



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 697 31 834 T2** 2005.12.15

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 917 571 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **697 31 834.6**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US97/06853**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **97 918 802.6**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 97/043412**

(86) PCT-Anmeldetag: **22.04.1997**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **20.11.1997**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **26.05.1999**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **01.12.2004**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **15.12.2005**

(51) Int Cl.⁷: **C12N 15/12**
C12N 1/21, C07K 14/47, C12P 21/00,
A61K 38/17

(30) Unionspriorität:

17505 P	10.05.1996	US
757541	27.11.1996	US

(73) Patentinhaber:

Amgen Inc., Thousand Oaks, Calif., US

(74) Vertreter:

BOEHMERT & BOEHMERT, 80336 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

STARK, Lee, Kevin, Newbury Park, US; LUETHY,
Roland, Newbury Park, US

(54) Bezeichnung: **AGOUTI VERWANDTES GEN**

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

Hintergrund

Gebiet der Erfindung

[0001] Diese Erfindung bezieht sich auf neue menschliche Gensequenzen und Proteine, welche durch diese Gensequenzen kodiert werden. Insbesondere betrifft die Erfindung ein neues Gen, das als „ART“ bezeichnet wird, welches in ausgewählten Geweben exprimiert wird und die Nahrungsaufnahme erhöht.

Beschreibung des verwandten Standes der Technik

1. Agouti Gen

[0002] Das Agouti Gen ist in den meisten Säugetieren vorhanden, obwohl seine Funktion in Säugetieren, mit Ausnahme von Nagetieren, unklar ist. Das Agouti Genprodukt reguliert die jeweilige Herstellung von schwarzen oder gelben Pigmenten im Haar von vielen Tieren, einschließlich Mäusen, Eichhörnchen und Wölfen (A. G Searle, *Comparative Genetics of Coat Color in Mammals*, Academic Press, New York, N.Y. [1968]).

[0003] Das Maus-Agouti Gen wurde kloniert und sequenziert (Bultman et al., *Cell*, 71: 1195–1204 [1992]), und es kodiert für ein 131 Aminosäuren Protein, das abgesondert wird. Das Agouti Protein scheint als ein Antagonist zu dem Melanocortin-1-Rezeptor („MC1r“) zu fungieren, welcher auf Melanozyten exprimiert wird (siehe auch Takeuchi, *J. Invest. Dermatol.*, 92: 239S–242S [1989]; Jackson, *Nature*, 362: 587–588 [1993]). MC1r, veranlaßt Melanozyten schwarzes Pigment zu synthetisieren, wenn er durch Melanozyten stimulierendes Hormon (α -MSH) besetzt ist, (siehe auch Jackson, *supra*) und folglich hat es den Anschein, dass Agouti die Aktivität von α -MSH blockiert, dadurch wird Haar mit gelben Pigmenten gebildet (Lu et al., *Nature*, 371: 799–802 [1994]).

[0004] Auf die gleiche Weise haben Willard et al (*Biochemistry*, 34: 12341–12346 [1995]) gezeigt, dass teilweise gereinigtes Maus-Agouti Protein als ein potenter Antagonist von dem α -MSH an dem MC1-Rezeptor in B16F10 Maus Melanomzellkulturen agiert. Eine proteolytische Spaltung des Agouti Proteins bei der Aminosäure 83 erweist ein C-terminales Fragment, welches in seiner Aktivität vergleichbar ist zu Agouti Protein in voller Länge, was darauf hindeutet, dass die aktive Domäne des Agouti Proteins innerhalb seines C-Terminus liegt (Willard et al., *supra*). Dieses C-terminale Fragment hat 10 Cysteine (das vollständige Molekül hat 11 Cysteine).

[0005] Im Menschen wird das Agouti Gen in der Haut, im Herz, in den Hoden, im Eierstock und im Fettgewebe exprimiert. Diese unterschiedliche Gewebe-Expression deutet darauf hin, dass Agouti in anderen physiologischen Prozessen als der Pigmentherstellung involviert sein kann (Wilson et al., *Human Mol. Gen.*, 4: 233–230 [1995]); Kwon et al., *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 91: 9760–9764 [1994]).

[0006] Verschiedene dominante Phänotypen, welche auf eine Agouti-Überexpression in transgenen Mäusen zurückzuführen sind, wurden identifiziert. Diese umfassen zum Beispiel Fettsucht, Hyperinsulinemie, Diabetes und eine erhöhte Tumoranfälligkeit (siehe auch Manne et al., *Proc. Acad. Sci USA*, 92: 4721–4724 [1995]). Das Ausmaß und die Dauer der Entstehung der Obesität und der Hyperinsulinemie scheinen in Bezug zu der Agouti Gen-Expression zu stehen (Manne et al., *supra*). Ferner scheinen diese Phänotypen nicht zu der exzessiven Herstellung des gelben Pigments zu stehen, da Mäuse, welche einen inaktiven MC1-Rezeptor haben, den gleichen Phänotyp zeigen.

[0007] Mutante Mäuse, welche das Agouti Genprodukt überexprimieren, haben erhöhte Mengen an intrazellulärem Kalzium in der quergestreiften Muskulatur (Zemel et al., *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 92: 4728–4732 [1995]). Obwohl der Mechanismus, durch welchen Agouti diesen Effekt bewirkt, nicht bekannt ist, scheint es nicht aus der Freisetzung von intrazellulären Speichern von Kalzium oder aus der erniedrigten Ausflussrate an Kalzium zu resultieren. Da die quergestreifte Muskulatur wichtig bei der Aufnahme von Insulin ist, und dieser Prozeß zumindest teilweise durch die Mengen an Kalzium reguliert wird, kann dieses erhöhte intrazelluläre Kalzium die Hyperinsulinemie, welche in den Agouti-mutanten Mäusen beobachtet wird, begründen.

[0008] Interessanterweise hat das Maus-Agouti einige Aminosäuresequenz Homologien mit verschiedenen Spinnen- und Schneckentoxinen gemeinsam, die auf spezifische Neurotransmitter-Rezeptoren oder Innenkanäle abzielen (Manne et al., *supra*; Ichida et al., *Neurochem. Res.* 18: 1137–1144 [1993]). Figueiredo et al.,

Toxicon, 33: 83–93 [1995]). Diese Homologie ist in erster Linie auf den C-Terminus von dem Agouti Protein beschränkt, wobei die Toxine und Agouti 8 Cysteinreste gemeinsam haben. In den Toxinen bilden die Cysteinreste 4 Disulfidbrücken, welche kritisch für die Toxin-Aktivität sind. Strukturelle Aktivitätsbeziehungen, welche eine dreidimensionale NMR verwenden, sagen voraus, dass die Disulfidbrücken für die Bildung der tertiären Strukturen notwendig sind, welche erforderlich sind, um die Kalzium-Kanäle zu blockieren (Kim et al., J. Mol. Biol., 250: 659–671 [1995]).

[0009] Angesichts der Aminosäuresequenzhomologie von Agouti mit den Spinnen- und Schneekentoxinen und den Ergebnissen, welche von den mutanten Mäusen, die Agouti überexprimieren, erhalten wurden, wurde vorgeschlagen, dass Agouti ein Mitglied einer neuen Klasse von Molekülen sein könnte, welche die Aktivität von Melanocortinrezeptoren oder verschiedene Arten von Kalzium-Kanal-Proteinen reguliert (Manne et al., supra).

2. Melanocortinrezeptoren

[0010] In Menschen sind zur Zeit 5 Melanocortinrezeptoren bekannt, und sie sind bekannt als MC1r–MC5r. Zwei von diesen, MC1r und MC2r, zeigen jeweils relative Spezifität für die Liganden α -MSH und ACTH. MC1r und MC2r werden jeweils in Melanozyten und Nebennieren exprimiert (Mountjoy et al., Science, 257: 1248–1251 [1992]). MC3r wird in bestimmten Gehirnregionen exprimiert, während MC4r weitestgehend überall im Gehirn exprimiert wird und MC5r in zahlreichen peripheren Geweben exprimiert wird (Roselli-Reyffuss et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 8856–8860 [1993]; Mountjoy et al., Science, supra; Labbe et al., Biochemistry, 33: 4543–4549 [1994]). Die Liganden und die biologischen Funktionen von MC3r, MC4r und MC5r sind zur Zeit unbekannt.

[0011] Kürzlich wurde durch die Beobachtung, dass die Injektion von Melanin konzentrierendes Hormon (MCH) in das Gehirn von Ratten eine Fütterungsantwort stimuliert (Qu et al., Nature, 380: 243–247 [1996]), eine Rolle für den Melanocortinrezeptor in der zentralen Kontrolle der Fettsucht vorgeschlagen. Obwohl MCH keine Aminosäuresequenzhomologie mit Agouti aufweist, erkennen Antikörper gegen MCH auch Epitope auf Agouti, und MCH zeigt auch antagonistische Aktivität an dem MC1-Rezeptor.

[0012] Im Hinblick auf die Vielzahl von physiologischen Funktionsstörungen und Erkrankungen (Fettsucht, Insulinämie, Diabetes), mit denen Agouti und MCH in Zusammenhang gebracht worden sind, und im Hinblick auf die Tatsache, dass Agouti und MCH MC-Rezeptoren antagonisieren, besteht auf diesem Gebiet ein Bedarf, verwandte Gene und Proteine zu identifizieren und analysieren, die möglicherweise in denselben Erkrankungen involviert sind.

[0013] Folglich ist es eine Aufgabe, eine Verbindung bereitzustellen, die, entweder direkt oder indirekt, die Melanocortinrezeptorsignalübermittlung, die intrazellulären Kalziummengen und/oder die Körperfettzusammensetzung (wie z. B. Fettgewebemengen und/oder Verteilung, zirkulierende Glucosemengen und/oder Insulinmengen).

[0014] Es ist eine weitere Aufgabe, eine Verbindung bereitzustellen, welche die Nahrungsaufnahme erhöhen kann.

[0015] Diese und weitere Aufgaben werden dem Durchschnittsfachmann leicht ersichtlich.

Zusammenfassung der Erfindung

[0016] Im einer Ausführungsform stellt die Erfindung ein Nukleinsäuremolekül zur Verfügung, welches für ein Polypeptid kodiert, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus:

- (a) dem Nukleinsäuremolekül der SEQ ID NO: 4;
- (b) dem Nukleinsäuremolekül der SEQ ID NO: 5;
- (c) dem Nukleinsäuremolekül der SEQ ID NO: 6;
- (d) dem Nukleinsäuremolekül der SEQ ID NO: 9;
- (e) einem Nukleinsäuremolekül, das für das Polypeptid der SEQ ID NO: 7 kodiert;
- (f) einem Nukleinsäuremolekül, das für das Polypeptid der SEQ ID NO: 8 kodiert;
- (g) einem Nukleinsäuremolekül, das für das Polypeptid der SEQ ID NO: 10 kodiert;
- (h) einem Nukleinsäuremolekül, das für das Polypeptid der SEQ ID NO: 11 kodiert;
- (i) einem Nukleinsäuremolekül, das für ein Polypeptid kodiert, das zu mindestens 70% identisch ist zu dem Polypeptid der SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10 oder SEQ ID NO: 11, wobei das Polypeptid

die biologische Aktivität der Erhöhung der Nahrungsaufnahme in einem Säuger aufweist und
(j) einem Nukleinsäuremolekül, dass das Komplement zu einem von (a)–(i) oben ist.

[0017] In einer weiteren Ausführungsform stellt die Erfindung einen Vektor zur Verfügung, welcher einen Nukleinsäuremolekül umfaßt, ausgewählt aus der oben dargelegten Gruppe und einer Wirtszelle, welche den Vektor umfaßt.

[0018] In einer noch weiteren Ausführungsform stellt die Erfindung eine Verfahren zur Herstellung eines Agouti-verwandten (ART) Polypeptids zur Verfügung, welches die Schritte umfaßt:

- (a) Exprimieren eines Polypeptids, das durch die Nukleinsäure, ausgewählt aus der oben dargelegten Gruppe, kodiert wird, wobei die Nukleinsäure in einem geeigneten Wirt eingebracht wurde; und
- (b) Isolieren des Polypeptids.

[0019] Die Erfindung stellt weiter ein Agouti-verwandtes (ART) Polypeptid zur Verfügung, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus:

- (a) dem Polypeptid der SEQ ID NO: 7;
- (b) dem Polypeptid der SEQ ID NO: 8;
- (c) dem Polypeptid der SEQ ID NO: 10;
- (d) dem Polypeptid der SEQ ID NO: 11; und
- (e) einem biologisch aktiven Fragment des Polypeptids nach (a), (b), (c) oder (d), wobei das Fragment die biologische Aktivität der Erhöhung der Nahrungsaufnahme in einem Säuger aufweist, und
- (f) einem Polypeptid, das zu mindestens 70% identisch ist zu dem Agouti-verwandten (ART) Polypeptid gemäß einem von (a) bis (d), das Polypeptid die biologische Aktivität der Erhöhung der Nahrungsaufnahme in einem Säuger aufweist, wobei das Agouti-verwandte (ART) Polypeptid ein Amino-terminales Methionin aufweisen kann oder nicht aufweisen kann.

[0020] Auch ist ein Verfahren zur Erhöhung der Nahrungsaufnahme in einem Säuger offenbart, welche die Verabreichung eines Agouti-verwandten (ART) Polypeptids an den Säuger umfaßt.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0021] [Fig. 1A](#) und B zeigen die genomische DNA-Sequenz des humanen ART (SEQ ID NO: 4).

[0022] [Fig. 2](#) zeigt die ART cDNA aus humanem Gehirngewebe (SEQ ID NO: 5).

[0023] [Fig. 3](#) zeigt die ART cDNA aus humanem Peripheriegewebe (SEQ ID NO: 6).

[0024] [Fig. 4](#) zeigt die vollständig übersetzte Aminosäuresequenz der humanen ART cDNA (SEQ ID NO: 7).

[0025] [Fig. 5](#) stellt ein gestutztes, humanes ART Polypeptid dar (SEQ ID NO: 8).

[0026] [Fig. 6](#) stellt einen Northern Blot verschiedener humaner Gewebe wie angegeben dar. Der Blot wurde mit einer ART cDNA, wie in den Beispielen beschrieben wurde, beladen.

[0027] [Fig. 7](#) zeigt genomische Maus-DANN, beginnend mit dem Exon 2 (dem ersten kodierenden Exon) und auch umfassend die Exons 3 und 4, wie auch die korrespondierenden Introns (SEQ ID NO: 9).

[0028] [Fig. 8](#) zeigt die vollständig translatierte Aminosäuresequenz der Maus ART cDNA (SEQ ID NO: 10).

[0029] [Fig. 9](#) zeigt die Aminosäuresequenz von einem humanem ART Genpolymorphismus. Wie ersichtlich ist, ist in dieser polymorphen Sequenz die Aminosäure an Position 45 (Leu in [Fig. 4](#)) ein Prolin (SEQ ID NO: 11).

[0030] [Fig. 10](#) stellt einen Graphen des Musters des Fütterungsverhaltens von Ratten dar, welchen humanes ART Polypeptid injiziert wurde. Die X-Achse stellt die Zeit nach der Injektion von ART dar, nach welcher Nahrungsaufnahme gemessen wurde; die Y-Achse stellt die allmählich zunehmende Menge an verbrauchter Nahrung in Gramm dar. Ratten wurde entweder PBS allein (Kontrolle), "ungefaltetes" ART (Kontrolle), 0.075, 0.3, 3.0, oder 7.5 nmol des gefalteten ART in annähernd 2 µl Volumen injiziert. Die Standardfehlerbalken sind angezeigt. Die statistische Analyse der Daten ist, wo angebracht, wie folgt angezeigt: * = ps < 0,006–0,0001 vs PBS, und # = ps < 0,01–0,0001 vs ungefaltetes ART.

Genaue Beschreibung der Erfindung

[0031] Wie hierin verwendet, bezieht sich der Begriff "ART", wenn er verwendet wird um ein Nukleinsäuremolekül zu beschreiben, auf ein Nukleinsäuremolekül oder Fragment davon, dass (a) die Nukleotidsequenz aufweist, wie in SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, oder SEQ ID NO: 6 dargelegt; (b) eine Nukleinsäuresequenz aufweist, welche für ein Polypeptid kodiert, das zu mindestens 70 identisch, bevorzugt zu mindestens 80% identisch, und noch bevorzugter zu mindestens 90% identisch zu dem Polypeptid ist, welches durch eine der Sequenzen SEQ ID NOS:4,5, oder 6 kodiert wird;

(c) eine natürlich vorkommende allelische Variante von (a) oder (b) ist;

(d) eine Nukleinsäurevariante von (a) bis (c) ist, hergestellt wie hierin vorgesehen;

(e) und/oder komplementär zu (a) bis (d) ist.

[0032] Die Sequenzidentitäten in Prozent können durch Standardmethoden bestimmt wurden, welche üblicherweise verwendet werden, um die Ähnlichkeiten in Positionen von Aminosäuren von zwei Polypeptiden zu vergleichen. Durch die Verwendung eines Computerprogramms, wie zum Beispiel BLAST oder FASTA, können zwei Polypeptide für einen optimalen Abgleich ihrer entsprechenden Aminosäuren ausgerichtet werden (entweder entlang der gesamten Länge von einer oder beiden Sequenzen, oder entlang eines vorbestimmten Anteils von einer oder beiden Sequenzen). Die Programme stellen einen vorgegebenen Wert („default“) bezüglich des „opening penalty“ („default opening penalty“) und ein „default gap penalty“ zur Verfügung, und eine „scoring matrix“, wie zum Beispiel PAM 250 (eine standard scoring matrix; siehe auch Dayhoff et al., in: Atlas of Protein Sequence and Structure, vol. 5, supp. 3 [1978]), kann in Verbindung mit dem Computerprogramm verwendet werden. Die Identität in Prozent kann dann wie folgt berechnet werden:

Gesamtanzahl identischer Übereinstimmung

X 100

[Länge der längeren Sequenz innerhalb des übereinstimmenden Bereichs] + [Anzahl an Lücken, welche in die längere Sequenz eingefügt wurden, um die beiden Sequenzen abzugleichen].

[0033] Polypeptide, die zu mindestens 70% identisch sind, weisen typischerweise eine oder mehrere Aminosäure-Substitutionen, Deletionen, oder Insertionen auf. Üblicherweise werden die Substitutionen konservativ sein, um einen geringen oder keinen Effekt auf die Gesamtladung, Polarität oder Hydrophobizität des Proteins zu haben. Konservative Substitutionen werden in Tabelle 1 unten dargestellt.

Tabelle I
Konservative Aminosäure Substitutionen

Basisch:	Arginin Lysin Histidin
Sauer:	Glutaminsäure Asparaginsäure
Polar:	Glutamin Asparagin
Hydrophob:	Leucin Isoleucin Valin
Aromatisch:	Phenylalanin Tryptophan Tyrosin
Klein:	Glycin Alanin Serin Threonin Methionin

[0034] Der Begriff "stringente Bedingungen" bezieht sich auf die Hybridisierung und das Waschen unter Bedingungen, die lediglich die Bindung von einem Nukleinsäuremolekül, wie zum Beispiel einer Oligonukleotid- oder einer cDNA-Molekül-Probe, hoher homologer Sequenz erlaubt. Eine stringente Waschlösung besteht aus 0.015 M NaCl, 0.005 M NaCitrat, und 0,1% SDS, verwendet bei einer Temperatur von 55°C–65°C. Eine weitere stringente Waschlösung besteht aus 0,2 × SSC und 0,1% SDS, verwendet bei einer Temperatur zwischen 50°C bis 65°C. Wenn Oligonukleotid-Sonden zum Screenen von cDNA oder genomischer Banken verwendet werden, können die folgenden stringenten Waschbedingungen verwendet werden. Ein Protokoll verwendet 6 × SSC mit 0,05% Natriumpyrophosphat bei einer Temperatur von 35°C bis 62°C, in Abhängigkeit von der Länge der Oligonukleotidprobe. Zum Beispiel werden Proben von 14 Basenpaaren bei 35 bis 40°C gewaschen, Proben von 17 Basenpaaren werden bei 45 bis 50°C gewaschen, Proben von 20 Basenpaaren werden bei 52 bis 57°C gewaschen und Proben von 23 Basenpaaren werden bei 57°C bis 63°C gewaschen. Die Temperatur kann um 2 bis 3°C erhöht werden, wenn der Hintergrund nicht-spezifischer Bindungen hoch erscheint. Ein zweites Protokoll verwendet für das Waschen der Oligonukleotidproben Tetramethylammoniumchlorid (TMAC). Eine stringente Waschlösung besteht aus 3 M TMAC, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, und 0,2% SDS. Bei der Verwendung dieser Lösung ist die Waschttemperatur eine Funktion von der Länge der Probe. Zum Beispiel wird eine Probe von 17 Basenpaaren bei circa 45°C bis 50°C gewaschen.

[0035] Wie hierin verwendet, bezieht sich der Begriff "ART Protein" oder "ART Polypeptid" auf jedes Protein oder Polypeptid, welches die Eigenschaften hat, die hierin für ART beschrieben wurden. Das ART Polypeptid kann oder kann nicht Amino-terminal Methionin aufweisen, in Abhängigkeit von der Art und Weise, in welcher es hergestellt wird. Beispielsweise umfasst das ART Protein oder ART Polypeptid eine Aminosäuresequenz, welche durch ein Nukleinsäuremolekül, wie in einem der Punkte (a)–(e) oben beschrieben kodiert wird, und Peptide oder Polypeptidfragmente, die hieraus abgeleitet sind, bis Aminosäuresequenzen, die in SEQ ID NOs: 7 oder 8 dargelegt, und/oder chemisch modifizierte Derivate, als auch Nukleinsäuren und/oder Varianten der

Aminosäuresequenz, wie hierin zur Verfügung gestellt.

[0036] Wie hierin verwendet, bezieht sich der Begriff "ART Fragment" auf ein Peptid oder ein Polypeptid, das kleiner ist als die vollständige Aminosäuresequenz von natürlich vorkommendem ART Protein, aber im Wesentlichen die gleiche biologische Aktivität wie die oben beschriebenen ART Polypeptide oder ART Protein aufweist. Solch ein Fragment kann an dem Aminoterminal gekürzt sein, dem Carboxyterminal, und/oder intern, und kann chemisch modifiziert sein. Bevorzugt wird das ART Fragment ein Carboxy-terminales Fragment sein, welches zumindest alle 10 C-terminalen Cysteinreste beibehält. Solche ART Fragmente können mit oder ohne einem Amino-terminalen Methionin hergestellt werden. Ein bevorzugtes ART Fragment ist in SEQ ID NO: 8 dargelegt.

[0037] Wie hierin verwendet, bezieht sich der Begriff "ART Derivat" oder "ART Variante" auf ein ART Polypeptid oder ART Protein, das 1) chemisch modifiziert wurde, wie zum Beispiel durch Addition von Polyethylenglycol oder anderen Verbindungen und/oder 2) eine oder mehrere Nukleinsäure oder Aminosäuresequenz -Substitutionen, -Deletionen und/oder -Insertionen enthält.

[0038] Wie hierin verwendet, bezieht sich der Begriff "biologisch aktives Polypeptid" und "biologisch aktives Fragment" auf ein Peptid oder Polypeptid, das ART Aktivität aufweist (das heißt, es ist in der Lage, die Signalisierungsaktivität eines Melanocortin-Rezeptors zu modulieren, es ist geeignet, die intrazellulären Kalziummengen zu modulieren, und/oder es ist geeignet, den Lipidstoffwechsel zu modulieren).

[0039] Wie hierin verwendet, bezieht sich der Begriff "wirksame Menge" und "therapeutisch wirksame Menge" auf die Menge von ART, welche notwendig ist, um eine oder mehrere der oben dargelegten biologischer Aktivitäten von ART zu erhalten.

[0040] Die ART Polypeptide, welche in der Ausübung der vorliegenden Erfindung Verwendung finden, können natürlich vorkommende vollständige Polypeptide, oder verkürzte Polypeptide oder Peptide (das heißt, "Fragmente") sein. Die Polypeptide oder Fragmente können chemisch modifiziert sein, d. h., glycosiliert, phosphoryliert und/oder an ein Polymer gebunden werden, wie unten beschrieben wird, und sie können aminoterminal ein Methionin aufweisen, in Abhängigkeit davon, wie sie hergestellt werden. Darüber hinaus können die Polypeptide oder Fragmente Varianten von den natürlich vorkommenden ART Polypeptiden sein (das heißt, sie können eine oder mehrere Aminosäure -Deletionen, Insertionen und/oder Substitutionen im Vergleich zu natürlich vorkommenden ART enthalten).

[0041] Das ART Polypeptid in gesamter Länge, oder ein Fragment davon, kann hergestellt werden, indem gut bekannte rekombinante DNA-Technologiemethoden verwendet werden, wie zum Beispiel jene, die in Sambrook et al. dargestellt sind (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. [1989]) und/oder Ausubel et al., Hrsg., (Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishers Inc. and Wiley and Sons, NY [1994]). Ein Gen oder cDNA, welche das ART Protein oder ein Fragment davon kodieren, können durch zum Beispiel dem Screenen einer genomischen oder cDNA-Bibliothek, oder durch PCR-Amplifikation erhalten werden. Wahlweise kann ein Gen, welches das ART Polypeptid oder Fragment kodiert, durch chemische Synthese hergestellt werden, indem dem Fachmann gut bekannte Methoden verwendet werden, wie zum Beispiel jenen durch Engels et al. beschriebenen (Angew. Chem. Intl. Ed., 28: 716-734 [1989]). Diese Methoden umfassen unter anderem die Phosphotriester, Phosphoramidit, und H-Phosphonat-Methoden für die Nukleinsäuresynthese. Eine bevorzugte Methode für solche chemischen Synthesen ist die Polymer-unterstützte Synthese, welche Standardphosphoramiditchemie verwendet. Typischerweise wird die DNA, welche die ART Polypeptide kodiert, einige 100 Nukleotide lang sein. Nukleinsäuren, welche länger als ungefähr 100 Nukleotide sein werden, können in mehreren Fragmenten synthetisiert werden, indem diese Methoden verwendet werden. Die Fragmente können dann aneinander ligiert werden, um das vollständige ART-Polypeptid zu bilden. Normalerweise werden DNA-Fragmente, welche den Aminoterminal des Polypeptids kodieren, ein ATG haben, welcher für ein Methioninrest kodiert. Dieses Methionin kann oder kann nicht in der reifen Form von dem ART Polypeptid vorliegen, in Abhängigkeit davon, ob das in der Wirtszelle hergestellte Polypeptid sekretiert wird.

[0042] In einigen Fällen kann es wünschenswert sein, Nukleinsäure und/oder Aminosäure-Varianten von natürlich vorkommendem ART herzustellen. Nukleinsäurevarianten (in denen eines oder mehrere Nukleotide vorgesehen sind, um sich von dem Wildtyp oder natürlich vorkommenden ART zu unterscheiden) können hergestellt werden, indem eine zielgerichtete Mutagenese („site directed mutagenesis“) oder PCR-Amplifikation, in welcher der/die Primer die gewünschten Punktmutationen haben, verwendet werden (siehe Sambrook et al., supra, und Ausubel et al., supra, für die Beschreibung von Mutagenesetechniken). Die chemische Synthese

durch die Anwendung der durch Engels et al., supra, beschriebenen Methoden kann auch verwendet werden, um solche Varianten herzustellen. Andere dem Fachmann bekannte Methoden können ebenso verwendet werden. Bevorzugte Nukleinsäurevarianten sind jene, die Nukleotidsubstitutionen enthalten, die der Bevorzugung der Codonpräferenz in der Wirtszelle Rechnung tragen, die verwendet wird, um ART herzustellen. Andere bevorzugte Varianten sind jene, welche für einen konservativen Aminosäureaustausch kodieren (zum Beispiel, worin die Ladung oder die Polarität der natürlich vorkommenden Aminosäureseitenkette im Wesentlichen nicht durch die Substitution mit einer anderen Aminosäure geändert wird), im Vergleich zum Wildtyp, und/oder jene, die bestimmt sind, entweder eine neue Glykosilierungs- und/oder Phosphorylierungsstelle(n) in ART zu generieren, oder denjenigen, die dafür bestimmt sind, eine bestehende Glykosilierungs- und/oder Phosphorylierungsstelle(n) in ART zu entfernen.

[0043] Das ART Gen oder die cDNA kann in einen geeigneten Expressionsvektor für die Expression in einer Wirtszelle eingefügt werden. Der Vektor wird so ausgewählt, daß er in der entsprechenden Wirtszelle funktionsstüchtig ist (das heißt, der Vektor ist mit der Wirtszellmaschinerie kompatibel, so daß eine Amplifikation von dem ART Gen und/oder Expression von dem Gen beobachtet werden kann). Das ART Polypeptid, oder ein Fragment davon, kann in prokaryotischen Wirtszellen, Hefe, Insekten (Baculovirussysteme) und/oder eukaryontischen Wirtszellen amplifiziert/exprimiert werden. Die Auswahl der Wirtszelle wird zumindest teilweise davon abhängen, ob das ART Polypeptid, oder ein Fragment davon, glykosiliert werden soll. Wenn ja, sind Hefe-, Insekten- oder Säugetierwirtszellen bevorzugt; Hefezellen werden das Polypeptid glycosilieren und Insekten und Säugetierzellen können das Polypeptid glycosilieren und/oder phosphorylieren, wie es natürlicherweise an dem ART Polypeptid vorkommt (das heißt, „native“ Glycosilierung und/oder Phosphorylierung).

[0044] Üblicherweise enthalten die in jeder dieser Wirtszellen verwendeten Vektoren 5' flankierende Sequenzen (auch als „Promotor“ bezeichnet) und andere regulatorische Elemente, wie auch zum Beispiel einen oder mehrere Enhancer, ein Replikationsstartelement („origin of replication“), ein Transkriptionsbeendigungselement („transcriptional termination element“), eine vollständige Intronsequenz, welche eine Donor- und Akzeptorspleisstelle enthält, eine Signalpeptidsequenz, ein Element für eine Ribosomenbindungsstelle, eine Polyadenylierungssequenz, eine Polylinkerregion, um die Nukleinsäure, welche das zu exprimierende Polypeptid kodiert, einzufügen, und ein auszuwählendes Markerelement. Jedes dieser Elemente wird unten diskutiert. Wahlweise kann der Vektor eine „tag“-Sequenz enthalten, das heißt, eine Oligonukleotidsequenz, welche in dem 5'- oder 3'-Ende von der ART kodierenden Sequenz lokalisiert ist und welche polyHis (wie z. B. hexaHis) oder andere kleine immunogene Sequenzen kodiert. Diese Kennzeichnung („tag“) wird mit dem Protein zusammen exprimiert und kann als eine Affinitätskennzeichnung für die Reinigung von dem ART Polypeptid aus der Wirtszelle dienen. Wahlweise kann die Kennzeichnung anschließend von dem gereinigten ART Polypeptid durch verschiedene Mittel entfernt werden, wie zum Beispiel durch die Verwendung einer ausgewählten Peptidase.

[0045] Die 5' flankierenden Sequenzen können homolog (das heißt, aus derselben Spezies und/oder Stamm wie die Wirtszelle), heterolog (das heißt, aus einer anderen Spezies als die Wirtszellspezies oder Stamm), hybrid (das heißt, eine Kombination von 5' flankierenden Sequenzen aus mehreren als einer Quelle), synthetisch sein, oder sie kann die native ART 5' flankierende Sequenz sein. Als solche kann die Herkunft der 5' flankierenden Sequenz jeder einzellige prokaryontische oder eukaryontische Organismus, jeder vertebrate oder invertebrate Organismus, oder jede Pflanze sein, vorausgesetzt, dass die 5' flankierende Sequenz darin funktionsstüchtig ist und durch die Wirtszellmaschinerie aktiviert werden kann.

[0046] Die 5' flankierenden Sequenzen, welche in den Vektoren der Erfindung verwendbar sind, können durch jede der vielen in der Fachwelt bekannten Methoden erhalten werden. Üblicherweise sind die hierin verwendbaren 5' flankierenden Sequenzen andere als die ART 5' flankierenden Sequenzen welche vorher durch Mapping und/oder Restriktionsendonuklease-Verdau identifiziert worden sind, und können somit aus einer geeigneten Gewebe-Quelle isoliert werden, indem die entsprechenden Restriktionsendonukleasen verwendet werden. In einigen Fällen kann die volle Nukleotidsequenz der 5' flankierenden Sequenz bekannt sein. Hierbei können die 5' flankierenden Sequenzen hergestellt werden, indem die oben beschriebenen Methoden für die Nukleinsäuresynthese oder Klonierung verwendet werden.

[0047] Wo alles oder nur ein Teil von der 5' flankierenden Sequenz bekannt ist, kann sie durch Verwendung von PCR-Methoden erhalten werden, und/oder durch das Screening einer genomischen Bibliothek mit einem geeigneten Oligonukleotid, und/oder 5' flankierenden Sequenzfragmenten aus einer gleichen oder einer anderen Spezies.

[0048] Wo die 5' flankierende Sequenz nicht bekannt ist, kann ein Fragment der DNA, welche eine 5' flankie-

rende Sequenz enthält, aus einem größeren Stück DNA isoliert werden, dass zum Beispiel eine kodierende Sequenz oder sogar ein anderes Gen oder Gene enthalten kann. Die Isolation kann durch Restriktionsendonukleaseverdau bewerkstelligt werden, indem ein oder mehrere sorgfältig ausgewählte Enzyme verwendet werden, um das geeignete DNA-Fragment zu isolieren. Nach dem Verdau kann das gewünschte Fragment durch Agarosegelreinigung, Qiagen®-Säulen oder anderen Methoden, welche dem Fachmann bekannt sind, isoliert werden. Die Auswahl geeigneter Enzyme, um dieses Ziel zu erreichen, ist dem Durchschnittsfachmann bekannt.

[0049] Das Replikationsstartpunktelement ist üblicherweise ein Teil von den kommerziell erwerbbaaren prokaryotischen Expressionsvektoren, und wirkt unterstützend bei der Amplifikation von dem Vektor in der Wirtszelle. Die Amplifikation von dem Vektor in einer bestimmten Kopienanzahl kann in einigen Fällen für die optimale Expression von dem ART Polypeptid wichtig sein. Wenn der Vektor der Wahl keinen Replikationsstartpunkt enthält, kann dieser basierend auf bekannte Sequenzen chemisch synthetisiert werden und in dem Vektor ligiert werden.

[0050] Das Transkriptionsbeendigungselement ist typischerweise an dem 3' Ende von der ART Polypeptid kodierenden Sequenz lokalisiert und dient dazu, die Transkription des ART Polypeptids zu beenden. Üblicherweise ist das Transkriptionsbeendigungselement in prokaryontischen Zellen ein G-C reiches Fragment, gefolgt von einer Poly-T-Sequenz. Während das Element leicht aus Bibliotheken kloniert werden kann oder auch käuflich als Teil eines Vektors erhalten werden kann, kann es auch leicht synthetisiert werden, indem die Methoden für die Nukleinsäuresynthese, wie zum Beispiel jene, die oben beschrieben sind, verwendet werden.

[0051] Ein auswählbares Markergenelement kodiert für ein Protein, welches für das Überleben und Wachstum von der Wirtszelle notwendig ist, die in einem Selektionskulturmedium gewachsen ist. Übliche Selektionsmarkergene kodieren Proteine, die (a) eine Resistenz für Antibiotika oder andere Toxine verleihen, zum Beispiel, Ampicillin, Tetracyclin oder Kanamycin für prokaryontische Wirtszellen, (b) auxotrophe Mängel der Zelle ergänzen; oder (c) entscheidende Nährstoffe liefern, welche aus den zusammengesetzten Medien nicht verfügbar sind. Bevorzugte Selektionsmarker sind das Kanamycin-Resistenzgen, das Ampicillin-Resistenzgen und das Tetracyclin-Resistenzgen.

[0052] Das Ribosombindungelement, gemeinhin die Shine-Dalgarno-Sequenz (Prokaryonten) oder die Kozak-Sequenz (Eukaryonten) genannt, ist für die Initiierung der Translation der mRNA notwendig. Das Element ist typischerweise 3' zu dem Promotor und 5' zu der kodierenden Sequenz vom zu synthetisierenden ART Polypeptid lokalisiert. Die Shine-Dalgarno-Sequenz ist unterschiedlich, aber ist typischerweise ein Polypurin (das heißt, sie hat einen hohen A-G-Anteil). Viele Shine-Dalgarno-Sequenzen sind identifiziert worden, jede hiervon kann leicht synthetisiert werden, indem die oben dargestellten Methoden verwendet werden und in einem prokaryontischen Vektor verwendet werden.

[0053] In den Fällen, wo es wünschenswert ist, dass ART von der Wirtszelle sekretiert wird, kann eine Signalsequenz verwendet werden, um das ART Polypeptid aus der Wirtszelle zu lenken, in welcher es synthetisiert wird. Üblicherweise wird die Signalsequenz in die kodierende Region von der ART Nukleinsäuresequenz positioniert, oder direkt an das 5' Ende von der ART kodierenden Region. Viele Signalsequenzen sind identifiziert worden, und jede von ihnen, welche in der ausgewählten Wirtszelle funktionsfähig ist, kann in Verbindung mit dem ART-Gen verwendet werden. Daher kann die Signalsequenz homolog oder heterolog zu dem ART Polypeptid sein und kann homolog oder heterolog zu dem ART Polypeptid sein. Zusätzlich kann die Signalsequenz chemisch synthetisiert werden, indem die oben dargestellten Methoden verwendet werden. In den meisten Fällen wird die Sekretion von dem Polypeptid aus der Wirtszelle über die Anwendbarkeit von einem Signalpeptid die Entfernung des aminoterminalen Methionins von dem Polypeptid nach sich ziehen.

[0054] In vielen Fällen ist die Transkription von dem ART Polypeptid durch die Anwesenheit von einem oder mehreren Introns in dem Vektor erhöht; dies ist insbesondere für eukaryontische Wirtszellen zutreffend, besonders für Säugetierwirtszellen. Das Intron kann natürlicherweise in der ART-Nukleinsäuresequenz vorkommen, speziell dort, wo die verwendete ART-Sequenz eine vollständige genomische Sequenz oder ein Fragment davon ist. Wo das Intron nicht natürlicherweise in der ART-DNA-Sequenz vorkommt (wie für die meisten cDNAs), können die Intron(s) aus anderen Quellen erhalten werden. Die Lage von dem Intron ist mit Bezug auf die 5' flankierende Sequenz und der ART-kodierenden Sequenz wichtig, da das Intron transkribiert werden muß, um wirksam zu sein. Als solche, wo die ART Nukleinsäuresequenz eine cDNA-Sequenz ist, ist die bevorzugte Lage für das Intron 3' zum Transkriptionsstartpunkt und 5' zu der PolyA Transkriptionsbeendigungssequenz. Bevorzugt wird für die ART cDNAs das Intron auf der einen oder der anderen Seite (das heißt, 5' oder 3') von der ART kodierenden Sequenz lokalisiert sein, so dass es nicht diese kodierende Sequenz unterbricht. Jedes

Intron von jeder Quelle, einschließlich jeden viralen, prokaryotischen und eukaryotischen (Pflanze oder Tier) Organismen, kann in der Ausführung dieser Erfindung verwendet werden, vorausgesetzt, dass es kompatibel mit der/die Wirtszelle(n) ist, in welche es inseriert wird. Hierin auch eingeschlossen sind synthetische Introns. Wahlweise kann mehr als ein Intron in dem Vektor verwendet werden.

[0055] Wo eines oder mehrere von den oben dargestellten Elementen nicht schon in dem zu verwendenden Vektor vorhanden ist, können sie einzeln erhalten werden und in den Vektor ligiert werden. Methoden, welche zum Erlangen von jedem dieser Elemente verwendet werden, sind dem Fachmann wohlbekannt und sind vergleichbar mit den oben dargestellten Methoden (das heißt, Synthese von der DNA, Bibliotheken-Screening und Ähnliches).

[0056] Die endgültigen Vektoren, welche für die Ausführung dieser Erfindung verwendet werden, sind üblicherweise Konstrukte eines Ausgangsvektors, wie zum Beispiel eines käuflich erwerbten Vektors. Solche Vektoren können oder können nicht einige von den Elementen enthalten, die in dem fertigen Vektor eingefügt sein sollen. Wenn keines der erwünschten Elemente in dem Anfangsvektor vorhanden ist, kann jedes Element einzeln in den Vektor ligiert werden, indem der Vektor mit der/den geeigneten Restriktionsendonuklease(n) geschnitten wird, so dass die Enden von dem zu ligierenden Element und die Enden des Vektors kompatibel für die Ligation sind. In einigen Fällen kann es notwendig sein, die Enden, die zusammen ligiert werden sollen, "stumpf" zu machen, um eine zufriedenstellende Ligation zu erhalten. Das Blunting wird vollendet durch ein erstes Auffüllen in "klebrige Enden", indem die Klenow DNA Polymerase oder T4 DNA Polymerase in Gegenwart aller vier Nukleotide verwendet werden. Diese Methode ist auf dem Gebiet wohlbekannt und wird zum Beispiel in Sambrook et al., supra, beschrieben.

[0057] Wahlweise können zwei oder mehr der in den Vektor einzufügenden Elemente zuerst aneinander ligiert werden (wenn sie angrenzend zueinander positioniert werden sollen) und dann in den Vektor ligiert werden.

[0058] Eine andere Methode für die Konstruktion des Vektors ist, alle Ligationen der verschiedenen Elemente gleichzeitig in einem Reaktionsgemisch durchzuführen. Hierbei werden viele nonsense oder nicht funktionsfähige Vektoren aufgrund ungenauer Ligation oder Insertion der Elemente erzeugt, obwohl funktionsfähige Vektoren identifiziert werden können und durch Restriktionsendonukleaseverdau selektiert werden können.

[0059] Bevorzugte Vektoren für die Ausübung dieser Erfindung sind jene, die mit bakteriellen, Insekten- und Säugetierwirtszellen kompatibel sind. Solche Vektoren umfassen unter anderem pCRII (Invitrogen Company, San Diego, CA), pBSII (Stratagene Company, LaJolla, CA) und pETL (BlueBacII; Invitrogen).

[0060] Nachdem der Vektor konstruiert wurde und eine ART-Nukleinsäure in eine geeignete Stelle des Vektors inseriert wurde, kann der fertige Vektor in eine geeignete Wirtszelle zur Amplifikation und/oder ART Polypeptidexpression eingebracht werden.

[0061] Wirtszellen können prokaryontische Wirtszellen (wie zum Beispiel E. coli) oder eukaryontische Wirtszellen (wie zum Beispiel eine Hefezelle, eine Insektenzelle oder eine vertebrale Zelle) sein. Die Wirtszelle kann, wenn sie unter geeigneten Bedingungen kultiviert wird, das ART Protein synthetisieren, welches anschließend aus dem Kulturmedium gesammelt werden kann (wenn die Wirtszelle das Protein ins Medium sekretiert) oder direkt aus der Wirtszelle, welche das Protein herstellt (wenn es nicht sekretiert wird). Nach der Sammlung kann das ART Protein gereinigt werden, indem Methoden, wie zum Beispiel Molekularsiebchromatographie, Affinitätschromatographie und ähnliche, verwendet werden.

[0062] Die Auswahl der Wirtszelle wird teilweise davon abhängen, ob das ART Protein glykosyliert oder phosphoryliert werden soll (wobei in diesem Fall eukaryontische Wirtszellen bevorzugt sind) und der Art und Weise, in welcher die Wirtszelle fähig ist, das Protein in seine native tertiäre Struktur zu „falten“ (zum Beispiel die geeignete Ausrichtung der Disulfidbrücken, etc.), so dass das biologisch aktive Protein durch die Zelle hergestellt wird. Dennoch kann, wo die Wirtszelle nicht biologisch aktives ART synthetisiert, das ART nach der Synthese "gefaltet" werden, indem geeignete chemische Bedingungen, wie unten diskutiert, verwendet werden.

[0063] Geeignete Zellen oder Zelllinien können Säugetierzellen, wie zum Beispiel Chinese Hamster Ovary Cells (CHO) oder 3T3 Zellen sein. Die Auswahl geeigneter Säugetierwirtszellen und Methoden für die Transformation, Kultur, Amplifikation, Screening und Produktherstellung und Reinigung sind auf dem Gebiet bekannt. Andere geeignete Säugetierzelllinien sind Affen COS-1 und COS-7 Zelllinien und die CV-1 Zelllinie. Weitere beispielhafte Säugetierzellen umfassen Primatenzelllinien und Nagerzelllinien, einschließlich transfor-

mierter Zelllinien. Normale diploide Zellen, Zellstämme erhalten aus in vitro Kulturen vom Primärgewebe, als auch primären Explantaten, sind auch geeignet. Kandidatenzellen können genotypisch negativ bezüglich des Selektionsgens sein oder können ein dominant agierendes Selektionsgen enthalten. Andere geeignete Säugerzelllinien umfassen, sind aber nicht hierauf beschränkt, HeLa, Maus L-929 Zellen, 3T3 Linien erhalten von Swiss-, Balb-c oder NIH Mäusen, BHK oder HaK Hamsterzelllinien.

[0064] Ähnlich verwendbar als Wirtszellen, die für diese Erfindung geeignet sind, sind bakterielle Zellen. Zum Beispiel die verschiedenen Stämme von *E. coli* (zum Beispiel, HB101, DH5 α , DH10 und MC1061) sind als Wirtszellen auf dem Gebiet der Biotechnologie sehr gut bekannt. Verschiedene Stämme von *B. subtilis*, *Pseudomonas* spp., andere *Bacillus* spp., *Streptomyces* spp. und ähnliche können auch in diesen Methoden verwendet werden.

[0065] Viele Stämme von Hefezellen, welche dem Fachmann bekannt sind, sind auch als Wirtszellen für die Expression von den Polypeptiden dieser Erfindung brauchbar. Zusätzlich können, wo erwünscht, Insektenzellen als Wirtszellen in den Methoden der vorliegenden Erfindung verwendet werden (Miller et al., Genetic Engineering 8: 277–298 [1986]).

[0066] Das Einfügen (Insertion (auch bezeichnet als "Transformation" oder "Transfektion")) des Vektors in die ausgewählte Wirtszelle kann durchgeführt werden, indem solche Methoden wie Calciumchlorid, Elektroporation, Mikroinjektion, Lipofektion oder die DEAE-Dextranmethode verwendet werden. Die ausgewählte Methode wird teilweise von dem Typ der zu verwendenden Wirtszelle abhängig sein. Diese Methoden und andere geeignete Methoden sind dem Fachmann gut bekannt und sind, zum Beispiel, in Sambrook et al., supra dargelegt.

[0067] Die Wirtszelle, welche den Vektor enthält (das heißt, transformiert oder transfektiert), kann kultiviert werden, indem dem Fachmann gut bekannte Standardmedien verwendet werden. Die Medien enthalten üblicherweise sämtliche Nährstoffe, welche für das Wachstum und Überleben der Zellen notwendig sind. Geeignete Medien für die Kultur von *E. coli* Zellen sind, zum Beispiel, Luria Broth (LB) und/oder Terrific Broth (TB). Geeignete Medien für die Kultur von eukaryotischen Zellen sind RPMI 1640, MEM, DMEM, alle, die mit Serum und/oder Wachstumsfaktoren ergänzt werden können, wie durch die jeweilige Zelllinie, welche kultiviert wird, benötigt wird. Ein geeignetes Medium für die Insektenkulturen ist Grace Medium ergänzt mit Yeastolat, Lactalbuminhydrolysat und/oder Kälberserum, wie benötigt.

[0068] Üblicherweise wird ein Antibiotikum oder eine andere Verbindung, welche für selektives Wachstum der transformierten Zellen geeignet ist, nur als Zusatz dem Medium hinzugefügt. Die zu verwendende Verbindung wird durch das Selektionsmarkerelement diktiert, welches im Plasmid vorhanden ist, mit welchem die Wirtszelle transformiert wurde. Zum Beispiel wird dort, wo das Selektionsmarkerelement eine Kanamycinresistenz ist, die Verbindung, welche dem Kulturmedium hinzugegeben wird, Kanamycin sein.

[0069] Die Menge des in der Wirtszelle hergestellten ART Polypeptids kann bestimmt werden, indem auf dem Gebiet bekannte Standardmethoden verwendet werden. Solche Methoden umfassen, ohne Einschränkung, Western Blot Analysen, SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese, nicht-denaturierende Gelelektrophorese, HPLC-Separation, Immunpräzipitation und/oder Aktivitätsassays, wie zum Beispiel DNA-Bindungsgeleshiftassays.

[0070] Wenn das ART Polypeptid so konstruiert wurde, dass es von der Wirtszelle ausgesondert wird, wird das meiste des Polypeptids voraussichtlich im Kulturmedium zu finden sein. Polypeptide, die auf diese Weise hergestellt wurden, haben üblicherweise kein aminoterminales Methionin, da es während der Sekretion aus der Zelle entfernt wird. Wenn jedoch das ART Polypeptid nicht aus der Wirtszelle sekretiert wird, wird es in dem Cytoplasma (bei Eukaryonten, Gram-positiven Bakterien und Insektenwirtszellen), oder in dem Periplasma (bei Gram-negativen Bakterienwirtszellen) vorhanden sein und kann ein aminoterminales Methionin haben.

[0071] Bei intrazellulärem ART Protein wird die Wirtszelle typischerweise erst mechanisch oder osmotisch aufgebrochen, um den cytoplasmatischen Inhalt in eine gepufferte Lösung freizusetzen. Das ART Polypeptid kann dann aus dieser Lösung isoliert werden.

[0072] Die Reinigung des ART-Polypeptids aus der Lösung kann bewerkstelligt werden, indem eine Vielfalt von Techniken verwendet wird. Wenn das Polypeptid so synthetisiert wurde, dass es einen Marker, wie zum Beispiel Hexahistidin (ART/hexaHis) enthält oder andere kleine Peptide entweder am Carboxyl- oder am Aminoterminus, kann es im wesentlichen in einem Einschrittverfahren gereinigt werden, indem die Lösung durch

eine Affinitätssäule läuft, wo die Säulenmatrix eine hohe Affinität für den Marker, oder für das Polypeptid direkt (das heißt, einen monoklonalen Antikörper, der spezifisch ART erkennt) hat. Zum Beispiel bindet Polyhistidin mit einer hohen Affinität und Spezifität an Nickel, auf diese Weise kann eine Affinitätssäule aus Nickel (wie zum Beispiel die Qiagen Nickelsäule) für die Reinigung von ART/polyHis verwendet werden. (Siehe auch, zum Beispiel, Ausubel et al., eds., *Current Protocols in Molecular Biology*, Section 10.11.8, John Wiley & Sons, New York [1993]).

[0073] Wo das ART Polypeptid keine Kennzeichnung hat und keine Antikörper erhältlich sind, können andere gut bekannte Verfahren für die Reinigung verwendet werden. Solche Methoden umfassen, ohne Einschränkung, Ionenaustauschchromatographie, Molekularsiebchromatographie, HPLC, native Gelelektrophorese in Kombination mit Gelelution und präparative isoelektrische Fokussierung ("Isoprime" Gerät/Technik, Hoefer Scientific). In einigen Fällen können zwei oder mehrere dieser Techniken kombiniert werden, um eine erhöhte Reinheit zu erhalten. Bevorzugte Methoden für die Reinigung umfassen polyHistidinmarker und Ionenaustauschchromatographie in Kombination mit präparativer isoelektrischer Fokussierung.

[0074] Wenn erwartet wird, dass das ART Polypeptid in erster Linie im periplasmatischen Raum der Bakterien oder dem Cytoplasma von eukaryotischen Zellen zu finden ist, kann der Inhalt von dem Periplasma oder Cytoplasma, einschließlich der Einschlußkörperchen („inclusion bodies“) (zum Beispiel Gram-negative Bakterien), wenn das hergestellte Polypeptid solche Komplexe gebildet hat, aus der Wirtszelle extrahiert werden, indem jede dem Fachmann bekannte Standardmethode verwendet wird. Zum Beispiel können die Wirtszellen lysiert werden, um den Inhalt des Periplasmas durch "French press", Homogenisation und/oder Sonikation, freizusetzen. Das Homogenat kann dann zentrifugiert werden.

[0075] Wenn das ART Polypeptid Einschlußkörperchen in dem Periplasma gebildet hat, können die Einschlußkörperchen häufig an die innere und/oder äußere zelluläre Membran binden und auf diese Weise werden sie in erster Linie nach der Zentrifugation im Pelletmaterial gefunden werden. Das Pelletmaterial kann dann mit einem chaotropischen Agens behandelt werden, wie zum Beispiel Guanidin oder Harnstoff, um die Einschlußkörperchen freizusetzen, auseinanderzubrechen und aufzulösen. Das ART Polypeptid in seiner jetzigen löslichen Form kann dann analysiert werden, indem eine Gelelektrophorese, Immunpräzipitation oder ähnliches verwendet wird. Wenn es gewünscht wird, das ART Polypeptid zu isolieren, kann die Isolation bewerkstelligt werden, indem Standardmethoden verwendet werden, wie zum Beispiel jene, die unten dargestellt sind und in Marston et al. (*Meth. Enz.*, 182: 264–275 [1990]) beschrieben sind.

[0076] Wenn die ART Polypeptide nicht in einem erheblichen Maße im Periplasma der Wirtszelle gebildet wurden, wird das ART Polypeptid hauptsächlich nach der Zentrifugation im Überstand des Zellhomogenats zu finden sein und die ART Polypeptide können aus dem Überstand isoliert werden, indem Methoden, wie zum Beispiel jene, die unten dargelegt sind, verwendet werden.

[0077] In jenen Situationen, wo es bevorzugt ist, das ART Polypeptid teilweise oder komplett zu isolieren, kann die Reinigung durchgeführt werden, indem dem Fachmann gut bekannte Standardmethoden verwendet werden. Solche Methoden umfassen, ohne Einschränkung, die Separation durch Elektrophorese, gefolgt durch Elektroelution, verschiedenen Arten von Chromatographie (Immunaaffinität, Molekularsieb und/oder Ionenaustausch), und/oder Hochdruckflüssigkeitschromatographie. In einigen Fällen kann es bevorzugt sein, mehr als eine von diesen Methoden für eine vollständige Reinigung zu verwenden.

[0078] Zusätzlich zur Herstellung und Reinigung von ART Polypeptid durch Verwendung rekombinanter DNA-Techniken können die ART Polypeptide, Fragmente und/oder Derivative davon durch chemische Synthesemethoden hergestellt werden (wie zum Beispiel feste Phase Peptidsynthese), indem auf dem Gebiet bekannte Methoden verwendet werden, wie zum Beispiel jene die in Merrifield et al., (*J. Am. Chem. Soc.*, 85: 2149 [1964]), Houghten et al. (*Proc Natl Acad. Sci. USA*, 82: 5132 [1985]) und Stewart and Young (*Solid Phase Peptide Synthesis*, Pierce Chem Co, Rockford, IL. [1984]) dargestellt sind. Solche Polypeptide können mit oder ohne einem Methionin an dem ein Aminoterminus synthetisiert werden. Chemisch synthetisierte ART Polypeptide oder Fragmente können oxidiert werden, um Disulfidbrücken zu bilden, indem die in diesen Referenzen dargestellten Methoden, angewendet werden. Die ART Polypeptide oder Fragmente können als biologisch aktive oder als immunologischen Ersatz für natürliche, gereinigte ART Polypeptide in therapeutischen und immunologischen Verfahren verwendet werden.

[0079] Chemisch modifizierte ART-Zusammensetzungen (das heißt "Derivative"), wobei das ART Polypeptid an ein Polymer geknüpft ist ("ART-Polymere") sind im Umfang dieser Erfindung eingeschlossen. Das ausgewählte Polymer ist üblicherweise wasserlöslich, so dass das Protein, an das es geknüpft ist, nicht in wässriger

Umgebung präzipitiert, wie zum Beispiel einer physiologischen Umgebung. Das ausgewählte Polymer ist üblicherweise so modifiziert, das es eine einzelne reaktive Gruppe hat, wie zum Beispiel einen aktiven Ester für die Acylierung oder ein Aldehyd für die Alkylierung, so dass der Grad der Polymerisation kontrolliert werden kann, wie in den vorliegenden Methoden vorgesehen ist. Ein bevorzugtes reaktives Aldehyd ist Polyethylenglycolpropionaldehyd, welches wasserfest ist, oder Mono-C1-C10 Alkoxy- oder Aryloxyderivative davon (siehe auch US Patent 5,252,714). Das Polymer kann verzweigt oder unverzweigt sein. Im Umfang von ART-Polymeren ist ein Gemisch von Polymeren eingeschlossen. Bevorzugt wird das Polymer für die therapeutische Verwendung des Endproduktpräparats pharmazeutisch verträglich sein. Das wasserlösliche Polymer, oder das Gemisch davon, kann aus der Gruppe ausgewählt werden, bestehend aus zum Beispiel Polyethylenglycol (PEG), Monomethoxy-polyethylenglycol, Dextran, Zellulose oder andere auf Kohlenhydrate basierende Polymere, Poly-(N-vinylpyrrolidon)polyethylenglycol, Propylenglycolhomopolymer, ein Polypropylenoxid/ethylenoxid Co-polymer, polyoxyethylierte Polyalkohole (zum Beispiel Glycerol) und Polyvinylalkohol. Für die Acylierungsreaktionen sollten das/die ausgewählten Polymer(e) eine einzelne reaktive Estergruppe haben. Für die reduktive Alkylierung sollte das/die ausgewählte Polyme(e) eine einzelne reaktive Aldehydgruppe haben. Das Polymer kann von jedem Molekulargewicht sein und kann verzweigt oder unverzweigt sein.

[0080] Pegylierung von dem ART kann durch jede auf dem Gebiet bekannten Pegylierungsreaktionen durchgeführt werden, wie zum Beispiel in den folgenden Referenzen beschrieben: Focus on Growth Factors 3 (2): 4–10 (1992); EP 0 154 316; und EP 0 401 384. Bevorzugt wird die Pegylierung mit Hilfe einer Acylierungsreaktion oder einer Alkylierungsreaktion mit einem reaktiven Polyethylenglycolmolekül (oder einem entsprechenden reaktiven wasserlöslichen Polymer), wie unten beschrieben, durchgeführt.

[0081] Die Pegylierung durch Acylierung umfaßt die Reaktion eines aktiven Esterderivats von Polyethylenglycol (PEG) mit einem ART Protein. Jedes bekannt oder anschließend entdecktes reaktives PEG-Molekül kann verwendet werden, um die Pegylierung von ART auszuführen. Ein bevorzugt aktivierter PEG-Ester ist PEG, welches am N-Hydroxysuccinimid ("NHS") verestert ist. Wie hierin verwendet, ist der Begriff "Acylierung" vorgesehen, die folgenden Arten von Bindungen zwischen ART und einem wasserlöslichen Polymer, wie zum Beispiel PEG, ohne Einschränkung zu umfassen: Amide, Carbamate, Urethane und Ähnlichen, wie in Bioconjugate Chem. 5: 133–140 (1994) beschrieben. Die Reaktionsbedingungen können aus jenen ausgewählt werden, welche auf dem Gebiet der Pegylierung bekannt sind, oder jene, die später entwickelt werden, vorausgesetzt, dass die Bedingungen, wie zum Beispiel die Temperatur, Lösungsmittel und pH, die die zu modifizierenden ART-Arten inaktivieren würden, vermieden werden.

[0082] Pegylierung durch Acylierung führt üblicherweise zu einem poly-pegylierten ART-Produkt, wobei die Lysin- ϵ -Aminogruppen mit Hilfe einer Acylbindungsgruppe pegyliert sind. Bevorzugt ist die verbindende Verknüpfung ein Amid. Ferner bevorzugt wird das resultierende Produkt mindestens ungefähr 95% mono-, di- oder tri-pegyliert sein. Dennoch werden normalerweise einige Spezies mit einem höheren Grad an Pegylierung (bis zur maximalen Anzahl der Lysin- ϵ -Aminogruppen von ART plus einer α -Aminogruppe an dem Aminoterminal von ART) in Mengen gebildet werden, welche von den spezifischen verwendeten Reaktionsbedingungen abhängen. Wenn erwünscht, können die weiter gereinigten Pegylierungsspezies, insbesondere nicht reagierte Spezies, von dem Gemisch durch Standardreinigungsmethoden abgetrennt werden, einschließlich, unter anderem, Dialyse, Aussalzen, Ultrafiltration, Ionenaustauschchromatographie, Gelfiltrationschromatographie und Elektrophorese.

[0083] Pegylierung durch Alkylierung umfaßt im Allgemeinen die Reaktion eines terminalen Aldehydderivats von PEG mit einem Protein, wie zum Beispiel ART, in der Gegenwart eines reduzierenden Agens. Ungeachtet des Grades der Pegylierung werden die PEG-Gruppen bevorzugt an das Protein mit Hilfe einer $-\text{CH}_2\text{-NH}$ -Gruppe verbunden. Mit einem besonderen Bezug auf die $-\text{CH}_2$ -Gruppe, wird diese Art der Verbindung hierin als eine "Alkyl"-Verknüpfung verwendet.

[0084] Die Derivatisierung mit Hilfe einer reduktiven Alkylierung, um ein monopegyliertes Produkt herzustellen, nutzt die unterschiedliche Reaktivität von verschiedenen Arten von primären Aminogruppen (Lysin versus des N-Terminus') aus, welche für die Derivatisierung in ART zur Verfügung stehen. Üblicherweise wird die Reaktion bei einem pH (siehe unten) durchgeführt, welcher einem erlaubt, den Vorteil der pK_a -Unterschiede zwischen den Etheraminogruppen von den Lysinresten und den von der α -Aminogruppe an dem N-terminalen Rest von dem Protein zu nutzen. Durch solch eine selektive Derivatisierung ist die Anfügung von einem wasserlöslichen Polymer, welches eine reaktive Gruppe, wie zum Beispiel ein Aldehyd umfaßt, an ein Protein kontrolliert: die Konjugation mit dem Polymer erfolgt hauptsächlich an dem N-Terminus von dem Protein, ohne signifikante Änderungen von anderen reaktiven Gruppen, wie zum Beispiel den Lysin-Seitenketten-Aminogruppen. Die vorliegende Erfindung sieht eine im wesentlichen homogene Herstellung von ART-Monopolymerpro-

teinkonjugatmolekülen vor (mit der Bedeutung eines ART Proteins, an welches im wesentlichen nur ein Polymermolekül an einer einzigen Stelle an das ART Protein angefügt wurde (das heißt, zumindest ungefähr 95%)). Insbesondere sieht die vorliegende Erfindung, wenn Polyethylenglycol verwendet wird, auch ein pegyliertes ART Protein vor, welchem möglicherweise antigene Verknüpfungsgruppen fehlen und das Polyethylenglycolmolekül direkt an das ART Protein gekoppelt ist.

[0085] Ein besonders bevorzugtes wasserlösliches Polymer für die Verwendung hierin ist Polyethylenglycol, abgekürzt PEG. Wie hierin verwendet, ist Polyethylenglycol dazu bestimmt, jede der Formen von PEG zu umfassen, welche verwendet wurden, um andere Proteine zu derivatisieren, wie zum Beispiel Mono-(C1-C10) Alkoxy- oder Aryloxy-polyethylenglycol.

[0086] Im Allgemeinen kann die chemische Derivatisierung unter jeder geeigneten Kondition durchgeführt werden, welche verwendet wird, um eine biologisch aktive Substanz mit einem aktivierten Polymermolekül zu reagieren. Methoden für die Herstellung von pegyliertem ART umfassen im Allgemeinen die Schritte von (a) Reagieren eines ART Polypeptids mit Polyethylenglycol (wie zum Beispiel ein reaktiver Ester oder Aldehydderivat von PEG) unter Bedingungen, wobei ART mit einer oder mehreren PEG-Gruppen verknüpft wird, und (b) dem Erhalten des Reaktionsprodukts/der Reaktionsprodukte. Im Allgemeinen werden die optimalen Reaktionsbedingungen für die Acylierungsreaktionen auf bekannten Parametern und den erwünschten Ergebnissen basierend bestimmt. Zum Beispiel ist je größer der Anteil von PEG : Protein, desto größer der Prozentanteil von poly-pegyliertem Produkt.

[0087] Eine reduktive Alkylierung, um eine im wesentlichen homogene Population von mono-Polymer/ART Proteinkonjugatmolekülen herzustellen, umfasst im allgemeinen die Schritte von: (a) Reagieren eines ART Proteins mit einem reaktiven PEG-Molekül unter reduktiven Alkylierungsbedingungen, bei einem pH, welcher geeignet ist, um die selektive Modifikation von den α -Aminogruppen an dem Aminoterminal von besagtem ART Protein zu ermöglichen; und (b) Erhalten des Reaktionsprodukts/der Reaktionsprodukte.

[0088] Für eine im Wesentlichen homogene Population von mono-Polymer/ART Proteinkonjugatmolekülen sind die reduktiven Alkylierungsreaktionsbedingungen jene, welche das selektive Verknüpfen von dem wasserlöslichen Polymerrest an den N-Terminus von ART ermöglichen. Solche Reaktionsbedingungen berücksichtigen üblicherweise pK_a -Unterschiede zwischen den Lysin-Aminogruppen und den α -Aminogruppen an dem N-Terminus (der pK_a ist der pH, bei welchem 50% von den Aminogruppen protoniert sind und 50% nicht). Der pH beeinflusst auch das Verhältnis von Polymer zu dem zu verwendenden Protein. Im Allgemeinen ist, wenn der pH geringer ist, ein großer Überschuss von Polymer zu Protein erwünscht (das heißt, je weniger reaktiv die N-terminalen α -Aminogruppe, desto mehr Polymer wird benötigt, um optimale Bedingungen zu erhalten). Wenn der pH höher ist, ist kein so großes Verhältnis von Polymer: Protein erforderlich (das heißt, je mehr reaktive Gruppen verfügbar sind, desto weniger Polymermoleküle sind erforderlich). Für die Zwecke der vorliegenden Erfindung fällt der pH im Allgemeinen innerhalb des Bereiches von 3 bis 9, bevorzugt 3 bis 6.

[0089] Eine weitere wichtiger Gesichtspunkt ist das Molekulargewicht des Polymers. Im Allgemeinen ist, je höher das Molekulargewicht von dem Polymer, desto geringer die Anzahl von Polymermolekülen, welche and das Protein geknüpft werden können. In ähnlicher Weise sollten Verzweigungen von dem Polymer in Betracht gezogen werden, wenn diese Parameter optimiert werden. Üblicherweise, je höher das Molekulargewicht (oder je mehr Verzweigungen), desto höher das Verhältnis von Polymer : Protein. Im Allgemeinen ist, für die hierin vorgesehene Pegylierungsreaktion das bevorzugte durchschnittliche Molekulargewicht ungefähr 2 kDa bis ungefähr 100 kDa (der Ausdruck "ungefähr" bedeutet hierbei ± 1 kDa). Das bevorzugte durchschnittliche Molekulargewicht ist ungefähr 5 kDa bis ungefähr 50 kDa, besonders bevorzugt ungefähr 12 kDa bis ungefähr 25 kDa. Das Verhältnis von wasserlöslichem Polymer zu ART Protein wird üblicherweise im Bereich von 1 : 1 bis 100 : 1 sein, bevorzugt (für Polypegylierung) 1 : 1 bis 20 : 1 und (für Monopegylierung) 1 : 1 bis 5 : 1.

[0090] Bei Verwendung des oben angezeigten Bedingungen sorgt die reduktive Alkylierung für eine selektive Anknüpfung von dem Polymer zu jedem ART Protein, welches eine α -Aminogruppe am Aminoterminal hat und sorgt für eine im wesentlichen homogene Herstellung von Monopolymer/ART Proteinkonjugat. Der Begriff "Monopolymer/ART Proteinkonjugat" wird hierin verwendet, um eine Mischung zu beschreiben, welche ein einzelnes Polymermolekül, geknüpft an ein ART Proteinmolekül, umfasst. Das Monopolymer/ART Proteinkonjugat wird bevorzugt ein Polymermolekül an dem N-Terminus angeordnet haben, aber nicht an Lysinaminoseitengruppen. Die Zubereitung wird bevorzugt zu größer als 90% Monopolymer/ART Proteinkonjugat, und mehr bevorzugt zu größer als 95 % aus Monopolymer/ART Proteinkonjugat bestehen, mit dem Rest der wahrnehmbaren Moleküle, welche unregiert sind (das heißt, Proteine, welchen der Polymeranteil fehlt). Die Beispiele unten sehen eine Herstellung vor, welche zumindest ungefähr 90 Monopolymer/Proteinkonjugat und ungefähr

10% unreaktiertes Protein hat. Das Monopolymer/Proteinkonjugat weist biologische Aktivität auf.

[0091] Für die vorliegende reduktive Alkylierung sollte das reduzierende Agens in wässriger Lösung stabil sein und bevorzugt sollte es in der Lage sein, nur die Schiffsche Base zu reduzieren, welche zu Beginn des Verfahrens der reduktiven Alkylierung gebildet wurde. Bevorzugte reduzierende Agenzien können ausgewählt werden aus der Gruppe bestehend aus Natriumborhydrid, Natriumcyanborhydrid, Dimethylaminboran, Trimethylaminboran und Pyridinboran. Ein besonders bevorzugt reduzierendes Agens ist Natriumcyanborhydrid.

[0092] Andere Reaktionsparameter, wie zum Beispiel Lösungsmittel, Reaktionszeiten, Temperaturen etc. und Mittel zur Reinigung der Produkte, können auf veröffentlichten Informationen basierend bestimmt werden, die sich auf die Derivatisierung von Proteinen mit wasserlöslichen Polymeren beziehen.

[0093] Ein Gemisch von Polymer-ART Proteinkonjugatmolekülen kann hergestellt werden durch Acylierung und/oder Alkylierungsmethoden, wie oben beschrieben wurde, und man kann das Verhältnis von Monopolymer/Proteinkonjugat auswählen, welches in dem Gemisch enthalten sein soll. Folglich kann, wenn erwünscht, ein Gemisch von verschiedenen Proteinen mit verschiedener Anzahl daran gehängter Polymermoleküle (das heißt, di-, tri-, tetra-, etc.) hergestellt werden und mit dem Monopolymer/ART Proteinkonjugatmaterial, welches durch die Verwendung des vorliegenden Methoden hergestellt wurde, gemischt werden.

[0094] Zustände, welche durch die Verabreichung des vorliegenden Polymer/ART abgeschwächt oder reguliert werden können, umfassen üblicherweise jene, welche hierin für ART Moleküle im Allgemeinen beschrieben sind. Jedoch können die hierin offenbarten Polymer/ART-Moleküle zusätzliche Aktivitäten haben, erhöhte oder erniedrigte Aktivitäten, oder andere Charakteristika, im Vergleich zu nicht derivatisierten Molekülen.

[0095] ART-Nukleinsäuremoleküle, Fragmente und/oder Derivative, die nicht selbst Polypeptide kodieren, welche wirksam in Aktivitäts-Methoden sind, können als Hybridisierungsproben in diagnostischen Assays nützlich sein, um auf das Vorhandensein von ART- DNA oder RNA, entweder qualitativ oder quantitativ, in Säugertiergewebe oder Körperflüssigkeitsproben zu testen.

[0096] ART Polypeptidfragmente und/oder Derivative, welche nicht selbst wirksam in Aktivitäts-Assays sind, können als Modulatoren (zum Beispiel Inhibitoren oder Stimulatoren) von den ART-Rezeptoren in vitro oder in vivo nützlich sein, oder um Antikörper gegen ART Polypeptide herzustellen.

[0097] Die ART Polypeptide und Fragmente davon können, ob chemisch modifiziert oder nicht, alleine oder in Kombination mit anderen pharmazeutischen Zusammensetzungen in der Behandlung von endokrinen systematischen Erkrankungen verwendet werden, wie zum Beispiel, neurotrophen Faktoren, Cytokinen, Interferonen, Interleukinen, Wachstumsfaktoren, Antibiotika, anti-entzündlichen Substanzen, Neurotransmitterrezeptor-Agonisten oder -Antagonisten und/oder Antikörper.

[0098] Die ART Polypeptide und/oder Fragmente davon können verwendet werden, um Antikörper herzustellen, welche durch Standardmethoden generiert werden. Somit sind Antikörper, welche mit den ART Polypeptiden reagieren, genauso wie reaktive Fragmente solcher Antikörper im Umfang der vorliegenden Erfindung enthalten. Die Antikörper können polyclonal, monoclonal, rekombinant, chimär, einzelsträngig und/oder bispezifisch, usw. sein. Die Antikörperfragmente können jedes Fragment, das mit dem erfindungsgemäßen ART reaktiv ist, wie zum Beispiel, F_{ab} , $F_{ab'}$, usw. sein. Auch werden durch die vorliegende Erfindung die Hybridome bereitgestellt, welche generiert werden, indem ART oder Fragmente davon einem ausgewählten Säuger als Antigen präsentiert wird, gefolgt durch die Fusion der Zellen (zum Beispiel Milzzellen) von den Tieren mit verschiedenen Krebszellen, um immortalisierte Zelllinien durch bekannte Techniken zu erzeugen. Die verwendeten Methoden, um solche Zelllinien und Antikörper, welche gegen alle oder Teile von einem humanen ART Polypeptid der vorliegenden Erfindung gerichtet sind, sind auch von der Erfindung umfasst.

[0099] Die Antikörper können therapeutisch verwendet werden, so dass die Bindung von ART an seinen Rezeptor inhibiert wird. Die Antikörper können weiterhin für in vivo und in vitro diagnostische Zwecke verwendet werden, wie zum Beispiel in markierter Form, um das Vorliegen von ART in Körperflüssigkeiten zu detektieren.

Therapeutische Zusammensetzungen und Verabreichung

[0100] Therapeutische Zusammensetzungen für die Behandlung verschiedener endokriner und/oder neuro-endokriner systemischer Erkrankungen, wie zum Beispiel Glucocorticoid-Resistenz, das Cushing-Syndrom (entweder genetisch bedingt oder verursacht durch ektopische ACTH-Bildung aufgrund von Hypophysentumoren).

moren, kleinem Lungenkarzinom oder Nebennierentumoren), kongenitaler Nebennierenhyperplasie, oder Erkrankungen der Hypothalamus-Hypophysen-Achse („hypothalamus-pitvitary axis“ = HPA) und/oder Fettsucht, sind innerhalb des Umfangs der vorliegenden Erfindung. Solche Zusammensetzungen können eine therapeutisch wirksame Menge von dem ART Polypeptid, oder einem Fragmente davon (welche beide chemisch modifiziert sein können), in Beimischung mit einem pharmazeutisch verträglichen Trägerstoff umfassen. Das Trägermaterial kann Wasser für die Injektion sein, bevorzugt ergänzt mit anderen Materialien gemeinsam in Lösung für die Verabreichung an Säuger. Üblicherweise wird eine ART therapeutische Verbindung in Form einer Zusammensetzung verabreicht, welche das gereinigte Protein (welches chemisch modifiziert sein kann) umfaßt in Verbindung mit einem oder mehreren physiologisch verträglichen Trägerstoffen, Hilfsstoffen oder Verdünnungsmitteln. Neutral gepufferte Kochsalzlösung oder Kochsalzlösung gemischt mit Serumalbumin sind beispielhaft geeignete Trägerstoffe. Bevorzugt wird das Produkt als ein Lyophilisat formuliert, in dem geeignete Hilfsstoffe verwendet werden (zum Beispiel Saccharose). Andere Standardträgerstoffe, Verdünnungsmittel und Hilfsstoffe können wie erwünscht hinzugefügt werden. Andere beispielhafte Zusammensetzungen umfassen Tris-Puffer mit einem pH von ungefähr 7,0 bis 8,5, oder Acetatpuffer mit einem pH von ungefähr 4,0 bis 5,5, welche weiter Sorbit, oder einen geeigneten Ersatz dafür, umfassen können.

[0101] Die ART-Zusammensetzungen können systematisch parenteral verabreicht werden. Wahlweise können die Zusammensetzungen intravenös oder subkutan verabreicht werden. Wenn systematisch verabreicht wird, kann die therapeutische Zusammensetzung für die Verwendung in dieser Erfindung in Form einer pyrogenfreien, parenteral verträglichen wäßrigen Lösung sein. Die Herstellung solcher pharmazeutisch verträglicher Proteinlösungen, mit Hinblick auf den pH-Wert, die Isotonizität, Stabilität und Ähnlichem gehört zum Fachwissen auf dem Gebiet.

[0102] Therapeutische Formulierungen von den ART-Zusammensetzungen, welche in der Ausführung der vorliegenden Erfindung nützlich sind, können für die Lagerung in Form eines lyophilisierten Stücks oder einer wässrigen Lösung durch das Mischen ausgewählter Zusammensetzungen hergestellt werden, welche den erwünschten Grad an Reinheit haben, optional mit physiologisch verträglichen Trägerstoffen, Hilfsstoffen oder Stabilisatoren (Remingtons Pharmaceutical Sciences, 18. Auflage, A. R. Gennaro, Hrsg., Mack Publishing Company [1990]). Verträgliche Trägerstoffe, Hilfsstoffe oder Stabilisatoren sind nicht toxisch für den Empfänger und bevorzugt bei den verwendeten Dosierungen und Konzentrationen inert und umfassen Puffer, wie zum Beispiel Phosphat, Citrat oder andere organische Säuren; Antioxidantien, wie zum Beispiel Ascorbinsäure; Polypeptide von geringem Molekulargewicht; Proteine, wie zum Beispiel Serumalbumin, Gelatine oder Immunglobuline; hydrophile Polymere, wie zum Beispiel Polyvinylpyrrolidon; Aminosäuren, wie zum Beispiel Glycin, Glutamin, Asparagin, Arginin oder Lysin; Monosaccharide, Disaccharide und andere Kohlenhydrate einschließlich Glucose, Mannose, oder Dextrine; chelatbildende Substanzen, wie zum Beispiel EDTA; Zuckeralkohole, wie zum Beispiel Mannitol oder Sorbitol; salzbildende Gegenionen, wie zum Beispiel Natrium; und/oder nicht-ionische Tenside, wie zum Beispiel Tween, Pluronic oder Polyethylenglycol (PEG).

[0103] Die ART-Zusammensetzungen, welche für die in vivo Verabreichung verwendet werden, müssen steril sein. Dies wird leicht durch Filtration durch sterile Filtrationsmembranen erreicht. Wo die ART Zusammensetzung lyophilisiert ist, kann Sterilisation durchgeführt werden, indem diese Methoden entweder vor oder nach der Lyophilisation und Rekonstitution verwendet werden. Die Zusammensetzung für die parenterale Verabreichung wird gewöhnlicherweise in lyophilisierter Form oder in Lösung gelagert.

[0104] Die therapeutischen Zusammensetzungen werden üblicherweise in einem Behälter aufbewahrt, welcher einen sterilen Zugang hat, zum Beispiel einen intravenösen Lösungsbeutel oder Fläschchen, welches ein mit einer Injektionsnadel durchbohrbaren Verschluss hat.

[0105] Die Art der Verabreichung der Zusammensetzung ist in Übereinstimmung mit bekannten Methoden, zum Beispiel oral, durch Injektion oder Infusion durch intravenöse, intraperitoneale, intracerebrale (intreaparenchymale), intracerebroventriculare, intramuskuläre, intraokulare, intraarterielle oder intraläsionale Wege oder durch anhaltende Freisetzungssysteme oder Implantationsmittel, welche optional die Verwendung eines Katheters umfassen können. Wo erwünscht, können die Zusammensetzungen kontinuierlich durch Infusion, durch Injektion eines Bolus oder durch Implantationsmittel verabreicht werden. Wahlweise oder zusätzlich kann ART lokal in das betroffene Gebiet mit Hilfe einer Implantation einer Membran, eines Schwammes oder anderen geeigneten Materialien, auf welchen ART Polypeptide absorbiert wurden, verabreicht werden.

[0106] Wo ein Implantationsmittel verwendet wird, kann das Mittel in jedes geeignete Gewebe oder Organ implantiert werden, wie zum Beispiel, in einen cerebralen Ventrikel oder in Gehirnparenchym und die Freisetzung von ART direkt durch das Mittel mit Hilfe eines Bolus oder einer kontinuierlichen Verabreichung, oder mit

Hilfe eines Katheters, durch Verwendung einer kontinuierlichen Infusion, erfolgen.

[0107] Das ART Polypeptid kann in einer Formulierung oder eines Präparats mit verlängerter Wirkstoffabgabe verabreicht werden. Geeignete Beispiele von Präparaten mit verlängerter Wirkstoffabgabe umfassen semipermeable Polymer-Grundsubstanzen in Form von geformten Artikeln, zum Beispiel Filme oder Mikrokapseln. Grundsubstanzen mit verlängerter Wirkstoffabgabe umfassen Polyester, Hydrogele, Polylaktide (U.S. 3,773,919, EP 58 481), Copolymere von Glutaminsäure und gamma-Ethyl-L-glutamat (Sidman et al., Biopolymers, 22: 547–556 [1983]), poly(2-Hydroxyethyl-methacrylat) (Langer et al., J. Biomed. Mater. Res., 15: 167–277 [1981] und Langer, Chem. Tech., 12: 98–105 [1982]), Ethylenvinylacetat (Langer et al., supra) oder poly-D(–)-3-Hydroxybuttersäure (EP 133 988). Zusammensetzungen mit verlängerter Wirkstoffabgabe können auch Liposomen umfassen, welche durch jede der vielen auf dem Gebiet bekannten Methoden hergestellt werden können (zum Beispiel DE 3 218 121; Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3688–3692 [1985]; Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4030–4034 [1980]; EP 52 322; EP 36 676; EP 88 046; EP 143 949).

[0108] In einigen Fällen kann es wünschenswert sein, ART-Zusammensetzungen in einer ex vivo Art und Weise zu verwenden, das heißt, Zellen oder Gewebe zu behandeln, welche vom Patienten entfernt wurden und dann nachfolgend zurück in den Patienten implantiert werden.

[0109] In anderen Fällen kann ART durch Implantierung verschiedener Zellen in den Patienten abgegeben werden, welche genetisch verändert wurden (durch Verwendung der oben beschriebenen Methoden), um ART Polypeptide zu exprimieren und zu sekretieren. Solche Zellen können humane Zellen sein und können von dem eigenen Gewebe des Patienten oder einer anderen Quelle erhalten werden, entweder human oder nicht human. Wahlweise können die Zellen immortalisiert sein. Die Zellen können in das Gehirn implantiert werden, in die Nebenniere oder in andere Körpergewebe oder Organe.

[0110] In verschiedenen Situationen kann es wünschenswert sein, gentherapeutische Methoden für die Verabreichung von ART an den Patienten zu verwenden, welche an verschiedenen endokrinen und/oder neuroendokrinen systemischen Erkrankungen leiden oder Erkrankungen, wie zum Beispiel Glucocorticoid-Resistenz, Cushing-Syndrom (entweder genetisch bedingt oder durch ektopische ACTH Herstellung aufgrund von Hypophysentumoren, kleinem Lungenkarzinom oder Nebennierentumoren verursacht werden), kongenitaler Nebennierenhyperplasie, andere Erkrankungen der Hypothalamus-Hypophysenachse-Achse („hypothalamic-pituitary axis“ = HPA) und/oder Fettsucht. In diesen Situationen kann genomische DNA, cDNA und/oder synthetische DNA, welche für ART oder einem Fragment oder einer Variante davon kodiert, funktionell an einen konstitutiven oder induzierbaren Promotor geknüpft werden, welcher in dem Gewebe, in das die Zusammensetzung injiziert werden soll, aktiv ist. Dieses ART DNA Konstrukt kann direkt in das Gehirn oder anderes neuronales Gewebe, welches behandelt werden soll, injiziert werden.

[0111] Wahlweise kann das ART DNA Konstrukt in Muskelgewebe injiziert werden, wo es in die Zellen aufgenommen werden kann und in den Zellen exprimiert werden kann, vorausgesetzt, dass die ART DNA funktionell an einen Promotor geknüpft ist, der in Muskelgewebe aktiv ist, so zum Beispiel dem Cytomegalovirus (CMV) Promotor, dem Rous Sarcomavirus Promotor (RSV) oder dem Muskelcreatinkinasepromotor. Üblicherweise kann das DNA Konstrukt (zusätzlich zu der ART DNA und einem Promotor) eine Vektorsequenz umfassen, welche aus Vektoren, wie zum Beispiel dem Adenovirusvektor, Adeno-assoziierten Virusvektoren, einem retroviralen Vektor, und/oder einem Herpesvirusvektor erhalten wurde. Dem Vektor DNA Konstrukt kann ein pharmazeutisch verträglicher Trägerstoffe) für die Injektion beigemischt werden.

[0112] Eine wirksame Menge von der/den ART-Zusammensetzung(en), welche therapeutisch verwendet werden soll, wird zum Beispiel von den therapeutischen Zielen abhängen, wie zum Beispiel der Indikation, für die ART verwendet wird, der Art der Verabreichung und dem Zustand des Patienten. Folglich ist es für den Therapeuten notwendig, die Dosierung zu bestimmen und die Weise der Verabreichung zu modifizieren, wie es erforderlich ist, um den optimalen therapeutischen Effekt zu erhalten. Eine typische tägliche Dosis kann von ungefähr 0,1 µg/kg bis zu 100 mg/kg oder mehr reichen, in Abhängigkeit von den oben genannten Faktoren. Üblicherweise wird ein Kliniker die ART-Zusammensetzung verabreichen, bis die Menge erreicht ist, die die erwünschten Effekte erzielt. Daher können die ART-Zusammensetzungen in einer Einzeldosis oder als zwei oder mehr Dosen über die Zeit verabreicht werden (welche die gleichen oder nicht die gleichen Mengen an ART enthalten können), oder als eine kontinuierliche Infusion mit Hilfe von Implantationsmitteln oder einem Katheter.

[0113] Sowie weitere Studien durchgeführt werden, werden sich weitere Informationen hinsichtlich der geeig-

neten Dosierungsmengen für die Behandlung der verschiedenen Zustände in verschiedenen Patienten ergeben und der Durchschnittsfachmann, welcher den therapeutischen Zusammenhang betrachtet, die Art der zu behandelnden Erkrankung, das Alter und die allgemeine Gesundheit des Empfängers wird in der Lage sein, die geeignete Dosierung zu bestimmen. Üblicherweise wird die Dosierung zwischen 0,01 µg/kg Körpergewicht (errechnet aus der Masse des Proteins allein, ohne chemische Modifikation) und 300 µg/kg (auf dem gleichen basierend) sein.

[0114] Die ART Proteine, Fragmente und/oder Derivative davon können verwendet werden, um Krankheiten und Störungen des endokrinen Systems zu behandeln, welche mit Änderungen in dem Muster der ART-Expression verbunden sind oder welche von einer Aussetzung gegenüber ART oder Anti-ART-Antikörpern Nutzen profitieren.

[0115] Das ART Protein und/oder Fragmente oder Derivative davon können verwendet werden, um Patienten zu behandeln, in welchen verschiedene Zellen des endokrinen und/oder nervalen System degeneriert sind und/oder beschädigt worden sind durch eine angeborene Erkrankung, Trauma, einem chirurgischen Eingriff, einem Schlaganfall, Ischämie, einer Infektion, einer Stoffwechselerkrankung, Ernährungsmangel, Krebs und/oder toxischen Agenzien.

[0116] In anderen Ausführungsformen dieser Erfindung kann das ART Protein und/oder Fragmente oder Derivative davon verwendet werden, um endokrine und/oder neuro-endokrine systemische Störungen oder Erkrankungen zu behandeln, wie zum Beispiel Glucocorticoid-Resistenz, Cushing-Syndrom (entweder genetisch bedingt oder durch ektopische ACTH Herstellung aufgrund von Hypophysentumoren, kleinem Lungenkarzinom oder Nebennierentumoren verursacht werden), kongenitaler Nebennierenhyperplasie, andere Erkrankungen der Hypothalamus-Hypophysenachse-Achse („hypothalamic-pituitary axis“ = HPA) und/oder Fettsucht. Zusätzlich können ART-Zusammensetzungen nützlich bei der Modulierung intrazellulärer Calciumlevel sein.

[0117] Weiterhin kann das ART Protein oder Peptidfragmente oder Derivative davon in Verbindung mit chirurgischer Implantation von Gewebe bei der Behandlung von Erkrankungen, in welchen Gewebeimplantation angezeigt ist, verwendet werden.

BEISPIELE

Beispiel I: Identifizierung der humanen ART cDNA

[0118] Die öffentlich zugängliche Washington University/Merck DNA Sequenzdatenbank, bezeichnet als EST (Expressed Sequence Tag) Datenbank, wurde mit einem Sequenzprofil durchsucht (Gribkov et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84: 4355 [1987] und Luethy et al., Protein Science, 3: 139–146 [1994]), indem eine Sequenzausrichtung von der humanen und dem Maus Agouti Genen gemacht wurde (beginnend bei Aminosäure 22 von beidem, Maus und Human Agouti), in Übereinstimmung mit der PAM250 Aminosäuresubstitutionstabelle (Dayhoff et al., in: Atlas of Protein Sequence and Structure, vol. 5, supp. 3 [1978]).

[0119] Um in der Datenbank nach homologen Aminosäuresequenzen zu suchen, wurde jeder Eintrag in der EST Datenbank zunächst durch einen Computer von der DNA in die Aminosäuresequenz vor der Suche translatiert. Es wurde eine Eintragung in der EST Datenbank von einem cDNA Klon, H63735, gefunden, welcher Homologie zu dieser Profilsequenz aufweist. Der Eintrag, welcher die Sequenz von dem entgegengesetzten Ende von diesem cDNA Klon, H63298, enthält, wurde bestimmt, aber er zeigte keine Homologie zu der Profilsequenz.

[0120] Der E. coli Stock, welcher den cDNA Klon enthält, welcher H63735 und H63298 entspricht (Stock Nr. 208641), wurde von Genome Systems Inc., St. Louis, MO erhalten. Die DNA aus diesem Klon wurde präpariert, indem Standard Miniprepmethoden verwendet wurden (Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY [1989]). Die DNA wurde über eine Qiagensäule gereinigt (Qiagen, Chatsworth, CA) indem das Herstellerprotokoll angewendet wurde. Nach der Reinigung wurde die DNA sequenziert, indem die Standard Dideoxymethoden angewendet wurden. Wenn diese gereinigte DNA mit den Restriktionsendonukleasen EcoRI und HindIII verdaut wurde, wurden zwei Fragmente von ca. 1,2 und 0,3 kb erhalten, was anzeigt, dass der Klon ein Insert von ungefähr 1,5 kb enthält. Die Sequenz von den T3 und T7 Primern von dem Sequenzierungsvektor ergab Sequenzen, welche nahezu identisch zu den eingereichten Sequenzen waren, was anzeigt, dass der Klon 208641 die DNA enthält, welche verwendet wurde, die Vorlagen H63735 und H63298 zu generieren.

[0121] Eine Analyse der vollständigen cDNA Sequenz von dem Klon 208641 bestätigte das Vorliegen einer Homologie mit dem Agouti-Gen im Cystein-reichen Carboxyterminus. Der Vergleich von der cDNA Sequenz von Klon 208641 mit der Originalsequenz, die in die Datenbank (H63735) eingereicht wurde, zeigte einen Fehler in der eingereichten Sequenz. Insbesondere war ein zusätzliches Guaninnukleotid an der Position 164 von H63735 vorhanden, was in einer Frameshift Mutation und einem vorschnellen Leseraster Stoppkodon resultiert, wenn H63735 translatiert wurde. Dieser Fehler, wenn er korrigiert wird, zeigte eine erhöhte Homologie zwischen der Profilsequenz H63735. Eine Korrektur von diesem Fehler resultiert auch in einer zusätzlichen Sequenzhomologie zwischen Klon 208641 und dem Agouti-Gen. Jedoch, auch mit der Korrektur dieses Frameshifts, resultiert die von dem offenen Leseraster vorausgesagte Proteinsequenz von 208641 in ein Protein von 94 Aminosäuren, verglichen zu 132 Aminosäuren für das humane Agouti. Zusätzlich nimmt die vorausgesagte Proteinhomologie dramatisch zum Aminoterminal hin ab. Dies legt nahe, dass 208641 tatsächlich nicht die wirkliche cDNA war, sondern vielmehr ein teilweise gespleißtes genomisches Intron DNA-cDNA Hybrid, und dieses wurde bestätigt, als die Sequenz für den humanen genomischen Klon (SEQ ID NO: 4), wie unten beschrieben erhalten wurde.

[0122] Um das Genexpressionsmuster von dem Klon zu bestimmen, wurden Nylon-Northern Blots, welche ca. 2 µg pro Spur von polyA RNA von verschiedenen Humangeweben enthielten (Clontech Labs, Palo Alto, CA) auf das Vorhandensein von ART gescannt, indem die Blots mit einer Sonde von annähernd 600 Basenpaaren untersucht wurden (erhalten durch Verdau des Klons 208641 mit NcoI und NotI und Isolierung des 600 Basenpaarfragments durch Verwendung des Qiagen Gel Purification Kit [Qiagen, Chatsworth, CA]) und dem Nacharbeiten des Herstellerprotokolls. Dieses isolierte 600 Basenpaarfragment wurde in einer Randomprimerreaktion (RediPrime, Amersham) mit einem α -³²P-dCTP radioaktiv markiert, indem Standardmethoden (Redi-View, Amersham, Arlington Heights, IL) verwendet wurden. Nichtinkorporierte Radioaktivität wurde durch eine Größenausschlußchromatographie (QuickSpin Säulen, Boehringer-Mannheim) ausgeschlossen. Die Northern Filter wurden über Nacht bei ungefähr 42°C im Puffer hybridisiert, welcher 50% Formamid, 2% SDS, 10 × Denhardt, 100 mg/ml Lachssperma DNA und 5 × SSPE enthält. Die Filter wurden dann in 2 × SSC, 0,05% SDS bei Raumtemperatur für ungefähr 40 Minuten mit dreimaligem Wechseln der Waschlösung gewaschen, nachfolgend für 30 Minuten bei ungefähr 50°C in 0,1 × SSC, 0,1% SDS. Die Hybridisierungssignale wurden detektiert, indem die Filter über Nacht in eine Phosphorimagerkassette platziert wurden.

[0123] Die Hybridisierung der Northern Filter mit der 600 bp NcoI-NotI Sonde zeigte ein eindrucksvolles und relativ spezifisches Muster der Expression von ART, wie in [Fig. 6](#) gezeigt wird. Der Ort, wo am meisten exprimiert wurde, war die Nebennierenrinde, gefolgt durch das Nebennierenmark, Hypothalamus, dem subthalamischen Nukleus und Testis. Ein schwaches Hybridisierungssignal wurde in der Lunge detektiert. Wenn die relativen Intensitäten der Hybridisierungssignale in einem Phosphorimager quantifiziert wurden und relativ zur Nebennierenrinde ausgedrückt wurden, wurden die folgenden Werte erhalten; Nebennierenrinde, 100; Nebennierenmark, 46; Hypothalamus, 23; Testis, 15; subthalamischer Nukleus, 11; und Lunge, 3,6. Die Filter wurden dann mit einer beta-Actinprobe untersucht, um das gleichmäßige Beladen von RNA und das korrekte Platzieren der RNA Größenmarker zu verifizieren.

[0124] Die Untersuchung des Northern Blot mit Referenz zu den Größenmarkern zeigte einen interessanten Unterschied in den Längen der Transkripte von ART zwischen Gehirn und peripheren Geweben, welche auf alternatives Exon-Splicing zurückzuführen sein könnten. Die Transkriptgröße war ungefähr 0,8 kb für das Gehirngewebe, während die peripheren Gewebe ein kleineres Transkript von ungefähr 0,6 kb aufwiesen. Um entscheiden zu können, ob dies das alternative Splicing von kodierenden und/oder untranslatierten Exons wiedergibt, wurde die cDNA von sowohl subthalamischem Nukleus und Nebenniere wie unten beschrieben kloniert.

[0125] Anfängliche Versuche, die vollständige cDNA durch Verwendung von Standardphagenbibliotheken zu klonieren, waren nicht erfolgreich, was sehr wahrscheinlich zurückzuführen ist auf die kleine Transkriptgröße, die während der Präparation solcher Bibliotheken ausgeschlossen wird. Dementsprechend wurde eine technisch weiterentwickelte und technisch veränderte Klonierungsmethode, welche PCR verwendet, versucht. Um den vollständigen humanen cDNA Klon, welcher dem Klon 208641 entspricht, zu erhalten, wurde humane polyA RNA aus der Nebenniere, dem subthalamischen Nukleus und der Lunge (Clontech, Palo Alto, CA; jeweils die Katalog Nummern 6571-1, 6581-1 und 6524-1) revers transkribiert, Zweitstrang cDNA wurde synthetisiert und ein Adapterprimer ligiert, indem das Marathon cDNA Amplifikations Kit verwendet wurde (Clontech, Palo Alto, CA), und dem Herstellerprotokoll gefolgt wurde. Die endgültigen cDNA Produkte wurden von den nicht-ligierten Adapterprimern gereinigt (PCR Clean-up Kit, Qiagen, Chatsworth, CA) und als Templates für die nachfolgenden RACE Reaktionen verwendet, indem PCR angewendet wurde. Eine PCR wurde für jede cDNA durchgeführt, indem folgende Primer verwendet wurden:
CCATCCTAATACGACTCACTATAGGGC (SEQ ID NO: 1)

TAGCCCCGACCCTGACGTTGGC (SEQ ID NO: 2)

und durch die Verwendung der Komponenten des Advantage PCR Kit (Clontech, Palo Alto, CA). Folgend einem anfänglichen Denaturierungsschritt (94°C für 3 Minuten), wurden die Reaktionen 5 mal bei 94°C für 15 Sekunden und dann bei 72°C für 2 Minuten einem Zyklus unterzogen; 5 mal bei 94°C für 15 Sekunden und dann bei 70°C für 2 Minuten; und 25 Zyklen bei 94°C für 15 Sekunden und dann bei 68°C für 2 Minuten. Alle Reaktionen wurden auf einer Perkin Elmer 2400 PCR Maschine durchgeführt.

[0126] Ein Aliquot von jedem PCR Reaktionsgemisch wurde auf einem Agarosegel elektrophoresiert und die Banden, welche bei annähernd 600 Basenpaaren wanderten, wurden ausgeschnitten und gereinigt (Gel Extractions Kit, Qiagen, Chatsworth, CA), und als Templat für die nachfolgende PCR verwendet, indem der Primer SEQ ID NO: 2 und der Primer

ACTCACTATAGGGCTCGAGCGGC (SEQ ID NO: 3)

verwendet wurden. Die PCR-Bedingungen waren die gleichen wie oben beschrieben.

[0127] Ein Aliquot von dieser zweiten PCR-Reaktion wurde auf Agarose elektrophoriert und die Banden, welche bei ungefähr 600 Basenpaaren wanderten, wurden ausgeschnitten, gereinigt und in ein Plasmid kloniert (TA Cloning kit, Invitrogen, San Diego, CA). Bakterielle Wirtszellen wurden dann mit dem Plasmid transformiert und über Nacht für die DNA Reinigung gezüchtet. Die Plasmid DNA wurde dann aus den bakteriellen Wirtszellen isoliert, indem das Qiagen Miniprepprotokoll verwendet wurde, verdaut mit EcoRI und elektrophoresiert, um das Vorhandensein und die Größe der Inserts zu bestätigen. Klone, welche eine Vielzahl von Insertgrößen enthalten, wurden sequenziert, indem verschiedene T7 und M13 Primer verwendet wurden. Die Sequenzierung der Klone zeigte einen Polymorphismus in der zweiten Position von Codon 135, welches den vorausgesagten Aminosäuren Leu (CTG) oder Pro (CCG; siehe auch [Fig. 4](#) und [Fig. 9](#)) entspricht. Die erhaltenen Sequenzen wurden verwendet, um zu bestimmen, welche Klone Inserts enthalten, die die ART cDNA enthalten, und um Oligonucleotidprimer für den 5' Teil von der ART cDNA zu designen. Wenn eine Anzahl von diesen Inserts sequenziert wurden, enthielten nur die größeren Inserts die Größen von 700 bp und 500 bp jeweils aus dem subthalamischen Nucleus und den Nebennieren, die ART Transkripte. Beide dieser Inserts enthielten den gleichen offenen Leserahmen (ORF), aber unterschieden sich in der Menge der 5' untranslatierten Region. Dieser ORF entsprach der Sequenz aus 208641 in der 3' Region.

[0128] Für die 3' RACE Reaktion wurde ein Oligonukleotid auf dem Vorwärtsstrang, das das 5' RACE Produkt durch ungefähr 180 bp überlappt, mit SEQ ID NO: 1 verwendet. Dieses resultierte in einem gleich großen Amplicon (ungefähr 300 bp) aus allen drei Geweben. Die Sequenz dieses Amplicons war aus allen drei Geweben gleich und stimmte auch mit der Sequenz von Klon 208641 überein. Die Sequenz der ART cDNA aus der Nebenniere und der Lunge (den "peripheren Geweben") ist in [Fig. 3](#) gezeigt (SEQ ID NO: 6).

[0129] Die kombinierten Sequenzen der RACE Reaktionen aus dem subthalamischen Nucleus ist in [Fig. 2](#) gezeigt (SEQ ID NO: 5). Wie oben erwähnt, ist die Sequenz aus der Nebenniere und der Lunge identisch zu dieser Sequenz, außer in der Länge von der 5' untranslatierten Region. Diese cDNA Sequenz enthält einen in-Frame Terminationscodon von der vermutlichen Translationsstartstelle, ein Polyadenylierungssignal, und einen polyA Schwanz. Das Protein, welches von diesem offenen Leserahmen (ORF) vorausgesagt wird, enthält 132 Aminosäuren, eine Signalpeptidsequenz und 11 Cysteine und diese Sequenz ist in [Fig. 4](#) gezeigt (SEQ ID NO: 7). Das Signalpeptid besteht aus den ersten 20 Aminosäuren und das reife Polypeptid beginnt bei Aminosäure 21 (Ala).

Beispiel II: Identifikation der humanen ART genomischen DNA

[0130] Filter hoher Dichte, beladen mit DNA von humaner genomischer DNA (erhalten von Genome Systems Inc., St. Louis, MO) wurde mit einer 600 bp α -³²P-dCTP markierten NcoI-NotI cDNA Sonde (siehe Beispiel I) in RapidHyb Puffer (Amersham, Arlington Heights, IL, Katalog Nr. RPN 1636) bei ungefähr 65°C für ungefähr 4 Stunden hybridisiert. Die Filter wurden dann in 2 × SSC, welches 0,2% SDS enthält, bei Raumtemperatur für 30 Minuten gewaschen, und dann in 0,2 × SSC, welches 0,2% SDS enthält, bei 65°C für 30 Minuten. Die Filter wurden in einer Autoradiographiekassette mit einem Hyperfilm (Amersham) plziert und bei -80°C über Nacht gelagert. Der Film wurde dann entwickelt und die Koordinaten von den P1 Klonen, welche an die Probe hybridisierten, wurden aufgezeichnet. Die bakteriellen Stämme, welche diese positiven P1 Klone enthalten, wurden von Genome Systems Inc. erhalten, und die DNA aus diesen Stämmen wurde isoliert (Qiagen Miniprep System, Qiagen, Chatsworth, CA).

[0131] Eine Aliquot DNA wurde mit EcoRI verdaut, auf einem 0,9%-igen Agarosegel elektrophoriert, und die Banden, welche bei annähernd 2 bis 3 kb liefen, wurden ausgeschnitten, gereinigt und in ein Plasmid subklo-

niert (Bluescript-KSII, Stratagene), welches zuvor mit EcoRI verdaut wurde. DNA wurde aus Bakterien isoliert, welche Inserts enthalten (Qiagen Miniprep System), verdaut mit EcoRI, elektrophoriert, transferiert auf Nylonfilter (Turboblotter, S & S, Keene, NH) und UV cross-linked (Stratagene, La Jolla, CA). Diese Filter wurden dann mit der NcoI-NotI Sonde, wie oben beschrieben, hybridisiert, um Klone zu identifizieren, welche ART Sequenzen enthalten. Ein Klon, welcher ein annähernd 2,3 kb EcoRI Fragment enthält, wurde als mit der ART-Probe zu hybridisieren erkannt. Die DNA aus diesem Klon wurde dann sequenziert und die Nukleinsäuresequenz von dieser ART genomischen DNA ist in **Fig. 1** gezeigt (SEQ ID NO: 4). Wenn die Sequenz von diesem genomischen Klon mit der cDNA Sequenz verglichen wurde; welche aus den adrenalen Nebennieren und dem Gehirn erhalten wurde, wurde festgestellt, dass die ART kodierende Sequenz in drei Exons gegliedert ist. Weiterhin wurde gefunden, dass die 5' untranslatierte Sequenz, welche in der Gehirn cDNA vorhanden ist, sich auf einem separaten Exon befindet, 5' lokalisiert zu diesen 3 kodierenden Exons. Daher scheint das ART-Gen aus drei kodierenden Exons und unterschiedlich gesplittenen untranslatierten Exons zu bestehen.

[0132] Es ist möglich, dass die kleineren ART Transkripte, welche in den Northern Blots von peripheren Geweben identifiziert wurden, zurückzuführen sind auf die Abwesenheit von diesem nicht kodierenden Exon. Interessanterweise ist das Maus Agouti bekannt, unterschiedlich gespleißte nicht-kodierende Exons während verschiedener Phasen des Haarwuchses zu verwenden.

Beispiel III: Herstellung von ART-Peptiden

[0133] Ein synthetisches Peptid, welches die Aminosäuren 79 bis 132 von ART enthält, wurde hergestellt, indem Standard feste-Phase-FMOC-Schutzchemie verwendet wurde. Die Sequenz von diesem Peptid ist in **Fig. 5** (SEQ ID NO: 8) dargestellt. Um das ART-Peptid neu zu falten, wurden ungefähr 5,0 mg von dem lyophilisierten Pulver in 25 ml von 20 mM Tris-HCL und 4M Harnstoff (pH 7,0) gelöst. Dieses Gemisch wurde langsam über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nach dem Rühren wurde die Probe in einem Amicon (Beverly, MA) konzentriert, indem eine Ausschlußmembran von 3 kDa verwendet wurde. Das endgültige Volumen betrug nach der Konzentration ungefähr 1 ml. Diese Probe wurde dann mit ungefähr 15 ml sterilem D-PBS (GibcoBRL, Grand Island, NY) verdünnt und wurde dann auf ein endgültiges Volumen von ungefähr 1 ml neu konzentriert. Das Rührgefäß wurde zweimal mit ungefähr 2 ml D-PBS durchspült und diese 4 ml der Lösung wurden der Probe hinzugefügt. Diese Probenlösung, nun ungefähr 5 ml, wurde weiter in einem Amicon Centricon 3 -Vorrichtung auf ein endgültiges Volumen von ungefähr 0,5 ml konzentriert (entsprechend ungefähr 10 mg/ml). Die Probe wurde dann in einer Costar (Cambridge, MA) 0,22 µm Spinexfiltervorrichtung gefiltert und bei 4°C gelagert.

[0134] Diese Peptidprobe wurde Ratten verabreicht, wie in Beispiel V unten beschrieben.

Beispiel IV: Klonierung der Maus ART genomischen DNA

[0135] Eine genomische Bibliothek aus Mauslebergewebe (Stratagene, La Jolla, CA) wurde nach der Maus ART genomischen DNA durchsucht, indem die 600 bpa-³²P-dCTP markierte NcoI-NotI cDNA Sonde (siehe Beispiel I) in RapidHyb Puffer (Amersham, Arlington Height, IL; Katalog Nr. RPN 1636) bei ungefähr 65°C für 4 Stunden verwendet wurde. Die Filter wurden dann in 2 × SSC, welches 0,2% SDS enthält, bei Raumtemperatur für 30 Minuten und dann in 0,2 × SSC, welches 0,2% SDS enthält, bei 65°C für 30 Minuten gewaschen. Die Filter wurden in einer Autoradiographiekassette mit einem Hyperfilm (Amersham, Arlington Heights, IL) plziert und dann bei -80°C über Nacht untergebracht. Der Film wurde dann entwickelt und ein Klon wurde identifiziert, welcher an die Probe gebunden hatte.

[0136] Dieser Klon, bezeichnet als m-ARTg, wurde Plaque-gereinigt, indem Standardmethoden verwendet wurden, die Bakterien lysiert wurden, und die DNA wurde dann isoliert, indem eine Qiagen Maxiprep Säule verwendet wurde (Chatsworth, CA). Die gereinigte DNA wurde mit XbaI verdaut und ein nahezu 2,8 kb Fragment wurde gefunden, welches mit der humanen ART c DNA Sonde hybridisierte. Diese 2,8 kb Fragment wurde in den Vektor pBlueScript (Stratagene, La Jolla, CA) subkloniert und sequenziert. Der kodierende Bereich dieser Sequenz ist in **Fig. 7** dargestellt. Die Splice Donor/Akzeptor Stellen in diesem Gen wurden als vergleichbar zu jenen in der humanen ART genomischen DNA gefunden, was drauf hinweist, dass das Maus ART Gen auch drei kodierende Exons (2, 3 und 4) und ein nicht-kodierendes Exon (Exon 1) hat. Die vorhergesagte Aminosäuresequenz von dem Maus ART ist in **Fig. 8** gezeigt. Diese Sequenz ist ungefähr 81% identisch zu der humanen ART Polypeptidsequenz.

Beispiel V: Freßverhalten von Ratten, welche mit ART behandelt wurden

[0137] Long-Evans männliche Ratten, welche 300 bis 550 g wiegen, wurden im Gehirn eine 22 Gauge Kanüle chronisch implantiert, welche auf die lateralen Ventrikel zielt. Die stereotaxischen Koordinaten für die Kanülen waren ungefähr: 0,8 mm anterior/posterior; 1,4 mm medial/lateral; und 3,5 mm dorsal/ventral. Ein 3,5 mm, 28 Gauge Stilette verblieb innerhalb der implantierten Kanüle, bis das Tier bereit für eine Injektion war. ART-Peptide oder Kontrolllösungen wurden mit einem 28 Gauge Injektor verabreicht, welcher bis ungefähr 1 mm hinter die Spitze der Kanüle ausgefahren wurde.

[0138] ART-Peptide wurden in PBS (pH ca. 7,0) gelöst und in Dosen, die sich über einen Bereich von ungefähr 0,075 nmol bis ungefähr 7,5 nmol in einem Volumen von ungefähr 2 µl erstreckten, in den lateralen Ventrikel injiziert. Kontrollen waren PBS und eine ungefaltete Ausführung von ART bei ungefähr 7,5 nmol. Messungen des Fütterungsverhaltens wurden von vorgewogenen Schüsseln, welche ein Gemisch von Nagetiergrundfutter, Zucker und kondensierter Milch enthielten, genommen. (45% : 28% : 27%). Ratten wurde dieses Gemisch zusammen mit ihrem regulären Futter ungefähr 24 Stunden vor der Injektion angeboten. Ungefähr eine und eine Halbe Stunde vor der Infusion wurde das reguläre Futter entfernt, aber den Ratten wurde ermöglicht, mit einer Ernährung mit dem gesüßten Gemischs fortzufahren. Injektionen wurden um 8.30 Uhr am Vormittag oder um 8.30 am Nachmittag durchgeführt. Die Futteraufnahme wurde durch Wiegen der Schüsseln über die Zeit bei 90 Minuten, 4 Stunden, 8 Stunden, 12 Stunden und 24 Stunden nach der Injektion bestimmt. 10 bis 12 Ratten wurden pro Gruppe eingesetzt.

[0139] Die Ergebnisse sind in [Fig. 10](#) gezeigt. Wie der Abbildung zu entnehmen ist, erhöhten diejenigen Ratten, welche gefaltetes ART erhielten, ihre Futteraufnahme im Vergleich zu den Kontrollen. Ferner ist eine Korrelation zwischen der Menge von injiziertem ART und der Menge des durch die Ratten gefressenen Futters zu beobachten.

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

- (i) ANMELDER: Amgen, Inc.
- (ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Neues Agouti verwandtes Gen
- (iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 11
- (iv) KORRESPONDENZ-ADRESSE:
 - (A) NAME: Amgen, Inc.
 - (B) STRASSE: 1840 Dehavilland Drive
 - (C) ORT: Thousand Oaks
 - (D) STAAT: Kalifornien
 - (E) LAND: USA
 - (F) POSTLEITZAHL: 9132-1789
- (v) COMPUTERLESBARE FASSUNG:
 - (A) DATENTRÄGER: Diskette
 - (B) COMPUTER: IBM-PC-kompatibel
 - (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
 - (D) SOFTWARE: PatentIn-Release 1.0, Version 1.30
- (vi) DERZEITIGE ANMELDE DATEN:
 - (A) ANMELDE NUMMER:
 - (B) EINREICHUNGSDATUM:
 - (C) KLASSIFIZIERUNG:
- (viii) ANWALT/AGENT INFORMATIONEN:
 - (A) NAME: Oleski, Nancy A
 - (B) REGISTRIERUNGSNUMMER: 34,688
 - (C) REFERENZ/DOCKET NUMMER: A-402A

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:1:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 27 Basenpaare
 - (B) ART: Nukleinsäure
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: Linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: andere Nukleinsäure
 - (A) BESCHREIBUNG: /desc = „Oligonukleotid“
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:1:

CCATCCTAAT ACGACTCACT ATAGGGC

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:2:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 22 Basenpaare
 - (B) ART: Nukleinsäure
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: Linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: andere Nukleinsäure
 - (A) BESCHREIBUNG: /desc = „Oligonukleotid“
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:2:

TAGCCCCGAC CCTGACGTTG GC

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:3:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 23 Basenpaare
 - (B) ART: Nukleinsäure

- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: Linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: andere Nukleinsäure
- (A) BESCHREIBUNG: /desc = „Oligonukleotid“
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:3:

ACTCACTATA GGGCTCGAGC GGC

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:4:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 2371 Basenpaare
 - (B) ART: Nukleinsäure
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: Linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:4:

GAATTCTTGG AAGCACAGGA AACAACATGC CACATAGGGG TTGAGTAAGC ATCTCTGGGG	60
CCACAAATTA AATTAAGCTT TCAGGGCCGC CTGCCTTGTT ATTGCTAATG GTTCTAGCCC	120
TGCTCAGCTC CTAGGTCCCT GTCCTGTGGA AATTTGTGGA CCCTGGGCAC CCTCTCTTGC	180
TCCCAAATTT TAATCGGCTC CTGGAAACCT CACCCCAAAT TGGAGATAGG CACTCCTCTT	240
GTAGAACAAA AGGCTCAGGT TCAGGGAGTG AGGGCCTGAA CTGTGCCCCC ACCCTCCAGG	300
AAGGGTCCTT CACGGCCTGG CTGCAGGGAT CAGTCACGTG TGGCCCTTCA TTAGGCCCTG	360
CCATATAAGC CAAGGGCACG GGGTGGCCGG GAACTCTCTA GGCAAGAATC CCGGAGGCAG	420
AGGTGAGTCC TCAGGTTGGG CAGGGACTCC TCCTCTCTGT GGGGTCTCTA TCTGGGCACC	480
TAGAGGGGAC TCCAAGGATA AGGAGGGACT AAGTGGTACA TCTTCCTGCT GAGCCAGGCC	540
ATGCTGACCG CAGCGGTGCT GAGCTGTGCC CTGCTGCTGG CACTGCCTGC CACGCGAGGA	600
GCCCAGATGG GCTTGGCCCC CATGGAGGGC ATCAGAAGGC CTGACCAGGC CCTGCTCCCA	660

GAGCTCCCAG GTCAGTGTGA GCAAGGGTGG GACTGGGCGG GGCCTGAATA CCCTCTGGCC	720
ACAAATAGTC TCCCCTGGCA TAAACCCCTCT TTCTCCCTTC CCAAACCCTC CCCTGGGAGG	780
TGGGTGCTTT GTGCATGGGG GTTCCTGCCC TCACATCCTC TGCCCCAGGC CTGGGCCTGC	840
GGGCCCCACT GAAGAAGACA ACTGCAGAAC AGGCAGAAGA GGATCTGTTG CAGGAGGCTC	900
AGGCCTTGGC AGAGGTAAGT GCTCAGGGAA AAGGGTAAGG TGGTGGCCCT TGGGAGGGGG	960
CATTGGGTAT TAGCTCCTCT CCCCAGCTCC AACTCCCTC ACCAGCGACG AACTACCGA	1020
CCACCCCTTC CCATGCTCCA CTGCCATCCT GCACAGGTTG GGACAGGTAA GATCCCTGGA	1080
TCTGTCTTTA GAGGCCTGTG CTGGTTCCCC ACCCCTGCAG GTACTAGACC TGCAGGACCG	1140
CGAGCCCCGC TCCTCACGTC GCTGCGTAAG GCTGCATGAG TCCTGCCTGG GACAGCAGGT	1200
GCCTTGCTGT GACCCATGTG CCACGTGCTA CTGCCGCTTC TTCAATGCCT TCTGCTACTG	1260
CCGCAAGCTG GGTACTGCCA TGAATCCCTG CAGCCGCACC TAGCTGGCCA ACGTCAGGGT	1320
CGGGGCTAGG GTAGGGGCAA GGAAACTCGA ATAAAGGATG GGACCAACCC CAAGGCTGTG	1380
GTTATTTCAA ACGTGGCCGT CAAAGGAGGG AGGGTTCATG GAGGGGGTGG GAGTGTACCC	1440
AAGCCAAGAA ACCACACATA CTCTTATCCC AGGGCCTGGG CTACCCTATC ATAGGAGGCA	1500
CATACACGGG CGCTTTTAGG GGTCCCTGGTG CCCCTGGGAA AAATAGAGAA GAGCCGCACT	1560
CCAGCTTTTG AAAATCTTGT ACAGCAAGTG CGGGGAACGC AGGACGCAGC GTGGCACAGG	1620
GGCTATCACT CCTGGCTAAC AAATAAGCCT TAGGCTCCAG GGCTTGCTGC TACTTCCACG	1680
CAAAGCCTGC CCCTCATCCT GTTACCAGAG GGAAGGCCAG GAGTGTGCGT TGTTCCAGGC	1740
CTTAGCGTTT CGAACAAAGA ATTGAACAAA ACCCAGAAAG TAACAAACGA ATGACACACA	1800
GGAAGGAAGC AGACAGCTGG GATTTGTTAA AGCGAGAAAG CACTACGCAG GGTGGGAGTG	1860
GGCCTGAGCA AGAGGCTGAA GGGGCTCAGT TACAAAGTTT TCCGGGTTTT AAGTACTCCT	1920
TTTGCGGTCC CTGTCCGTTA CCCCTTATCT GGATGAAGGG TTTGGTCCAT GGCTAATTAA	1980
TCCATTTATG CCTGAGGTTG CAATCTTTTT GAATTTTTGC AATCAGACCT TGGCCATGAC	2040
CTTGAGCAGT AGGATATAAA TAACTCCCAT ATGCTTAGCG TTCCAATAAT GGAACACAAG	2100
GCATAAATGG GGCTAAGGTG AATTGGCGCC CTATGCAGAT GAAGGGATGG CCCGTGCTTG	2160
GCCCGCAGCC AATCCAAGGC ACTCTCCCTT TCAACTGAGA CGTGGTGGAA GGGGGAGGGT	2220
TGTGGGGACA GTGGCCTTTG ATCCTTTGTT ACTTGACAT GGGGAGATGG GGTTTTTCTT	2280
TTTGGTTTAG CTTTAGTAAG CTCGCCTTAG TTGGCCTCCG GTTCCCTGCC CCCAGACCTT	2340
GGTGTTTTCC CTTGATTCAG CTCAGAATT C	2371

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:5:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 830 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:5:

```

GGGCCCTCTA GATGCATGCT CGAGCGGCCG CCAGTGTGAT GGATATCTGC AGAATTCGGC      60
TTGGTCCCTG TCCTGTGGAA ATTTGTGGAC CCTGGGCACC CTCTCTTGCT CCCAAATTTT      120
AATCGGCTCC TGGAAACCTC ACCCCAAATT GGAGATAGGC ACTCCTCTTG TAGAACAAAA      180
GGCTCAGGTT CAGGGAGTGA GGGCCTGAAC TGTGCCCCCA CCCTCCAGGA AGGGTCCTTC      240
ACGGCCTGGC TGCAGGGATC AGTCACGTGT GGCCCTTCAT TAGGCCCTGC CATATAAGCC      300
AAAGGCACGG GGTGGCCGGG AACTCTCTAG GCAAGAATCC CGGAGGCAGA GGCCATGCTG      360
ACCGCAGCGG TGCTGAGCTG TGCCCTGCTG CTGGCACTGC CTGCCACGCG AGGAGCCCAG      420
ATGGGCTTGG CCCCCATGGA GGGCATCAGA AGGCCTGACC AGGCCCTGCT CCCAGAGCTC      480
CCAGGCCTGG GCCTGCGGGC CCCACTGAAG AAGACAACTG CAGAACAGGC AGAAGAGGAT      540
CTGTTGCAGG AGGCTCAGGC CTTGGCAGAG GTACTAGACC TGCAGGACCG CGAGCCCCGC      600
TCCTCACGTC GCTGCGTAAG GCTGCATGAG TCCTGCCTGG GACAGCAGGT GCCTTGCTGT      660
GACCCATGTG CCACGTGCTA CTGCCGCTTC TTCAATGCCT TCTGCTACTG CCGCAAGCTG      720
GGTACTGCCA TGAATCCCTG CAGCCGCACC TAGCTGGCCA ACGTCAGGGT CGGGGCTAGG      780
GTAGGGGCAA GGAAACTCGA ATAAAGGATG GGACCAACAA AAAAAAAAAA      830

```

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:6:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 479 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:6:

GCCATGCTGA CCGCAGCGGT GCTGAGCTGT GCCCTGCTGC TGGCACTGCC TGCCACGCGA	60
GGAGCCCAGA TGGGCTTGGC CCCCATGGAG GGCATCAGAA GGCCTGACCA GGCCCTGCTC	120
CCAGAGCTCC CAGGCCTGGG CCTGCGGGCC CCACTGAAGA AGACAACTGC AGAACAGGCA	180
GAAGAGGATC TGTTGCAGGA GGCTCAGGCC TTGGCAGAGG TACTAGACCT GCAGGACCGC	240
GAGCCCCGCT CCTCACGTCG CTGCGTAAGG CTGCATGAGT CCTGCCTGGG ACAGCAGGTG	300
CCTTGCTGTG ACCCATGTGC CACGTGCTAC TGCCGCTTCT TCAATGCCTT CTGCTACTGC	360
CGCAAGCTGG GTACTGCCAT GAATCCCTGC AGCCGCACCT AGCTGGCCAA CGTCAGGGTC	420
GGGGCTAGGG TAGGGGCAAG GAAACTCGAA TAAAGGATGG GACCAACAAA AAAAAAAAAA	479

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:7:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 132 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:7:

```

Met Leu Thr Ala Ala Val Leu Ser Cys Ala Leu Leu Leu Ala Leu Pro
1           5           10           15
Ala Thr Arg Gly Ala Gln Met Gly Leu Ala Pro Met Glu Gly Ile Arg
           20           25           30

Arg Pro Asp Gln Ala Leu Leu Pro Glu Leu Pro Gly Leu Gly Leu Arg
           35           40           45

Ala Pro Leu Lys Lys Thr Thr Ala Glu Gln Ala Glu Glu Asp Leu Leu
           50           55           60

Gln Glu Ala Gln Ala Leu Ala Glu Val Leu Asp Leu Gln Asp Arg Glu
65           70           75           80

Pro Arg Ser Ser Arg Arg Cys Val Arg Leu His Glu Ser Cys Leu Gly
           85           90           95

Gln Gln Val Pro Cys Cys Asp Pro Cys Ala Thr Cys Tyr Cys Arg Phe
           100          105          110

Phe Asn Ala Phe Cys Tyr Cys Arg Lys Leu Gly Thr Ala Met Asn Pro
           115          120          125

Cys Ser Arg Thr
           130

```

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:8:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 54 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:8:

```

Arg Glu Pro Arg Ser Ser Arg Arg Cys Val Arg Leu His Glu Ser Cys
1           5           10           15

Leu Gly Gln Gln Val Pro Cys Cys Asp Pro Cys Ala Thr Cys Tyr Cys
           20           25           30

Arg Phe Phe Asn Ala Phe Cys Tyr Cys Arg Lys Leu Gly Thr Ala Met
           35           40           45

Asn Pro Cys Ser Arg Thr
           50

```

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:9:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 734 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:9:

```

ATGCTGACTG CAATGTTGCT GAGTTGTGTT CTGCTGTTGG CACTGCCTCC CACTGGGG      60
GTCCAGATGG GCGTGGCTCC ACTGAAGGGC ATCAGAAGGC CTGACCAGGC TCTGTTCCCA      120
GAGTCCCAG GTGAGTATGG TCAGGTTGGG GATATGTGGG GCAACGACCA TTGCTGGCCA      180
CAGACCTGCC CGCCCAGGCT TAGACCTCCT TCCCCAATCC CAATCCCAAC CTAGGGAGGT      240
GGGTACTTGG TGCATGGTGG GTGTGGCCCT CACATCTTCT GCCCCAGGTC TAAGTCTGAA      300
TGGCCTCAAG AAGACAACTG CAGACCGAGC AGAAGAAGTT CTGCTGCAGA AGGCAGAAGC      360
TTTGGCGGAG GTAACCTATT AGGGAAAGGG ATAAAGTAGA AGGTAGGGCG CATCAGATAC      420
CATCATCTCT CCCCCTTCC GGATTACCCA ACCTGGGCAG AACTGCAGCC CCTCCCTGAC      480
CTCAGTCCAC TGCCACCCTA CTGGGGTCGG GGTTTGAGAG TTTCTGAAC CTTATTCCCC      540
TACGAATGCA GGTGCTAGAT CCACAGAACC GCGAGTCTCG TTCTCCGCGT CGCTGTGTAA      600
GGCTGCACGA GTCCTGCTTG GGACAGCAGG TACCTTGCTG CGACCCGTGC GCTACGTGCT      660
ACTGCCGCTT CTTCAATGCC TTTTGCTACT GCCGCAAGCT GGGTACGGCC ACGAACCTCT      720
GTAGTCGCAC CTAG                                     734

```

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:10:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 131 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:10:

```

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

```

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:11:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 132 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:11:

```

Met Leu Thr Ala Ala Val Leu Ser Cys Ala Leu Leu Leu Ala Leu Pro
1           5           10           15

Ala Thr Arg Gly Ala Gln Met Gly Leu Ala Pro Met Glu Gly Ile Arg
20           25           30

Arg Pro Asp Gln Ala Leu Leu Pro Glu Leu Pro Gly Pro Gly Leu Arg
35           40           45

Ala Pro Leu Lys Lys Thr Thr Ala Glu Gln Ala Glu Glu Asp Leu Leu
50           55           60

Gln Glu Ala Gln Ala Leu Ala Glu Val Leu Asp Leu Gln Asp Arg Glu
65           70           75           80

Pro Arg Ser Ser Arg Arg Cys Val Arg Leu His Glu Ser Cys Leu Gly
85           90           95

Gln Gln Val Pro Cys Cys Asp Pro Cys Ala Thr Cys Tyr Cys Arg Phe
100          105          110

Phe Asn Ala Phe Cys Tyr Cys Arg Lys Leu Gly Thr Ala Met Asn Pro
115          120          125

Cys Ser Arg Thr
130

```

Patentansprüche

1. Nukleinsäuremolekül, das für ein Polypeptid kodiert, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus:

- (a) dem Nukleinsäuremolekül der SEQ ID Nr. 4,
- (b) dem Nukleinsäuremolekül der SEQ ID Nr. 5,
- (c) dem Nukleinsäuremolekül der SEQ ID Nr. 6,
- (d) dem Nukleinsäuremolekül der SEQ ID Nr. 9,
- (e) einem Nukleinsäuremolekül, das für das Polypeptid der SEQ ID Nr. 7 kodiert,
- (f) einem Nukleinsäuremolekül, das für das Polypeptid der SEQ ID Nr. 8 kodiert,
- (g) einem Nukleinsäuremolekül, das für das Polypeptid der SEQ ID Nr. 10 kodiert,
- (h) einem Nukleinsäuremolekül, das für das Polypeptid der SEQ ID Nr. 11 kodiert,
- (i) einem Nukleinsäuremolekül, das für ein Polypeptid kodiert, das zu mindestens 70 Prozent identisch ist zu dem Polypeptid der SEQ ID Nr. 7, SEQ ID Nr. 8, SEQ ID Nr. 10 oder SEQ ID Nr. 11, wobei das Polypeptid die biologische Aktivität der Erhöhung der Nahrungsaufnahme in einem Säuger aufweist, und
- (j) einem Nukleinsäuremolekül, das das Komplement zu einem von (a)–(i) oben ist.

2. Das Nukleinsäuremolekül, das SEQ ID Nr. 4 ist.
3. Das Nukleinsäuremolekül, das SEQ ID Nr. 5 ist.
4. Nukleinsäuremolekül gemäß SEQ ID Nr. 6.
5. Nukleinsäuremolekül gemäß SEQ ID Nr. 9.
6. Nukleinsäuremolekül, das für das Polypeptid der SEQ ID Nr. 7 kodiert.
7. Nukleinsäuremolekül, das für das Polypeptid der SEQ ID Nr. 8 kodiert.
8. Nukleinsäuremolekül, das für das Polypeptid der SEQ ID Nr. 10 kodiert.
9. Nukleinsäuremolekül, das für das Polypeptid der SEQ ID Nr. 11 kodiert.
10. Vektor, umfassend das Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 1.
11. Vektor, umfassend das Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 2.
12. Vektor, umfassend das Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 3.
13. Vektor, umfassend das Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 4.
14. Vektor, umfassend das Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 5.
15. Vektor, umfassend das Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 6.
16. Vektor, umfassend das Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 9.
17. Wirtszelle, umfassend den Vektor nach Anspruch 10.
18. Wirtszelle, umfassend den Vektor nach Anspruch 11.
19. Wirtszelle, umfassend den Vektor nach Anspruch 12.
20. Wirtszelle, umfassend den Vektor nach Anspruch 13.
21. Wirtszelle, umfassend den Vektor nach Anspruch 14.
22. Wirtszelle, umfassend den Vektor nach Anspruch 15.
23. Wirtszelle, umfassend den Vektor nach Anspruch 16.

24. Verfahren zur Herstellung eines Agouti-zusammenhängenden (ART) Polypeptids, umfassend die Schritte von

- (a) Exprimieren eines Polypeptids, das durch die Nukleinsäure nach Anspruch 1 kodiert wird, in einem geeigneten Wirt, und
- (b) Isolieren des Polypeptids.

25. Verfahren nach Anspruch 24, wobei das Polypeptid ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus: SEQ ID Nr. 7, SEQ ID Nr. 8, SEQ ID Nr. 10 und SEQ ID Nr. 11.

26. Agouti-zusammenhängendes (ART) Polypeptid, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus:

- (a) dem Polypeptid der SEQ ID Nr. 7,
- (b) dem Polypeptid der SEQ ID Nr. 8,
- (c) dem Polypeptid der SEQ ID Nr. 10,
- (d) dem Polypeptid der SEQ ID Nr. 11,
- (e) einem biologisch aktiven Fragment des Polypeptids nach (a), (b), (c) oder (d), wobei das Fragment die biologische Aktivität der Erhöhung der Nahrungsaufnahme in einem Säuger aufweist, und

(f) einem Polypeptid, das zu mindestens 70 Prozent identisch ist zu dem Agoutizusammenhängenden (ART) Polypeptid nach einem von (a) bis (d), wobei das Polypeptid die biologische Aktivität der Erhöhung der Nahrungsaufnahme in einem Säuger aufweist.

27. Das ART Polypeptid nach Anspruch 26, das kein Amino-terminales Methionin aufweist.

28. Das ART Polypeptid nach Anspruch 26, das ein Amino-terminales Methionin aufweist.

29. Nicht-therapeutisches Verfahren zur Erhöhung der Nahrungsaufnahme in einem Säuger, umfassend Verabreichen des Polypeptids, das durch eine Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 9 kodiert wird oder dem Polypeptid nach einem der Ansprüche 26 bis 28 an den Säuger.

30. Polypeptid, das durch die Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 9 kodiert wird oder das Polypeptid nach einem der Ansprüche 26 bis 28 zur Verwendung in einem Verfahren zur Erhöhung der Nahrungsaufnahme in einem Säuger.

31. Verwendung eines Polypeptids, das durch die Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 9 kodiert wird oder eines Polypeptid nach einem der Ansprüche 26 bis 28 zur Herstellung eines Medikaments zur Erhöhung der Nahrungsaufnahme in einem Säuger.

32. Therapeutische Zusammensetzung, umfassend ein Polypeptid, das durch die Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 9 kodiert wird oder ein Polypeptid nach einem der Ansprüche 26 bis 28 und einen physiologisch akzeptablen Träger, Hilfsstoff oder Verdünnungsmittel.

Es folgen 11 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

Figur 1 A

GAATTCTTGG AAGCACAGGA AACAAATGC CACATAGGGG TTGAGTAAGC ATCTCTGGGG	60
CCACAAATTA AATTAAAGCTT TCAGGGCCGC CTGCCCTTGTT ATTGCTAATG GTTCTAGCCC	120
TGCTCAGCTC CTAGGTCCCT GTCCTGTGGA AATTGTGTGA CCCTGGGCAC CCTCTCTTGC	180
TCCCAAATTT TAATCGGCTC CTGGAAACCT CACCCCAAAT TGGAGATAGG CACTCCTCTT	240
GTAGAACAAA AGGCTCAGGT TCAGGGAGTG AGGGCCTGAA CTGTGCCCCC ACCCTCCAGG	300
AAGGGTCCTT CACGGCCTGG CTGCAGGGAT CAGTCACGTG TGGCCCTTCA TTAGGCCCTG	360
CCATATAAGC CAAGGGCACG GGGTGGCCGG GAACTCTCTA GGCAAGAATC CCGGAGGCAG	420
AGGTGAGTCC TCAGGTTGGG CAGGGACTCC TCCTCTCTGT GGGGTCTCTA TCTGGGCACC	480
TAGAGGGGAC TCCAAGGATA AGGAGGGACT AAGTGGTACA TCTTCCTGCT GAGCCAGGCC	540
ATGCTGACCG CAGCGGTGCT GAGCTGTGCC CTGCTGCTGG CACTGCCTGC CACGCGAGGA	600
GCCCAGATGG GCTTGGCCCC CATGGAGGGC ATCAGAAGGC CTGACCAGGC CCTGCTCCCA	660
GAGCTCCCAG GTCAGTGTGA GCAAGGGTGG GACTGGGCGG GGCCTGAATA CCCTCTGGCC	720
ACAAATAGTC TCCCCTGGCA TAAACCCTCT TTCTCCCTTC CCAAACCCTC CCCTGGGAGG	780
TGGGTGCTTT GTGCATGGGG GTTCCTGCCC TCACATCCTC TGCCCCAGGC CTGGGCCTGC	840
GGGCCCCACT GAAGAAGACA ACTGCAGAAC AGGCAGAAGA GGATCTGTTG CAGGAGGCTC	900
AGGCTTGGC AGAGGTAAC TCTCAGGAA AAGGGTAAGG TGGTGGCCCT TGGGAGGGGG	960
CATTGGGTAT TAGCTCCTCT CCCAGCTCC AAACCTCCCTC ACCAGCGACG AACTACCGA	1020
CCACCCCTTC CCATGCTCCA CTGCCATCCT GCACAGGTTG GGACAGGTAA GATCCCTGGA	1080
TCTGTCTTTA GAGGCCTGTG CTGGTTCCCC ACCCTGTCAG GTACTAGACC TGCAGGACCG	1140
CGAGCCCCGC TCCTCACGTC GCTGCGTAAG GCTGCATGAG TCCTGCCTGG GACAGCAGGT	1200
GCCTTGCTGT GACCCATGTG CCACGTGCTA CTGCCGCTTC TTCAATGCCT TCTGCTACTG	1260
CCGCAAGCTG GGTACTGCCA TGAATCCCTG CAGCCGCACC TAGCTGGCCA ACGTCAGGGT	1320
CGGGGCTAGG GTAGGGGCAA GGAAACTCGA ATAAAGGATG GGACCAACCC CAAGGCTGTG	1380
GTTATTTCAA ACGTGGCCGT CAAAGGAGGG AGGGTTCATG GAGGGGGTGG GAGTGTACCC	1440
AAGCCAAGAA ACCACACATA CTCTTATCCC AGGGCCTGGG CTACCCTATC ATAGGAGGCA	1500
CATACACGGG CGCTTTTAGG GGTCTGGTG CCCCTGGGAA AAATAGAGAA GAGCCGCACT	1560
CCAGCTTTCG AAAATCTTGT ACAGCAAGTG CGGGGAACGC AGGACGCAGC GTGGCACAGG	1620

Figur 1 B

GGCTATCACT CCTGGCTAAC AAATAAGCCT TAGGCTCCAG GGCTTGCTGC TACTTCCACG	1680
CAAAGCCTGC CCTTCATCCT GTTACCAGAG GGAAGGCCAG GAGTGTGCGT TGTTCAAGTC	1740
CTTAGCGTTT CGAACAAAGA ATTGAACAAA ACCCAGAAAG TAACAAACGA ATGACACACA	1800
GGAAGGAAGC AGACAGCTGG GATTTGTATA AGCGAGAAAG CACTACGCAG GGTGGGAGTG	1860
GGCCTGAGCA AGAGGCTGAA GGGGCTCAGT TACAAAGTTT TCCGGGTTTT AAGTACTCCT	1920
TTTGGGGTCC CTGTCCGGTA CCCCTTATCT GGATGAAGGG TTTGGTCCAT GGCTAATTAA	1980
TCCATTATG CCTGAGGTTG CAATCTTTTT GAATTTTTCG AATCAGACCT TGGCCATGAC	2040
CTTGAGCAGT AGGATATATA TAACTCCGCAT ATGCTTAGCG TTCCAATAAT GGAACACAAG	2100
GCATAAATGG GGCTAAGGTG AATTGGGGCC CTATGCAGAT GAAAGGATGG CCCGTGCTTG	2160
GCCCCGAGCC AATCCAAGC ACTCTCCCCT TCAACTGAGA CGTGGTGGAA GGGGGAGGCT	2220
TGTGGGGACA GTGGCCTTTG ATCCTTTTGT ACTTGGACAT GGGGAGATGG GGTTTTTCCT	2280
TTTGGTTTAG CTTTAGTAAG CTCGCCCTAG TTGGCCTCCG GTTCCCCTGCC CCCAGACCTT	2340
GGTGTTTTCC CTTGATTCAG CTTCAGAAAT C	2371

Figur 2

```

GGGCCCCTCTA GATGCATGCT CGAGCGGCGG CCAGTGTGAT GGATATCTGC AGAATTCGGC   60
TTGGTCCCCTG TCCTGTGGAA ATTGTGGAC CCTGGGCACC CTCTCTTGCT CCCAAATTTT   120
AATCGGCTCC TGGAAACCTC ACCCCAAATT GGAGATAGGC ACTCCTCTTG TAGAACAAAA   180
GGCTCAGGTT CAGGAGTGA GGGCCTGAAC TGTGCCCCCA CCTCCAGGA AGGGTCCTTC   240
ACGGCCTGGC TGCAGGGATC AGTCACGTGT GGCCCTTCAT TAGGCCCTGC CATATAAGCC   300
AAAGGCACGG GGTGGCCGGG AACTCTCTAG GCAAGAATCC CGGAGGCAGA GGCCATGCTG   360
ACCGCAGCGG TGCTGAGCTG TGCCCTTGCTG CTGSCACTGC CTGCCACGG AGGAGCCCCAG   420
ATGGGCTTGG CCCCCATGGA GGGCATCAGA AGGCCTGACC AGGCCCTGCT CCCAGAGCTC   480
CCAGGCCCTGG GCCTGCGGGC CCCACTGAAG AAGACAACTG CAGAACAGGC AGAAGAGGAT   540
CTGTTGCAGG AGGCTCAGGC CTTGGCAGAG GTACTAGACC TGCAGGACCG CGAGCCCCCG   600
TCCTCACGTC GCTGCGTAAG GCTGCAATGAG TCCTGCGCTGG GACAGCAGGT GCCTTGCTGT   660
GACCCATGTG CCACGTGCTA CTGCGGCTTC TTCAATGCCT TCTGCTACTG CCGCAAGCTG   720
GGTACTGCCA TGAATCCCTG CAGCCGCACC TAGCTGGCCA ACGTCAGGA GCCGAATTCC   780
AGCACACTGG CGGCCGTTAG TAGTGGATCC   810

```

Figur 3

```

GCCATGCTGA CCGCAGCGGT GCTGAGCTGT GCCCTGCTGC TGGCACTGCC TGCCACGCGA    60
GGAGCCCAGA TGGGCTTGGC CCCCATGGAG GGCATCAGAA GGCCTGACCA GGCCCTGCTC    120
CCAGAGCTCC CAGGCCCTGGG CCTGCGGGCC CCACTGAAGA AGACAACCTGC AGAACAGGCA    180
GAAGAGGATC TGTTCAGGA GGCTCAGGCC TTGGCAGAGG TACTAGACCT GCAGGACCGC    240
GAGCCCCGCT CCTCACGTCG CTGCGTAAGG CTGCATGAGT CCTGCCCTGG ACAGCAGGTG    300
CCTTGCTGTG ACCCATGTGC CACGTGCTAC TGCCGCTTCT TCAATGCCTT CTGCTACTGC    360
CGCAAGCTGG GTACTGCCAT GAATCCCTGC AGCCGCACCT AGCTGGCCAA CGTCAGGAAG    420
CCGAATTCCA GCACACTGGC GGCCGTTACT AGTGGATCC                                459

```

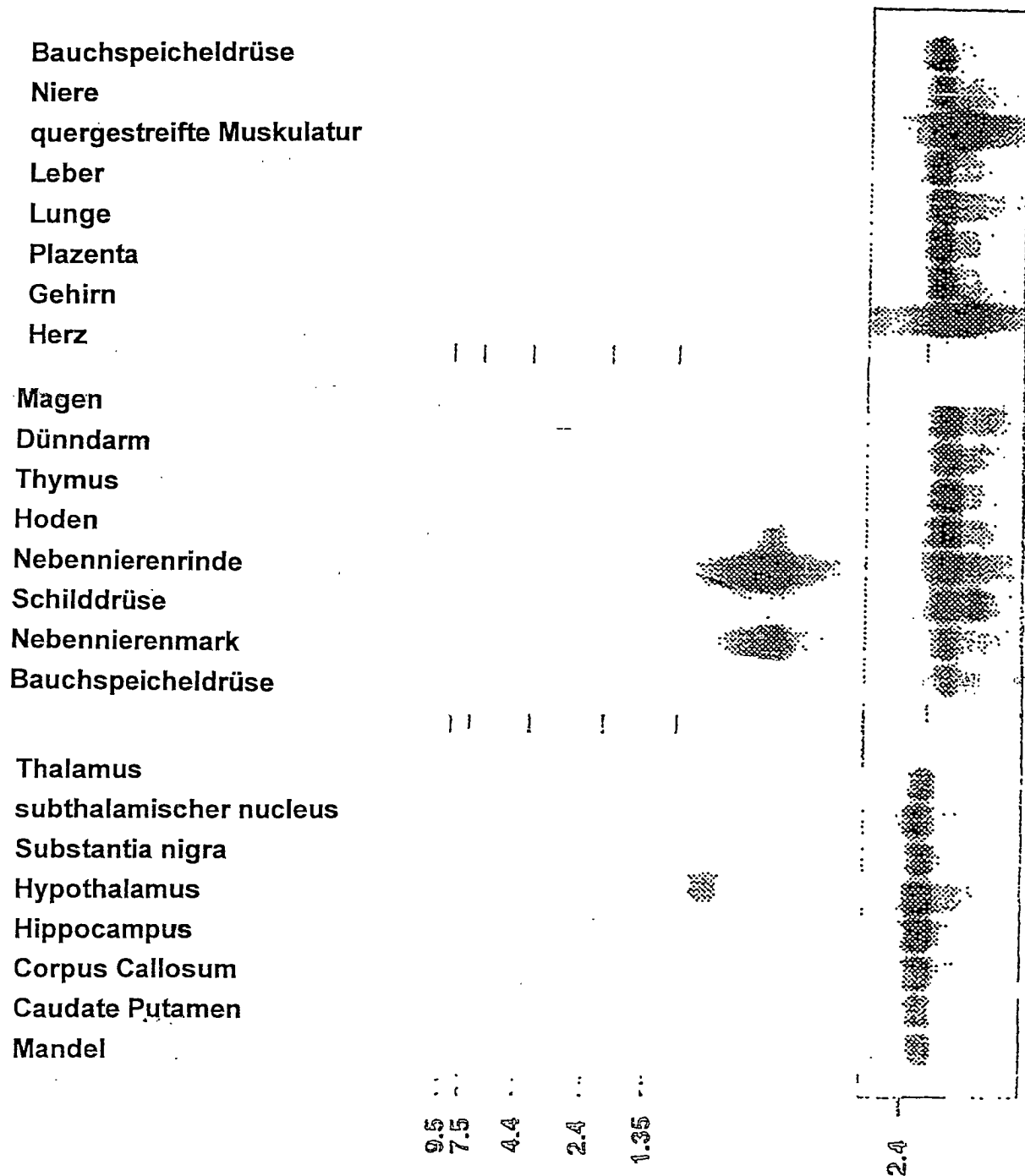
Figur 4

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

Figur 5

Arg Glu Pro Arg Ser Ser Arg Arg Cys Val Arg Leu His Glu Ser Cys
 1 5 10 15
 Leu Gly Gln Gln Val Pro Cys Cys Asp Pro Cys Ala Thr Cys Tyr Cys
 20 25 30
 Arg Phe Phe Asn Ala Phe Cys Tyr Cys Arg Lys Leu Gly Thr Ala Met
 35 40 45
 Asn Pro Cys Ser Arg Thr
 50

Figur 6



Figur 7

```

ATGCTGACTG CAATGTTGCT GAGTTGTGTT CTGCTGTTGG CACTGCCTCC CACTCTGGGG      60
GTC CAGATGG GCGTGGCTCC ACTGAAGGC ATCAGAAGGC CTGACCAGGC TCTGTTCCCA      120
GAGT TCCCAG GTGAGTATGG TCAGGTTGGG GATATGTGGG GCAACGACCA TTGCTGGCCA      180
CAGACCTGCC CGCCCAGGCT TAGACCTCCT TCCCCAATCC CAATCCCAAC CTAGGGAGGT      240
GGGTACTTGG TGCATGGTGG GTGTGGCCCT CACATCTTCT GCCCCAGGTC TAAGTCTGAA      300
TGGCCTCAAG AAGACAACCTG CAGACCGAGC AGAAGAAGTT CTGCTGCAGA AGGCAGAAGC      360
TTTGCGGGAG GTAAC TCAATT AGGCAAAAGG ATAAGTAGA AGGTAGGGCG CATCAGATAC      420
CATCATCTCT CCCCACTTCC GGATTACCCA ACCTGGGCAG AACTGCAGCC CCTCCCTGAC      480
CTCAGTCCAC TGCCACCCCTA CTGGGTCGG GGT TTGAGAG TTTCTCTGAAC CTATATCCCC      540
TACGAATGCA GGTGCTAGAT CCAGAGAACC GCGAGTCTCG TTCTCCGCGT CGCTGTGTAA      600
GGCTGCACGA GTCCTGCTTG GGACAGCAGG TACCTTGCTG CGACCCGTGC GCTACGTGCT      660
ACTGCCGCTT CTTCAATGCC TTTTGCTACT GCCGCAAGCT GGTACGGCC ACGAACCTCT      720
GTAGTCGCAC CTAG

```

Figur 8

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

Figur 9

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

Figur 10

