiedene Formen von Tumoren zu beurteilen (Monks et al., siehe oben, Boyd, Cancer: Princ. Pract. Oncol. Update 3(10), 1-12 (1989)).

[0265] Zellen aus etwa 60 menschlichen Tumorzelllinien wurden mit Trypsin/EDTA (Gibco) geerntet, einmal gewaschen, in IMEM resuspendiert, und ihre Lebensfähigkeit wurde bestimmt. Die Zellsuspensionen wurden in separate 96-Well-Mikrotiterplatten durch eine Pipette (100 µL Volumen) hinzugefügt. Die Zelldichte für die 60-tägige Inkubation war geringer als für die 20-tägige Inkubation, um übermäßiges Wachstum zu vermeiden. Inokulaten wurde eine Präinkubationsperiode von 24 Stunden bei 37 °C zur Stabilisierung ermöglicht. Verdünnungen auf das Doppelte der beabsichtigten Testkonzentration wurden zum Zeitpunkt null in 100-ml-Aliquoten zu den Mikrotiterplattenwells hinzugefügt (Verdünnung 1:2). Testverbindungen wurden bei halb-log-Verdünnungen (1000 bis 100000fach) beurteilt. Inkubationen fanden zwei Tage lang und sechs Tage lang in einer 5%-CO₂-Atmosphäre und 100 % Feuchtigkeit statt.

[0266] Nach Inkubation wurde das Medium entfernt, und die Zellen wurden in 0,1 ml von 10 % Trichloressigsäure bei 40 °C fixiert. Die Platten wurden fünfmal mit entionisiertem Wasser gespült, getrocknet, 30 Minuten lang mit 0,1 ml 0,4 % Sulforhodamin-B-farbstoff (Sigma) gefärbt, der in 1 % Essigsäure gelöst war, viermal mit 1 % Essigsäure gespült, um ungebundenen Farbstoff zu entfernen, getrocknet, und der Farbstoff wurde 5 Minuten lang mit 0,1 ml von 10 mM Tris-Base [Tris(hydroxymethyl)aminomethan], pH 10,5, extrahiert. Die Absorption (OD) von Sulforhodamin-B bei 492 nm wurde unter Verwendung eines 96-Well-Mikrotiterplattenlese-

geräts mit Computer-Schnittstelle gemessen.

[0267] Eine Testprobe wird als positiv erachtet, wenn sie zumindest 50 % Wachstumshemmwirkung in einer oder mehreren Konzentrationen zeigt. Die Ergebnisse sind in den folgenden Tabellen dargestellt, wo die Abkürzungen Folgende sind:

NSCL = nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom

ZNS = zentrales Nervensystem

Leuk = Leukämie

Tabelle 5

Testverbindung	Konzentration	Testlänge	Tumorzelllinie	
			Typ	Bezeichnung
DNA35638-Protein (Seq.-ID Nr. 9)	0,35 nM	2	NSCL Ovarial	HOP92 OVCAR-4
DNA35638-Protein (Seq.-ID Nr. 9)	0,35 nM	2	Leuk	SR
DNA35638-Protein (Seq.-ID Nr. 9)	0,35 nM	6	Colon	HCC-2998
DNA35638-Protein (Seq.-ID Nr. 9)	3,5 nM	6	Leuk Colon	SR SW-620
DNA35638-Protein (Seq.-ID Nr. 9)	6,2 nM	6	Colon	HCT-116
DNA35638-Protein (Seq.-ID Nr. 9)	6,2 nM	6	Leuk	RPMI-8226

BEISPIEL 8

Verwendung von PRO245 als Hybridisierungssonde

[0268] Das folgende Verfahren beschreibt die Verwendung einer Nucleotidsequenz, die für ein PRO245 kodiert, als Hybridisierungssonde.

[0269] DNA, welche die kodierende Sequenz des Nativsequenz-PRO245 (wie in [Fig. 2](#) (Seq.-ID Nr. 8) dargestellt) umfasst, wird als Sonde zum Screenen auf homologe DNAs (wie z.B. jene, die für natürlich auftretende Varianten von PRO245 kodieren) in menschlichen Gewebs-cDNA-Bibliotheken oder menschlichen genomischen Gewebsbibliotheken verwendet.

[0270] Hybridisierung und Waschung von Filtern, die beide Bibliotheks-DNAs enthalten, werden unter den folgenden Bedingungen hoher Stringenz durchgeführt. Hybridisierung von radiomarkierter, von PRO245 abstammender Sonde an die Filter wird in einer Lösung von 50 % Formamid, 5 × SSC, 0,1 % SDS, 0,1 % Natriumpyrophosphat, 50 mM Natriumphosphat, pH 6,8, 2 × Denhardt-Lösung und 10 % Dextransulfat bei 42 °C 20 Stunden lang durchgeführt. Waschung der Filter wird in einer wässrigen Lösung von 0,1 × SSC und 0,1 % SDS bei 42 °C durchgeführt.

[0271] DNA mit einer gewünschten Sequenzidentität mit der DNA, die für ein Nativsequenz-PRO245 voller Länge kodiert, kann dann unter Einsatz von fachbekannten Standardverfahren identifiziert werden.

BEISPIEL 9

Expression von PRO245 in E. coli

[0272] Dieses Beispiel veranschaulicht die Herstellung einer nicht-glykosylierten Form von PRO245 durch rekombinante Expression in E. coli.

[0273] Die DNA-Sequenz, die für PRO245 kodiert, wird anfänglich unter Verwendung ausgewählter PCR-Pri-

mer amplifiziert. Die Primer sollen Restriktionsenzymstellen umfassen, die den Restriktionsenzymstellen auf dem ausgewählten Expressionsvektor entsprechen. Es kann eine Vielzahl von Expressionsvektoren verwendet werden. Ein Beispiel für einen geeigneten Vektor ist pBR322 (von *E. coli* abstammend, siehe Bolivar et al., Gene 2, 95 (1977)), das Gene für Ampicillin- und Tetracyclinresistenz enthält. Der Vektor wird mit Restriktionsenzym verdaut und dephosphoryliert. Die PCR-amplifizierten Sequenzen werden dann in den Vektor ligiert. Der Vektor umfasst vorzugsweise Sequenzen, die für ein Antibiotikaresistenzgen kodieren, einen *trp*-Promotor, einen polyhis-Leader (einschließlich der ersten sechs STII-Codone, poly-his-Sequenz, und Enterokinasespaltstelle), die für PRO245 kodierende Region, lambda-Transkriptionsterminator und ein *argU*-Gen.

[0274] Das Ligationsgemisch wird dann dazu verwendet, einen ausgewählten *E.-coli*-Stamm unter Verwendung der in Sambrook et al., siehe oben, beschriebenen Verfahren zu transformieren. Transformanten werden durch ihre Fähigkeit identifiziert, auf LB-Platten zu wachsen, und es werden antibiotikaresistente Kolonien ausgewählt. Plasmid-DNA kann isoliert werden und durch Restriktionsanalyse und DNA-Sequenzierung nachgewiesen werden.

[0275] Ausgewählte Klone können über Nacht in flüssigem Kulturmedium, wie z.B. LB-Kulturlösung, die mit Antibiotikā ergänzt ist, gezüchtet werden. Die Übernachtskultur kann in der Folge dazu verwendet werden, eine Kultur in großem Maßstab zu inokulieren. Die Zellen werden dann auf eine gewünschte optische Dichte gezüchtet, während welcher der Expressionspromotor eingeschaltet wird.

[0276] Nach Kultivieren der Zellen für mehrere Stunden können die Zellen durch Zentrifugation geerntet werden. Das durch Zentrifugation erhaltene Zellpellet kann unter Einsatz verschiedener fachbekannter Mittel solubilisiert werden, und das solubilisierte PRO245-Protein kann dann unter Einsatz einer metallchelatbildenden Säule unter Bedingungen gereinigt werden, die eine enge Bindung des Proteins ermöglichen.

[0277] PRO301 wurde in *E. coli* in einer poly-his-markierten Form, wie in WO99/27098 offenbart, exprimiert.

BEISPIEL 10

Expression von PRO245 in Säugetierzellen

[0278] Dieses Beispiel veranschaulicht die Herstellung einer glykosylierten Form eines PRO245 durch rekombinante Expression in Säugetierzellen.

[0279] Der Vektor pRK5 (siehe EP 307.247, veröffentlicht am 15. März 1989) wird als Expressionsvektor verwendet. Gegebenenfalls ist die PRO245-DNA in pRK5 mit ausgewählten Restriktionsenzymen ligiert, um Insertion von PRO245-DNA unter Verwendung von Ligationsverfahren, wie z.B. in Sambrook et al., siehe oben, beschrieben, zu ermöglichen. Der resultierende Vektor wird pRK5-PRO245 genannt.

[0280] In einer Ausführungsform können die gewählten Wirtszellen 293-Zellen sein. Menschliche 293-Zellen (ATCC CCL 1573) werden in Gewebekulturplatten in Medium, wie z.B. DMEM, das mit fötalem Kälberserum und optional Nährstoffkomponenten und/oder Antibiotika ergänzt ist, bis zur Konfluezn gezüchtet. Etwa 10 µg pRK5-PRO245-DNA werden mit etwa 1 µg DNA gemischt, die für das VA-RNA-Gen kodiert (Thimmappaya et al., Cell 31, 543 (1982)), und in 500 µl von 1 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, 0,227 M CaCl₂ gelöst. Zu diesem Gemisch werden tröpfchenweise 500 µl von 50 mM HEPES (pH 7,35), 280 mM NaCl, 1,5 mM NaPO₄ hinzugefügt, und ein Präzipitat wird 10 Minuten lang bei 25 °C gebildet. Das Präzipitat wird suspendiert und zu den 293-Zellen hinzugegeben und etwa vier Stunden bei 37 °C absetzen gelassen. Das Kulturmedium wird abgesaugt, und 2 ml von 20 % Glycerin in PBS wird 30 Sekunden lang hinzugegeben. Die 293-Zellen werden dann mit serumfreiem Medium gewaschen, frisches Medium wird hinzugegeben, und die Zellen werden etwa 5 Tage lang inkubiert.

[0281] Etwa 24 Stunden nach den Transfektionen wird das Kulturmedium entfernt und durch ein Kulturmedium (alleine) oder ein Kulturmedium ersetzt, das 200 µCi/ml ³⁵S-Cystein und 200 µCi/ml ³⁵S-Methionin enthält. Nach einer 12-stündigen Inkubation wird das konditionierte Medium gewonnen, auf einem Zentrifugenfilter konzentriert und auf ein 15 % SDS-Gel geladen. Das verarbeitete Gel kann getrocknet und für einen ausgewählten Zeitraum Film ausgesetzt werden, um die Gegenwart von PRO245-Polypeptid zu zeigen. Die Kulturen, die transfizierte Zellen enthielten, können weiterer Inkubation unterworfen werden (in serumfreiem Medium), und das Medium wird in ausgewählten Biotests getestet.

[0282] In einem alternativen Verfahren kann PRO245-DNA in 293-Zellen vorübergehend unter Verwendung

des von Sompanyrac et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 12, 7575 (1981), beschriebenen Dextransulfatverfahrens eingeführt werden. 293-Zellen werden in einer Spinnerflasche auf maximale Dichte gezüchtet, und 700 µg pRK5-PRO245-DNA werden hinzugegeben. Die Zellen werden zuerst durch Zentrifugation aus der Spinnerflasche konzentriert und mit PBS gewaschen. Das DNA-Dextran-Prazipitat wird auf dem Zellpellet 4 Stunden lang inkubiert. Die Zellen werden mit 20 % Glycerin 90 Sekunden lang behandelt, mit Gewebskulturmedium gewaschen und wieder in die Spinnerflasche eingeführt, die das Gewebskulturmedium, 5 µg/ml Rinderinsulin und 0,1 µg/ml Rindertransferrin enthält. Nach etwa 4 Tagen wird das konditionierte Medium zentrifugiert und filtriert, um Zellen und Trümmer zu entfernen. Die Probe, die exprimiertes PRO245 enthielt, kann dann konzentriert und durch ein beliebiges ausgewähltes Verfahren gereinigt werden, wie z.B. Dialyse und/oder Säulenchromatographie.

[0283] In einer anderen Ausführungsform kann PRO245 in CHO-Zellen exprimiert werden. Das pRK5-PRO245 kann in CHO-Zellen unter Einsatz bekannter Reagenzien, wie z.B. CaPO₄ oder DEAE-Dextran, transfiziert werden. Wie oben beschrieben können die Zellkulturen inkubiert werden und das Medium durch ein Kulturmedium (alleine) oder ein Medium ersetzt werden, das eine Radiomarkierung, wie z.B. ³⁵S-Methionin, enthält. Nach der Bestimmung der Gegenwart von PRO245-Polypeptid kann das Kulturmedium durch serumfreies Medium ersetzt werden. Vorzugsweise werden die Kulturen etwa 6 Tage lang inkubiert, und dann wird das konditionierte Medium geerntet. Das Medium, welches das exprimierte PRO245 enthält, kann dann konzentriert und durch ein beliebiges ausgewähltes Verfahren gereinigt werden.

[0284] Epitopmarkiertes PRO245 kann auch in Wirts-CHO-Zellen exprimiert werden. Das PRO245 kann aus dem pRK5-Vektor subkloniert werden. Das Subkloninsert kann PCR unterzogen werden, um im Raster mit einer ausgewählten Epitopmarkierung, wie z.B. Poly-his-Markierung, in einen Baculovirus-Expressionsvektor zu fusionieren. Das poly-his-markierte PRO245-Insert kann dann in einen SV40-gesteuerten Vektor subkloniert werden, der einen Selektionsmarker, wie z.B. DHFR, zur Selektion von stabilen Klonen enthält. Letztendlich können die CHO-Zellen (wie oben beschrieben) mit dem SV40-gesteuerten Vektor transfiziert werden. Eine Markierung kann wie oben beschrieben durchgeführt werden, um die Expression zu verifizieren. Das Kulturmedium, welches das exprimierte poly-his-markierte PRO245 enthält, kann dann konzentriert und durch ein beliebiges ausgewähltes Verfahren gereinigt werden, wie z.B. durch Ni²⁺-Chelataffinitätschromatographie, gereinigt werden.

[0285] PRO245 wurde in CHO-Zellen sowohl durch ein vorübergehendes als auch ein stabiles Expressionsverfahren exprimiert.

[0286] Stabile Expression in CHO-Zellen wurde unter Einsatz des folgenden Verfahrens durchgeführt. Die Proteine wurden als IgG-Konstrukt (Immunadhäsion) exprimiert, in welchem die für die löslichen Formen kodierenden Sequenzen (z.B. extrazelluläre Domänen) der jeweiligen Proteine an eine IgG1-Konstantregionsequenz fusioniert wurden, welche die Gelenks-, CH2- und CH2-Domänen enthielt, und/oder als poly-his-markierte Form.

[0287] Nach PCR-Amplifikation wurden die entsprechenden DNAs in einen CHO-Expressionsvektor unter Verwendung von Standardverfahren wie von Ausubel et al., Current Protocols of Molecular Biology, Kapitel 3.16, John Wiley und Sons (1997), subkloniert. CHO-Expressionsvektoren werden hergestellt, um kompatible Restriktionsstellen 5' und 3' der DNA von Interesse aufzuweisen, um das geeignete Shuttleing von cDNAs zu ermöglichen. Der zur Expression in CHO-Zellen verwendete Vektor wird in Lucas et al., Nucl. Acids Res. 24, 9, 1174-1779 (1996), beschrieben und verwendet den frühen SV40 Promotor/Enhancer, um die Expression der cDNA von Interesse und Dihydrofolatreductase (DHFR) zu steuern. DHFR-Expression ermöglicht eine Auswahl zur stabilen Aufrechterhaltung des Plasmids nach Transfektion.

[0288] Zwölf Mikrogramm der gewünschten Plasmid-DNA wurden in etwa 10 Millionen CHO-Zellen unter Verwendung von im Handel erhältlichen Transfektionsreagenzien Superfect® (Qiagen), Dospel® oder Fugene® (Boehringer Mannheim) eingeführt. Die Zellen wurden gezüchtet und in Lucas et al., siehe oben, beschrieben. Etwa 3×10^{-7} Zellen werden in einer Ampulle für weiteres Wachstum gefroren, und Produktion erfolgt wie nachstehend beschrieben.

[0289] Die Ampullen, welche die Plasmid-DNA enthalten, wurden aufgetaut, indem sie in ein Wasserbad getaucht wurden, und durch Verwirbeln gemischt. Die Inhalte wurden in ein Zentrifugenröhrchen pipettiert, das 10 ml Medium enthielt, und bei 1000 U/min 5 Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, und die Zellen wurden in 10 ml selektivem Medium (0,2-µm-filtriertem PS20 mit 5 % 0,2-µm-diafiltriertem fötalem Rinderserum) resuspendiert. Die Zellen wurden dann in einen 100-ml-Spinner aliquotiert, der 90 ml von selektivem

tivem Medium enthielt. Nach 1-2 Tagen wurden die Zellen in einen 250-ml-Spinner transferiert, der mit 150 ml selektivem Wachstumsmedium gefüllt war, und bei 37 °C inkubiert. Nach weiteren 2-3 Tagen wurden ein 250-ml-, 500-ml- und 2000-ml-Spinner mit 3×10^5 Zellen/ml beimpft. Das Zellmedium wurde durch frisches Medium durch Zentrifugation und Resuspension in Produktionsmedium ausgetauscht. Obwohl ein beliebiges geeignetes CHO-Medium verwendet werden kann, wird im Wesentlichen ein Produktionsmedium verwendet, das in US-Patent Nr. 5.122.469, veröffentlicht am 16. Juni 1992, beschrieben ist. 3-l-Produktionsspinner wird bei $1,2 \times 10^6$ Zellen/ml beimpft. An Tag 0 wurde die Zellanzahl und der pH bestimmt. An Tag 1 wurde der Spinner einer Probe unterzogen und das Hindurchleiten von filtrierter Luft begonnen. An Tag 2 wurde der Spinner einer Probe unterworfen, die Temperatur änderte sich auf 33 °C und 30 ml von 500 g/l Glucose und 0,6 ml von 10 % Antischaummittel (z.B. 35 % Polydimethylsiloxanemulsion, Dow Corning 365 Medical Grade Emulsion). Während der Produktion wurde der pH wie notwendig angepasst, um bei etwa 7,2 zu bleiben. Nach 10 Tagen oder bis die Lebensfähigkeit unter 70 % fiel wurde die Zellkultur durch Zentrifugation geerntet und durch einen 0,22-µm-Filter filtriert. Das Filtrat wurde entweder bei 4 °C aufbewahrt oder sofort auf Säulen zur Reinigung geladen.

[0290] Für die poly-His-markierten Konstrukte wurden die Proteine unter Einsatz einer Ni-NTA-Säule (Qiagen) gereinigt. Vor Reinigung wurde Imidazol zum konditionierten Medium bis zu einer Konzentration von 5 mM hinzugefügt. Das konditionierte Medium wurde auf eine 6-ml-Ni-NTA-Säule gepumpt, die in 20 mM HEPES-Puffer, pH 7,4, der 0,3 M NaCl und 5 mM Imidazol enthielt, bei einer Durchflussgeschwindigkeit von 4-5 ml/min bei 4 °C äquilibriert worden war. Nach Ladung wurde die Säule mit zusätzlichem Äquilibrierungspuffer gewaschen und das Protein mit Äquilibrierungspuffer eluiert, der 0,25 M Imidazol enthielt. Das höchst gereinigte Protein wurde in der Folge in einem Speicherpuffer, der 10 mM Hepes, 0,14 M NaCl und 4 % Mannit enthielt, pH 6,8, mit einer 25-ml-G25-Superfine-Säule (Pharmacia) entsalzt und bei -80 °C aufbewahrt.

[0291] Immunadhäsion- (Fc-enthaltende) Konstrukte wurden aus dem konditionierten Medium wie folgt gereinigt. Das konditionierte Medium wurde auf eine 5-ml-Protein-A-Säule (Pharmacia) gepumpt, die in 20 mM Na-Phosphatpuffer, pH 6,8, äquilibriert worden war. Nach dem Laden wurde die Säule umfassend mit Äquilibrierungspuffer gewaschen, bevor mit 100 mM Zitronensäure, pH 3,5, eluiert wurde. Das eluierte Protein wurde sofort neutralisiert, durch Gewinnung von 1-ml-Fraktionen in Röhrchen, die 275 µl von 1 M Tris-Puffer, pH 9, enthielten. Das höchst gereinigte Protein wurde in der Folge in einen Speicherpuffer entsalzt, wie oben für die Poly-his-markierten Proteine beschrieben ist. Die Homogenität wurde unter Verwendung von SDS-Polyacrylamid-Gelen beurteilt und durch N-terminale Aminosäuresequenzierung durch Edman-Abbau beurteilt.

[0292] PRO245 wurde auch durch vorübergehende Expression in COS-Zellen produziert.

BEISPIEL 11

Expression von PRO245 in Hefe

[0293] Das folgende Verfahren beschreibt die rekombinante Expression von PRO245 in Hefe.

[0294] Zuerst werden Hefeexpressionsvektoren für intrazelluläre Produktion oder Sekretion von PRO245 aus dem ADH2/GAPDH-Promotor hergestellt. DNA, die für PRO245, ein ausgewähltes Signalpeptid und den Promotor kodiert, wird in geeignete Restriktionsenzymstellen im ausgewählten Plasmid inseriert, um intrazelluläre Expression von PRO245 zu steuern. Zur Sekretion kann DNA, die für PRO245 kodiert, in das ausgewählte Plasmid kloniert werden, gemeinsam mit DNA, die für den ADH2/GAPDH-Promotor, die sekretorische Signal/Leadersequenz von Hefe-Alphafaktor und Linkersequenzen (wenn nötig) kodiert, zur Expression von PRO245.

[0295] Hefezellen, wie z.B. Hefestamm AB110, können dann mit den Expressionsplasmiden, die oben beschrieben sind, transformiert werden und in ausgewähltem Fermentationsmedium kultiviert werden. Die transformierten Hefeüberstände können durch Präzipitation mit 10 % Trichloressigsäure und Trennung durch SDS-PAGE analysiert werden, gefolgt von Färbung der Gele mit Coomassie-Blau-Farbstoff.

[0296] Rekombinantes PRO245 kann in der Folge durch Entfernen der Hefezellen aus dem Fermentationsmedium und Zentrifugation und Konzentration des Mediums unter Einsatz ausgewählter Kassettenfilter isoliert und gereinigt werden. Das Konzentrat, das PRO245 enthält, kann unter Verwendung ausgewählter Säulen-chromatographieharze weiter gereinigt werden.

Expression von PRO245 in mit Baculovirus infizierten Insektenzellen

[0297] Das folgende Verfahren beschreibt die rekombinante Expression von PRO245 in mit Baculovirus infizierten Insektenzellen.

[0298] Das PRO245 ist stromauf einer Epitopmarkierung fusioniert, die in einem Baculovirus-Expressionsvektor enthalten ist. Solche Epitopmarkierungen umfassen poly-his-Markierungen und Immunglobulinmarkierungen (wie Fc-Regionen von IgG). Eine Vielzahl an Plasmiden kann verwendet werden, einschließlich Plasmide, die von im Handel erhältlichen Plasmiden abstammen, wie z.B. pVL1393 (Novagen). Kurz gesagt wird das PRO245 oder der gewünschte Abschnitt von PRO245 (wie z.B. die Sequenz, die für die extrazelluläre Domäne eines Transmembranproteins kodiert) durch PCR mit Primern amplifiziert, die zu den 5'- und 3'-Regionen komplementär sind. Der 5'-Primer kann flankierende (ausgewählte) Restriktionsenzymstellen aufnehmen. Das Produkt wird dann mit den ausgewählten Restriktionsenzymen verdaut und in den Expressionsvektor subkloniert.

[0299] Rekombinantes Baculovirus wird durch Cotransfektion des obigen Plasmids und BaculoGold™-Virus-DNA (Pharmingen) in *Spodoptera-frugiperda*- („Sf9“-) Zellen (ATCC CRL 1711) unter Einsatz von Lipofectin (im Handel von GIBCO-BRL erhältlich) erzeugt. Nach 4-5 Tagen Inkubation bei 28 °C werden die freigesetzten Viren geerntet und für weitere Amplifikationen verwendet. Virusinfektion und Proteinexpression wird wie von O'Reilly et al., *Baculovirus expression vectors: A laboratory Manual*, Oxford, Oxford University Press (1994), durchgeführt.

[0300] Exprimiertes poly-his-markiertes PRO245 kann dann z.B. durch Ni²⁺-Chelataffinitätschromatographie wie folgt gereinigt werden. Extrakte werden aus rekombinanten virusinfizierten Sf9-Zellen wie von Rupert et al., *Nature* 362, 175-179 (1993), hergestellt. Kurz gesagt wurden Sf9-Zellen gewaschen, in Beschallungspuffer resuspendiert (25 ml HEPES, pH 7,9, 12,5 mM MgCl₂, 0,1 mM EDTA, 10 % Glycerin, 0,1 % NP-40, 0,4 M KCl) und zweimal 20 Sekunden auf Eis beschallt. Die beschallten Präparate werden durch Zentrifugation gereinigt, und der Überstand wird 50fach in Ladungspuffer verdünnt (50 mM Phosphat, 300 mM NaCl, 10 % Glycerin, pH 7,8) und durch einen 0,45-µm-Filter filtriert. Eine Ni²⁺-NTA-Agarosesäule (im Handel von Qiagen erhältlich) wird mit einem Bettvolumen von 5 ml hergestellt, mit 25 ml Wasser gewaschen und mit 25 ml Ladungspuffer äquilibriert. Das filtrierte Zellextrakt wird bei 0,5 ml pro Minute auf die Säule geladen. Diese Säule wird mit Ladungspuffer auf Basislinie A₂₈₀ gewaschen, an welchem Punkt die Gewinnung von Fraktionen begonnen wird. Als Nächstes wird die Säule mit einem sekundären Waschpuffer gewaschen (50 mM Phosphat, 300 mM NaCl, 10 % Glycerin, pH 6,0), der nicht-spezifisch gebundenes Protein eluiert. Nachdem wieder die A₂₈₀-Basislinie erreicht worden ist, wird die Säule mit einem 0 bis 500 mM Imidazolgradienten im sekundären Waschpuffer entwickelt. 1-ml-Fraktionen werden gewonnen und durch SDS-PAGE und Silber-Färbung oder Western-Blot mit Ni²⁺-NTA, das an alkalische Phosphatase konjugiert ist (Qiagen), analysiert. Fraktionen, die das eluierte His₁₀-markierte PRO245 enthalten, werden vereinigt und gegen Ladungspuffer dialysiert.

[0301] Alternativ dazu kann die Reinigung von IgG-markiertem (oder FC-markiertem) PRO245 unter Verwendung bekannter Chromatographieverfahren durchgeführt werden, einschließlich z.B. Protein-A- oder Protein-G-Säulenchromatographie.

[0302] PRO245 wurde in mit Baculovirus infizierten Sf9-Insektenzellen exprimiert. Während die Expression im Wesentlichen in einem Maßstab von 0,5-2 l durchgeführt wurde, kann sie einfach für größere (z.B. 8 l) Formulierungen angepasst werden. Die Proteine wurden als IgG-Konstrukt (Immunadhäsion) exprimiert, in welchem die extrazelluläre Proteinregion an eine IgG1-Konstantregionsequenz fusioniert war, welche die Gelenks-, CH2- und CH3-Domänen enthielt, oder in poly-his-markierten Formen.

[0303] Nach der PCR-Amplifikation wurden die jeweiligen kodierenden Sequenzen in einen Baculovirus-Expressionsvektor subkloniert (pb.PH.IgG für IgG-Fusionen und pb.PH.His.c für poly-his-markierte Proteine), und der Vektor und BaculoGold®-Baculovirus-DNA (Pharmingen) wurden zu 105 *Spodoptera-frugiperda*- („Sf9“-) Zellen (ATCC CRL 1711) unter Verwendung von Lipofectin (Gibco BRL) co-transfiziert. pb.PH.IgG und pb.PH.His sind Modifikationen des im Handel erhältlichen Baculovirus-Expressionsvektors pVL1393 (Pharmingen) mit modifizierten Polylinkerregionen, welche die His- oder Fc-Markierungssequenzen umfassen sollen. Die Zellen wurden in Hinks TNM-FH-Medium gezüchtet, das mit 10 % FBS (Hyclone) ergänzt war. Die Zellen wurden 5 Tage lang bei 28 °C inkubiert. Der Überstand wurde geerntet und in der Folge für die erste Virusamplifikation verwendet, indem Sf9-Zellen in Hinks TNM-FH-Medium, das mit 10 % FBS ergänzt war, bei einer un-

gefährten Infektionsmultiplizität (MOI) von 10 infiziert wurden. Die Zellen wurden drei Tage lang bei 28 °C inkubiert. Der Überstand wurde geerntet, und die Expression der Konstrukte im Baculovirusexpressionsvektor wurde durch Batch-Bindung von 1 ml von Überstand an 25 ml von Ni-NTA-Kugeln (QIAGEN) für histidinmarkierte Proteine oder Protein-A-Sepharose-CL-4B-Kügelchen (Pharmacia) für IgG-markierte Proteine bestimmt, gefolgt von SDS-PAGE-Analyse, die mit einer bekannten Konzentration von Proteinstandard durch Coomassieblaufärbung verglichen werden kann.

[0304] Der erste Virusamplifikationsüberstand wurde dazu verwendet, eine Spinnerkultur von Sf9-Zellen bei einem ungefähren MOI von 0,1 zu infizieren (500 ml), die in ESF-921-Medium gezüchtet wurden (Expression Systems LLC). Die Zellen wurden 3 Tage lang bei 28 °C inkubiert. Der Überstand wurde geerntet und filtriert. Batchbindung und SDS-PAGE-Analyse wurden wiederholt, wenn notwendig bis eine Expression der Spinnerkultur nachgewiesen wurde.

[0305] Das konditionierte Medium aus den transfizierten Zellen (0,5 bis 3 l) wurde durch Zentrifugation geerntet, um die Zellen zu entfernen, und durch 0,22-µm-Filter filtriert. Für die poly-His-markierten Konstrukte wurde das Proteinkonstrukt unter Einsatz einer Ni-NTA-Säule (Qiagen) gereinigt. Vor Reinigung wurde Imidazol zum konditionierten Medium auf eine Konzentration von 5 mM hinzugegeben. Die konditionierten Medien wurden auf eine 6-ml-Ni-NTA-Säule gepumpt, die in 20 mM HEPES-Puffer, pH 7,4, der 0,3 M NaCl und 5 mM Imidazol bei einer Durchflussgeschwindigkeit von 4-5 ml/min bei 4 °C enthielt, äquilibriert worden war. Nach der Ladung wurde die Säule mit einem zusätzlichen Äquilibrierungspuffer gewaschen und das Protein mit Äquilibrierungspuffer eluiert, der 0,25 M Imidazol enthielt. Das höchst gereinigte Protein wurde in der Folge mit einer 25-ml-G25-Superfine-Säule (Pharmacia) in einen Speicherpuffer entsalzt, der 10 mM Hepes, 0,14 M NaCl und 4% Mannit, pH 6,8 enthielt, und bei -80 °C aufbewahrt.

[0306] Immunadhäsion- (Fc-enthaltende) Konstrukte von Proteinen wurden wie folgt aus den konditionierten Medien gereinigt. Die konditionierten Medien wurden auf eine 5-ml-Protein-A-Säule (Pharmacia) gepumpt, die in 20 mM Na-Phosphatpuffer, pH 6,8, äquilibriert worden war. Nach der Ladung wurde die Säule ausgiebig mit Äquilibrierungspuffer gewaschen, bevor mit 100 mM Zitronensäure, pH 3,5, eluiert wurde. Das eluierte Protein wurde sofort durch Gewinnung von 1-ml-Fractionen in Röhrchen neutralisiert, die 275 ml von 1 M Tris-Puffer, pH 9, enthielten. Das höchst gereinigte Protein wurde in der Folge in Speicherpuffer entsalzt, wie oben für die Poly-his-markierten Proteine beschrieben ist. Die Homogenität der Proteine wurde durch SDS-Polyacrylamidgel- (PEG-) Elektrophorese und N-terminale Aminosäuresequenzierung durch Edman-Abbau nachgewiesen.

[0307] PRO245 wurde auch in mit Baculovirus infizierten High-5-Zellen unter Verwendung eines analogen Verfahrens exprimiert. High-5-Zellen wurden bei 27 °C, kein CO₂, kein Penicillin und kein Streptomycin auf eine Konfluenz von 50 % gezüchtet. Für jede 150-mm-Platte wurden 30 µg von pIE-basiertem Vektor, der PRO245 enthielt, mit 1 ml Ex-Cell-Medium gemischt (Medium: Ex-Cell 401, 1/100 L-Glu JRH Biosciences, Nr. 14401-78P, Anmerkung: das Medium ist lichtempfindlich), und in einem separaten Röhrchen wurden 100 µl von CellFectin (GibcoBRL Nr. 10362-010) mit 1 ml von Ec-Cell-Medium gemischt. Die pIE1-1- und pIE1-2-Vektoren sind zur konstitutiven Expression von rekombinanten Proteinen aus dem Baculovirus-*ie1*-Promotor in stabil transformierten Insektenzellen entworfen (J.L. Cartier et al., J. Virol. 68, 7728-7737 (1994)). Die Plasmide unterscheiden sich nur in der Orientierung der multiplen Klonierungsstellen und enthalten alle Promotorsequenzen, von denen bekannt ist, dass sie für die *ie1*-vermittelte Genexpression in nicht-infizierten Insektenzellen wichtig sind, sowie das *hr5*-Enhancerelement. pIE1-1 und pIE1-2 umfassen die *ie1*-Translationsinitiationsstelle und können zur Produktion von Fusionsproteinen verwendet werden.

[0308] Die zwei Lösungen wurden kombiniert und bei Raumtemperatur 15 Minuten lang inkubieren gelassen. 8 ml von Ex-Cell-Medium wurden zu 2 ml von DNA/CellFectin-Gemisch zugegeben und auf High-5-Zellen geschichtet, die zuvor mit Ex-Cell-Medium gewaschen worden waren. Die Platte wurde in Dunkelheit 1 Stunde lang bei Raumtemperatur inkubiert. Das DNA/CellFektion-Gemisch wurde abgesaugt, und die Zellen wurden einmal mit Ex-Cell gewaschen, um überschüssiges Zellfectin zu entfernen. Frisches Ex-Cell-Medium (30 ml) wurde hinzugegeben, und die Zellen wurden 3 Tage lang bei 28 °C inkubiert. Der Überstand wurde geerntet, und die Expression von PRO245 wurde durch Batchbindung auf ähnliche Art und Weise bestimmt wie für Sf9-Zellen.

BEISPIEL 13

Herstellung von Antikörpern, die PRO245 binden

[0309] Dieses Beispiel veranschaulicht die Herstellung von monoklonalen Antikörpern, die PRO245 spezi-

fisch binden.

[0310] Verfahren zur Herstellung der monoklonalen Antikörper sind fachbekannt und zum Beispiel in Goding, s.o., beschrieben. Immunogene, die verwendet werden können, umfassen gereinigtes PRO245, Fusionsproteine, die PRO245 enthalten, und Zellen, die rekombinantes PRO245 auf der Zelloberfläche exprimieren. Die Auswahl des Immunogens kann vom Fachmann ohne übermäßiges Experimentieren durchgeführt werden.

[0311] Mäuse, wie z.B. Balb/c-Mäuse, werden mit dem PRO245-Immunogen immunisiert, das in komplettem Freund-Adjuvans emulgiert worden ist, und dieses wird ihnen subkutan und intraperitoneal in einer Menge von 1-100 Mikrogramm injiziert. Alternativ dazu wird das Immunogen in MPL-TDM-Adjuvans emulgiert (Ribi Immunochemical Research, Hamilton, MT) und in die Hinterpfoten des Tiers injiziert. Die immunisierten Mäuse werden dann 10 bis 12 Tage später mit zusätzlichem Immunogen, das im ausgewählten Adjuvans emulgiert worden war, aufgefrischt. Danach werden die Mäuse für mehrere Wochen mit weiteren Immunisierungsinjektionen aufgefrischt. Serumproben können von den Mäusen periodisch durch retroorbitale Blutabnahme zum Testen in ELISA-Tests erhalten werden, um PRO245-Antikörper zu detektieren.

[0312] Nachdem ein geeigneter Antikörpertiter detektiert worden ist, kann den für Antikörper „positiven“ Tieren eine finale intravenöse Injektion von PRO245 gegeben werden. Drei bis vier Tage später werden die Mäuse getötet und die Milzzellen gewonnen. Die Milzzellen werden dann (unter Verwendung von 35 % Polyethylenglykol) an eine ausgewählte murine Myelomzelllinie, wie z.B. P3X63AgU.1, fusioniert, erhältlich von ATCC Nr. CRL 1597. Die Fusionen erzeugen Hybridomzellen, die dann in 96-Well-Gewebskulturplatten plattiert werden können, die HAT-Medium (Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin) enthalten, um die Proliferation von nicht-fusionierten Zellen, Myelomhybriden und Milzzellhybriden zu hemmen.

[0313] Die Hybridomzellen werden in einem ELISA auf Reaktivität gegen PRO245 getestet. Die Bestimmung von „positiven“ Hybridomzellen, welche die gewünschten monoklonalen Antikörper gegen PRO245 sekretieren, ist im Fachgebiet bekannt.

[0314] Die positiven Hybridomzellen können intraperitoneal in syngenetische Balb/c-Mäuse injiziert werden, um Aszites zu produzieren, die monoklonale Anti-PRO245-Antikörper enthalten. Alternativ dazu können die Hybridomzellen in Gewebekulturflaschen oder Rollerflaschen gezüchtet werden. Die Reinigung der monoklonalen Antikörper, die in den Aszites produziert werden, kann durch Ammoniumsulfatpräzipitation erreicht werden, gefolgt von Gelausschlusschromatographie. Alternativ dazu kann Affinitätschromatographie basierend auf der Bindung von Antikörper an Protein A oder Protein G verwendet werden.

Hinterlegung von Material

[0315] Die folgenden Materialien sind bei der American Type Culture Collection, 12301 Parklaven Drive, Rockville, MD, USA (ATCC), hinterlegt worden.

Bezeichnung	ATCC-Hinterlegungsnummer	Hinterlegungsdatum
DNA35638-1141	209265	16. September 1-997

[0316] Diese Hinterlegungen wurden unter den Vorschriften des Budapester Vertrages über die internationale Anerkennung der Hinterlegung von Mikroorganismen für die Zwecke von Patentverfahren und den darunter gültigen Bestimmungen (Budapester Vertrag) durchgeführt. Dieser stellt die Aufrechterhaltung einer lebensfähigen Kultur der Hinterlegung für 30 Jahre vom Hinterlegungsdatum an sicher. Die Hinterlegung wird von ATCC unter den Bestimmungen des Budapester Vertrages verfügbar gemacht und unterliegt dem Abkommen zwischen Genentech, Inc., und ATCC, das die permanente und uneingeschränkte Verfügbarkeit der Nachkommenschaft der Kultur der Hinterlegung der Öffentlichkeit nach Erteilung des geeigneten US-Patents oder nach Offenlegung einer beliebigen US- oder fremden Patentanmeldung gegenüber der Öffentlichkeit sicherstellt, abhängig davon, was zuerst kommt, und die Verfügbarkeit der Nachkommenschaft für einen vom Präsidenten des Patentamts der USA bestimmten Anspruchsberechtigten gemäß 35 USC '122 und den Regeln des Präsidenten diesbezüglich (einschließlich 37 CFR § 1.14 mit besonderem Hinweis auf 886 OG 638) sicherstellt.

[0317] Der Zessionar der vorliegenden Anmeldung hat zugestimmt, dass bei Tod oder Verlust oder Zerstörung einer Kultur der hinterlegten Materialien bei Kultivierung unter geeigneten Bedingungen die Materialien unmittelbar nach Bekanntwerden durch andere derselben Art ersetzt werden. Die Verfügbarkeit der hinterlegten Materialien soll nicht als Lizenz zur Umsetzung der Erfindung bei Übertretung der Rechte verstanden werden, die von einer beliebigen Regierung gemäß ihrer Patentrechte gewährt werden.

[0318] Die vorangegangene schriftliche Beschreibung wird als ausreichend erachtet, um einem Fachmann zu ermöglichen, die Erfindung umzusetzen. Die vorliegende Erfindung soll im Schutzzumfang nicht vom hinterlegten Konstrukt eingeschränkt werden, da die hinterlegte Ausführungsform als einzelne Veranschaulichung von bestimmten Aspekten der Erfindung gedacht ist, und Konstrukte, die funktional äquivalent sind, können im Schutzzumfang dieser Erfindung, wie in den Ansprüchen definiert, liegen. Die Hinterlegung des hierin angeführten Materials stellt kein Zugeständnis dar, dass die hierin enthaltene schriftliche Beschreibung ungeeignet ist, um die Umsetzung eines Aspektes der Erfindung zu ermöglichen, einschließlich des besten Modus davon, noch soll sie den Schutzzumfang der Ansprüche auf die spezifischen Veranschaulichungen, die sie repräsentiert, einschränken. Tatsächlich werden verschiedene Modifikationen zusätzlich zu den hierin dargestellten und beschriebenen Fachleuten aus der vorangegangenen Beschreibung offensichtlich sein und fallen in den Schutzzumfang der Ansprüche im Anhang.

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Genentech, Inc.
 Avi J. Ashkenazi
 Sherman Fong
 Audrey Goddard
 Austin L. Gurney
 Mary A. Napier
 Daniel Tumas
 William I. Wood

<120> VERBINDUNGEN, ZUSAMMENSETZUNGEN UND VERFAHREN ZUR BEHANDLUNG VON
 ERKRANKUNGEN, DIE DURCH A33-VERWANDTE ANTIGENE CHARAKTERISIERT SIND

<130> P1216R1PCT

<141> 20.11.1998

<150> US 60/066.364

<151> 21.11.1997

<150> US 60/078.936

<151> 20.3.1998

<150> PCT/US98/19437

<151> 17.9.1998

<160> 30

<210> 1

<211> 299

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

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

Thr Val Asn Ile Pro Ser Ser Ala Thr Ile Gly Asn Arg Ala Val
 140 145 150
 Leu Thr Cys Ser Glu Gln Asp Gly Ser Pro Pro Ser Glu Tyr Thr
 155 160 165
 Trp Phe Lys Asp Gly Ile Val Met Pro Thr Asn Pro Lys Ser Thr
 170 175 180
 Arg Ala Phe Ser Asn Ser Ser Tyr Val Leu Asn Pro Thr Thr Gly
 185 190 195
 Glu Leu Val Phe Asp Pro Leu Ser Ala Ser Asp Thr Gly Glu Tyr
 200 205 210
 Ser Cys Glu Ala Arg Asn Gly Tyr Gly Thr Pro Met Thr Ser Asn
 215 220 225
 Ala Val Arg Met Glu Ala Val Glu Arg Asn Val Gly Val Ile Val
 230 235 240
 Ala Ala Val Leu Val Thr Leu Ile Leu Leu Gly Ile Leu Val Phe
 245 250 255
 Gly Ile Trp Phe Ala Tyr Ser Arg Gly His Phe Asp Arg Thr Lys
 260 265 270
 Lys Gly Thr Ser Ser Lys Lys Val Ile Tyr Ser Gln Pro Ser Ala
 275 280 285
 Arg Ser Glu Gly Glu Phe Lys Gln Thr Ser Ser Phe Leu Val
 290 295 299

<210> 2

<211> 321

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Gly Ile Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Gly His Leu Thr Val
 1 5 10 15
 Asp Thr Tyr Gly Arg Pro Ile Leu Glu Val Pro Glu Ser Val Thr
 20 25 30
 Gly Pro Trp Lys Gly Asp Val Asn Leu Pro Cys Thr Tyr Asp Pro
 35 40 45
 Leu Gln Gly Tyr Thr Gln Val Leu Val Lys Trp Leu Val Gln Arg
 50 55 60
 Gly Ser Asp Pro Val Thr Ile Phe Leu Arg Asp Ser Ser Gly Asp
 65 70 75
 His Ile Gln Gln Ala Lys Tyr Gln Gly Arg Leu His Val Ser His
 80 85 90
 Lys Val Pro Gly Asp Val Ser Leu Gln Leu Ser Thr Leu Glu Met
 95 100 105

Asp Asp Arg Ser His Tyr Thr Cys Glu Val Thr Trp Gln Thr Pro
 110 115 120
 Asp Gly Asn Gln Val Val Arg Asp Lys Ile Thr Glu Leu Arg Val
 125 130 135
 Gln Lys Leu Ser Val Ser Lys Pro Thr Val Thr Thr Gly Ser Gly
 140 145 150
 Tyr Gly Phe Thr Val Pro Gln Gly Met Arg Ile Ser Leu Gln Cys
 155 160 165
 Gln Ala Arg Gly Ser Pro Pro Ile Ser Tyr Ile Trp Tyr Lys Gln
 170 175 180
 Gln Thr Asn Asn Gln Glu Pro Ile Lys Val Ala Thr Leu Ser Thr
 185 190 195
 Leu Leu Phe Lys Pro Ala Val Ile Ala Asp Ser Gly Ser Tyr Phe
 200 205 210
 Cys Thr Ala Lys Gly Gln Val Gly Ser Glu Gln His Ser Asp Ile
 215 220 225
 Val Lys Phe Val Val Lys Asp Ser Ser Lys Leu Leu Lys Thr Lys
 230 235 240
 Thr Glu Ala Pro Thr Thr Met Thr Tyr Pro Leu Lys Ala Thr Ser
 245 250 255
 Thr Val Lys Gln Ser Trp Asp Trp Thr Thr Asp Met Asp Gly Tyr
 260 265 270
 Leu Gly Glu Thr Ser Ala Gly Pro Gly Lys Ser Leu Pro Val Phe
 275 280 285
 Ala Ile Ile Leu Ile Ile Ser Leu Cys Cys Met Val Val Phe Thr
 290 295 300
 Met Ala Tyr Ile Met Leu Cys Arg Lys Thr Ser Gln Gln Glu His
 305 310 315
 Val Tyr Glu Ala Ala Arg
 320 321

<210> 3
 <211> 390
 <212> DNA
 <213> künstlich

<220>
 <221> künstliche Sequenz
 <222> 1-390
 <223> künstliche Sequenz

<400> 3

cttcttgcca actggtatca ccttcaagtc cgtgacacgg gaagacactg 50
 ggacatacac ttgtatggtc tctgaggaag gcggaacag ctatggggag 100
 gtcaaggcca agctcatcgt gcttgtgcct ccatccaagc ctacagttaa 150

catcccctcc tctgccacca ttggaaccg ggcagtgctg acatgctcag 200
 aacaagatgg ttccccacct tctgaatata cctggttcaa agatgggata 250
 gtgatgccta cgaatcccaa aagcaccctg gccttcagca actcttecta 300
 tgtcctgaat cccacaacag gagagctggt ctttgatccc ctgtcagcct 350
 ctgatactgg agaatacagc tgtgaggcac ggaatgggta 390

<210> 4
 <211> 726
 <212> DNA
 <213> künstlich

<220>
 <221> künstliche Sequenz
 <222> 1-726
 <223> künstliche Sequenz

<400> 4
 tctcagtcce ctcgctgtag tcgaggagct gtgttctggt tcccaggagt 50
 ccttcggcgg ctgtttgtgct caggtgcgcc tgatcgcgat ggggacaaag 100
 gcgcaagctc gagaggaaac tgttgtgcct cttcatattg gcgacacctg 150
 tgtgctccct ggcattgggc agtggtacag ttgcactctt ctgaacctga 200
 agtcagaatt cctgagaata atcctgtgaa gttgtcctgt gcctactcgg 250
 gcttttcttc tccccgtgtg gagtggaagt ttgaccaagg agacaccacc 300
 agactcgttt gctataataa caagatcaca gcttcctatg aggaccgggt 350
 gaccttcttg ccaactggta tcacctcaa gtccgtgaca cgggaagaca 400
 ctgggacata cacttgatg gtctctgagg aaggcggcaa cagctatggg 450
 gaggtcaagg tcaagctcat cgtgcttgtg cctccatcca agcctacagt 500
 taacatcccc tctctgcca ccattgggaa ccgggcagtg ctgacatgct 550
 cagaacaaga tggttcccca ccttctgaat acacctggtt caaagatggg 600
 atagtgatgc ctacgaatcc caaaagcacc cgtgccttca gcaactcttc 650
 ctatgtcctg aatcccacaa caggagagct ggtctttgat cccctgtcag 700
 cctctgatac tggagaatac agctgt 726

<210> 5
 <211> 1503
 <212> DNA
 <213> künstlich

<220>
 <221> künstliche Sequenz
 <222> 1-1503
 <223> künstliche Sequenz

<400> 5

gcaggcaag taccagggcc gcctgcatgt gagccacaag gttccaggag 50
atgtatccct ccaattgagc accctggaga tggatgaccg gagccactac 100
acgtgtgaag tcacctggca gactcctgat ggcaaccaag tcgtgagaga 150
taagattact gagctccgtg tccagaaact ctctgtctcc aagcccacag 200
tgacaactgg cagcggttat ggcttcacgg tgccccaggg aatgaggatt 250
agccttcaat gccagggttc ggggttctcc tcccatcagt tatatttggt 300
ataagcaaca gactaataac caggaaccc atcaaagtag caaccctaag 350
taccttactc ttcaagcctg cggatgtagc cgactcaygc tcctatttct 400
gcactgcaa gggccagggt ggctctgagc agcacagcga cattgtgaag 450
tttgtggcca aagactcctc aaagctactc aagaccaaga ctgaggcacc 500
tacaaccatg acatacccct tgaaagcaac atctacagtg aagcagtcct 550
gggactggac cactgacatg gatggctacc ttggagagac cagtgctggg 600
ccaggaaaga gcctgcctgt ctttgccatc atcctcatca tctccttgtg 650
ctgtatgggtg gtttttacca tggcctatat catgctctgt cggaagacat 700
cccaacaaga gcatgtctac gaagcagcca gggcacatgc cagagaggcc 750
aacgactctg gagaaacat gaggggtggc atcttcgcaa gtggctgctc 800
cagtgatgag ccaacttccc agaatctggg gcaacaacta ctctgatgag 850
ccctgcatag gacaggagta ccagatcacc gccagatca atggcaacta 900
cgcccgcctg ctggacacag ttcctctgga ttatgagttt ctggccactg 950
agggcaaaaag tgtctgttaa aatgccccca ttaggccagg atctgctgac 1000
ataattgcct agtcagtcct tgccttctgc atggccttct tccctgctac 1050
ctctcttctt ggatagcccc aagtgtccgc ctaccaacac tggagccgct 1100
gggagtcact ggctttgcc tggaaatttgc cagatgcacc tcaagtaagc 1150
cagctgctgg atttgctct gggcccttct agtatctctg ccgggggctt 1200
ctggtactcc tctctaaata ccagagggaa gatgcccata gcactaggac 1250
ttggatcatca tgacctacaga cactattcaa ctttggcatc ttgccaccag 1300
aagacccgag gggaggctca gctctgccag ctccagaggac cagctatata 1350
caggatcatt tctctttctt cagggccaga cagcttttaa ttgaaattgt 1400
tatttcacag gccagggttc agttctgctc ctccactata agtctaattgt 1450
tctgactctc tctgggtgct caataaatat ctaatcataa cagcaaaaaa 1500

aaa 1503

<210> 6

<211> 319

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Met	Val	Gly	Lys	Met	Trp	Pro	Val	Leu	Trp	Thr	Leu	Cys	Ala	Val
1				5					10					15
Arg	Val	Thr	Val	Asp	Ala	Ile	Ser	Val	Glu	Thr	Pro	Gln	Asp	Val
				20					25					30
Leu	Arg	Ala	Ser	Gln	Gly	Lys	Ser	Val	Thr	Leu	Pro	Cys	Thr	Tyr
				35					40					45
His	Thr	Ser	Thr	Ser	Ser	Arg	Glu	Gly	Leu	Ile	Gln	Trp	Asp	Lys
				50					55					60
Leu	Leu	Leu	Thr	His	Thr	Glu	Arg	Val	Val	Ile	Trp	Pro	Phe	Ser
				65					70					75
Asn	Lys	Asn	Tyr	Ile	His	Gly	Glu	Leu	Tyr	Lys	Asn	Arg	Val	Ser
				80					85					90
Ile	Ser	Asn	Asn	Ala	Glu	Gln	Ser	Asp	Ala	Ser	Ile	Thr	Ile	Asp
				95					100					105
Gln	Leu	Thr	Met	Ala	Asp	Asn	Gly	Thr	Tyr	Glu	Cys	Ser	Val	Ser
				110					115					120
Leu	Met	Ser	Asp	Leu	Glu	Gly	Asn	Thr	Lys	Ser	Arg	Val	Arg	Leu
				125					130					135
Leu	Val	Leu	Val	Pro	Pro	Ser	Lys	Pro	Glu	Cys	Gly	Ile	Glu	Gly
				140					145					150
Glu	Thr	Ile	Ile	Gly	Asn	Asn	Ile	Gln	Leu	Thr	Cys	Gln	Ser	Lys
				155					160					165
Glu	Gly	Ser	Pro	Thr	Pro	Gln	Tyr	Ser	Trp	Lys	Arg	Tyr	Asn	Ile
				170					175					180
Leu	Asn	Gln	Glu	Gln	Pro	Leu	Ala	Gln	Pro	Ala	Ser	Gly	Gln	Pro
				185					190					195
Val	Ser	Leu	Lys	Asn	Ile	Ser	Thr	Asp	Thr	Ser	Gly	Tyr	Tyr	Ile
				200					205					210
Cys	Thr	Ser	Ser	Asn	Glu	Glu	Gly	Thr	Gln	Phe	Cys	Asn	Ile	Thr
				215					220					225
Val	Ala	Val	Arg	Ser	Pro	Ser	Met	Asn	Val	Ala	Leu	Tyr	Val	Gly
				230					235					240
Ile	Ala	Val	Gly	Val	Val	Ala	Ala	Leu	Ile	Ile	Ile	Gly	Ile	Ile
				245					250					255
Ile	Tyr	Cys	Cys	Cys	Cys	Arg	Gly	Lys	Asp	Asp	Asn	Thr	Glu	Asp

	260		265		270									
Lys	Glu	Asp	Ala	Arg	Pro	Asn	Arg	Glu	Ala	Tyr	Glu	Glu	Pro	Pro
			275						280					285
Glu	Gln	Leu	Arg	Glu	Leu	Ser	Arg	Glu	Arg	Glu	Glu	Glu	Asp	Asp
			290						295					300
Tyr	Arg	Gln	Glu	Glu	Gln	Arg	Ser	Thr	Gly	Arg	Glu	Ser	Pro	Asp
			305						310					315
His	Leu	Asp	Gln											
			319											

<210> 7

<211> 2181

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

```

cccacgcgtc cgcccacgcg tccgcccacg ggtccgccc cgcgtccggg 50
ccaccagaag tttgagcctc tttggtagca ggaggctgga agaaaggaca 100
gaagtagctc tggctgtgat ggggatctta ctgggcctgc tactcctggg 150
gcacctaaac gtggacactt atggccgtcc catcctggaa gtgccagaga 200
gtgtaacagg accttgaaa ggggatgtga atcttcctg cacctatgac 250
cccctgcaag gctacacca agtcttgggt aagtggctgg tacaacgtgg 300
ctcagaccct gtcaccatct ttctacgtga ctcttctgga gaccatatcc 350
agcaggcaaa gtaccagggc cgcctgcatg tgagccacaa ggttccagga 400
gatgtatccc tccaattgag caccctggag atggatgacc ggagccacta 450
cacgtgtgaa gtcacctggc agactcctga tggcaaccaa gtcgtgagag 500
ataagattac tgagctccgt gtccagaaac tctctgtctc caagcccaca 550
gtgacaactg gcagcggtta tggcttcacg gtgccccagg gaatgaggat 600
tagccttcaa tgccaggctc ggggttctcc tcccatcagt tatatttggt 650
ataagcaaca gactaataac caggaacca tcaaagtagc aaccctaagt 700
accttactct tcaagcctgc ggtgatagcc gactcaggct cctatttctg 750
cactgccaaag ggccagggtg gctctgagca gcacagcgac attgtgaagt 800
ttgtgggtcaa agactcctca aagctactca agaccaagac tgaggcacct 850
acaaccatga cataccctt gaaagcaaca tctacagtga agcagtcctg 900
ggactggacc actgacatgg atggctacct tggagagacc agtgctgggc 950
caggaaagag cctgcctgtc tttgccatca tctcatcat ctcttgtgc 1000
tgtatggtgg tttttacat ggcctatata atgctctgtc ggaagacatc 1050

```

ccaacaagag catgtctacg aagcagccag gtaagaaagt ctctcctctt 1100
 ccatttttga ccccgctcct gccctcaatt ttgattactg gcaggaaatg 1150
 tggaggaagg ggggtgtggc acagacccaa tcctaaggcc ggaggccttc 1200
 agggtcagga catagctgcc ttccctctct caggcacctt ctgaggttgt 1250
 tttggccctc tgaacacaaa ggataattta gatccatctg ccttctgctt 1300
 ccagaatccc tgggtggtag gatcctgata attaattggc aagaattgag 1350
 gcagaagggt gggaaaccag gaccacagcc ccaagtccct tcttatgggt 1400
 ggtgggctct tgggccatag ggcacatgcc agagaggcca acgactctgg 1450
 agaaaccatg aggggtggcca tcttcgcaag tggctgctcc agtgatgagc 1500
 caacttccca gaatctgggc aacaactact ctgatgagcc ctgcatagga 1550
 caggagtacc agatcatcgc ccagatcaat ggcaactacg cccgectgct 1600
 ggacacagtt cctctggatt atgagtttct ggccactgag ggcaaaagtg 1650
 tctgttaaaa atgccccatt aggccaggat ctgctgacat aattgcctag 1700
 tcagtccttg ccttctgcat ggccttcttc cctgctacct ctcttcttgg 1750
 atagcccaaa gtgtccgcct accaactctg gagccgctgg gagtcaactg 1800
 ctttgccctg gaatttgcca gatgcatctc aagtaagcca gctgctggat 1850
 ttggctctgg gcccttctag tatctctgcc gggggcttct ggtactcctc 1900
 tctaaatacc agaggggaaga tgcccatagc actaggactt ggtcatcatg 1950
 cctacagaca ctattcaact ttggcatctt gccaccagaa gacccgaggg 2000
 aggctcagct ctgccagctc agaggaccag ctatatccag gatcatttct 2050
 ctttcttcag ggccagacag cttttaattg aaattggtat ttcacaggcc 2100
 agggttcagt tctgctcctc cactataagt ctaatgttct gactctctcc 2150
 tggtgctcaa taaatatcta atcataacag c 2181

<210> 8

<211> 1295

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 8

cccagaagtt caagggcccc cggcctcctg cgctcctgcc gccgggaccc 50
 tcgacctct cagagcagcc ggctgccgcc ccgggaagat ggcgaggagg 100
 agccgccacc gcctcctcct gctgctgctg cgctacctgg tggctgccct 150
 gggctatcat aaggcctatg ggttttctgc cccaaaagac caacaagtag 200

tcacagcagt agagtaccaa gaggctatth tagcctgcaa aaccccaaag 250
 aagactgttt cctccagatt agagtggaag aaactgggtc ggagtgtctc 300
 ctttgtctac tatcaacaga ctcttcaagg tgattttaaa aatcgagctg 350
 agatgataga tttcaatata cggatcaaaa atgtgacaag aagtgatgcg 400
 gggaaatata gttgtgaagt tagtgcccca tctgagcaag gccaaaacct 450
 ggaagaggat acagtcactc tggaagtatt agtggctcca gcagttccat 500
 catgtgaagt accctcttct gctctgagtg gaactgtggt agagctacga 550
 tgtcaagaca aagaaggaa tccagctcct gaatacacat ggtttaagga 600
 tggcatccgt ttgctagaaa atcccagact tggctcccaa agcaccaaca 650
 gctcatacac aatgaatata aaaactggaa ctctgcaatt taatactgtt 700
 tccaaactgg acaactggaga atattcctgt gaagcccga attctgttgg 750
 atatcgcagg tgtcctggga aacgaatgca agtagatgat ctcaacataa 800
 gtggcatcat agcagccgta gtagttgtgg ccttagtgat ttccgtttgt 850
 ggcttgggtg tatgctatgc tcagaggaaa ggctactttt caaaagaaac 900
 ctccctccag aagagtaatt cttcatctaa agccacgaca atgagtgaaa 950
 atgtgcagtg gctcacgctt gtaatcccag cactttggaa ggccgcggcg 1000
 ggcggatcac gaggtcagga gttctagacc agtctggcca atatggtgaa 1050
 accccatctc tactaaaata caaaaattag ctgggcatgg tggcatgtgc 1100
 ctgcagttcc agctgcttgg gagacaggag aatcacttga acccgggagg 1150
 cggaggttgc agtgagctga gatcacgcca ctgcagtcca gcctgggtaa 1200
 cagagcaaga ttccatctca aaaaataaaa taaataaata aataaatact 1250
 ggtttttacc tgtagaattc ttacaataaa tatagcttga tattc 1295

<210> 9

<211> 312

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Met Ala Arg Arg Ser Arg His Arg Leu Leu Leu Leu Leu Leu Arg
 1 5 10 15

Tyr Leu Val Val Ala Leu Gly Tyr His Lys Ala Tyr Gly Phe Ser
 20 25 30

Ala Pro Lys Asp Gln Gln Val Val Thr Ala Val Glu Tyr Gln Glu
 35 40 45

Ala Ile Leu Ala Cys Lys Thr Pro Lys Lys Thr Val Ser Ser Arg
 50 55 60

Leu Glu Trp Lys Lys Leu Gly Arg Ser Val Ser Phe Val Tyr Tyr
 65 70 75
 Gln Gln Thr Leu Gln Gly Asp Phe Lys Asn Arg Ala Glu Met Ile
 80 85 90
 Asp Phe Asn Ile Arg Ile Lys Asn Val Thr Arg Ser Asp Ala Gly
 95 100 105
 Lys Tyr Arg Cys Glu Val Ser Ala Pro Ser Glu Gln Gly Gln Asn
 110 115 120
 Leu Glu Glu Asp Thr Val Thr Leu Glu Val Leu Val Ala Pro Ala
 125 130 135
 Val Pro Ser Cys Glu Val Pro Ser Ser Ala Leu Ser Gly Thr Val
 140 145 150
 Val Glu Leu Arg Cys Gln Asp Lys Glu Gly Asn Pro Ala Pro Glu
 155 160 165
 Tyr Thr Trp Phe Lys Asp Gly Ile Arg Leu Leu Glu Asn Pro Arg
 170 175 180
 Leu Gly Ser Gln Ser Thr Asn Ser Ser Tyr Thr Met Asn Thr Lys
 185 190 195
 Thr Gly Thr Leu Gln Phe Asn Thr Val Ser Lys Leu Asp Thr Gly
 200 205 210
 Glu Tyr Ser Cys Glu Ala Arg Asn Ser Val Gly Tyr Arg Arg Cys
 215 220 225
 Pro Gly Lys Arg Met Gln Val Asp Asp Leu Asn Ile Ser Gly Ile
 230 235 240
 Ile Ala Ala Val Val Val Val Ala Leu Val Ile Ser Val Cys Gly
 245 250 255
 Leu Gly Val Cys Tyr Ala Gln Arg Lys Gly Tyr Phe Ser Lys Glu
 260 265 270
 Thr Ser Phe Gln Lys Ser Asn Ser Ser Ser Lys Ala Thr Thr Met
 275 280 285
 Ser Glu Asn Val Gln Trp Leu Thr Pro Val Ile Pro Ala Leu Trp
 290 295 300
 Lys Ala Ala Ala Gly Gly Ser Arg Gly Gln Glu Phe
 305 310 312

<210> 10

<211> 300

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 10

Met Gly Thr Glu Gly Lys Ala Gly Arg Lys Leu Leu Phe Leu Phe
 1 5 10 15

Thr Ser Met Ile Leu Gly Ser Leu Val Gln Gly Lys Gly Ser Val
 20 25 30
 Tyr Thr Ala Gln Ser Asp Val Gln Val Pro Glu Asn Glu Ser Ile
 35 40 45
 Lys Leu Thr Cys Thr Tyr Ser Gly Phe Ser Ser Pro Arg Val Glu
 50 55 60
 Trp Lys Phe Val Gln Gly Ser Thr Thr Ala Leu Val Cys Tyr Asn
 65 70 75
 Ser Gln Ile Thr Ala Pro Tyr Ala Asp Arg Val Thr Phe Ser Ser
 80 85 90
 Ser Gly Ile Thr Phe Ser Ser Val Thr Arg Lys Asp Asn Gly Glu
 95 100 105
 Tyr Thr Cys Met Val Ser Glu Glu Gly Gly Gln Asn Tyr Gly Glu
 110 115 120
 Val Ser Ile His Leu Thr Val Leu Val Pro Pro Ser Lys Pro Thr
 125 130 135
 Ile Ser Val Pro Ser Ser Val Thr Ile Gly Asn Arg Ala Val Leu
 140 145 150
 Thr Cys Ser Glu His Asp Gly Ser Pro Pro Ser Glu Tyr Ser Trp
 155 160 165
 Phe Lys Asp Gly Ile Ser Met Leu Thr Ala Asp Ala Lys Lys Thr
 170 175 180
 Arg Ala Phe Met Asn Ser Ser Phe Thr Ile Asp Pro Lys Ser Gly
 185 190 195
 Asp Leu Ile Phe Asp Pro Val Thr Ala Phe Asp Ser Gly Glu Tyr
 200 205 210
 Tyr Cys Gln Ala Gln Asn Gly Tyr Gly Thr Ala Met Arg Ser Glu
 215 220 225
 Ala Ala His Met Asp Ala Val Glu Leu Asn Val Gly Gly Ile Val
 230 235 240
 Ala Ala Val Leu Val Thr Leu Ile Leu Leu Gly Leu Leu Ile Phe
 245 250 255
 Gly Val Trp Phe Ala Tyr Ser Arg Gly Tyr Phe Glu Thr Thr Lys
 260 265 270
 Lys Gly Thr Ala Pro Gly Lys Lys Val Ile Tyr Ser Gln Pro Ser
 275 280 285
 Thr Arg Ser Glu Gly Glu Phe Lys Gln Thr Ser Ser Phe Leu Val
 290 295 300

<210> 11
 <211> 2181
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 11

cccacgctc cgcccacgcg tccgcccacg ggtccgcca cgcgtccggg 50
ccaccágaag tttgagcctc tttggtagca ggaggctgga agaaaggaca 100
gaagtagctc tggctgtgat ggggatctta ctgggcctgc tactcctggg 150
gcacctaaca gtggacactt atggccgtcc catcctggaa gtgccagaga 200
gtgtaacagg accttgaaa ggggatgtga atcttcctg cacctatgac 250
cccctgcaag gctacacca agtcttgggtg aagtggctgg tacaacgtgg 300
ctcagacct gtcaccatct ttctacgtga ctcttctgga gaccatatcc 350
agcaggcaaa gtaccagggc cgcctgcatg tgagccacaa ggttccagga 400
gatgtatccc tccaattgag caccctggag atggatgacc ggagccacta 450
cacgtgtgaa gtcacctggc agactcctga tggcaaccaa gtcgtgagag 500
ataagattac tgagctccgt gtccagaaac tctctgtctc caagcccaca 550
gtgacaactg gcagcgggta tggcttcacg gtgccccagg gaatgaggat 600
tagccttcaa tgccaggctc ggggttctcc tcccatcagt tatatttggg 650
ataagcaaca gactaataac caggaacca tcaaagtagc aaccctaagt 700
accttactct tcaagcctgc ggtgatagcc gactcaggct cctatttctg 750
cactgccaag ggccagggtg gctctgagca gcacagcgac attgtgaagt 800
ttgtgggtcaa agactcctca aagctactca agaccaagac tgaggcacct 850
acaacatga catacccctt gaaagcaaca tctacagtga agcagtcctg 900
ggactggacc actgacatgg atggctacct tggagagacc agtgctgggc 950
caggaaagag cctgcctgtc tttgcatca tctcatcat ctcttgtgc 1000
tgtatgggtg tttttaccat ggcctatata atgctctgtc ggaagacatc 1050
ccaacaagag catgtctacg aagcagccag gtaagaaagt ctctcctctt 1100
ccatttttga ccccgctcct gccctcaatt ttgattactg gcaggaaatg 1150
tggaggaagg ggggtgtggc acagaccaa tcttaaggcc ggaggccttc 1200
agggtcagga catagctgcc ttcctctctc caggcacctt ctgaggttgt 1250
tttggcctc tgaacacaaa ggataattta gatccatctg ccttctgctt 1300
ccagaatccc tgggtggtag gatcctgata attaattggc aagaattgag 1350
gcagaagggg gggaaaccag gaccacagcc ccaagtcctt tcttatgggt 1400
ggtgggctct tgggcatag ggcacatgcc agagaggcca acgactctgg 1450
agaaacatg aggggtggcca tcttcgcaag tggctgctcc agtgatgagc 1500

caacttccca gaatctgggc aacaactact ctgatgagcc ctgcatagga 1550
caggagtacc agatcatcgc ccagatcaat ggcaactacg cccgcctgct 1600
ggacacagtt cctctggatt atgagtttct ggccactgag ggcaaaagtg 1650
tctgttaaaa atgccccatt aggccaggat ctgctgacat aattgcctag 1700
tcagtecttg ccttctgcat ggcctctctc cctgctacct ctcttctctg 1750
atagcccaaa gtgtccgcct accaactctg gagccgctgg gagtcaactg 1800
ctttgccttg gaatttgcca gatgcatctc aagtaagcca gctgctggat 1850
ttggctctgg gcccttctag tatctctgcc gggggcttct ggtactctc 1900
tctaaatacc agaggggaaga tgccatagc actaggactt ggtcatcatg 1950
cctacagaca ctattcaact ttggcatctt gccaccagaa gaccogaggg 2000
aggctcagct ctgccagctc agaggaccag ctatatccag gatcatttct 2050
ctttcttcag ggccagacag cttttaattg aaattggtat ttcacaggcc 2100
agggttcagt tctgctcctc cactataagt ctaatgttct gactctctcc 2150
tggtgctcaa taaatatcta atcataacag c 2181

<210> 12
<211> 24
<212> DNA
<213> künstliche Sequenz

<220>
<221> künstliche Sequenz
<222> 1-24
<223> künstliche Sequenz

<400> 12

tcgcgagct gtgttctggt tccc 24

<210> 13
<211> 50
<212> DNA
<213> künstliche Sequenz

<220>
<221> künstliche Sequenz
<222> 1-50
<223> künstliche Sequenz

<400> 13

tgatcgcgat ggggacaaag gcgcaagctc gagaggaaac tgttgtgcct 50

<210> 14

<211> 20
<212> DNA
<213> künstliche Sequenz

<220>
<221> künstliche Sequenz
<222> 1-20
<223> künstliche Sequenz

<400> 14

acacctggtt caaagatggg 20

<210> 15
<211> 24
<212> DNA
<213> künstliche Sequenz

<220>
<221> künstliche Sequenz
<222> 1-24
<223> künstliche Sequenz

<400> 15

taggaagagt tgctgaaggc acgg 24

<210> 16
<211> 20
<212> DNA
<213> künstliche Sequenz

<220>
<221> künstliche Sequenz
<222> 1-20
<223> künstliche Sequenz

<400> 16

ttgccttact caggtgctac 20

<210> 17
<211> 20
<212> DNA
<213> künstliche Sequenz

<220>
<221> künstliche Sequenz
<222> 1-20
<223> künstliche Sequenz

<400> 17

actcagcagt ggtaggaaag 20

<210> 18
<211> 24
<212> DNA
<213> künstliche Sequenz

<220>
<221> künstliche Sequenz
<222> 1-24
<223> künstliche Sequenz

<400> 18

tatccctcca attgagcacc ctgg '24

<210> 19
<211> 21
<212> DNA
<213> künstliche Sequenz

<220>
<221> künstliche Sequenz
<222> 1-21
<223> künstliche Sequenz

<400> 19

gtcgggaagac atccaacaa g 21

<210> 20
<211> 24
<212> DNA
<213> künstliche Sequenz

<220>
<221> künstliche Sequenz
<222> 1-24
<223> künstliche Sequenz

<400> 20

cttcacaatg tcgctgtgct gctc 24

<210> 21
<211> 24
<212> DNA
<213> künstliche Sequenz

<220>
<221> künstliche Sequenz
<222> 1-24
<223> künstliche Sequenz

<400> 21

agccaaatcc agcagctggc ttac 24

<210> 22
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> künstliche Sequenz

<220>
 <221> künstliche Sequenz
 <222> 1-50
 <223> künstliche Sequenz

<400> 22
 tggatgaccg gagccactac acgtgtgaag tcacctggca gactcctgat 50

<210> 23
 <211> 260
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 23
 Leu Ala Leu Gly Ser Val Thr Val His Ser Ser Glu Pro Glu Val
 1 5 10 15
 Arg Ile Pro Glu Asn Asn Pro Val Lys Leu Ser Cys Ala Tyr Ser
 20 25 30
 Gly Phe Ser Ser Pro Arg Val Glu Trp Lys Phe Asp Gln Gly Asp
 35 40 45
 Thr Thr Arg Leu Val Cys Tyr Asn Asn Lys Ile Thr Ala Ser Tyr
 50 55 60
 Glu Asp Arg Val Thr Phe Leu Pro Thr Gly Ile Thr Phe Lys Ser
 65 70 75
 Val Thr Arg Glu Asp Thr Gly Thr Tyr Thr Cys Met Val Ser Glu
 80 85 90
 Glu Gly Gly Asn Ser Tyr Gly Glu Val Lys Val Lys Leu Ile Val
 95 100 105
 Leu Val Pro Pro Ser Lys Pro Thr Val Asn Ile Pro Ser Ser Ala
 110 115 120
 Thr Ile Gly Asn Arg Ala Val Leu Thr Cys Ser Glu Gln Asp Gly
 125 130 135
 Ser Pro Pro Ser Glu Tyr Thr Trp Phe Lys Asp Gly Ile Val Met
 140 145 150
 Pro Thr Asn Pro Lys Ser Thr Arg Ala Phe Ser Asn Ser Ser Tyr
 155 160 165
 Val Leu Asn Pro Thr Thr Gly Glu Leu Val Phe Asp Pro Leu Ser
 170 175 180
 Ala Ser Asp Thr Gly Glu Tyr Ser Cys Glu Ala Arg Asn Gly Tyr
 185 190 195

Gly Thr Pro Met Thr Ser Asn Ala Val Arg Met Glu Ala Val Glu
 200 205 210

Arg Asn Val Gly Val Ile Val Ala Ala Val Leu Val Thr Leu Ile
 215 220 225

Leu Leu Gly Ile Leu Val Phe Gly Ile Trp Phe Ala Tyr Ser Arg
 230 235 240

Gly His Phe Asp Arg Thr Lys Lys Gly Thr Ser Ser Lys Lys Val
 245 250 255

Ile Tyr Ser Gln Pro
 260

<210> 24
 <211> 270
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 24
 Val Arg Val Thr Val Asp Ala Ile Ser Val Glu Thr Pro Gln Asp
 1 5 10 15

Val Leu Arg Ala Ser Gln Gly Lys Ser Val Thr Leu Pro Cys Thr
 20 25 30

Tyr His Thr Ser Thr Ser Ser Arg Glu Gly Leu Ile Gln Trp Asp
 35 40 45

Lys Leu Leu Leu Thr His Thr Glu Arg Val Val Ile Trp Pro Phe
 50 55 60

Ser Asn Lys Asn Tyr Ile His Gly Glu Leu Tyr Lys Asn Arg Val
 65 70 75

Ser Ile Ser Asn Asn Ala Glu Gln Ser Asp Ala Ser Ile Thr Ile
 80 85 90

Asp Gln Leu Thr Met Ala Asp Asn Gly Thr Tyr Glu Cys Ser Val
 95 100 105

Ser Leu Met Ser Asp Leu Glu Gly Asn Thr Lys Ser Arg Val Arg
 110 115 120

Leu Leu Val Leu Val Pro Pro Ser Lys Pro Glu Cys Gly Ile Glu
 125 130 135

Gly Glu Thr Ile Ile Gly Asn Asn Ile Gln Leu Thr Cys Gln Ser
 140 145 150

Lys Glu Gly Ser Pro Thr Pro Gln Tyr Ser Trp Lys Arg Tyr Asn
 155 160 165

Ile Leu Asn Gln Glu Gln Pro Leu Ala Gln Pro Ala Ser Gly Gln
 170 175 180

Pro Val Ser Leu Lys Asn Ile Ser Thr Asp Thr Ser Gly Tyr Tyr
 185 190 195

Ile Cys Thr Ser Ser Asn Glu Glu Gly Thr Gln Phe Cys Asn Ile
 200 205 210

Thr Val Ala Val Arg Ser Pro Ser Met Asn Val Ala Leu Tyr Val
 215 220 225
 Gly Ile Ala Val Gly Val Val Ala Ala Leu Ile Ile Ile Gly Ile
 230 235 240
 Ile Ile Tyr Cys Cys Cys Cys Arg Gly Lys Asp Asp Asn Thr Glu
 245 250 255
 Asp Lys Glu Asp Ala Arg Pro Asn Arg Glu Ala Tyr Glu Glu Pro
 260 265 270

<210> 25
 <211> 263
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 25
 Leu Cys Ser Leu Ala Leu Gly Ser Val Thr Val His Ser Ser Glu
 1 5 10 15
 Pro Glu Val Arg Ile Pro Glu Asn Asn Pro Val Lys Leu Ser Cys
 20 25 30
 Ala Tyr Ser Gly Phe Ser Ser Pro Arg Val Glu Trp Lys Phe Asp
 35 40 45
 Gln Gly Asp Thr Thr Arg Leu Val Cys Tyr Asn Asn Lys Ile Thr
 50 55 60
 Ala Ser Tyr Glu Asp Arg Val Thr Phe Leu Pro Thr Gly Ile Thr
 65 70 75
 Phe Lys Ser Val Thr Arg Glu Asp Thr Gly Thr Tyr Thr Cys Met
 80 85 90
 Val Ser Glu Glu Gly Gly Asn Ser Tyr Gly Glu Val Lys Val Lys
 95 100 105
 Leu Ile Val Leu Val Pro Pro Ser Lys Pro Thr Val Asn Ile Pro
 110 115 120
 Ser Ser Ala Thr Ile Gly Asn Arg Ala Val Leu Thr Cys Ser Glu
 125 130 135
 Gln Asp Gly Ser Pro Pro Ser Glu Tyr Thr Trp Phe Lys Asp Gly
 140 145 150
 Ile Val Met Pro Thr Asn Pro Lys Ser Thr Arg Ala Phe Ser Asn
 155 160 165
 Ser Ser Tyr Val Leu Asn Pro Thr Thr Gly Glu Leu Val Phe Asp
 170 175 180
 Pro Leu Ser Ala Ser Asp Thr Gly Glu Tyr Ser Cys Glu Ala Arg
 185 190 195
 Asn Gly Tyr Gly Thr Pro Met Thr Ser Asn Ala Val Arg Met Glu
 200 205 210
 Ala Val Glu Arg Asn Val Gly Val Ile Val Ala Ala Val Leu Val
 215 220 225

Thr Leu Ile Leu Leu Gly Ile Leu Val Phe Gly Ile Trp Phe Ala
 230 235 240
 Tyr Ser Arg Gly His Phe Asp Arg Thr Lys Lys Gly Thr Ser Ser
 245 250 255
 Lys Lys Val Ile Tyr Ser Gln Pro
 260 263

<210> 26
 <211> 273
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 26
 Leu Cys Ala Val Arg Val Thr Val Asp Ala Ile Ser Val Glu Thr
 1 5 10 15
 Pro Gln Asp Val Leu Arg Ala Ser Gln Gly Lys Ser Val Thr Leu
 20 25 30
 Pro Cys Thr Tyr His Thr Ser Thr Ser Ser Arg Glu Gly Leu Ile
 35 40 45
 Gln Trp Asp Lys Leu Leu Leu Thr His Thr Glu Arg Val Val Ile
 50 55 60
 Trp Pro Phe Ser Asn Lys Asn Tyr Ile His Gly Glu Leu Tyr Lys
 65 70 75
 Asn Arg Val Ser Ile Ser Asn Asn Ala Glu Gln Ser Asp Ala Ser
 80 85 90
 Ile Thr Ile Asp Gln Leu Thr Met Ala Asp Asn Gly Thr Tyr Glu
 95 100 105
 Cys Ser Val Ser Leu Met Ser Asp Leu Glu Gly Asn Thr Lys Ser
 110 115 120
 Arg Val Arg Leu Leu Val Leu Val Pro Pro Ser Lys Pro Glu Cys
 125 130 135
 Gly Ile Glu Gly Glu Thr Ile Ile Gly Asn Asn Ile Gln Leu Thr
 140 145 150
 Cys Gln Ser Lys Glu Gly Ser Pro Thr Pro Gln Tyr Ser Trp Lys
 155 160 165
 Arg Tyr Asn Ile Leu Asn Gln Glu Gln Pro Leu Ala Gln Pro Ala
 170 175 180
 Ser Gly Gln Pro Val Ser Leu Lys Asn Ile Ser Thr Asp Thr Ser
 185 190 195
 Gly Tyr Tyr Ile Cys Thr Ser Ser Asn Glu Glu Gly Thr Gln Phe
 200 205 210
 Cys Asn Ile Thr Val Ala Val Arg Ser Pro Ser Met Asn Val Ala
 215 220 225
 Leu Tyr Val Gly Ile Ala Val Gly Val Val Ala Ala Leu Ile Ile
 230 235 240

Ile Gly Ile Ile Ile Tyr Cys Cys Cys Cys Arg Gly Lys Asp Asp
 245 250 255

Asn Thr Glu Asp Lys Glu Asp Ala Arg Pro Asn Arg Glu Ala Tyr
 260 265 270

Glu Glu Pro
 273

<210> 27
 <211> 413
 <212> DNA
 <213> künstliche Sequenz

<220>
 <221> künstliche Sequenz
 <222> 1-413
 <223> künstliche Sequenz

<400> 27

ctcgagccgc tcgagccgtg cggggaaata tcgttgtgaa gttagtgcc 50
 catctgagca aggccaaaac ctggaagagg atacagtcac tctggaagta 100
 ttagtggctc cagcagttcc atcatgtgaa gtaccctctt ctgctctgag 150
 tggaactgtg gtagagctac gatgtcaaga caaagaaggg aatccagctc 200
 ctgaatacac atggtttaag gatggcatcc gtttgctaga aaatcccaga 250
 cttggctccc aaagcaccaa cagctcatac acaatgaata caaaaactgg 300
 aactctgcaa ttaatactg tttccaaact ggacactgga gaatattcct 350
 gtgaagcccg caattctggt ggatategca ggtgtcctgg ggaaacgaat 400
 gcaagtagat gat 413

<210> 28
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> künstliche Sequenz

<220>
 <221> künstliche Sequenz
 <222> 1-22
 <223> künstliche Sequenz

<400> 28

atcgttgtga agttagtgcc cc 22

<210> 29
 <211> 23
 <212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<221> künstliche Sequenz

<222> 1-23

<223> künstliche Sequenz

<400> 29

acctgcgata tccaacagaa ttg 23

<210> 30

<211> 48

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<221> künstliche Sequenz

<222> 1-48

<223> künstliche Sequenz

<400> 30

ggaagaggat acagtcactc tggaagtatt agtggctcca gcagttcc 48

Patentansprüche

1. Antagonist jenes Polypeptids, dessen Aminosäuresequenz in [Fig. 3](#) (Seq.-ID Nr. 9) dargestellt ist, zur Verwendung in einem medizinischen Behandlungsverfahren, worin der Antagonist: ein Antikörper gegen das Polypeptid ist, der die Aktivität des Polypeptids in Bezug auf die Stimulierung der Proliferation von stimulierten T-Lymphozyten und/oder die Aktivität des Polypeptids in Bezug auf die Stimulierung von entzündlichen Zellinfiltraten in Meerschweinchenhaut teilweise oder vollständig blockiert, hemmt oder neutralisiert; oder ein gegen die in [Fig. 2](#) dargestellte Nucleinsäuresequenz (Seq.-ID Nr. 8) gerichtetes Antisense-, Ribozym- oder Tripelhelixmolekül ist.

2. Antagonist nach Anspruch 1, der ein Antikörper ist.

3. Antagonist nach Anspruch 2, der ein monoklonaler Antikörper ist.

4. Antagonist nach Anspruch 3, der Reste nichtmenschlicher Komplementaritätsbestimmender Regionen (CDR) aufweist und Reste menschlicher Gerüstregionen (FR) enthält.

5. Verwendung eines Polypeptids bei der Herstellung eines Medikaments zur Steigerung der Entzündungsreaktion, worin das Polypeptid:

(i) die Aminosäuren 1 bis 312 aus [Fig. 3](#) (Seq.-ID Nr. 9) oder eine natürlich vorkommende trunkierte oder sekretierte Form, natürlich vorkommende Variantenform oder natürlich vorkommende Allelvariante davon umfasst; oder

(ii) zumindest 80 % Aminosäuresequenzidentität mit der Aminosäuresequenz aus [Fig. 3](#) (Seq.-ID Nr. 9) mit oder ohne Startmethionin, aufweist, worin die Sequenzidentität über die Gesamtlänge der Sequenz bestimmt wird;

und worin das Polypeptid die Proliferation von stimulierten T-Lymphozyten stimuliert und/oder entzündliche Zellinfiltrate in Meerschweinchenhaut stimuliert.

6. Verwendung nach Anspruch 5, worin der Identitätsgrad zumindest 85 % beträgt.

7. Verwendung nach Anspruch 5, worin der Identitätsgrad zumindest 90 % beträgt.

8. Verwendung nach Anspruch 5, worin der Identitätsgrad zumindest 95 % beträgt.

9. Verwendung nach einem der Ansprüche 5 bis 8, worin das Medikament zur Behandlung einer Infekti-

onskrankheit oder eines Immundefekts dient.

Es folgen 7 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

Seq.-ID Nr. 6 A33 1 M V G K M W P V L W T L C A Y R V T V D A I S V E T P Q D V L R A S Q G K S V T L P C T Y H T S T S

Seq.-ID Nr. 1 40628 1 M G T K A Q V E R K L L C L F I L A I L C S L A L G S V T Y H S S E P E V R I P E

Seq.-ID Nr. 2 45416 1 M G I L L G L L L L G H L T V D T Y G R P I L E V P E S V T G P W K G D V N L P C T Y D P L

Seq.-ID Nr. 9 35638 1 M A R R S R H R L L L L L R Y L V V A L G Y H K A Y G F S A P K D O Q V V T A V E

Seq.-ID Nr. 10 JAM 1 . M G T E G K A G R K L L F L F T S M I L G S L V Q G K G S V Y T A Q S D V Q V P E

A33 51 S R E G L I Q W D K L L L T H T E R V I W P F S H K N Y I H G E L Y K H R V S I S N H A E Q S D A

40628 43 N H P Y K L S C A Y S G F S S P R V E W K F D Q G D T T R L V C Y H N K I T A S Y E D R V T F L P T

45416 47 Q G Y T Q V L Y K W L V Q R G S D P V T I F L R D S S G D H I Q A K Y Q G R L H V S H K V P G D V

35638 43 Y Q E A I L A C K T P K K T V S S R L E W K X L G R S V S F V Y Y Q Q T L Q G D F K N R A E M I D F

JAM 42 N E S I K L T C T Y S G F S S P R V E W K F V Q G S T T A L V C Y H S Q I T A P Y A D R V T F S S S

A33 101 S I T I D Q L T M A D N G T Y E C S V S L . M S D L E G H T K S R V R L L V L V P P S K

40628 93 G I T F K S V T R E D T G T Y T C M V S E E G H S Y G E V K V K L I V L V P P S K

45416 97 S L Q L S T L E M D D R S H Y T C E Y T W Q T P O G N Q V Y R D K I T E L R V Q K L S V S K P T V T

35638 93 N I R I K H V T R S D A G K Y R C E V S A P S E O G Q H L E E D T V T L E V L V A P A V

JAM 92 G I T F S S V T R K D N G E Y T C M V S E E G G Q H Y G E V S I H L T V L V P P S K

A33 144 P E C G I E G E T I I G N N I Q L T C O S K E G S P T P Q Y S W K R Y N I L N Q E Q

40628 135 P T Y N I P S S A T I G N R A V L T C S E O D G S P P S E Y T W F K D G I V M P T H . P K S T R A F

45416 147 T G S G Y G F T V P Q G M R I S L O C Q A R . G S P P I S Y I W Y K Q O T N N O E P

35638 137 P S C E V P S S A L S G T V V E L R C O D X E G N P A P E Y T W F K D G I R L L E N . P R L G S Q S

JAM 134 P T I S V P S S V T I G N R A V L T C S E H D G S P P S E Y S W F K D G I S M L T A D A K K T R A F

FIG. 1A

Seq.-ID Nr. 6 A33 186 . . . P L A O P A S G Q P V S L K N I S T D T S G Y Y I C T S S N E E G T O F C N I T V
 Seq.-ID Nr. 1 40628 184 S H S S Y V L N P T T G E L V F D P L S A S O T G E Y S C E A R N G Y G T P M T S N A V
 Seq.-ID Nr. 2 45416 188 I K Y A T L S T L L F K P A Y I A D S G S Y F C T A K G Q V G S E Q H S D I V K F V V K O
 Seq.-ID Nr. 9 35638 186 T H S S Y T M N T K T G T L Q F N T V S K L D T G E Y S C E A R N S V G Y A R C P G K R
 Seq.-ID Nr. 10 JAM 184 M N S S F T I D P K S G D L I F D P Y T A F D S G E Y Y C O A Q N G Y G T A M R S E A A

A33 227 A V R S P S M H V A L Y V G I A V G V V A A L I I G I I Y C C C R G K D D N T E O K E D A . . .
 40628 228 R M E A V E R N V G V I V A A V L V T L I L L G I L V F G I W F A Y S R G H F D O R T K K G T S . . .
 45416 233 S S K L L K T K T E A P T T M T Y P L K A T S T Y K O S W D W T T D M D G Y L G E T S A G P G K S L
 35638 230 . M O V D D L N I S G I I A A V V V A L V I S V C G L G V C Y A O R K G Y F S K E T S F O K S . . .
 JAM 228 H M D A V E L N V G G I V A A V L V T L I L L G L L I F G V W F A Y S R G Y F E T T K K G T A P . . .

A33 275 . R P N R E A Y E E P P E O L R E L S R E R E E E D D Y R O E E O R S T G R E S P D H L O Q
 40628 275 S K K V I Y S O P S A R S E G E F K O T S S F L V
 45416 283 P V F A I I L I S L C C M V V F T M A Y I M L C R K T S O O E H V Y E A A R
 35638 277 . H S S S K A T T M . S E N V Q W L T P V I P A L W K A A A G G S R G Q E F
 JAM 276 G K K V I Y S O P S T R S E G E F K O T S S F L V

FIG.-1B

Seq.-ID Nr. 8

CCCAGAAGTTCAAGGGCCCCCGGCCTCCTGCGCTCCTGCCGCCGGGACCCCTCGACCTCCT
 CAGAGCAGCCGGCTGCCGCCCGGGGAAGATGGCGAGCAGGAGCCGCCACCGCCTCCTCCT
 GCTGCTGCTGCGCTACCTGGTGGTCGCCCTGGGCTATCATAAGGCCTATGGGTTTTCTGC
 CCCAAAAGACCAACAAGTAGTCACAGCAGTAGAGTACCAAGAGGCTATTTTAGCCTGCAA
 AACCCCAAAGAAGACTGTTTTCTCCAGATTAGAGTGGAAGAACTGGGTCGGAGTGTCTC
 CTTTGTCTACTATCAACAGACTCTTCAAGGTGATTTTAAAAATCGAGCTGAGATGATAGA
 TTCAATATCCGGATCAAAAATGTGACAAGAAGTGATGCCGGGAAATATCGTTGTGAAGT
 TAGTGCCCATCTGAGCAAGGCCAAAACCTGGAAGAGGATACAGTCACTCTGGAAGTATT
 AGTGGCTCCAGCAGTTCATCATGTGAAGTACCCTCTTCTGCTCTGAGTGGAAGTGTGGT
 AGAGCTACGATGTCAAGACAAAGAAGGGAATCCAGCTCCTGAATACACATGGTTTAAGGA
 TGGCATCCGTTTGCTAGAAAATCCAGACTTGGCTCCCAAAGCACCAACAGCTCATAAC
 AATGAATACAAAACCTGGAAGTCTGCAATTTAATACTGTTTCAAACCTGGACACTGGAGA
 ATATTCCTGTGAAGCCCGCAATTCTGTTGGATATCGCAGGTGTCTGGGAAACGAATGCA
 AGTAGATGATCTCAACATAAGTGGCATCATAGCAGCCGTAGTAGTTGTGGCCTTAGTGAT
 TTCCGTTTGTGGCCTTGGTGTATGCTATGCTCAGAGGAAAGGCTACTTTTCAAAGAAAC
 CTCCTTCCAGAAGAGTAATTCTTCATCTAAAGCCACGACAATGAGTGAAAATGTGCAGTG
 GCTCACGCCTGTAATCCCAGCACTTTGGAAGGCCGCGGGCGGATCACGAGGTCAGGA
 GTTCTAGACCAGTCTGGCCAATATGGTGAACCCCATCTCTACTAAAATACAAAATTAG
 CTGGGCATGGTGGCATGTGCCTGCAGTTCAGCTGCTTGGGAGACAGGAGAATCACTTGA
 ACCCGGGAGGCGGAGGTTGCAGTGAGCTGAGATCACGCCACTGCAGTCCAGCCTGGGTAA
 CAGAGCAAGATTCATCTCAAAAATAAAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAA
 TGTAGAATTCTTACAATAAATATAGCTTGATATTC

FIG._2

Seq.-ID Nr. 9

MARRSRHRLLLLLLRYLVVALGYHKAYGFSAPKDQQVVTAVEYQEAILACKTPKKTVS SR
 LEWKKLGRSVSFVYYQQTLOGDFKNRAEMIDFNIRIKNVTRSDAGKYRCEVSAPSEQQN
 LEEDTVTLEVLVAPAVPSCEVPSSALSGTVVELRCQDKEGNPAPEYTWFKDGI RLLNPR
 LGSQSTNSSYTMNTKTGTLQFNTVSKLDTGEYSCEARNSVGYRRCPGKRMQVDDLNI SGI
 IAAVVVVALVISVCGLVGYAQRKGYFSKETS FQKSNSSSKATTMSENVQWLTPVIPALW
 KAAAGGSRGQEF

FIG._3

Seq.-ID Nr. 6 A33_hum 1 . . M V G K M W P V L W T L C A V R V T V D A I S V E T P O D V L R A S Q G K S V T L P C
 Seq.-ID Nr. 9 1 M A R R S R H R L L L L L R Y L V V A L G Y H K A Y G F S A P K D O Q V T A V E Y Q E A I L A C

A33_hum 44 T Y H T S T S S R E G L I O W K L L L T H T E R V I W P F S N K N Y J H G E L Y K N R R V S I S N
 35638 51 . . K T P K K T V S S R L E W K K L G R S V S F V Y Y Q O T . L O G D . F K N R

A33_hum 94 N A E Q S D A S I T I D Q L T M A D N G T Y E C S V S L M S D L E G N . T K S R V R L L V L V P P S
 35638 87 . A E M I D F N I R I K N V T R S D A G K Y R C E V S A P S E O G O N L E E D T V T L E V L V A P A

A33_hum 143 K P E C G I E G E T I I G N N I Q L T C O S K E G S P T P O Y S W K R Y N I L N O E Q P L A Q P A S
 35638 136 V P S C E V P S S A L S G T V V E L R C O D K E G N P A P E Y T W F K O G I R L L E N P R L G S Q S

A33_hum 193 G O P V S L K N I S T O T S G Y Y I C T S S N E E G T O F C H I T V A V . . . R I S P S M N V A L Y V
 35638 186 T N S S Y T M N T K T G T L O F N T . V S K L D T G E Y S C E A R N S V G Y R R C P G K R M Q V D D

A33_hum 240 G I A V G V V A A L I I I G I I I Y C C . . . C C R G K D D N T E D K E D A R P N R E A Y E E P P E
 35638 235 L N I S G I I A A V V V A L V I I S V C G L G V C Y A O R K G Y F S K E T S F O K S N S S S K A T T

A33_hum 287 Q L R E L S R . E R E E E D D Y R Q E E O R S T G R E S P D H L D Q
 35638 285 M S E N V O W L T P V I P A L W K A A G G S R G Q E F

FIG. 4

Seq.-ID Nr. 10 jam 1 MGTEGKAGRKLLFLFTSMILGSLVQKGSVYTAQSDVQV...PENESIKL
 Seq.-ID Nr. 29 35638 1..MARRSRHRLLLLLRYLVVALGYHKA YGFSAPKQOVVTAVEYOEAAIL

48 TC·TYSGFS SPRVWKFYQGSTTALVCYNSOITAPYADRVTFSSSGITFS
 35638 49 ACKTTPKXTVSSRLEWKXL·GRSVFVYQQTLOGDFKNRAEMIDFNIRIK

jam 97 SVTRKDNGEYTCMVS·EEGGQNYGEVSIHLTVLVPPSKPTISVPSSVTI
 35638 98 NVTRSDA GK YRC E V S A P S E Q Q N L E E D T V T L E V L V A P A V P S C E V P S S A L S

jam 145 GNRAVLTCSEHDGSPSEYSWFKDGISMLTADAKKTRAFMNSSFTIDPKS
 35638 148 GTVVELRCQDKEGNPAPEYTWFXDGI RLL·ENPRLGSO STNSSYTMNTKT

jam 195 GDLIFDPVTAFDISGEYCOAQNGYGTAMRSEAAHMDAVELVNGGIVAAVL
 35638 197 GTLQFNHTVSKLDTGEYSCEARNSVG·YRRC PGKRMOVDDL NISGI IAAVV

jam 245 VTLILLGLLIFGVWFAYSRGYFETTKXGTAPGKXVIYSQPS TRSEGEFKQ
 35638 246 VVALVISVCGLV CYAORKGYF...SKETSFOKSNSSSKATTWSENVQWL

jam 295 TSSFLV
 35638 293 TPVLPALWAAAAGGSRGQEF

FIG. 5

Seq.-ID Nr.6 A33_hum 1 M V G K M W P V L W T . L C A V R V T V D A I S V E T P Q D V L R A S O G K S V T L P C T
 Seq.-ID Nr.10 jam 1 M G T E G K A G R K L L F L F T S M I L G S L V O G K G S V Y T A Q S D V O V P E N E S I K L T C T

A33_hum 45 Y H T S T S S R E G L I O W D K L L L T H T E R Y V I W P F S H K N Y I H G E L Y K N R V S I S N N
 jam 51 Y S G F S S P R . . . V E W . K F V O G S T T A L V C . . Y N S Q . . I T A P . Y A D R V T F S S .

A33_hum 95 A E O S D A S I T I D O L T M A O N G T Y E C S V S L H S D L E G N T K S R V R L V L V P P S K P
 jam 91 S G I T F S S V T R K O N G E Y T C M V S E E G G . Q N Y G E V S I H L T T V L V P P S K P

A33_hum 145 E C G I E G E T I I G N N I O L T C O S X E G S P T P O Y S W X R Y N I L N O E O P L A O P A S G Q
 jam 135 T I S V P S S V T I G N R A V L T C S E H D G S P S E Y S W F K D G I S M L T A D A K K T R A F M

A33_hum 195 P V S L K N I S T D T S G Y I C T S S N E E G T O F C N I T V A V R S P S M N . . . V A L
 jam 185 N S S F T I D P K S G D L I F D P V T A F D S G E Y Y C O A O N G Y G T A M R S E A A H M D A V E L

A33_hum 238 Y V . G I A V G V V A A L I I G I I I Y C . . . C C C R G K D O N T E D K E D A R P N R E A Y E E
 jam 235 N V G G I V A A V L V T L I L L G L L I F G V W F A Y S R G Y F E . I T K K G T A P G K K V I Y S Q

A33_hum 284 P P E O L R E L S R E R E E E O D Y R O E E O R S T G R E S P O H L O Q
 jam 284 P S T R S E G E F K O T S S F L Y

FIG. 6

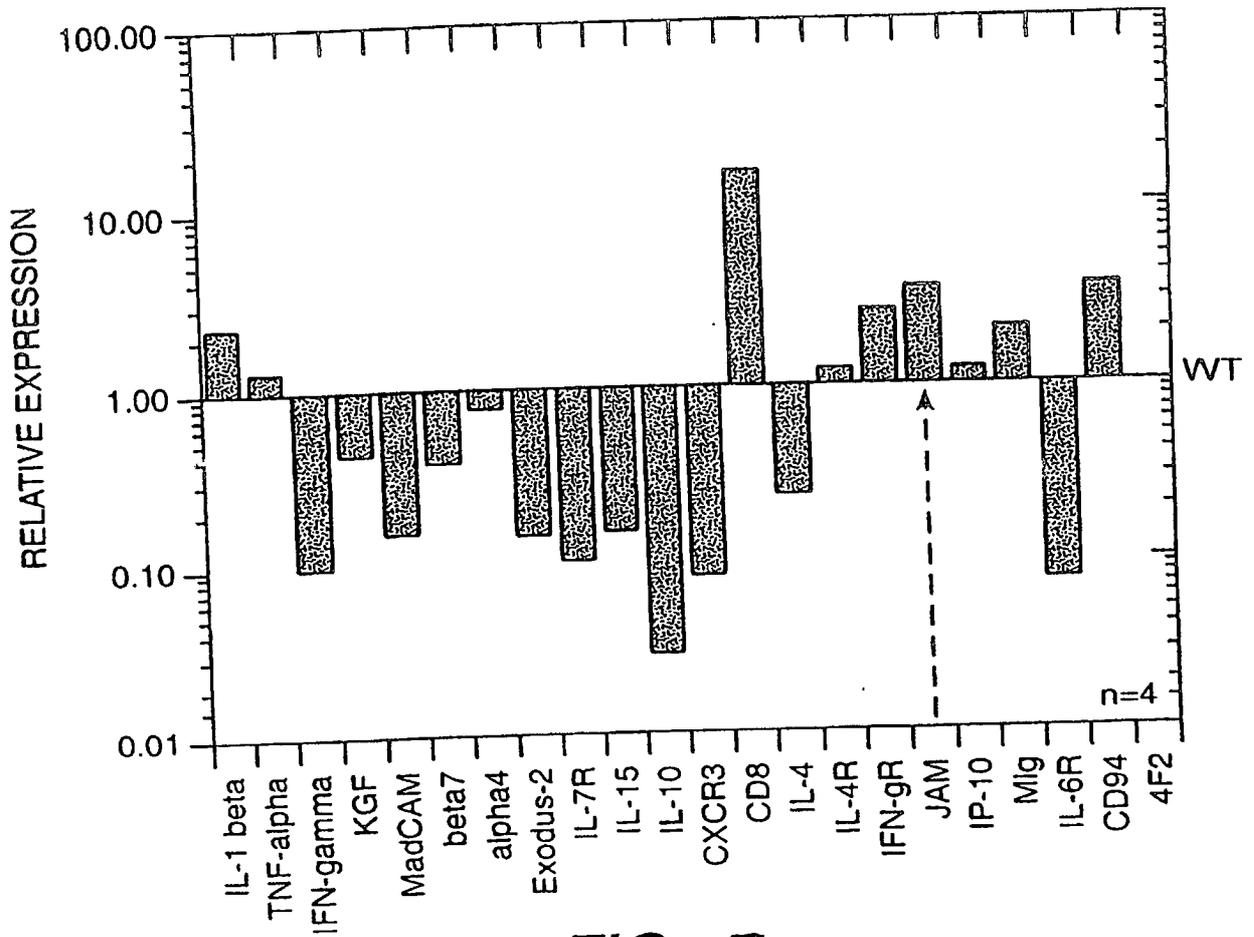


FIG. 7