



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 601 28 066 T2** 2007.12.27

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 254 174 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **601 28 066.0**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US01/03267**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **01 906 861.8**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2001/055210**

(86) PCT-Anmeldetag: **31.01.2001**

(87) Veröffentlichungstag  
der PCT-Anmeldung: **02.08.2001**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **06.11.2002**

(97) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung beim EPA: **25.04.2007**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **27.12.2007**

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: **C07K 14/475** (2006.01)

**G01N 33/68** (2006.01)

**C12N 15/63** (2006.01)

**A01K 67/027** (2006.01)

**A61P 19/04** (2006.01)

**A61P 9/00** (2006.01)

**A61P 21/00** (2006.01)

**A61K 48/00** (2006.01)

**C07K 7/08** (2006.01)

(30) Unionspriorität:

**495448**      **31.01.2000**      **US**

**204364 P**      **15.05.2000**      **US**

**238705 P**      **06.10.2000**      **US**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(73) Patentinhaber:

**Munin Corporation, Chicago, Ill., US**

(72) Erfinder:

**LAU, Lester F., Chicago, IL 60657, US; YEUNG,  
Cho-Yau, Oak Park, IL 60302, US; GREENSPAN,  
Jeffrey A., Chicago, IL 60657, US**

(74) Vertreter:

**LEINWEBER & ZIMMERMANN, 80331 München**

(54) Bezeichnung: **HUMANES CYR61**

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****GEBIET DER ERFINDUNG**

**[0001]** Die vorliegende Erfindung betrifft Materialien und Verfahren im Zusammenhang mit einem isolierten Cyr61-Fragment, das zumindest eine biologische Funktion von menschlichem Cyr61 behält, worin das Fragment eine Sequenz aus Aminosäuren innerhalb der Domäne III von Cyr61 mit Seq.-ID Nr. 2 oder von menschlichem Cyr61 mit Seq.-ID Nr. 4 umfasst und aus Seq.-ID Nr. 33 besteht oder aus einer Aminosäuresequenz besteht, die zu zumindest 95 % ähnlich zu Seq.-ID Nr. 33 ist.

**HINTERGRUND DER ERFINDUNG**

**[0002]** Das Wachstum von Säugetierzellen ist durch Polypeptid-Wachstumsfaktoren streng reguliert. Im erwachsenen Tier sind die meisten Zellen metabolisch aktiv, sind jedoch in Bezug auf die Zellteilung ruhend. Unter bestimmten Bedingungen können diese Zellen stimuliert werden, um wieder in den Zellzyklus einzutreten und sich zu teilen. So wie die ruhenden Zellen in die aktiven Wachstums- und Teilungsphasen des Zellzyklus wiedereintreten, werden eine Reihe von spezifischen Genen, die unmittelbar frühen Gene, rasch aktiviert. Der Wiedereintritt in den aktiven Zellzyklus ist notwendigerweise streng reguliert, da ein Zusammenbruch dieser Kontrolle unkontrolliertes, häufig als Krebs erkanntes Wachstum bewirken kann. Der kontrollierte Wiedereintritt bestimmter Zellen in die Wachstumsphase ist für solche Prozesse wie Angiogenese (z.B. Blutgefäß-Wachstum und -Reparatur), Chondrogenese (z.B. Skelettentwicklung und Prothesenintegration), Onkogenese (z.B. Krebszellenmetastase und Tumor-Neovaskularisierung) und andere ein Wachstum erfordernde Prozesse essenziell.

**[0003]** Angiogenese, die Bildung neuer Blutgefäße aus den Endothelzellen bereits bestehender Blutgefäße, ist ein komplexer Vorgang, der ein sich veränderndes Profil der Endothelzellen-Genexpression in Verbindung mit Zellmigration, -vermehrung und -differenzierung umfasst. Angiogenese beginnt mit lokalisertem Abbau der Basalmembran des Stamm-Gefäßes. In vivo unterstützen die Basalmembranen (in erster Linie aus Laminin, Collagen Typ IV, Nidogen/Entacin und Proteoglykan zusammengesetzt) die Endothelzellen und sorgen für eine Barriere, die diese Zellen vom darunter liegenden Stroma trennt. Die Basalmembran beeinflusst ferner eine Vielzahl von biologischen Aktivitäten, einschließlich Zelladhäsion, -migration und -wachstum während Entwicklung und Differenzierung.

**[0004]** Nach dem Abbau der Basalmembran migrieren Endothelzellen vom Stamm-Gefäß weg in die interstitielle extrazelluläre Matrix (ECM), zumindest teilweise aufgrund chemisch anziehend wirkender Gradienten. Die migrierenden Endothelzellen bilden einen Kapillarspross, der sich streckt. Diese Streckung ist das Ergebnis von Migration und Vermehrung von Zellen im Spross. In der führenden Kapillarspitze lokalisierte Zellen migrieren zum angiogenen Stimulus, synthetisieren jedoch keine DNA und teilen sich nicht. Unterdessen unterziehen sich hinter diesen führenden Spitzenzellen andere Endothelzellen einer schnellen Teilung, um eine ausreichende Versorgung von Endothelzellen zur Bildung des neuen Gefäßes sicherzustellen. Kapillarsprossen verzweigen sich dann an ihren Spitzen, die Zweige erfahren Anastomose oder vereinigen sich miteinander, um ein Lumen zu bilden, die Basalmembran wird wiederhergestellt, und es wird eine Gefäßverbindung errichtet, was zum Blutfluss führt.

**[0005]** Veränderungen von zumindest drei Endothelzellen-Funktionen treten während der Angiogenese auf: 1) Modulierungen der Wechselwirkungen mit der ECM, die Änderungen der Zellmatrixkontakte und die Herstellung von Matrix-abbauenden proteolytischen Enzymen erfordern; 2) eine anfängliche Erhöhung und anschließende Verminderung der Endothelzellen-Migration, was eine Zellverlagerung zum angiogenen Stimulus bewirkt; und 3) ein vorübergehender Anstieg der Zellvermehrung, die Zellen für das wachsende und sich streckende Gefäß bereitstellt, mit einer anschließenden Rückkehr zum ruhenden Zellzustand, wenn sich das Gefäß gebildet hat. Diese drei Funktionen werden durch adhäsive, chemotaktische und mitogene Wechselwirkungen bzw. Reaktionen verwirklicht. Daher erfordert die Kontrolle der Angiogenese den Eingriff in drei unterschiedliche Zellaktivitäten: 1) Zelladhäsion, 2) Zellmigration und 3) Zellvermehrung. Ein weiterer biologischer Prozess, der eine ähnlich komplexe Reihe von Zellaktivitäten umfasst, ist die Chondrogenese.

**[0006]** Chondrogenese ist der für die Skelettorganisation verantwortliche Zellprozess, einschließlich der Entwicklung von Knochen und Knorpel. Chondrogenese umfasst wie Angiogenese den kontrollierten Wiedereintritt ruhender Zellen in die Wachstumsphase des Zellzyklus. Der Wachstumsphasenübergang ist mit veränderten Zelladhäsionseigenschaften, veränderten Mustern von Zellmigration und vorübergehend erhöhter Zellvermehrung verbunden. Chondrogenese umfasst die anfängliche Entwicklung chondrogener Fähigkeit (d.h. des

protodifferenzierten Stadiums) durch primitive undifferenzierte Mesenchymzellen. Dieses Stadium umfasst die Produktion Chondrozyten-spezifischer Marker ohne die Fähigkeit, eine typische Knorpel-ECM zu bilden. Anschließend entwickeln die Zellen die Fähigkeit, eine Knorpel-spezifische ECM zu produzieren, wenn sie sich zu Chondrozyten entwickeln. Langille, *Microscop. Res. & Tech.* 28, 455-469 (1994). Chondrozyten-Migration, -Adhäsion und -Vermehrung tragen zur Entwicklung des knöchernen und knorpeligen Skeletts bei. Die abnormale Elaboration der programmierten Entwicklung von Zellen, die am Prozess der Chondrogenese teilnehmen, resultiert in Skelettdefekten, die Probleme aufwirft, die von kosmetischen Belangen bis zu lebensbedrohenden Störungen reichen.

**[0007]** Wie die Angiogenese und Chondrogenese ist die Onkogenese durch Veränderungen der Zelladhäsion, -migration und -vermehrung charakterisiert. Metastasierende Krebszellen zeigen veränderte Adhäsions- und Migrationseigenschaften. Die Etablierung von Tumormassen erfordert eine erhöhte Zellvermehrung und die Elaboration der Zelleigenschaften, die für Angiogenese während der Neovaskularisierung von Tumoren charakteristisch ist.

**[0008]** Die abnormale Progression von Angiogenese oder Chondrogenese sowie die bloße Progression der Onkogenese beeinträchtigt die Lebensqualität für befallene Individuen wesentlich und erhöht die Kosten der modernen medizinischen Versorgung. Die diesen komplexen biologischen Prozessen gemeinsamen Eigenschaften, die veränderte Zelladhäsion, -migration und -vermehrung umfassen, legen nahe, dass Mittel, die zur Beeinflussung aller drei dieser Zellaktivitäten fähig sind, zum Screenen und Modulieren der oben genannten komplexen biologischen Prozesse wirksam sein sollten. Obgleich die Wissenschaft von Mitteln Kenntnis hat, die die einzelnen Zellaktivitäten beeinflussen, z.B. Integrine und Selectine (Zelladhäsion), Chemokine (Zellmigration) und eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren oder Zytokinen (Zellvermehrung), ist bis vor kurzem kein Mittel identifiziert worden, das einen Einfluss auf alle drei Zellaktivitäten im Menschen ausübt.

**[0009]** Maus-Cyr61 (CYstein-Reiches Protein) ist ein Protein, das in aktiv wachsenden und sich teilenden Zellen exprimiert wird, das möglicherweise alle diese drei Zellaktivitäten beeinflusst. RNase-Schutz-Analysen haben gezeigt, dass das für Maus-Cyr61 kodierende Gen, Maus-cyr61, im sich entwickelnden Mausembryo transkribiert wird. O'Brian et al., *Cell Growth & Diff.* 3, 645-654 (1992). In-situ-Hybridisierungsanalyse zeigte, dass die Expression von cyr61 während der Maus-Embryogenese eng mit der Differenzierung von aus Ektoderm und Mesoderm hergeleiteten Mesenchymzellen in Chondrozyten korreliert. Zusätzlich wird cyr61 in den Gefäßwänden des sich entwickelnden Kreislaufsystems exprimiert. Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass Maus-cyr61 während der Zellvermehrung und -differenzierung exprimiert wird, die Charakteristika der Expression von Genen sind, die an den Regulationskaskaden beteiligt sind, die den Zellwachstumszyklus kontrollieren.

**[0010]** Die weitere Charakterisierung des Cyr61-Polypeptids ist durch das Unvermögen behindert worden, brauchbare Mengen des Proteins zu reinigen. Bemühungen, Cyr61 in größeren Mengen durch Überexpression aus entweder eukaryotischen oder prokaryotischen Zellen zu reinigen, gelingen typischerweise nicht. Yang, University of Illinois at Chicago, Dissertation (1993). Ein mit dem Versuch, brauchbare Mengen von Cyr61 zu erhalten, verbundenes Problem ist die Reduktion der Säugetierwachstumsraten, die durch die Überexpression von Cyr61 induziert wird. Ein weiteres Problem bei der Cyr61-Reinigung ist, dass sich das Cystein-reiche Polypeptid, wenn es unter Anwendung rekombinanter DNA-Techniken in Bakterienzellen exprimiert wird, häufig in unlöslichen Proteinmassen findet. Trotzdem ist Cyr61 als ein Polypeptid von 349 Aminosäuren charakterisiert worden, das 39 Cysteinreste, eine hydrophobe mutmaßliche N-terminale Signalsequenz und potentielle N-gebundene Glykosylierungsstellen (Asn<sub>28</sub> und Asn<sub>235</sub>) enthält. US-Patent Nr. 5.408.040 bei Spalte 3, Zeilen 41-54, Grotendorst et al. (das „040“-Patent). In jüngster Zeit sind mit Cyr61 verwandte Proteine charakterisiert worden. Beispielsweise ist ein Humanprotein, Bindegewebswachstumsfaktor (CTGF), identifiziert worden. (Siehe 040-Patent). CTGF wird in aktiv wachsenden Zellen, wie z.B. Fibroblasten und Endothelzellen, exprimiert (040-Patent, in Spalte 5, Zeilen 62-64), ein Expressionsmuster, das von Cyr61 geteilt wird. Bezüglich der Funktion ist CTGF als Proteinwachstumsfaktor beschrieben worden, da seine Mitogenität zu seiner primären biologischen Aktivität erklärt worden ist (040-Patent, Spalte 2, Zeilen 25-27 und 53-55). Zusätzlich zeigt CTGF angeblich chemotaktische Aktivität. 040-Patent, Spalte 2, Zeilen 56-59. Bezüglich ihrer Struktur sind die für CTGF kodierende Polynucleotidsequenz und die Aminosäuresequenz von CTGF publiziert worden. 040-Patent, Seq.-ID Nr. 7 bzw. Seq.-ID Nr. 8.

**[0011]** Ein weiteres, scheinbar verwandtes Protein ist das Mausprotein Fisp12 (Fibroblasten-Sekretiertes Protein). Fisp12 ist einer Aminosäuresequenzanalyse unterzogen worden, was eine an Cystein reiche Primärstruktur offenbarte. Ryseck et al., *Cell Growth & Diff.* 2, 225-233 (1991). Das Protein besitzt auch eine hydrophobe N-terminale Sequenz, die eine für sekretierte Proteine charakteristische Signalsequenz andeutet.

**[0012]** Sequenzanalysen, die Cyr61, Fisp12, CTGF und andere Proteine umfassen, haben zur Identifizierung einer Familie Cystein-reicher sekretierter Proteine beigetragen. Elemente der Familie weisen ähnliche Primärstrukturen auf, die von Genen kodiert werden, die ähnliche Sequenzen aufweisen. Jedes der Proteine in dieser aufkommenden Familie ist weiters durch die Gegenwart einer hydrophoben N-terminalen Signalsequenz und 38 Cysteinresten in den sekretierten Formen des Proteins gekennzeichnet. Elemente der Familie, die bis dato identifiziert sind, umfassen die oben genannten Cyr61 (Human und Maus), Fisp12 (Maus) und CTGF (das Human-Ortholog von Fisp12) sowie CEF10 (Huhn) und Nov (vogelartig).

**[0013]** Eine von mehreren Anwendungen für ein gereinigtes Protein, das zur Beeinflussung der Zelladhäsions-, -migrations- und -vermehrungseigenschaften fähig ist, umfasst die Entwicklung stabiler, hämatopoetischer Langzeit-ex-vivo-Stammzellkulturen. Hoch dosierter Chemotherapie unterzogene Patienten weisen unterdrückte Hämatopoese auf; die Expansion von Stammzellen, ihre Reifung zu verschiedenen hämatopoetischen Linien und Mobilisierung reifer Zellen in den Blutkreislauf dauern für gewöhnlich viele Wochen, bis sie abgeschlossen sind. Für solche Patienten und andere, die eine hämatopoetische Zelltransplantation benötigen, ist die Einführung autologer Stammzellen, die manipuliert und in Kultur vermehrt worden sind, in Patienten vorteilhaft. Solche hämatopoetischen Stammzellen (HSC) exprimieren das CD34-Stammzellenantigen, exprimieren jedoch nicht Linienbindungsantigene („lineage commitment antigens“). Diese Zellen können letztlich zu allen Blutzelllinien führen (z.B. Erythrozyten, Lymphozyten und Myelozyten). Hämatopoetische Vorläufer-Zellen, die Langzeitkulturen initiieren und aufrechterhalten können (d.h. Langzeitkultur-System-initiierende Zellen oder LTC-IC), stellen eine primitive Population von Stammzellen dar. Die Häufigkeit von LTC-IC ist mit nur 1-2 je  $10^4$  Zellen im normalen Human-Knochenmark und nur ungefähr 1 je 50-100 Zellen in einer hochgereinigten CD34<sup>+</sup>-Subpopulation geschätzt worden. Folglich wäre es zweckdienlich, über Verfahren und Systeme für Langzeitzellkultur zu verfügen, die primitive, pluripotente Human-HSC aufrechterhalten und vermehren, um sie für die Neupopulation des hämatopoetischen Systems in vivo zu verwenden.

**[0014]** Zellkulturmodelle der Hämatopoese haben eine Vielzahl von Zytokinen offenbart, die eine Rolle im Hämatopoese-Prozess zu spielen scheinen, einschließlich zahlreicher koloniestimulierender Faktoren, Interleukinen, Stammzellenfaktor und des c-kit-Liganden. In Ex-vivo-Kulturen begünstigen verschiedene Kombinationen dieser Zytokine jedoch die Vermehrung verschiedener Gruppen festgelegter Vorläufer. Beispielsweise verstärkte ein Faktor im Nabelschnurblutplasma die Vermehrung der Vorläufer der Granulozyten-Erythrozyten-Makrophagen-Megakaryozyten-Kolonie-bildenden Einheit (CFU-GEMM), jedoch begünstigte die Vermehrung in diesen Kulturen die reiferen Untergruppen von Zellen. Daher ist es schwierig gewesen, ein Kultursystem zu etablieren, das die In-vivo-Hämatopoese nachahmt.

**[0015]** Ein HSC-Kultursystem sollte eine große Anzahl von multi- oder pluripotenten Stammzellen aufrechterhalten und vermehren, die sowohl zur Langzeit-Neupopulation als auch zur letztlichen Linien-Bindung unter geeigneter Induktion fähig sind. In den meisten Ex-vivo-Kultursystemen sinkt jedoch der Anteil der aus LTC-IC bestehenden Zellpopulation mit fortdauernder Kultivierung stetig ab und fällt nach mehreren Wochen häufig auf 20 % ihres Anfangswerts ab, so wie die Kultur von reiferen Untergruppen hämatopoetischer Vorläufer-Zellen besiedelt wird, die nicht mehr pluripotent sind. Darüber hinaus kann die von einzelnen LTC-IC gezeigte Vermehrungsfähigkeit stark variieren. Folglich besteht auf dem Gebiet der Erfindung ein Bedarf an HSC-Kultursystemen, die biologische Mittel umfassen, die das pluripotente Potenzial von Zellen, wie z.B. LTC-IC-Zellen, aufrechterhalten oder fördern. Zusätzlich zu einer Rolle bei der Entwicklung von Ex-vivo-HSC-Kulturen sind biologische Mittel, die die Zelladhäsion, -migration und -vermehrung beeinflussen, in einer Reihe von anderen Zusammenhängen zweckdienlich.

**[0016]** Proteine, die die Aktivität von Mitogenen potenzieren, jedoch selbst keine mitogene Aktivität aufweisen, können wichtige Rollen als Signalmoleküle in solchen Prozessen wie der Hämatopoese spielen. Außerdem könnten diese Signalproteine auch als Sonden bei der Suche nach weiteren Mitogenen dienen, von denen viele nicht identifiziert oder charakterisiert worden sind. Von mehreren biologischen Faktoren ist gezeigt worden, dass sie die mitogene Aktivität anderer Faktoren potenzieren, ohne selbst mitogen zu sein. Manche dieser Potenziatoren sind mit der Zelloberfläche und/oder der extrazellulären Matrix assoziiert. In dieser Gruppe umfasst ein sekretiertes basisches Fibroblasten-Wachstumsfaktor-bindendes Protein (bFGF-bindendes Protein), das Basalmembran-Protein Perlecan und das Human-Immundefizienz-Virus-1-TAT-Protein, wobei jedes Protein fähig ist, die bFGF-induzierte Zellvermehrung und Angiogenese zu fördern. Ebenfalls in dieser Gruppe von Mitogen-Potenziatoren umfasst sind Thrombospondin, das zur Aktivierung einer latenten Form des Transformierenden Wachstumsfaktors  $\beta$  fähig ist, und ein nicht identifizierter sekretierter Wachstums-potenzierender Faktor aus vaskulären Glattmuskelzellen (Nakano et al., J. Biol. Chem. 270, 5702-5705 (1995)), wobei der letztere Faktor für die effiziente Aktivierung der Epidermal-Wachstumsfaktor- oder Thrombin-induzierten DNA-Synthese erforderlich ist. Weiters ist der B-Zellen-stimulierende Faktor-1/Interleukin-4, ein T-Zellen-Pro-

dukt mit keiner nachweisbaren mitogenen Aktivität, fähig, 1) die Vermehrungsreaktion von Granulozyten-Makrophagen-Vorläufern auf Granulozyten-Kolonie-stimulierenden Faktor zu verstärken, 2) die Vermehrungsreaktion von Erythrozyten-Vorläufern auf Erythropoietin zu verstärken und 3) gemeinsam mit Erythropoietin die Koloniebildung durch multipotente Vorläuferzellen zu induzieren. Gleichermäßen verstärkte Interleukin-7 die Stammzellenfaktor-induzierte Koloniebildung durch primitive Maus-Knochenmark-Vorläufer, obgleich Interleukin-7 selbst keine proliferative Wirkung aufwies. Außerdem hat sich gezeigt, dass Lymphozyten-Wachstumsverstärkungs-Faktor (LGEF) die Mitogen-stimulierte Vermehrung von Human-Peripherblut-Lymphozyten (PBL) oder gereinigten T-Zellen auf dosisabhängige Weise verstärkte. LGEF alleine stimulierte die PBL- oder T-Zellen-Vermehrung nicht.

**[0017]** Daher besteht weiterhin ein Bedarf an biologischen Mitteln, die fähig sind, einen aufeinander abgestimmten Einfluss auf eine oder mehrere der spezifizierten Funktionen (z.B. Zelladhäsion, Zellmigration und Zellproliferation) auszuüben, die gemeinsam solche komplexen biologischen Prozesse wie Angiogenese, Chondrogenese und Onkogenese kennzeichnen. Außerdem besteht auf dem Gebiet der Erfindung ein Bedarf an Mitteln, die zur Reproduktion dieser In-vivo-Prozesse in einer Ex-vivo-Umgebung beitragen, z.B. die Entwicklung von HSC-Kulturen. Weiters besteht weiterhin ein Bedarf an Werkzeugen zur Suche nach den verbleibenden biologischen Komponenten dieser komplexen Prozesse, z.B. an Mitogen-Sonden, deren Fehlen Bemühungen behindert, solche Prozesse vorteilhaft zu modulieren und damit zu kontrollieren.

**[0018]** In WO 99/39660 (L. Iruela-Arispe et al.) und den entsprechenden Hinterlegungen bei der GSP-Datenbank [Online] (Zugangsnummern AAY49506 und AAY49503; 10. Jänner 2003) sind die antiangiogenen Proteine, die menschlichen Metalloproteasenthrombospondin-(METH-) Proteine METH1 und METH2 und dafür kodierende isolierte Nucleinsäuremoleküle beschrieben.

**[0019]** In EP 0443404 (W.R. Grace & Co. (1991)) sind Peptidfragmente und Analoga von menschlichem Thrombospondin sowie Verfahren für ihre Verwendung als thrombospondinartige Mittel beschrieben.

**[0020]** In WO 96/39486 (Human Genome Sciences Inc.) sind ein menschliches kleines CCN-artiges Wachstumsfaktor-Polypeptid (SCGF) und für solch ein Polypeptid kodierende DNA (RNA) beschrieben.

**[0021]** In WO 97/33995 (Munin Corp.) sind die biologischen Aktivitäten von ECM-Signalmolekülen, Fragmente von ECM-Signalmolekülen, Antikörperprodukte, die Cy161 erkennen, und ihre Anwendungen beschrieben.

## ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

**[0022]** Die vorliegende Erfindung stellt ein isoliertes Cyr61-Fragment bereit, das die Haftung bzw. Adhäsion von Endothelzellen und Fibroblasten unterstützt, worin das Fragment eine Sequenz aus Aminosäuren innerhalb der Domäne III von Cyr61 mit Seq.-ID Nr. 2 oder von menschlichem Cyr61 mit Seq.-ID Nr. 4 umfasst und aus Seq.-ID Nr. 33 besteht oder aus einer Aminosäuresequenz besteht, die zu zumindest 95 % ähnlich zu Seq.-ID Nr. 33 ist. Die vorliegende Erfindung stellt außerdem Polynucleotide, die für solche Fragmente kodieren, und Antikörper, die spezifisch an solche Fragmente binden, bereit. Weiters stellt die Erfindung die Verwendung einer Zusammensetzung, die solch ein Fragment oder einen Antikörper, wie sie oben beschrieben sind, umfasst, zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Erkrankungen oder Leiden im Zusammenhang mit Angiogenese oder Onkogenese bereit.

**[0023]** Eine biologische Aktivität eines ECM-Signalmoleküls (z.B. Cyr61) kann die Fähigkeit sein, Zelladhäsion, Zellmigration oder Zellvermehrung zu stimulieren; die Fähigkeit, Angiogenese, Chondrogenese oder Onkogenese zu modulieren; Immunogenität oder die Fähigkeit, eine Immunantwort hervorzurufen; und die Fähigkeit, an Polypeptide zu binden, die spezifische Bindungsstellen für ECM-Signalmoleküle aufweisen, einschließlich Antikörpern und Integrinen. Die Fragmente der Erfindung können native oder rekombinante Moleküle sein. Für menschliche Cyr61-Fragmente, die bezüglich der Erfindung in Frage kommen, kann ein Polynucleotid kodieren, das eine Sequenz umfasst, die zu zumindest 95 % (wie beschrieben unter Einsatz von BLAST-Software mit Standardeinstellungen) ähnlich zu einem Polynucleotid ist, das für ein Polypeptid mit der unter Seq.-ID Nr. 33 angeführten Sequenz kodiert, worin das Polypeptid zumindest eine biologische Funktion von menschlichem Cyr61 beibehält. Außerdem können die Fragmente der Erfindung underivatisiert oder in Übereinstimmung mit einem nativen oder nicht-nativen Derivatisierungsmuster derivatisiert sein. Die Erfindung erstreckt sich weiters auf Fragmente, die eine native oder natürlich auftretende Aminosäuresequenz aufweisen, und auf Varianten (d.h. Fragmente, die unterschiedliche Aminosäuresequenzen aufweisen), Analoga (d.h. Fragmente, die eine Nicht-Standard-Aminosäure oder eine andere strukturelle Abweichung vom herkömmlichen Satz von Aminosäuren aufweisen) und Homologe (d.h. Fragmente, die einen evolutionären Vorläufer mit

einem anderen Fragment gemeinsam haben) davon. Fragmente, die kovalent an andere Verbindungen, wie z.B. Polyethylenglykol, oder andere Proteine oder Peptide gebunden sind, d.h. Fusionsproteine, sind in der Erfindung ebenfalls vorgesehen.

**[0024]** ECM-Signalmoleküle umfassen Cyr61-, Fisp12- und CTGF-Polypeptid von Säugetieren. Die Erfindung umfasst Antikörperprodukte, die spezifisch an ein Fragment der Erfindung binden. Eine breite Vielfalt von Antikörperprodukten liegt im Schutzbereich der Erfindung, einschließlich polyklonaler und monoklonaler Antikörper, Antikörperfragmenten, chimären Antikörpern, durch CDR-Grafting hergestellten Antikörpern, „humanisierten“ Antikörpern und anderen Antikörperformen, die auf dem Gebiet der Erfindung bekannt sind. Andere Moleküle, wie z.B. Peptide, Kohlenhydrate oder Lipide, können so konstruiert sein, dass sie an eine aktive Stelle von ECM-Molekülen binden und dadurch ihre Aktivitäten hemmen. Moleküle, wie z.B. Peptide, können jedoch die Aktivitäten von ECM-Molekülen verstärken oder potenzieren. Eine pharmazeutische Zusammensetzung kann eine biologisch wirksame Menge eines Polypeptids und einen) pharmazeutisch annehmbares/n Adjuvans, Verdünner oder Träger umfassen. Eine „biologisch wirksame Menge“ des Biomaterials ist eine Menge, die ausreicht, um eine nachweisbare Reaktion in der biologischen Probe zu bewirken, wenn sie mit einer Kontrolle verglichen wird, der das Biomaterial fehlt.

**[0025]** Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft ein gereinigtes und isoliertes Polynucleotid, das eine Sequenz umfasst, die für ein Fragment der Erfindung kodiert. Ein Polynucleotid gemäß der Erfindung kann DNA oder RNA sein, einzel- oder doppelsträngig, und kann von einer nativen Quelle gereinigt und isoliert werden oder kann unter Anwendung synthetischer oder Rekombinationstechniken, die auf dem Gebiet der Erfindung bekannt sind, produziert werden. Vektoren, die ein Polynucleotid gemäß der Erfindung umfassen, sind ebenfalls vorgesehen. Außerdem können Wirtszellen mit solch einem Polynucleotid oder Vektor transformiert oder transfiziert werden.

**[0026]** Ein Verfahren zur Herstellung eines Fragments gemäß der Erfindung kann das Expressieren eines Polynucleotids, das für ein Fragment gemäß der vorliegenden Erfindung kodiert, in einer geeigneten Wirtszelle und das Reinigen des Fragments umfassen. Andere Verfahren zum Herstellen eines Fragments der Erfindung verwenden Techniken, die auf dem Gebiet der Erfindung bekannt sind, wie z.B. die Isolierung und Reinigung nativer Polypeptide oder die Verwendung synthetischer Techniken zur Polypeptidproduktion. Im Speziellen umfasst ein Verfahren der Reinigung eines ECM-Signalmoleküls, wie z.B. menschliches Cyr61, die Schritte des Identifizierens einer Quelle, die menschliches Cyr61 enthält, des Aussetzens der Quelle gegenüber einem für menschliches Cyr61 spezifischen Biomolekül, das Cyr61 bindet, wie z.B. Anti-Human-Cyr61-Antikörper, und des Eluierens des menschlichen Cyr61 vom Antikörper oder anderen Biomolekül, wodurch das menschliche Cyr61 gereinigt wird.

**[0027]** Ein Verfahren zur Behandlung eines massiven Tumors kann den Schritt der Zufuhr einer therapeutisch wirksamen Menge eines Cyr61-Inhibitors an ein Individuum umfassen, wodurch die Neovaskularisierung des Tumors gehemmt wird. Inhibitoren umfassen, sind jedoch nicht eingeschränkt auf, Inhibitorpeptide, wie z.B. Peptide, die ein „RGD“-Motiv aufweisen, und Zytotoxine, die frei oder an Moleküle, wie z.B. Cyr61, gebunden sein können.

**[0028]** Eine biologisch wirksame Menge eines ECM-Signalmoleküls, z.B. Cyr61, kann an ein Tier verabreicht werden, um die Organregeneration zu fördern. Das beeinträchtigte Organ kann das Ergebnis eines Traumas, z.B. eines chirurgischen Eingriffs, oder einer Krankheit sein. Ein weiteres Verfahren betrifft das Verbessern der Vaskularisierung von Transplantaten, z.B. Hauttransplantaten. Ein weiteres Verfahren betrifft einen Prozess zur Förderung von Knochenimplantation, einschließlich Knochentransplantaten. Das Verfahren zur Förderung der Knochenimplantation umfasst gegebenenfalls den Schritt des Kontaktierens eines Knochenimplantats oder einer Rezeptorstelle mit einer biologisch wirksamen (d.h. chondrogenisch wirksamen) Menge eines ECM-Signalmoleküls. Der Kontaktierungsschritt kann durch Aufbringen des ECM-Signalmoleküls auf einen biokompatiblen Verband, wie z.B. einer bioabbaubaren Gaze, und Kontaktieren des Verbands mit einem Knochenimplantat bewirkt werden, wodurch die Knochenimplantation gefördert wird. Die Knochenimplantate umfassen natürliche Knochen und Fragmente davon sowie leblose natürliche und synthetische Materialien, die biokompatibel sind, wie z.B. Prothesen. Zusätzlich zur direkten Aufbringung eines ECM-Signalmoleküls auf eine(n) Knochen, Prothese oder Rezeptorstelle können auch Matrixmaterialien zur kontrollierten Freisetzung des ECM-Signalmoleküls verwendet werden, zusätzlich zu solchen Applikationsmaterialien wie Gazen.

**[0029]** Verfahren zur Behandlung von Erkrankungen oder Leiden, wie z.B. Erkrankungen im Zusammenhang mit der Genunter- oder -überexpression, können die Zufuhr einer therapeutisch wirksamen Menge eines ECM-Signalmoleküls (z.B. eines Cyr61-Polypeptids, Fisp12, CTGF) oder eines biologisch aktiven Fragments

davon oder eines Modulators einer Cyr61-Integrin-Rezeptor-Wechselwirkung umfassen, wobei ein auf dem Gebiet der Erfindung bekanntes Zufuhrmittel eingesetzt wird. Ein Verfahren zur Modulation von Genexpression kann den Schritt des Verabreichens einer biologisch wirksamen Menge eines menschlichen Cyr61-Fragments an eine Zelle umfassen, die zu einer Cyr61-modulierten Genexpression in der Lage ist.

**[0030]** Ein Verfahren zur Behandlung eines Leidens, das durch einen Defekt in glattem Muskelgewebe in einem Säugetier gekennzeichnet ist, umfasst gegebenenfalls folgende Schritte: (a) Identifizieren eines Säugetiers, das eine Behandlung des Leidens benötigt, und (b) Verabreichen einer Zusammensetzung an das Säugetier, die einen Modulator einer Wechselwirkung zwischen Cyr61 und einem  $\alpha_6\beta_1$ -Integrin-Rezeptor umfasst, in einer Menge, die zur Linderung der Symptome des Leidens im Säugetier wirksam ist. Ein Beispiel für einen Modulator ist aus der Gruppe ausgewählt, die aus Heparin, Heparansulfat und einem Polypeptid besteht, das einen  $\alpha_6\beta_1$ -Integrin-Rezeptor bindet. Eines aus einer Vielzahl von geeigneten Mitteln zur Verabreichung der Zusammensetzung umfasst das Exprimieren einer exogenen Polypeptid-Kodierregion in Zellen des Typs, der vom Leiden betroffen ist. Wiederum umfassen Beispiele für Cyr61-Polypeptid Fragmente von Cyr61, wie z.B. ein Fragment, das eine Sequenz umfasst, die aus der aus den Resten 280-290 der Seq.-ID Nr. 4 und den Resten 306-312 der Seq.-ID Nr. 4 bestehenden Gruppe ausgewählt ist. Leiden, die durch das Verfahren behandelt werden können, umfassen ein Leiden, das aus der aus Atherosklerose, Herzerkrankungen, Tumorwachstum, Tumormetastasen, Fibrose, Leiden in Zusammenhang mit inadäquater Angiogenese, Leiden in Zusammenhang mit aberrierender Granulationsgewebeerkrankung, aberrierendem Fibroblastenwachstum und Wunden bestehenden Gruppe ausgewählt ist.

**[0031]** Zahlreiche weitere Aspekte und Vorteile der vorliegenden Erfindung werden bei Betrachtung der folgenden Abbildung und ausführlichen Beschreibung offensichtlich.

#### KURZBESCHREIBUNG DER ABBILDUNG

**[0032]** [Fig. 1](#) stellt die vergleichenden Aminosäuresequenzen von Elementen der Cysteinreichen Proteinfamilie wachstumsregulierender Proteine dar.

#### AUSFÜHRLICHE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

**[0033]** Bei der Maus wurde gezeigt, dass das Cyr61-Protein die Zelladhäsion, -migration und -vermehrung beeinflusst. Das *cyr61*-Gen, das für Cyr61 kodiert, ist ein unmittelbar frühes Gen, das durch Serum-Wachstumsfaktoren in Maus-Fibroblasten transkriptionell aktiviert wird. Lau et al., EMBO J. 4, 3145-3151 (1985); Lau et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 1182-1186 (1987). Die für Maus-*cyr61*-cDNA kodierende Sequenz ist in Seq.-ID Nr. 1 dargelegt. (Die für Human-*cyr61*-cDNA kodierende Sequenz wird in Seq.-ID Nr. 3 bereitgestellt.) Die Aminosäuresequenz von Maus-Cyr61 ist in Seq.-ID Nr. 2 dargelegt. (Die Human-Cyr61-Aminosäuresequenz ist in Seq.-ID Nr. 4 dargestellt.) Cyr61 ist ein Polypeptid von 41 kDa Länge, das 39 Cysteinreste enthält, wobei ungefähr 10 % der 379 Aminosäuren das unprozessierte Enzym ausmachen. Yang et al., Cell Growth & Diff. 2, 351-357 (1991). Untersuchungen haben offenbart, dass Maus-Cyr61 Heparin bindet und sekretiert wird. Yang et al. Im Einklang mit der beobachteten Sekretion von Cyr61 steht die Identifizierung einer N-terminalen Signalsequenz im naszierenden Cyr61, die von der Untersuchung der Maus-*cyr61*-cDNA-Sequenz abgeleitet wurde. Yang et al. Außerdem findet sich Cyr61 nicht im konditionierten Medium kultivierter, *cyr61* exprimierender Zellen, findet sich jedoch mit der extrazellulären Matrix (ECM) und der Zelloberfläche assoziiert. Yang et al. Strukturell ähnliche, Cystein-reiche Säugetierproteine sind charakterisiert worden.

**[0034]** Fisp12, ein Cystein-reiches Maus-Protein, zeigt strukturelle Ähnlichkeit mit Cyr61. Die für Fisp12 kodierende cDNA-Sequenz ist in Seq.-ID Nr. 5 dargelegt; die Aminosäuresequenz von Fisp12 ist in Seq.-ID Nr. 6 dargestellt. Maus-Fisp12 beeinflusst wie Cyr61 die Zelladhäsion, -vermehrung und -migration. Das Human-Ortholog von Fisp12 ist Bindegewebe-Wachstumsfaktor (CGTF), ein Protein mit ähnlicher Struktur und Funktion wie Cyr61. Fisp12 und CTGF sind jedoch von Cyr61 unterscheidbar. Beispielsweise findet sich ein höherer Anteil von sekretiertem Fisp12 im Kulturmedium als es für Cyr61 der Fall ist; ein entsprechend niedrigerer Anteil von Fisp12, als es für Cyr61 der Fall ist, ist im Bereich exprimierender Zellen (Zelloberfläche und nahe gelegene extrazelluläre Matrix) lokalisiert. Zusätzliche Ähnlichkeiten und Unterschiedlichkeiten unter den ECM-Signalmolekülen der Erfindung umfassenden Proteinen werden in den hierin unten stehenden Ausführungen offensichtlich.

**[0035]** Beispiel 1 beschreibt die Klonierung von Polynucleotiden, die für Elemente der Cystein-reichen Proteinfamilie von ECM-Signalmolekülen kodieren; Beispiel 2 beschreibt Sequenzanalysen; Beispiel 3 beschreibt RNA-Analysen; Beispiel 4 beschreibt die Produktion transgener Tiere; Beispiel 5 beschreibt die Expression von

Cyr61-Polypeptiden; Beispiel 6 beschreibt die Expression von Fisp12-Polypeptiden; Beispiel 7 legt Verfahren der Polypeptidreinigung dar; Beispiel 8 stellt eine Charakterisierung von Cyr61-Polypeptiden bereit; Beispiel 9 offenbart einen Heparin-Bindungstest für die Polypeptid-Elemente der Cystein-reichen Proteinfamilie; Beispiel 10 betrifft Rezeptoren für Cyr61-Polypeptide; Beispiel 11 beschreibt Anti-ECM-Signalmolekül-Antikörper; Beispiel 12 betrifft inhibierende Peptide; Beispiel 13 beschreibt Zelladhäsion und auf Polypeptid basierende Verfahren zum Beeinflussen des Prozesses der Zelladhäsion; Beispiel 14 beschreibt Polypeptid-beeinflusste Migration von Fibroblasten; Beispiel 15 beschreibt die Migration von Endothelzellen und In-vitro-Tests für die Migration; Beispiel 16 beschreibt einen In-vitro-Test für Inhibitoren der Endothelzellen-Migration; Beispiel 17 beschreibt einen In-vivo-Test für Endothelzellen-Migration; Beispiel 18 beschreibt Mitogen-Potenzierung durch Cyr61- und Fisp12-Polypeptide; Beispiel 19 beschreibt einen In-vivo-Hornhaut-Test für angiogene Faktoren und Modulatoren; Beispiel 20 betrifft Verfahren zum Beeinflussen der Blutgerinnung unter Verwendung von ECM-Signalmolekülen; Beispiel 21 offenbart die Verwendung der Polypeptide für hämatopoetische Ex-vivo-Stammzellkulturen; Beispiel 22 betrifft Organregeneration; Beispiel 23 beschreibt Chondrogenese und die Expression von extrazellulären Matrix-Signalmolekülen und Mesenchymzellen; Beispiel 24 beschreibt die Förderung von Zelladhäsion im Chondrogenese-Prozess unter Verwendung von Cyr61-Polypeptiden; Beispiel 25 beschreibt Chondrogenese und den Einfluss von Cyr61-Polypeptiden auf die Zellaggregation; Beispiel 26 beschreibt die Förderung der Zellvermehrung durch Cyr61-Polypeptide im Chondrogenese-Prozess; Beispiel 27 betrifft Verfahren zur Verwendung der ECM-Signalmoleküle, um Chondrogenese zu beeinflussen; Beispiel 28 stellt genetische Ansätze zur Verwendung der ECM-Signalmoleküle bereit; Beispiel 29 beschreibt Fibroblastenadhäsion; Beispiel 30 betrifft Angiogenese; Beispiel 31 bezieht sich auf Insertionsinaktivierung oder Knock-out-Genkonstrukte; Beispiel 32 beschreibt die Adhäsion an Blutplättchen und Makrophagen; und Beispiel 33 beschreibt Peptidmodulatoren von Cyr61-Aktivität. Diese Beispiele sind zur Illustration und sollten nicht dahingehend ausgelegt werden, dass sie den Schutzzumfang der Erfindung einschränken.

#### Beispiel 1

##### Polynucleotid-Klonierung

**[0036]** Zuerst wurde der Versuch unternommen, eine Human-cyr61-cDNA aus einer Human-Plazenta-cDNA-Bibliothek durch Sondieren mit der Maus-cyr61-cDNA-Sequenz unter Anwendung von Techniken zu isolieren, die auf dem Gebiet der Erfindung standardmäßig eingesetzt werden. Siehe Sambrook et al. Die Isolierung der vollständigen Maus-cyr61-cDNA aus einer BALB/c-3T3-(ATCC CRL-1658) cDNA-Bibliothek ist beschrieben worden. O'Brien et al., Mol. Cell. Biol. 10, 3569-3577 (1990). Die Nucleotid- und abgeleiteten Aminosäuresequenzen von Maus-cyr61 sind von der GenBank-Datenbank unter der Zugangsnummer M32490 erhältlich. Die Nucleotidsequenz von Maus-cyr61 ist in Seq.-ID Nr. 1 dargestellt, die Maus-Cyr61-Aminosäuresequenz ist in Seq.-ID Nr. 2 dargestellt.

**[0037]** Die Human-cDNA-Bibliothek wurde unter Verwendung von  $\lambda$ gt11 (Promega Corp., Madison, WI) als Vektor konstruiert, der in E. coli transfiziert und auf LB-Agar ausplattiert wurde. Ein in pGEM-2 (O'Brian et al. (1990)) kloniertes Maus-cDNA-Expressionskonstrukt, das die gesamte für Maus-cyr61 kodierende Sequenz (Nucleotide 56-1560, unter Anwendung der Nummerierung von O'Brian et al. (1990); siehe Seq.-ID Nr. 1) enthielt, wurde als Sonde verwendet. Die Maus-cDNA-Sonde wurde durch Standardtechniken auf dem Gebiet der Erfindung radioaktiv markiert. Sambrook et al. Plaque-Screenings unter Verwendung der Maus-Sonde wurden mittels Standardtechniken durchgeführt. Sambrook et al.

**[0038]** Im Spezielleren wurden Agarplatten, die die oben beschriebene Human-cDNA enthielten, gegenüber Nitrozellulosefiltern (BA85, 82 mm, Schleicher & Schuell, Keene, NH) ausgesetzt und auf jede Platte gegeben. Nach Adsorption der Plaques (ungefähr 20 Minuten) wurden die Filter entfernt und ungefähr 30 Minuten lang luftgetrocknet. Anschließend wurde jedes Filter nacheinander für 30-60 Sekunden in 0,2 M NaOH, 1,5 M NaCl (100 ml); 2 × SSC, 0,4 M Tris-HCl, pH 7,4 (100 ml); und 0,2 × SSC (100 ml) eingetaucht. Die Filter wurden dann bei Raumtemperatur ungefähr 1 Stunde lang getrocknet und bei 80°C unter Vakuum 2 Stunden lang behandelt. Die Filter wurden mit radiomarkierter Maus-cyr61-cDNA sondiert. Die übermäßig hohe Anzahl an Signalen, die auf einen hohen Wert an falschen positiven Signalen von verwandten Sequenzen hinweist, verhinderte die Identifikation von cyr61-cDNA.

**[0039]** Unter Zuhilfenahme einer komplizierten, cyr61-spezifischen Klonierungsstrategie wurden Human-cyr61-cDNA-Klone mit Sonden identifiziert, die mittels RT-PCR erzeugt wurden. Im Speziellen war die Sonde für das Screening der Human-Plazenta-cDNA-Bibliothek ein mit degenerierten Primern mittels RT-PCR von Gesamt-RNA aus logarithmisch wachsenden WI38-Zellen erzeugtes PCR-Fragment. Die Primer wurden von denjenigen Sequenzen hergeleitet, die der am meisten konservierten Region des offenen Leserasters der



Maus-cyr61-cDNA entsprechen. Einer der Primer, H61-5 [5'-GGG-AATTCTG(TC)GG(GATC)TG(TC)TG(TC)AA(GA)GT(GC)TG-3'] genannt, enthält eine degenerierte Sequenz, die mit Ausnahme der „GGGAATTC“-Sequenz am 5'-Ende, die zur Einführung einer EcoRI-Stelle verwendet wurde, von den Nucleotiden 327-346 (Sinn-Strang) der in Seq.-ID Nr. 1 dargelegten Maus-cyr61-Sequenz hergeleitet ist. Die Degenerierungen treten in Positionen auf, die der dritten Position der Codons in Seq.-ID Nr. 1 entsprechen. Der zweite für die PCR-Amplifizierung einer Human-cyr61-Sequenz verwendete Primer wurde H61-3 [5'-CCGGATCC(GA)CA(GA)TT(GA)TA(GA)TT(GA)CA-3'] genannt, der mit Ausnahme der 5'-Sequenz „CCGGATCC“, die zur Einführung einer BamHI-Stelle verwendet wurde, dem Anti-Sense-Strang entspricht, der zu den Nucleotiden 1236-1250 der in Seq.-ID Nr. 1 dargelegten Maus-cyr61-Sequenz komplementär ist. Die Degenerierungen treten in Positionen auf, die zu den dritten Positionen der in Seq.-ID Nr. 1 dargelegten Codons in Maus-cyr61 komplementär sind. Die amplifizierte cyr61-cDNA wurde in pBlueScript-SK<sup>+</sup>-Vektor (Stratagene, La Jolla, CA) kloniert und mit einem Sequenase-II-Set (U.S. Biochemicals, Cleveland, OH) sequenziert.

**[0040]** Reihen-Screenings der Human-Plazenta-cDNA-Bibliothek führten zur Isolierung eines Klons, der eine Human-cyr61-cDNA enthielt. Die Human-cyr61-cDNA hat eine Länge von ungefähr 1.500 Basenpaaren. Die Human-cDNA ist auf einem in die EcoRI-Stelle in pGEM-2 klonierten EcoRI-Fragment enthalten. Wie in Seq.-ID Nr. 3 gezeigt, umfasst die Human-cDNA-Sequenz die gesamte kodierende Region für Human-Cyr61, gemeinsam mit 120 bp 5'-flankierender Sequenz und ungefähr 150 bp 3'-flankierender Sequenz.

**[0041]** Die Polynucleotide der Erfindung können völlig oder teilweise synthetisch, DNA oder RNA und einzel- oder doppelsträngig sein. Weil Polynucleotide der Erfindung für Fragmente eines Cyr61-Proteins kodieren, kodieren die Polynucleotide für eine Teilsequenz von Cyr61. Polynucleotidsequenzen der Erfindung sind für die Produktion von Cyr61 durch Rekombinationsverfahren und als Hybridisierungs sonden für Polynucleotide zweckdienlich, die für Cyr61 kodieren.

**[0042]** DNA-Polynucleotide gemäß der Erfindung umfassen genomische DNAs, cDNAs und Oligonucleotide, die eine kodierende Sequenz eines Cyr61-Fragments oder eines Analogons davon wie oben beschrieben umfassen, das zumindest eine der biologischen Aktivitäten eines ECM-Signalmoleküls beibehält, wie z.B. die Fähigkeit, Zelladhäsion, Zellmigration oder Zellvermehrung in solchen biologischen Prozessen wie Angiogenese, Chondrogenese und Onkogenese zu fördern, oder die Fähigkeit, einen ein ECM-Signalmolekül erkennenden Antikörper hervorzurufen.

**[0043]** Andere Polynucleotide gemäß der Erfindung unterscheiden sich in ihrer Sequenz von Sequenzen, die innerhalb nativer Cyr61-Polynucleotide enthalten sind (d.h. durch die Addition, Deletion, Insertion oder Substitution von Nucleotiden), unter der Voraussetzung, dass die Polynucleotide für ein Protein kodieren, das zumindest eine der biologischen Aktivitäten eines ECM-Signalmoleküls beibehält. Eine Polynucleotidsequenz der Erfindung kann sich von einer nativen Cyr61-Polynucleotidsequenz durch stille Mutationen unterscheiden, die die Sequenz der darin kodierten Aminosäuren nicht verändern. Außerdem können Polynucleotide der Erfindung ein Cyr61-Fragment festlegen, das sich in der Aminosäuresequenz von nativen Cyr61-Fragmenten wie oben beschrieben unterscheidet. Beispielsweise sind Polynucleotide, die für Polypeptide kodieren, die sich in ihrer Aminosäuresequenz von nativen Cyr61-Fragmenten durch konservativen Ersatz eines oder mehrerer Aminosäurereste unterscheiden, in der Erfindung vorgesehen. Die Polynucleotide der Erfindung können unter standardmäßigen stringenten Bedingungen an Polynucleotide hybridisieren, die für ein Cyr61-Fragment der Erfindung kodieren, oder die hybridisieren würden, wenn es keine Degeneration des genetischen Codes gäbe. Beispielhafte stringente Hybridisierungsbedingungen umfassen die Hybridisierung bei 42°C in 50 % Formamid, 5 × SSC, 20 mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 6,8 und Waschen in 0,2 × SSC bei 55°C. Dem Fachkundigen ist klar, dass die Variation dieser Bedingungen auf Basis der Länge und des GC-Nucleotidgehalts der zu hybridisierenden Sequenzen erfolgt. Formeln, die auf dem Gebiet der Erfindung standardmäßig verwendet werden, sind für die Ermittlung der exakten Hybridisierungsbedingungen geeignet. Siehe Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2. Aufl., Cold Spring Harbor Laboratory Press, §§ 9.47-9.51 (1989).

**[0044]** Cyr61-Polynucleotide, die RNA umfassen, liegen ebenfalls im Schutzzumfang der vorliegenden Erfindung. Andere RNA-Polynucleotide der Erfindung umfassen RNAs, die sich von einer nativen Cyr61-mRNA durch die Insertion, Deletion, Addition oder Substitution von Nucleotiden (siehe oben) unterscheiden, unter der Voraussetzung, dass sie für ein Polypeptid kodieren, das eine mit einem ECM-Signalmolekül in Verbindung stehende biologische Aktivität beibehält. Weitere RNAs der Erfindung umfassen Anti-Sense-RNAs (d.h. RNAs, die eine RNA-Sequenz umfassen, die zu einer Cyr61-mRNA komplementär ist).

**[0045]** Demgemäß wurde ein Satz von DNA-Fragmenten, die gemeinsam die Human-cyr61-cDNA umfassen,

in pGEM-2 und M13-Derivaten unter Anwendung von Verfahren geklont, die auf dem Gebiet der Erfindung wohl bekannt sind, um die Nucleotidsequenzanalysen zu erleichtern. Die pGEM-2-Klone stellen Substrate für die enzymatische Erzeugung von Reihen-Deletionen unter Anwendung von Techniken bereit, die auf dem Gebiet der Erfindung bekannt sind. Diese Sammlung von Klonen, die gemeinsam eine Reihe von DNA-Fragmenten enthielten, die verschiedene Abschnitte der für *cyr61*-cDNA kodierenden Region umfassten, sind in den Verfahren der Erfindung zweckdienlich. Die resultierenden Reihen von geschachtelten pGEM-2-Klonen stellen ihrerseits Substrate für Nucleotidsequenzanalysen unter Verwendung der enzymatischen Kettenterminationstechnik bereit. Die Fragmente sind auch als Nucleinsäuresonden und zur Herstellung von *Cyr61*-Deletions- oder Trunktations-Analoga zweckdienlich. Beispielsweise können die *cyr61*-cDNA-Klone verwendet werden, um *cyr61*-Klone aus Human-Gen-Bibliotheken, die im Handel erhältlich sind, zu isolieren. (Clontech Laboratories Inc., Palo Alto, CA.) Genomische Klone können ihrerseits verwendet werden, um den *cyr61*-Locus, einen Locus, der mit einem bekannten Krankheits-Locus assoziiert ist, im Human-Genom zu kartieren.

**[0046]** Die Polynucleotide der Erfindung können in einer Vielzahl von Vektoren enthalten sein, einschließlich Plasmid-, Virus- (z.B. prokaryotischen und eukaryotischen Virusvektoren, die von Lambda-Phagen, Herpesviren, Adenovirus, Adeno-assoziierten Viren, Cytomegalovirus, Vacciniavirus, der M13-f1-fd-Familie von Viren, Retroviren, Baculovirus und anderen hergeleitet sind), Phagemid-, Cosmid- und YAC- (d.h. Yeast-Artificial-Chromosome) Vektoren.

**[0047]** Die Polynucleotide der Erfindung können innerhalb von heterologen Polynucleotid-Umgebungen enthalten sein. Polynucleotide der Erfindung sind in heterologe Genome inseriert worden, wodurch Transgene und transgene Tiere gemäß der Erfindung erzeugt wurden. Im Speziellen sind zwei Arten von Genfusionen, die Maus-*cyr612*-Teilgensequenzen enthalten, verwendet worden, um transgene Mäuse zu erzeugen. (Siehe unten.) Eine Art von fusioniertem Gen rekombinierte die kodierende Sequenz von *cyr61* mit einem von drei verschiedenen Promotoren: 1) dem Keratin-Promotor K14, 2) dem  $\beta$ -Actinpromotor oder 3) dem Phosphoglycerokinase-Promotor. Adra et al., Gene 60, 65-74 (1987). Diese Fusionskonstrukte wurden unter Anwendung von Standardtechniken, wie unten im Zusammenhang mit einer Phosphoglycerokinase-Promotor- (*pgk-1*-) *cyr61*-Fusion beschrieben wird, erzeugt. Ein genomisches *XhoI*-*Scal*-DNA-Fragment, das die gesamte für *cyr61* kodierende Region und alle Introns enthält, dem jedoch die Transkriptionsinitiationsstelle und das Polyadenylierungssignal fehlt, wurde in Plasmid *pgk*/ $\beta$ -gal kloniert, wobei die für *lacZ* kodierende Sequenz ersetzt wurde. Das resultierende Konstrukt stellte *cyr61* unter die Kontrolle des starken *pgk-1*-Promotors, der in allen Zellen aktiv ist.

**[0048]** Die zweite Art der Genfusion rekombinierte die *cyr61*-Expressionskontrollsequenzen (d.h. Promotor) mit der für *E. coli*- $\beta$ -Galactosidase kodierenden Sequenz. Das *cyr61-lacZ*-Fusionsgen wurde unter Anwendung des folgenden Ansatzes konstruiert. Ein die Nucleotide -2065 bis +65 in Bezug auf das Transkriptionsinitiationsnucleotid umfassendes DNA-Fragment wurde verwendet, um den *pgk-1*-Promotor (Adra et al., Gene 60, 65-74 (1987)) im Plasmid *pgk*/ $\beta$ -gal durch stumpfendige Klonierung zu ersetzen. Zusätzlich wurde das Polyadenylierungssignal aus dem Rinder-Wachstumshormon-Gen in das das Fusionsgen enthaltende Plasmid kloniert. Das resultierende Konstrukt, Plasmid 2/*lacZ*, weist das *E. coli-lacZ*-Gen unter transkriptioneller Kontrolle eines 2-kb-DNA-Fragments auf, das den *cyr61*-Promotor enthält. Das verwandte Plasmid 1.4/*lacZ* wurde von Plasmid 2/*lacZ* durch Entfernen von ungefähr 600 bp *cyr61*-DNA, die sich stromauf einer *Afl*III-Stelle finden, hergeleitet. Auch ähnelt Plasmid 2M/*lacZ* dem Plasmid 2/*lacZ* mit der Ausnahme eines mittels PCR erzeugten C→T-Übergangs in der CArG-Box. Diese Konstrukte wurden aus den Vektoren durch *NotI*-Verdau herausgeschnitten, mittels GeneClean (Bio101 Inc., La Jolla, CA) gereinigt und dazu verwendet, um transgene Mäuse zu erzeugen (siehe unten).

**[0049]** Ein für Maus-*fisp12* kodierendes cDNA-Fragment ist ebenfalls mittels Standardtechniken kloniert worden. Ryseck et al., Cell Growth & Diff. 2, 225-233 (1991), hierin durch Verweis aufgenommen. Die Klonierung wurde durch Ligieren eines die für *fisp12*-cDNA kodierende Region enthaltenden *XhoI*-Fragments in BamHI-gespaltetes pBlueScriptBacIII, einem Baculovirus-Expressionsvektor (Invitrogen Corp., San Diego, CA), erzielt. Rekombinante Baculovirus-Klone wurden wie in Summers et al., TX Ag. Exp. Sta., Bulletin 1555 (1987), beschrieben erhalten.

**[0050]** Das Human-Ortholog von *fisp12*, das für CTGF kodierende Gen, wurde durch Screenen einer Fusions-cDNA-Bibliothek mit Anti-Blutplättchen-hergeleiteten Wachstumsfaktor- (Anti-Platelet-Derived-Growth-Factor-, Anti-PDGF-) Antikörpern, wie in US-Patent Nr. 5.408.040, Spalte 12, Zeile 16, bis Spalte 13, Zeile 29, beschrieben kloniert. Die Screening-Strategie nutzte die immunologische Kreuzreaktivität von CTGF und PDGF.

**[0051]** Die klonierten Kopien der *cyr61*-, *fisp12*- und *ctgf*-cDNAs stellen eine fertige Quelle für Polynucleotidsonden bereit, um die Isolierung genomischer kodierender Regionen sowie allelischer Varianten der genomischen DNAs oder cDNAs zu erleichtern. Außerdem können die existierenden cDNA-Klone oder Klone, die durch Sondieren wie oben beschrieben isoliert wurden, verwendet werden, um transgene Organismen zu erzeugen. Beispielsweise sind transgene Mäuse, die *cyr61* beherbergen, unter Anwendung von Standardtechniken wie im nächsten Beispiel beschrieben erzeugt worden.

**[0052]** Ein Klon, hCyr61-cDNA, der die in Seq.-ID Nr. 3 dargelegte Human-cyr61-cDNA-Sequenz enthält, und ein mit diesem Klon transformierter Bakterienstamm, *Escherichia coli* DH5a (hCyr61cDNA), wurden bei der American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD, 20852 USA, am 14. März 1997 hinterlegt.

## Beispiel 2

### Sequenzanalysen

**[0053]** Die Nucleotidsequenz von Maus-cyr61 ist beschrieben worden, O'Brian et al. (1990); Latinkic et al., Nucl. Acids Res. 19, 3261-3267 (1991), und ist hierin als Seq.-ID Nr. 1 dargelegt.

**[0054]** Die abgeleitete Aminosäuresequenz von Maus-Cyr61 ist beschrieben worden, O'Brian et al. (1990), und ist in Seq.-ID Nr. 2 dargelegt.

**[0055]** Die Nucleotidsequenz der Human-cyr61-cDNA wurde unter Anwendung des Verfahrens von Sanger, wie in Sambrook et al. beschrieben, ermittelt. Es wurden Sequenzierungstemplate durch Konstruieren einer Reihe von verschachtelten Deletionen aus einem pGEM-2-Human-cyr61-cDNA-Klon wie oben in Beispiel 1 beschrieben erzeugt. Die Human-cyr61-cDNA-Sequenz ist in Seq.-ID Nr. 3 dargelegt. Die Aminosäuresequenz von Human-Cyr61 wurde von der Human-cyr61-cDNA-Sequenz abgeleitet und ist in Seq.-ID Nr. 4 dargelegt.

**[0056]** Ein Vergleich von Maus- und Human-Cyr61-Sequenzen, die in Seq.-ID Nr. 2 bzw. Seq.-ID Nr. 4 dargestellt sind, offenbart 91 % Ähnlichkeit. Beide Sequenzen zeigen eine N-terminale Signalsequenz, die für ein prozessiertes und sekretiertes Protein kennzeichnend ist; beide Proteine enthalten ferner 38 Cysteinreste, die bei beiden Proteinen über das gesamte Protein verteilt sind, jedoch den zentralen Regionen von Maus- sowie Human-Cyr61 in besonderem Maße fehlen. Beachtenswerterweise ist diese zentrale, von Cysteinresten freie Region diejenige Region der höchsten Sequenzabweichung zwischen den für Maus- und Human-Cyr61 kodierenden Regionen. Jedoch sind die 5'-untranslatierten Regionen der Maus- und Human-cyr61-cDNAs sogar stärker voneinander abweichend (67 % Ähnlichkeit). Im Gegensatz dazu sind die 3'-untranslatierten Regionen die ähnlichsten Regionen (91 % Ähnlichkeit). Die Gesamtlänge des kodierten Maus-Cyr61 beträgt 379 Aminosäuren; die der Human-Cyr61 beträgt 381 Aminosäuren.

**[0057]** Eine *fisp12*-cDNA-Sequenz ist ebenfalls ermittelt worden und ist in Seq.-ID Nr. 5 dargelegt. Die Aminosäuresequenz von Fisp12 ist von der *fisp12*-cDNA-Sequenz abgeleitet worden und ist in Seq.-ID Nr. 6 dargelegt. Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen von Maus-Cyr61 und -Fisp12 offenbart, dass die beiden Proteine zu 65 % identisch sind. Die Strukturähnlichkeit von Cyr61 und Fisp12 steht im Einklang mit ähnlichen Funktionseigenschaften der beiden Proteine, die unten beschrieben sind.

**[0058]** Eine cDNA-Teilsequenz von CTGF, die die gesamte für CTGF kodierende Region enthält, ist ebenfalls ermittelt worden. Die CTGF-cDNA-Sequenz wurde unter Verwendung von M13-Klonen als Template für die enzymatischen Sequenzierungsreaktionen wie beschrieben erhalten. 040-Patent, in Spalte 12, Zeile 68, bis Spalte 13, Zeile 14. Zusätzliche Klonierung, gekoppelt mit doppelsträngigen enzymatischen Sequenzierungsreaktionen, klärte die gesamte Sequenz der für CTGF kodierenden cDNA auf. US-Patent Nr. 5.408.040, Spalte 14, Zeile 44, bis Spalte 15, Zeile 8. Die Nucleotidsequenz der für CTGF kodierenden cDNA ist hierin in Seq.-ID Nr. 7 dargestellt. Die abgeleitete Aminosäuresequenz der für CTGF kodierenden cDNA ist in Seq.-ID Nr. 8 dargestellt.

## Beispiel 3

### RNA-Analysen

**[0059]** Polynucleotidsonden sind zweckdienliche diagnostische Werkzeuge für angiogene und andere mit Cyr61-Expression in Beziehung stehende Störungen, da geeignet konstruierte Sonden Ort und Ausmaß der

cyr61-Genexpression auf transkriptioneller Ebene offenbaren kann. Die Expression von cyr61 zeigt ihrerseits an, ob Gene, die den Prozess der Angiogenese kontrollieren, in typischen oder erwarteten Ausmaßen exprimiert werden oder nicht.

**[0060]** Unter Verwendung dieser Werkzeuge wurde das Maus-cyr61-mRNA-Expressionsmuster unter Anwendung einer RNase-Schutztechnik ermittelt. O'Brian et al. (1992). Im Speziellen wurde eine Antisense-Ribosonde mit 289 Nucleotiden verwendet, die für gewöhnlich 246 Nucleotide der Maus-cyr61-mRNA schützt (Nucleotide 67 bis 313 unter Verwendung der Nummerierung von O'Brian et al.). Die Tests zeigten das Auftreten von cyr61-mRNA in PSA-1-Zellen (10 µg Gesamt-RNA) des undifferenzierten Stadiums oder der Stadien 1, 2 und 3 der Differenzierung (PSA-1-Zellen erfahren drei Stadien der Zelldifferenzierung, die Maus-Embryozellen der folgenden Trächtigkeit alter in Tagen entsprechen: 4,5-6,5 (PSA-1-Stadium 1); 6,5-8,5 (PSA-1-Stadium 2); 8,5-10,5 (PSA-1-Stadium 3)). Ein Vergleich des Schutzes von Embryo- und Plazenta-Gesamt-RNAs (je 20 µg) zeigte, dass cyr61 in embryonalen Geweben zu Zeitpunkten exprimiert wird, die mit den Prozessen der Zelldifferenzierung und -vermehrung zusammenfallen.

**[0061]** Expressionscharakteristika von Human-cyr61 wurden durch Northern-Analyse unter Anwendung von Techniken ermittelt, die auf dem Gebiet der Erfindung standardmäßig eingesetzt werden. Sambrook et al. RNA wurde aus der diploiden Human-Fibroblasten-Zelllinie WI38 (ATCC CCL-75) isoliert. Außerdem wurde RNA aus Rattenzellen (REF52), Hamsterzellen (CHO) und Affenzellen (BSC40) isoliert. Jede dieser Zelllinien wurde in MEM-10 (Eagle's Minimal Essential Medium mit Earle's Salzen (Gibco-BRL Inc.), 2 mM Glutamin und 10 % Fötalkälberserum (fcs)) zur Konfluenz gezüchtet und zwei Tage lang in MEM-0,5 (ein Medium mit 0,5 % Serum) gehalten. Die Kulturen wurden dann mit 20 % fcs in An- und Abwesenheit von Cycloheximid durch auf dem Gebiet der Erfindung bekannte Verfahren stimuliert. Lau et al. (1985, 1987). Zehn-Mikrogramm-Aliquoten von aus diesen Zelllinien isolierter RNA wurden dann mittels Formaldehyd-Agarose-Gelelektrophorese fraktioniert, transferiert und an Nitrozellulosefiltern immobilisiert und gegenüber einer [<sup>32</sup>P]-radiomarkierten Vollängen-Maus-cyr61-cDNA-Sonde unter Hybridisierungsbedingungen hoher Stringenz ausgesetzt. Die Human-cyr61-RNA-Expression war der Maus-cyr61-Expression ähnlich. Sowohl Maus- als auch Human-cyr61-Expression lieferten RNAs von ungefähr 2 Kilobasen. Sowohl die Maus- als auch die Human-Expression von Cyr61 wurden außerdem durch Serum stimuliert und waren gegen Cycloheximid resistent.

**[0062]** Die Verteilung von Human-cyr61-mRNA wurde ferner unter Verwendung mehrfacher Gewebe-Northern-Blots (Clontech) untersucht. Die Blots wurden in einer Express-Hyb-Lösung (Clontech) gemäß den Anleitungen des Herstellers hybridisiert. Die Ergebnisse zeigten, dass cyr61-mRNA in menschlichem/r Herz, Lunge, Pankreas und Plazenta reichlich vorhanden ist; in niedrigen Mengen in Skelettmuskel, Niere und Hirn vorhanden ist; und in Leber nicht detektierbar ist. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der Expression von cyr61 in Mausgeweben.

**[0063]** Außerdem wurde zelluläre Gesamt-RNA aus Human-Hautfibroblasten (HSFs) isoliert, die entweder ruhend, exponentiell wachsend, von Serum stimuliert oder gegenüber Cycloheximid ausgesetzt waren. HU-VE-Zellen (ATCC CRL 1730) wurden in Ham's F12-Medium gehalten, das mit 10 % fbs (Intergene), 100 µg/ml Heparin (Gibco BRL) und 30 µg/ml Endothelzellen-Wachstumsergänzung (Collaborative Biomedical Products) ergänzt war. Human-Hautfibroblasten (HSF, ATCC CRL-1475) und WI38-Fibroblasten (ATCC CCL-75) wurden in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) gezüchtet, das mit 10 % fbs ergänzt war. Ruhende HSFs wurden durch Züchten in mit 10 % fbs ergänztem DMEM bis zur Konfluenz, gefolgt von Mediumswechsel gegen 0,1 % fbs enthaltendes DMEM 2 Tage lang hergestellt. Serum-Stimulierung wurde durch Mediumswechsel auf 20 % fbs 1 Stunde lang durchgeführt. Wo angezeigt, wurde Cycloheximid auf 10 µg/ml gleichzeitig mit Serum 3 Stunden lang zugesetzt.

**[0064]** RNAs aus den oben erwähnten Zellen wurden unter Anwendung einer Guanidinium-Isothiocyanat-Arbeitsvorschrift isoliert. Chomczynski et al., Anal. Biochem. 162, 156-159 (1987). RNA-Proben wurden durch elektrophoretische Trennung in Formaldehyd-Agarose-Gelen analysiert, gefolgt vom Transfer auf Nylon-Filter. Die Blots wurden mit willkürlich geprimten Sonden hybridisiert, die unter Verwendung von entweder cyr61 oder GAPDH als Templat erzeugt wurden. Adams et al., Nature 355, 632-634 (1992). Die Ergebnisse zeigten an, dass Human-cyr61-mRNA in ruhenden Human-Hautfibroblasten nicht nachweisbar, in logarithmisch wachsenden und Serumstimulierten HSFs reichlich vorhanden ist und durch Cycloheximid superinduziert wird.

**[0065]** Die Analyse von RNA, die für CTGF kodiert, umfasste auch Techniken, die auf dem Gebiet der Erfindung standardmäßig eingesetzt werden. Im Speziellen umfasste die Untersuchung von RNA, die für CTGF kodiert, die Isolierung von zellulärer Gesamt-RNA und Northern-Analysen, die wie in US-Patent Nr. 5.408.040, Spalte 11, Zeile 59, bis Spalte 12, Zeile 14, und Spalte 13, Zeilen 10-29. Es wurde eine 2,4-kb-RNA identifiziert.

Die Expression von CTGF war hoch in Plazenta, Lunge, Herz, Niere, Skelettmuskel und Pankreas. Jedoch war die CTGF-Expression in Leber und Hirn niedrig.

#### Beispiel 4

##### Transgene Tiere

**[0066]** Die Konstruktion transgener Mäuse, die integrierte Kopien rekombinanter *cyr61*-Sequenzen trugen, wurde unter Verwendung linearer DNA-Fragmente erzielt, die ein Fusionsgen enthielten. Die für *cyr61* kodierende Sequenz wurde unabhängig voneinander an die  $\beta$ -Actin-, K14- und pgk-Promotoren wie oben beschrieben fusioniert. Die Expression von *cyr61* wurde von diesen Promotoren in den transgenen Tieren angetrieben. Das Fusionsgen wurde durch geeignete Restriktionsendonuclease-Verdauungen mittels Standardtechniken produziert. Die Fusionsgenfragmente wurden in Einzelzell-Zygoten von Swiss-Webster-Mäusen injiziert. Die injizierten Zygoten wurden dann in scheinträchtige Weibchen implantiert. Mehrere Würfe von Mäusen wurden auf diese Weise produziert. Neugeborene, die ungewöhnliche Phänotypen zeigten, wurden weiteren Analysen unterzogen. Beispielsweise zeigten neugeborene transgene Mäuse, die *cyr61* unter dem pgk-Promotor exprimierten, Skelettdeformationen, einschließlich gewellter Schwänze, unbeweglicher Gelenke und verdrehter Extremitäten, was Fortbewegungsschwierigkeiten bewirkte. Diese Mäuse waren typischerweise verkümmert und verendeten innerhalb von sieben Tagen nach der Geburt. Transgene Mäuse, die *cyr61* unter dem  $\beta$ -Actin-Promotor exprimierten, zeigten keinen offensichtlichen Phänotyp, außer dass die Mäuse kleiner waren. Wenn Mäuse, die das Transgen trugen, zum Inzucht-Stamm C57BL/6 rückgekreuzt wurden, verkümmerten die Nachkommen der Mäuse mit fortgesetzter Rückkreuzung in zunehmendem Maße. Nach drei oder vier solcher Rückkreuzungen überleben im Wesentlichen keine Nachkommen zur Reproduktion. Transgene Mäuse, die *cyr61* unter dem K14-Promotor exprimierten, zeigten eine Form von fibrotischer Dermatitis. Die Pathologie umfasste ausgeprägte Oberflächenkratzwunden, die manchmal in Blutungen resultierten. Transgene Organismen, die Knockout-Mutationen von *cyr61* aufwiesen, können unter Anwendung dieser Standardtechniken ebenfalls erzeugt werden (Hogan et al., *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1994)) und sind zweckdienlich als Modelle von Krankheitszuständen.

#### Beispiel 5

##### Cyr61-Expression

**[0067]** Natives *Cyr61* wird in Embryogewebe exprimiert und wird in einer Vielzahl verwundeter Gewebe induziert. Siehe unten; siehe auch O'Brian et al. (1992). Die Gewebeverteilung von *Cyr61* wurde mit polyklonalen Kaninchen-Anti-*Cyr61*-Antikörpern untersucht, die unter Anwendung herkömmlicher immunologischer Technik (Harlow et al. (1987)) hervorgerufen und affinitätsgereinigt wurden. Unter Verwendung affinitätsgereinigter polyklonaler Anti-*Cyr61*-Antikörper wurde *cyr61*-Expression in einer Vielzahl von Geweben gefunden, einschließlich Glattmuskel, Kardiomyozyten und Endothelen des kardiovaskulären Systems; Hirn, Rückenmark, Ganglien und Neuronen und Retina des Nervensystems; Knorpel und Knochen des Skelettsystems; Epidermis, Haar, Mund-Epithel und Hornhaut der Haut; Bronchiolen und Blutgefäßen der Lunge; und Plazenta-Gewebe. Zusätzlich zu den auf natives *cyr61* (mRNA und Protein) gerichteten Expressionsuntersuchungen haben Untersuchungen unter Verwendung von oben beschriebenen *cyr61*-Transgenen zum Verständnis der Erfinder über die *Cyr61*-Expression beigetragen. Die Verwendung von Transgenfusionen, die die Expressionskontrollsequenzen von *cyr61* und die kodierende Sequenz von lacZ (für  $\beta$ -Galactosidase kodierend) umfassen, hat einen zweckmäßigen kolorimetrischen Test für die Proteinexpression bereitgestellt.

**[0068]** Der kolorimetrische Test umfasst die Verwendung von 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (d.h. X-Gal) als Substrat für  $\beta$ -Galactosidase, das Genprodukt von lacZ. Die enzymatische Spaltung von X-Gal durch  $\beta$ -Galactosidase produziert einen intensiv gefärbten Indigo-Farbstoff, der für histochemische Färbung zweckdienlich ist. In der Praxis werden der Analyse unterzogene embryonale und adulte Gewebe seziiert und in 2 % Formaldehyd, 0,2 % Glutaraldehyd, 0,02 % Nonidet P-40 und 0,01 % Natriumdesoxycholat in standardmäßiger phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) fixiert. Die Fixierungszeiten variierten von 15-120 Minuten in Abhängigkeit von der Größe und Dichte von Organ- oder Embryoproben, die der Analyse unterzogen werden. Anschließend wurden die Proben in PBS gewaschen und über Nacht bei 37°C in einer PBS-Lösung gefärbt, die 5 mM Kaliumferrocyanid, 5 mM Kaliumferricyanid, 2 mM  $MgCl_2$ , 0,02 % Nonidet P-40, 0,01 % Natriumdesoxycholat und 1 mg/ml X-Gal (40 mg/ml in Dimethylsulfoxid (DMSO)) enthielt. Die Proben wurden dann in PBS gespült, in 4 % Paraformaldehyd 1-2 Stunden lang nachfixiert und in 70 % Ethanol bei 4°C gelagert, bis sie der mikroskopischen Untersuchung unterzogen wurden. Mäuse, die das *cyr61*-lacZ-Transgen enthielten, wurden verwendet, um das Expressionsprofil von *cyr61* zu kartieren. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 für

embryonales Gewebe am Tag 12,5 dargestellt.

Tabelle 1

Transgene Mauslinie	Blutgefäße	Skelett	Nervensystem	Epidermis
1.S <sup>1</sup>	+ <sup>2</sup>	-	+	+
2.S	+	+	+	+
3.S	+	+/-	+	+
4.T	+	-	-	nicht verfügbar
5.T	+	-	-	nicht verfügbar
6.T	+	+/-	-	nicht verfügbar
7.T	+	+/-	-	nicht verfügbar
8.T	+	+/-	+	nicht verfügbar

<sup>1</sup>Transgene Linien, S- stabile (etablierte) transgene Linien; T- vorübergehende Linien

<sup>2</sup> +/- Expressionsmuster nur teilweise reproduziert.

**[0069]** Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass Cyr61 in einer Vielzahl embryonaler Zelltypen exprimiert wird. Zusätzliche Informationen wurden der ektopischen Expression von Cyr61 entnommen, die aus einem anderen Typ von Transgenfusion resultiert, die eine an die kodierende Sequenz von *cyr61* gekoppelte heterologe Expressionskontrollsequenz umfasst. Die Kontrollsequenzen, der K14-Keratin-Promotor, der  $\beta$ -Actin-Promotor und der Phosphoglycerokinase-Promotor, steuerten die Expression von Cyr61 in einem Muster, das sich von seiner nativen Expression unterschied.

**[0070]** Transgene Mäuse, die Cyr61 ektopisch exprimierten, waren üblicherweise kleiner als Mäuse der Wildform und zeigten eine Verringerung der durchschnittlichen Lebensdauer. Darüber hinaus hatten diese transgenen Mäuse abnormale Herzen (d.h. verdickte Kammerwände mit einer entsprechenden Verminderung der inneren Kapazität) und abnormale Skelette, die durch gekrümmte Wirbelsäulen, geschwollene Gelenke bis zur Unbeweglichkeit und gewellte Schwänze gekennzeichnet waren. Daher stört die ektopische Expression von Cyr61 die Angiogenese (Blutgefäßentwicklung und Herzentwicklung) und Chondrogenese (Skelettentwicklung). Außerdem können transgene Mäuse, die Knockout-Mutationen von *cyr61* tragen, als Modelle von Krankheitszuständen entwickelt und getestet werden, die mit dem Fehlen von Cyr61-Aktivität in Verbindung stehen.

**[0071]** Eine Strategie für die Expression von rekombinantem *cyr61* wurde unter Verwendung eines Baculovirus-Expressionsvektors in Sf9-Zellen konstruiert. Baculovirus-Expressionsvektoren und Sf9-Zellen umfassende Expressionssysteme sind in Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel et al. (Hrsg.), §§ 16.9.1-16.12.6 (1987), beschrieben. Die Expressionsstrategie wurde auf eine Weise durchgeführt, indem die Maus-*cyr61*-cDNA in pBlueBac2, einem Transfervektor, kloniert wurde. Der rekombinante Klon wurde gemeinsam mit AcMNPV- (d.h. Autographa-california-Kern-Polyhedrose-Virus oder Baculovirus) Ziel-DNA zu Sf9-Zellen mittels Liposomvermittelter Transfektion unter Verwendung des MaxBac-Sets (Invitrogen Inc., San Diego, CA) gemäß den Anleitungen des Herstellers zugeführt. Das rekombinante Virus wurde Plaque-gereinigt und durch drei Passagen durch Sf9-Zellen über Infektion amplifiziert.

**[0072]** Konditioniertes Medium von Sf9-Insektenzellen, die mit einem Baculovirus-Konstrukt infiziert waren, das die Synthese von Maus-Cyr61 antreibt, wurde als Quelle zur Reinigung von Cyr61 verwendet (siehe unten). Das gereinigte rekombinante Cyr61 behält gewisse Eigenschaften des endogenen Proteins bei, z.B. die Heparin-Bindungsaktivität von Cyr61 (unten beschrieben) aus 3T3-Fibroblastenzellen, und wies eine Struktur auf, die dem endogenen Protein ähnlich ist, wie durch unabhängige Peptid-Profile offenbart wurde, die durch Teilproteolyse unter Verwendung von Chymotrypsin oder Trypsin (Sequenzierqualität; Boehringer-Mannheim Inc., Indianapolis, IN) produziert wurden.

**[0073]** Human-*cyr61* wurde ebenfalls mit dem Baculovirus-System exprimiert. Ein Smal-HindIII-Fragment

(den Nucleotiden 100-1649 der Seq.-ID Nr. 3 entsprechend) von *cyr61*-cDNA, das das gesamte offene Leserahinter von Human-*cyr61* umfasste, wurde in einen pBlueBac3-Baculovirus-Expressionsvektor (Invitrogen) subkloniert. Rekombinante Baculovirus-Klone wurden erhalten, Plaque-gereinigt und durch drei Passagen von Sf9-Infektion unter Anwendung herkömmlicher Techniken amplifiziert. Die Infektion von Sf9-Zellen und Human-Cyr61- (hCyr61-) Reinigung wurde unter Anwendung von Standardtechniken mit einigen Modifizierungen durchgeführt. Sf9-Zellen wurden in Serum-freiem Sf900-II-Medium (Sigma) gehalten. Sf9-Zellen wurden zu  $2-3 \times 10^6$  Zellen je 150-mm-Petrischale in Monolayer-Kulturen ausgesät und wurden mit 5 Plaque-bildenden Einheiten (PFU) des rekombinanten Virus pro Zelle infiziert. Das konditionierte Medium wurde nach 8 und 96 Stunden nach Infektion gesammelt, durch Zentrifugation ( $5000 \times g$ , 5 Minuten) geklärt und auf 50 mM MES (2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure), pH 6,0, 1 mM PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid) und 1 mM EDTA eingestellt. Das Medium wurde in einem Verhältnis von 5 ml Sepharose-S-Perlen je 500 ml konditioniertem Medium mit Sepharose-S-Perlen gemischt, die mit Beladungspuffer (50 mM MES, pH 6,0, 1 mM PMSF, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl) äquilibriert waren, und die Proteine wurden bei 4°C (über Nacht) unter sanftem Schütteln an die Sepharose S binden gelassen. Die Sepharose-S-Perlen wurden durch Sedimentation ohne Rühren 20 Minuten lang gesammelt und auf die Säule aufgegeben. Die Säule wurde mit 6 Volumina 0,3 M NaCl in Beladungspuffer gewaschen, und rekombinantes Human-Cyr61 wurde mit einem Stufengradienten von NaCl (0,4-0,8 M) in Beladungspuffer von der Säule eluiert. Diese Prozedur resultierte in 3-4 Milligramm gereinigtem Cyr61-Protein aus 500 ml konditioniertem Medium, und das gereinigte Cyr61 war zu über 90 % rein, wie durch Coomassie-Blau-Färbung von SDS-Gelen beurteilt wurde.

**[0074]** Die vollständige Human-*cyr61*-cDNA kann alternativ in einen Cytomegalovirus-Vektor, wie z.B. pBK-CMV (Stratagene, LaJolla, CA), unter Verwendung der Polymerasekettenreaktion (Hayashi, in: PCR: The Polymerase Chain Reaction, Mullis et al. (Hrsg.), Birkhauser, 3-13 (1994)) und Taq-Polymerase mit Editing-Funktion kloniert werden, gefolgt von herkömmlichen Klonierungstechniken, um das PCR-Fragment in einen Vektor zu insertieren. Der Expressionsvektor wird dann durch Liposomvermittelte Transfektion in HU-VE-Zellen eingeführt. Empfänger-Klone, die das Vektor-getragene neo-Gen enthalten, werden mittels G418 selektiert. Selektierte Klone werden vermehrt und die Cyr61-Expression mittels Reverse-Transkription-Polymerasekettenreaktion (d.h. RT-PCR; Chelly et al., in: PCR: The Polymerase Chain Reaction, Mullis et al. (Hrsg.), Birkhauser, 97-109 (1994)) oder Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assays (d.h. ELISA; Stites et al., in: Basic and Clinical Immunology, Stites et al. (Hrsg.), Appleton & Lange, 243 (1991)) identifiziert.

**[0075]** Cyr61-Protein kann auch in Bakterienzellen oder anderen Expressionssystemen (z.B. Hefe) exprimiert werden, und zwar unter Verwendung der für *cyr61*-cDNA kodierenden Region, die an Promotoren gebunden ist, die im verwendeten Zelltyp operativ sind. Unter Verwendung von einem dieser Ansätze kann Cyr61-Protein in einer Form erhalten werden, die direkt an Patienten, z.B. durch intravenöse Wege, verabreicht werden kann, um angiogene, chondrogene oder onkogene Störungen zu behandeln. Ein Fachkundiger wird üblicherweise anerkennen, dass andere Verabreichungswege ebenfalls verfügbar sind, wie z.B. topische oder lokale Anwendung, Liposom-vermittelte Abgabetechniken oder subkutane, intradermale, intraperitoneale oder intramuskuläre Injektion.

#### Beispiel 6

#### Fisp12-Expression

**[0076]** Die Expression von Fisp12 und ein Vergleich der Expressionseigenschaften von Cyr61 und Fisp12 wurden unter Anwendung immunhistochemischer Techniken untersucht. Für diese immunhistochemischen Analysen wurden Gewebeproben (siehe unten) zunächst 2-4 lang Stunden einer Behandlung mit Methyl-Car-noy's-Fixiermittel (60 % Methanol, 30 % Chloroform und 10 % Eisessig) unterzogen. Dann wurden sie entwässert, geklärt und in Paraplast-X-tra-Wachs bei 55-56°C für eine minimale Zeit infiltriert. 7 µm dicke Abschnitte wurden auf mit Poly-L-Lysin beschichteten Objektträgern (Sigma) gesammelt, montiert und entwachst. Dann wurden sie mit einer 0,03%igen  $H_2O_2$ -Lösung in Methanol 30 Minuten lang behandelt, um endogene Peroxidaseaktivität zu inaktivieren. Nach Rehydratisierung wurden die Abschnitte 15 Minuten lang in Tris-gepufferte Kochsalzlösung (TBS: 10 mM Tris, pH 7,6 und 140 mM NaCl) gegeben. An diesem Punkt wurden die Abschnitte geblottet, um überschüssiges TBS mit Papiertüchern zu entfernen, und mit 3%igem normalen Ziegenserum in TBS 10 Minuten lang in einer feuchten Kammer blockiert. Überschüssiger Puffer wurde dann abgetropft und primäre Antikörper aufgegeben. Affinitätsgereinigte Anti-Cyr61-Antikörper wurden 1:50 in 3%iger Normal-Ziegenserum-TBS-Lösung verdünnt. Die Verdünnung für affinitätsgereinigte Anti-Fisp12-Antikörper betrug 1:25. Die routinemäßige Kontrolle war 3%iges Normal-Ziegenserum-TBS oder ein irrelevanter Antikörper (beispielsweise monoklonales Anti-Glattnuskelzellen-a-Actin). Die Spezifität der Färbung wurde durch Inkubation von Anti-Cyr61- oder Anti-Fisp12-Antikörpern mit einem Überschuss des entsprechenden Antigens auf Eis für zu-

mindest zwei Stunden vor dem Aufgeben auf Abschnitte bestätigt. Es wurde vollständige Konkurrenz beobachtet. Im Gegensatz dazu trat keine Kreuz-Konkurrenz (Inkubation von Cyr61-Antikörpern mit Fisp12-Antigen und umgekehrt) auf.

**[0077]** Die primären Antikörper wurden über Nacht bei 4°C auf den Abschnitten belassen. Sie wurden dann zweimal mit TBS gewaschen und einer 30-minütigen Inkubation mit Sekundärantikörpern bei Raumtemperatur unterzogen. Die verwendeten Sekundärantikörper waren Ziege-Anti-Kaninchen-Meerrettichperoxidase-Konjugate von Boehringer-Mannheim Inc., Indianapolis, IN (in einer Verdünnung von 1:400 verwendet). Die Abschnitte wurden zweimal in TBS gewaschen, und es wurde chromogenes Meerrettichperoxidase-Substrat 5 Minuten lang angewendet (1 mg/ml Diaminobenzidin in 50 mM Tris-HCl, pH 7,2 und 0,03 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Die Abschnitte wurden dann in Ehrlichschem Hämatoxylin oder in Alcian-Blau gegengefärbt, entwässert und in Permount montiert.

**[0078]** Maus-Embryos zwischen Neuralfalten- (E8.5, Embryo-Tag 8,5) und spätem Organogenese- (E18.5) Stadium der Entwicklung wurden geschnitten und der Immunfärbung mit Antigen-affinitätsgereinigten Kaninchen-Anti-Cyr61- und Anti-Fisp12-Antikörpern unterzogen. Während sich verschiedene Organe im Zuge der Embryogenese entwickelten, wurde die Anwesenheit von Cyr61 und Fisp12 bestimmt. Cyr61 und Fisp12 waren gemeinsam in einer Reihe von Geweben und Organen lokalisiert. Ein bemerkenswertes Beispiel ist die Plazenta, wo beide Proteine leicht detektierbar waren. Im Speziellen wurden Cyr61 sowie Fisp12 in tropoblastischen Riesenzellen und um diese herum gefunden, was die frühere Detektion von *cyr61*-mRNA in diesen Zellen durch In-situ-Hybridisierung (O'Brian und Lau (1992)) bestätigt. Sowohl Cyr61- als auch Fisp12-Signale der immunhistochemischen Färbung wurden vom entsprechenden Cyr61- oder Fisp12-Antigen blockiert, jedoch weder untereinander noch durch irrelevante Proteine, was die Spezifität belegt. Im Allgemeinen konnten Cyr61- und Fisp12-Proteine sowohl intrazellulär, als auch extrazellulär detektiert werden.

**[0079]** Zusätzlich zur Plazenta wurden sowohl Cyr61 als auch Fisp12 im kardiovaskulären System detektiert, einschließlich im Glattmuskel, in den Kardiomyozyten und Endothelen. Beide Proteine wurden auch in den Bronchiolen und Blutgefäßen der Lunge gefunden. Niedrige Ausmaße an Anti-Cyr61- und Anti-Fisp12-Färbung konnten vorübergehend im Skelettmuskel detektiert werden. Diese Färbung ist mit der Bindegewebshülle und nicht mit Myozyten assoziiert; in diesem Fall war das Färbemuster eindeutig extrazellulär.

**[0080]** Ein komplexeres Verteilungsmuster wurde in der Epidermis und der Epithelen gefunden. Sowohl Cyr61- als auch Fisp12-Färbung konnten in der frühen Einzelzellschicht der embryonalen Epidermis sowie in der späteren mehrschichtigen, sich differenzierenden Epidermis detektiert werden. Fisp12 in der Epidermis sank mit dem Ende der Trächtigkeit auf nicht nachweisbare Mengen ab und blieb so während der adulten Phase, wogegen Cyr61 in der Epidermis leicht detektierbar war. Im Neugeborenen wurde eine starke Färbung von Fisp12 im Mund-Epithel beobachtet, wo die Cyr61-Färbung viel schwächer war, während Cyr61 im oberen Kieferknochen gefunden wurde, wo Fisp12 nicht beobachtet wurde. Das Anti-Fisp12-Signal im Mund-Epithel erhöhte sich allmählich und blieb bis in die adulte Phase intensiv. In der Zunge wurden sowohl Cyr61 als auch Fisp12 im keratinisierten Epithel beobachtet, obgleich das Fisp12-Färbemuster, nicht jedoch das von Cyr61, die Papilla filiformis ausschloss.

**[0081]** Abgesehen von den oben erwähnten Stellen der Lokalisierung waren Cyr61 und Fisp12 ferner einzeln in mehreren Organsystemen zugegen. Beispielsweise war Cyr61, nicht jedoch Fisp12 in den Skelett- und Nervensystemen vorhanden. Wie von den In-situ-Hybridisierungsexperimenten zu erwarten war (O'Brian und Lau (1992)), konnte Cyr61-Protein in den Sklerotom-Massen von Somiten und in Knorpel und Knochen in späteren Entwicklungsstadien leicht detektiert werden. Im Gegensatz dazu war Fisp12 im Skelettsystem nicht nachweisbar. Da die Korrelation mit der chondrozytischen Differenzierung eine der markantesten Eigenschaften der *cyr61*-Expression ist (O'Brian und Lau (1992)), könnte das Fehlen von Fisp12 im Skelettsystem einen wichtigen Unterschied bezüglich der biologischen Rollen von Cyr61 und Fisp12 unterbewerten. Im E14.5-Embryo konnte Cyr61 im ventralen Rückenmark, in Dorsalganglien, Axialmuskel und Sklerotom-hergeleiteten knorpeligen Wirbeln detektiert werden. Fisp12 wurde jedoch in diesen Geweben nicht detektiert.

**[0082]** Im Gegensatz dazu war Fisp12 in verschiedenen Sekretionsgeweben für sich alleine vorhanden. Beginnend bei E16.5 konnte Fisp12 in Pankreas, Nieren und Speicheldrüse detektiert werden. Im Pankreas war Fisp12 strikt auf die Peripherie der Langerhans-Inseln begrenzt. In der Niere wurde eine starke Fisp12-Färbung in den Sammelröhrchen und Henle-Schleifen beobachtet, Regionen, wo Cyr61 nicht gefunden wurde. In der schleimartigen submandibularen Speicheldrüse färbten sich nur die Sammelkanäle auf Fisp12, wogegen in der gemischten schleimig/serösen Submandibulardrüse sich sowohl die serösen Azini als auch die Sammelkanäle färbten. Das Signal in den Azini war peripher, was die Möglichkeit erhebt, dass Fisp12 Kapsel-assoziiert



ist. In einfachen holokrinen Talgdrüsen wurde ein starkes azelluläres Fisp12-Signal detektiert.

**[0083]** Zusammenfassend sind Cyr61 und Fisp12 gemeinsam in der Plazenta, im kardiovaskulären System, in Lunge und Haut lokalisiert worden. Kein Protein wurde weder im Verdauungssystem noch in den endokrinen Drüsen detektiert. Einzigartige Lokalisierung von Cyr61 kann im Skelettmuskel und Zentralnervensystem detektiert werden, und Fisp12 findet sich in Sekretionsgeweben, wo sich kein Cyr61 findet.

**[0084]** Ein mit der Proteinexpression in engem Zusammenhang stehendes Thema betrifft das metabolische Schicksal der exprimierten Proteine. Elemente der Cystein-reichen Proteinfamilie sind lokalisiert worden. Wie oben erörtert, findet sich sekretiertes Cyr61 in der ECM und an der Zelloberfläche, nicht jedoch im Kulturmedium (Yang und Lau (1991)), jedoch konnte Fisp12 im Kulturmedium leicht detektiert werden (Ryseck et al. (1991)). Um die Frage anzusprechen, ob Fisp12 ebenfalls ECM-assoziiert ist, wurde das Schicksal von Cyr61 sowie Fisp12 mittels Pulse-Chase-Experimenten verfolgt. Serum-stimulierte, subkonfluente NIH-3T3-Fibroblasten wurden metabolisch 1 Stunde lang Pulse-markiert und in kaltem Medium für verschiedene Zeitspannen verfolgt. Die Proben wurden in Zell-, ECM- und Medium-Fractionen fraktioniert, gefolgt von Immunpräzipitation, um Cyr61 und Fisp12 zu detektieren. Beide Proteine hatten eine ähnliche Halbwertszeit von ungefähr 30 Minuten in der Zellfraktion, die neu synthetisierte intrazelluläre Proteine sowie mit der Zelloberfläche assoziierte, sekretierte Proteine (Yang und Lau (1991)) einschließt. Es sollte angemerkt werden, dass der Hauptanteil von sekretiertem Cyr61 mit der Zelloberfläche assoziiert ist, da Cyr61 nach der Synthese quantitativ sekretiert wird und nur ein geringfügiger Anteil stabil mit der ECM assoziiert ist (Yang und Lau (1991)).

**[0085]** Ein Anteil von Cyr61 wurde in die ECM getrieben, wo es mehrere Stunden lang stabil war. Neu synthetisiertes Fisp12 wurde ebenfalls in die ECM getrieben, wo seine Halbwertszeit nur ungefähr 1 Stunde betrug. Ein größerer Anteil von Fisp12 wurde in das konditionierte Medium getrieben, wo kein Cyr61 detektierbar war. Fisp12 im konditionierten Medium hatte ebenfalls eine kurze Halbwertszeit von ungefähr 2 Stunden. Folglich ist Fisp12 eher übergangsmäßig mit der ECM assoziiert, wogegen Cyr61 stark mit der ECM assoziiert ist. Dieses Ergebnis legt nahe, dass Fisp12 in der Lage sein könnte, an einer Stelle fern vom Ort seiner Synthese und Sekretion zu wirken, wogegen Cyr61 eher lokal wirken könnte.

**[0086]** Da viele ECM-Proteine über eine Wechselwirkung mit Heparinsulfat-Proteoglykanen mit der Matrix assoziieren, könnte die Affinität, mit der ein Protein Heparin bindet, ein Faktor seiner Wechselwirkung mit der ECM sein. Die unten beschriebenen Ergebnisse von Heparin-Bindungstests stehen mit dieser Hypothese im Einklang.

#### Beispiel 7

##### Proteinreinigung

**[0087]** Serum-stimulierte NIH-3T3-Fibroblastenzellen wurden lysiert, um eine Quelle von nativem Maus-Cyr61 bereitzustellen. Yang et al. Gleichermaßen sind Human-Fibroblasten eine Quelle von nativem Human-Cyr61.

**[0088]** Rekombinantes Maus-Cyr61 wurde aus Sf9-Zellen gereinigt, die den oben beschriebenen rekombinanten Baculovirus-Vektor trugen, der die gesamte für cyr61 kodierende Sequenz enthält. Obgleich Maus-Cyr61 in Sf9-Zelllysaten unlösliche Aggregate bildete, wie es mit bakteriellen Zellextrakten der Fall war, wurden ungefähr 10 % des synthetisierten Cyr61 in löslicher Form in das Medium sekretiert. Die lösliche, sekretierte Form von Cyr61 wurde daher der Reinigung unterzogen.

**[0089]** Zunächst wurden subkonfluente Sf9-Zellen in Monolayer-Kulturen in ergänztem Grace-Medium (GIBCO-BRL Inc., Grand Island, NY) erzeugt. Grace, Nature 195, 788 (1962). Die Sf9-Zellen wurden dann mit 10 Plaque-bildenden Einheiten pro Zelle des rekombinanten Baculovirus-Vektors infiziert, 16 Stunden lang inkubiert und mit serumfreiem Grace-Medium gefüttert. Diese Zellen wurden in serumfreiem Grace-Medium vermehrt. Das konditionierte Medium wurde 48 Stunden nach der Infektion gesammelt, obgleich die Cyr61-Expression 24 Stunden nach der Infektion detektiert werden konnte. Anschließend wurde das konditionierte Medium durch 5-minütige Zentrifugation bei  $5.000 \times g$  geklärt, auf 4°C gekühlt, auf 50 mM MES, pH 6,0, 2 mM EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure), 1 mM PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid) eingestellt und auf eine Sepharose-S-Säule (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) bei 4°C (5 ml Ausschlussvolumen pro 500 ml Medium) aufgegeben. Die Säule wurde mit einem 150 mM NaCl enthaltenden Puffer (50 mM MES, pH 6,0, 2 mM EDTA, 0,5 mM PMSF) gewaschen, und gebundene Proteine wurden mit einem linearen NaCl-Gradienten (0,2-1,0 M) im selben Puffer eluiert. Die vereinigten Cyr61-Fractionen eluierten bei 0,6-0,7 M NaCl als deutlicher breiter

Peak. Die Säulenfraktionen waren zu 90 % rein, wie mittels 10%iger SDS-PAGE, gefolgt von Coomassie-Blau-Färbung und Western-Analyse unter Anwendung von Standardverfahren auf dem Gebiet der Erfindung ermittelt wurde. Yang et al.; siehe auch Sambrook et al., siehe oben. Für die Western-Analyse wurden die Blots mit affinitätsgereinigten Anti-Cyr61-Antikörpern wie in Yang et al. (siehe oben) beschrieben sondiert. Nach der Antikörpersondierung wurden die Western-Blots mit ECL<sup>TM</sup>- (d.h. Enhanced ChemiLuminescence-) Detektionsreagenzien (Amersham Corp., Arlington Heights, IL) gefärbt. Cyr61 enthaltende Fraktionen wurden vereinigt, mit Tris-HCl, pH 7,5, auf pH 7,5 eingestellt, und es wurde vor der Lagerung der Aliquote bei -70°C Glycerin auf 10 % zugegeben. Die Proteinkonzentration wurde mit dem modifizierten Lowry-Verfahren unter Verwendung des BioRad-Proteintestsets (BioRad Laboratories Inc., Hercules, CA) bestimmt. Dieses Reinigungsverfahren wurde zumindest fünf Mal mit ähnlichen Resultaten wiederholt. Die typische Ausbeute betrug 3-4 mg von 90 % reinem Cyr61-Protein aus 500 ml konditioniertem Medium.

**[0090]** Fisp12 wurde unter Anwendung einer Modifizierung des Cyr61-Reinigungsschemas gereinigt (Kireeva et al., Experimental Cell Research, im Druck). Serumfreies konditioniertes Medium (500 ml) von Sf9-Zellen, die mit 10 pfu pro Zelle infiziert waren, wurden 48 Stunden nach der Infektion gesammelt und auf eine 5-ml-Sepharose-S-Säule (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) aufgegeben. Nach reichlichem Waschen mit 0,2 M und 0,4 M NaCl wurden gebundene Proteine durch Stufenelution mit 0,5 M NaCl enthaltendem 50 mM MES (pH 6,0) gewonnen. Fisp12 enthaltende Fraktionen mit einer Reinheit von mehr als 80 % wurden vereinigt, bezüglich NaCl auf 0,15 M eingestellt und das Protein an einer 0,5-ml-Sepharose-S-Säule mit Elution des Proteins bei 0,6 M NaCl 3- bis 5fach aufkonzentriert.

**[0091]** Dieses Reinigungsschema ermöglichte die Isolierung von 1,5 mg rekombinantem Fisp12-Protein mit einer Reinheit von zumindest 80 % aus 500 ml serumfreiem konditioniertem Medium.

**[0092]** CTGF wurde mittels Affinitätschromatographie unter Anwendung der PDGF-Kreuzreaktivität zwischen CTGF und PDGF, wie in US-Patent Nr. 5.408.040, Spalte 7, Zeile 15, bis Spalte 9, Zeile 63, beschrieben gereinigt.

#### Beispiel 8

##### Polypeptid-Charakterisierung

**[0093]** Das Maus-Cyr61-Protein weist ein  $M_r$  von 41.000 und eine Länge von 379 Aminosäuren einschließlich des N-terminalen Sekretionssignals auf. Es besteht eine Aminosäuresequenzidentität von 91 % mit der Aminosäuresequenz von 381 Aminosäuren des Human-Proteins. Von jenen Regionen der Maus- und Human-Proteine, die zur Ähnlichkeit der beiden Proteine beitragen, sollte erwartet werden, dass sie zu den biologischen Aktivitäten beitragen, die beide Proteine gemeinsam aufweisen und hierin offenbart sind. Jedoch unterscheiden sich die Maus- und Human-Proteine signifikant im zentralen Teil des Proteins, wo beide Proteine frei von Cysteinen sind. Siehe O'Brian et al., Cell Growth & Diff. 3, 645-654 (1992). Eine Cystein-freie Region in der Maus-Cyr61-Aminosäuresequenz findet sich zwischen den Aminosäureresten 164 bis 226 (Seq.-ID Nr. 2). Eine entsprechende Cystein-freie Region findet sich in der Human-Cyr61-Aminosäuresequenz zwischen den Aminosäureresten 163 bis 229 (Seq.-ID Nr. 4). Im Spezielleren unterscheiden sich die Maus- und Human-Cyr61-Proteine am meisten zwischen den Cyr61-Aminosäuren 170-185 und 210-225. Andere Elemente der ECM-Signalmolekülfamilie Cystein-reicher Proteine, z.B. Fisp12 (Seq.-ID Nr. 6) und CTGF (Seq.-ID Nr. 8), zeigen ähnliche Strukturen, die auf sekretierte Proteine hinweisen, die Sequenzen aufweisen, die von Cysteinen dominiert sind.

**[0094]** Da Maus-Cyr61 38 Cysteine im sekretierten Teil von 355 Aminosäuren enthält, wurde der Beitrag der Bildung von Disulfidbindungen an der Cyr61-Tertiärstruktur untersucht. Das Aussetzen von Cyr61 gegenüber 10 mM Dithiothreitol (DTT) 16 Stunden lang beeinflusste die Fähigkeit von Cyr61 nicht, die Zellanhaftung zu vermitteln (siehe unten). Jedoch wurde Cyr61 durch Erwärmen bei 75°C 5 Minuten lang, Inkubation in 100 mM HCl oder bei extensivem Verdau mit Chymotrypsin inaktiviert. Diese Ergebnisse zeigen an, dass Maus-Cyr61 ein hitze- und säurelabiles Protein ist, dessen aktive Konformation gegen Reduktionsmittel nicht empfindlich ist. Die oben erwähnten strukturellen Ähnlichkeiten von Maus- und Human-Cyr61-Polypeptiden legen nahe, dass Human-Cyr61 ebenfalls gegen Hitze oder Säure empfindlich, jedoch unempfindlich gegen Reduktionsmittel ist. Außerdem ist Cyr61 weder phosphoryliert noch glykosyliert.

**[0095]** Um zu ermitteln, ob das oben beschriebene gereinigte rekombinante Maus-Cyr61 dasselbe wie das native Maus-Cyr61 war, wurden zwei zusätzliche Eigenschaften von Maus-Cyr61 bestimmt. Zuerst wurden zwei unabhängige Protein-Fingerprints von rekombinantem und nativem Maus-Cyr61 erhalten. Gereinigtes re-

kombinantes Maus-Cyr61 und ein Lysat von Serum-stimulierten 3T3-Zellen, die bekanntermaßen natives Maus-Cyr61 enthalten, wurden begrenzter Proteolyse entweder mit Trypsin oder Chymotrypsin unterzogen, und ihre Verdauungsprodukte wurden verglichen. Tryptische Teilverdauungen des rekombinanten Proteins sowie des Zelllysats lieferten zwei Cyr61-Fragmente von ungefähr 21 und 19 kDa. Gleichermaßen produzierte das Fingerprinting beider Präparate durch partiellen Chymotrypsinverdau stabile Fragmente von 23 kDa aus rekombinantes Maus-Cyr61 und nativem Maus-Cyr61.

**[0096]** Ein weiteres verwendetes Kriterium zur Beurteilung der Eigenschaften von rekombinantes Cyr61 war seine Fähigkeit, Heparin zu binden, wie unten beschrieben wird. Gereinigtes rekombinantes Maus-Cyr61 band quantitativ an Heparin-Sepharose bei 0,15 M NaCl und wurde bei 0,8-1,0 M NaCl eluiert. Diese Heparin-Bindungskapazität ist ähnlich dem nativen Maus-Cyr61, das aus Serum-stimulierten Maus-Fibroblasten erhalten wurde. Wegen der Ähnlichkeiten der Maus- und Human-Cyr61-Proteine sollte rekombinantes Human-Cyr61 Eigenschaften zeigen, die dem nativen Human-Cyr61 ähnlich sind, wie es für die Maus-Polypeptide der Fall war.

**[0097]** Die Fragmente der Erfindung behalten zumindest eine biologische Aktivität eines ECM-Signalmoleküls bei. Kandidat-Fragmente zur Erhaltung von zumindest einer biologischen Eigenschaft eines ECM-Signalmoleküls umfassen Fragmente, die eine Aminosäuresequenz aufweisen, die einer konservierten Region bekannter ECM-Signalmoleküle entsprechen. Beispielsweise wären Fragmente, die eine oder mehrere der konservierten Cysteinreste von ECM-Signalmolekülen beibehalten, wahrscheinliche Kandidaten für ECM-Signalmolekülfragmente, die zumindest eine biologische Aktivität beibehalten. Über natürlich auftretende Aminosäuresequenzen von Cyr61-Fragmenten hinaus können die Cyr61-Fragmente der Erfindung auch Analoga der Aminosäuresequenzen oder -untersequenzen nativer Cyr61-Fragmente umfassen.

**[0098]** Cyr61-Fragment-Analoga sind Polypeptide, die sich in ihrer Aminosäuresequenz von nativen Cyr61-Fragmenten unterscheiden, jedoch zumindest eine biologische Aktivität eines nativen ECM-Signalmoleküls wie oben beschrieben beibehalten. Diese Analoga können sich in ihrer Aminosäuresequenz von nativen Cyr61-Fragmenten unterscheiden, z.B. durch Insertion, Deletion oder konservative Substitution von Aminosäuren. Eine konservative Substitution einer Aminosäure, d.h. das Ersetzen einer Aminosäure durch eine andere Aminosäure mit ähnlichen Eigenschaften (z.B. Hydrophilie, Ausmaß und Verteilung geladener Regionen), wird auf dem Gebiet der Erfindung als typischerweise geringfügige Änderung angesehen. Diese geringfügigen Änderungen können teilweise durch Betrachtung des Hydropathie-Index von Aminosäuren festgestellt werden, wie auf dem Gebiet der Erfindung bekannt ist. Kyte et al., J. Mol. Biol. 157, 105-132 (1982). Der Hydropathie-Index einer Aminosäure basiert auf der Betrachtung seiner Hydrophobie und Ladung und umfasst die folgenden Werte: Alanin (+1,8), Arginin (-4,5), Asparagin (-3,5), Aspartat (-3,5), Cystein/Cystin (+2,5), Glycin (-0,4), Glutamat (-3,5), Glutamin (-3,5), Histidin (-3,2), Isoleucin (+4,5), Leucin (+3,8), Lysin (-3,9), Methionin (+1,9), Phenylalanin (+2,8), Prolin (-1,6), Serin (-0,8), Threonin (-0,7), Tryptophan (-0,9), Tyrosin (-1,3) und Valin (+4,2). Es ist auf dem Gebiet der Erfindung bekannt, dass Aminosäuren mit ähnlichen Hydropathie-Indizes substituiert werden können und nach wie vor Proteinfunktion beibehalten. Vorzugsweise werden Aminosäuren substituiert, die Hydropathie-Indizes von +/- 2 aufweisen.

**[0099]** Die Hydrophilie von Aminosäuren kann ebenfalls verwendet werden, um Substitutionen zu finden, die Proteine liefern würden, die ihre biologische Funktion beibehalten. Eine Betrachtung der Hydrophilie von Aminosäuren im Zusammenhang mit einem Polypeptid erlaubt die Berechnung der höchsten lokalen, mittleren Hydrophilie dieses Polypeptids, ein zweckdienliches Maß, von dem berichtet worden ist, dass es gut mit Antigenität und Immunogenität korreliert. US-Patent Nr. 4.554.101. Hydrophilie-Werte für jede der gewöhnlichen Aminosäuren, wie sie im US-Patent Nr. 4.554.101 berichtet werden, sind die folgenden: Alanin (-0,5), Arginin (+3,0), Asparagin (+0,2), Aspartat (+3,0 +/- 1), Cystein (-1,0), Glycin (0), Glutamat (+3,0 +/- 1), Glutamin (+0,2), Histidin (-0,5), Isoleucin (-1,8), Leucin (-1,8), Lysin (+3,0), Methionin (-1,3), Phenylalanin (-2,5), Prolin (-0,5 +/- 1), Serin (+0,3), Threonin (-0,4), Tryptophan (-3,4), Tyrosin (-2,3) und Valin (-1,5). Die Substitution von Aminosäuren mit ähnlichen Hydrophiliewerten kann Proteine liefern, die biologische Aktivität beibehalten, beispielsweise Immunogenität, wie auf dem Gebiet der Erfindung bekannt ist. Vorzugsweise werden Substitutionen mit Aminosäuren durchgeführt, die Hydrophiliewerte innerhalb von +/- 2 voneinander haben. Sowohl der Hydrophobie-Index als auch der Hydrophilie-Wert von Aminosäuren werden von der speziellen Seitenkette dieser Aminosäure beeinflusst. Im Einklang mit dieser Beobachtung hängen Aminosäuresubstitutionen, die mit biologischer Funktion kompatibel sind, von der relativen Ähnlichkeit der Aminosäuren und insbesondere der Seitenketten dieser Aminosäuren ab, wie durch die Hydrophobie, Hydrophilie, Ladung, Größe und andere Eigenschaften gezeigt wurde.

**[0100]** Außerdem sind Computeralgorithmen verfügbar, um die Vorhersage von Aminosäuresequenzdomä-

nen zu unterstützen, die voraussichtlich einem wässrigen Lösungsmittel zugänglich sind. Diese Domänen sind, wie auf dem Gebiet der Erfindung bekannt ist, häufig gegen die Außenseite des Proteins hin angeordnet, wodurch sie möglicherweise zur Bindung von Determinanten, einschließlich antigenen Determinanten, beitragen. Wenn man die DNA-Sequenz zur Verfügung hat, wird die Herstellung solcher Analoga durch Verfahren erzielt, die auf dem Gebiet der Erfindung wohl bekannt sind, z.B. (ortsgerichtete) Mutagenese und andere Techniken.

**[0101]** Derivate von Cyr61-Fragmenten können auch Cyr61-Fragmente der Erfindung sein. Cyr61-Fragment-Derivate sind Proteine oder Peptide, die sich von nativen Cyr61-Fragmenten auf andere Weisen als in der Primärstruktur (d.h. Aminosäuresequenz) unterscheiden. Illustrativ können Cyr61-Fragment-Derivate sich vom nativen Cyr61-Fragment durch Glykosylierung, einer Form von posttranslationeller Modifizierung, unterscheiden. Beispielsweise können Cyr61-Fragmente Glykosylierungsmuster aufgrund der Expression in heterologen Systemen zeigen. Wenn diese Cyr61-Fragmente zumindest eine biologische Eigenschaft eines nativen ECM-Signalmoleküls beibehalten, dann können diese Polypeptide Cyr61-Derivate gemäß der Erfindung sein. Andere ECM-Signalmolekül-Derivate umfassen, sind jedoch nicht eingeschränkt auf, Fusionsproteine mit einem kovalent modifizierten N- oder C-Terminus, PEGylierte Polypeptide, mit Lipidgruppierungen assoziierte Polypeptide, alkylierte Polypeptide, über eine funktionelle Aminosäureseitenkettengruppe an andere Polypeptide oder Chemikalien gebundene Polypeptide und zusätzliche Modifizierungen, wie sie auf dem Gebiet der Erfindung üblicherweise selbstverständlich sind. Außerdem können Cyr61-Fragmente der Erfindung an einen ECM-Signalmolekül-Rezeptor binden, wie unten beschrieben wird.

**[0102]** Die oben beschriebenen, verschiedenen Fragmente der vorliegenden Erfindung können als einzelne Polypeptide bereitgestellt werden oder z.B. durch kovalente Bindungen an andere Verbindungen gebunden sein. Beispielsweise können immunogene Träger, wie z.B. Schlüsselloch-Napfschnecke-Hämocyanin, an ein Cyr61-Fragment der Erfindung gebunden sein.

#### Beispiel 9

##### Heparin-Bindungstest

**[0103]** Der von Yang et al. beschriebene Heparin-Bindungstest für natives Maus-Cyr61 wurde für das gereinigte rekombinante Maus-Protein modifiziert. Zunächst wurde rekombinantes gereinigtes Cyr61 in RIPA- (Radioimmunpräzipitationstest-) Puffer (150 mM NaCl, 1,0 % NP-40, 0,5 % Desoxycholat, 0,1 % SDS, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid) suspendiert. Als Nächstes wurden 200 µl einer Aufschlämmung von 50 Vol.-% Heparin-Sepharose-CL-6B-Kügelchen (Pharmacia-LKB Biotechnology Inc., Piscataway, NJ) zu 100 µl der rekombinanten Cyr61-Lösung zugegeben und 1 Stunde lang inkubiert. Unter diesen Bedingungen wurde Human-Cyr61 quantitativ an Heparin-Agarose gebunden. Das Aufgeben eines Salzkonzentrationsgradienten in RIPA-Puffer resultierte in der Elution von rekombinanten Maus-Cyr61 bei 0,8-1,0 M NaCl. Das Elutionsprofil des rekombinanten Proteins war ähnlich dem Elutionsprofil für natives Maus-Cyr61.

**[0104]** Man könnte erwarten, dass Fisp12 Heparin mit einer niedrigeren Affinität als Cyr61 bindet, da es nicht so stark mit der ECM wechselwirkt wie Cyr61. Um diese Möglichkeit zu untersuchen, wurden metabolisch markierte (<sup>35</sup>S-Cystein; 100 µCi pro 100-mm-Platte; ICN) Zelllysate mit Heparin-Agarose-Perlen inkubiert, die anschließend gewaschen wurden, um ungebundene Proteine zu entfernen. Gebundene Proteine wurden in ansteigenden Salzkonzentrationen eluiert. Fisp12 aus Zelllysaten wurden auf Heparin-Agarose zurückgehalten, wurde jedoch bei 0,2 bis 0,6 M NaCl mit Peak-Elution bei 0,4 M NaCl eluiert. Dies steht im Gegensatz zu Cyr61, das bei wesentlich höheren NaCl-Konzentrationen eluiert wurde. Dieser Unterschied hinsichtlich der Heparin-Bindung steht im Einklang mit den unterschiedlichen Affinitäten von Cyr61 und Fisp12 für die ECM, was darauf hinweist, dass die Bindung an Heparansulfat-Proteoglykane ein hauptsächlicher Mechanismus ist, durch den beide Proteine mit der ECM assoziieren.

#### Beispiel 10

##### Rezeptoren

**[0105]** Human-Cyr61 war wie Maus-Cyr61 an der Zelloberfläche und ECM lokalisiert. Die Lokalisierung von Cyr61 an der Zelloberfläche implizierte einen Cyr61 bindenden Zelloberflächenrezeptor. Im Einklang mit dieser Schlussfolgerung werden die biologischen Wirkungen von Cyr61 durch  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin oder Vitronectin-Rezeptor vermittelt. Das  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin bildet in Verbindung mit anderen Integrinen Proteincluster, die Kristallisationspunkte für die Zytoskelett-Anhaftung bereitstellt. Cyr61 induziert die Bildung von Proteinclustern, einschließlich der  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin enthaltenden Proteincluster. Außerdem wurden unter Verwendung eines In-vitro-Tests die biolo-

gischen Wirkungen von Cyr61, einschließlich der Cyr61-induzierten Zelladhäsion und Mitogenese, durch die Zugabe von irgendeinem der beiden gegen das  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin gerichteten monoklonalen Antikörper LM609 (Cheresh, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 6471-6475 (1987)) oder Anti-VnR 1 (Chen et al., Blood 86, 2606-2615 (1995)) aufgehoben. Diese Daten führten zur Identifikation des  $\alpha_v\beta_3$ -Integrins als Cyr61-Rezeptor.

**[0106]** Die in Beispiel 13 unten beschriebene Cyr61-Induktion der HUVE-Zelladhäsion führte zu einer Untersuchung der gegen zweiwertige Kationen empfindlichen Zelloberflächenrezeptoren, die von HUVE-Zellen exprimiert werden. Die Zelladhäsionseigenschaften von Cyr61 wurden verwendet, um den Rezeptor zu identifizieren, der ein gegen zweiwertige Kationen empfindlicher Zelloberflächenrezeptor ist. Die Fähigkeit von Cyr61, die Zelladhäsion zu vermitteln, verbunden mit der absoluten Bedingung von zweiwertigen Kationen im Prozess, wies darauf hin, dass Cyr61 mit einem der von zweiwertigen Kationen abhängigen Adhäsionsmoleküle aus den Integrin-, Selectin- oder Cadherin-Familien wechselwirkt. Ruoslahti et al., Exp. Cell Res. 227, 1-11 (1996). Unter Anwendung gut charakterisierter Ansätze der Rezeptoridentifizierung wurde eine Reihe von Hemmuntersuchungen durchgeführt. Inhibitoren oder Blockierungsmittel mit verschiedenen Spezifitätsgraden (EDTA, ähnlich dem oben beschriebenen EGTA; inhibierende Peptide, die Varianten des RGD- (Einbuchstaben-Aminosäurecode) Integrin-Erkennungsmotivs beherbergen, wie z.B. RGDS, SGDR und RGDSPK (Ruoslahti et al., Science 238, 491-497 (1987); E. Ruoslahti, Ann. Rev. of Cell and Dev. Biol. 12, 698-715 (1996)); und bekannte, spezifische Anti-Rezeptor-Antikörper) wurden verwendet, um einen Cyr61-Rezeptor zu identifizieren. Dieser Rezeptor war das  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin, der auch dahingehend bekannt ist, dass er als Vitronectin-Rezeptor fungiert. Die Bestätigung dieser Identifizierung wurde erhalten, indem gezeigt wurde, dass der Antikörper LM609, ein spezifischer Anti- $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Antikörper, die Wirkung von Cyr61 auf die Zelladhäsion blockieren konnte. Integrine bilden eine große Familie heterodimerer Adhäsionsrezeptoren mit einem breiten Ligandenspezifitätsbereich, die an Zelle-Zelle- und Zelle-Matrix-Wechselwirkungen beteiligt sind. Über ihre Abhängigkeit von zweiwertigen Kationen und ihre Beteiligung an Zelle-Matrix-Adhäsionsereignissen (R.O. Hynes, Cell 69, 11-25 (1992)) hinaus sind Integrine auch an der Zellmigration (Damsky et al., Curr. Opin. Cell Biol. 4, 772-781 (1992); Doerr et al., J. Biol. Chem. 271, 2443-2447 (1996)) und -vermehrung (Juliano et al., J. Cell Biol. 120, 577-585 (1993); Plopper et al., Mol. Biol. Cell 6, 1349-1365 (1995); und Clark et al., Science 268, 233-239 (1995)) beteiligt, zwei weiteren Prozessen, die mit Cyr61-Aktivität verbunden sind. Das  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin erwies sich als essentiell für die Cyr61-vermittelte Zelladhäsion.

**[0107]** Die Charakterisierung der CTGF-Bindung an Zellen hat gezeigt, dass sie über einen Zelloberflächenrezeptor stattfindet, der auch mit PDGF-BB (der BB-Isoform von PDGF) wechselwirkt, wie im US-Patent Nr. 5.408.040, Spalte 11, Zeile 10, bis Spalte 12, Zeile 14, angeführt ist. Die Identifizierung der vorangehenden Rezeptoren erlaubt die Konstruktion und Produktion von Molekülen, die an die jeweiligen Rezeptoren binden, um die Aktivitäten von ECM-Molekülen zu hemmen.

#### Beispiel 11

##### Anti-ECM-Signalmolekül-Antikörper

**[0108]** Antikörper, die, wie unten beschrieben, gegebenenfalls an einen Marker oder an ein Toxin gebunden sind, sind in der vorliegenden Erfindung ebenfalls vorgesehen. Die Verfügbarkeit der Human-cyr61-cDNA-Sequenz und der abgeleiteten Cyr61-Proteinsequenz erleichtert die Implementierung von Verfahren, die zur Hervorrufung von Anti-Cyr61-Antikörpern unter Anwendung einer Reihe von Standardtechniken auf dem Gebiet der Erfindung (Harlow et al.) entworfen wurden.

**[0109]** Polyklonale Antikörper, die gegen Cyr61 gerichtet sind, können erzeugt werden. Die Erzeugung von Anti-Cyr61-Antikörpern, die für Human-Cyr61 spezifisch sind, wird beispielsweise durch Konstruieren geeigneter Antigene optimiert. Das Human-Cyr61-Protein hat einschließlich des N-terminalen Sekretionssignals eine Länge von 381 Aminosäuren. Wie oben beschrieben weist Human-Cyr61 91 % Aminosäuresequenzidentität mit der Sequenz von 379 Aminosäuren des Maus-Proteins auf. Jedoch unterscheiden sich die Maus- und Human-Proteine am signifikantesten im zentralen Teil der Proteine, wo sie frei von Cysteinen sind (siehe oben). Diese Sequenzunterschiede werden genutzt, um Antikörper hervorzurufen, die gegen das Human-Cyr61 spezifisch sind, indem ein Peptid als Antigen verwendet wird, das eine Sequenz aufweist, die sich von einer der unterschiedlichen Regionen im Human-Protein herleitet, obgleich gegen eine konservierte Region gerichtete Antikörper in der Erfindung ebenfalls vorgesehen sind.

**[0110]** Monoklonale Antikörper können unter Verwendung von intaktem rekombinantem menschlichem Cyr61 hervorgerufen werden. Ein Fragment kann ebenfalls verwendet werden kann. Weibliche BALB/c-Mäuse werden intraperitoneal mit einem Gemisch von 0,25 ml bakteriell produziertem oder in eukaryotischen Zellen pro-

duziertem, rekombinantem Human-Cyr61 (5-50 Mikrogramm) und 0,25 ml komplettem Freundschem Adjuvans inokuliert. Vierzehn Tage später werden die Injektionen wiederholt, wobei das komplette Freundsches Adjuvans durch inkomplettes Freundsches Adjuvans ersetzt wird. Nach weiteren zwei Wochen wird eine weitere Injektion von Human-Cyr61 in inkomplettem Freundschem Adjuvans verabreicht. Ungefähr zwei Wochen nach der dritten Injektion wird an den Schwänzen Blut abgenommen und Serumproben auf Human-Anti-Cyr61-Antikörper durch Immunpräzipitation mit radiomarkiertem rekombinantem Human-Cyr61 gescreent. Ungefähr 2 Monate nach der ersten Injektion werden diejenigen Mäusen, deren Sera die höchsten Antikörpertiter lieferten, Booster-Injektionen von Cyr61 verabreicht (5-50 Mikrogramm in inkomplettem Freundschem Adjuvans, 0,1 ml intravenös und 0,1 ml intraperitoneal). Drei Tage nach der Booster-Injektion werden die Mäuse getötet. Splenozyten werden dann aus jeder Maus mittels Standardtechniken isoliert und die Zellen gewaschen und einzeln mit einer Myelomzelllinie, z.B. der X63Ag8.653-Zelllinie (Harlow et al.), unter Verwendung von Polyethylenglykol durch Techniken fusioniert, die auf dem Gebiet der Erfindung bekannt sind. Andere geeignete Zelllinien zur Fusion mit Splenozyten sind in Harlow et al. auf Seite 144, in Tabelle 6.2, beschrieben. Fusionierte Zellen werden aus der PEG-Lösung entfernt, in ein gegenselektives Medium (z.B. Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin- oder HAT-Medium) verdünnt, um unfusionierte Myelomzellen abzutöten, und in Multi-Well-Gewebekulturplatten inokuliert.

**[0111]** Ungefähr 1-2 Wochen später werden Proben der Gewebekulturüberstände aus den Wells, die wachsende Hybridome enthalten, entfernt und auf die Anwesenheit von Anti-Cyr61-Antikörpern durch Binden an rekombinantes, an Nitrozellulose gebundenes Cyr61 und Screenen mit markiertem Anti-Immunglobulin-Antikörper in einem standardmäßigen Antikörper-Fang-Test getestet. Zellen aus positiven Wells werden gezüchtet, und es werden einzelne Zellen auf Feeder-Schichten von Splenozyten kloniert. Die klonierten Zelllinien werden gefroren gelagert. Monoklonale Antikörper werden unter Anwendung von Standardtechniken, z.B. Hydroxyapatit-Chromatographie, gesammelt und gereinigt. In einer Alternative können als Antigene verwendete Cyr61-Peptide an immunogene Träger, wie z.B. an Schlüsselloch-Napfschnecken-Hämocyanin-Trägerprotein gebunden werden, um monoklonale Anti-Cyr61-Antikörper hervorzurufen.

**[0112]** Es können auch Antikörperprodukte gegen ein Fusionsprotein, das einen Teil des Human-Cyr61 oder das gesamte Human-Cyr61 enthält, erzeugt werden, wobei ausreichend Proteinsequenz umfasst ist, um ein brauchbares Epitop in einem Fusionsprotein zu entfalten. Die Fusion der großen Untereinheit von Anthranilat-Synthase (d.h. TrpE) an Maus-Cyr61 und die Fusion von Glutathion-S-Transferase (d.h. GST) an Maus-Cyr61 sind verwendet worden, um erfolgreich Antikörper gegen Maus-Cyr61 herzustellen. Yang et al. Außerdem kann eine breite Vielfalt von Polypeptiden, die dem Fachkundigen auf dem Gebiet der Erfindung wohl bekannt sind, bei der Bildung von Cyr61-Fragment-Fusionspolypeptiden gemäß der Erfindung verwendet werden.

**[0113]** Yang beschrieb ein TrpE-Cyr61-Fusionspolypeptid, das aus einem rekombinanten Klon exprimiert wurde, der durch Klonen eines Fragments von Maus-cyr61-cDNA, die die Nucleotide 456 bis 951 (für die Cyr61-Aminosäuren 93-379 kodierend) enthält, in die SacI-Stelle des pATH1-Vektors konstruiert wurde. Dieckman et al., J. Biol. Chem. 260, 1513-1520 (1985). Das rekombinante Konstrukt wurde in einen bakteriellen Wirt, z.B. E. coli K12, transformiert, und die Expression des Fusionsproteins wurde durch Zugabe von 25 µg/ml Indolacrylsäure zu wachsenden Kulturen induziert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und das Gesamtzelllysate durch Elektrophorese an einem 7,5%igen Polyacrylamidgel fraktioniert. Das Fusionsprotein der vorhergesagten Größe war die einzige von Indolacrylsäure induzierte Bande; diese Bande wurde aus dem Gel eluiert und als Antigen verwendet, um New-Zealand-White-Kaninchen (Langshaw Farms) mittels Standardtechniken auf dem Gebiet der Erfindung zu immunisieren. Harlow et al. Zusätzlich zu polyklonalen Antikörpern können auch monoklonale Antikörper gegen solche Fusionsproteine gerichtet sein.

**[0114]** In anderen Ausführungsformen der Erfindung werden rekombinante Antikörperprodukte verwendet. Beispielsweise liegen chimäre Antikörperprodukte, „humanisierte“ Antikörperprodukte und CDR-Pfropf-Antikörperprodukte im Schutzbereich der Erfindung. Kashmiri et al., Hybridoma 14, 461-473 (1995). Antikörperfragmente sind in der Erfindung ebenfalls vorgesehen. Die Antikörperprodukte umfassen die oben erwähnten, als isolierte Antikörper oder als an Marker gebundene Antikörper verwendeten Arten von Antikörperprodukten. Marker können signalerzeugende Enzyme, Antigene oder Antikörper, Lectine, Kohlenhydrate, Biotin, Avidin, Radioisotope, Toxine, Schwermetalle und andere auf dem Gebiet der Erfindung bekannte Zusammensetzungen sein; Bindungstechniken sind auf dem Gebiet der Erfindung ebenfalls wohl bekannt.

**[0115]** Anti-Cyr61-Antikörper sind bei der Diagnose eines Thrombose-Risikos zweckdienlich, wie unten in Beispiel 20 ausführlicher erläutert wird. Außerdem werden Anti-Cyr61-Antikörper in Therapien verwendet, die zur Prävention oder Verringerung unerwünschter, abnormalen Cyr61-Spiegel zurechenbarer Gerinnung entwor-

fen wurden. Weiters können Antikörper gemäß der Erfindung an Toxine, wie z.B. Ricin, unter Anwendung von auf dem Gebiet der Erfindung wohl bekannten Techniken gebunden werden. Diese Antikörperprodukte gemäß der Erfindung sind bei der Abgabe von spezifisch abzielenden Zytotoxinen an Zellen zweckdienlich, die Cyr61 exprimieren, z.B. Zellen, die an der Neovaskularisierung von massiven Tumoren teilnehmen. Diese Antikörper werden durch eine Reihe von Verabreichungswegen in pharmazeutischen Zusammensetzungen abgegeben, die Träger und Verdüner umfassen, wie von Fachkundigen auf dem Gebiet der Erfindung wohlverstanden wird.

**[0116]** Antikörper, die Fisp12 spezifisch erkennen, sind ebenfalls unter Verwendung eines Fusionsproteins hervorgerufen worden. Das zur Herstellung von Anti-Fisp12-Antikörpern verwendete Antigen band Glutathion-S-Transferase (GST) an den zentralen Teil von Fisp12 (GST-Fisp12), wo keine Sequenzähnlichkeit mit Cyr61 besteht (O'Brian und Lau (1992)). Ein Konstrukt, das für Aminosäuren 165 bis 200 von Fisp12 kodierende cDNA enthielt, wurde an die für Glutathion-S-Transferase (GST) kodierende Sequenz fusioniert. Dies wurde mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) durchgeführt, um die Synthese eines DNA-Fragments, das jenes Fisp12-Fragment umfasste, das von einer 5'-BamHI-Restriktionsstelle und einer 3'-EcoRI-Restriktionsstelle flankiert war, zu lenken. Der 5'-Primer weist die Sequenz 5'-GGGGATCTGTGACGAGCCCAAGGAC-3' (Seq.-ID Nr. 9) auf, und der 3'-Primer weist die Sequenz 5'-GGGAATTCGACCAGGCAGTTGGCTCG-3' (Seq.-ID Nr. 10) auf. Für Cyr61-spezifisches Antiserum wurde ein Konstrukt, das den zentralen Teil von Cyr61 (Aminosäuren 163-229), der keine Sequenzähnlichkeit zu Fisp12 enthält, an GST fusioniert, unter Verwendung des 5'-Primers 5'-GGGGATCCTGTGATGAAGACAGCATT-3' (Seq.-ID Nr. 11) und des 3'-Primers 5'-GGGAATTCACGATGCATTTCTGGCC-3' (Seq.-ID Nr. 12) in derselben Weise hergestellt. Diese wurden gerichtet in den pGEX2T-Vektor (Pharmacia-LKB Inc.) kloniert und die Klone mittels Sequenzanalyse bestätigt. Das GST-Fusionsprotein wurde an Glutathion-Sepharose 4B (Pharmacia-LKB Inc.) gemäß den Anleitungen des Herstellers isoliert und dazu verwendet, um New-Zealand-White-Kaninchen zu immunisieren. Für Affinitätsreinigungen wurden Antisera zunächst durch eine GST-Protein-Affinitätssäule geschickt, um gegen GST erzeugte Antikörper zu entfernen, und dann durch eine GST-Fisp12- oder GST-Cyr61-Protein-Affinitätssäule, um Anti-Fisp12- oder Anti-Cyr61-Antikörper zu isolieren (Harlow et al. (1988)).

**[0117]** Diese Antikörper immunpräzipitierten das Fisp12-Proteinprodukt der korrekten Größe, das, von fisp12-mRNA gelenkt, in vitro synthetisiert wurde. Die Antikörper sind für das Fisp12-Polypeptid spezifisch und zeigen keine Kreuzreaktivität mit Cyr61.

**[0118]** CTGF erkennende polyklonale Antikörper sind ebenfalls bekannt. US-Patent Nr. 5.408-040, Spalte 7, Zeile 41, bis Spalte 9, Zeile 63, offenbart eine immunologische Kreuzreaktivität zwischen PDGF und CTGF, wie sie oben beschrieben wird.

## Beispiel 12

### Hemmende Peptide

**[0119]** Hemmende Peptide können in therapeutischen Strategien eingesetzt werden, die zur Hemmung der Aktivität des Cyr61-Proteins entworfen wurden. Ein Ansatz ist die Synthese eines hemmenden Peptids auf Basis der Proteinsequenz von Cyr61. Beispielsweise konkurriert ein Peptid, das eine Aminosäuresequenz umfasst, die zwischen Maus-Cyr61 (Seq.-ID Nr. 2) und Human-Cyr61 (Seq.-ID Nr. 4) konserviert ist, mit nativem Cyr61 um seine Bindungsstellen. Diese Konkurrenz hemmt dadurch die Wirkung von nativem Cyr61. Beispielsweise hemmt die Verabreichung eines hemmenden Peptids über wohl bekannte Wege die Fähigkeit von Cyr61, die Kaskade von Ereignissen zu beeinflussen, die Blutgerinnsel, Vaskularisierung von Tumoren oder abnormale Vaskularisierung des Auges (z.B. Augenstörungen, die durch Vaskularisierung der Retina oder Glaskörperflüssigkeit gekennzeichnet sind) usw. bewirkt. Insbesondere verhindert ein hemmendes Peptid, dass Cyr61 die Wirkung von Gewebefaktorpfad-Inhibitor (Tissue-Factor-Pathway-Inhibitor) oder TFPI wie unten beschrieben hemmt.

**[0120]** Hemmende Peptide wurden so konstruiert, dass sie mit Cyr61 konkurrieren. Diese hemmenden Peptide dienen wie die Antikörper des vorhergehenden Beispiels als Beispiele von Modulatoren der Cyr61-Aktivität, wie sie im Zusammenhang mit einer Reihe von hierin offenbarten Tests der Cyr61-Aktivität beschrieben sind. Die Peptid-Konstruktion war von Sequenzvergleichen unter Maus-Cyr61, Fisp12 und Nov (ein Vogel-Proto-Onkogen) geleitet. Die Aminosäuresequenzen von mehreren Elementen dieser Familie werden in [Fig. 1](#) verglichen. Diese Arten von Sequenzvergleichen stellen eine Basis für eine rationale Konstruktion einer Vielzahl von hemmenden Peptiden bereit. Einige dieser konstruierten Peptide, zum Beispiel Peptide, die die Aminosäuren 48-68 (Seq.-ID Nr. 13), 115-135 (Seq.-ID Nr. 14), 227-250 (Seq.-ID Nr. 15), 245-270 (Seq.-ID Nr. 16)

und 310-330 (Seq.-ID Nr. 17) der Seq.-ID Nr. 2 umfassen, sind synthetisiert worden. Ein Vergleich der Maus-Cyr61-Aminosäuresequenz und der Human-Cyr61-Aminosäuresequenz offenbart, dass ähnliche Domänen aus dem Human-Protein bei der Konstruktion von Peptiden, die Human-Cyr61 hemmen, verwendet werden können. Außerdem können Sequenzvergleiche die Human-Cyr61-Aminosäuresequenz umfassen; Vergleiche können ferner das Human-Homolog von Fisp12, Connective-Tissue-Growth-Factor, umfassen, das ebenfalls als Element dieser Proteinfamilie identifiziert worden ist. O'Brian et al. (1992).

**[0121]** Hemmende Peptide können auch konstruiert werden, um mit anderen ECM-Signalmolekülen, z.B. Fisp12 oder CTGF, um die Bindung an ihre entsprechenden Rezeptoren zu konkurrieren. Die Konstruktion hemmender Peptide wird durch die Ähnlichkeit der Aminosäuresequenzen unter den ECM-Signalmolekülen erleichtert. Außerdem kann die Konstruktion von hemmenden Peptiden durch ein oder mehrere Verfahren gelenkt werden, die auf dem Gebiet der Erfindung zur Identifizierung von Aminosäuresequenzen bekannt sind, die wahrscheinlich funktionelle Domänen umfassen (z.B. hydrophile Aminosäuresequenzen wie äußere/Oberflächen-Proteindomänen; Sequenzen, die mit  $\alpha$ -Helixbildung als Membran-umspannende Domänen kompatibel sind). Diese Verfahren sind in Form von im Handel erhältlicher Software, die dem Fachkundigen auf dem Gebiet der Erfindung bekannt sind, implementiert worden. Siehe z.B. „Intelligenetics Suite of Analytical Programs for Biomolecules“. Intelligenetics Inc., Mountain View, CA. Unter Anwendung dieser Ansätze können hemmende Peptide konstruiert werden, die die biologische Aktivität eines ECM-Signalmoleküls, wie z.B. Cyr61, Fisp12 oder CTGF, stören. Mit der Konstruktion einer Aminosäuresequenz eines hemmenden Peptids kann die Produktion dieses Peptids durch eine Reihe wohl bekannter Techniken realisiert werden, einschließlich rekombinanter Produktion und chemischer Synthese, sind jedoch nicht darauf beschränkt. Beispielhafte Peptide, von denen gezeigt worden ist, dass sie zumindest eine biologische Eigenschaft von Cyr61 spezifisch hemmen, umfassen Peptide, die das „RGD“-Motiv oder Motiv-Varianten, wie z.B. „RGDS“, „RGDSPK“, „GDR“ oder „SGDR“, aufweisen (Ruoslahti et al., Science 238, 491-497 (1987); E. Ruoslahti, Ann. Rev. of Cell and Dev. Biol. 12, 698-715 (1996)), wie oben in Beispiel 10 beschrieben wurde.

#### Beispiel 13

##### Zelladhäsion

**[0122]** Cyr61 kann zur Vermittlung der Anhaftung von Zellen an die extrazelluläre Matrix verwendet werden. Die Induktion der Zelladhäsion wurde unter Verwendung von Maus-Cyr61, Fibronectin und Rinderserumalbumin (BSA) untersucht. Immunologische 96-Well-Platten (Marke Falcon) wurden mit 50  $\mu$ l 0,1 % BSA in PBS bei 4°C in Gegenwart von 0-30  $\mu$ g/ml Maus-Cyr61 oder Fibronectin beschichtet. Nach zwei Stunden Aussetzen gegenüber der Beschichtungslösung wurden unverdünnte Immun- oder Prä-Immunsensera (30  $\mu$ l/Well) oder affinitätsgereinigte Anti-Cyr61-Antikörper zugegeben. In einigen Wells wurde das Beschichtungsgemisch auf 10 mM DTT oder 100 mM HCl eingestellt. Nach 16 Stunden Inkubation wurde die Beschichtungslösung entfernt und die Welloberfläche mit 1 % BSA in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) 1 Stunde lang bei Raumtemperatur blockiert. HUVE-Zellen wurden in komplettem Ham-F12K-Medium (Gibco-BRL Inc.; Ham, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 53, 786 (1965)) zu  $5 \times 10^3$ - $10^4$  Zellen/Well ausplattiert. Cycloheximid wurde auf 100  $\mu$ g/ml unmittelbar vor dem Ausplattieren zugegeben, und Monensin wurde auf 1  $\mu$ M 14 Stunden vor der Ausplattierung zugegeben. Nach einer 2-stündigen Inkubation bei 37°C wurden die Wells mit PBS gewaschen, und anhaftende Zellen wurden fixiert und mit Methylenblau gefärbt. Die Anhaftungseffizienz wurde durch quantitative Farbstoffextraktion und Messung der Extraktabsorption bei 650 nm bestimmt. Oliver et al., J. Cell. Sci. 92, 513-518 (1989).

**[0123]** HUVE-Zellen hafteten schlecht an mit BSA alleine behandelten Platten, hafteten jedoch gut an mit Fibronectin beschichteten Platten. Maus-Cyr61-beschichtete Oberflächen unterstützten ebenfalls die Anhaftung von HUVE-Zellen auf dosisabhängige Weise, ähnlich wie Fibronectin. Beispielsweise ergaben Cyr61 und Fibronectin bei 1  $\mu$ g/ml  $A_{650}$ -Werte von 0,1. Ein  $A_{650}$ -Wert von 0,5 entsprach der Anhaftung von  $6 \times 10^3$  Zellen. Am anderen Ende des getesteten Konzentrationsbereichs, 30  $\mu$ g/ml, ergab Cyr61 eine  $A_{650}$  von 0,8; Fibronectin ergab eine  $A_{650}$  von 0,9. Cyr61 förderte auch die Anhaftung von NIH-3T3-Zellen, obgleich weniger effektiv als Fibronectin.

**[0124]** Cyr61-vermittelte Zellanhaftung kann schon 30 Minuten nach Ausplattierung beobachtet werden, wie mittels Lichtmikroskopie sichtbar gemacht werden kann.

**[0125]** Die Adhäsion von HUVE-Zellen an Maus-Cyr61-beschichteten Oberflächen wurde durch Anti-Cyr61-Antiserum und durch affinitätsgereinigte Anti-Cyr-61-Antikörper spezifisch gehemmt, nicht jedoch durch Prä-Immunsensum. Im Gegensatz dazu wurde die Anhaftung von Zellen an Fibronectin-beschichtete Platten



weder durch das Anti-Cyr61-Antiserum noch durch affinitätsgereinigte Anti-Cyr61-Antikörper beeinträchtigt. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Verstärkung der Zelladhäsion eine spezifische Aktivität des Cyr61-Proteins ist. Darüber hinaus war die Cyr61-vermittelte Zellanhaftung unempfindlich gegen Cycloheximid- oder Monensin-Behandlung, was darauf hinweist, dass Cyr61 nicht durch Induzieren der De-novo-Synthese von ECM-Komponenten, Stimulation von Fibronectin oder Collagen-Sekretion agiert. Die Daten stützen vielmehr die direkte Einwirkung von Cyr61 auf Zellen, die die Adhäsion beeinflussen. Die Cyr61-vermittelte Anhaftung von HUVE-Zellen wurde durch die Gegenwart von EGTA vollständig aufgehoben; jedoch wurde die Anhaftung durch Zusatz von  $\text{CaCl}_2$  oder  $\text{MgSO}_4$  zum Medium wiederhergestellt. Diese Ergebnisse zeigen an, dass die Wechselwirkung zwischen Cyr61 und seinem Oberflächenrezeptor zweiwertige Kationen erfordert, was mit den Beobachtungen übereinstimmt, die zur Identifizierung des  $\alpha_v\beta_3$ -Integrins als den oben in Beispiel 10 beschriebenen Cyr61-Rezeptor führte.

**[0126]** Die Fähigkeit von Cyr61, die Zelladhäsion zu fördern, und die Fähigkeit von Molekülen, wie z.B. Anti-Cyr61-Antikörpern, diesen Prozess zu hemmen, wird in einem Test für Modulatoren der Zelladhäsion ausgenutzt. Der Test umfasst einen Vergleich der Zelladhäsion an Oberflächen, z.B. Kunststoff-Gewebekulturwells, die mit Cyr61 und einem mutmaßlichen Modulator der Zelladhäsion beschichtet sind. Als Kontrolle wird eine ähnliche Oberfläche mit Cyr61 alleine beschichtet. Nach dem Kontakt mit geeigneten Zellen werden die an den Oberflächen anhaftenden Zellen gemessen. Ein relativer Anstieg der Zelladhäsion in Gegenwart des mutmaßlichen Modulators relativ zum Ausmaß an Zellanhaftung an einer Cyr61-beschichteten Oberfläche identifiziert einen Förderer der Zelladhäsion. Eine relative Abnahme der Zelladhäsion in Gegenwart des mutmaßlichen Modulators identifiziert einen Inhibitor der Zelladhäsion.

**[0127]** Die Identifizierung eines Cyr61-Rezeptors führte zur Entwicklung eines schnellen und spezifischen Ligand-Rezeptor-Tests (d.h. Integrin-Bindungstests) für Cyr61. Der monoklonale Antikörper LM609 (Anti- $\alpha_v\beta_3$ ) ist beschrieben worden. Cheresch (1987). Der monoklonale Antikörper JBS5 (Anti-Fibronectin-Antikörper) wurde von Chemicon bezogen. Anti-Human- und Anti-Rinder-Vitronectin-Antisera stammten von Gibco BRL. HRP-konjugierter Ziege-Anti-Kaninchen-Antikörper stammte von KPL. RDGSPK-Peptid stammte von Gibco BRL; RGDS- und SDGR-Peptide stammten von American Peptide Company. Die Peptide für die funktionellen Tests wurden zu 10 mg/ml in PBS gelöst und der pH mit NaOH auf 7,5-8,0 eingestellt. Human-Plasma-Vitronectin stammte von Collaborative Biomedical Products.

**[0128]** Die  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Reinigung aus HUVE-Zelllysaten wurde wie in Pytela et al., Meth. Enzymol. 144, 475-489 (1987), beschrieben durchgeführt. Zusammenfassend wurden  $10^8$  Zellen in 1 ml PBS lysiert, das 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,5 mM PMSF und 100 mM Octylglucosid enthielt. Das Lysat wurde vier Mal durch eine 0,5-ml-Säule geschickt die RDGSPK-Sephrose (hergestellt aus der Bromcyan-aktivierten Sepharose CL 4B, wie beschrieben in S.C.-T. Lam, J. Biol. Chem. 267, 5649-5655 (1992)) enthielt. Die Säule wurde mit 10 ml des Lysepuffers gewaschen, und das gebundene Protein wurde mit 2 ml desselben Puffers, der 1 mM RGDS-Peptid enthielt, bei Raumtemperatur eluiert. Das  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin wurde gegen PBS dialysiert, das 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 5 mM Octylglucosid und 0,1 mM PMSF enthielt, wobei der Dialysepuffer drei Mal ausgetauscht wurde, um das RGDS-Peptid zu entfernen. Das Protein wurde in Aliquoten bei  $-70^\circ\text{C}$  gelagert. Die Reinheit des Integrins wurde mittels SDS-PAGE unter nichtreduzierenden Bedingungen bestimmt, gefolgt von Silberfärbung. Western-Blotting mit Anti-CD47-Antikörper zeigte, dass dieses  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Präparat keinerlei Integrin-assoziierten Proteine enthält.

**[0129]** Der Integrin-Bindungstest wurde gemäß den Offenbarungen in Brooks et al., Cell 85, 683-693 (1996), und S.C.-T. Lam (1992) entwickelt. Ungefähr 50 ng des Integrins in einem Gesamtvolumen von 50  $\mu\text{l}$  wurden pro Well immunologischer 96-Well-Pro-Bind-Platten (Falcon) zugegeben und über Nacht bei  $4^\circ\text{C}$  inkubiert. Unspezifische Stellen wurden mit 20 mg/ml BSA im selben Puffer blockiert und vier Mal in diesem Puffer gewaschen. Die behandelten Platten wurden mit 1  $\mu\text{g/ml}$  Cyr61 oder 0,1  $\mu\text{g/ml}$  Vitronectin 3 Stunden lang bei Raumtemperatur inkubiert. EDTA (5 mM), RGDS-Peptid (0,5 mM) und blockierende Antikörper wurden entweder mit dem immobilisierten Integrin 1 Stunde lang vor der Zugabe des Protein-Liganden vorinkubiert oder gemeinsam mit dem Liganden zugegeben. Die Endverdünnung der LM609-Aszitesflüssigkeit betrug 1:200. Gebundene Proteine wurden durch spezifische polyklonale Antisera (Anti-Cyr61-Antiserum wurde 1:500 und Anti-Vitronectin-Antiserum wurde 1:1000 in PBS verdünnt, das 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1 mM  $\text{MgCl}_2$  und 5 mg/ml BSA enthielt), gefolgt von einem sekundären Antikörper-Meerrettichperoxidase-Konjugat (1:20.000 im selben Puffer) detektiert. Die Platten wurden nach jeder Inkubation vier Mal mit 1 mM  $\text{CaCl}_2$  und 1 mM  $\text{MgCl}_2$  enthaltendem PBS gespült. Meerrettichperoxidase (HRP) wurde mit einem HRP-Immunistestset (Bio-Rad Laboratories) detektiert. Die kolorimetrische Reaktion wurde 15-20 Minuten lang bei Raumtemperatur entwickelt, durch Zugabe von  $\text{H}_2\text{SO}_4$  gestoppt, und die Absorption bei 450 nm wurde gemessen. Fachkundige auf dem Gebiet der Erfindung werden verstehen, dass eine Vielzahl von Techniken anstelle des beispielhaften enzymgebundenen immunologischen

Ansatzes eingesetzt werden könnten. Beispielsweise könnten andere Marker, wie z.B. Radiomarker, fluoreszierende Verbindungen und dergleichen, z.B. kovalent an einen Antikörper oder ein anderes Mittel, welches das Peptid von Interesse, wie z.B. Cyr61, erkennt, gebunden werden.

**[0130]** Die Ergebnisse der Integrin-Bindungstests zeigten, dass Vitronectin und Cyr61 an das immobilisierte Integrin banden. Weiters war sowohl die Cyr61- als auch die Vitronectin-Bindung an  $\alpha_v\beta_3$  saturierbar. Die Konzentration von Cyr61, bei der Sättigung erreicht wurde, war signifikant höher als die für Vitronectin erforderliche Konzentration zur Sättigung. Dieser Unterschied könnte eine niedrigere Affinität von  $\alpha_v\beta_3$  für Cyr61 im Vergleich zu Vitronectin widerspiegeln, was im Einklang mit den Ergebnissen von Zelladhäsionstests steht, die zeigen, dass HUVE-Zellen auf konzentrationsabhängige Weise an Vitronectin und schwächer an Cyr61 anhaften (siehe unten).

**[0131]** Die Spezifität der Wechselwirkung wurde durch Blockieren der Ligandenbindungsstelle des Integrins untersucht, und zwar unter Anwendung einer beliebigen von mehreren Techniken, einschließlich Verarmung an zweiwertigen Kationen, RGDS-Peptid-Konkurrenz und LM609-Antikörper-Hemmung. Die Wechselwirkung beider Proteine (Cyr61 und Vitronectin) mit  $\alpha_v\beta_3$  wurde von EDTA, RGDS-Peptid und LM609-Antikörper gehemmt. Diese Eigenschaften der Cyr61-Wechselwirkung mit  $\alpha_v\beta_3$  standen ferner im Einklang mit den Ergebnissen des Zelladhäsionstests und zeigten an, dass die HUVE-Zellen-Adhäsion an Cyr61 durch die direkte Wechselwirkung von Cyr61 mit dem  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin vermittelt wurde.

**[0132]** Außerdem induziert Cyr61 Fokaladhäsion, d.h. Zelloberflächen-Fokuspunkte für Zytoskelettanhaftungen. Die Fokaladhäsion wird durch Zelloberflächen-Proteinkomplexe oder -cluster bewirkt. Diese Proteinkomplexe sind komplex und umfassen eine Reihe von Rezeptoren aus der Integrin-Familie und eine Reihe von Proteinkinasen. Die Induktion der Fokaladhäsion durch Cyr61 widerspiegelt sich in der Fähigkeit von Cyr61, spezielle Elemente dieser Zelloberflächencluster zu induzieren. Beispielsweise induziert Cyr61 die Phosphorylierung der Fokal-Adhäsion-Kinase, einem 125-kDa-Polypeptid, und Paxillin, einem weiteren Protein, das bekanntermaßen an den Fokaladhäsions-Zelloberflächenproteinkomplexen beteiligt ist. Darüber hinaus haben indirekte Immunfluoreszenz-Untersuchungen gezeigt, dass Cyr61 an einen Rezeptor (siehe oben) in Fokaladhäsions-Plaques gebunden wird. Die Plaques ihrerseits sind charakteristisch für Fokaladhäsions-Proteinkomplexe. Fokal-Adhäsion-Kinase, Paxillin und  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin sind gemeinsam an den Fokaladhäsions-Plaques lokalisiert, die durch Cyr61-induzierte Fokaladhäsionskomplexbildung produziert wurden. Diese Fokaladhäsions-Proteinkomplexe binden Cyr61 an der Zelloberfläche; die Komplexe heften sich auch innen an das Zytoskelett. Daher sind Maus-Cyr61 und Human-Cyr61 (siehe unten) zum Teil Adhäsionsmoleküle, eine Eigenschaft, die Cyr61 von herkömmlichen Wachstumsfaktoren unterscheidet. Der Fachkundige auf dem Gebiet der Erfindung wird anerkennen, dass das  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin in Verbindung mit Cyr61 verwendet werden kann, um auf Modulatoren der Cyr61-Bindung an seinen Rezeptor zu screenen. Das Integrin kann immobilisiert und entweder gegenüber (a) Cyr61 und einem mutmaßlichen Modulator der Rezeptorbindung oder (b) Cyr61 alleine ausgesetzt werden. Anschließend wird gebundenes Cyr61 detektiert, z.B. durch Anti-Cyr61-Antikörper, der mittels Techniken markiert ist, die auf dem Gebiet der Erfindung bekannt sind, wie z.B. Radiomarkierung, Fluoreszenzmarkierung und die Verwendung von Enzymen, die kolorimetrische Reaktionen katalysieren. Ein Förderer der Cyr61-Bindung an seinen Rezeptor würde die Bindung von Cyr61 im Vergleich zur Bindung durch Cyr61 alleine erhöhen (und ein Inhibitor würde Cyr61 vermindern).

**[0133]** Die Wirkung von Maus-Cyr61 auf die Zellmorphogenese kann durch einen Zellausbreitungstest ermittelt werden. Polystyrol-Petrischalen wurden mit 2 ml einer 10- $\mu\text{g/ml}$ -Lösung von Cyr61 oder Fibronectin in PBS mit 0,1 % BSA beschichtet und wie oben beschrieben behandelt. Eine dritte Platte wurde mit BSA behandelt und diente als Kontrolle. Jede Platte erhielt  $7 \times 10^6$  Zellen und wurde 2 Stunden lang inkubiert. Die Zellausbreitung wurde durch Mikroskopie bei 100facher Vergrößerung analysiert. Die Ergebnisse zeigen an, dass Maus-Cyr61 die HUVE-Zellausbreitung ungefähr im selben Ausmaß wie Fibronectin induziert. Die effiziente Anhaftung (siehe oben) und Ausbreitung von Zellen auf Maus-Cyr61-beschichteten Substraten zeigte an, dass Cyr61 mit einem signaltransduzierenden Zelloberflächenrezeptor wechselwirken könnte, was zu einer Kaskade von Zytoskelett-Umordnungen und zu einer möglichen Bildung von Fokalkontakten führt. Folglich können Cyr61 und Cyr61-verwandte Polypeptide bei der Kontrolle der Zelladhäsion zweckdienlich sein, z.B. bei Zelladhäsionsereignissen, die metastasierende Krebszellen, Organreparatur und -regenerierung oder Chondrozyten-Besiedelung von Prothesenimplantaten begleiten, wie unten erörtert wird.

**[0134]** Im Gegensatz zu Maus-Cyr61, das die Anhaftung sowie Migration von HUVE-Zellen vermittelt, vermittelte hCyr61 die Zelladhäsion, nicht jedoch die Ausbreitung von HUVE-Zellen. Immunologische Platten (96-Well-ProBind-Testplatten, Falcon) wurden mit 0,1-30  $\mu\text{g/ml}$  hCyr61, Fibronectin (Gibco BRL) oder Vitronectin (Gibco BRL) in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS), die 0,1 % Protease-freies BSA (Sigma) enthielt,

16 Stunden lang bei 4°C beschichtet. Die Wells wurden mit 1 % BSA in PBS 1 Stunde lang bei Raumtemperatur blockiert und mit PBS gewaschen. HUVE-Zellen wurden mit 0,02 % EDTA in PBS geerntet, zweimal mit serumfreiem F12-Medium gewaschen und in serumfreiem F12 resuspendiert. In einigen Experimenten wurde fbs auf 5-10 % zugegeben. Auch wurde in Experimenten mit Vironectin-beschichteten Platten endogenes Vironectin durch Immunaффinitätschromatographie unter Verwendung von polyklonalen Anti-Vironectin-Antikörpern aus Rindern (Gibco) von fbs entfernt. Norris et al., J. Cell Sci. 95, 255-262 (1990). Die Zellen wurden zu 10<sup>4</sup> Zellen/Well ausplattiert. Nach zwei Stunden wurden die Zellen mit 4 % Paraformaldehyd fixiert, mit Methylenblau gefärbt und wie beschrieben quantifiziert. Oliver et al., J. Cell Sci. 92, 513-518 (1989).

**[0135]** Unter serumfreien Bedingungen vermittelte hCyr61 die Zellanhaftung, nicht jedoch die Ausbreitung von HUVE-Zellen. Die Anhaftung von HUVE-Zellen an hCyr61-beschichtete Platten wurde durch Aufnahme von Serum in das Kulturmedium verstärkt. In Gegenwart von Serum erfolgte die Anhaftung und Ausbreitung von HUVE-Zellen an hCyr61 auf eine ähnliche Weise, wie sie an Fibronectin beobachtet worden ist. Human-Cyr61 förderte die Adhäsion von HUVE-Zellen auf dosisabhängige Weise bei hohen (10 %) und niedrigen (0,5 %) Serumkonzentrationen. Jedoch war in Gegenwart von 10 % fbs der maximale Anteil an Zellen, die bei niedrigerer hCyr61-Konzentration anhafteten, und der Anteil von anhaftenden Zellen höher. Von Human-Cyr61 zeigte sich ebenfalls, dass es mit Vironectin bei der Förderung der Adhäsion und Ausbreitung von HUVE-Zellen kooperierte. Zwei hauptsächliche Zelladhäsionsproteine, die sich in Säugetier-Seren finden, sind Fibronectin und Vironectin, die auch als „Serum-Ausbreitungsfaktor“ bekannt sind. Für einen Überblick siehe Felding-Habermann et al., Curr. Opin. Cell Biol. 5, 864-868 (1993). Zellanhaftung, -ausbreitung und -wachstum auf Gewebekultur-Kunststoff hängten aus den folgenden Gründen von Vitronectin und nicht von Fibronectin im Serum ab: (1) erhebliche Verarmung von Fibronectin in den fbs-Chargen wegen „Gerinnung“ bei 4°C; und (2) Unfähigkeit von Fibronectin, den Kunststoff in Gegenwart einer überschüssigen Menge anderer Serumproteine effizient zu beschichten. Im Gegensatz dazu beschichtete Vitronectin die Kunststoffoberflächen unter denselben Bedingungen effizient.

**[0136]** Es wurde die Fähigkeit von HUVE-Zellen verglichen, in Gegenwart von pseudo-immunverarmtem fbs und Serum, das mit Anti-Rinder-Vitronectin-Antikörpern immunverarmt war, an hCyr61-beschichteten Platten zu haften. HUVE-Zellen hafteten an hCyr61-beschichteten Oberflächen signifikant besser in Gegenwart von löslichem Vitronectin oder pseudo-immunverarmtem fbs als in Gegenwart von serumfreiem Medium oder Medium, das mit Vitronectin-immunverarmtem fbs ergänzt war. Die Zugabe von Vitronectin (30 µg/ml) zu Vitronectin-immunverarmtem Serum stellte die Fähigkeit von HUVE-Zellen zur Anhaftung und Ausbreitung an hCyr61-beschichteten Platten im selben Ausmaß wieder her, wie sie beobachtet wurde, wenn Gesamtserum im Zellanhaftungstest verwendet wurde. Darüber hinaus stellte lösliches Vitronectin alleine bei einer Konzentration, die gleich seiner Konzentration in 10 % Serum war (30 µg/ml), das Ausmaß an Zelladhäsion und -ausbreitung auf jenes Ausmaß wieder her, das in Gegenwart von 10 % Serum gefunden wurde. Folglich ist Vitronectin eine notwendige und hinreichende Serumkomponente, die zur Adhäsion und Ausbreitung von HUVE-Zellen an hCyr61-beschichteten Kunststoffoberflächen beiträgt. Kontrolluntersuchungen zeigten, dass die Wirkung von Vitronectin nicht auf seine bevorzugte Retention an den Kunststoffplattenoberflächen in Gegenwart von hCYR61 zurückzuführen war.

**[0137]** Außerdem wurde die Anhaftung und Ausbreitung von HUVE-Zellen in Gegenwart einer ansteigenden Menge von Vitronectin untersucht. Die Lösungen zum Beschichten der Platten enthielten ansteigende Mengen Vitronectin (0-10 µg/ml) mit einer festgelegten Menge hCyr61 (10 µg/ml). Die Ergebnisse wiesen darauf hin, dass an den mit den beiden Proteinen beschichteten Platten mehr Zellen anhafteten, als durch Addition der einzelnen Adhäsionskapazitäten von Vitronectin und hCyr61 zu erwarten gewesen wäre. Dieser nicht-additive Anstieg der Adhäsion in Gegenwart von Vitronectin und hCyr61 war nicht auf die höheren Mengen von am Kunststoff adsorbiertem Vitronectin zurückzuführen. Ein ELISA-Test mit Anti-Human-Vitronectin-Antikörpern zeigte, dass die Menge an Vitronectin, die an den gegenüber Vitronectin/hCyr61-Gemisch ausgesetzten Kunststoffplatten adsorbierten, jene von Vitronectin alleine um nicht mehr als 20 % überschritt. Dieser Unterschied reicht nicht aus, um den beobachteten Unterschied an Zelladhäsion (3- bis 5fach in verschiedenen Experimenten) zu erklären. Außerdem haftete auch ein höherer Anteil an HUVE-Zellen an das Gemisch von Proteinen an, wenn die Beschichtungslösung verdünntes Vitronectin (2,5 µg/ml) enthielt, als an Platten, die mit höheren Konzentrationen an reinem Vitronectin (10 µg/ml) oder reinem hCyr61 (10 µg/ml) beschichtet waren. Folglich kooperieren Vitronectin und hCyr61 funktionell und bestätigen eine synergistische Wirkung auf die Adhäsion von HUVE-Zellen.

**[0138]** Die Fähigkeit von Fisp12, die Zelladhäsion zu beeinflussen, wurde ebenfalls untersucht. Fisp12-Zellanhaftungstests wurden im Wesentlichen wie beschrieben (Oliver et al. (1989)) durchgeführt. Immunologische 96-Well-Platten wurden 16 Stunden lang bei 4°C mit 20 µg/ml Cyr61, Fisp12 oder Fibronectin (Gibco BRL) in

0,1 mg/ml BSA enthaltendem PBS beschichtet und mit 10 mg/ml BSA 1 Stunde lang bei Raumtemperatur blockiert. HUVE-Zellen wurden zu  $10^4$  Zellen/Well in F12K-Medium mit 10 % FBS (Hyclone Laboratories Inc., Logan, Utah) ausplattiert; NIH-3T3-Fibroblasten wurden zu  $3 \times 10^4$  Zellen/Well ausplattiert, und Mv1Lu-Zellen wurden zu  $5 \times 10^4$  Zellen/Well in Minimal-Essential-Medium (MEM) mit 10 % FBS ausplattiert. Nach einstündiger Inkubation wurden die Zellen fixiert, mit Methylenblau gefärbt und wie beschrieben (Oliver et al. (1989)) quantifiziert. Die Zellausbreitung wurde an Zellen untersucht, die auf mit 2,5 ml einer Lösung von 20 µg/ml Cyr61, Fisp12 oder Fibronectin beschichteten 100-mm-Polystyrol-Petrischalen ausplattiert waren.  $10^7$  Zellen wurden auf jeder Platte ausplattiert und die Zellausbreitung 90 Minuten nach Ausplattierung durch Mikroskopie bei 100facher Vergrößerung analysiert.

**[0139]** Die Ergebnisse zeigten an, dass Fisp12 sowie Cyr61, wenn sie auf Kunststoffplatten beschichtet waren, die Anhaftung von drei verschiedenen Zelltypen förderte: HUVE-Zellen, NIH-3T3-Fibroblasten und Nerz-Lungenepithel-(Mv1Lu-) Zellen. Diese Zellen hafteten schlecht an unbeschichteten Kunststoffplatten oder Kunststoffplatten, die mit Rinderserumalbumin beschichtet waren, hafteten jedoch signifikant besser an Platten, die entweder mit Fibronectin, Cyr61 oder Fisp12 beschichtet waren. Die Fähigkeit von Cyr61 oder Fisp12, die Zellanhaftung zu vermitteln, ist vergleichbar mit jener von Fibronectin für alle drei Zelltypen. Während die Fähigkeit von Cyr61, die Zellanhaftung zu vermitteln, bereits früher für Fibroblasten und Endothelzellen nachgewiesen worden ist (Kireeva et al. (1996)), zeigen diese Untersuchungen eine Zellanhaftungsaktivität für Fisp12 sowie Cyr61 in Epithelzellen zusätzlich zu Endothelzellen und Fibroblasten.

**[0140]** Wie die Zellanhaftung von Fibronectin und Cyr61 (Kireeva et al (1996)) wurde die Fisp12-vermittelte Zellanhaftung gehemmt, wenn zum Kulturmedium EDTA zugesetzt wurde. Diese Hemmung wurde durch die Zugabe von überschüssigem  $MgCl_2$  vollständig aufgehoben, was auf die Notwendigkeit von zweiwertigen Kationen für die Fisp12-vermittelte Zellanhaftung hinweist. Zusätzlich zur Zellanhaftung fördert Fisp12 auch die Zellausbreitung. Eine ähnliche Zellausbreitung wurde gefunden, wenn NIH-T3T-Zellen auf Platten, die entweder mit Fibronectin, Cyr61 oder Fisp12 beschichtet waren, ausplattiert wurden, nicht jedoch bei Beschichtung mit BSA. Endothelzellen und Epithelzellen breiteten sich ebenfalls aus, wenn sie auf Fibronectin, Cyr61 oder Fisp12 ausplattiert wurden.

#### Beispiel 14

##### Migration von Fibroblasten

**[0141]** Cyr61 beeinflusst ferner Chondrozyten, z.B. die an der Skelettentwicklung beteiligten Fibroblasten. In Speziellen beeinflusst Cyr61 die Entwicklung und möglicherweise die Erhaltung von Knorpel, im Gegensatz zu einer Vielzahl von wachstumsbezogenen Proteinen, die ausschließlich die Entwicklung und Erhaltung des Knochenskeletts beeinflussen. Die chemotaktische Reaktion von NIH-3T3-Zellen auf Maus-Cyr61 wurde unter Verwendung einer modifizierten Boyden-Kammer (Neuroprobe Inc., Katalognummer AP48) untersucht. Grotendorst, Meth. Enzymol. 147, 144-152 (1987). Gereinigtes Cyr61-Protein wurde in Rinderserumalbumin (BSA; 0,2 mg/ml) enthaltendem DMEM reihenverdünnt und zum unteren Well der Kammer zugegeben. Der untere Well wurde dann mit einem Collagen-beschichteten Polycarbonatfilter (8 µm Porendurchmesser; Nucleopore Corp., Pleasanton, CA) bedeckt. Zellen ( $6 \times 10^4$ ) wurden dann in den oberen Well eingebracht. Nach 5 Stunden Inkubation (10 %  $CO_2$ , 37°C) wurde das Filter entfernt und die Zellen unter Verwendung von Wright-Giemsa-Farbstoff (Harleco-Formulierung; EM Diagnostic Systems, Gibbstown, NJ) fixiert und gefärbt. Zellen aus der oberen Oberfläche des Filters wurden dann durch Abwischen mit einem Gewebetupfer entfernt. Die chemotaktische Reaktion wurde durch Zählen der Gesamtzahl migrierender Zellen bestimmt, die in zehn zufällig gewählten Hochleistungs-Mikroskopie-Feldern (400fache Vergrößerung) an der unteren Oberfläche des Filters detektiert wurden. Doppelversuche wurden für jedes Experiment durchgeführt, und das Experiment wurde drei Mal wiederholt, um die Reproduzierbarkeit der Daten sicherzustellen.

**[0142]** NIH-3T3-Zellen reagierten auf Cyr61 als chemotaktischer Faktor auf dosisabhängige Weise im Boyden-Kammer-Test. Ohne Cyr61 migrierten ungefähr 4,8 Zellen pro Hochleistungs-Feld. In Gegenwart von 0,5 µg/ml Maus-Cyr61 fanden sich ungefähr 5,2 Zellen pro Feld. Wenn die Konzentration von Cyr61 auf 1, 5 und 10 µg/ml erhöht wurde, stieg die mittlere Anzahl migrierender Zellen pro Feld auf 7,5, 18,5 und 18,7. Folglich agiert Maus-Cyr61 als chemisch anziehendes Mittel für Fibroblasten. Die optimale Konzentration für die chemotaktische Aktivität von Cyr61 beträgt in diesem Test 1-5 µg/ml; dieser Konzentrationsbereich steht im Einklang mit den berichteten Bereichen, bei denen andere ECM-Moleküle für eine wirksame chemotaktische Stimulierung sorgen. Beispielsweise weist Thrombospondin bei 5-50 µg/ml eine chemotaktische Wirkung auf Endothelzellen auf (Taraboletti et al., J. Cell Biol. 111, 765-772 (1990)); Fibronectin fungiert ebenfalls als chemotaktisches Mittel bei 1-30 µg/ml (Carsons et al., Role of Fibronectin in Rheumatic Diseases, in: Fibronectin,

Mosher (Hrsg.), Academic Press (1989); Carsons et al., *Arthritis. Rheum.* 28, 601-612 (1985)), wie unter Verwendung ähnlicher Boyden-Kammer-Tests ermittelt wurde. Das Human-Cyr61-Polypeptid kann verwendet werden, um die Chemoattraktion von Fibroblasten auf eine zum Maus-Cyr61 analoge Weise zu bewirken. In Experimenten, die analog zu den Studien der NIH-3T3-Zellmigration als Reaktion auf Maus-Cyr61 sind, wurde die Migration von Human-1064SK-Hautfibroblasten als Reaktion auf Wildtyp-Human-Cyr61 und Human-Cyr61-NT (ein Cyr61-Polypeptidfragment, das genauer in Beispiel 29 beschrieben ist) bestimmt. Cyr61 induzierte Migration der Human-Fibroblastenzellen bei vergleichbaren Mengen wie die Maus-Cyr61-Mengen, die NIH-3T3-Zellen-Chemotaxis induzieren. Das Human-Cyr61-NT induzierte 1064SK-Zellmigration bei Mengen, die mit wirksamen Mengen des Wildtyp-Human-Cyr61 vergleichbar sind. Antikörperstudien zeigten, dass ein Antikörper, der für die  $\alpha_v$ -Integrin-Untereinheit spezifisch war, die Fibroblastenmigration in Gegenwart von Cyr61-Polypeptiden hemmte, während ein Antikörper (d.h. GoH3), der für die  $\alpha_6$ -Integrin-Untereinheit spezifisch war, die Migration nicht hemmte. Weitere Untersuchungen zeigten, dass ein monoklonaler Antikörper, der  $\alpha_v\beta_5$ -Integrin spezifisch erkannte, Cyr61-induzierte Human-Fibroblastenmigration hemmte, jedoch ein monoklonaler Antikörper, der Integrin- $\alpha_v\beta_3$  spezifisch erkannte, diese Migration nicht hemmte. Daher vermittelt Integrin  $\alpha_v\beta_5$  die Fibroblasten-Migration als Reaktion auf Cyr61-Polypeptide. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu den Ergebnissen der Antikörper-Studien, die die chemotaktische Reaktion von Endothelzellen auf Cyr61-Polypeptide, die von Integrin  $\alpha_v\beta_3$  abhängig ist, analysierten. Vom Human-CTGF ist ebenfalls berichtet worden, dass es die Migration von Nicht-Human-Säugetierzellen, wie z.B. NIH-3T3-Zellen (Maus-Fibroblasten) und BASM-Zellen (Rinder-Aorta-Glattmuskelnzellen), stimuliert, wie in US-Patent Nr. 5.408.040, Spalte 7, Zeile 65, bis Spalte 11, Zeile 7, beschrieben wird.

**[0143]** Somit ist ein Verfahren zum Screenen auf Modulatoren von Zellmigration, wie z.B. Fibroblasten-Zellmigration, möglich. Das Verfahren umfasst allgemein das Aussetzen von Zellen, die zumindest einen geeigneten Integrin-Rezeptor umfassen, gegenüber einem Cyr61-Polypeptid in Gegenwart oder Abwesenheit eines möglichen, oder vermutlichen, Modulators. Eine nachfolgende Messung der relativen Zellmigrationsgeschwindigkeiten (in Gegenwart und Abwesenheit des potenziellen Modulators) identifiziert Modulatoren von Cyr61-induzierter Zellmigration. Es ist zu erwarten, dass verschiedene kleine Chemikalien, sowohl anorganischer als auch organischer Natur, sowie unterschiedliche Peptide potenzielle Modulatoren darstellen. Beispiele umfassen Mannose und sein Derivat Mannose-6-phosphat, wobei Letzteres wahrscheinlich durch Hemmung als Modulator von Cyr61-induzierter Zellmigration agiert. Mögliche Modulatoren können sehr unterschiedliche Strukturen aufweisen und einzeln oder als Teil eines systematischeren Ansatzes unter Einsatz einer auf dem Gebiet der Erfindung bekannten chemischen oder Peptidbibliothek getestet werden.

**[0144]** In einem alternativen Verfahren umfasst ein Test für Modulatoren der Zellmigration, wie z.B. der Migration von Chondrozyten, eine Kombination eines mutmaßlichen Modulators der Zellmigration und Cyr61, die dem unteren Well einer Boyden-Kammer zugegeben werden. Als Kontrolle wird Cyr61 gesondert dem unteren Well einer anderen Boyden-Kammer zugegeben. Relative Zellmigrationen werden dann gemessen. Ein Anstieg der Zellmigration in Gegenwart des mutmaßlichen Modulators verglichen mit der Zellmigration als Reaktion auf Cyr61 alleine identifiziert einen Förderer der Chondrozyten-Zellmigration, während eine relative Abnahme der Zellmigration in Gegenwart des mutmaßlichen Modulators einen Inhibitor identifiziert.

### Beispiel 15

#### Migration von Endothelzellen – In-vitro-Tests

**[0145]** Das Endprodukt der In-vitro-Angiogenese ist ein wohldefiniertes Netzwerk von kapillarähnlichen Röhren. Wenn auf Gelmatrizes, z.B. Collagen, Fibrin oder Matrigel-Gelen, kultiviert wird, müssen Endothelzellen zuerst in die Matrix eindringen, bevor reife Gefäße gebildet werden. (Matrigel ist ein komplexes Gemisch von Basalmembran-Proteinen, die Laminin, Collagen Typ IV, Nidogen/Entactin und Proteoglykan-Heparinsulfat mit zusätzlichen Wachstumsfaktoren umfassen. Kleinman et al., *Biochem.* 25, 312-318 (1986)). Die invasiven Strukturen sind Stränge, die letztlich anastomosieren, um die gefäßähnlichen Strukturen auszubilden. Die angiogene Wirkung von Human-Cyr61 auf konfluente Monoschichten von Human-Nabelvenen-Endothelzellen wird durch Aussäen der Zellen auf dreidimensionalen Collagen- oder Fibrin-Gelen in Gegenwart oder Abwesenheit von Cyr61 ermittelt. HUVE-Zellen dringen nicht spontan in solche Gele ein, tun dies jedoch bei Induktion durch solche Mittel wie Tumor-Promotoren.

**[0146]** Collagen-Gele wurden hergestellt, indem zunächst Typ-I-Collagen (Collaborative Research Inc., Bedford, MA) in einer sterilen 1:1000-Verdünnung (Vol./Vol.) von Eisessig (300 ml pro Gramm Collagen) solubilisiert wurde. Die resultierende Lösung wurde durch eine sterile Dreifach-Gaze filtriert und bei  $16.000 \times g$  1 Stunde lang bei  $4^\circ C$  zentrifugiert. Der Überstand wurde gegen 0,1X-Eagle's-Minimal-Essential-Medium (MEM; Gib-

co-BRL Inc.) dialysiert und bei 4°C gelagert. Gele von rekonstituierten Collagenfasern wurden durch schnelles Erhöhen von pH-Wert und Ionenstärke der Collagenlösung hergestellt. Die Einstellungen von pH und Ionenstärke wurden durch schnelles Mischen von 7 Volumina kalter Collagenlösung mit einem Volumen 10X-MEM und 2 Volumina Natriumbicarbonat (11,76 mg/ml) in einer sterilen Flasche erzielt. Die Lösung wurde auf Eis gehalten, um die sofortige Gelierung zu verhindern. Das kalte Gemisch wurde in 18-mm-Gewebekulturwells verteilt und 10 Minuten lang bei 37°C gelieren gelassen.

**[0147]** Fibringele wurden durch Auflösen von Fibrinogen (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) unmittelbar vor der Verwendung in Calcium-freiem MEM hergestellt, um eine Endkonzentration von 2,5 mg Protein/ml zu erreichen. Die Gerinnung wurde durch schnelles Mischen von 1,35 ml Fibrinogen-Lösung mit 15 µl 25 U/ml Thrombin (Sigma Chemical Co.) enthaltendem 10X-MEM in einem Kunststoffröhrchen ausgelöst. Das Gemisch wurde sofort in 18-mm-Gewebekulturwells übertragen und für ungefähr 2 Minuten lang bei 37°C gelieren gelassen.

**[0148]** In manchen Wells wurde Cyr61 vor der Gelierung in die Gelmatrix gemischt (Endkonzentration 10 µg/ml), während sich in anderen Wells Cyr61 nicht in der Gelmatrix befand, sondern als Teil des Nährmediums zugegeben wurde (ähnliche Konzentrationsbereiche wie in der Matrix), nachdem die Zellen Konfluenz erreicht hatten. HUVE-Zellen wurden zu  $5 \times 10^4$  Zellen pro Well in 10 % Fötalrinderserum, 100 µg/ml Heparin und 30 µg/ml Endothelzellen-Wachstumsfaktor enthaltendem Ham-F12K-Medium (Gibco-BRL Inc.) auf die Gelmatrixoberfläche gesät. Sobald die Zellen Konfluenz erreichten, wurde das Medium entfernt, die Zellen wurden mit PBS gewaschen und mit frischem Medium ohne Endothelzellen-Wachstumsfaktor versorgt. Manche Kulturen erhielten gereinigtes rekombinantes Cyr61, während andere Cyr61 und polyklonale Anti-Cyr61-Antikörper erhielten. Folglich umfasste die Reihe von Kulturen bei Konfluenz Folgendes: a) Kulturen ohne Cyr61; b) Kulturen mit Cyr61 im Inneren der Matrix; c) Kulturen mit Cyr61, welches das Medium ergänzte; und d) Kulturen mit Cyr61, welches das Medium gemeinsam mit polyklonalen Anti-Cyr61-Antikörpern ergänzte.

**[0149]** Die Invasion der Gelmatrix wurde ungefähr 4-7 Tage nach Behandlung der konfluenten Kulturen quantifiziert. Zufällig gewählte Felder einer Größe von 1,0 mm × 1,4 mm wurden in jedem Well phasenkontrastmikroskopisch mit einem invertierten Zeiss-Axiovert-Fotomikroskop fotografiert. Fotografien wurden auf einer einzigen Ebene unter der Oberflächen-Monoschicht aufgenommen. Die Invasion wurde durch Messen der Gesamtlänge aller Zellstränge quantifiziert, die unter die Oberflächen-Monoschicht eindrangen. Ergebnisse wurden als mittlere Länge in Mikrometer pro Feld für zumindest 3 zufällig gewählte Felder aus jedem von zumindest drei gesonderten Experimenten berechnet.

**[0150]** Um das Netzwerk von Strängen im Inneren der Matrix für die Bildung kapillarähnlicher Röhren zu untersuchen, wurden Kulturen in situ über Nacht mit 2,5 % Glutaraldehyd und 1 % Gerbsäure in 100 mM Natriumcacodylatpuffer, pH 7,4, fixiert. Die Kulturen wurden dann intensiv in 100 mM Natriumcacodylatpuffer, pH 7,4, gewaschen. Die Gele wurden in 2 mm × 2 mm große Stücke geschnitten, in 1 % Osmiumtetroxid in Veronalacetatpuffer (um Gewebequellung zu minimieren; siehe Hayat, in: Principles and Techniques of Electron Microscopy: Biological Applications 1, Litton Educational Publishing Inc., 38 (1970)) 45 Minuten lang nachfixiert, im Ganzen mit 0,5 % Uranylacetat in Veronapuffer 45 Minuten lang gefärbt, durch Aussetzen gegenüber einer abgestuften Ethanolreihe entwässert und in flachen Formen in Epon eingebettet. Semidünnschnitte wurde quer zur Kulturebene mit einem Ultramikrotom geschnitten, mit 1 % Toluidinblau gefärbt und unter Durchlicht mit einem Axiophot-Fotomikroskop (Zeiss) fotografiert.

**[0151]** In einem alternativen Verfahren wird ein mutmaßlicher Modulator der Angiogenese mit Cyr61 kombiniert und die Kombination wie vorher vor oder nach der Ausbildung eines Gels zugegeben. In diesem Verfahren wird eine Kontrolle durch Verwenden von Cyr61 alleine eingeführt. Die Migration von Zellen als Reaktion auf den mutmaßlichen Modulator und Cyr61 wird dann mit der Migration von Zellen als Reaktion auf Cyr61 alleine verglichen. Ein Förderer oder positiver Effektor wird die Zellmigration erhöhen, während ein Inhibitor oder negativer Effektor die Zellmigration vermindern wird.

**[0152]** In einem alternativen In-vitro-Test für angiogene Aktivität wurde ein Test für Endothelzellen-Migration entwickelt. Von diesem Chemotaxis-Test ist gezeigt worden, dass er die Wirkungen von Cyr61-Konzentrationen in der Größenordnung von Nanogramm pro Milliliter detektiert. Primäre mikrovaskuläre Human-Endothelzellen (HMVEC PO51; Clonetics, San Diego, CA) wurden in DME mit 10 % Donor-Kälberserum (Flow Laboratories, McLean, VA) und 100 µg/ml Endothelzellen-Mitogen (Biomedical Technologies Inc., Stoughton, MA) gehalten. Die Zellen wurden zwischen Passagen 10 und 15 verwendet. Um die Migration zu messen, wurden die Zellen für 24 Stunden in 0,1 % BSA enthaltendem DME ausgehungert, geerntet, in DME mit 0,1 % BSA resuspendiert und zu  $1,75 \times 10^4$  Zellen/Well an der unteren Oberfläche eines gelatinisierten 0,5-µm-Filters (Nucleo-

pore Corporation, Pleasanton, CA) in einer invertierten modifizierten Boyden-Kammer ausplattiert. Nach 1-2 Stunden bei 37°C, währenddessen die Anhaftung der Zellen an das Filter ermöglicht wurde, wurde die Kammer in ihre normale Position umgedreht. Zum oberen Well gesonderter Kammern wurde basischer Fibroblasten-Wachstumsfaktor (eine positive Kontrolle), Cyr61 oder eine negative Kontrolllösung (konditioniertes Medium, dem bekanntermaßen Chemoattraktoren fehlen, oder DME plus BSA, siehe unten) in Konzentrationen im Bereich von 10 ng/ml bis 10 µg/ml zugegeben. Die Kammern wurden dann 3-4 Stunden lang bei 37°C inkubiert, um Migration zu ermöglichen. Die Kammern wurden zerlegt, die Membranen fixiert und gefärbt und die Anzahl von Zellen, die zur Oberseite des Filters migriert sind, in 3 Hochleistungs-Feldern bestimmt. Tolsma et al., J. Cell Biol. 122, 497-511 (1993) und darin zitierte Arbeiten. DME mit 0,1 % BSA wurde als negative Kontrolle verwendet, und es wurde entweder bFGF (10 ng/ml) oder konditioniertes Medium aus angiogenen Hamster-Zelllinien (20 µg/ml Gesamtprotein) als positive Kontrolle verwendet. Rastinejad et al., Cell 56, 345-355 (1989). Jede Probe wurde in vierfacher Ausführung (Testverbindung, wie z.B. Cyr61, positive Kontrolle, konditioniertes Medium als negative Kontrolle und DME plus BSA als negative Kontrolle) in einem einzigen Experiment getestet; Experimente wurden zumindest zweimal wiederholt.

**[0153]** Um den Vergleich von Experimenten zu ermöglichen, die an verschiedenen Tagen durchgeführt wurden, sind die Migrationsdaten als prozentuelle maximale Migration gegenüber der positiven Kontrolle angegeben, die nach Subtraktion der in Gegenwart von DME plus BSA beobachteten Hintergrundmigration beobachtet wurde. Testverbindungen, die die Zufallsbewegung von Endothelzellen unterdrückten, zeigten einen negativen Wert für die prozentuelle Migration. Sehr hohe Konzentrationen von Thrombospondin (TSP) bewirkten die Ablösung von Endothelzellen von der Membran. Die Ablösung wurde durch Zählen der Zellen an der Unterseite der Membran detektiert. Wenn der Zellverlust 10 % überschritt, wurde die Anzahl migrierter Zellen um diesen Verlust korrigiert. Die Ergebnisse zeigen an, dass 0,01-10 µg/ml bFGF die Migration von konstanten 92 Zellen je drei Hochleistungs-Mikroskopfeldern induzierte. Migration in Gegenwart von Cyr61 offenbarte eine stärkere Konzentrationsabhängigkeit. Bei 10 ng/ml induzierte Cyr61 im Mittel die Migration von 64 Zellen je drei untersuchten Hochleistungsfeldern. Bei 100 ng/ml Cyr61 fanden sich ungefähr 72 Zellen in drei Feldern; bei 1 µg/ml Cyr61 ist ein Maximum von 87 Zellen migriert; bei ungefähr 7 µg/ml Cyr61 wurden ungefähr 61 Zellen beobachtet; und bei 10 µg/ml Cyr61 fanden sich ungefähr 57 Zellen, die migriert sind. Die negative Kontrolle zeigte ein konstantes Grundausmaß von Endothelzellen-Migration von 53 Zellen je drei Hochleistungs-Mikroskopfeldern. Zusätzlich zu diesen Ergebnissen besteht eine perfekte Korrelation der Ergebnisse aus diesem In-vitro-Test und der Ergebnisse aus dem unten beschriebenen In-vivo-Hornhaut-Test.

**[0154]** Um die Toxizität zu beobachten, wurden Endothelzellen mit jeder der getesteten Verbindungen in einem Konzentrationsbereich unter Bedingungen behandelt, die mit jenen der im Migrationstest verwendeten identisch waren. Die Zellen wurden dann mit Trypanblau gefärbt, und es wurden die Trypanblau ausschließenden Zellen gezählt. Die Ergebnisse zeigten, dass die Zellen lebensfähig blieben und dass die Hemmung der Migration nicht auf Toxizität zurückzuführen war. Wo zweckdienlich, wurden Endothelzellen 36-48 Stunden lang mit Peptiden zu 20 µM in DME mit 0,1 % BSA vor der Verwendung in den Migrationstests vorbehandelt. Die Toxizität wurde während dieser Zeitspanne ebenfalls getestet und erwies sich als vernachlässigbar.

**[0155]** Die Fähigkeit von Cyr61, Matrix-Invasion und Röhrenbildung durch HUVE-Zellen zu induzieren, sowie die Fähigkeit von Cyr61, die Migration von mikrovaskulären Human-Endothelzellen zu induzieren, belegt die angiogenen Eigenschaften dieses Proteins. Es wird erwartet, dass andere Elemente der ECM-Signalmolekül-Familie Cystein-reicher Proteine, wie z.B. Fisp12 und CTGF, ähnliche Eigenschaften aufweisen, die zum Screenen auf angiogene Bedingungen und Modulieren angiogener Bedingungen verwendet werden können. Im Speziellen kann ein gewöhnlich Fachkundiger auf dem Gebiet der Erfindung nachvollziehen, dass ein In-vitro-Test für angiogene Inhibitoren den oben beschriebenen Test umfasst und eine wirksame Menge Cyr61 mit oder ohne Kandidat-Inhibitor einschließt.

#### Beispiel 16

##### Mirgration von Endothelzellen – ein In-vitro-Test für Angiogenese-Inhibitoren

**[0156]** Die Aufnahme einer wirksamen Menge eines ECM-Signalmoleküls, wie z.B. Cyr61, in den im vorhergehenden Beispiel beschriebenen In-vitro-Migrations- (d.h. Chemotaxis-) Test stellt einen Test bereit, der zur Detektion von Inhibitoren von ECM-Signalmolekülen und Angiogenese konstruiert ist. Wegen der entscheidenden Rolle der Neovaskularisierung in solchen Prozessen wie Wachstum und Metastase massiver Tumoren wäre die Entwicklung von Tests zur Detektion von Verbindungen zweckdienlich, die diese Prozesse antagonisieren könnten.

**[0157]** Der oben beschriebene In-vitro-Migrationstest wurde adaptiert, so dass er ein ECM-Signalmolekül, Cyr61, umfasste. Cyr61 wurde zu 1 µg/ml aufgenommen, das sich in Titrationsuntersuchungen als optimale Dosis erwies. Wie im vorhergehenden Beispiel wurden mikrovaskuläre Human-Endothelzellen (Clonetics) verwendet. In einer der Testserien wurden mehrere Kohlenhydrate und Kohlenhydratderivate analysiert. Diese Verbindungen umfassten 10 mM Mannose, 10 mM Mannose-6-phosphat und 10 mM Galactose. Ergebnisse dieser Tests zeigten, dass Cyr61 plus Mannose ungefähr 73 Zellen pro Satz von drei Hochleistungs-Mikroskopfeldern (siehe oben) lieferte. Cyr61 plus Galactose induzierte die Migration von ungefähr 74 Zellen pro Satz von drei Hochleistungsfeldern. Jedoch lieferte Cyr61 plus Mannose-6-phosphat ungefähr 2 migrierende Zellen für jeden Satz von drei untersuchten Hochleistungsfeldern. Kontrollexperimente zeigen, dass die Hemmung der Cyr61-Aktivität durch Mannose-6-phosphat spezifisch ist.

**[0158]** Die angiogene Aktivität von basischem FGF (10 ng/ml) wurde ebenfalls wie oben beschrieben mit und ohne Mannose-6-phosphat getestet. In Gegenwart von 10 mM Mannose-6-phosphat induzierte bFGF die Migration von 51 Zellen pro Satz von drei Hochleistungsfeldern; in dessen Anwesenheit induzierte bFGF die Migration von ungefähr 52 Zellen. Wenn jedoch entweder Cyr61 oder Insulin-Wachstumsfaktor II (IGF-II) getestet wurden, verminderte Mannose-6-phosphat die Anzahl migrierender Zellen von ungefähr 48 bzw. 47 Zellen auf ungefähr 12 bzw. 11 Zellen. Die Wirkung von Mannose-6-phosphat auf die IGF-II-Aktivität war erwartet, da Mannose-6-phosphat bekanntermaßen mit IGF II um ihren gemeinsamen Rezeptor (den IGF-II-Rezeptor) konkurrieren. Folglich hemmt Mannose-6-phosphat spezifisch die chemotaktische Aktivität von Cyr61 an Human-Endothelzellen. Darüber hinaus ist Mannose-6-phosphat wegen der im Wesentlichen perfekten Korrelation zwischen In-vitro-Migrationstest und In-vivo-Angiogenese-Test (unten beschrieben) als Inhibitor der Angiogenese auf Basis der Ergebnisse des hierin offenbarten Tests identifiziert worden. Demgemäß kann ein Verfahren der Angiogenese-Hemmung den Schritt des Verabreichens eines Inhibitors der angiogenen Aktivität von Cyr61, wie z.B. Mannose-6-phosphat, umfassen. Tests wie der oben beschriebene können ferner verwendet werden, um auf andere Inhibitoren der Angiogenese zu screenen, die bei der Behandlung von Krankheiten, die mit Angiogenese in Verbindung stehen, wie z.B. Krebs, und Krankheiten des Auges, die von Neovaskularisierung begleitet sind, zweckdienlich sein können.

**[0159]** Ein Verfahren des Screenings auf Modulatoren der Angiogenese kann einen Vergleichstest umfassen. Ein Satz von Bedingungen umfasst die Exposition von Zellen mit einer Kombination von Cyr61 und einem mutmaßlichen Modulator der Zellmigration. Als Kontrolle wird ein Paralleltest durchgeführt, der Zellen gegenüber Cyr61 alleine aussetzt. Ein Förderer der Zellmigration erhöht die Rate der In-vitro-Zellmigration im Vergleich zur Migrationsrate in Gegenwart von Cyr61 alleine; das Gegenteil trifft für einen Inhibitor der Chemoattraktionsfähigkeit von Cyr61 zu.

### Beispiel 17

#### Migration von Endothelzellen – ein In-vivo-Test

**[0160]** Ein In-vivo-Test für Endothelzellen-Migration ist ebenfalls entwickelt worden. Im Allgemeinen steht das Testprotokoll mit der Offenbarung von Tolsma et al. (1993) im Einklang. Um die mit der Bildung von Granulationsgewebe (d.h. das neu gebildete, proliferative, fibroblastische Hautgewebe um die Wunden während der Heilung) in Verbindung stehende Angiogenese zu ermitteln, wurden Schwammimplantate wie früher beschrieben (Fajardo et al., Lab. Invest. 58, 718-724 (1988)) verwendet. Polyvinylalkohol-Schaumstoffscheiben (10 mm Durchmesser, 1 mm Dicke) wurden hergestellt, indem zunächst ein Kernstück des Schwamms von 2 mm Durchmesser entfernt wurde. PBS oder ein RGDS-Peptid (andere mögliche Testverbindungen umfassen Fragmente von Cyr61, RGDS-Peptid, kleine Moleküle, wie z.B. Mannose-6-phosphat) wurden dem Schwammkernstück zu 100 µM zugegeben, das dann mit 5 µl sterilem Hydron (Interferon Sciences, New Brunswick, NJ) beschichtet wurde. Nach Verfestigung wurde der beschichtete Kern in das Zentrum des Schwamms zurückgesetzt, der dann an beiden Seiten mit 5-µm-Filtern bedeckt und mit Klebstoff (Millipore Corp., Bedford, MA) gesichert wurde. Eine Kontrolle und eine Testscheibe wurden dann subkutan in den Unterleib anästhetisierter weiblicher Balb/c-Mäuse implantiert, wo Granulationsgewebe in den freien Rand der Scheibe eindringen konnte. Die Wunden wurden mit Autoclips verschlossen und die Tiere ungestört belassen, bis sie getötet wurden.

**[0161]** Quantitative Schätzungen der Thymidin-Inkorporation in situ in die Endothelzellen in den Scheiben wurden wie früher beschrieben erhalten (Polverini et al., J. Immunol. 118, 529-532 (1977)). Schwammimplantate wurden an Tagen 5, 7, 10 und 14 nach Implantation beurteilt. Dreißig Minuten vor der Tötung wurde den Mäusen eine [<sup>3</sup>H]-Thymidin in Kochsalzlösung (spezifische Aktivität 6,7 Ci/mM; New England Nuclear/Du Pont, Wilmington, DE) enthaltende Lösung im Ausmaß von 1 µCi pro Gramm Körpergewicht injiziert. Die Schwämme wurden entfernt und flächenseitig eingebettet, um einen gleichmäßigen Schnitt des gesamten Umfangs zu er-



halten. Die Gewebe wurden in 10 % neutral gepuffertem Formalin fixiert, in einer abgestuften Alkoholreihe entwässert und in Glykolmethacrylat (Polysciences, Miles, IL) eingebettet. Autoradiogramme wurden durch Eintauchen der auf säuregereinigten Glasobjektträgern montierten Schnitte in NTB-Emulsion Typ 2 (Eastman Kodak) hergestellt. Nach Exposition für 4 Wochen bei 4°C wurden die Autoradiogramme in D-19-Entwickler der halben Stärke entwickelt, in Kodak-Rapid-Fixierer fixiert und mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt. Die Quantifizierung der Endothelzellen-Markierung wurde durch Zählen aller Endothelzellen, die Kapillaren und Venolen beschichteten, die sich von der Peripherie zum Zentrum des Schwamms erstreckten, durch Rektilinearscanning unter Ölimmersion ( $\times 1.000$ ) durchgeführt. Insgesamt 500-700 Endothelzellen wurden in jedem der beiden Schwämme gezählt, die entweder PBS, TSP oder Peptidfragmente (d.h. Thrombospondin-Fragmente) enthielten. Die Zellen wurden als markiert betrachtet, wenn fünf oder mehr Körner über dem Kern detektiert wurden. Der prozentuelle Anteil markierter Zellen wurde berechnet, und es wurde eine Chi-Quadrat-Analyse der von Kontrolle und Schwämmen des Experiments hergeleiteten Daten durchgeführt.

**[0162]** Die Ergebnisse des vorangegangenen Tests zeigten, dass Thrombospondin-Fragmente den Angiogenese-Prozess hemmen konnten.

### Beispiel 18

#### Mitogen-Potenzierung

**[0163]** Maus-Cyr61 verstärkte die mitogene Wirkung von Wachstumsfaktoren auf Fibroblasten und Endothelzellen. Wenn NIH-3T3-Fibroblasten oder HUVE-Zellen mit einer nicht sättigenden Dosis von entweder basischem Fibroblasten-Wachstumsfaktor (bFGF) oder Blutplättchen-hergeleitetem Wachstumsfaktor (PDGF-BB) behandelt wurden, erhöhte die Zugabe von Maus-Cyr61 signifikant die Inkorporation von radimarkiertem Thymidin im Vergleich zu Zellen, die mit den Wachstumsfaktoren alleine behandelt worden sind. Der Thymidin-Inkorporationstest ist eine Standardtechnik, um zu bestimmen, ob Zellen aktiv wachsen, indem das Ausmaß ermittelt wird, in dem Zellen in die S-Phase eingetreten sind und DNA synthetisieren. Die Cyr61-Verstärkung von bFGF- oder PDGF-BB-induzierter Thymidin-Inkorporation war dosisabhängig und erforderte eine Minimalkonzentration von 0,5 bis 1,0 µg/ml rekombinantem Protein für jeden Zelltyp. Die Verstärkung der DNA-Synthese durch Cyr61 wurde durch die Zugabe von spezifischem Anti-Cyr61-Antiserum gehemmt.

**[0164]** Im Spezielleren wurden NIH-3T3-Fibroblastenzellen auf 24-Well-Platten zu  $3 \times 10^4$  Zellen/Well ausplattiert und in DMEM mit 10 % Fötalrinderserum (Intergen Co., Purchase, NY) 3-4 Tage lang gezüchtet und mit 0,2 % FBS enthaltendem Medium für die folgenden 48 Stunden inkubiert. Die folgenden Verbindungen wurden dann zu den ausplattierten Zellen in den in Klammern angegebenen Endkonzentrationen in frischem, 0,2%iges fbs und [ $^3$ H]-Thymidin (1 µCi/ml Endkonzentration; ICN Biochemicals Inc., Costa Mesa, CA), bFGF (15 ng/ml), PDGF-BB (30 ng/ml) und Maus-Cyr61 (0,5-5 µg/ml) enthaltendem DMEM zugegeben. Diese Verbindungen wurden den einzelnen Platten nach folgendem Muster zugegeben: 1) keine Ergänzung; 2) Maus-Cyr61; 3) bFGF; 4) Maus-Cyr61 und bFGF; 5) PDGF-BB; und 6) Maus-Cyr61 und PDGF. Nach 18-20 Stunden Inkubation wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 10 % Trichloressigsäure fixiert. DNA wurde in 0,1 N NaOH gelöst und die Thymidin-Inkorporation bestimmt. Die Ergebnisse zeigten an, dass Maus-Cyr61 in Abwesenheit eines Wachstumsfaktors die mittels Tritium-Thymidin-Inkorporation gemessene DNA-Synthese nicht stimulierte. Ohne irgendwelche Ergänzungen inkorporierten 3T3-Zellen ungefähr  $1,8 \times 10^4$  cpm [ $^3$ H]-Thymidin in Gegenwart und Abwesenheit von Cyr61. Zellen, die gegenüber bFGF alleine ausgesetzt wurden, inkorporierten ungefähr  $1,2 \times 10^5$  cpm; mit bFGF und Maus-Cyr61 kontaktierte Zellen inkorporierten  $2 \times 10^5$  cpm. Zellen, die PDGF-BB erhielten, inkorporierten etwa  $1,2 \times 10^5$  cpm; und Zellen, die gegenüber PDGF-BB und Maus-Cyr61 ausgesetzt wurden, inkorporierten etwa  $2,4 \times 10^5$  cpm. Daher fungierte Maus-Cyr61 selbst nicht als Mitogen, potenzierte jedoch die mitogene Aktivität von bFGF und PDGF-BB, zwei bekannten Wachstumsfaktoren.

**[0165]** Die Fähigkeit von Maus-Cyr61, die mitogene Wirkung von verschiedenen bFGF-Konzentrationen zu potenzieren, offenbarte auch die Notwendigkeit eines Schwellenwerts für den Wachstumsfaktor. Human-Nabelvenen-Endothelzellen wurden im Wesentlichen wie oben für 3T3-Zellen beschrieben ausplattiert und einer konstanten Menge Maus-Cyr61 ausgesetzt; Kontrollen erhielten kein Cyr61. Verschiedene Platten wurden dann verschiedenen bFGF-Konzentrationen ausgesetzt, die eine Reihe von bFGF-Konzentrationen im Bereich von 0-10 ng/ml umfassten. Nach Züchtung der Kultur in Gegenwart von [ $^3$ H]-Thymidin für 72 Stunden zeigten gegenüber 0-0,1 ng/ml bFGF ausgesetzte Zellen ein Basislinienniveau von Thymidin-Inkorporation (ungefähr  $4 \times 10^2$  cpm) in Gegenwart und Abwesenheit von Cyr61. Bei 1 ng/ml bFGF erhöhten jedoch HUVE-Zellen ihre Thymidin-Inkorporation in Gegenwart von bFGF auf  $6 \times 10^2$  cpm; in Gegenwart von 1 ng/ml bFGF und Maus-Cyr61 inkorporierten HUVE-Zellen  $1,3 \times 10^3$  cpm. Bei 10 ng/ml bFGF inkorporierten gegenüber bFGF

ausgesetzte Zellen ungefähr  $1,8 \times 10^3$  cpm Thymidin; Zellen, die 10 ng/ml bFGF und Cyr61 erhielten, inkorporierten ungefähr  $6,1 \times 10^3$  cpm.

**[0166]** Die Fähigkeit von Maus-Cyr61, die mitogene Aktivität von bFGF zu potenzieren, wurde durch einen Thymidin-Inkorporationstest verifiziert, der HUVE-Zellen und verschiedene Kombinationen von bFGF, Cyr61 und Anti-Cyr61-Antikörpern umfasste. Die Zellen wurden wie oben beschrieben ausplattiert und gezüchtet. Die folgenden Kombinationen von Ergänzungen (Endkonzentrationen der Platten in Klammern angegeben) wurden dann 1 Stunde lang vor Zugabe zu den einzelnen Platten vorinkubiert: 1) Prä-Immunantiserum (3 %); 2) bFGF (15 ng/ml) und Prä-Immunantiserum (3 %); 3) Prä-Immunantiserum (3 %) und Cyr61 (4 µg/ml); 4) Prä-Immunantiserum (3 %), Cyr61 (4 µg/ml) und bFGF (15 ng/ml); 5) Anti-Cyr61-Antiserum (3 %); 6) Anti-Cyr61-Antiserum und bFGF (15 ng/ml); 7) Anti-Cyr61-Antiserum (3 %) und Cyr61 (4 µg/ml); und 8) Anti-Cyr61-Antiserum (3 %), Cyr61 (4 µg/ml) und bFGF (15 ng/ml).

**[0167]** Nach der wie oben beschriebenen Inkubation in Gegenwart von [ $^3$ H]-Thymidin inkorporierten gegenüber Prä-Antiserum ausgesetzte Zellen ungefähr  $2 \times 10^2$  cpm Thymidin; mit Prä-Immunserum und bFGF kontaktierte Zellen inkorporierten  $1,3 \times 10^3$  cpm; Prä-Immunserum und Cyr61 erhaltende Zellen inkorporierten  $1 \times 10^2$  cpm; Prä-Immunserum, Cyr61 und bFGF erhaltende Zellen inkorporierten  $3,6 \times 10^3$  cpm; gegenüber Anti-Cyr61-Antiserum ausgesetzte Zellen inkorporierten  $2 \times 10^2$  cpm; Anti-Cyr61-Antiserum und bFGF erhaltende Zellen inkorporierten ungefähr  $1,3 \times 10^3$  cpm; mit Anti-Cyr61-Antiserum und Cyr61 kontaktierte Zellen inkorporierten ungefähr  $1 \times 10^2$ ; und Anti-Cyr61-Antiserum, Cyr61 und bFGF erhaltende Zellen inkorporierten  $1 \times 10^3$  cpm. Diese Ergebnisse zeigen an, dass Präimmun-Antiserum keine Wirkung auf die Cyr61-induzierte Potenzierung mitogener bFGF-Aktivität hatte. Anti-Cyr61-Antiserum jedoch hob die Potenzierung von bFGF durch Cyr61 vollständig auf. Darüber hinaus war die Wirkung von Anti-Cyr61-Antiserum gegen die Cyr61-induzierte mitogene Potenzierung spezifisch, da Anti-Cyr61-Antiserum an sich keine Wirkung auf die mitogene Aktivität von bFGF hatte. Daher kann Cyr61 als Reagens verwendet werden, um auf brauchbare Mitogene zu screenen.

**[0168]** Zusätzliche Antikörper-Untersuchungen unter Einsatz von Integrin-spezifischen monoklonalen Antikörpern zeigen, dass aus einem ganzen Panel von Anti-Integrin-Antikörpern nur ein Antikörper, der für  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin spezifisch war, die Induktion von DNA-Synthese durch Cyr61-Polypeptide, einschließlich Wildtyp-Cyr61 und Cyr61-NT, hemmte. Somit ist  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin für eine Cyr61-induzierte Mitogenese erforderlich, obwohl es nicht an Fibroblastenadhäsion beteiligt ist (siehe Beispiel 19).

**[0169]** Die DNA-Synthese für HUVE-Zellen und NIH-3T3-Fibroblasten wurde durch Thymidin-Inkorporation wie früher beschrieben (Kireeva et al., Mol. Cell. Biol. 16, 1326-1334 (1996)) mit geringfügigen Modifizierungen gemessen. HUVE-Zellen wurden in 24-Well-Platten bis zum Zustand der Subkonfluenz gezüchtet, 24 Stunden lang an Serum verarmt und mit 10 % Fötalkälberserum (FBS), 1 µCi/ml [ $^3$ H]-Thymidin und 10 ng/ml basischen Fibroblasten-Wachstumsfaktor (bFGF) (Gibco-BRL Inc.) enthaltendem F12K-Medium mit verschiedenen Konzentrationen von Cyr61 und Fisp12 wie angegeben behandelt. NIH-3T3-Fibroblasten wurden bis nahe der Konfluenz gezüchtet, 48 Stunden lang an Serum verarmt und mit 0,5 % FBS, 1 µCi/ml [ $^3$ H]-Thymidin, bFGF und verschiedenen Konzentrationen von Cyr61 und Fisp12 enthaltendem Minimal-Essential-Medium (MEM) behandelt. Die Thymidin-Inkorporation in die in Trichloressigsäure unlösliche Fraktion wurde nach 24 Stunden langer Inkubation bestimmt. Logarithmisch gewachsene Nerz-Lungenepithelzellen (Mv1Lu, CCL64) wurden mit verschiedenen Konzentrationen TGF- $\beta$ 1 (Gibco-BRL) und 2 µg/ml Cyr61 oder Fisp12 18 Stunden lang behandelt; [ $^3$ H]-Thymidin wurde dann zu 1 µCi/ml für 2 Stunden zugegeben. Die Thymidin-Inkorporation wurde wie oben beschrieben bestimmt.

**[0170]** Gereinigtes rekombinantes Fisp12-Protein zeigte keinerlei mitogene Aktivität unter irgendeiner der getesteten Testbedingungen. Dagegen war Fisp12 fähig, durch Fibroblasten-Wachstumsfaktor induzierte DNA-Synthese in NIH-3T3-Fibroblasten sowie HUVE-Zellen zu verstärken. Diese Aktivität war von der durch Cyr61 gezeigten nahezu ununterscheidbar.

**[0171]** Während Cyr61 und Fisp12 die Wachstumsfaktor-induzierte DNA-Synthese in Fibroblasten und Endothelzellen verstärken, verstärken beide Proteine auch Wachstumsfaktor-vermittelte Wirkungen auf andere Weise. Es ist bekannt, dass TGF- $\beta$  die DNA-Synthese in Epithelzellen hemmt (Satterwhite et al. (1994)). Es wurde beobachtet, dass sowohl Cyr61 als auch Fisp12 die Fähigkeit von TGF- $\beta$  verstärkten, die DNA-Synthese in Nerz-Lungenepithelzellen zu hemmen. Die Daten belegen, dass rekombinantes Cyr61 und Fisp12, aus serumfreien Quellen gereinigt, selbst nicht mitogen sind, jedoch die Fähigkeit haben, mit den Wirkungen von Polypeptid-Wachstumsfaktoren in Synergie zu treten. Cyr61 und Fisp12 verstärken die DNA-Synthese-Induktion durch FGF und verstärken die DNA-Synthese-Hemmung durch TGF- $\beta$ .

**[0172]** Weiters können Verfahren zum Screenen auf Modulatoren von Mitogen-Potenzierung eingeschlossen sein. Ein Vergleichstest setzt subkonfluente Zellen einem ECM-Signalmolekül, wie z.B. Cyr61, einem Wachstumsfaktor, und einem mutmaßlichen Modulator eines ECM-Signalmoleküls aus. Als Kontrolle wurden ähnliche Zellen dem ECM-Signalmolekül und Wachstumsfaktor ausgesetzt. Eine weitere Kontrolle setzt ähnliche Zellen gegenüber dem Wachstumsfaktor und dem mutmaßlichen Modulator in Abwesenheit des ECM-Signalmoleküls aus. Auf Basis der z.B. durch [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Inkorporation gemessenen relativen Zellvermehrungsraten kann eine Identifizierung eines mutmaßlichen Modulators als Förderer der Mitogen-Potenzierung (erhöhte Zellvermehrung in Gegenwart aller drei Moleküle) oder eines Inhibitors der Mitogen-Potenzierung (erniedrigte Zellvermehrung in Gegenwart der drei Moleküle) erzielt werden.

**[0173]** Außerdem können ECM-Signalmoleküle, wie z.B. Cyr61-Polypeptide, in Verfahren zur Behandlung von Erkrankungen oder Leiden, wie z.B. Erkrankungen in Zusammenhang mit der Unter- oder Überproliferation von Säugetierzellen, verwendet werden. Für Fachleute auf dem Gebiet der Erfindung ist offensichtlich, dass Cyr61-Polypeptide mit Wachstumsfaktor-verstärkender Aktivität zur Behandlung von Leiden geeignet sind, die durch eine unerwünscht niedrige Zellproliferationsrate gekennzeichnet sind. Die Verwendung von Cyr61-Polypeptiden ohne solche Aktivität könnte zur Behandlung von Leiden genutzt werden, die durch eine Überproliferation von Zellen gekennzeichnet sind. Jedes auf dem Gebiet der Erfindung zur Verabreichung der therapeutischen Polypeptide oder Modulatoren bekannte Mittel ist geeignet, einschließlich direkter Injektion in ein Säugetier, wie z.B. einen Menschen, auf jedem beliebigen bekannten Weg (z.B. subkutan, intramuskulär, intravenös, intraperitoneal), gegebenenfalls in Gegenwart eines bekannten Adjuvans, Exzipienten, Trägers oder Vehikels, wie z.B. eines Liposoms, sowie Gentherapie unter Einsatz eines beliebigen herkömmlichen Nucleinsäure-Verabreichungssystems. Jeder dieser Verabreichungsmechanismen kann durch auf dem Gebiet der Erfindung bekannte Mechanismen (z.B. Assoziation mit einem Targeting-Molekül, wie z.B. einem Antikörper, der einen gewünschten Zelltyp erkennt) modifiziert werden, um die Zufuhr des Therapeutikums genau auf das Ziel auszurichten.

#### Beispiel 19

##### Hornhaut-Test für angiogene Faktoren und Modulatoren

**[0174]** Ein weiterer Test für Modulatoren der Angiogenese, der Hornhaut-Test, ist ein In-vivo-Test zur Ermittlung der Wirkung eines mutmaßlichen Modulators in Gegenwart eines ECM-Signalmolekül-verwandten Biomaterials, wie z.B. Cyr61, auf die Angiogenese. Der Hornhaut-Test macht sich die Abwesenheit von Blutgefäßen in der Hornhaut zunutze, die in Gegenwart eines angiogenen Faktors in der detektierbaren Entwicklung von Kapillaren resultiert, die sich von der Lederhaut in die Hornhaut erstreckt. Friedlander et al., Science 270, 1500-1502 (1995). Dieses Hineinwachsen neuer Blutgefäße von der Lederhaut kann mikroskopisch bestimmt werden. Weiters kann die visuell bestimmte Migrationsrate verwendet werden, um Änderungen der Angiogenese-Rate zu bestimmen. Diese Hornhaut-Tests können unter Verwendung einer breiten Vielfalt von Tiermodellen durchgeführt werden. Vorzugsweise werden die Hornhaut-Tests unter Verwendung von Ratten durchgeführt. Als Beispiel wird ein Test auf mutmaßliche Modulatoren von Cyr61 unter Anwendung dieses Tests offenbart. Um diesen Test durchzuführen, wird Cyr61 zunächst unter Verwendung primärer Kapillarendothelzellen titriert, um wirksame Konzentrationen von Cyr61 zu ermitteln. Anschließend wird Cyr61 in Gegenwart oder Abwesenheit eines mutmaßlichen Modulators chirurgisch in die Hornhäute von Säugetier-Labortieren, z.B. Kaninchen oder Ratten, implantiert. Vorzugsweise wird Cyr61 (oder Cyr61 und ein mutmaßlicher Modulator) in eine biokompatible Matrix eingebettet, wobei auf dem Gebiet der Erfindung standardmäßige Matrixmaterialien verwendet werden. Anschließend werden Augen, die Implantate enthalten, visuell auf Wachstum der leicht erkennbaren Blutgefäße im Inneren des Auges beobachtet. Kontrollimplantationen können aus physiologisch ausbalancierten Puffern bestehen, die im selben Matrixmaterial eingebettet sind und in Augen derselben Labortierart, die die Cyr61-enthaltenden Implantate erhalten, implantiert werden.

**[0175]** Die Entwicklung eines In-vivo-Hornhaut-Tests für angiogene Faktoren weist Vorteile gegenüber bestehenden In-vitro-Tests für diese Faktoren auf. Der Prozess der Angiogenese umfasst vier unterschiedliche Phasen: Induktion von Gefäß-Diskontinuität Endothelzellen-Bewegung, Endothelzellen-Vermehrung und dreidimensionale Neustrukturierung und Sprossung. In-vitro-Tests können nur zwei dieser Schritte beurteilen: Endothelzellen-Migration und -Mitogenese. Folglich wird zur Bereitstellung eines umfassenden Tests für angiogene Faktoren ein In-vivo-Test, wie z.B. der Hornhaut-Test, bevorzugt.

**[0176]** Der Hornhaut-Test ist verwendet worden, um die Wirkung angiogener Faktoren, wie z.B. Cyr61, Fisp12, CTGF und Nov, auf den Prozess der Angiogenese zu bestätigen. Darüber hinaus resultiert das Modifizieren des Hornhaut-Tests durch Aufnehmen irgendwelcher dieser angiogenen Faktoren und eines mutmaß-

lichen Modulators ihrer Aktivität in einem Hornhaut-Test für Modulatoren der Angiogenese. Beispielsweise könnte die Dosierung eines angiogenen Faktors, wie z.B. Cyr61, in Hornhaut-Tests für positive Effektoren der angiogenen Aktivität von Cyr61 verwendet werden. Eine geeignete Dosis von Cyr61 würde zunächst durch Titration der Dosisantwort-Beziehung von Cyr61 zu angiogenen Ereignissen ermittelt werden. Die Einbeziehung eines Kontrolltests, dem Cyr61 fehlt, würde Verbindungen mit einer direkten Wirkung auf die Angiogenese eliminieren. In einer alternativen Ausführungsform der Erfindung könnte eine wirksame Dosis eines angiogenen Faktors, wie z.B. Cyr61, verwendet werden, um auf negative Modulatoren der Aktivität eines angiogenen Faktors zu testen. In noch einer weiteren alternativen Ausführungsform umfasst ein Hornhaut-Implantat Cyr61, und ein weiteres Hornhaut-Implantat umfasst Cyr61 und einen mutmaßlichen Modulator der Angiogenese. Messungen der Entwicklung von Blutgefäßen in den implantierten Hornhäuten stellen eine Basis für die Identifizierung eines mutmaßlichen Modulators als Förderer der Angiogenese bereit (erhöhte Blutgefäßentwicklung in der Hornhaut, die ein den mutmaßlichen Modulator umfassendes Implantat enthält). Eine relative Verminderung der Blutgefäßentwicklung identifiziert einen Inhibitor der Angiogenese.

**[0177]** Die Ratte wird als Tiermodell für den Hornhaut-Test bevorzugt. Offenbarungen auf dem Gebiet der Erfindung haben die Ratte als gut charakterisiertes System für das Analysieren der Angiogenese etabliert. Parameter, wie z.B. Implantatgröße, Proteinfreisetzungsdynamik und geeignete chirurgische Techniken, sind gründlich charakterisiert worden. Obgleich irgendein Rattenstamm im Hornhaut-Test verwendet werden kann, sind bevorzugte Stämme für gewöhnlich gut charakterisierte Laborstämme, wie z.B. der Sprague-Dawley-Stamm.

**[0178]** Obgleich Ratten verschiedener Größen im Hornhaut-Test verwendet werden können, ist eine bevorzugte Größe für die Ratten 150-200 g/Tier. Anästhesie wird mit Methoxyfluran induziert und 40-60 Minuten lang mit Natriumpentobarbital (50 mg/kg, intraperitoneal verabreicht) aufrechterhalten. Die Augen werden vorsichtig geöffnet und durch Befestigen des oberen Augenlids mit einer nicht traumatisierenden Arterienklemme fixiert. Zwei Tropfen steriles Proparacain-Hydrochlorid (0,5 %) werden dann auf jedes Auge gegeben, um eine Lokalanästhesie zu bewirken. Unter Verwendung einer geeigneten chirurgischen Klinge, wie z.B. einer Bard-Parker-Klinge Nr. 11, wird ein ungefähr 1,5 mm langer Schnitt ungefähr 1 mm vom Zentrum der Hornhaut ausgeführt. Der Schnitt erstreckt sich in das Stroma, nicht jedoch durch dieses hindurch. Ein gekrümmter Iris-Spatel von ungefähr 1,5 mm Breite und ungefähr 5 mm Länge wird dann unter den Rand des Schnitts eingeführt und vorsichtig durch das Stroma zum äußeren Augenwinkel des Auges stumpf seziiert. Ein leichter Fingerdruck gegen den Augapfel hilft, das Auge während der Dissektion ruhig zu halten. Der Spatel dringt in das Stroma nicht mehr als ungefähr 2,5 mm ein. Sobald die Hornhaut-Tasche hergestellt ist, wird der Spatel entfernt und der Abstand zwischen Limbus und Basis der Tasche gemessen, um sicherzustellen, dass die Trennung zumindest ungefähr 1 mm beträgt.

**[0179]** Um für eine langsame Freisetzung des Proteins nach Implantation in die Hornhaut zu sorgen, wird Protein mit Poly-2-hydroxyethylmethacrylat (Hydron®) oder einem gleichwertigen Mittel gemischt, um ein Pellet von ungefähr 5 µl auszubilden. Auf diese Weise hergestellte Implantate werden mit einem Tropfen steriler Ringer-Laktatlösung rehydratisiert und wie oben beschrieben implantiert. Nach Implantation wird die Hornhauttasche mit Erythromycin-Salbe verschlossen. Nach der Implantation sollte das Protein-Hydron-Pellet nahe dem Limbus der Hornhaut (Hornhaut-Lederhaut-Grenze) verbleiben, und die Sehkraft sollte nicht signifikant beeinträchtigt sein.

**[0180]** Nach dem chirurgischen Eingriff wurden die Tiere täglich sieben Tage lang mithilfe eines Stereomikroskops untersucht, um auf Entzündung und Reaktionen zu prüfen. Um die Untersuchung zu erleichtern, wird das Tier mit Methoxyfluran anästhesiert und das Anästhetikum während der Untersuchung kontinuierlich durch einen Nasentrichter verabreicht. Während dieses siebentägigen Zeitraums werden die Tiere auf Implantatposition und Hornhaut-Exsudat beobachtet. Hornhaut-Exsudat aufweisende Tiere werden getötet. Ein bevorzugtes Verfahren der Euthanasie ist die Ausblutung. Die Tiere werden anfänglich mit Natriumpentobarbital (50 mg/kg) anästhesiert und dann wie unten beschrieben perfundiert.

**[0181]** Nach sieben Tagen werden die Tiere mit kolloidalem Kohlenstoff (z.B. Indiaink) perfundiert. Anästhesie wird mit Methoxyfluran induziert und mit Natriumpentobarbital (60 mg/kg, intraperitoneal) aufrechterhalten. Jedes Tier wird mit 100-200 ml warmer (37°C) Ringer-Laktatlösung pro 150 g Körpergewicht über die Bauchorta perfundiert. Sobald die Schnauze vollkommen ausgebleicht ist, werden 20-25 ml kolloidaler Kohlenstoff in derselben Weise wie die Ringer-Lösung injiziert, bis Kopf und Thoraxorgane vollständig schwarz sind. Die Augen werden dann herausgeschält und fixiert. Hornhäute werden herausgeschnitten, flach gedrückt und fotografiert.

**[0182]** Jedes Protein wird typischerweise in drei Dosierungen gemäß der Praxis auf dem Gebiet der Erfindung

getestet. Der Fachkundige auf dem Gebiet der Erfindung wird verstehen, dass sechs positive Hornhaut-Reaktionen pro Dosis erforderlich sind, um eine Identifizierung einer angiogenen Reaktion zu bestätigen. Ein beispielhafter Hornhaut-Test umfasst drei Dosierungen des untersuchten Proteins, wobei sechs Ratten bei jeder Dosis getestet werden. Außerdem werden sechs Tiere gegenüber einem Puffer-Hydron-Implantat ausgesetzt und dienen als negative Kontrollen. Das Aussetzen von zumindest drei Tieren gegenüber einem bekannten Angiogenese-Faktor-Hydron-Implantat dient als positive Kontrolle. Schließlich werden sechs Tiere gegenüber Implantaten ausgesetzt, die eine einzelne Dosis des untersuchten Proteins, einen Überschuss an neutralisierendem Antikörper und Hydron enthalten, um die Spezifität irgendeiner beobachteten Reaktion nachzuweisen.

**[0183]** Ein wie oben beschriebener Hornhaut-Test wurde durchgeführt, um die Fähigkeit von Cyr61 zu ermitteln, Angiogenese zu induzieren. Vier Tiere erhielten Negativkontrollimplantate, die ein Puffer-Hydron-Pellet enthielten (beide Augen). Keines dieser Tiere zeigte nach sieben Tagen irgendeine Blutgefäßentwicklung in einem der beiden Augen. Sechs Tiere erhielten Implantate, die eine biologisch wirksame Menge Fibroblasten-Wachstumsfaktor (0,15 µM) in ein Auge und ein Kontrollpellet ins andere Auge enthielten; alle sechs zeigten angiogene Entwicklung im Auge, das FGF erhielt, und keines zeigte eine Neovaskularisierung im Auge, das die negative Kontrolle erhielt. Sieben Tiere erhielten 1 µg/ml Cyr61 in ein Auge, und alle sieben dieser Augen zeigten Blutgefäßwachstum; eines dieser sieben Augen, die eine negative Kontrolle erhielten, zeigte angiogene Entwicklung. Schließlich erhielten vier Tiere Implantate, die 1 µg/ml Cyr61 (Hydron, hergestellt mit einer Cyr61-Lösung von 10 µg/ml) und einen spezifischen Anti-Cyr61-Antikörper im dreifachen Überschuss gegenüber Cyr61 lokal freisetzen: keines der Augen dieser Gruppe zeigte irgendeine angiogene Entwicklung. Folglich identifiziert der In-vivo-Test für Angiogenese angiogene Faktoren, wie z.B. FGF und Cyr61. Der Test ist ferner in der Lage, die Hemmung angiogener Entwicklung zu offenbaren, die durch ECM-Signalmoleküle, wie z.B. Cyr61, induziert wird.

#### Beispiel 20

##### Blutgerinnung

**[0184]** ECM-Signalmoleküle sind ferner für die Korrektur von Hämostasie oder abnormaler Blutgerinnung zweckdienlich. Ein Defekt der Blutgerinnung, der z.B. durch ein niedriges Expressionsausmaß von Cyr61 verursacht wird und dadurch dem Tissue-Factor-Pathway-Inhibitor (TFPI) ermöglicht, ungehindert zu agieren, kann durch Expression oder Verwendung von rekombinantem Cyr61-Protein korrigiert werden.

**[0185]** Cyr61 kann mit TFPI, einem Protein, das die extrinsische Blutgerinnung hemmt, in Wechselwirkung treten. TFPI hemmt die Blutgerinnung in einem Zwei-Schritt-Verfahren. Zuerst bindet TFPI an Faktor Xa, und der TFPI-Xa-Komplex tritt dann mit dem Gewebefaktor:Faktor-VIIa-Komplex (Gewebefaktor = TF („Tissue Factor“)) in Wechselwirkung, wodurch der letztere Komplex gehemmt wird. Der TF:Faktor-VIIa-Komplex ist derjenige Komplex, der die Faktoren IX und X aktiviert. Durch Hemmung von TF:Faktor-VIIa reguliert TFPI die Gerinnung durch Verhindern der Aktivierung der Faktoren IX und X, die für die Blutgerinnung erforderlich sind. Die Wechselwirkung von Cyr61 mit TFPI hemmt die Aktivität von TFPI und fördert so die Blutgerinnung. Cyr61 ist folglich ein Gewebefaktor-Agonist.

#### Beispiel 21

##### Hämatopoetische Ex-vivo-Stammzellenkulturen

**[0186]** Um die Wirkung von Cyr61 auf das Wachstum primitiver multipotenter Stammzellen zu untersuchen, werden mehrere Tests eingesetzt, die diese Zellen von reiferen Vorläuferzellen in einer hämatopoetischen Kultur unterscheiden. Diese Tests nutzen physikochemische (Fibronectin-bindende) oder Wachstums- und Entwicklungs-bezogene (Erzeugung von Vorläufer-Blastzellen-Kolonien) Unterschiede zwischen unreifen und reifen Untergruppen von Zellen.

**[0187]** Zwei Zelllinien, die konditioniertes Medium zum Wachstum benötigen, werden als Quelle hämatopoetischer Stammzellen (HSC) verwendet. Diese klonierten, Faktorabhängigen Maus-Linien sind B6Sut (kloniert aus Langzeit-Knochenmark-Kultur und fähig, in Flüssigmedium ohne Differenzierung zu wachsen, jedoch multipotent in Agar, wie beschrieben in Greenberger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 2931 (1983)) und FDCP-Gemisch (kloniert aus Langzeit-Knochenmarkkultur-Zellen, die mit dem rekombinanten Virus src-Mo-MuLV infiziert sind; sie sind multipotent in Agarkulturen, wie beschrieben in Spooner et al., Nature 310, 2288 (1984)). B6Sut-Zellen werden in Kincaid-Medium mit 10 % Fötalkälberserum (FCS) und 10 % 6X-konzentriertem, WEHI-konditioniertem Medium vermehrt. Greenberger et al. FDCP-Gemisch-Zellen werden in Fi-

scher-Medium mit 20 % Pferdeserum und 10 % 6X-konzentriertem WEHI-konditioniertem Medium vermehrt. Die Zelllinien werden bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> vermehrt.

**[0188]** Verschiedene Ex-vivo- oder In-vitro-Kulturen werden auf Populationswachstum in Gegenwart oder Abwesenheit von exogen zugeführtem/n Maus-Cyr61 oder polyklonalen Anti-Cyr61-Antikörpern getestet. Unter Grenzverdünnungsbedingungen wird der Kopfsteinpflasterbereich-bildende Zellen- (cobblestone area forming cell, CAFC-) Test verwendet, um Zellen mit Langzeit-Wiederbesiedlungsfähigkeit zu identifizieren. Ploemacher et al., Blood 74, 2755 (1989); Ploemacher et al., Blood 78, 2527 (1991). Zellen, die im CAFC-Test als Langzeit-Wiederbesiedlungsfähig identifiziert wurden, werden dann durch Messen von drei Parametern analysiert: Populationsverdoppelungsrate; Mitose-Index und DNA-Syntheserate.

**[0189]** Langzeitkulturen mit oder ohne Cyr61-Ergänzung werden auf ihre Mengen an primitiven HSC im CAFC-Test hin getestet. Van der Sluijs et al., Exp. Hematol. 22, 1236 (1994). Beispielweise werden M2-10B4-Stromazellen, B6Sut und FDCP-Gemisch jeweils dem CAFC-Test auf folgende, für die M2-10B4-Zelllinie beschriebene Weise unterzogen. Stromazellschichten werden durch Inokulieren von  $5 \times 10^5$  M2-10B4-Stromazellen (eine aus Knochenmark-Stroma klonierte Zelllinie, Sutherland et al., Blood 78, 666 (1991)) in jeden Well einer 96-Well-Kulturplatte in DMEM mit 10 % FCS hergestellt. Wenn die Zellen sich der Konfluenz nähern, werden sie mit PBS gespült und bestrahlt (20 Gy Gammabestrahlung, 1,02-1,04 Gy/Minute), um die Replikation jeglicher hämatopoetischer Zellen innerhalb des Stromas zu verhindern, ohne die Fähigkeit des Stromas zu beeinflussen, die Hämatopoese zu fördern.

**[0190]** B6Sut- oder FDCP-Gemischzellen (Quellen von HSC) werden in Gegenwart oder Abwesenheit von Cyr61 zu den bestrahlten Stroma-Zellen in DMEM mit 10 % FCS zugegeben (10 µm/ml Endkonzentration). Nachdem das B6Sut- oder FDCP-Gemisch über die Stromazellen gelegt wurde, werden die Kulturen inkubiert (z.B. 28-35 Tage lang beim Maus-System), und die Anzahl an Kopfsteinpflasterbereichbildenden Bereichen (wodurch Zellen mit Langzeit-Wiederbesiedlungsfähigkeit identifiziert werden) wird gezählt, um die HSC-Häufigkeit zu bestimmen.

**[0191]** In einer Variation des oben beschriebenen CAFC-Tests werden Zellen (z.B. B6Sut- oder FDCP-Gemisch) anfangs in parallelen Kulturen in Gegenwart oder Abwesenheit eines Cyr61-Polypeptids gehalten. Danach werden CAFC-Tests durchgeführt, wie sie oben allgemein beschrieben sind; der Test wird jedoch vorzugsweise in vollkommener Abwesenheit von CAFC durchgeführt. Es ist zu erwarten, dass Zellen, die in Gegenwart von Cyr61-Polypeptiden kultiviert werden, im Vergleich zu Zellen, die anfangs in Abwesenheit von Cyr61-Polypeptiden kultiviert wurden, eine Steigerung in der Häufigkeit von HSC aufweisen.

**[0192]** Nach der Identifizierung von Zellen mit Langzeit-Wiederbesiedlungsfähigkeit werden Populationsverdoppelungsraten z.B. durch mikroskopische Untersuchung der Zellmorphologie bestimmt, um die Anzahl von Langzeit-wiederbesiedelnden Zellen (und reifere Kurzzeit-Vorläuferzellen) zu bestimmen, die in den verschiedenen experimentellen Langzeitkulturen vorhanden sind. Die anschließende Untersuchung der Expansions- und Differenzierungsfähigkeiten der möglichen Langzeit-HSC-Kulturen wird zur Bestätigung geeigneter Kandidat-Zelllinien verwendet.

**[0193]** Der Mitose-Index wird nach Verfahren bestimmt, die auf dem Gebiet der Erfindung bekannt sind. Karam et al., Cancer Genet. Cytogenet. 55, 235 (1991). Geerntete Zellen werden in Methanol:Essigsäure (3:1, Vol./Vol.) fixiert, gezählt und zu  $10^6$  Zellen/ml im Fixiermittel resuspendiert. Zehn Mikroliter dieser Suspension werden auf einen Objektträger gegeben, getrocknet und mit Giemsa-Farbstoff behandelt. Die Zellen in der Metaphase werden unter einem Lichtmikroskop gezählt und der Mitose-Index durch Division der Anzahl von Zellen in der Metaphase durch die Gesamtzahl von Zellen am Objektträger berechnet. Die statistische Analyse von Vergleichen von Mitose-Indizes wird unter Anwendung des zweiseitigen gepaarten t-Tests durchgeführt.

**[0194]** Die DNA-Syntheserate wird unter Anwendung eines Thymidin-Inkorporationstests gemessen. Verschiedene Kulturen werden in 1 µCi/ml [<sup>3</sup>H]-Thymidin (ICN Biomedicals Inc., Costa Mesa, CA) 24-72 lang Stunden vermehrt. Geerntete Zellen werden dann mit PBS gespült und mit 10 % Trichloressigsäure fixiert. DNA wird in 0,1 N Na-OH gelöst und die Thymidin-Inkorporation beispielsweise durch Flüssigkeits-Szintillations-spektralphotometrie bestimmt.

**[0195]** Die Funktion von Cyr61-Polypeptiden bei der Förderung des Erhalts und/oder der Expansion von hämatopoetischen Langzeit-Stammzellkulturen wurde durch Antikörperuntersuchungen bestätigt. Nachdem bestimmt wurde, dass Cyr61 eine Stromaassoziierte Komponente ist, die für Erhalt/Expansion von Langzeit-HSC-Kulturen wichtig ist, wurden Stroma-Kontakt-Knochenmark-Zellkulturen in Gegenwart oder Abwe-

senheit von Anti-Cyr61-Antikörpern Cyr61-Polypeptiden ausgesetzt. Diese Kulturen, in denen die Cyr61-Aktivität durch Aussetzen gegenüber Anti-Cyr61-Antikörpern neutralisiert worden war, wiesen eine Verringerung in der Lebensfähigkeit der Kultur, eine Steigerung in der Anzahl an sichtbar detektierbaren differenzierten hämatopoetischen Zellen in der Kultur und einen Rückgang der HSC umfassenden Zellfraktion auf und gleichzeitig eine Zunahme der Zellfraktion aus festgelegten Zellen im Vergleich zu HSC-Kulturen, die in Gegenwart von Cyr61, aber in Abwesenheit von Anti-Cyr61-Antikörpern, gehalten wurden. Folglich ist zu erwarten, dass die Aktivität von Cyr61-Polypeptiden wichtig für die Stroma-abhängige Expansion von undifferenzierten hämatopoetischen Stammzellen ist.

**[0196]** Die Verwendung eines ECM-Signalmolekül-verwandten Biomaterials, wie z.B. Cyr61, kann bei der Ex-vivo-Vermehrung hämatopoetischer Stammzellenkulturen verwendet werden. Außerdem kann mehr als ein ECM-Signalmolekülverwandtes Biomaterial verwendet werden, um diese Kulturen zu vermehren. Beispielsweise kann Cyr61 mit seiner lokal abzielenden Expression mit Fisp12 kombiniert werden, das eine ausgedehntere Abzielung zeigt, wie durch Anwesenheit von Fisp12 im Kulturmedium nachgewiesen werden kann. Als Alternative dazu kann Fisp12 durch CTGF, seinem Maus-Ortholog, ersetzt werden. Ein Fachkundiger auf dem Gebiet der Erfindung wäre in der Lage, andere Kombinationen von ECM-Signalmolekül-verwandten Biomolekülen zu ersinnen.

**[0197]** Fachkundige auf dem Gebiet der Erfindung werden erkennen, dass die erfolgreiche Vermehrung hämatopoetischer Stammzellenkulturen in Gegenwart von ECM-Signalmolekülen, wie z.B. Cyr61, eine Basis für ein Verfahren des Screenings auf mutmaßliche Modulatoren jenes Vermehrungsprozesses bereitstellt. Ein mutmaßlicher Modulator wird mit einem ECM-Signalmolekül, wie z.B. Cyr61, kombiniert und primitiven Zellen ausgesetzt. Parallel dazu wird das ECM-Signalmolekül ähnlichen Zellen ausgesetzt. Die relativen Vermehrungsraten können verwendet werden, um einen Förderer oder Inhibitor der Fähigkeit von ECM-Signalmolekülen zu identifizieren, pluripotente hämatopoetische Stammzellenkulturen zu vermehren.

**[0198]** Cyr61 alleine oder in Kombination mit anderen hämatopoetischen Wachstumsfaktoren können ferner verwendet werden, um aus einem Patienten entnommene Stammzellenpopulationen zu vermehren, die nach Vermehrung dem Patienten oder geeigneten Empfängerpatienten rückgeführt werden können, beispielsweise nach Chemotherapie oder anderen Behandlungsmodalitäten, die in der Verarmung von Blutzellen in einem Patienten resultieren. Wie oben beschrieben vermehrte Stammzellenkulturen können auch in Knochenmarkstransplantaten in einem Patienten, der dieses benötigt, verwendet werden. Außerdem kann ein ECM-Signalmolekül, wie z.B. ein Cyr61-Polypeptid (einschließlich Polypeptidfragmenten, die endogene Cyr61-Aktivität aufweisen), an ein Individuum (z.B. einen Patienten) verabreicht werden, das von einer Steigerung, oder Verringerung, der HSC-Produktion oder Hämatopoese profitieren würde, wobei auf dem Gebiet der Erfindung bekannte Zufuhrmittel eingesetzt werden.

## Beispiel 22

### Organ-Regeneration

**[0199]** Die Rolle von Cyr61 in den verschiedenen Zellprozessen, die durch Änderungen des Zellwachstumsstadiums hervorgerufen werden, weist darauf hin, dass dieses Protein bei der Förderung von Organ-Regeneration wirksam sein sollte. Zu diesem Zweck wurden Untersuchungen durchgeführt, um das Expressionsprofil von Maus-Cyr61 in verbleibendem Lebergewebe nach partieller Hepatektomie zu bestimmen. (Die Reaktion von verbleibendem Lebergewebe nach partieller Hepatektomie ist ein Modell für die Reaktion der Leber auf eine Reihe von Verletzungen, einschließlich chemischer Verletzungen, z.B. Aussetzen gegenüber toxischen Mengen Tetrachlorkohlenstoff.)

**[0200]** BALB/c-3T3- (Charles-River-) Mäuse wurden partieller Hepatektomie unterzogen, wobei ungefähr 67 % ihres Lebergewebes entfernt wurden. Higgins et al., Archs. Path. 12, 186-202 (1931). Aliquoten von zwanzig Mikrogramm RNA wurden vom verbleibenden Lebergewebe zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Operation entfernt, und die Leber-DNA wurde durch Gewebekomogenisierung gefolgt von Guanidinium-Isothiocyanat-, Cäsiumchlorid-Präzipitation isoliert. Sambrook et al. RNAs wurden dann an Nitrozellulosefiltern immobilisiert und mit radioaktiv markierten Klonen sondiert, die verschiedene Regionen von Maus-cyr61-cDNA enthielten. Die Ergebnisse wurden mittels Autoradiographie sichtbar gemacht und zeigten an, dass die Entfernung von Lebergewebe die cyr61-mRNA-Expression induzierte, insbesondere in Zellen, die sich nahe der Verletzungsstelle finden. Daher könnte die Induktion der cyr61-Expression, z.B. durch Rekombinationstechniken, die Regeneration von Organen, wie z.B. der Leber, fördern. Beispielsweise kann die cyr61-Expression kontrolliert werden, z.B. durch Einführen rekombinanter cyr61-Konstrukte, die so konstruiert worden sind, dass sie die Fä-

higkeit zur Expressionskontrolle des Gens bereitstellen, z.B. durch Verwendung von gewebespezifischen Promotoren, z.B. des K14-Promotors zur Expression in der Haut. Das rekombinante *cyr61* kann in die Zellen des maßgeblichen Organs eingeführt werden, und zwar durch Genterapietechniken unter Verwendung von Vektoren, die die homologe Rekombination erleichtern (z.B. von Herpesviren, Adenovirus, Adeno-assoziiertem Virus, Cytomegalovirus, Baculovirus, Retroviren, Vacciniavirus und anderen hergeleitete Vektoren). Techniken zur Einführung heterologer Gene in eukaryotische Zellen und Techniken zur Integration heterologer Gene in Wirtschromosomen durch homologe Rekombination sind auf dem Gebiet der Erfindung wohl bekannt.

**[0201]** Die Entwicklung der Haut, einem anderen Organ, wird ebenfalls von *Cyr61* beeinflusst. Die Expression von *cyr61* wird in Zellen in der Nähe von Hautverletzungen induziert. Ferner hat *Cyr61* wie oben beschrieben eine chemotaktische Wirkung (d.h. *Cyr61* induziert die Zellmigration) auf Endothelzellen und Fibroblasten. Weiters induziert *Cyr61* die Vermehrung von Endothelzellen und Fibroblasten. Beide Prozesse sind an der Heilung von Hautwunden beteiligt. Demgemäß sollte eine *Cyr61*-Verabreichung, z.B. durch örtlich begrenzte oder topische Abgabe, die Hautregeneration fördern.

**[0202]** *Cyr61* wird außerdem sehr stark in Lungenepithel exprimiert. Diese Zellen werden häufig durch Aussetzen gegenüber Umweltschadstoffen verletzt. Im Speziellen wird das Lungenepithel durch Oxidationsmittel in der Luft geschädigt. Die Verabreichung von *Cyr61*, z.B. in Zerstäubern oder Inhalatoren, kann zur Heilung von Lungenepithel, das z.B. durch Umweltschadstoffe geschädigt ist, beitragen.

### Beispiel 23

#### Chondrogenese – ECM-Signalmoleküle werden im Mesenchym exprimiert

**[0203]** Manche ECM-Signalmoleküle werden auch in Zellen, wie z.B. Mesenchymzellen, exprimiert, die letzten Endes Teil des Skelettsystems werden. In diesem Beispiel wird *Cyr61* als eines der in Mesenchymzellen exprimierten ECM-Signalmoleküle identifiziert. Extremitäten-Mesenchymzellen wurden in Mikromassenkultur wie oben beschrieben auf Glasobjektträgern (Fisher) 3 Tage lang gezüchtet. Die Kulturen wurden in 4 % Paraformaldehyd in PBS fixiert, 30 Minuten lang bei Raumtemperatur mit 1 mg/ml Rinderhoden-Hyaluronidase (Typ IV, Sigma) in 0,1 N Natriumacetat (pH 5,5) mit den Proteaseinhibitoren Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF, 1 mM), Pepstatin (1 µg/ml), Leupeptin (1 µg/ml), Aprotinin (1 µg/ml), Aminocaprinsäure (50 mM), Benzamidin (5 mM) und EDTA (1 mM) inkubiert, mit 10 % Ziegerserum in PBS blockiert und über Nacht bei 4°C mit Primärantikörpern gegen *Cyr61* (Yang et al (1991)), Fibronectin (Gibco) und Tenascin (Gibco) inkubiert. Kontrollen wurden mit Anti-*Cyr61*-Antikörpern inkubiert, die mit 1 µg/ml gereinigtem *Cyr61* neutralisiert waren. Die Kulturen wurden anschließend mit FITC-konjugiertem Ziege-Anti-Kaninchen-Sekundärantikörper (Zymed) 1 Stunde lang bei Raumtemperatur inkubiert.

**[0204]** Für die immunhistochemische Ganzpräparat-Färbung wurden Maus-Embryos der Trächtigkeitsstadien 10,5 bis 12,5 in 4 % Paraformaldehyd in PBS fixiert, in Methanol/PBS entwässert und bei -20°C in absolutem Methanol gelagert. Nach Rehydratation wurden die Embryos mit Anti-*Cyr61*-Antikörpern wie in Hogan et al., Development 120, 53-60 (1994), beschrieben inkubiert. Kontrollen wurden mit Anti-*Cyr61*-Antikörpern inkubiert, die mit 1 µg/ml gereinigtem *Cyr61* neutralisiert waren. Die immungefärbten Embryos wurden fixiert, geklärt und fotografiert.

**[0205]** Im Einklang mit der vorübergehenden Expression von *cyr61*-mRNA in Ursegment-Mesenchymzellen, die sich zu Chondrozyten differenzieren (O'Brien et al. (1992)), wurde das *Cyr61*-Protein im sich entwickelnden embryonalen Skelettsystem gefunden. *Cyr61* war mittels immunhistochemischer Ganzpräparatfärbung am proximalen Extremitätenknospen-Mesenchym in Embryos der Trächtigkeitsstage 10,5 bis 12,5 lokalisiert. *Cyr61*-Protein war an den sich entwickelnden Wirbelsäulen, am Schädeldecke-Stirnbein und ersten Armbogen sowie in den Herz- und Umbilikalgefäßen lokalisiert, wobei ein Expressionsmuster ausgebildet wurde, das mit dem Expressionsmuster von *cyr61*-mRNA im Einklang stand (O'Brien et al. (1992)).

**[0206]** *Cyr61*-Protein konnte mittels Immunblot-Analyse in Gesamt-Extremitätenknospen und in Mikromassenkulturen von Extremitätenknospen-Mesenchymzellen detektiert werden. Die Konzentration des *Cyr61*-Proteins blieb während des 4-tägigen Kulturzeitraums, während der die Chondrogenese auftrat, relativ konstant. Unter Anwendung quantitativer Immunblot-Analyse wurde geschätzt, dass *Cyr61* ungefähr 0,03 % der gesamten zellulären und extrazellulären Proteine in den Mesenchymzellkulturen ausmacht. *Cyr61*, Tenascin (Gibco) und Fibronectin wurden mittels Immunfluoreszenzfärbung in den Mesenchymzellkulturen an den Knorpelknötchen lokalisiert. *Cyr61* und Tenascin wurden in erster Linie unter den intranodulären Zellen lokalisiert, während ein fibrilläres Färbungsmuster mit Anti-Fibronectin-Antikörpern auch um die Knorpelknötchen herum und zwi-



schen ihnen beobachtet wurde. Ein ähnliches Immunfluoreszenzfärbemuster wurde in Querschnitten von Mikromassenkulturen für alle drei Antikörper beobachtet. Gemeinsam zeigen diese Ergebnisse, dass endogenes Cyr61 sowohl in vivo als auch in vivo im sich entwickelnden Extremitätenknospen-Mesenchym lokalisiert ist.

#### Beispiel 24

##### Chondrogenese – ECM-Signalmoleküle fördern die Zelladhäsion

**[0207]** Cyr61 ist ein sekretiertes Protein, das die Adhäsion von Fibroblasten und Endothelzellen an Nicht-Gewebekultur-behandelte Kunststoffoberflächen vermittelt (Kireeva et al., Mol. Cell. Biol. 16, 1326-1334 (1996)). Die Anhaftung von Extremitätenknospen-Mesenchymzellen an Nicht-Gewebekultur-Platten, die mit BSA, Cyr61, Tenascin und Fibronectin beschichtet waren, wurde verglichen.

**[0208]** Cyr61, Fibronectin (Gibco) oder Tenascin (Gibco) wurden in 0,1 % proteasefreiem Rinderserumalbumin (BSA) in PBS mit 0,5 mM PMSF auf eine Endkonzentration von 10 oder 50 µg/ml verdünnt. Ein Tropfen von 10 µl je Well wurde in eine Nicht-Gewebekultur-behandelte 24-Well-Platte (Corning) gegeben und bei Raumtemperatur 2 Stunden lang behandelt. Die Wells wurden mit 1 % BSA in PBS 1 Stunde lang bei Raumtemperatur blockiert und mit serumfreiem MEM (Modified Eagle's Medium) gespült. In serumfreiem MEM zu  $5 \times 10^5$  Zellen/ml suspendierte Extremitäten-Mesenchymzellen wurden in einem Volumen von 400 µl/Well zugegeben und bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> 1 bis 3 Stunden lang inkubiert. Zu jedem Messzeitpunkt wurde die Zellsuspension entfernt, die Wells wurden mit MEM gespült und die verbleibenden anhaftenden Zellen fotografiert.

**[0209]** Die Zellen hafteten schlecht an BSA-beschichteten Platten, hafteten jedoch als Cluster gerundeter Zellen an Cyr61- und Tenascin-beschichteten Platten innerhalb 1 Stunde nach Ausplattierung. Im Gegensatz dazu hafteten auf Fibronectin-beschichteten Platten ausplattierte Zellen gleichmäßig und begannen sich auszubreiten. Wenn die Anhaftung von Zellen 3 Stunden lang ermöglicht wurde, wurden sehr viel mehr anhaftende Zellen festgestellt. Darüber hinaus wurde interzelluläre Haufenbildung und rundliche Zellmorphologie in Zellen aufrechterhalten, die auf Cyr61 und Tenascin ausplattiert waren, wogegen auf Fibronectin ausplattierte Zellen sich so ausbreiteten, dass sie eine Monoschicht ausbildeten. Diese Beobachtungen zeigen, dass Cyr61 die Adhäsion und Erhaltung einer rundlichen Zellmorphologie vermittelt, die der Mesenchymzellen-Chondrogenese förderlich ist (Zanetti et al., Dev. Biol. 139, 383-395 (1990); Solursh et al., Dev. Biol. 94, 259-264 (1982)), die ähnlich derjenigen ist, die früher für Tenascin beschrieben worden ist (Mackie et al., J. Cell Biol. 105, 2569-2579 (1987)).

**[0210]** Wie vorhin erwähnt, können ECM-Signalmoleküle, wie z.B. Cyr61, in Verfahren zum Screenen auf Modulatoren der Zelladhäsion, einschließlich, jedoch nicht eingeschränkt auf, Adhäsion von Chondrozyten, verwendet werden. Der oben beschriebene Vergleichstest misst die relativen Adhäsionsausmaße von Zellen, die einer Kombination eines ECM-Signalmoleküls und eines mutmaßlichen Modulators der Zelladhäsion ausgesetzt sind, und von Zellen, die dem ECM-Signalmolekül alleine ausgesetzt sind, wodurch das relative Ausmaß eine Basis zur Identifizierung entweder eines Förderers oder eines Inhibitors der Zelladhäsion bereitstellt.

#### Beispiel 25

##### Chondrogenese – ECM-Signalmoleküle fördern die Zellaggregation

**[0211]** Da die Aggregation ein wesentlicher Schritt der chondrogenen Differenzierung ist (M. Solursh, in: The role of extracellular matrix in development, R. Trelstad (Hrsg.), Alan R. Liss, New York, S. 277-303 (1984)), wurde die Fähigkeit von Cyr61 ermittelt, die interzelluläre Aggregation in Suspensionskulturen von Mesenchymzellen zu vermitteln. Die Anzahl der zu verschiedenen Zeiten nach Isolierung verbleibenden Zellen wurde gezählt. Unbehandelte Mesenchymzellen in Suspension begannen bald nach Isolation zu aggregieren, da die Anzahl von Einzelzellen sich innerhalb eines Inkubationszeitraums von 2 Stunden auf 30 % der anfänglichen Anzahl verminderte. Die Zellaggregation wurde in mit affinitätsgereinigten Anti-Cyr61-Antikörpern behandelten Kulturen signifikant gehemmt, was darauf hinweist, dass endogenes Cyr61 für die Mesenchymzellen-Aggregation von Bedeutung ist. Um die Möglichkeit auszuschließen, dass die affinitätsgereinigten Anti-Cyr61-Antikörper unbestimmte Komponenten enthalten, die die Aggregation stören, wurden die oben beschriebenen Anti-Cyr61-Antikörper vor Zugabe zu den Zellen mit gereinigtem Cyr61-Protein vorinkubiert. Diese vorinkubierten Antikörper beeinträchtigten die Zellaggregation nicht mehr als die IgG- und Cyr61-Puffer-Kontrollen, was darauf hinweist, dass die Anti-Cyr61-Antikörper ihre Hemmung der Zellaggregation durch Neutralisieren des endogenen Cyr61-Proteins von Mesenchymzellen erzielten.

**[0212]** Zusätzlich zur oben beschriebenen Zellaggregation in Suspensionskulturen wurde auch die Wirkung von Cyr61 auf die Mesenchymzellen-Aggregation in Mikromassenkulturen untersucht. Wenn gereinigtes Cyr61-Protein (0,3 µg/ml) zu Extremitäten-Mesenchymzellen zugegeben wurde, wurde im Gegensatz zu Kontrollzellen, die kein Cyr61 erhalten haben, innerhalb von 24 Stunden eine frühzeitige Zellaggregation beobachtet. Weder Cyr61-behandelte noch Kontrollkulturen hatten sich zu diesem Zeitpunkt zu Knorpelknötchen entwickelt. Bis zum Kulturtag 3 war die Entwicklung intranodulärer Zellverdichtungen zwischen den verschiedenen Knorpelknospen in Cyr61-behandelten Kulturen stärker ausgeprägt. Diese internodulären Verdichtungen erfahren anschließend Chondrogenese, die als Alcian-Blau-Färbung der Knorpelmatrix am Kulturtag 4 zu beobachten war. Gemeinsam zeigen diese Ergebnisse an, dass Cyr61 fähig ist, die Aggregation zwischen Zellen zu fördern, was ein notwendiger Schritt bei der Chondrogenese von Mesenchymzellen in Mikromassenkultur ist.

#### Beispiel 26

##### Chondrogenese – ECM-Signalmoleküle fördern die Zellvermehrung

**[0213]** Manche ECM-Signalmoleküle, wie z.B. Cyr61, beeinflussen die Chondrogenese, wie sich durch ihre Wirkungen auf Extremitätenknospen-Mesenchymzellen in Mikromassenkultur wie oben beschrieben offenbart. Ahrens et al., Dev. Biol. 60, 69-82 (1977), haben berichtet, dass diese Zellen in Mikromassenkultur Chondrogenese auf eine Weise erfahren, die dem In-vivo-Prozess ähnlich ist. Mesenchymzellen wurden aus Maus-embryo-Extremitätenknospen durch Trypsinverdau (1 mg/ml, 1:250-Verdünnung von Schweinepankreas-Trypsin, Sigma Chemical Co.) erhalten. Die Zellen wurden in Kunststoffgewebekulturwells explantiert und 2 Stunden lang bei 37°C, 5 CO<sub>2</sub> anhaften gelassen. Die Zellen wurden dann 24 Stunden lang bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> in MEM mit 10 % FBS, Penicillin (50 U/ml) und Streptomycin (50 µg/ml) inkubiert. Zu diesem Zeitpunkt wurde die Zusammensetzung des Mediums durch Ersetzen des 10%igen FBS durch 4 % NuSerum (Collaborative Biomedical Products Inc.) geändert. Einzelne Kulturen erhielten dann Cyr61, Fibronectin, Heparin (alle zu ungefähr 1 µg/ml) oder Puffer als negative Kontrolle. Eine zusätzliche Kontrolle wurde durch Zugabe einer 1:100-Verdünnung von affinitätsgereinigtem Anti-Cyr61-Antikörper (ungefähr 13 µg/ml Stammlösung) bereitgestellt, der nach Standardtechniken hervorgerufen und gereinigt wurde. Harlow et al.

**[0214]** Die Zellvermehrung wurde wie oben beschrieben mittels Thymidintest und mikroskopischer Zellzählung ermittelt. Chondrogenese wurde durch Quantifizieren der Inkorporation von [<sup>35</sup>S]-Sulfat (ICN Biomedicals Inc.) in sulfatierte Glykosaminoglykane und durch qualitative Bestimmung des Chondrogenese-Ausmaßes durch Zellfärbung mit Alcian-Blau ermittelt. Die oben beschriebenen Kulturen wurden mit 2,5 µCi/ml [<sup>35</sup>S]-Sulfat 18 Stunden lang markiert, zweimal in PBS gewaschen, mit Kahle-Fixiermittel (Pepper et al., J. Cell Sci. 109, 73-83 (1995)) fixiert und 18 Stunden lang in 0,5 % Alcian-Blau, pH 1,0, gefärbt. Das Ausmaß der Chondrogenese korrelierte mit der Intensität der Alcian-Blau-Färbung. San Antonio et al., Dev. Biol. 115, 313-324 (1986). Die Ergebnisse zeigen, dass Cyr61 die Vermehrung und Aggregation von Extremitätenknospen-Mesenchymzellen erhöhte, was verstärkte Chondrogenese bewirkte.

**[0215]** Zusätzlich zum Nachweis, dass gereinigtes Cyr61 die Wachstumsfaktor-induzierte DNA-Synthese in Fibroblasten und Endothelzellen verstärkte, wurden die Wirkungen von Cyr61 auf die Zellvermehrung direkt untersucht. Die Zellvermehrung während des 4-tägigen Kulturzeitraums wurde durch Zählen der Zellzahl und durch Inkorporation von [<sup>3</sup>H]-Thymidin bestimmt. Um die Zellzahl zu bestimmen, wurden die Zellen mittels Trypsin/EDTA geerntet und mit einem Coulter-Counter gezählt. In Parallelkulturen wurde [<sup>3</sup>H]-Thymidin (1 µCi/ml; ICN) zu dem Medium 18 Stunden lang zugegeben und die Inkorporation in die TCA-unlösliche Schicht durch Flüssigszintillationszählung gemessen. Zu Extremitäten-Mesenchymzellen zugegebenes gereinigtes Cyr61-Protein erhöhte die Zellzahl und verstärkte die DNA-Synthese nach zwei und drei Tagen in Kultur, obgleich die Gesamtzellzahl in Cyr61-behandelten und Cyr61-unbehandelten Kulturen sich nach 4 Tagen auf dasselbe Ausmaß einpendelte.

**[0216]** Die Rolle von Cyr61 bei der Chondrogenese kann auch die Integration von Prothesen verbessern. Beispielsweise werden Skelettverletzungen und -leiden häufig durch Einsetzen einer Prothese, z.B. Hüftprothese, Knieprothese, behandelt. Über Fragen der Histokompatibilität hinaus erfordert die erfolgreiche Implantation einer Prothese, dass das fremde Element in die Skelettstruktur des Organismus integriert wird. Die Fähigkeit von Cyr61-Polypeptiden, Zelladhäsion, -migration und -vermehrung zu beeinflussen, und die Fähigkeit von Cyr61-Polypeptiden, die Differenzierung von Mesenchymzellen zu Chondrozyten zu induzieren, sollte sich als wertvoll bei der Behandlung von Skelettstörungen durch Prothesenimplantation erweisen. Beispielsweise würde die Integration einer Prothese durch Chondrozyten-Kolonisierung durch therapeutische Behandlungen gefördert werden, die die Verabreichung von Cyr61 in einem pharmazeutisch annehmbaren Adjuvans, Träger

oder Verdünner umfassen, und zwar unter Anwendung beliebiger Verabreichungswege, die auf dem Gebiet der Erfindung bekannt sind, oder durch Beschichten der Prothese mit Cyr61-Polypeptiden in einem geeigneten Träger. Der Träger kann auch ein Vehikel mit langsamer Freisetzung sein, um eine verzögerte Freisetzung der Polypeptide zu ermöglichen.

**[0217]** Ein Vergleich der relativen Raten der Zellvermehrung in Gegenwart einer Kontrolle, die ein ECM-Signalmolekül alleine umfasst (z.B. Cyr61), und in Gegenwart einer Kombination eines ECM-Signalmoleküls und eines mutmaßlichen Modulators der Zellvermehrung stellt eine Basis für die Identifizierung eines mutmaßlichen Modulators als Förderer oder Inhibitor der Chondrozyten-Vermehrung bereit.

#### Beispiel 27

##### Chondrogenese – ECM-Signalmoleküle fördern die Chondrogenese

**[0218]** Die chondrogene Differenzierung wurde durch Inkorporation von [<sup>35</sup>S]-Sulfat (ICN) in sulfatierte Glykosaminoglykane quantifiziert und qualitativ mittels Alcian-Blau-Färbung beurteilt. Die Kulturen wurden mit 2,5 µCi/ml [<sup>35</sup>S]-Sulfat 18 Stunden lang radioaktiv markiert, mit Kahle-Fixiermittel fixiert und mit 0,5 % Alcian-Blau, pH 1,0, gefärbt (Lev et al. (1964)). Das Ausmaß an Chondrogenese wird mit der Intensität der Alcian-Blau-Färbung (San Antonio et al. (1986)) korreliert. [<sup>35</sup>S]-Sulfat-Inkorporation in der fixierten Zellschicht wurde mittels Flüssigszintillationszählung quantifiziert.

**[0219]** Exogenes, gereinigtes Cyr61-Protein förderte die Extremitäten-Mesenchymzellenaggregation und resultierte in größeren, sich mit Alcian-Blau anfärbenden Knorpelregionen in Mikromassenkulturen, was eine die Chondrogenese fördernde Wirkung nahe legt. Diese Wirkung wurde durch Inkorporation von [<sup>35</sup>S]-Sulfat in sulfatierte Glykosaminoglykane (San Antonio et al. (1986)) in Cyr61-behandelten Mikromassenkulturen quantifiziert. Exogenes Cyr61 erhöhte die [<sup>35</sup>S]-Sulfat-Inkorporation auf dosisabhängige Weise, was einen 1,5fachen und 3,5fachen Anstieg mit 0,3 bzw. 5 µg/ml Cyr61 bewirkte und qualitativ mit erhöhter Alcian-Blau-Färbung korrelierte. Der bei der 5-µg/ml-Cyr61-Dosis (120 nM) beobachtete Anstieg unterschätzt das tatsächlichen Ausmaß an Chondrogenese, da sich einige der großen Knorpelknötchen, die bei dieser Dosis gebildet wurden, von der Platte ablösten. Mit 10 µg/ml Cyr61 behandelte Kulturen bildeten einen massiveren Knorpelhügel.

**[0220]** Eine Durchsicht der Literatur wies darauf hin, dass die Chondrogenese in Extremitäten-Mesenchymzellen-Mikromassenkulturen mit der Zugabe von 10 µg/ml Heparin um das 2fache (San Antonio et al. (1987); Resh et al. (1985)) und mit 50 µg/ml Tenascin (200 nM) um das 3fache (Mackie et al. (1987)) anstieg. Die Ergebnisse zeigte, dass gereinigtes Cyr61 bei Konzentrationen (10-100 nM) wirksam war, die ähnlich oder niedriger als jene anderer Moleküle waren, die bekanntermaßen die Chondrogenese in diesem Zellsystem fördern.

**[0221]** Da ein gewisser Schwellwert an Zelldichte erreicht werden muss, damit die anfängliche Aggregation stattfinden kann (Umansky (1966); Ahrens et al. (1977)), sind bei niedrigen Dichten ausplattierte Embryo-Mesenchymzellen normalerweise unfähig, sich zu Chondrozyten zu differenzieren, obgleich der Zusatz exogener Faktoren, wie z.B. Heparin oder Poly-L-Lysin (San Antonio et al. (1986); San Antonio et al. (1987)) erwiesenermaßen die Chondrogenese in Zellen fördern, die unter diesen Bedingungen ausplattiert worden sind. Daher wurde die Fähigkeit von Cyr61 untersucht, die Differenzierung von Mesenchymzellen zu fördern, die mit Dichten über und unter dem Schwellwert für Chondrogenese ausplattiert waren. Mit  $2,5 \times 10^6$  Zellen/ml ausplattierte Zellen inkorporierten wenig [<sup>35</sup>S]-Sulfat. Wenn jedoch Cyr61 zugesetzt wurde, bildeten diese Kulturen mit einer Dichte unter dem Schwellwert Knötchen und inkorporierten Sulfat bis zu einem Ausmaß, das ähnlich jenem in Kulturen war, die mit einer Dichte von  $3 \times 10^6$  Zellen/ml, die Chondrogenese unterstützt, ausplattiert waren. Daher kann Cyr61 Chondrogenese in Mesenchymzellen fördern, die bei nicht-chondrogenen Dichten unter dem Schwellwert ausplattiert wurden.

**[0222]** Daher ist es denkbar, dass bei Ausplattieren von Mesenchymzellen in einer Mikromasse hoher Dichte das Ausmaß an Chondrogenese maximal sein kann und durch exogene Faktoren, die möglicherweise auch nicht allen Zellen zugänglich sind, weiter gesteigert werden kann. Jedoch resultierte die Zugabe von exogenem Cyr61 in einer 2fachen Erhöhung der [<sup>35</sup>S]-Sulfat-Inkorporation in Kulturen, die mit Dichten im Bereich von 3 bis  $10 \times 10^6$  Zellen/ml ausplattiert waren. Daher kann Cyr61 die Chondrogenese in Mikromassenkulturen hoher Dichte, die offenbar einen maximalen Grad an Differenzierung nicht erreicht haben, weiter erhöhen.

**[0223]** Es ist vorstellbar, dass, wenn Mesenchymzellen in einer hohen Mikromassendichte ausplattiert werden, das Ausmaß der Chondrogenese maximal sein kann und nicht durch exogene Faktoren, die auch nicht für alle Zellen zugänglich sein können, weiter erhöht werden kann. Die Zugabe von exogenem Cyr61 resultiert

jedoch in einer 2fachen Steigerung der [ $^{35}\text{S}$ ]-Sulfat-Inkorporation in Kulturen, die in Dichten von 3 bis  $10 \times 10^6$  Zellen/ml ausplattiert wurden. Daher kann Cyr61 die Chondrogenese in hohen Mikromassendichten weiter erhöhen, die offensichtlich kein maximales Ausmaß an Differenzierung erreicht haben.

**[0224]** Es ist möglich, dass die erhöhte [ $^{35}\text{S}$ ]-Sulfat-Inkorporation in Cyr61-behandelte Kulturen zumindest teilweise auf einen Anstieg der Zellzahl zurückzuführen ist, da Cyr61 auch die Zellvermehrung fördert. Wenn dies korrekt wäre, dann würde die Normalisierung der Sulfatinkorporation bezüglich der Zellzahl jegliche Unterschiede zwischen Kontrolle und Cyr61-behandelten Kulturen eliminieren. Es erwies sich, dass dies nicht der Fall ist. Cyr61-behandelte Kulturen zeigten nach wie vor eine ungefähr 2fache Erhöhung der normalisierten Sulfatinkorporation gegenüber der Kontrolle, was darauf hinweist, dass Cyr61 einen Nettoanstieg an Chondrogenese fördert. Am Kulturtag 2 war das Sulfat:Zellzahl-Verhältnis in Cyr61-behandelten Kulturen im Vergleich zu Kontrollen niedriger und spiegelt ein niedriges Ausmaß an [ $^{32}\text{S}$ ]-Sulfat-Inkorporation relativ zur Zellzahl wider, da Mesenchymzellen sich in Kulturen dieses frühen Stadiums eher vermehren als differenzieren (Ede (1983)).

**[0225]** Die Gegenwart von endogenem Cyr61 in diesen Zellen sowohl in vivo als auch in vitro weist darauf hin, dass Cyr61 tatsächlich die biologische Funktion aufweist, die chondrogene Differenzierung zu regulieren. Die Fähigkeit von exogen zugegebenem, gereinigtem Cyr61, die interzelluläre Aggregation zu fördern und die [ $^{35}\text{S}$ ]-Sulfat-Inkorporation und Alcian-Blau-Färbung in Extremitäten-Mesenchymzellen zu erhöhen, beweist, dass Cyr61 als Chondrogenese-Verstärkungsfaktor agieren kann. Wie oben in Beispiel 11 gezeigt, können Anti-Cyr61-Antikörper sowohl die Zelladhäsions- als auch die DNA-Synthese-Verstärkungsaktivitäten von Cyr61 neutralisieren. Anti-Cyr61-Antikörper wurden dem Mesenchymzellen-Kulturmedium zugegeben oder vor dem Ausplattieren mit der Zellsuspension gemischt. Die Chondrogenese wurde in mit Anti-Cyr61-Antikörpern behandelten Kulturen gehemmt, wie durch Verminderungen der [ $^{35}\text{S}$ ]-Sulfat-Inkorporation auf 50 % und 30 % der Kontrollen nachgewiesen wurde, wenn Antikörper dem Medium zugegeben bzw. mit den Zellen gemischt wurden. Diese Beobachtungen korrelierten mit verminderter Alcian-Blau-Färbung. Jedoch resultierte das Mischen der Anti-Cyr61-Antikörper mit Mesenchymzellen vor dem Ausplattieren in vollständiger Ablösung von manchen der behandelten Kulturen innerhalb von 24 Stunden.

**[0226]** Um die Möglichkeit einer nicht identifizierten Komponente im Antikörperpräparat als Ursache der Zellablösung zu eliminieren, wurde Anti-Cyr61-Antikörper mit 1 µg/ml gereinigtem Cyr61-Protein vor dem Mischen mit Zellen vorinkubiert. Die Hemmung der Chondrogenese in mit neutralisierten Anti-Cyr61-Antikörpern gemischten Mesenchymzellen wurde aufgehoben.

**[0227]** Ein Verfahren des Screenings auf Modulatoren der Chondrogenese kann vorgesehen sein. Ein Vergleichstest umfasst das Aussetzen von Chondrozyten gegenüber entweder (a) einer Kombination eines mutmaßlichen Modulators der Chondrogenese und eines ECM-Signalmoleküls, wie z.B. Cyr61, oder (b) dem ECM-Signalmolekül alleine. Messungen der relativen Chondrogenese-Raten stellen dann eine Basis für die Identifizierung des mutmaßlichen Modulators der Chondrogenese als Förderer oder Inhibitor dieses Prozesses bereit.

**[0228]** Die in diesem Beispiel beschriebenen Ergebnisse zeigen, dass endogenes Cyr61 in Mesenchymzellen vorhanden und für ihre Chondrogenese von Bedeutung ist. Demgemäß beabsichtigt die Erfindung die Verwendung eines ECM-Signalmoleküls, wie z.B. Cyr61, um Knochenheilung zu induzieren. Beispielsweise wird eine biologisch wirksame Menge Cyr61 in eine Matrix, wie z.B. einen Schwamm, wie oben beschrieben eingeführt, und dieses Material wird dann aufgegeben, um Knochenbrüche zu fixieren, oder dazu verwendet, um die Fragmente einer Trümmerfraktur zueinander zu bringen. Es kann eine bioabbaubare Matrix eingesetzt werden, oder die Matrix kann zu einem geeigneten späteren Zeitpunkt entfernt werden. Alternativ dazu kann Cyr61 direkt auf den Knochen aufgetragen werden. Zusätzlich kann Cyr61 auf leblose Objekte, wie z.B. auf biokompatible Prothesen, wie in Beispiel 26 beschrieben angewendet werden.

## Beispiel 28

### Genetik

**[0229]** Ein anderer Weg, die Wirkungen eines ECM-Signalmolekül-verwandten Biomaterials zu kontrollieren, ist seine Inaktivierung durch Erzeugen von dominant negativen Mutationen im relevanten Gen in aktiv wachsenden und sich teilenden Zellen. Ein Ansatz umfasst die Verwendung rekombinanter Techniken, um z.B. homozygote mutierte Genotypen in Ex-vivo-Kulturen, wie z.B. HSC-Kulturen, zu erzeugen. Die Einführung dieser Zellen in einen Organismus, wie z.B. in einen humanen Patienten, würde dann eine Gelegenheit für die einge-

fürten mutierten Zellen bereitstellen, sich auszubreiten und die Expression des ECM-Signalmoleküls in vivo zu ändern. Mutanten, die für eine solche Mutation homozygot sind, könnten die Expression eines endogenen ECM-Signalmoleküls der Wildform in anderen Zellen beeinflussen. Heterozygote Mutanten könnten veränderte ECM-Signalmoleküle produzieren, die zur Wechselwirkung mit dem ECM-Signalmolekül der Wildform, das ebenfalls exprimiert wird, in einer solchen Weise fähig sind, dass die Aktivitäten des ECM-Signalmoleküls moduliert oder aufgehoben werden.

**[0230]** Darüber hinaus könnten sich wegen der Rolle, die ECM-Signalmoleküle, wie z.B. Cyr61, bei der Regulation der Chondrogenese (d.h. Skelettentwicklung) spielen, genetische Manipulationen, die die Expression von Human-Cyr61 verändern, als medizinisch bedeutungsvoll für vorgeburtliche Screeningverfahren und Gentherapiebehandlungen erweisen, die mit Skelettiden in Verbindung stehen, und zwar zusätzlich zu angiogenen Leiden. Beispielsweise wird das Cyr61-Gen exprimiert, wenn Mesenchymzellen ektodermalen sowie mesodermalen Ursprungs sich differenzieren, um Chondrozyten auszubilden. Folglich ist es eine Rolle, die Cyr61 spielen könnte, die Regulation der Festlegung von Mesenchymzellen auf Chondrozyten-Zelllinien, die an der Skelettentwicklung beteiligt sind. Im Einklang mit dieser Sichtweise werden transgene Mäuse, die *cyr61* ektopisch überexprimieren, mit Skelett-Abnormalitäten geboren. In allen untersuchten Fällen korreliert die Anwesenheit von Skelettdeformationen mit der Expression des Transgens. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Human-Form von Cyr61 ebenfalls die Chondrogenese und Skelettentwicklung regulieren kann. Es ist ferner möglich, dass das Human-*cyr61*-Gen einem genetischen Locus entspricht, der wie bereits bekannt die Skelettentwicklung oder Geburtsdefekte in Verbindung mit der Knochen-Morphogenese beeinflusst. Die Kenntnis der Human-Cyr61-Proteinsequenz, die hierin in Seq.-ID Nr. 4 dargestellt ist, und der kodierenden Sequenz der cDNA, die hierin in Seq.-ID Nr. 3 dargestellt ist, stellen eine Basis für die Konstruktion einer Vielzahl von Therapieansätzen bereit.

**[0231]** Die Informationen stellen ferner eine Basis für die Konstruktion von Sonden bereit, die bei genotypischen Analysen, z.B. Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus-Analysen, zweckdienlich sind. Solche Analysen sind auf den Gebieten genetischer Beratung, z.B. bei der Diagnose von Krankheiten und Leiden und der Wahrscheinlichkeit ihres Auftretens, sowie bei forensischen Analysen zweckdienlich.

**[0232]** Als Beispiel sind die Materialien der vorliegenden Erfindung im vorgeburtlichen Screening für eine Reihe von Leiden oder Störungen, einschließlich Blutstörungen, Skelettanomalitäten und Krebsleiden, zweckdienlich. Wohl bekannte Techniken zum Erlangen fötaler Zellen, z.B. Amniozentese, stellen für die Diagnose benötigte Materialien bereit. Die fötalen Zellen können vermehrt und die DNA isoliert werden. Fötale Zellen können lysiert und Polymerasekettenreaktionen unter Verwendung von Oligonucleotidprimern durchgeführt werden. Bei beiden Ansätzen wird die DNA dann der Analyse unterzogen. Einer der analytischen Ansätze umfasst die Bestimmung der Nucleotidsequenz bestimmter Regionen von *cyr61* oder des gesamten Gens. Die verfügbare kodierende Sequenz von Human-*cyr61*, die hierin in Seq.-ID Nr. 3 dargestellt ist, erleichtert die Konstruktion von Sequenzierungsprimern und bringt daher die Nucleotidsequenzanalyse in den Bereich der praktischen Realität. Eine Alternative zur Nucleotidsequenzanalyse ist eine Untersuchung der Expressionseigenschaften der fötalen Nucleinsäure. Die Fähigkeit der fötalen Nucleinsäure, exprimiert werden zu können, könnte bei der Diagnose von Cyr61-bezogenen angiogenen, chondrogenen oder onkogenen Störungen entscheidend sein.

#### Beispiel 29

##### Fibroblastenadhäsion

**[0233]** Primäre Human-Hautfibroblasten haften an Proteinen der CCN-Familie, vor allem Cyr61 und CTGF, und zwar durch Integrin  $\alpha_6\beta_1$  und nicht  $\alpha_v\beta_3$  oder  $\alpha_{IIb}\beta_3$ . Fibroblastenadhäsion an entweder Cyr61 oder CTGF erfordert eine Wechselwirkung des Proteins mit Zelloberflächen-Heparansulfat-Proteoglykan, das als Corezeptor mit  $\alpha_6\beta_1$  für sowohl Cyr61 als auch CTGF dient. Neben seiner Beteiligung an Fibroblastenadhäsion induziert Cyr61 angiogene Faktoren, wie z.B. den Gefäßendothelzellen-Wachstumsfaktor (d.h. VEGF), in diesen Zellen. Es ist zu erwarten, dass CTGF auch VEGF-Expression induziert.

**[0234]** Sowohl Cyr61 als auch CTGF dienen als angemessene Signalmoleküle, die durch Adhäsionsrezeptoren wirken. Fibroblastenadhäsion an Cyr61 und CTGF resultiert in Fokaladhäsions-Plaques, die durch Färben mit entweder Anti- $\beta_1$ -Antikörpern oder Anti-Fokaladhäsionskinase- (FAK), Anti-Paxillin- oder Anti-Vinculin-Antikörpern sichtbar gemacht werden kann. Morphologisch gesehen bilden Fibroblasten, die an Cyr61 haften, Filopodien, in Übereinstimmung mit einer Migrationsreaktion. Außerdem führt die Adhäsion zur raschen Tyrosinphosphorylierung von FAK und Paxillin sowie zur Aktivierung von MAP-Kinase und JNK-Kinase durch Phos-

phorylierung. Die Adhäsion von Cyr61 resultiert in einer veränderten Genexpression in Fibroblasten, wie z.B. zur Induktion von MMP1 (Collagenase; Matrix-Metalloproteinase 1).

**[0235]** Das  $\alpha_6\beta_1$ -Integrin ist der Adhäsionsrezeptor für Cyr61 und CTGF in Fibroblasten. Außerdem umfasst Cyr61-vermittelte Adhäsion durch  $\alpha_6\beta_1$  eine gleichzeitige Bindung an Heparansulfat-Proteoglykan. Im Gegensatz dazu erfordert Cyr61-Adhäsion durch  $\alpha_v\beta_3$  in Endothelzellen keine Bindung an Proteoglykane. Somit besteht die Adhäsion von Endothelzellen aus zwei Komponenten: eine wird durch  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin vermittelt, und die andere durch  $\alpha_6\beta_1$ . Eine geringes Ausmaß an Cyr61-vermittelter Adhäsion in Endothelzellen, die nicht durch LM609 blockiert werden konnte, wurde beobachtet. Diese Restadhäsion wurde durch Anti- $\alpha_6\beta_1$ -Antikörper vollkommen blockiert. Somit ist  $\alpha_6\beta_1$  der primäre Rezeptor für Cyr61 in Fibroblasten und der sekundäre Rezeptor in Endothelzellen.

**[0236]** Die funktionell blockierenden monoklonalen Antikörper gegen Integrine wurden von Chemicon Inc. bezogen: JB1A (Anti- $\beta_1$ ); FB12 (Anti- $\alpha_1$ ); P1E6 (Anti- $\alpha_2$ ); P1B5 (Anti- $\alpha_3$ ); P1H4 (Anti- $\alpha_4$ ); P1D6 (Anti- $\alpha_5$ ); NK1-GoH3 (Anti- $\alpha_6$ ); P3G8 (Anti- $\alpha_v$ ); LM609 (Anti- $\alpha_v\beta_3$ ). Polyklonale Anti-Cyr61-Antikörper wurden in Kaninchen gebildet und wie beschrieben affinitätsgereinigt (Kireeva et al. (1997)). Synthetische Peptide GRGDSP (Seq.-ID Nr. 31) und GRGESP (Seq.-ID Nr. 32) wurden von Gibco-BRL bezogen. Heparin, Chondroitin-Sulfat A, Chondroitin-Sulfat C und Decorin stammten von Sigma. Chondroitin-Sulfat B (Dermatan-Sulfat) und niedermolekulares (3K) Heparin stammten von Fluka.

**[0237]** Um Cyr61-vermittelte Fibroblastenadhäsion weiter zu charakterisieren, wurden Cyr61-Varianten oder -Mutanten konstruiert, die Alaninsubstitutionen innerhalb der vermeintlichen Heparin-bindenden Stellen zwischen etwa den Aminosäuren 280-290 und den Aminosäuren 306-312 aufweisen. Konstruktionen umfassten ortsgerichtete Mutagenese unter Einsatz eines zwei Schritte umfassenden Polymerasekettenreaktions- (PCR-) Verfahrens. Kurz gesagt wurden zwei überlappende interne Oligonucleotid-Primer, welche die geänderten Sequenzen in entgegengesetzter Orientierung enthielten, gemeinsam mit externen Primern in zwei separaten PCR-Reaktionen eingesetzt. Maus-cyr61-cDNA wurde in der ersten PCR-Reaktion als Matrize eingesetzt. Die resultierenden Produkte wurden gelgereinigt, kombiniert und als Matrize für die zweite PCR-Reaktion verwendet. Das letztendliche mutierte PCR-Produkt wurde mit BsrG1 verdaut, das an Stellen schneidet, welche die mutierten Sequenzen flankieren. Das BsrG1-Fragment, welches die Wildtyp-cyr61-cDNA im pSG5-Vektor enthielt, wurde mit dem mutierten PCR-Produkt substituiert. Die Orientierung und Mutationen wurden durch DNA-Sequenzierung bestätigt. Schließlich wurde die mutierte cyr61-cDNA durch Verdau mit EcoRI von pSG5 freigesetzt und in den Baculovirus-Expressionsvektor pBlueBac 4.5 (Invitrogen) kloniert.

**[0238]** Für die H1-Mutante waren die internen Primer 5'-GCGGCATGCAGCGCGACCGCGAAATCCCCAG-AACCAGTC-3' (Primer fh1; Seq.-ID Nr. 18) und 5'-TCGCGCTGCATGCCGCGCCCCGCTTTTAGGCTGCTGTACTG-3' (Primer rh1; Seq.-ID Nr. 19). Für die H2-Mutanten waren die internen Primer 5'-GTGCGGCA-TACGCGCCCAATACTGCGGCTC-3' (Primer fh2; Seq.-ID Nr. 20) und 5'-GCGCGTATGCCGCGACACTG-GAGCATCCTGC-3' (Primer rh2; Seq.-ID Nr. 21). Die in der zweiten PCR-Reaktion verwendeten Außenprimer waren für jede Mutante 5'-CAGACCACGTCTTGGTCC-3' (Stromauf-PCR-Primer; Seq.-ID Nr. 22) und 5'-GAA-TAGGCTGTACAGTCGG-3' (Stromab-PCR-Primer; Seq.-ID Nr. 23). Um eine Doppelmutante (dmcyr61) zu konstruieren, wurde das H2-mutierte cyr61-hältige amplifizierte Polynucleotid als PCR-Matrize verwendet, wenn die in H1 vorkommende Mutation eingeführt wurde.

**[0239]** Rekombinantes Human-Cyr61 und mutiertes Cyr61, in einem Baculovirus-Expressionssystem unter Verwendung von Sf9-Insektenzellen synthetisiert, wurden von serumfreiem konditioniertem Medium durch Chromatographie auf Sepharose-S-Säulen gereinigt. Die Reinheit und Ausbeute der Proteine wurden durch SDS-PAGE, gefolgt von Coomassieblau-Färbung und Immun-Blotting bestimmt. Menschliches Fibronectin, menschliches Vitronectin, Rattenschwanz-Typ-I-Collagen und Maus-Laminin wurden von Collaborative Research, MA, erhalten.

**[0240]** Die primäre menschliche Vorhaut-Fibroblasten-Zelllinie 1064SK (ATCC CRL-2076; Start-Passage 2) wurde in DMEM (4,5 g/Liter Glucose, Gibco) mit 10 % fötalem Rinderserum (Intergene) kultiviert. Human-Nabelvenen-Endothelzellen (HUVEC) stammten von Cascade Biologics Inc. und wurden in dem von Cascade Biologics bereitgestellten Medium gezüchtet. Zelladhäsionstests wurden unter serumfreien Bedingungen durchgeführt. Kurz gesagt wurde ein zu untersuchendes Protein bis zur gewünschten Konzentration (0,1-10  $\mu\text{M}$ ) in PBS verdünnt, auf 96-Well-Mikrotiterplatten (50  $\mu\text{l}$  pro Well) aufgebracht und 16 Stunden lang bei 4°C inkubiert. Die Bindungskapazität für ungesättigtes Protein wurde mit 1 % BSA bei Raumtemperatur 1 Stunde lang blockiert. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und durch Inkubation in PBS, das 2,5 mM EDTA enthielt, bei Raumtemperatur 10 Minuten lang geerntet. Abgelöste Zellen wurden mit serumfreiem Grundkultur-

medium gewaschen, das 1 % BSA enthielt, und mit  $2,5 \times 10^5$  Zellen/ml im gleichen Medium resuspendiert. Wenn angegeben wurden Reagenzien (EDTA, Heparin, Peptide usw.) vor dem Ausplattieren mit den Zellen vermischt, und Antikörper wurden vor dem Ausplattieren 30 Minuten lang bei Raumtemperatur mit Zellen inkubiert. Zu jedem Well wurden 50  $\mu$ l Zellsuspension zugegeben, und nach einer 30-minütigen Inkubation bei 37°C wurden die Wells zweimal mit PBS gewaschen. Anhaftende Zellen wurden mit 10 % Formalin fixiert, mit Methylenblau gefärbt und durch Farbstoffextraktion quantifiziert, und dann wurde die Absorption bei 620 nm gemessen. Die Hemmung von Glykosaminoglykan-Sulfatierung wurde erreicht, indem die Zellen 24 Stunden lang in einem Medium gezüchtet wurden, das die angegebenen Menge an Natriumchlorat enthielt. Die Beteiligung von Zelloberflächen-Proteoglykan wurde untersucht, indem die Zellen 30 Minuten lang bei 37°C mit Heparinase I (2 U/ml, Sigma) oder Chondroitinase ABC (2 U/ml, Sigma) vorbehandelt wurden.

**[0241]** Die Fähigkeit von Cyr61, Zelladhäsion in normalen Fibroblasten zu vermitteln, wurde untersucht. Mikrotiterwells wurden mit gereinigtem rekombinantem Cyr61-Protein beschichtet, und 1064SK-Primär-Human-Vorhautfibroblasten wurden unter serumfreien Bedingungen anhaften gelassen. Genauer gesagt wurden gewaschene 1064SK-Fibroblasten mit 2,5 mM EDTA abgelöst und bei  $2,5 \times 10^5$  Zellen/ml in serumfreiem DMEM-Medium resuspendiert. 50  $\mu$ l Zellsuspensionen wurden auf mit variierenden Konzentrationen (0,5-5,0  $\mu$ g/ml) Cyr61-Protein beschichteten Mikrotiterwells ausplattiert. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei 37°C wurden anhaftende Zellen fixiert und mit Methylenblau befärbt. Extrahierter Farbstoff wurde durch Absorption bei 620 nm quantifiziert, und das Mittel aus drei Versuchen zeigte ein Absorptionsvermögen von etwa 0,3  $A_{620}$  (0,5  $\mu$ g/ml Cyr61) auf, wobei das Absorptionsvermögen für Cyr61-Lösungen von 1-5  $\mu$ g/ml von 0,45-0,55  $A_{620}$  reichte. Die Adhäsion von 1064SK-Zellen an Cyr61 war dosenabhängig und sättigbar.

**[0242]** In einem anderen Experiment wurden Mikrotiterwells mit entweder BSA, Cyr61 (2  $\mu$ g/ml) oder Vitronectin (VN; 0,5  $\mu$ g/ml) beschichtet und mit affinitätsgereinigten Anti-Cyr61-Antikörpern eine Stunde lang bei 37°C blockiert, bevor 1064SK-Zellen ausplattiert wurden. Das  $A_{620}$  für BSA-beschichtete Wells betrug etwa 0,05, mit oder ohne blockierendem/n Anti-Cyr61-Antikörper. Bei Cyr61-beschichteten Wells betrug das  $A_{620}$  0,45 (ohne blockierenden Antikörper) oder 0,15 (mit blockierendem Antikörper). Bei VN-beschichteten Wells betrug das  $A_{620}$  etwa 0,55, mit oder ohne blockierendem/n Antikörper. Diese Daten sind Mittel aus drei Versuchen. Die Ergebnisse zeigen, dass affinitätsgereinigte Anti-Cyr61-Antikörper 1064SK-Zelladhäsion an Cyr61, nicht jedoch an Vitronectin, hemmten, was darauf hinweist, dass die Fähigkeit zur Vermittlung von Fibroblastenadhäsion eine immanente Eigenschaften des Cyr61-Proteins ist.

**[0243]** Die Wirkungen von zweiwertigen Kationen auf die Zelladhäsion an Cyr61 wurden ebenfalls untersucht. Die Zellen wurden zu Mikrotiterwells zugesetzt, die mit Cyr61 (2  $\mu$ g/ml); Typ-I-Collagen (Col. I, 2  $\mu$ g/ml), Vitronectin (VN, 0,5  $\mu$ g/ml) oder BSA (Kontrolle) beschichtet waren; zu manchen Zellen wurde EDTA (2,5 mM) oder  $Mg^{2+}$  (5,0 mM) zugesetzt. Die Zellen wurden auf Mikrotiterwells ausplattiert, die mit Cyr61 (2  $\mu$ g/ml) beschichtet waren; und eine der folgenden Komponenten wurde zugesetzt: nichts,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}/Mg^{2+}$  oder  $Ca^{2+}/Mn^{2+}$  (jeweils 5,0 mM); die  $A_{620}$ -Werte waren 0,07, 0,46, 0,07, 0,46, 0,50, 0,08 bzw. 0,48. Die Daten sind Mittel aus drei Versuchen. Die Fibroblastenadhäsion an Cyr61 wurde durch 2,5 mM EDTA vollständig blockiert (etwa 0,12  $A_{620}$ ) und durch den Zusatz von 5,0 mM  $Mg^{2+}$  wiederhergestellt (0,50  $A_{620}$ ). Wie erwartet wurden ähnliche Ergebnisse bei Fibroblasten beobachtet, die auf Collagen (0,10  $A_{620}$  mit EDTA, 0,58  $A_{620}$  mit  $Mg^{2+}$ ) oder Vitronectin (0,05  $A_{620}$  mit EDTA, 0,55  $A_{620}$  mit  $Mg^{2+}$ ) ausplattiert wurden. Die Gegenwart von  $Ca^{2+}$  löste die Zelladhäsion an Cyr61 vollständig aus, während der Zusatz von  $Mg^{2+}$  oder  $Mn^{2+}$  keine Auswirkungen hatte. Die Hemmung durch  $Ca^{2+}$  ist charakteristisch für die Adhäsion durch manche Mitglieder der  $\beta_1$ -Familie von Integrinen, einschließlich Rezeptoren, die Typ-I-Collagen, Laminin und Vitronectin (Integrine  $\alpha_2\beta_1$ ,  $\alpha_6\beta_1$  und  $\alpha_v\beta_1$ ) in Fibroblasten binden, sowie des lymphozytenspezifischen Integrins  $\alpha_L\beta_2$ . Diese Beobachtung half auch, einige Integrine auszuschließen, deren Adhäsionseigenschaften durch  $Ca^{2+}$  unterstützt werden. Die Gegenwart von  $Mn^{2+}$ , nicht aber von  $Mg^{2+}$ , konnte die Hemmwirkung von  $Ca^{2+}$  auf die Zelladhäsion an Cyr61 überwinden, was vermuten lässt, dass  $Mn^{2+}$  den Cyr61-Adhäsionsrezeptor mit höherer Affinität binden kann als  $Ca^{2+}$ .

**[0244]** Eine Reihe von Integrinen, die in Fibroblasten exprimiert werden, vor allem die  $\alpha_v$ -Integrine ( $\alpha_v\beta_1$ ,  $\alpha_v\beta_3$  und  $\alpha_v\beta_5$ ; Vitronectin-Rezeptoren) und das Integrin  $\alpha_v\beta_1$  (Fibronectin-Rezeptor) reagieren empfindlich auf Hemmung durch RGD-hältige Peptide. Die Wirkungen von RGD-Peptiden auf Cyr61-vermittelte Fibroblastenbindung wurden getestet, indem die Zellen in Wells ausplattiert wurden, die mit Cyr61 (2  $\mu$ g/ml), Typ-I-Collagen (2  $\mu$ g/ml) oder Vitronectin (0,5  $\mu$ g/ml) beschichtet waren; dann wurden 2 mM GRGDSP- oder GRGESP-Peptide zugesetzt. Bei Cyr61-beschichteten Wells ergaben kein Zusatz, GRGDSP oder GRGESP  $A_{620}$ -Werte von etwa 0,50, 0,48 bzw. 0,46. Bei Typ-I-Collagen betrugen die  $A_{620}$ -Werte 0,50, 0,47 bzw. 0,49, und bei VN waren die Werte 0,45, 0,05 bzw. 0,41.

**[0245]** Die Zellen wurden auch bei Raumtemperatur 30 Minuten lang mit 40  $\mu$ g/ml monoklonalen Antikörpern

gegen die Integrin- $\alpha_5$ - oder die Integrin- $\alpha_v$ -Untereinheiten vorinkubiert, dann auf Wells ausplattiert, die mit Cyr61 (2  $\mu\text{g/ml}$ ), Vitronectin (0,5  $\mu\text{g/ml}$ ) oder Fibronectin (FN, 1  $\mu\text{g/ml}$ ) beschichtet waren. Bei Cyr61-beschichteten Wells waren die  $A_{620}$ -Werte 0,75 (kein Zusatz), 0,73 (Anti- $\alpha_v$ ) und 0,77 (Anti- $\alpha_5$ ); die entsprechenden Werte für VN betrugen 0,78, 0,32 und 0,72; bei Fibronectin waren die entsprechenden Werte 0,72, 0,65 und 0,36. Die Daten sind Mittel aus drei Versuchen. Das Peptid RGDSP, nicht aber das Kontrollpeptid RGESP, hoben die 1064SK-Zelladhäsion an Vitronectin vollkommen auf. Im Gegensatz dazu hatte RGDSP keine Wirkung auf die Fibroblastenadhäsion an Cyr61 oder Typ-I-Collagen. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass die Fibroblastenadhäsion an Cyr61 weder durch die  $\alpha_v$ -Integrine ( $\alpha_v\beta_1$ ,  $\alpha_v\beta_3$  und  $\alpha_v\beta_5$ ) noch durch  $\alpha_5\beta_1$  nicht vermittelt wird.

**[0246]** 1064SK-Zellen wurden außerdem durch Vorinkubation mit monoklonalen Antikörpern provoziert, welche die  $\alpha_v$ - und  $\alpha_5$ -Integrin-Untereinheiten spezifisch erkennen. Während die 1064SK-Adhäsion an Vitronectin und Fibronectin durch monoklonale Antikörper gegen  $\alpha_v$  bzw.  $\alpha_5$  blockiert wurde, hatten diese Antikörper keine Wirkung auf die Adhäsion an Cyr61. Somit wird 1064SK-Fibroblastenadhäsion an Cyr61 durch eine der Untergruppen von  $\beta_1$ -Integrinen (z.B.  $\alpha_2\beta_1$ ,  $\alpha_3\beta_1$  oder  $\alpha_6\beta_1$ ) vermittelt, die bekannterweise durch  $\text{Ca}^{2+}$  gehemmt werden und gegenüber Hemmung durch RGD-hältige Peptide unempfindlich sind.

**[0247]** Die 1064SK-Zellen wurden außerdem unter Einsatz des monoklonalen Antikörpers JB1A analysiert, der an die  $\beta_1$ -Integrin-Untereinheit bindet. Die Zellen wurden mit dem Antikörper (50  $\mu\text{g/ml}$ ) vorinkubiert, bevor sie auf Mikrotiterwells ausplattiert wurden, die mit Cyr61 (2  $\mu\text{g/ml}$ ), Typ-I-Collagen (2  $\mu\text{g/ml}$ ) oder Vitronectin (0,5  $\mu\text{g/ml}$ ) beschichtet waren. Anti- $\beta_1$ -Antikörper hemmten die Zelladhäsion an Cyr61 ( $A_{620}$  von 0,53 ohne Antikörper und 0,14 mit Antikörper) zu 75 %, was bestätigt, dass 1064SK-Fibroblastenadhäsion an Cyr61 die Beteiligung eines  $\beta_1$ -Integrins erfordert. Wie zu erwarten wurde die Adhäsion an Typ-I-Collagen durch den Anti- $\beta_1$ -Antikörper zu etwa 62 % gehemmt ( $A_{620}$  von 0,56 ohne und 0,21 mit Antikörper), während die Adhäsion an Vitronectin nicht beeinträchtigt war ( $A_{620}$  von 0,48 ohne und 0,44 mit Antikörper). Die Daten sind Mittel aus drei Versuchen.

**[0248]** Um das spezifische  $\beta_1$ -Integrin zu identifizieren, das Fibroblastenadhäsion an Cyr61 vermittelt, wurden die Hemmwirkungen von funktionsblockierenden monoklonalen Antikörper gegen verschiedene Integrin- $\alpha$ -Untereinheiten getestet. Die Zellen wurden mit monoklonalen Antikörpern gegen die Integrin- $\beta_1$ -Einheit (50  $\mu\text{g/ml}$ , siehe oben beschriebene Ergebnisse) oder die Integrin- $\alpha_6$ -Untereinheit (20  $\mu\text{g/ml}$ ) bei Raumtemperatur 30 Minuten lang vorinkubiert und dann auf Wells ausplattiert, die mit Cyr61 (2  $\mu\text{g/ml}$ ), Laminin (5  $\mu\text{g/ml}$ ) oder Fibronectin (1  $\mu\text{g/ml}$ ) beschichtet waren. Die Daten sind Mittel aus zumindest drei Versuchen. Der monoklonale Anti- $\alpha_6$ -Antikörper blockierte 1064SK-Fibroblastenadhäsion an Cyr61 ( $A_{620}$  von 0,53 ohne und 0,08 mit Antikörper) zu mehr als 80 %, während er keine Wirkung auf die Adhäsion an Fibronectin hatte. Die Adhäsion an Laminin, einen Liganden für Integrin  $\alpha_6\beta_1$ , wurde nur teilweise blockiert ( $A_{620}$  von 0,62 ohne und 0,48 mit Antikörper, oder eine Blockierung von etwa 22 %). Die Zellen wurden mit 40  $\mu\text{g/ml}$  monoklonalen Antikörpern gegen Integrin  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$  oder  $\alpha_4$  vorinkubiert oder mit einem Gemisch aus  $\alpha_1$ -,  $\alpha_2$ - und  $\alpha_3$ -Antikörpern (jeweils 40  $\mu\text{g/ml}$ ) 30 Minuten lang bei Raumtemperatur behandelt, dann auf Wells ausplattiert, die mit Cyr61 (2  $\mu\text{g/ml}$ ), Vitronectin (0,5  $\mu\text{g/ml}$ ) oder Typ-I-Collagen (2  $\mu\text{g/ml}$ ) beschichtet waren. Die Daten sind Mittel aus drei Versuchen und in Tabelle II zusammengefasst.

TABELLE II

Antikörper	Cyr61 ( $A_{620}$ )	VN ( $A_{620}$ )	Coll. I ( $A_{620}$ )
keiner (Kontrolle)	0,58	0,59	0,74
Anti- $\alpha_1$	0,54	0,57	0,62
Anti- $\alpha_2$	0,60	0,58	0,31
Anti- $\alpha_3$	0,55	0,54	0,63
Anti- $\alpha_4$	0,56	0,55	0,72
Anti- $\alpha_1$ + Anti- $\alpha_2$ + Anti- $\alpha_3$	0,56	0,56	0,10

**[0249]** Funktionsblockierende monoklonale Antikörper gegen  $\alpha_1$ -,  $\alpha_2$ -,  $\alpha_3$ - oder  $\alpha_4$ -Untereinheiten oder eine Kombination aus Antikörpern gegen  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  und  $\alpha_3$  hatte nur wenig Wirkung auf Cyr61-vermittelte Zelladhäsion (Tabelle II). Im Gegensatz dazu hemmte ein Gemisch aus Anti- $\alpha_1$ -, Anti- $\alpha_2$ - und Anti- $\alpha_3$ -Antikörpern Fibroblas-



tenadhäsion an Collagen fast vollständig. Somit wird 1064SK-Fibroblastenadhäsion an Cyr61 durch Integrin  $\alpha_6\beta_1$  vermittelt.

**[0250]** Die Rolle von Heparin bei der Bindung von Fibroblasten an Cyr61 wurde ebenfalls untersucht. Zuerst wurden unterschiedliche Mengen von löslichem Heparin zu Suspensionen von 1064SK-Fibroblasten zugesetzt, bevor sie auf entweder mit Cyr61 oder Fibronectin beschichteten Wells ausplattiert wurden. Genauer gesagt wurden die Zellen auf Wells ausplattiert, die mit Cyr61 (2 µg/ml) oder Fibronectin (1 µg/ml) beschichtet waren. Unterschiedliche Mengen Heparin (0,001-1000 µg/ml) wurden vor dem Ausplattieren in die Zellsuspension gegeben. Die Zellen wurden auf Wells ausplattiert, die mit Cyr61 (2 µg/ml) oder Vitronectin (0,5 µg/ml) beschichtet waren. Daten, die Mittel aus zumindest drei Versuchen darstellen, zeigten, dass Heparinwerte von nur 1 ng/ml die Bindung nachweisbar hemmten, wobei 0,1 µg/ml oder mehr die Zelladhäsion an Cyr61 vollständig hemmten. Hohe Heparinwerte von bis zu 1000 µg/ml hatten jedoch keine Wirkung auf die Zelladhäsion an Fibronectin.

**[0251]** Der Einfluss von Chondroitin-Sulfaten auf die Zelladhäsion an Cyr61 wurde ebenfalls untersucht. Die Zellen wurden auf Wells ausplattiert, die mit Cyr61 (2 µg/ml) oder Vitronectin (0,5 µg/ml) beschichtet waren. Chondroitin-Sulfat A (1 mg/ml), Chondroitin-Sulfat B (100 µg/ml), Chondroitin-Sulfat C (10 mg/ml) oder Decorin (100 µg/ml) wurde vor dem Ausplattieren in die Zellsuspension gegeben. Die Daten (drei Durchgänge) zeigten, dass 1 mg/ml Chondroitin A oder 10 µg/ml entweder Chondroitin B oder Decorin die Zelladhäsion an Cyr61 hemmten; Chondroitin C hemmte die Adhäsion an Cyr61 in allen getesteten Konzentrationen (0,01-1000 µg/ml). Die Konzentrationen von Chondroitin-Sulfat A, B oder Decorin, die für diese Hemmung erforderlich waren, waren einige Größenordnungen höher als die wirksame Hemmkonzentration von Heparansulfat (z.B. 0,1 µg/ml Heparansulfat im Vergleich zu 1 mg/ml Chondroitin-Sulfat A).

**[0252]** Der Zusatz von Natriumchlorat (ein Hemmer der Proteoglykansulfatierung) zu Zellsuspensionen in Cyr61-behandelten (2 µg/ml) Wells resultierte in einer dosisabhängigen Reaktion mit 90%iger Hemmung der Adhäsion bei 40 mM Natriumchlorat. Im Gegensatz dazu führte diese Konzentration von Chlorat zu nur einer 10-20%igen Hemmung der Zelladhäsion an andere Substraten (Fibronectin, Typ-I-Collagen, Vitronectin und Laminin). Die Daten sind Mittel aus drei Versuchen. Die Chlorathemmstudie wurde durchgeführt, indem Zellen 24 Stunden lang in einem Medium kultiviert wurden, das 0-50 mM Natriumchlorat enthielt, dann gewaschen und wie oben beschrieben geerntet wurden, gefolgt von einer Ausplattierung auf Cyr61 (2 µg/ml), Fibronectin (1 µg/ml), Typ-I-Collagen (Coll. I, 2 µg/ml), Vitronectin (VN, 0,5 µg/ml) oder Laminin (5 µg/ml). Chlorat-vermittelte Adhäsionshemmung wurde durch den Zusatz von 10 mM  $\text{MgSO}_4$  gerettet. Die Zellen wurden 24 Stunden lang in einem Medium kultiviert, das 50 mM Natriumchlorat oder 50 mM Natriumchlorat plus 10 mM Magnesiumsulfat enthielt, dann gewaschen und geerntet und anschließend auf Wells ausplattiert, die mit Cyr61 (2 µg/ml), Vitronectin (0,5 µg/ml) oder Fibronectin (1 mg/ml) beschichtet waren.

**[0253]** Die 1064SK-Fibroblasten wurden außerdem mit Heparatinase behandelt, sodass die Zellen nicht mehr an Cyr61 haften konnten ( $A_{620}$  von 0,13 mit und 0,59 ohne Behandlung), aber keinerlei Auswirkungen auf die Zelladhäsion an Vitronectin ( $A_{620}$  von 0,63 mit und 0,70 ohne Behandlung) oder Fibronectin ( $A_{620}$  von 0,66 mit und 0,74 ohne Behandlung) hatte. Im Gegensatz dazu hatten Chondroitinase A, B und C keine Wirkung ( $A_{620}$ -Werte von 0,57, 0,69 und 0,65 für Cyr61, Vitronectin bzw. Fibronectin) auf die Zelladhäsion, was zeigt, dass Chondroitin-Sulfate nicht wesentlich zur Adhäsion von menschlichen Vorhaut-Fibroblasten an Cyr61 beitragen. Folglich sind Zelloberflächen-Proteoglykane, wie z.B. Heparansulfat-Proteoglykane, an Cyr61-vermittelter Fibroblastenzelladhäsion beteiligt. Die Adhäsion von menschlichen Fibroblasten an Cyr61 wird durch Integrin  $\alpha_6\beta_1$  vermittelt, und sulfatierte Proteoglykane spielen bei dieser Adhäsion eine Rolle.

**[0254]** Mutierte Cyr61-Proteine mit mangelnder Heparinbindung wurden erzeugt, um die Wirkung solcher Veränderungen auf die Fibroblastenadhäsion zu untersuchen. Herkömmliche ortsgerichtete Mutageneseverfahren wurden verwendet, um mutierte Cyr61-Polypeptide mit geänderten Heparinbindungsmotiven herzustellen. Zwei vermeintliche Heparinbindungsmotive wurden innerhalb der carboxylterminalen Domäne in Cyr61 gefunden, welche der Consensus-XBBXB-Sequenz für die Heparinbindung entsprechen (worin B für einen basischen Aminosäurerest, wie z.B. Lysin oder Arginin, steht). Ortsgerichtete Mutagenese wurde eingesetzt, um die Lysin- und Argininreste in den Motiven mit Alanin zu ersetzen, wodurch zwei Cyr61-Varianten (H1 und H2) geschaffen wurden, die jeweils eines der beiden Heparinbindungsmotive mutiert aufwiesen. Außerdem wurden beide Motive in einer Cyr61-Doppelmutanten- (DM-) Variante mutiert. Ein Vergleich der mutierten Aminosäuresequenz  $\text{H}_2\text{N-SLKAGAACSATAKSPPEPVRFTYAGCSSVAAYAPKYCG-CO}_2\text{H}$  (Seq.-ID Nr. 30) mit den Resten 278-314 von Seq.-ID Nr. 2 (Wildtyp-Maus-Cyr61) zeigt Cluster von Aminosäureänderungen zwischen den Resten 280-290 (H1, oben unterstrichen) und zwischen den Resten 305-310 (H2, oben unterstrichen); beide Gruppen von geclusterten Veränderungen sind bei DM zu finden. Diese Mutationen wurden unter Verwendung

des Vollängen-cyr61 geschaffen; die mutierten Konstrukte wurden in rekombinanten Baculovirus-transformierten Insektenzellen exprimiert und daraus gereinigt. Gleiche Mengen von konditioniertem Medium von Insekten-SF9-Zellen, die mit Baculovirus infiziert waren und Wildtyp- oder Mutanten-Cyr61-Protein exprimieren, wurden auf CL-6B-Heparin-Sepharose-Säulen geladen. Nach dem Waschen mit 20 Bett-Volumina RIPA-Puffer wurde gebundenes Protein mit RIPA-Puffer eluiert, der steigende Konzentrationen Natriumchlorid enthielt. Gleiche Mengen Eluat von jeder Fraktion wurden auf SDS-PAGE-Gelen analysiert, gefolgt von Western-Blotting zur Sichtbarmachung von Cyr61-Protein. Als Antikörper wurden polyklonale Kaninchen-Antikörper gegen bakterielles GST-Cyr61 eingesetzt. Die Cyr61-Polypeptid-H1-Mutante eluierte über einen Bereich von 0,4-0,8 M NaCl; H2 eluierte über einen Bereich von 0,4-1,0 (vorwiegend zwischen 0,6-0,8) M NaCl; DM eluierte während des Waschens und bis zu 0,25 M NaCl; und Wildtyp-Cyr61 eluierte bei 0,8-1,0 M NaCl. Diese Elutionsprofile zeigen, dass H1 und H2 etwas verringerte Heparin-Bindungsaffinitäten aufwiesen, während DM eine deutlich defiziente Heparinbindung besaß.

**[0255]** Um die Aktivitäten dieser Cyr61-Varianten (d.h. Cyr61-Proteinmutanten) zu untersuchen, wurden verschiedene Konzentrationen der Varianten separat auf Mikrotiterwells aufgetragen, und 1064SK-Fibroblasten wurden zugesetzt. Adhäsionstests wurden durchgeführt, indem Zellen gegebenenfalls bei Raumtemperatur 30 Minuten lang mit 20 µg/ml monoklonalem Anti- $\alpha_6$ -Antikörper vorinkubiert wurden, dann auf Wildtyp-Cyr61, eine Cyr61-H1-Mutante, eine Cyr61-H2-Mutante oder Vitronectin (0,5 µg/ml) plattiert wurden. Die Ergebnisse (drei Durchgänge) zeigten, dass sowohl H1 (z.B. 2,5 µg/ml) als auch H2 (z.B. 2,5 mg/ml) in der Lage waren, Fibroblastenadhäsion mit Adhäsions-Isothermen zu unterstützen, die mit denen von Wildtyp-Cyr61 vergleichbar waren (z.B. 2 µg/ml), obwohl die maximale Adhäsion bei Wildtyp-Protein bei einer niedrigeren Konzentration (1 µg/ml) erreicht wurde als bei Proteinmutanten (2,5-5,0 µg/ml). Außerdem wurde die Adhäsion an entweder H1 oder H2 durch Antikörper gegen die Integrin-Untereinheit  $\alpha_6$  blockiert, was zeigt, dass die Zelladhäsion an den Cyr61-Proteinmutanten auch durch Integrin  $\alpha_6\beta_1$  vermittelt wird. Genauer gesagt hemmte der Antikörper Cyr61-vermittelte Bindung um 78 %, H1-vermittelte Bindung um 69 % und H2-vermittelte Bindung um 70 %; Fibroblastenbindung an Vitronectin wurden nur zu 9 % gehemmt. Somit unterscheiden sich die Integrin- $\alpha_6\beta_1$ -Bindungsstellen von Cyr61 von den Heparin-Bindungsstellen, die in H1 und H2 mutiert sind. Cyr61-Proteinmutanten, die eine der Heparin-Bindungsstellen behielten, wiesen ausreichende Rest-Heparinbindungsaktivität auf, um Fibroblastenadhäsion zu unterstützen. Im Gegensatz dazu war DM nicht in der Lage, 1064SK-Fibroblastenadhäsion bei irgendeiner getesteten Konzentration zu unterstützen, was zeigt, dass die immanente Heparin-Bindungsaktivität von Cyr61 wesentlich für die Vermittlung von Fibroblastenadhäsion ist.

**[0256]** Versuche, die auf die Untersuchung der Wirkung der Deletion der carboxyterminalen Domäne von Cyr61 auf die Cyr61-vermittelte Adhäsion von 1064SK-Fibroblasten ausgerichtet sind, führten zu übereinstimmenden Ergebnissen, die zeigten, dass die carboxyterminale Domäne, welche die Heparin-Bindungsstelle enthält, für Fibroblastenadhäsion an Cyr61 notwendig ist. Die Experimente wurden gemäß dem oben beschriebenen Protokoll durchgeführt, aber das rekombinante Human-cyr61-Konstrukt kodierte für Cyr61-NT, ein Cyr61-Polypeptid mit den Aminosäuren 1-281 der Seq.-ID Nr. 4 (d.h. ohne die carboxyterminalen Aminosäurereste 282-381 der Seq.-ID Nr. 4). Somit enthält reifes Cyr61-NT die Domänen I, II und III, was der IGFBP-Homologiedomäne, der von-Willebrand-Faktor-Typ-C-Wiederholungsdomäne bzw. der Thrombospondin-Typ-1-Wiederholungsdomäne entspricht, während die Heparin-Bindungsdomäne IV fehlt. Ergebnisse aus diesen Versuchen zeigten, dass Cyr61-NT Fibroblastenadhäsion nicht unterstützte, obwohl dieses Cyr61-Polypeptidfragment Fibroblasten-Migration unterstützte, wie oben beschrieben ist (siehe Beispiel 14). Weiters zeigten immunologische Analysen, dass ein Antikörper (d.h. GoH3), der das Integrin  $\alpha_6$  spezifisch erkannte, Humanfibroblasten-Adhäsion an Cyr61-Polypeptide blockierte.

**[0257]** Der folgende Versuch zeigte, dass die Anforderungen für Cyr61-Heparin-Bindungsstellen anders sind als für Cyr61-vermittelte Adhäsion durch das  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin. Gewaschene HUVE-Zellen wurden durch 2,5 mM EDTA abgelöst und in serumfreiem F-12K-Medium bei  $5 \times 10^5$  Zellen/ml resuspendiert. Dann wurden die Zellen bei Raumtemperatur 30 Minuten lang mit 2,5 mM EDTA, 1 mM RGD-Peptid oder 40 µg/ml monoklonalem Anti- $\alpha_v\beta_3$ -Antikörper (LM609) vorinkubiert, anschließend auf Wildtyp-Cyr61 (5 µg/ml), doppelmutiertem Cyr61 (DM Cyr61, 10 µg/ml) oder Vitronectin (0,5 µg/ml) ausplattiert. Immobilisierte Zellen wurden mit Methylenblau gefärbt, und die Absorptionswerte ( $A_{620}$ ) wurden aufgezeichnet. Die relativen Bindungskapazitäten (die Bindung von Zellen, die keiner Vorinkubationsverbindung ausgesetzt worden waren, ist als 100 % definiert) sind in Tabelle III zusammengefasst.

Tabelle III

Vorinkubation	Cyr61	DM Cyr61	Vitronectin
keine	100	100	100
EDTA	22	23	11
RGD-Peptid	50	23	13
Anti- $\alpha_v\beta_3$ -Antikörper	42	23	89

**[0258]** Die Daten basieren auf drei unabhängigen Versuchen. Folglich vermittelte eine DM immer noch eine HUVEC-Bindung, was zeigt, dass das Ausbleiben der Bindung an Fibroblasten bei einer DM spezifisch für diesen Zelltyp war.

**[0259]** Zelladhäsionstests wurden auch mit Glattmuskelzellen durchgeführt. Rinder-Aortenglattmuskelzellen (BASM-Zellen) wurden dem oben beschriebenen Zelladhäsionstest unterzogen, um Fibroblasten zu testen. Die Ergebnisse zeigten, dass Cyr61-Polypeptide eine Adhäsion von BASM-Zellen induzierte. Heparin, nicht jedoch „RGD“-Peptide (siehe z.B. Seq.-ID Nr. 31), hemmten Cyr61-induzierte Adhäsion der Glattmuskelzellen. Um bestimmte Integrin-Rezeptoren zu identifizieren, welche die Cyr61-Induktion der BASM-Zelladhäsion vermittelten, wurden Antikörper-Untersuchungen unter Einsatz von Anti-Integrin-Antikörpern durchgeführt, welche die spezifischen Integrine erkannten. Der Antikörper GoH3, der das Integrin  $\alpha_6$  erkannte, hob die BASM-Zelladhäsion vollständig auf. Dementsprechend hob der Antikörper JB1a, der das Integrin  $\beta_1$  spezifisch erkannte, Cyr61-induzierte BASM-Zelladhäsion auf.

**[0260]** Somit vermittelt das Integrin  $\alpha_6\beta_1$  Cyr61-induzierte Adhäsion von Glattmuskelzellen. Es ist zu erwarten, dass Cyr61-Polypeptide, welche die Heparin-Bindungsdomäne IV umfassen, die Adhäsion beliebiger Säugetier-Glattmuskelzellen induzieren.

**[0261]** Dementsprechend kann ein Verfahren zum Screenen auf einen Modulator von Zelladhäsion folgende Schritte umfassen: (a) Kontaktieren einer ersten Fibroblastenzelle mit einem vermutlichen Modulator von Zelladhäsion und einer biologisch wirksamen Menge eines ECM-Signalmolekül-bezogenen Biomaterial, das aus der aus einem Cyr61, einem Fisp12, einem CTGF, einem NOV, einem ELM-1 (WISP-1), einem WISP-3, einem COP-1 (WISP-2) und Fragmenten, Analoga und Derivaten beliebiger der oben genannten Mitglieder der CCN-Proteinfamilie bestehenden Gruppe ausgewählt ist; (b) separates Kontaktieren einer zweiten Fibroblastenzelle mit einer biologisch wirksamen Menge eines ECM-Signalmolekül-bezogenen Biomaterials, wie oben beschrieben, wodurch eine Kontrolle bereitgestellt wird; (c) Messen des aus Schritt (a) und Schritt (b) resultierenden Zelladhäsionswerts; und (d) Vergleichen der in Schritt (c) erhaltenen Werte der Zelladhäsion, wodurch ein Modulator von Zelladhäsion aufgrund seiner Fähigkeit, den Wert der Zelladhäsion im Vergleich zu einer Kontrolle aus Schritt (b) zu ändern, identifiziert wird. Vorzugsweise präsentieren die Fibroblastenzellen das  $\alpha_6\beta_1$ -Integrin. Bevorzugt sind auch Fibroblastenzellen, die ein sulfatiertes Proteoglykan präsentieren, wie z.B. Heparansulfat-Proteoglykan. Beliebige aus einer Reihe von CCN-Polypeptiden können in den obigen Verfahren eingesetzt werden, wie z.B. Cyr61 (Maus – Seq.-ID Nr. 2, Mensch – Seq.-ID Nr. 4, Ratte – Genbank Zugriffs-Nr. AB015877), Fisp12/CTGF (Maus – Seq.-ID Nr. 6, Mensch Seq.-ID Nr. 8, N. viridescens – Genbank Zugriffs-Nr. AJ271167, Sus scrofa – Genbank Zugriffs-Nr. U7006U, X. laevis – Genbank Zugriffs-Nr. U43524, B. taurus – Genbank – Zugriffs-Nr. AF000137 und Ratte – Genbank Zugriffs-Nr. AF120275), NOV (Mensch – Genbank Zugriffs-Nr. NM\_002514, Maus – Genbank Zugriffs-Nr. Y09257 und G. gallus – Genbank Zugriffs-Nr. X59284), ELM-1 (Wisp-1; Mensch – Genbank Zugriffs-Nr. NM\_003882, Maus – Genbank Zugriffs-Nr. AB004873), COP-1 (Wisp-2; Mensch – Genbank Zugriffs-Nr. NM\_003881, Maus – Genbank Zugriffs-Nr. AF100778) und Wisp-3 (Mensch – Genbank Zugriffs-Nr. NM\_003880).

**[0262]** Weiters können Screens auf Modulatoren der Wechselwirkung zwischen ECM-Signalmolekülen, wie z.B. menschlichen Cyr61-Polypeptiden, und  $\alpha_5\beta_1$ , einem spezifischen Integrin-Rezeptor, durchgeführt werden, dessen Aktivitäten die Vermittlung der Adhäsion von Fibroblasten, Glattmuskelzellen und Endothelzellen umfassen, nicht jedoch auf diese eingeschränkt sind. Die Screening-Verfahren umfassen das Kontaktieren eines Cyr61-Polypeptids mit  $\alpha_5\beta_1$ , das vorzugsweise in einer Zusammensetzung vorhanden ist, die eine Säugetier-Zellmembran, wie z.B. eine Endothel-, Fibroblasten- oder Glattmuskel-Zellmembran, umfasst, und zwar in Gegenwart und Abwesenheit eines vermeintlichen oder vermutlichen Modulators der Cyr61-Integrin-Wechselwirkung. Der Nachweis von relativen Wechselwirkungsgraden, vorzugsweise in Form des Nachweises von re-

lativen Graden von Zellmembran- (oder Ganzzellen-) Adhäsion, führt zur Identifikation von Modulatoren. Die Erfindung umfasst weiters die Verwendung einer Zusammensetzung, die ein Cyr61-Fragment oder einen Antikörper der Erfindung umfasst, zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Zuständen oder Leiden, wie z.B. Erkrankungen, im Zusammenhang mit defekter Angiogenese, Tumorwachstum und Tumormetastasen. Die Behandlung kann die Zufuhr einer therapeutisch wirksamen Menge eines Cyr61-Polypeptids oder eines Modulators der Cyr61- $\alpha_6\beta_1$ -Integrinrezeptor-Wechselwirkung an ein Säugetier, wie z.B. einen Menschen, mithilfe eines beliebigen auf dem Gebiet der Erfindung bekannten Mittels umfassen.

**[0263]** Analoge Verfahren zum Screenen auf Modulatoren von Fibroblasten-Zellmigration oder -proliferation können ebenfalls durchgeführt werden. Das nachstehend beschriebene Verfahren dient zur Identifikation von Modulatoren von Zellmigration; das beschriebene Verfahren trifft auf Verfahren zum Screenen von Modulatoren von Zellproliferation durch Substitution der eingeklammerten Elemente zu. Ein Verfahren zum Screenen auf Modulatoren von Fibroblasten-Zellmigration umfasst folgende Schritte: (a) Kontaktieren einer ersten Fibroblastenzelle mit einem vermutlichen Modulator von Zellmigration (-proliferation) und einer biologisch wirksamen Menge eines ECM-Signalmolekül-bezogenen Biomaterials, das aus der aus einem Cyr61, einem Fisp12, einem CTGF, einem NOV, einem ELM-1 (WISP-1), einem WISP-3, einem COP-1 (WISP-2) und Fragmenten, Analoga und Derivaten beliebiger der oben genannten Mitglieder der CCN-Proteinfamilie bestehenden Gruppe ausgewählt ist; (b) separates Kontaktieren einer zweiten Fibroblastenzelle mit einer biologisch wirksamen Menge eines ECM-Signalmolekül-bezogenen Biomaterials, wie oben beschrieben, wodurch eine Kontrolle bereitgestellt wird; (c) Messen des aus Schritt (a) und Schritt (b) resultierenden Zellmigrations- (-proliferations-) Werts; und (d) Vergleichen der in Schritt (c) erhaltenen Werte der Zellmigration (-proliferation), wodurch ein Modulator von Zellmigration (-proliferation) aufgrund seiner Fähigkeit, den Wert der Zellmigration- (-proliferation) im Vergleich zu einer Kontrolle aus Schritt (b) zu ändern, identifiziert wird. Bevorzugte Ausführungsformen der Verfahren zum Screenen auf Modulatoren von entweder Zellmigration oder Zellproliferation umfassen die Verwendung von Fibroblasten, die ein  $\alpha_6\beta_1$ -Integrin und/oder ein sulfatiertes Proteoglykan präsentieren.

#### Beispiel 30

##### Cyr61-vermittelte Regulation von Genexpression

**[0264]** Ein lösliches Cyr61-Protein, das zu primären menschlichen Vorhaut-Fibroblasten in einer Kultur zugesetzt wird, führt zu signifikanten Veränderungen in der Genexpression innerhalb von 24 Stunden. Im Gegensatz dazu ist immobilisiertes Cyr61 deutlich weniger wirksam bei der Induktion solcher Expressionsänderungen. Die Veränderungen, die stattfinden, umfassen: (1) Hochregulierung von Matrixabbauenzymen, einschließlich MMP1, MMP3 und uPA; und (2) Herabregulierung von Matrixproteingenen, wie z.B. Typ-1-Collagenkettengen. Cyr61 induziert auch die Expression der entzündungsbezogenen Proteine IL-1 und IL-6. Außerdem induziert Cyr61 eine wesentliche Hochregulierung von VEGF1 (Gefäßendothelwachstumsfaktor 1 oder VEGF-A), einem starken angiogenen Faktor, und VEGF3 (VEGF-C), einem wichtigen angiogenen Faktor für das lymphatische System. Diese Genexpressionsänderungen zeigen, dass Cyr61 in Screening-Tests nützlich ist, die auf die Identifikation von Modulatoren von Angiogenese durch den Nachweis einer Wirkung auf die Cyr61-Aktivität ausgerichtet sind.

**[0265]** Ein gereinigtes, lösliches rekombinantes Cyr61-Protein wurde 24 Stunden lang zu Kulturen von primären menschlichen Vorhaut-Fibroblasten zugesetzt. Aus diesen Zellen wurde mRNA isoliert, um Sonden für die Hybridisierung eines Multi-Gen-Blots (Clontech Atlas Human Array 1.2 Kat.-Nr. 7850-1) mit etwa 650 Genen herzustellen. Die Expressionswerte dieser Gene in Cyr61-behandelten Zellen wurden mit jenen von Kontrollzellen verglichen. Dieser Vergleich ergab, dass die Expression verschiedener Gruppen von Genen verändert wurde: Hochregulierung von Matrixabbauenzymen, einschließlich MMP1, MMP3 und uPA; Herabregulierung von Matrixproteingenen, wie z.B. dem Typ-1-Collagenkettengen; Induktion der entzündungsbezogenen Zytokine IL-1 und IL-6; und Induktion der angiogenen Moleküle VEGF1 und VEGF3. Diese Ergebnisse wurden durch Northern-Blot-Analysen bestätigt, welche Steigerungen oder Abnahmen der betreffenden mRNAs in Cyr61-behandelten Zellen aufzeigten. Ein zeitlicher Verlauf von Expressionsänderungen wurde bestimmt. D.h. 6 Stunden nach seinem Zusatz hatte Cyr61 die Expression von VEGF-A-mRNA induziert, und diese Induktion ist 12 und 24 Stunden nach dem Zusatz immer noch vorhanden. 12 und 24 Stunden nach dem Zusatz hatte Cyr61 außerdem die Expression eines VEGF-A-Polypeptids induziert. Bezüglich VEGF-C ist die Induktion von mRNA 12 Stunden nach dem Zusatz von Cyr61 immer noch klar erkennbar, und die Induktion bleibt nach dem Zusatz zumindest 24 Stunden lang bestehen. Es ist zu erwarten, dass Cyr61 die Expression eines VEGF-C-Polypeptids mit ähnlicher Kinetik induziert.

**[0266]** Cyr61 scheint der Schlüsselmittler für die Wirkung von TGF- $\beta$  zu sein, der Cyr61 stark induziert und

bekannterweise Matrixproteinsynthese reguliert. Unter Verwendung von Mausembryo-Fibroblasten, die von Cyr61-Knockout-Mäusen stammen (siehe Beispiel 31), wurde gezeigt, dass Cyr61 TGF- $\beta$ -Funktion vermittelte. Während TGF- $\beta$  die Expression von Collagen in Embryo-Fibroblasten von einer *cyr61<sup>+/-</sup>*-Maus (Wurfgeschwister einer *cyr61<sup>-/-</sup>*-Maus) induzieren kann, ist das in Zellen mit einer Inaktivierung von *cyr61* durch Insertion (d.h. *cyr61*-Knockout-Zellen) nicht möglich. Außerdem kann TGF- $\beta$  BEFG-Expression in *cyr61<sup>+/-</sup>*-Fibroblasten induzieren, nicht aber in *cyr61<sup>-/-</sup>*-Fibroblasten.

**[0267]** Die Stimulation von Fibroblasten durch Serum induziert bekannterweise die Expression zahlreicher Gene. Während *cyr61<sup>+/-</sup>*-Zellen auf Serumstimulation mit der Induktion von VEGF reagieren, weisen *cyr61<sup>-/-</sup>*-Zellen keine Seruminduktion von VEGF auf (obwohl der Hintergrund-Expressionsgrad derselbe ist). Dieses Ergebnis zeigt, dass Cyr61 der Vermittler von VEGF-Induktion unter Stimulation durch Serumwachstumsfaktoren ist und bestätigt die Fähigkeit von Cyr61, VEGF-Expression zu regulieren.

**[0268]** Um zu beweisen, dass Cyr61-vermittelte Seruminduktion von VEGF auf Transkriptionsebene stattfindet, wurden Collagen-I- und Collagen-II-Promotoren, die an Reporter-Gene gebunden waren, in Cyr61-Knockout-Zellen und Kontrollzellen transfiziert. In Übereinstimmung mit den obigen Ergebnissen wurde in Kontrollzellen, nicht aber in Knockout-Zellen, eine Transkription aus den transfizierten Genkonstrukten durch TGF- $\beta$  induziert.

**[0269]** Wenn also Fibroblasten stimuliert werden, kann eine Cyr61-Expression zu Genexpressionsänderungen führen, die Proteine für Matrixabbau und -umbau, Zytokine, die chemotaktisch für Makrophagen und Lymphozyten sind, und Wachstumsfaktoren für Angiogenese produzieren.

**[0270]** Wie oben erwähnt interagieren Cyr61-Polypeptide mit dem  $\alpha_6\beta_1$ -Integrin-Rezeptor von Fibroblasten. Weitere Genexpressionsuntersuchungen haben gezeigt, dass weder Cyr61-NT (ohne Heparan-Bindungsdomäne IV) noch dmCyr61 (mit Substitutionen in den beiden Consensus-XBBXB-Heparan-Bindungsmotiven bei den Aminosäuren 280-290 (H1) und 305-310 (H2) von Seq.-ID Nr. 4) die Expression der oben genannten Gene (z.B. VEGF, MMP1 und MMP3) induzieren, im Gegensatz zu den Wirkungen von Wildtyp-Cyr61. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Heparan-Bindungsdomäne von Cyr61 anscheinend für die Induktion von Genexpression in Fibroblasten erforderlich ist. Es ist zu erwarten, dass Cyr61-Peptide, wie z.B. TSP1, Genexpression hemmen, die aus durch den  $\alpha_6\beta_1$ -Integrin-Rezeptor vermittelter Cyr61-Induktion resultiert. Außerdem ist zu erwarten, dass Cyr61 die Expression dieser Gene wie auch verwandter Gene in anderen Säugetier-Zelltypen induziert und dass die Heparan-Bindungsdomäne für solch eine Induktion erforderlich ist, egal um welchen Zelltyp es sich handelt.

**[0271]** Die Identifikation von Target-Zellen, die durch Cyr61 reguliert werden, einschließlich Genen, die an Matrixumbau (Wundenheilung, Metastasen etc.), Entzündungen und Angiogenese beteiligt sind, liefert Hinweise auf geeignete Targets einer Therapie unter Einsatz von Cyr61.

**[0272]** Somit kann ein Verfahren zum Screenen auf einen Modulator von Angiogenese gemäß diesen Ergebnissen folgende Schritte umfassen: (a) Kontaktieren einer ersten Endothelzelle, die ein *cyr61*-Allel umfasst, mit einem vermutlichen Modulator von Angiogenese; (b) Messen der Cyr61-Aktivität der ersten Endothelzelle; (c) Messen der Cyr61-Aktivität einer zweiten Endothelzelle, die ein *cyr61*-Allel umfasst; und (d) Vergleichen der in Schritt (b) und (c) gemessenen Cyr61-Aktivitätswerte, wodurch ein Modulator von Angiogenese identifiziert wird.

**[0273]** Ein verwandtes Verfahren ist ein Verfahren zum Screenen auf einen Modulator von Angiogenese, das folgende Schritte umfasst: (a) Kontaktieren einer ersten Endothelzelle mit einem Polypeptid, das aus der aus einem Cyr61, einem Fisp12, einem CTGF, einem NOV, einem ELM-1 (WISP-1), einem WISP-3, einem COP-1 (WISP-2) und Fragmenten, Analoga und Derivaten beliebiger der oben genannten Mitglieder der CCN-Proteinfamilie bestehenden Gruppe ausgewählt ist; (b) Kontaktieren der ersten Endothelzelle mit einem vermutlichen Modulator von Angiogenese; (c) Kontaktieren einer zweiten Endothelzelle mit dem Polypeptid aus Schritt (a); (d) Messen der Angiogenese der ersten Endothelzelle; (e) Messen der Angiogenese der zweiten Endothelzelle; und (f) Vergleichen der in Schritt (d) und (e) gemessenen Angiogenesewerte, wodurch ein Modulator von Angiogenese identifiziert wird.

**[0274]** Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft die Verwendung einer Zusammensetzung, die ein Cyr61-Fragment oder einen Antikörper der Erfindung umfasst, zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Erkrankungen oder Leiden, wie z.B. defekter Angiogenese, Tumorwachstum, Tumormetastasen. Gene, deren Expression durch ein ECM-Signalmolekül beeinflusst werden kann, umfassen, sind jedoch nicht

eingeschränkt auf: MMP1, MMP3, uPA, das Typ-I-Kollagenkettengen, die entzündungsbezogenen Zytokine IL-1 und IL-6 und die Gene, die für die angiogenen Moleküle VEGF1 und VEGF3 kodieren.

**[0275]** Die Verfahren zur Identifikation von Modulatoren von Angiogenese nutzen das Potenzial von Modulatoren, Angiogenese durch Einwirkung auf die Aktivitätswerte eines CCN-Proteins, wie z.B. Cyr61, zu beeinflussen, indem sie entweder den Expressionsgrad des Proteins beeinflussen oder die spezifische Aktivität des exprimierten Proteins beeinflussen.

### Beispiel 31

#### Cyr61-Knockout-Mäuse

**[0276]** Das Maus-cyr61-Gen wurde in vivo durch gerichtete Genunterbrechung insertionsinaktiviert (d.h. durch Knockout), und die Phänotypen von heterozygoten und homozygoten Knockout-Mäuse wurden untersucht. Heterozygote Mäuse (cyr61<sup>+/-</sup>) schienen normal zu sein, da diese Mäuse keine erkennbaren Phänotyp aufwiesen. Die homozygoten cyr61<sup>-/-</sup>-Mäuse wiesen jedoch schwere Gefäßdefekte und auch erkennbare neuronale Defekte auf. Die meisten cyr61<sup>-/-</sup>-Mäuse starben noch in der Gebärmutter, beginnend bei E10.5 während der Geburt, wobei die meisten Embryos um E13.5 starben. Zum Zeitpunkt des Todes der Embryos gibt es ein Spektrum von Entwicklungsdefekten und Phänotypen.

**[0277]** Der erste Schritt bei der Herstellung von Knockout-Mäusen bestand in der Konstruktion eines Targeting-Vektors, der das Maus-cyr61-Gen durch Einführung des bakteriellen lacZ-Gens, das für  $\beta$ -Galactosidase kodiert, insertionsinaktiviert aufwies, wodurch das Screenen auf Knockout-Mäuse vereinfacht wurde. Eine im Handel erhältliche genomische 129-SvJ-Maus-DNA-Bibliothek (Stratagene) wurde mit einer cyr61-Sonde gescreent, und Klon 61-9 wurde identifiziert. Klon-61-9-Phagen-DNA wurde dann hergestellt und mit *Stu*I und *Bam*HI unter Einsatz von Standardverfahren verdaut. Das 6-kb-Fragment mit dem cyr61-Promotor und der kodierenden Region wurde an *Kpn*I-Linker mit einem glatten Ende ligiert, wodurch der Linker an die *Stu*I-Stelle gebunden wurde. Das Fragment wurde dann mit *Bam*HI und *Kpn*I verdaut und in *Bam*HI-, *Kpn*I-verdautes pBluescript KS+ inseriert. Das rekombinante pBluescript KS+ wurde mit *Sma*I geschnitten und dann an einen *Xho*I-Linker ligiert. Nach der Linker-Ligation wurde das rekombinante Plasmid mit *Xho*I geschnitten, und das *Xho*I-Fragment, das die für lacZ kodierende Region von pSA $\beta$ gal trug, wurde inseriert (Friedrich et al., Genes Dev. 5, 1513-1532 (1991)). Das PGK-TK-blue-Plasmid mit einem Thymidinkinase-Gen, das durch den PGK-Promotor getrieben war (Mansour et al., Nature 336, 348-352 (1988)), wurde mit *Eco*RI geschnitten, und die Enden wurden mit Klenow glatt gemacht. Das Fragment mit dem glatten Ende wurde dann an *Kpn*I-Linker ligiert. Schließlich wurden die cyr61- $\beta$ gal-neo-DNA und die modifizierte PGK-TK-DNA jeweils mit *Kpn*I geschnitten und ligiert, um p61geo, das letztendliche Targeting-Konstrukt, zu bilden. Somit enthielt p61geo für funktionelles  $\beta$ gal und für neo kodierende Regionen, die auf der 5'-Seite von einem 1,7-kb-Fragment mit einem intakten cyr61-Promotor flankiert waren und auf der 3'-Seite von einem 3,7-kb-Fragment mit dem 3'-Ende der für cyr61 kodierenden Region flankiert waren (Exons 2-5 und 3'-flankierende Sequenz). Eine homologe Rekombination dieses Inserts in das Maus-Chromosom würde die für cyr61 kodierende Region unterbrechen und die für gal und neo kodierenden Regionen im Genom platzieren.

**[0278]** Die Zellen wurden gemäß den Anleitungen von Genome Systems für Mausembryo-Fibroblasten (MEFs) oder wie von Li et al., Cell 69, 915-926 (1992), mit Modifikationen für J1-ES-Zellen kultiviert. Kurz gesagt wurden MEFs in 7, 5 % CO<sub>2</sub> in einem Inkubator bei 37°C mit DMEM-Medium (hoher Glucosegehalt) (Gibco/BRL Nr. 11965-084) und 10 % hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum (HyClone), 2 mM Glutamin, 0,1 mM nichtessentiellen Aminosäuren und gegebenenfalls 100 U Penicillin/Streptomycin kultiviert. MEFs wurden bei E14.5 aus Mausembryos isoliert und bei Passage 2 bereitgestellt.

**[0279]** Für Feeder-Zellen wurden MEFs mitotisch inaktiviert, indem sie bei 37°C (7,5 % CO<sub>2</sub>) 2-5 Stunden lang 10  $\mu$ g/ml Mytomycin C (Sigma) in einem Kulturmedium ausgesetzt wurden. Dann wurden die Zellen 3-mal mit PBS gewaschen. Mitotisch inaktivierte MEFs wurden mit Trypsin-EDTA (Gibco/BRL) geerntet und bei etwa 1  $\times 10^5$ /cm<sup>2</sup> mit einem MEF-Medium ausplattiert.

**[0280]** Embryonale J1-Stammzellen (ES-Zellen) wurden in DMEM (kein Pyruvat, glucosereiche Formulierung; Gibco/BRL Nr. 11965-084), ergänzt mit 15 % hitzeinaktiviertem FCS (Hyclone), 2 mM Glutamin (Gibco/BRL), 0,1 mM nichtessenziellen Aminosäuren (Gibco/BRL), 10 mM HEPES-Puffer (Gibco/BRL), 55  $\mu$ M  $\beta$ -Mercaptoethanol (Gibco/BRL) und 1.000 U/ml ESGRO (Leukämie inhibierender Faktor, LIF) (Gibco/BRL), kultiviert. J1-Zellen wurden routinemäßig in einem ES-Medium auf einer Feeder-Schicht aus mitotisch inaktivierten MEFs in einem feuchtigkeitsgesättigten Inkubator bei 37°C in 7,5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Normalerweise wur-

den  $1,5 \times 10^6$  J1-Zellen in einem 25-cm<sup>2</sup>-Gewebekulturkolben ausgesät, und das Medium wurde jeden Tag gewechselt. Die Zellkulturen wurden 2 Tage nach dem Aussäen geteilt, üblicherweise wenn der Kolben etwa 80 % Konfluenz aufwies. Um ES-Zellen zu dissoziieren, wurden Zellen zweimal mit PBS (Ca- und Mg-frei) gewaschen und bei 37°C 4 Minuten lang mit Trypsin/EDTA trypsinisiert. Dann wurden die Zellen abgelöst, gründlich mit Trypsin/EDTA vermischt und weitere 4 Minuten lang inkubiert. Die Zellsuspension wurde dann mehrere Male (20- bis 30-mal) pipettiert, um die Zellklumpen aufzubrechen. Die vollständige Dissoziation der Zellen wurde mithilfe eines Mikroskops überprüft. ES-Zellen wurden mit einem ES-Medium mit 10 % FCS und 10 % DMSO (Sigma) bei etwa  $4-5 \times 10^6$  Zellen/ml bei 0,5 ml/Röhrchen eingefroren. Die gefrorenen Zellen wurden über Nacht bei -70°C gelagert und am nächsten Tag in flüssigen Stickstoff übertragen. Dann wurden die gefrorenen Zellen rasch in einem Wasserbad mit 37°C aufgetaut, in 5 ml ES-Medium pelletiert, um DMSO zu entfernen, und mit frischen MEF-Feeder-Zellen in 25-cm<sup>2</sup>-Kolben gegeben.

**[0281]** Um Mauszellen mit einem Transgen zu transfizieren, wurden die p61-geo-Targeting-Konstrukte durch NotI-Verdau linearisiert, mit 1 µg/ml in PBS suspendiert und durch Elektroporation in J1-ES-Zellen eingeführt. Rasch wachsende (subkonfluent, frisch ersetztes Medium) J1-ES-Zellen wurden trypsinisiert, gezählt, gewaschen und im Elektroporationspuffer, der 20 mM HEPES, pH 7,0, 137 mM NaCl, 5 mM KCl, 6 mM D-Glucose und 0,7 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> enthielt, bei  $1 \times 10^7$  Zellen/ml resuspendiert. Linearisierte DNA wurde in einer Menge von 45 µg/ml zur Zellsuspension zugesetzt, das Ganze wurde durchmischt und dann 5 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert. Eine 0,8-ml-Aliquote von Zell-DNA-Gemisch wurde dann in eine Küvette übertragen und einer Elektroporation mit einem BioRad-Gene-Pulser unter Einsatz eines einzelnen Impulses bei 800 V, 3 µF, unterzogen. Die Zellen wurden 10 Minuten lang bei Raumtemperatur im Puffer belassen und dann bei  $4 \times 10^6$  Zellen/100 mm Platte mit Neomycin-resistenten MEF-Feeder-Zellen ausplattiert. Die Zellen wurden anschließend unter Standardbedingungen ohne Arzneimittel-Selektion kultiviert. Nach 24 Stunden wurde das Selektionsmedium, das ES-Medium, ergänzt mit 400 µg/ml (Gesamt-) G418 (Gibco/BRL) und 2 µM Ganciclovir (Roche), enthielt, substituiert. Das Selektionsmedium wurde täglich ausgetauscht. Einzelne Kolonien wurden in Mikrotiter-Wells gegeben, und die Zellen wurden mit 25 µl 0,25 % Trypsin-EDTA/Well auf Eis dissoziiert und dann in einem befeuchteten Inkubator bei 37°C mit 7,5 CO<sub>2</sub> 10 Minuten lang inkubiert. Danach wurden die Zellsuspensionen mit 25 µl ES-Medium vermischt und 10-mal mit einer Pipette aufgezogen, um Zellklumpen aufzubrechen. Der gesamte Inhalt der einzelnen Wells wurde dann mit 150 µl ES-Medium pro Well auf Wells einer 96-Well-Flachbodenschale übertragen und mithilfe herkömmlicher Kultivierungsverfahren 2 Tage lang gezüchtet.

**[0282]** Konfluente ES-Zellklone wurden gewaschen und mit einem Lysepuffer (10 mM Tris (pH 7,7), 10 mM NaCl, 0,5 % (Gew./Vol.) Sarcosyl und 1 mg/ml Proteinase K) in einer feuchten Atmosphäre über Nacht bei 60°C behandelt. Nach der Lyse wurde ein Gemisch aus NaCl und Ethanol (150 µl 5 M NaCl in 10 ml kaltem absolutem Ethanol) zugesetzt (100 µl/Well), und genomische DNA wurde isoliert. Die genomische DNA der einzelnen ES-Zellklone wurde mit EcoRI (30 µl/Well) verdaut und einem Southern-Blot-Assay unterzogen.

**[0283]** Das Southern-Blotting wurde wie in „Current Protocols in Molecular Biology“ (Ausubel et al. (1991)) beschrieben durchgeführt. Kurz gesagt wurden EcoRI-Fragmente von genomischer DNA durch Elektrophorese durch 0,8 % Agarose-Gele fraktioniert und durch Abwärts-Kapillartransfer mit einem alkalischen Puffer (0,4 M NaOH) auf Nylon-Membranen (Bio-Rad) transferiert. Die Sonden, ein BamHI-EcoRI-Fragment 3' vom langen Arm des Targeting-Konstrukts (p61 geo) oder den Sequenzen der für neo kodierenden Region, wurden durch zufällige Primermarkierung hergestellt (Primit II, Stratagene), wobei [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dCTP (NEN) eingesetzt wurde. Membranen wurden in einem Hybridisierungspuffer (7 % SDS, 0,5 M NaHPO<sub>4</sub> (pH 7,0) und 1 mM EDTA) 15 Minuten lang bei 65°C in einer Rollerflasche vorhybridisiert. Mit der Sonde wurde frischer Hybridisierungspuffer zugesetzt, und die Membranen wurden 18 Stunden lang hybridisiert. Hybridisierte Membranen wurden kurz in 5 % SDS, 40 mM NaHPO<sub>4</sub> (pH 7,0), 1 mM EDTA gespült und dann 45 Minuten lang bei 65°C mit einer frischen Waschlösung gewaschen. Diese Waschlösung wurde mit 1 % SDS, 40 mM NaHPO<sub>4</sub> (pH 7,0), 1 mM EDTA ersetzt und zweimal 45 Minuten lang bei 65°C mit einer frischen Lösung gewaschen. Nach dem Waschen wurden die Membranen gescreent, wonach der Screen mithilfe eines Phosphorimagers (Molecular Dynamics) gescannt wurde. Die Blots wurden routinemäßig gestriipt und mit der neo-Kontrollsonde erneut sondiert, um sicherzustellen, dass keine zufällige Integration stattgefunden hatte, wobei herkömmliche Verfahren eingesetzt wurden.

**[0284]** Die Ergebnisse der Southern-Analyse zeigten, dass die genomische DNA von 14 Kolonien (231 Kolonien wurden untersucht) eine cyr61-Allelmutante an einer Stelle enthielt, die mit einer Integration durch homologe Rekombination übereinstimmt. Die Größe der nachgewiesenen Fragmente betrug 6,4 kb beim Wildtyp-cyr61-Allel und 7,4 kb bei der Allelmutante mit der cyr61-Sonde; keine Bande beim Wildtyp-cyr61-Allel und eine 7,4-kb-Bande bei der Allelmutante mit der neo-Sonde.

**[0285]** Auch eine Genotypisierung wurde durchgeführt, und zwar durch PCR unter Verwendung eines Robo-Cycler (Stratagene). Primer wurden entworfen, um ein 2,1-kb-DNA-Fragment aus Allelmutanten zu amplifizieren. Das PCR-Produkt deckt die 5'-Flanke des kurzen Arms des Targeting-Konstrukts bis zur Sequenz von lacZ ( $\beta$ -gal) innerhalb des Target-Konstrukts ab. Die obere PCR-Primersequenz war 5'-CACAAACAGAACGCCAGG-AACC-3' (Seq.-ID Nr. 24), und die untere PCR-Primersequenz war 5'-GAGGGGACGACGACAGTATC-3' (Seq.-ID Nr. 25). PCR-Reaktionsbedingungen waren 95°C 40 Sekunden lang, 63°C 40 Sekunden lang und 68°C eine Minute lang, 35 Durchgänge.

**[0286]** Zur Genotypisierung von Mausschwänzen oder Embryogewebe wurden zwei Primergruppen in die gleiche PCR-Reaktion aufgenommen, um sowohl Wildtyp- als auch mutierte Allele zu amplifizieren. Ein einzelner oberer PCR-Primer (b) wurde verwendet, welche die Sequenz 5'-CAACGGAGCCAGGGGAGGTG-3' (Seq.-ID Nr. 26) aufwies. Der untere PCR-Primer zur Amplifikation der Wildtyp-Allele, also der leichtere Primer, wies die Sequenz 5'-CGGCGACACAGAACCAACAA-3' (Seq.-ID Nr. 27) auf und würde ein Fragment von 388 bp amplifizieren. Der untere PCR-Primer zur Amplifikation der Allelmutante war der untere mutierte Primer und wies die Sequenz 5'-GAGGGGACGACGACAGTATC-3' (Seq.-ID Nr. 28) auf; ein 600-bp-Fragment wurde aus Allelmutanten amplifiziert. Die Reaktionsbedingungen waren: 95°C eine Minute lang, 63°C eine Minute lang und 72°C eine Minute lang, 30 Durchgänge.

**[0287]** Die PCR-Amplifikation von Allelmutanten von *cyr61* unter Verwendung der mutantenspezifischen Primer ergab ein Fragment von 2,1 kb, und Versuche, das Wildtyp-Allel mit diesen Primern zu amplifizieren, ergaben kein nachweisbar amplifiziertes Fragment, wie erwartet worden war. Southern-Analysen identifizierten eine 7,4-kb-Bande (Allelmutante) und eine 6,4-kb-Bande (Wildtyp) in heterozygoten Mutanten; nur die 6,4-kb-Bande wurde detektiert, wenn Wildtyp-DNAs sondiert wurden. Sowohl die PCR-Daten als auch die Southern-Daten zeigen, dass *cyr61*-Allelmutanten in das Maus-Genom eingeführt worden waren, und zwar durch homologe Rekombination.

**[0288]** Die selektierten ES-Zellklone wurden dann für eine Mikroinjektion in E3.5-Blastozysten aus C57BL/6J-Mäusen expandiert. Embryomanipulationen wurden wie von Koblizek et al., Curr. Biol. 8, 529-532 (1998), und Suri et al., Science 282, 468-471 (1998), beschrieben mit Modifikationen durchgeführt. Kurz gesagt wurden die J1-ES-Zellklone geerntet und mit Trypsin-EDTA dissoziiert. Die Zellen wurden in einem CO<sub>2</sub>-unabhängigen Medium (Gibco-BRL) mit 10 % FBS resuspendiert und auf Eis gehalten. Etwa 15-20 ES-Zellen wurden in jede Blastozyste aus C57BL/6J (Jackson Labs) injiziert. Injizierte Blastozysten wurden 1-2 Stunden lang kultiviert, bevor sie in die Uterushörner von scheinträchtigen Ziehmüttern (CD-1, Harlan) transferiert wurden. Chimären wurden durch die Fellfarbe identifiziert. Männliche Chimären mit einem hohen Prozentanteil von Agouti-Fellfarbe wurden mit C57BL/6J-Weibchen zusammengespart, um die Keimbahntransmission des ES-Zell-Genotyps zu testen. F<sub>1</sub>-Nachkommen mit dem Target- (d.h. mutierten) Allel wurden dann einige Male mit C57BL/6J-Weibchen rückgekreuzt, um einen genetischen C57BL-Inzuchthintergrund zu erhalten. Außerdem wurde eine mutierte Mauslinie mit dem genetischen 129SvJ-Inzuchthintergrund erhalten, indem Keimbahnchimären-Männchen mit 129SvJ-Weibchen gekreuzt wurden.

**[0289]** Fünf ES-Zellklone wurden injiziert und ergaben chimäre Nachkommen mit ES-Zell-Anteilen von 30 % – 100 %, wie durch den Anteil an Agouti-Fellfarbe beurteilt wurde. Vier und zwei chimäre Männchen, die von den ES-Zellklonen 4B7 bzw. 2A11 abstammten, gaben das Target-Allel erfolgreich über die Keimbahn weiter. Die heterozygote mutierte *cyr61*-Maus sah gesund und fruchtbar aus. Die 4B7-Chimärenlinie wurde entweder durch Zucht auf 129SvJ-Mäuse übertragen, um das Target-Allel in einem genetischen SvJ129-Hintergrund zu erhalten, oder mit C57BL/6J-Mäusen rückgekreuzt, um die Mutation in den C57BL/6J-Hintergrund zu übertragen. Die 2A11-Target-Linie wurde im genetischen 129SvJ-Hintergrund erhalten. Ähnliche Phänotypen wiesen die 4B7<sub>129</sub><sup>-</sup>, 4B7<sub>C57BL</sub><sup>-</sup> und 2A11-Mauslinien auf.

**[0290]** Von den Nachkommen von Zwischenkreuzungen von *cyr61*<sup>+/-</sup>-Mäusen, die untersucht wurden, waren 141 in diesem Alter *cyr61*<sup>+/-</sup>, 225 *cyr61*<sup>+/-</sup> und keine homozygoten *cyr61*<sup>-/-</sup>-Mäuse, mit der Ausnahme, dass 10 *cyr61*<sup>-/-</sup>-Jungen lebend geboren wurden und innerhalb von 24 Stunden nach der Geburt starben. Ausgehend vom Aufspaltungsverhältnis nach Mendel hätte die Mehrheit (> 90 %) der *cyr61*<sup>-/-</sup>-Tiere vor der Geburt sterben müssen. Deshalb wurden unterschiedliche Stadien pränataler Föten durch PCR untersucht, wie oben beschrieben ist. Beginnend mit E10.5 war die Anzahl an homozygoten mutierten Embryos geringer als aufgrund des Aufspaltungsverhältnisses erwartet, was eventuell auf die Resorption von homozygoten mutierten Embryos zurückzuführen sein könnte. Die meisten (80 %) der E10.5-*cyr61*<sup>-/-</sup>-Embryos schienen normal im Vergleich zu Wurfgeschwistern. In diesem Stadium (E10.5) wurde in manchen Embryos mangelhafte Verschmelzung von Chorion und Allantois gefunden, und dieser Phänotyp resultierte in früher Embryonenletalität. Die Allantois dieses Embryotyps sah ballförmig aus und war oft mit Blut gefüllt. Obwohl keine anderen Defekte spezifisch



identifiziert wurden, kam es in einigen wenigen der *cyr61*<sup>-/-</sup>-Null-Embryos zu Blutungen.

**[0291]** Bei E11.5 waren etwa 50 % der *cyr61*<sup>-/-</sup>-Embryos vom Aussehen her nicht von Wildtyp- oder heterozygoten mutierten Wurfgeschwistern zu unterscheiden. Bis E11.5 hatte sich der Zustand von Embryos mit fehlender Verschmelzung von Chorion und Allantois zusehends verschlechtert. Immer mehr und schwerere Blutungen waren auch in *cyr61*-Null-Embryos zu beobachten. Die Blutungen traten in unterschiedlichen Bereichen auf, einschließlich der Plazenta, innerhalb der Gebärmutter, innerhalb des Amnions, im embryonalen Rumpf, auf der Seite des Körpers und am Kopf. In diesem Stadium traten auch bei manchen Null-Mutationsembryos Defekte in der Plazenta auf. Die Plazenta in Verbindung mit diesen Embryos wies ein Gefäßsystem auf, das unter der Norm lag. Anders als die frühe Letalität im Zusammenhang mit der mangelhaften Verschmelzung von Chorion und Allantois lebten und entwickelten sich Embryos mit Plazenta-Defekten typischerweise normal.

**[0292]** Bei E12.5 wiesen *cyr61*<sup>-/-</sup>-Embryos immer noch drei Phänotypen auf: 1) nicht beeinträchtigt, 2) am Leben mit Blutungen und/oder Plazenta-Defekten und 3) beeinträchtigt, obwohl sich das Verhältnis zwischen den einzelnen Kategorien im Vergleich zu früheren Stadien verändert hatte. Etwa 30 % der *cyr61*-Null-Embryos waren in diesem Stadium nicht beeinträchtigt. Bei etwa 50 % der Nullmutationsembryos waren Anzeichen von Blutungen und/oder Plazenta-Defekten zu erkennen, und 20 % dieses Embryotyps überleben die Gefäß- oder Plazenta-Defekte nicht. Etwa 20 % der *cyr61*<sup>-/-</sup>-Embryos wies keine Verschmelzung von Chorion und Allantois auf und war schon in einem viel früheren Stadium gestorben, wie an der Unterentwicklung von defekten Embryos erkennbar war.

**[0293]** Bei E13.5 war keiner der *cyr61*<sup>-/-</sup>-Embryos, die Blutungen, Plazenta-Defekte oder mangelhafte Verschmelzung von Chorion und Allantois aufgewiesen hatten, mehr am Leben, obwohl etwa 30 % aller *Cyr61*-defizienten Embryos keinen offensichtlichen Phänotyp aufwies. Embryos, die in späteren Stadien (> E14.5) untersucht worden waren, wiesen das gleiche phänotypische Muster und den gleichen Anteil in Bezug auf die einzelnen Arten von Defekten, aber mit steigender Schwere, auf.

**[0294]** Weitere Untersuchungen auf zellulärer und subzellulärer Ebene wurden mithilfe der folgenden Verfahren durchgeführt. MEF-Zellen wurden wie von Hogan et al., *Manipulating the Mouse Embryo – A Laboratory Manual* (1994), beschrieben geerntet. Kurz gesagt wurden E11.5-Embryos aus Kreuzungen von zwei heterozygoten *cyr61*-Ziel-Eltern in DMEM ohne Serum seziiert. Die Glieder, die inneren Organe und das Gehirn wurden entfernt. Die Embryokadaver wurden dann mit einer Rasierklinge zerkleinert und mit Trypsin/EDTA bei 37°C unter Drehung 10 Minuten lang dissoziiert. Die Hälfte des Dissoziationspuffers wurde dann zu einem gleichen Volumen DMEM plus 10 % FBS zugesetzt. Der Dissoziations- und Abnehmschritt wurden fünfmal wiederholt. Abgenommene Zellen wurden expandiert und in einem Verhältnis von 1:10 geteilt, um die proliferierenden Fibroblastenzellen zu selektieren.

**[0295]** Um Gesamtzelllysate herzustellen, wurde eine 100-mm-Platte mit MEF-Zellen fast bis zur Konfluenz kultiviert. Dann wurden die Zellen mit frischem Medium mit 10 % Serum aktiviert und 1,5 Stunden lang bei 37°C inkubiert, bevor sie geerntet wurden. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und durch herkömmliche Verfahren zentrifugiert. Die Zellpellets wurden in 100 µl RIPA-Puffer resuspendiert (0,5 % Natriumdesoxycholat, 0,1 % SDS, 1 % Nonidet P-40, 50 mM Tris-Cl, pH 8,0, 150 mM NaCl, Aprotinin 0,2 Einheiten/ml und 1 mM PMSF) und 10 Minuten lang auf Eis gegeben, um die Zellen zu lysieren. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert, und der Überstand (Zelllysate) wurde bei -70°C für weitere Analysen gelagert. Ein Drittel des Überstands wurde einer Western-Blot-Analyse unter Einsatz eines polyklonalen TrpE-mCyr61-Anti-Serums unterzogen.

**[0296]** Um zu bestätigen, dass homozygote *cyr61*<sup>-/-</sup>-Tiere kein *Cyr61* exprimierten, wurden MEF-Zellen aus E11.5-Embryos hergestellt, die aus Kreuzungen zweier *cyr61*<sup>+/-</sup>-Eltern stammten. Zelllysate wurden von serumstimulierten MEFs verschiedener Genotypen entnommen und Western-Blot-Analysen unter Verwendung von Anti-*Cyr61*-Antiserum (trpE-mCyr61) unterzogen. Der Western-Blot zeigte, dass der *Cyr61*-Proteingehalt bei KO- (Knockout-) MEF-Zellen nicht nachweisbar war, während heterozygote *cyr61*<sup>+/-</sup>-Zellen das *Cyr61*-Protein unter den gleichen Kulturbedingungen und unter Serumstimulation stark exprimierten. Der Mangel an Expression von *Cyr61* in *cyr61*<sup>-/-</sup>-Tieren wurde weiter durch Northern-Blot-Analysen bestätigt, bei denen keine *cyr61*-mRNA in seruminduzierten KO-MEF-Zellen nachweisbar war. Somit wurde bestätigt, dass die Nullmutation von *cyr61*<sup>-/-</sup> *Cyr61*-Expression sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene eliminiert.

**[0297]** Defekte in der Plazenta-Entwicklung, eine der Hauptursachen des Sterbens der Embryos von *cyr61*<sup>-/-</sup>-Mäusen, wurden genauer analysiert. Histologische Analysen von Mausplazenten wurden allgemein gemäß Suri et al. (1998) durchgeführt. Kurz gesagt wurden Plazenten von E12.5-Embryos in kaltem PBS seziiert und mit 4 % Paraformaldehyd in 0,1 M Phosphatpuffer (PB) bei 4°C über Nacht fixiert. Fixierte Plazenten

wurden dann zweimal durch steigende Konzentrationen von Alkohol (50 %, 75 %, 90 %, 95 % und 100 %) entwässert. Dehydratisiertes Gewebe wurde dann mit Hemo-De (einer Xylol-Alternative), 1:1 Ethanol/Hemo-De (Fisher) und 100 % Hemo-De gereinigt, und der Reinigungsvorgang wurde wiederholt. Gereinigtes Gewebe wurde dann in einem 1:1-Gemisch aus Paraffin und Hemo-De eine Stunde lang in einem Vakuumofen bei 60°C äquilibriert, und der Vorgang wurde wiederholt. Das Gewebe wurde mit Histoembedder (Leica) in Paraffin eingebettet. Die in Paraffin eingebetteten Plazenten wurden mit einem Mikrotom (Leica) in 10 µm dicke Scheiben geschnitten. Schließlich wurden die Gewebeschnitte Harris-Hämatoxylin und Eosin-Färbung ausgesetzt (Asahara et al., Circ. Res. 83, 233-240 (1998)).

**[0298]** Plazenten zur immunhistochemischen Färbung wurden in kaltem PBS sezirt und in 4 % Paraformaldehyd über Nacht bei 4°C fixiert. Fixiertes Gewebe wurde über Nacht bei 4°C auf 30 % Saccharose in PBS transferiert. Dann wurden die Plazenten in O.C.T. (Polyvinylalkohol, Carbowax-Lösung) auf Trockeneis eingebettet. Gefrorene Blöcke wurden bei -70°C gelagert oder mit einem Kryotom (Leica) in 7 µm dicke Scheiben geschnitten. Immunhistochemisches Färben wurde gemäß den Empfehlungen des Herstellers (Zymed) durchgeführt. Kurz gesagt wurden gefrorene Schnitte mit 100 % Aceton bei 4°C 10 Minuten lang nachfixiert. Endogene Peroxidase wurde mit Peroxo-Block (Zymed) blockiert. Die Schnitte wurden über Nacht bei 4°C mit einer 1:250-Verdünnung von biotinyliertem monoklonalem Ratten-Antimäus-PECAM-1- (d.h. Blutplättchen-Endothelzellen-Adhäsionsmolekül 1) Antikörper MEC 13.3 (Pharmingen) inkubiert. Ein Histomouse-SP-Set mit Meerrettichperoxidase (Zymed) wurde zum Nachweis von PECAM-1-Signalen eingesetzt.

**[0299]** Die Ergebnisse von histologischen und immunhistochemischen Analysen zeigten, dass Cyr61-Null-Plazenten eine begrenzte Anzahl an embryonalen Blutkörperchen aufwiesen und größtenteils von maternalen Blutgefäßen besetzt waren. Anomal kompakte Trophoblastenregionen wurden ebenfalls gefunden. PECAM-1-Färbung zeigte die stark vaskularisierte Labyrinthzone in einer heterozygoten mutierten Plazenta. Bei stärkerer Vergrößerung konnte das Fließen von fötalen Blutzellen in den PECAM-1-gefärbten Blutgefäßen identifiziert werden. In Übereinstimmung mit der Variation der Phänotypen unter den Cyr61-defizienten Embryos spiegelte die Färbung der Plazenten von zahlreichen *cyr61<sup>-/-</sup>*-Embryos auch die Plazentadefekte in einem gewissen Grad wider. Nichtsdestotrotz können die durch PECAM-1-Färbung erkannten Plazentadefekte in zwei Gruppen unterteilt werden, Gruppe I und II. Gruppe I von Typ II (Typ I – Embryos mit komplettem Ausbleiben der Verschmelzung von Chorion und Allantois, die E10.5 nicht überlebten; Typ II – Embryos mit teilweise defekter Verschmelzung von Chorion und Allantois, die bis etwa E13.5 überlebten) weist eine Reihe von Plazentadefekten auf, die durch das praktische Fehlen von Embryo-Blutgefäßen, das Vorhandensein von kondensierten Trophoblasten und das Vorhandensein einer komprimierten Labyrinthzone charakterisiert sind. Eine stärkere Vergrößerung zeigte, dass sich bei Plazentadefekten dieser Art keine Gefäße im Labyrinth entwickelten. Plazenten mit einem Gruppe-II-Defekt wiesen ausreichende Mengen an PECAM-1-positiver Färbung und kondensierten Kapillarstrukturen auf. Die PECAM-1-gefärbten gefäßartigen Strukturen waren jedoch degeneriert und fielen aufgrund der fehlenden fötalen Blutkörperchen darin zusammen.

**[0300]** Somit führt der Mangel an Cyr61 zu zwei Arten von Plazentadefekten. Beim Typ I führt das Fehlen der Verschmelzung von Chorion und Allantois zum Verlust einer physikalischen Verbindung zwischen Embryo und Plazenta. Bei Typ-II-Plazentadefekten wird die physikalische Verbindung durch eine erfolgreiche Chorioallantois-Fusion errichtet. Die embryonalen Gefäße erreichen jedoch nur die Oberfläche der Plazenta oder bilden, wenn sie es schaffen, die Chorionplatte zu durchdringen, eine unterentwickelte, nichtfunktionelle Gefäßstruktur in der Labyrinthzone.

**[0301]** X-gal-Färbung wurde ebenfalls eingesetzt, um die embryonale Entwicklung in verschiedenen *cyr61*-Hintergründen zu beurteilen. (Die Targeting-DNA, *p61geo*, wurde entwickelt, um das Cyr61-Gen zu inaktivieren und auch ein  $\beta$ -gal-Gen als Marker einzubringen, um die Expression von Cyr61 widerzuspiegeln.) Färbung mit X-gal (d.h. 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranosid) für  $\beta$ -Galactosidase-Expression wurde an heterozygoten *cyr61<sup>+/-</sup>*-Embryos in den Stufen E9.5 bis E11.5 durchgeführt. Die Färbung erfolgte wie beschrieben (Sura et al. (1998)). Embryos in verschiedenen Stadien wurden in einer 0,2 % Paraformaldehyd-Lösung über Nacht bei 4°C fixiert. Fixiertes Gewebe wurde in 30 % Saccharose in PBS plus 2 mM  $MgCl_2$  über Nacht bei 4°C inkubiert. Dann wurde das Gewebe in OCT auf Trockeneis eingebettet und mit einem Kryotom in 7 µm dicke Scheiben geschnitten. Gefrorene Gewebeschnitte wurden in 0,2 % Paraformaldehyd nachfixiert und mit X-gal (1 mg/ml) 3 Stunden lang im Dunkeln bei 37°C gefärbt. Objektträger wurden mit 1 % Orange G gegengefärbt. Gefärbte Objektträger wurden dann durch steigende Konzentrationen Methanol reihen-dehydriert und mit Hemo-De gereinigt, und die Objektträger wurden fixiert.

**[0302]** X-gal-Färbung der E9.5-Embryos, einschließlich der externen embryonalen Gewebe, zeigte eine vom *cyr61*-Promotor getriebene  $\beta$ -Galactosidase-Expression an der Spitze der Allantois neben dem Chorion in der

Chorioallantois-Plazenta auf. Färbung der weiter fortgeschrittenen E10.5-Embryos zeigte, dass große Gefäße, die von den Allantoisgefäßen abzweigten, in der Chorionplatte entstanden und unter Verwendung von X-gal leicht in der Endothelauskleidung identifiziert werden konnten. Weiter entwickelte E11.5-Plazenta wies das gleiche Expressionsmuster auf wie E10.5-Embryos. Während das Färben stark mit dem Endothel der Umbilikalgefäße und Choriongefäße assoziiert war, war bei E11.5 in der Labyrinthzone, in der sich ein mikrovaskuläres Netz bildete, keine Färbung nachweisbar. Die Gegenwart von Cyr61 in der Allantois an der und proximal zur Verschmelzungs Oberfläche mit dem Chorion und in den Umbilikal- und Choriongefäßen ist ein weiterer Beleg für die wichtige Rolle von Cyr61 in der Angiogenese. Cyr61 war an der Verschmelzung von Chorion und Allantois beteiligt und entscheidend für die richtige Gefäßbildung bei fortschreitender Plazentation. Außerdem bestätigte eine Färbung des E11.5-Embryos, dass Cyr61 im dorsalen Aortenpaar und in den Hauptarterien, die vom Herzen wegführen, exprimiert wurde, was mit den in Cyr61-Nullmutanten beobachteten Blutungen übereinstimmt.

**[0303]** Aus der vorliegenden Beschreibung ist ein weiteres Verfahren ersichtlich, bei dem es sich um ein Verfahren zum Screenen auf Modulatoren von Angiogenese handelt, folgende Schritte umfassend: (a) Bilden eines nichtmenschlichen transgenen Tiers, das eine Allelmutante eines Gens umfasst, dass für ein Polypeptid kodiert, welches aus der aus einem Cyr61, einem Fisp12, einem CTGF, einem NOV, einem ELM-1 (WISP-1), einem WISP-3, einem COP-1 (WISP-2) bestehenden Gruppe ausgewählt ist; (b) Kontaktieren des transgenen Tiers mit einem vermutlichen Modulator von Angiogenese; (c) weiteres Kontaktieren eines Wildtyp-Tiers derselben Spezies mit dem Polypeptid, wodurch eine Kontrolle bereitgestellt wird; (d) Messen des Angiogenesezugs im transgenen Tier; (e) Messen des Angiogenesezugs im Wildtyp-Tier; und (f) Vergleichen der in Schritt (d) und (e) gemessenen Angiogenesezüge, wodurch ein Modulator von Angiogenese identifiziert wird.

**[0304]** Transgene Tiere sind wie oben beschrieben charakterisiert, und ausgehend von solchen Charakterisierungen können verschiedene Genotypen in den oben beschriebenen Verfahren zweckdienlich eingesetzt werden. Beispielsweise kann das transgene Tier entweder homozygot oder heterozygot sein, und die Allelmutante kann zu keiner Expression (d.h. Nullmutante) oder veränderten Aktivitätswerten führen. Ein bevorzugtes transgenes Tier ist eine Maus, obwohl beliebige nichtmenschliche Wirbeltier-Organismen eingesetzt werden können, einschließlich anderer Säugetier (z.B. unter anderem Ratten, Kaninchen, Schafe, Kühe, Schweine und Pferde) oder Vögel (z.B. Hühner). Ein bevorzugtes Transgen ist eine Insertionsinaktivierung, oder ein Knockout, eines Gens, das für ein CCN-Protein (z.B. *cyr61*) kodiert; weiters bevorzugt ist eine Insertionsinaktivierung, die aus der Einführung, oder dem „Knocking in“, eines identifizierbaren Markergens resultiert, wie z.B. für  $\beta$ -Galactosidase kodierendes lacZ. Natürlich sind zahlreiche Transgen-Konstruktionen möglich, einschließlich Transgenen, die aus der Ersetzung einer Wildtyp-Sequenz durch verwandte Sequenzen resultieren, welche Aminosäuresequenz-Varianten spezifizieren. Aus der obigen Erläuterung ist ersichtlich, dass gentherapeutische Ansätze, welche die Einführung eines Transgens in eine Zelle umfassen, zur Behandlung verschiedenster Zustände oder Leiden, wie z.B. Erkrankungen, eingesetzt werden können.

**[0305]** Weiters ist aus der obigen Erläuterung die Möglichkeit einer Säugetierzelle, die eine *cyr61*-Mutation umfasst, welche aus der aus einer Insertionsinaktivierung eines *cyr61*-Allels und einer Deletion eines Abschnitts eines *cyr61*-Allels ausgewählt ist, ersichtlich. Die Säugetierzelle ist vorzugsweise eine menschliche Zelle, und die Mutation ist entweder heterozygot oder homozygot. Die Mutation, die aus einer Insertionsinaktivierung oder Deletion resultiert, befindet sich entweder in der kodierenden Region oder in einer flankierenden Region, die für die Expression essentiell ist, wie z.B. eine 5'-Promotor-Region. Zellen können auch mit nichtmenschlichen Tieren assoziiert sein.

### Beispiel 32

#### Adhäsion an Blutplättchen und Makrophagen

**[0306]** Blutplättchen-Immobilisierung spielt eine wichtige Rolle bei der Wundheilung, beispielsweise indem sie zur Thrombose beim Stillen des Blutflusses beiträgt. Proteine der CCN-Familie, wie z.B. Cyr61 und Fisp12/CTGF, fördern die Blutplättchen-Adhäsion durch Wechselwirkung mit dem  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Ingrin.

**[0307]** Rekombinantes Cyr61 und Fisp12/mCTGF, die in einem Baculovirus-Expressionssystem unter Verwendung von Sf9-Insektenzellen synthetisiert worden waren, wurden durch Chromatographie auf Sepharose S wie beschrieben von serumfreiem konditioniertem Medium gereinigt (Kireeva et al. (1997); Kireeva et al. (1996)). Eine SDS-PAGE-Analyse von gereinigtem Cyr61 und Fisp12/mCTGF zeigte die Gegenwart von einzelnen Coomassie-Blau-gefärbten Banden mit 40 kDa bzw. 38 kDa auf. Bei Immunblots reagierten die gereinigten Proteine spezifisch mit ihren zugehörigen Antikörpern. Protein-Konzentrationen wurden unter Einsatz

des BCA-Protein-Tests (Pierce) mit Rinderserumalbumin (BSA) als Standard bestimmt.

**[0308]** Mikrotiter-Wells wurden mit gereinigtem rekombinantem Fisp12/mCTGF oder Cyr61 beschichtet, und die Adhäsion von isolierten Blutplättchen an diesen Proteinen wurde mit  $^{125}\text{I}$ -mAB15, einem monoklonalen Anti- $\beta_3$ -Antikörper, nachgewiesen (Frelinger et al., J. Biol. Chem. 265, 6346-6352 (1990)). Die Blutplättchen wurden aus venösem Blut von gesunden Spendern gewonnen und in einer Säure-Citrat-Dextrose (ACD) gesammelt. Gewaschene Blutplättchen wurden wie beschrieben durch differenzielle Zentrifugation erhalten (Kilough-Rathbone et al., Thromb. Haemostas. 2, 291-308 (1997)) und schließlich in HEPES-Tyrode-Puffer (5 mM HEPES, pH 7,35, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 135 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 11,9 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 1 mg/ml Dextrose und 3,5 mg/ml BSA) resuspendiert. Die Blutplättchen-Konzentration wurde auf  $3 \times 10^8$  Blutplättchen/ml eingestellt.

**[0309]** Mikrotiter-Wells (Immulon 2 Removawell Strips, Dynex Technologies, Inc.) wurden mit Cyr61, Fisp12/mCTGF oder Fibrinogen (25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 50  $\mu\text{l}/\text{Well}$ ) beschichtet und über Nacht bei 22°C inkubiert und dann mit 3 % BSA bei 37°C 2 Stunden lang blockiert. Gewaschene Blutplättchen wurden zu den Wells zugesetzt (100  $\mu\text{l}/\text{Well}$ ), und zwar in Gegenwart und Abwesenheit von Blutplättchen-Agonisten, und bei 37°C 30 Minuten lang inkubiert. Dann wurden die Wells mit HEPES-Tyrode-Puffer gewaschen, und anhaftende Blutplättchen wurden mit  $^{125}\text{I}$ -mAB15, einem monoklonalen Anti- $\beta_3$ -Antikörper, nachgewiesen. Das Aussetzen gegenüber dem markierten Antikörper (50 nM, 50  $\mu\text{l}/\text{Well}$ ) erfolgte 1 Stunde lang bei 22°C. Nach umfassendem Waschen mit HEPES-Tyrode-Puffer wurde gebundene Radioaktivität durch  $\gamma$ -Zählung bestimmt. In Hemmstudien wurden gewaschene Blutplättchen mit Blockierungspeptiden oder Antikörpern 15 Minuten lang bei 37°C vorinkubiert, bevor sie zu Mikrotiter-Wells zugesetzt wurden. In Experimenten zur Untersuchung der Wirkung von Chelatbildung von zweiwertigen Kationen wurde EDTA (5 mM) zu Suspensionen von gewaschenen Blutplättchen zugesetzt und 15 Minuten lang bei 37°C vorinkubiert.

**[0310]** Der Anti- $\beta_3$ -Antikörper wurde mit trägerfreiem  $\text{Na}^{125}\text{I}$  (Amersham Corp.) unter Verwendung des IO-DO-BEADS-Iodierungsreagens (Pierce) auf eine spezifische Aktivität von etwa 2  $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$  radioiodiert. Dieser Antikörper bindet gleichermaßen an  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$  auf aktivierten (siehe unten) und unaktivierten Blutplättchen. Als Kontrollen wurden BSA- und Fibrinogen-beschichtete (KabiVitrum Inc.) Wells verwendet. Zuerst wurde die Adhäsion von nichtaktivierten und aktivierten Blutplättchen an immobilisiertem Fisp12/mCTGF und Cyr61 verglichen. Um sicherzustellen, dass Blutplättchen nicht während des Waschvorgangs aktiviert wurden, wurde  $\text{PGI}_2$  (100 nM), das die Aktivierung durch eine Erhöhung der Blutplättchen-cAMP-Werte hemmt, zu den Blutplättchen-Suspensionen zugesetzt.

**[0311]** Nichtaktivierte Blutplättchen hafteten an keinem der Proteine. Eine Aktivierung von Blutplättchen mit 0,1 U/ml Thrombin, 500 nM U46619 oder 10  $\mu\text{M}$  ADP führten zu einer dramatischen Steigerung der Blutplättchen-Adhäsion an sowohl Fisp12/mCTGF- als auch Cyr61-beschichteten Wells. Um zu bestätigen, dass der Adhäsionsprozess aktivierungsabhängig war, wurde  $\text{PGI}_2$  (100 nM) mit den Agonisten zugesetzt, um eine Blutplättchen-Aktivierung zu verhindern. Unter diesen Bedingungen wurde die Blutplättchen-Adhäsion an sowohl Fisp12/mCTGF als auch Cyr61 signifikant gehemmt.

**[0312]** Zum Vergleich wurde Blutplättchen-Adhäsion an Fibrinogen-beschichteten Wells bewertet. Während nichtaktivierte Blutplättchen in der Lage waren, in geringem Maß an immobilisiertem Fibrinogen zu haften, schien die Blutplättchen-Adhäsion an Cyr61 und Fisp12/mCTGF vollkommen von zellulärer Aktivierung abzuhängen. Nach einer Blutplättchen-Aktivierung mit starken Agonisten, wie z.B. Thrombin und U46619, war die Blutplättchen-Adhäsion an Cyr61 und Fisp12/mCTGF mit Fibrinogen vergleichbar. Der schwächere Agonist ADP führte zu einer geringeren Reaktion. Da ADP keine Sekretion von  $\alpha$ -Granula-Proteinen aus gewaschenen menschlichen Blutplättchen induziert und keine Blutplättchen-Aggregation in Abwesenheit von exogenem Fibrinogen induziert, wurde ADP verwendet, um Blutplättchen-Adhäsion in nachfolgenden Experimenten zu induzieren.

**[0313]** Um die aktivierungsabhängige Adhäsion von Blutplättchen an diese Proteine weiter zu belegen, wurde ein Saure-Phosphatase-Test, der für die Quantifizierung der relativen Anzahl an anhaftenden Blutplättchen entworfen worden war, durchgeführt. In diesem Test wurde die Saure-Phosphatase-Aktivität von anhaftenden Blutplättchen gemessen. Nach dem oben beschriebenen Adhäsions- und Waschvorgang wurde die Substratlösung (0,1 mM Natriumacetat, pH 5,0, 20 mM p-Nitrophenylphosphat und 0,1 % Triton X-100; 150  $\mu\text{l}/\text{Well}$ ) zugesetzt und 2 Stunden lang bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch den Zusatz von 20  $\mu\text{l}$  2N NaOH gestoppt, und das Absorptionsvermögen bei 405 nm wurde gemessen. Sowohl der  $^{125}\text{I}$ -mAb15-Bindungstest als auch der Saure-Phosphatase-Test für die Adhäsion von ADP-stimulierten Blutplättchen an Fibrinogen, Fisp12/mCTGF und Cyr61 führten zu ähnlichen Ergebnissen. Da die Menge an gebundenem  $^{125}\text{I}$ -mAb15 direkt

proportional zur Menge an Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  an den anhaftenden Blutplättchen war, wurde der Saure-Phosphatase-Test in nachfolgenden Studien eingesetzt.

**[0314]** Die Adhäsion von ADP-aktivierten Blutplättchen an Fisp12/mCTGF und Cyr61 war dosisabhängig und sättigbar. In Gegenwart von  $\text{PGI}_2$  haften nichtaktivierte Blutplättchen schlecht an beiden Proteinen, sogar bei hohen Beschichtungskonzentrationen. Die Spezifität des Adhäsionsvorgangs wurde in Inhibierungsstudien charakterisiert, in denen gegen die zentralen variablen Regionen von Fisp12/mCTGF und Cyr61 gebildete polyklonale Anti-Peptid-Antikörper eingesetzt wurden. In Immunblots reagierten polyklonales Kaninchen-Anti-Fisp12/mCTGF und -Anti-Cyr61, die wie in Beispiel 29 beschrieben hergestellt worden waren, spezifisch mit Fisp12/mCTGF bzw. Cyr61. Keine Kreuzreaktivität war erkennbar. Außerdem hemmte der Anti-Fisp12/mCTGF-Antikörper die Blutplättchen-Adhäsion an Fisp12/mCTGF, nicht aber an Cyr61, und der Anti-Cyr61-Antikörper hemmte Cyr61-vermittelte Blutplättchen-Adhäsion, nicht aber die durch Fisp12/mCTGF vermittelte. Bei normalem Kaninchen-IgG war keine Hemmung erkennbar. Außerdem hemmten weder Anti-Fisp12/mCTGF-Antikörper noch Anti-Cyr61-Antikörper die Blutplättchen-Adhäsion an Fibrinogen-beschichtete Wells. Somit ist die Fähigkeit von Fisp12/mCTGF und Cyr61, Blutplättchen-Adhäsion zu hemmen, eine immanente Eigenschaft dieser Proteine.

**[0315]** Bei einer Blutplättchen-Aktivierung werden die Ligandenbindungsaffinitäten der Integrine  $\alpha_{IIb}\beta_3$  und  $\alpha_v\beta_3$  hochreguliert (Shattil et al., Blood 91, 2645-2657 (1998); Bennett et al., J. Biol. Chem. 272, 8137-8140 (1997)). Um zu bestimmen, ob diese Integrin-Rezeptoren Blutplättchen-Adhäsion an Fisp12/mCTGF und Cyr61 vermitteln, wurde das Hemmpotential von Peptid-Antagonisten und des Chelatbildners von zweiwertigen Kationen, EDTA, getestet. Vorinkubation von Blutplättchen mit EDTA bei 37°C hob die Blutplättchen-Adhäsion an beide Proteine vollständig auf, was darauf hinweist, dass der Adhäsionsvorgang vom Chelatbildner für zweiwertige Kationen abhing. Die Kationen-Abhängigkeit der Adhäsion stimmt mit der Beteiligung eines Integrin-Rezeptors überein.

**[0316]** Das wichtigste Blutplättchen-Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  ist empfindlich gegenüber Hemmung durch RGD-hältige Peptide und das Dodecapeptid  $\text{H}_{12}$  ( $\text{H}_2\text{N-HHLGGAKQAGDV-CO}_2\text{H}$ , Seq.-ID Nr. 29; Research Genetics Inc.), das von der Fibrinogen- $\gamma$ -Kette stammt (Plow et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 82, 8057-8061 (1985); Lam et al., J. Biol. Chem. 262, 947-950 (1987)). Die Adhäsion von ADP-aktivierten Blutplättchen an Cyr61 und Fisp12/mCTGF wurde durch GRGDSP (Seq.-ID Nr. 31) spezifisch gehemmt, nicht aber durch GRGESP (Seq.-ID Nr. 32) (Peninsula Laboratories).

**[0317]** Desgleichen blockierte das RGD-hältige Schlangengift-Peptid Echistatin (Gan et al., J. Biol. Chem. 263, 19827-19832 (1988); Sigma Chemical Co.) ebenfalls die Blutplättchen-Adhäsion an beiden Proteinen vollständig. Außerdem wurde gezeigt, dass das Dodecapeptid  $\text{H}_{12}$  eher mit dem Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  wechselwirkt als mit dem Integrin  $\alpha_v\beta_3$  (Cheresh et al., Cell 58, 945-953 (1989); Lam et al., J. Biol. Chem. 264, 3742-3749 (1989)). Somit zeigte die Erkenntnis, dass  $\text{H}_{12}$  die Blutplättchen-Adhäsion an Cyr61 und Fisp12/mCTGF hemmte, dass dieser Prozess eher durch  $\alpha_{IIb}\beta_3$  als durch  $\alpha_v\beta_3$  vermittelt wird. Während der Komplex-spezifische monoklonale Antikörper AP-2 (Anti- $\alpha_{IIb}\beta_3$ ; Pidar et al., J. Biol. Chem. 258, 12582-12587 (1983)) die Adhäsion von ADP-aktivierten Blutplättchen an Fisp12/mCTGF und Cyr61 vollkommen hemmte, wurde bei LM609 (Anti- $\alpha_v\beta_3$ ; Cheresh et al., J. Biol. Chem. 262, 17703-17711 (1987)) oder bei normalem Maus-IgG keine Hemmung beobachtet. In Kontrollproben wurde die Adhäsion von ADP-aktivierten Blutplättchen an Fibrinogen ebenfalls vollständig durch EDTA, RGDS, Echistatin,  $\text{H}_{12}$  oder AP-2 gehemmt, nicht aber durch RGES oder LM609. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Blutplättchen-Adhäsion an diese Proteine durch Wechselwirkung mit aktiviertem Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  vermittelt wird.

**[0318]** Ein Festphasen-Bindungstest zum Nachweis der Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen zeigte, dass  $\alpha_{IIb}\beta_3$  direkt an Fisp12/mCTGF und Cyr61 bindet. In diesen Versuchen wurden aktiviertes und nichtaktiviertes  $\alpha_{IIb}\beta_3$  von Blutplättchen-Lysaten gereinigt. Aktiviertes  $\alpha_{IIb}\beta_3$  wurde wie beschrieben durch RGD-Affinitätschromatographie gereinigt (Knezevic et al., J. Biol. Chem. 271, 16416-16421 (1996)). Kurz gesagt wurden alte menschliche Blutplättchen durch differenzielle Zentrifugation isoliert und in Lysepuffer (10 mM HEPES, pH 7,4, 0,15 M NaCl mit 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 100  $\mu\text{M}$  Leupeptin, 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid, 10 mM Ethylmaleinimid und 50 mM Octylglucosid) solubilisiert. Das Octylglucosid-Extrakt wurde über Nacht bei 4°C mit 1 ml GRGDSPK-gekoppelter Sepharose 4B inkubiert. Nach dem Waschen mit 15 ml Säulenpuffer (der gleiche wie der Lysepuffer, mit der Ausnahme, dass er 25 mM Octylglucosid enthält) wurde gebundenes  $\alpha_{IIb}\beta_3$  mit 1,7 mM  $\text{H}_{12}$  (2 ml) in Säulenpuffer eluiert. Das  $\text{H}_{12}$ -Eluat wurde auf eine Säule Sephacryl S-300 High Resolution (1,5  $\times$  95 cm) aufgetragen, und  $\alpha_{IIb}\beta_3$  wurde mit 10 mM HEPES, pH 7,4, 0,15 M NaCl, 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1 mM  $\text{MgCl}_2$  und 25 mM Octylglucosid eluiert.

**[0319]** Nichtaktiviertes  $\alpha_{IIb}\beta_3$  wurde durch das Verfahren gemäß Fitzgerald et al., Anal. Biochem. 151, 169-177 (1985), mit leichten Modifikationen isoliert. Die Durchflussfraktion der GRGDSPK-Sepharose-Säule wurde auf eine Concanavalin-A-Sepharose-4B-Säule (1 × 20 cm) aufgetragen. Ungebundene Proteine wurden mit 50 ml Säulenpuffer gewaschen, und gebundenes  $\alpha_{IIb}\beta_3$  wurde dann mit 100 mM Mannose, die in Säulenpuffer gelöst war, eluiert.  $\alpha_{IIb}\beta_3$  enthaltende Fraktionen wurden auf einer Säule Sephacryl S-300 High Resolution weiter gereinigt.

**[0320]** Um den Festphasen-Bindungstest durchzuführen, wurde gereinigtes  $\alpha_{IIb}\beta_3$  zu Wells zugesetzt, die mit entweder Cyr61 oder Fisp12 (mCTGF) beschichtet waren, und zwar in Gegenwart oder Abwesenheit von Inhibitoren, und die Bindung wurde 3 Stunden lang bei 37°C fortschreiten gelassen. Ungebundene Rezeptoren wurden entfernt, und die Wells wurden zweimal mit HEPES-Tyrode-Puffer gewaschen. Die Bindung von gereinigtem  $\alpha_{IIb}\beta_3$  an Cyr61 oder Fisp12/mCTGF, das auf Mikrotiter-Wells immobilisiert war, wurde mit  $^{125}$ I-mAb15 detektiert.

**[0321]** Aktiviertes und nichtaktiviertes  $\alpha_{IIb}\beta_3$  waren in einer SDS-PAGE-Analyse bei Detektion durch Silberfärbung nicht unterscheidbar. Aktiviertes  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , nicht aber der nichtaktivierte Rezeptor, war in der Lage, an immobilisiertes Fibrinogen zu binden. Desgleichen wurde eine stärkere Bindung von aktiviertem  $\alpha_{IIb}\beta_3$  an Fisp12/mCTGF und Cyr61 beobachtet als von nichtaktiviertem. Im Gegensatz dazu waren die Hintergrund-Bindungen von aktiviertem und nichtaktiviertem  $\alpha_{IIb}\beta_3$  an Kontroll-Wells, die mit BSA beschichtet waren, ähnlich. Somit hafteten zwar aktivierte, nicht aber nichtaktivierte, Blutplättchen an Cyr61 und Fisp12/mCTGF.

**[0322]** Um die Wechselwirkung zwischen  $\alpha_{IIb}\beta_3$  und Fisp12/mCTGF bzw. Cyr61 näher zu charakterisieren, wurden Bindungs-Isothermen für verschiedene Konzentrationen von RGD-affinitätsgereinigtem  $\alpha_{IIb}\beta_3$  bestimmt. Diese Bindungs-Isothermen zeigten, dass die dosisabhängige Bindung von aktiviertem  $\alpha_{IIb}\beta_3$  an Fisp12/mCTGF und Cyr61 mit einer Halbsättigung, die bei 15 nM bzw. 25 nM  $\alpha_{IIb}\beta_3$  stattfand, sättigbar war. Wiederum war keine signifikante Bindung von  $\alpha_{IIb}\beta_3$  an BSA-beschichtete Kontroll-Wells erkennbar. Um die Spezifität der Wechselwirkung aufzuzeigen, wurden Inhibierungsstudien durchgeführt. Wie zu erwarten wurde die Bindung von aktiviertem  $\alpha_{IIb}\beta_3$  an Fisp12/mCTGF und Cyr61 spezifisch durch RGDS blockiert, nicht aber durch RGEs. Außerdem hemmten auch Echistatin und das  $H_{12}$ -Peptid die  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Bindung an diese Proteine wirksam. Diese Erkenntnisse stimmten mit den Ergebnissen überein, die in den Blutplättchen-Adhäsionstests erhalten wurden. Zusammengefasst zeigen diese funktionalen und biochemischen Daten, dass aktiviertes Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  der Rezeptor ist, der die aktivierungsabhängige Blutplättchen-Adhäsion an Cyr61 und Fisp12/mCTGF vermittelt.

**[0323]** Somit kann ein Verfahren zum Screenen auf Modulatoren der Wundheilung folgende Schritte umfassen: (a) Kontaktieren eines ersten aktivierten Blutplättchens mit einem Polypeptid der CCN-Familie, wie z.B. Cyr61, und einem vermutlichen Modulator; (b) weiteres Kontaktieren eines zweiten aktivierten Blutplättchens mit dem Polypeptid aus Schritt (a); (c) Messen der Bindung des ersten aktivierten Blutplättchens an das Polypeptid; (d) Messen der Bindung des zweiten aktivierten Blutplättchens an das Polypeptid; und (e) Vergleichen der Bindungsmessungen aus Schritt (d) und (e), wodurch ein Modulator von Wundheilung identifiziert wird. Vorzugsweise umfasst die Wundheilung die Beteiligung von Blutplättchen-Bindung im Prozess der Blutgerinnung. Auch bevorzugt sind Blutplättchen, die das  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrin präsentieren.

**[0324]** Neben den oben beschriebenen Bindungseigenschaften von Mitgliedern der CCN-Familie von Proteinen haben Antikörper-Inhibierungsstudien mit Anti- $\alpha_M$ - und Anti- $\beta_3$ -Antikörpern gezeigt, dass Cyr61 durch noch ein anderes Integrin, das  $\alpha_M\beta_2$ -Integrin, an Makrophagen bindet. Ausgehend von diesen Ergebnissen ist zu erwarten, dass Säugetier-CCN-Proteine, wie z.B. menschliches oder Maus-Cyr61, an die Makrophagen von Säugetieren binden. Außerdem ist zu erwarten, dass Cyr61 die Migration von Makrophagen fördert und so eine Rolle beim Anlocken und Festhalten von Makrophagen an der Wundstelle spielt. Folglich ist zu erwarten, dass Cyr61 eine Rolle in Entzündungsreaktionen von Säugetieren spielt, und eine Modulation der Cyr61-Aktivität beeinflusst wahrscheinlich die Entzündungsreaktionen.

**[0325]** Ein Verfahren zum Screenen auf Modulatoren von Makrophagen-Adhäsion kann folgende Schritte umfassen: (a) Kontaktieren eines ersten Makrophagen mit einem Polypeptid der CCN-Familie, wie z.B. Cyr61, und einem vermutlichen Modulator; (b) weiteres Kontaktieren eines zweiten Makrophagen mit dem Polypeptid aus Schritt (a); (c) Messen der Bindung des ersten Makrophagen an das Polypeptid; (d) Messen der Bindung des zweiten Makrophagen an das Polypeptid; und (e) Vergleichen der Bindungsmessungen aus Schritt (d) und (e), wodurch ein Modulator von Makrophagen-Adhäsion identifiziert wird.

## Peptid-Modulatoren der ECM-Signalmolekül-Aktivität

**[0326]** Screening-Tests für Modulatoren von Zelladhäsion sind darauf ausgerichtet, Modulatoren (z.B. Inhibitoren oder Aktivatoren) von ECM-Signalmolekül-Aktivitäten, wie z.B. Cyr61-Aktivitäten, zu identifizieren, die an Angiogenese, Chondrogenese, Onkogenese, Zelladhäsion, Zellmigration oder Zellproliferation beteiligt sind. Bei der Entwicklung eines Screening-Tests für Modulatoren von Zelladhäsion wurden Peptid-Modulatoren wie in Beispiel 12 beschrieben konzipiert. Genauer gesagt wurden Cyr61-Peptid-Fragmente mit der Erwartung konzipiert, dass solche Peptide Cyr61-Bindung an einen Integrin-Rezeptor, wie z.B. das  $\alpha_6\beta_1$ -Integrin, modulieren würden.

**[0327]** Um mit dem in Beispiel 12 beschriebenen Ansatz zum Peptid-Entwurf leichter zum Ziel zu kommen, wurden Versuche durchgeführt, um die Position von Domänen genauer zu bestimmen, die an einer oder mehreren Aktivitäten von Cyr61, z.B. Angiogeneseaktivitäten, beteiligt sind. Zuerst wurde eine Deletion von Maus-cyr61 durchgeführt, um Domäne IV des kodierten Cyr61 zu entfernen (entspricht den Aminosäuren 282-381 der Seq.-ID Nr. 4). Für eine allgemeine Beschreibung der Cyr61-Domänen 1-4 siehe Lau et al., Exp. Cell Research 248, 44-57 (1999), als Gesamtes durch Verweis hierin aufgenommen. Das Deletionskonstrukt, das mithilfe eines herkömmlichen Baculovirus-Systems kloniert worden war, wurde exprimiert und einem Ratten-Hornhaut-Implantationstest unterzogen, wie er in Beispiel 19 allgemein beschrieben ist, und die Ergebnisse zeigten, dass das trunkierte Polypeptid Angiogenese induzierte. Weiters wurde das trunkierte Polypeptid einem In-vitro-Endothelzellen-Migrationstest unterzogen, wie er in Beispiel 15 beschrieben ist, und das Polypeptid mit den Cyr61-Domänen I, II und III induzierte Zellmigration.

**[0328]** Um an Angiogenese, einschließlich Endothelzellen-Migration, beteiligte Domänen genauer zu lokalisieren, wurden die für die Domänen I, II und III von Cyr61 kodierenden Regionen separat an eine für Glutathion-S-Transferase (GST) kodierende Sequenz fusioniert, wiederum unter Einsatz herkömmlicher Technologien. Die einzelnen Fusionskonstrukte wurden in Bakterienwirte eingebracht, exprimiert und mit Glutathion-Säulen gereinigt, wobei herkömmliche Techniken verwendet wurden. Zelladhäsionstests unter Verwendung von Endothelzellen und Fibroblasten zeigten, dass bei einer Isolation nur Domäne III (die den Aminosäuren 212-281 der Seq.-ID Nr. 4 entspricht) Zelladhäsion unterstützte, und das Fusionspolypeptid, das diese Domäne enthielt, unterstützte bei einer Immobilisierung die Adhäsion von ruhenden Endothelzellen und Fibroblasten.

**[0329]** Um die relevante Domäne noch genauer zu lokalisieren, wurden mehrere überlappende Peptide synthetisiert. Die Peptide, die jeweils eine Sequenz aufwiesen, die in einer der Seq.-ID Nr. 33-38 dargestellt ist, weisen signifikante Ähnlichkeit zu einem ECM-Signalmolekül, wie z.B. Maus-Cyr61 (Seq.-ID Nr. 2) oder menschlichem Cyr61 (Seq.-ID Nr. 4), auf. Diese Peptide wurden dann separat auf ihre Fähigkeit getestet, Cyr61-Adhäsion an Endothelzellen oder Fibroblasten zu hemmen. Peptide wurden wie oben beschrieben separat in unterschiedlichen Konzentrationen zu Cyr61-beschichteten Wells zugesetzt, die Endothelzellen oder Fibroblasten enthielten. Das als TSP1 bezeichnete Peptid (Seq.-ID Nr. 33) hemmte Cyr61-Adhäsion an Endothelzellen oder Fibroblasten in Konzentrationen von 25  $\mu\text{M}$  oder mehr. Keines der anderen getesteten Peptide (Seq.-ID Nr. 34-38) wiesen eine Hemmung von Zelladhäsion an Cyr61 auf.

**[0330]** Um zu bestimmen, ob TSP1 Cyr61-Bindung an  $\alpha_5\beta_3$  oder  $\alpha_6\beta_1$ , zwei Integrine auf Endothelzellen, die Cyr61 binden, selektiv hemmte, wurden Blockierungsstudien mit spezifischen monoklonalen Antikörpern durchgeführt. Diese Studien umfassten den separaten Zusatz von monoklonalem Antikörper GoH3 ( $\alpha_6$ -spezifisch, einschließlich  $\alpha_6\beta_1$ ; siehe Beispiel 29) oder LM609 ( $\alpha_5\beta_3$ -spezifisch; siehe Beispiel 29) zu Zellen, bevor das Gemisch in Gegenwart oder Abwesenheit des zu untersuchenden Peptids zu Cyr61-beschichteten Wells zugesetzt wurde. Die Ergebnisse zeigten, dass TSP1 Cyr61-Bindung an  $\alpha_6\beta_1$ -Integrin, einen Haupt-Cyr61-Rezeptor, der in ruhenden, oder nichtaktivierten, Endothelzellen und in Fibroblasten aktiv ist, hemmte. TSP1 hemmte keine Cyr61-Bindung an  $\alpha_5\beta_3$ , einen Haupt-Cyr61-Rezeptor in aktivierten Endothelzellen.

**[0331]** Endothelzellen, die mit Cyr61 wechselwirken, erfordern Integrin  $\alpha_v\beta_3$  für die Zellmigration und das Zellüberleben. Um jedoch in vitro Kanälchen in einem Matrigel zu bilden, ist Integrin  $\alpha_6\beta_1$  erforderlich. Somit wurde die Fähigkeit von TSP1, die Bildung von Kanälchen in vitro zu hemmen, unter Verwendung eines Matrigel-Tests, wie er in Beispiel 15 beschrieben ist (und auf dem Gebiet der Erfindung bekannt ist, Davis et al., Exp. Cell Research 216, 113-123 (1995), als Gesamtes durch Verweis hierin aufgenommen), durchgeführt. Wie zu erwarten hemmte TSP1 die Bildung von Kanälchen in dem Matrigel-Test.

**[0332]** Um zu bestätigen, dass das TSP1-Peptid Cyr61-Aktivität durch direkte Wechselwirkung mit dem

$\alpha_6\beta_1$ -Ingrin hemmte, wurden TSP1 und die Peptide, die die Seq.-ID Nr. 34-38 aufweisen, im oben genannten Zelladhäsionsstest in Abwesenheit von immobilisiertem Cyr61 eingesetzt. In diesen Tests wurden Wells mit einem der Peptide beschichtet, und die immobilisierten Peptide wurden dann separat entweder Endothelzellen (ruhenden oder aktivierten) oder Fibroblasten ausgesetzt. Die Ergebnisse zeigten, dass TSP1 von selbst die Adhäsion von Endothelzellen und Fibroblasten unterstützte. Keines der anderen getesteten Peptide (mit den Seq.-ID Nr. 34-38) unterstützte die Zelladhäsion in diesen Tests. Es ist jedoch zu erwarten, dass Peptide, welche Sequenzen aus der Domäne II (von-Willebrand-Faktor-Domäne) von Cyr61 umfassen, die Wechselwirkung zwischen Cyr61 und dem  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Rezeptor hemmen, wodurch die Beteiligung von Endothelzellen im Angiogenese-Prozess gehemmt wird. Es ist zu erwarten, dass solche Peptide zumindest 95 %, vorzugsweise 98 %, Ähnlichkeit mit einer Subsequenz der Sequenz aufweisen, die von Aminosäure 93 bis Aminosäure 211 der Seq.-ID Nr. 4 reicht, unter Einsatz des Vergleichsalgorithmus von Altschul et al., der für BLAST-Suchen in der GenBank-Nucleotid-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) mit den vorgegebenen Standardeinstellungen eingesetzt wird. Es ist zu erwarten, dass Aktivität aufweisende Peptide zumindest 7 Aminosäuren lang sind, wobei es keine Obergrenze gibt, obwohl die meisten wirtschaftlichen Peptide wahrscheinlich nicht mehr als 20 Aminosäuren aufweisen.

**[0333]** Dieses Beispiel zeigt, dass Peptid-Modulatoren von ECM-Signalmolekülen, wie z.B. Maus- und menschliches Cyr61, unter Einsatz der oben beschriebenen In-vitro-Angiogenese- und In-vitro-Zelladhäsionstests identifiziert werden können. Die Modulatoren selbst haben sich als vielversprechend für Therapeutika für Erkrankungen oder Leiden in Zusammenhang mit Angiogenese, Chondrogenese und Zelladhäsion sowie für Onkogenese und Zellmigration und Zellproliferation erwiesen, und jene, bei denen es sich um Cyr61-Fragmente, die aus Seq.-ID Nr. 33 oder einer Aminosäuresequenz bestehen, die zu zumindest 95 % ähnlich zu Seq.-ID Nr. 33 ist, oder um Antikörper handelt, die spezifisch an ein solches Cyr61-Fragment binden, stellen einen weiteren Aspekt der Erfindung dar.

**[0334]** Fachleute auf dem Gebiet der Erfindung können anhand der in dieser Anmeldung gebrachten Informationen leicht noch andere Peptide mit Cyr61-Modulationsaktivität identifizieren, indem Kandidatenpeptide mit Sequenzähnlichkeit zu einem ECM-Signalmolekül, wie z.B. Cyr61, entworfen werden. Sequenzvariation wird geleitet durch Wissen um konservative Aminosäuren-Substitution, wie oben beschrieben, und die Peptidlänge kann zwischen etwa 8-50 Aminosäureresten variieren. Außerdem können Peptid-Derivate (z.B. glykosyliert, PEGyliert, phosphoryliert) eingesetzt werden, wie auf dem Gebiet der Erfindung bekannt ist.

**[0335]** Bei der Umsetzung der Erfindung können Fachleute auf dem Gebiet der Erfindung zahlreiche Modifikationen und Variationen vornehmen. Folglich dienen die Beispiele nicht zur Einschränkung des Schutzbereichs der Erfindung, der in den beiliegenden Ansprüchen dargelegt ist.



## SEQUENZPROTOKOLL

&lt;110&gt; LAU, Lester F., YEUNG, Cho-Yau, und GREENSPAN, Jeffrey A.

&lt;120&gt; CYR61-ZUSAMMENSETZUNGEN UND VERFAHREN

&lt;130&gt; 28758/36753

&lt;140&gt;

&lt;141&gt;

&lt;160&gt; 38

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.0

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 1480

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (180) .. (1316)

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Maus-cyr61-cDNA-Kodiersequenz

&lt;400&gt; 1

```

cgagagcgcc ccagagaagc gcctgcaatc tctgcgcctc ctccgccagc acctcgagag 60
aaggacaccc gccgcctcgg ccctgcctc accgcactcc gggcgcattt gatcccgtg 120
ctcgccggct tgttggttct gtgtgcgcgc gctgcctccg gttcctcctg cgcgccaca 179
atg agc tcc agc acc ttc agg acg ctc gct gtc gcc gtc acc ctt ctc 227
Met Ser Ser Ser Thr Phe Arg Thr Leu Ala Val Ala Val Thr Leu Leu
  1          5          10          15
cac ttg acc aga ctg gcg ctc tcc acc tgc ccc gcc gcc tgc cac tgc 275
His Leu Thr Arg Leu Ala Leu Ser Thr Cys Pro Ala Ala Cys His Cys
          20          25          30
cct ctg gag gca ccc aag tgc gcc ccg gga gtc ggg ttg gtc cgg gac 323
Pro Leu Glu Ala Pro Lys Cys Ala Pro Gly Val Gly Leu Val Arg Asp
          35          40          45
ggc tgc ggc tgc tgt aag gtc tgc gct aaa caa ctc aac gag gac tgc 371
Gly Cys Gly Cys Cys Lys Val Cys Ala Lys Gln Leu Asn Glu Asp Cys
          50          55          60
agc aaa act cag ccc tgc gac cac acc aag ggg ttg gaa tgc aat ttc 419
Ser Lys Thr Gln Pro Cys Asp His Thr Lys Gly Leu Glu Cys Asn Phe
          65          70          75          80
ggc gcc agc tcc acc gct ctg aaa ggg atc tgc aga gct cag tca gaa 467
Gly Ala Ser Ser Thr Ala Leu Lys Gly Ile Cys Arg Ala Gln Ser Glu
          85          90          95
ggc aga ccc tgt gaa tat aac tcc aga atc tac caa aac ggg gaa agc 515
Gly Arg Pro Cys Glu Tyr Asn Ser Arg Ile Tyr Gln Asn Gly Glu Ser
          100          105          110
ttc cag ccc aac tgt aaa cac cag tgc aca tgt att gat ggc gcc gtg 563

```

Phe	Gln	Pro	Asn	Cys	Lys	His	Gln	Cys	Thr	Cys	Ile	Asp	Gly	Ala	Val		
	115						120					125					
ggc	tgc	att	cct	ctg	tgt	ccc	caa	gaa	ctg	tct	ctc	ccc	aat	ctg	ggc	611	
Gly	Cys	Ile	Pro	Leu	Cys	Pro	Gln	Glu	Leu	Ser	Leu	Pro	Asn	Leu	Gly		
	130					135					140						
tgt	ccc	aac	ccc	cgg	ctg	gtg	aaa	gtc	agc	ggg	cag	tgc	tgt	gaa	gag	659	
Cys	Pro	Asn	Pro	Arg	Leu	Val	Lys	Val	Ser	Gly	Gln	Cys	Cys	Glu	Glu		
145				150					155					160			
tgg	gtt	tgt	gat	gaa	gac	agc	att	aag	gac	tcc	ctg	gac	gac	cag	gat	707	
Trp	Val	Cys	Asp	Glu	Asp	Ser	Ile	Lys	Asp	Ser	Leu	Asp	Asp	Gln	Asp		
			165						170					175			
gac	ctc	ctc	gga	ctc	gat	gcc	tcg	gag	gtg	gag	tta	acg	aga	aac	aat	755	
Asp	Leu	Leu	Gly	Leu	Asp	Ala	Ser	Glu	Val	Glu	Leu	Thr	Arg	Asn	Asn		
			180					185					190				
gag	tta	atc	gca	att	gga	aaa	ggc	agc	tca	ctg	aag	agg	ctt	cct	gtc	803	
Glu	Leu	Ile	Ala	Ile	Gly	Lys	Gly	Ser	Ser	Leu	Lys	Arg	Leu	Pro	Val		
	195						200					205					
ttt	ggc	acc	gaa	cgg	cga	gtt	ctt	ttc	aac	cct	ctg	cac	gcc	cat	ggc	851	
Phe	Gly	Thr	Glu	Pro	Arg	Val	Leu	Phe	Asn	Pro	Leu	His	Ala	His	Gly		
	210					215					220						
cag	aaa	tgc	atc	gtt	cag	acc	acg	tct	tgg	tcc	cag	tgc	tcc	aag	agc	899	
Gln	Lys	Cys	Ile	Val	Gln	Thr	Thr	Ser	Trp	Ser	Gln	Cys	Ser	Lys	Ser		
225					230					235					240		
tgc	gga	act	ggc	atc	tcc	aca	cga	gtt	acc	aat	gac	aac	cca	gag	tgc	947	
Cys	Gly	Thr	Gly	Ile	Ser	Thr	Arg	Val	Thr	Asn	Asp	Asn	Pro	Glu	Cys		
			245					250						255			
cgc	ctg	gtg	aaa	gag	acc	cgg	atc	tgt	gaa	gtg	cgt	cct	tgt	gga	caa	995	
Arg	Leu	Val	Lys	Glu	Thr	Arg	Ile	Cys	Glu	Val	Arg	Pro	Cys	Gly	Gln		
			260				265						270				
cca	gtg	tac	agc	agc	cta	aaa	aag	ggc	aag	aaa	tgc	agc	aag	acc	aag	1043	
Pro	Val	Tyr	Ser	Ser	Leu	Lys	Lys	Gly	Lys	Lys	Cys	Ser	Lys	Thr	Lys		
		275					280					285					
aaa	tcc	cca	gaa	cca	gtc	aga	ttt	act	tat	gca	gga	tgc	tcc	agt	gtc	1091	
Lys	Ser	Pro	Glu	Pro	Val	Arg	Phe	Thr	Tyr	Ala	Gly	Cys	Ser	Ser	Val		
	290					295					300						
aag	aaa	tac	cgg	ccc	aaa	tac	tgc	ggc	tcc	tgc	gta	gat	ggc	cgg	tgc	1139	
Lys	Lys	Tyr	Arg	Pro	Lys	Tyr	Cys	Gly	Ser	Cys	Val	Asp	Gly	Arg	Cys		
305					310				315						320		
tgc	aca	cct	ctg	cag	acc	aga	act	gtg	aag	atg	cgg	ttc	cga	tgc	gaa	1187	
Cys	Thr	Pro	Leu	Gln	Thr	Arg	Thr	Val	Lys	Met	Arg	Phe	Arg	Cys	Glu		
			325					330						335			
gat	gga	gag	atg	ttt	tcc	aag	aat	gtc	atg	atg	atc	cag	tcc	tgc	aaa	1235	
Asp	Gly	Glu	Met	Phe	Ser	Lys	Asn	Val	Met	Met	Ile	Gln	Ser	Cys	Lys		
			340					345					350				
tgt	aac	tac	aac	tgc	cgg	cat	ccc	aac	gag	gca	tcg	ttc	cga	ctg	tac	1283	

Cys Asn Tyr Asn Cys Pro His Pro Asn Glu Ala Ser Phe Arg Leu Tyr  
 355 360 365

agc cta ttc aat gac atc cac aag ttc agg gac taagtgcctc caggggttcct 1336  
 Ser Leu Phe Asn Asp Ile His Lys Phe Arg Asp  
 370 375

agtgtgggct ggacagagga gaagcgcaag catcatggag acgtgggtgg gcggaggatg 1396  
 aatgggtgcct tgctcattct tgagtagcat taggggtattt caaaactgcc aaggggctga 1456  
 tgtggacgga cagcagcgca gccg 1480

<210> 2

<211> 379

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

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

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

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 1418

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (124) .. (1266)

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Human-cyr61-cDNA-Kodiersequenz

&lt;400&gt; 3

gggcgggccc accgcgacac cgcgccgccca ccccgacccc gctgcgcacg gcctgtccgc 60  
 tgcacaccag cttgttggcg tcttcgctgc cgcgctcgcc ccgggctact cctgcgcgcc 120  
 aca atg agc tcc cgc atc gcc agg gcg ctc gcc tta gtc gtc acc ctt 168  
   Met Ser Ser Arg Ile Ala Arg Ala Leu Ala Leu Val Val Thr Leu 15  
 ctc cac ttg acc agg ctg gcg ctc tcc acc tgc ccc gct gcc tgc cac 216  
 Leu His Leu Thr Arg Leu Ala Leu Ser Thr Cys Pro Ala Ala Cys His 30  
 tgc ccc ctg gag gcg ccc aag tgc gcg ccg gga gtc ggg ctg gtc cgg 264  
 Cys Pro Leu Glu Ala Pro Lys Cys Ala Pro Gly Val Gly Leu Val Arg 45  
 gac ggc tgc ggc tgc tgt aag gtc tgc gcc aag cag ctc aac gag gac 312  
 Asp Gly Cys Gly Cys Cys Lys Val Cys Ala Lys Gln Leu Asn Glu Asp 60  
                                  50                      55                      60

tgc agc aaa acg cag ccc tgc gac cac acc aag ggg ctg gaa tgc aac	360
Cys Ser Lys Thr Gln Pro Cys Asp His Thr Lys Gly Leu Glu Cys Asn	
65 70 75	
ttc ggc gcc agc tcc acc gct ctg aag ggg atc tgc aga gct cag tca	408
Phe Gly Ala Ser Ser Thr Ala Leu Lys Gly Ile Cys Arg Ala Gln Ser	
80 85 90 95	
gag ggc aga ccc tgt gaa tat aac tcc aga atc tac caa aac ggg gaa	456
Glu Gly Arg Pro Cys Glu Tyr Asn Ser Arg Ile Tyr Gln Asn Gly Glu	
100 105 110	
agt ttc cag ccc aac tgt caa cat cag tgc aca tgt att gat ggc gcc	504
Ser Phe Gln Pro Asn Cys Gln His Gln Cys Thr Cys Ile Asp Gly Ala	
115 120 125	
gtg ggc tgc att cct ctg tgt ccc caa gaa cta tct ctc ccc aac ttg	552
Val Gly Cys Ile Pro Leu Cys Pro Gln Glu Leu Ser Leu Pro Asn Leu	
130 135 140	
ggc tgt ccc aac cct cgg ctg gtc aaa gtt acc ggg cag tgc tgc gag	600
Gly Cys Pro Asn Pro Arg Leu Val Lys Val Thr Gly Gln Cys Cys Glu	
145 150 155	
gag tgg gtc tgt gac gag gat agt atc aag gac ccc atg gag gac cag	648
Glu Trp Val Cys Asp Glu Asp Ser Ile Lys Asp Pro Met Glu Asp Gln	
160 165 170 175	
gac ggc ctc ctt ggc aag gag ctg gga ttc gat gcc tcc gag gtg gag	696
Asp Gly Leu Leu Gly Lys Glu Leu Gly Phe Asp Ala Ser Glu Val Glu	
180 185 190	
ttg acg aga aac aat gaa ttg att gca gtt gga aaa ggc aga tca ctg	744
Leu Thr Arg Asn Asn Glu Leu Ile Ala Val Gly Lys Gly Arg Ser Leu	
195 200 205	
aag cgg ctc cct gtt ttt gga atg gag cct cgc atc cta tac aac cct	792
Lys Arg Leu Pro Val Phe Gly Met Glu Pro Arg Ile Leu Tyr Asn Pro	
210 215 220	
tta caa ggc cag aaa tgt att gtt caa aca act tca tgg tcc cag tgc	840
Leu Gln Gly Gln Lys Cys Ile Val Gln Thr Thr Ser Trp Ser Gln Cys	
225 230 235	
tca aag acc tgt gga act ggt atc tcc aca cga gtt acc aat gac aac	888
Ser Lys Thr Cys Gly Thr Gly Ile Ser Thr Arg Val Thr Asn Asp Asn	
240 245 250 255	
cct gag tgc cgc ctt gtg aaa gaa acc cgg att tgt gag gtg cgg cct	936
Pro Glu Cys Arg Leu Val Lys Glu Thr Arg Ile Cys Glu Val Arg Pro	
260 265 270	
tgt gga cag cca gtg tac agc agc ctg aaa aag ggc aag aaa tgc agc	984
Cys Gly Gln Pro Val Tyr Ser Ser Leu Lys Lys Gly Lys Lys Cys Ser	
275 280 285	
aag acc aag aaa tcc ccc gaa cca gtc agg ttt act tac gct gga tgt	1032
Lys Thr Lys Lys Ser Pro Glu Pro Val Arg Phe Thr Tyr Ala Gly Cys	
290 295 300	
ttg agt gtg aag aaa tac cgg ccc aag tac tgc ggt tcc tgc gtg gac	1080
Leu Ser Val Lys Lys Tyr Arg Pro Lys Tyr Cys Gly Ser Cys Val Asp	

305

310

315

ggc cga tgc tgc acg ccc cag ctg acc agg act gtg aag atg cgg ttc 1128  
 Gly Arg Cys Cys Thr Pro Gln Leu Thr Arg Thr Val Lys Met Arg Phe  
 320 325 330 335

cgc tgc gaa gat ggg gag aca ttt tcc aag aac gtc atg atg atc cag 1176  
 Arg Cys Glu Asp Gly Glu Thr Phe Ser Lys Asn Val Met Met Ile Gln  
 340 345 350

tcc tgc aaa tgc aac tac aac tgc ccg cat gcc aat gaa gca gcg ttt 1224  
 Ser Cys Lys Cys Asn Tyr Asn Cys Pro His Ala Asn Glu Ala Ala Phe  
 355 360 365

ccc ttc tac agg ctg ttc aat gac att cac aaa ttt agg gac 1266  
 Pro Phe Tyr Arg Leu Phe Asn Asp Ile His Lys Phe Arg Asp  
 370 375 380

taaatgctac ctgggtttcc agggcacacc tagacaaaca agggagaaga gtgtcagaat 1326

cagaatcatg gagaaaatgg gcgggggtgg tgtgggtgat gggactcatt gtagaaagga 1386

agcctttctca ttcttgagga gcattaaggt at 1418

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 381

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 4

Met Ser Ser Arg Ile Ala Arg Ala Leu Ala Leu Val Val Thr Leu Leu  
 1 5 10 15

His Leu Thr Arg Leu Ala Leu Ser Thr Cys Pro Ala Ala Cys His Cys  
 20 25 30

Pro Leu Glu Ala Pro Lys Cys Ala Pro Gly Val Gly Leu Val Arg Asp  
 35 40 45

Gly Cys Gly Cys Cys Lys Val Cys Ala Lys Gln Leu Asn Glu Asp Cys  
 50 55 60

Ser Lys Thr Gln Pro Cys Asp His Thr Lys Gly Leu Glu Cys Asn Phe  
 65 70 75 80

Gly Ala Ser Ser Thr Ala Leu Lys Gly Ile Cys Arg Ala Gln Ser Glu  
 85 90 95

Gly Arg Pro Cys Glu Tyr Asn Ser Arg Ile Tyr Gln Asn Gly Glu Ser  
 100 105 110

Phe Gln Pro Asn Cys Gln His Gln Cys Thr Cys Ile Asp Gly Ala Val  
 115 120 125

Gly Cys Ile Pro Leu Cys Pro Gln Glu Leu Ser Leu Pro Asn Leu Gly  
 130 135 140

Cys Pro Asn Pro Arg Leu Val Lys Val Thr Gly Gln Cys Cys Glu Glu  
 145 150 155 160

Trp	Val	Cys	Asp	Glu	Asp	Ser	Ile	Lys	Asp	Pro	Met	Glu	Asp	Gln	Asp	165	170	175
Gly	Leu	Leu	Gly	Lys	Glu	Leu	Gly	Phe	Asp	Ala	Ser	Glu	Val	Glu	Leu	180	185	190
Thr	Arg	Asn	Asn	Glu	Leu	Ile	Ala	Val	Gly	Lys	Gly	Arg	Ser	Leu	Lys	195	200	205
Arg	Leu	Pro	Val	Phe	Gly	Met	Glu	Pro	Arg	Ile	Leu	Tyr	Asn	Pro	Leu	210	215	220
Gln	Gly	Gln	Lys	Cys	Ile	Val	Gln	Thr	Thr	Ser	Trp	Ser	Gln	Cys	Ser	225	230	235
Lys	Thr	Cys	Gly	Thr	Gly	Ile	Ser	Thr	Arg	Val	Thr	Asn	Asp	Asn	Pro	245	250	255
Glu	Cys	Arg	Leu	Val	Lys	Glu	Thr	Arg	Ile	Cys	Glu	Val	Arg	Pro	Cys	260	265	270
Gly	Gln	Pro	Val	Tyr	Ser	Ser	Leu	Lys	Lys	Gly	Lys	Lys	Cys	Ser	Lys	275	280	285
Thr	Lys	Lys	Ser	Pro	Glu	Pro	Val	Arg	Phe	Thr	Tyr	Ala	Gly	Cys	Leu	290	295	300
Ser	Val	Lys	Lys	Tyr	Arg	Pro	Lys	Tyr	Cys	Gly	Ser	Cys	Val	Asp	Gly	305	310	315
Arg	Cys	Cys	Thr	Pro	Gln	Leu	Thr	Arg	Thr	Val	Lys	Met	Arg	Phe	Arg	325	330	335
Cys	Glu	Asp	Gly	Glu	Thr	Phe	Ser	Lys	Asn	Val	Met	Met	Ile	Gln	Ser	340	345	350
Cys	Lys	Cys	Asn	Tyr	Asn	Cys	Pro	His	Ala	Asn	Glu	Ala	Ala	Phe	Pro	355	360	365
Phe	Tyr	Arg	Leu	Phe	Asn	Asp	Ile	His	Lys	Phe	Arg	Asp				370	375	380

<210> 5

<211> 2267

<212> DNA

<213> Mus musculus

**<220>**

<223> Fisp12-cDNA--Kodiersequenz

**<220>**

<221> CDS

**<222> (138) .. (1191)**

<400> 5

gaattccgcc gacaaccca gacgccaccg cctggagcgt ccagacacca acctccgccc 60  
ctgtccgaat ccaggctcca gccgcgcctc tcgtcgcctc tgcaccctgc tgtgcatect 120  
cctaccgcgt cccgatac atg ctc gcc tcc gtc gca ggt ccc atc agc ctc 170

Met Leu Ala Ser Val Ala Gly Pro Ile Ser Leu																
1				5				10								
gcc	ttg	gtg	ctc	ctc	gcc	ctc	tgc	acc	cgg	cct	gct	acg	ggc	cag	gac	218
Ala	Leu	Val	Leu	Leu	Ala	Leu	Cys	Thr	Arg	Pro	Ala	Thr	Gly	Gln	Asp	
			15			20						25				
tgc	agc	gcg	caa	tgt	cag	tgc	gca	gcc	gaa	gca	gcg	ccg	cac	tgc	ccc	266
Cys	Ser	Ala	Gln	Cys	Gln	Cys	Ala	Ala	Glu	Ala	Ala	Pro	His	Cys	Pro	
			30			35						40				
gcc	ggc	gtg	agc	ctg	gtg	ctg	gac	ggc	tgc	ggc	tgc	tgc	cgc	gtc	tgc	314
Ala	Gly	Val	Ser	Leu	Val	Leu	Asp	Gly	Cys	Gly	Cys	Cys	Arg	Val	Cys	
			45			50						55				
gcc	aag	cag	ctg	gga	gaa	ctg	tgt	acg	gag	cgt	gac	ccc	tgc	gac	cca	362
Ala	Lys	Gln	Leu	Gly	Glu	Leu	Cys	Thr	Glu	Arg	Asp	Pro	Cys	Asp	Pro	
			60			65						70			75	
cac	aag	ggc	ctc	ttc	tgc	gat	ttc	ggc	tcc	ccc	gcc	aac	cgc	aag	att	410
His	Lys	Gly	Leu	Phe	Cys	Asp	Phe	Gly	Ser	Pro	Ala	Asn	Arg	Lys	Ile	
			80			85						90				
gga	gtg	tgc	act	gcc	aaa	gat	ggg	gca	ccc	tgt	gtc	ttc	ggg	ggg	tgc	458
Gly	Val	Cys	Thr	Ala	Lys	Asp	Gly	Ala	Pro	Cys	Val	Phe	Gly	Gly	Ser	
			95			100						105				
gtg	tac	cgc	agc	ggg	gag	tcc	ttc	caa	agc	agc	tgc	aaa	tac	caa	tgc	506
Val	Tyr	Arg	Ser	Gly	Glu	Ser	Phe	Gln	Ser	Ser	Cys	Lys	Tyr	Gln	Cys	
			110			115						120				
act	tgc	ctg	gat	ggg	gcc	gtg	ggc	tgc	gtg	ccc	cta	tgc	agc	atg	gac	554
Thr	Cys	Leu	Asp	Gly	Ala	Val	Gly	Cys	Val	Pro	Leu	Cys	Ser	Met	Asp	
			125			130						135				
gtg	cgc	ctg	ccc	agc	cct	gac	tgc	ccc	ttc	ccg	aga	agg	gtc	aag	ctg	602
Val	Arg	Leu	Pro	Ser	Pro	Asp	Cys	Pro	Phe	Pro	Arg	Arg	Val	Lys	Leu	
			140			145						150			155	
cct	ggg	aaa	tgc	tgc	aag	gag	tgg	gtg	tgt	gac	gag	ccc	aag	gac	cgc	650
Pro	Gly	Lys	Cys	Cys	Lys	Glu	Trp	Val	Cys	Asp	Glu	Pro	Lys	Asp	Arg	
			160			165						170				
aca	gca	gtt	ggc	cct	gcc	cta	gct	gcc	tac	cga	ctg	gaa	gac	aca	ttt	698
Thr	Ala	Val	Gly	Pro	Ala	Leu	Ala	Ala	Tyr	Arg	Leu	Glu	Asp	Thr	Phe	
			175			180						185				
ggc	cca	gac	cca	act	atg	atg	cga	gcc	aac	tgc	ctg	gtc	cag	acc	aca	746
Gly	Pro	Asp	Pro	Thr	Met	Met	Arg	Ala	Asn	Cys	Leu	Val	Gln	Thr	Thr	
			190			195						200				
gag	tgg	agc	gcc	tgt	tct	aag	acc	tgt	gga	atg	ggc	atc	tcc	acc	cga	794
Glu	Trp	Ser	Ala	Cys	Ser	Lys	Thr	Cys	Gly	Met	Gly	Ile	Ser	Thr	Arg	
			205			210						215				
gtt	acc	aat	gac	aat	acc	ttc	tgc	aga	ctg	gag	aag	cag	agc	cgc	ctc	842
Val	Thr	Asn	Asp	Asn	Thr	Phe	Cys	Arg	Leu	Glu	Lys	Gln	Ser	Arg	Leu	
			220			225						230			235	
tgc	atg	gtc	agg	ccc	tgc	gaa	gct	gac	ctg	gag	gaa	aac	att	aag	aag	890
Cys	Met	Val	Arg	Pro	Cys	Glu	Ala	Asp	Leu	Glu	Glu	Asn	Ile	Lys	Lys	
			240			245						250				



ggc aaa aag tgc atc cgg aca cct aaa atc gcc aag cct gtc aag ttt 938  
 Gly Lys Lys Cys Ile Arg Thr Pro Lys Ile Ala Lys Pro Val Lys Phe  
 255 260 265

gag ctt tct ggc tgc acc agt gtg aag aca tac agg gct aag ttc tgc 986  
 Glu Leu Ser Gly Cys Thr Ser Val Lys Thr Tyr Arg Ala Lys Phe Cys  
 270 275 280

ggg gtg tgc aca gac ggc cgc tgc tgc aca ccg cac aga acc acc act 1034  
 Gly Val Cys Thr Asp Gly Arg Cys Cys Thr Pro His Arg Thr Thr Thr  
 285 290 295

ctg cca gtg gag ttc aaa tgc ccc gat ggc gag atc atg aaa aag aat 1082  
 Leu Pro Val Glu Phe Lys Cys Pro Asp Gly Glu Ile Met Lys Lys Asn  
 300 305 310 315

atg atg ttc atc aag acc tgt gcc tgc cat tac aac tgt cct ggg gac 1130  
 Met Met Phe Ile Lys Thr Cys Ala Cys His Tyr Asn Cys Pro Gly Asp  
 320 325 330

aat gac atc ttt gag tcc ctg tac tac agg aag atg tac gga gac atg 1178  
 Asn Asp Ile Phe Glu Ser Leu Tyr Tyr Arg Lys Met Tyr Gly Asp Met  
 335 340 345

gcg taaagccagg aagtaaggga cacgaactca ttagactata acttgaactg 1231  
 Ala

agttgcatct cattttcttc tgtaaaaaca attacagtag cacattaatt taaatctgtg 1291

tttttaacta ccgtgggagg aactatccca ccaaagttag aacgttatgt catggccata 1351

caagtagtct gtcaacctca gacactgggt tcgagacagt ttacacttga cagttgttca 1411

ttagcgcaca gtgccagaac gcacactgag gtgagtctcc tggaacagtg gagatgccag 1471

gagaaagaaa gacaggtact agctgagggt attttaaaag cagcagtggt cctacttttt 1531

ggagtgtaac cggggaggga aattatagca tgcttgcaaga cagacctgct cttagcgagag 1591

ctgagcatgt gtctccact agatgaggct gagtccagct gttctttaag aacagcagtt 1651

tcagcctctg accattctga ttccagtga acttgctcagg agtcagagcc ttgtctgtta 1711

gactggacag cttgtggcaa gtaagtttgc ctgtaacaag ccagattttt attgatattg 1771

taaatattgt ggatatatat atatatatat atattgttac agttatctaa gtttaatttaa 1831

agtcatttgt ttttgtttta agtgcttttg ggattttaaa ctgatagcct caaactccaa 1891

acaccatagg taggacacga agcttatctg tgattcaaaa caaaggagat actgcagtgg 1951

gaattgtgac ctgagtgaact ctctgtcaga acaaacaaat gctgtgcagg tgataaagct 2011

atgtattgga agtcagattt ctagtaggaa atgtggtcaa atccctgttg gtgaacaaat 2071

ggcctttatt aagaaatggc tggctcaggg taagggtccga ttcctaccag gaagtgttg 2131

ctgcttcttt gattatgact ggtttggggt ggggggcagt ttatttggtg agagtgtgac 2191

caaaagttac atgtttgcac ctttctagtt gaaaataaag tatatatata ttttttatat 2251

gaaaaaaaaag gaattc

2267

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 348

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 6

```

Met Leu Ala Ser Val Ala Gly Pro Ile Ser Leu Ala Leu Val Leu Leu
 1           5           10           15

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

Gln Cys Ala Ala Glu Ala Ala Pro His Cys Pro Ala Gly Val Ser Leu
 35           40           45

Val Leu Asp Gly Cys Gly Cys Cys Arg Val Cys Ala Lys Gln Leu Gly
 50           55           60

Glu Leu Cys Thr Glu Arg Asp Pro Cys Asp Pro His Lys Gly Leu Phe
 65           70           75           80

Cys Asp Phe Gly Ser Pro Ala Asn Arg Lys Ile Gly Val Cys Thr Ala
 85           90           95

Lys Asp Gly Ala Pro Cys Val Phe Gly Gly Ser Val Tyr Arg Ser Gly
100           105           110

Glu Ser Phe Gln Ser Ser Cys Lys Tyr Gln Cys Thr Cys Leu Asp Gly
115           120           125

Ala Val Gly Cys Val Pro Leu Cys Ser Met Asp Val Arg Leu Pro Ser
130           135           140

Pro Asp Cys Pro Phe Pro Arg Arg Val Lys Leu Pro Gly Lys Cys Cys
145           150           155           160

Lys Glu Trp Val Cys Asp Glu Pro Lys Asp Arg Thr Ala Val Gly Pro
165           170           175

Ala Leu Ala Ala Tyr Arg Leu Glu Asp Thr Phe Gly Pro Asp Pro Thr
180           185           190

Met Met Arg Ala Asn Cys Leu Val Gln Thr Thr Glu Trp Ser Ala Cys
195           200           205

Ser Lys Thr Cys Gly Met Gly Ile Ser Thr Arg Val Thr Asn Asp Asn
210           215           220

Thr Phe Cys Arg Leu Glu Lys Gln Ser Arg Leu Cys Met Val Arg Pro
225           230           235           240

Cys Glu Ala Asp Leu Glu Glu Asn Ile Lys Lys Gly Lys Lys Cys Ile
245           250           255

Arg Thr Pro Lys Ile Ala Lys Pro Val Lys Phe Glu Leu Ser Gly Cys
260           265           270

Thr Ser Val Lys Thr Tyr Arg Ala Lys Phe Cys Gly Val Cys Thr Asp
275           280           285

```

Gly Arg Cys Cys Thr Pro His Arg Thr Thr Thr Leu Pro Val Glu Phe  
 290 295 300

Lys Cys Pro Asp Gly Glu Ile Met Lys Lys Asn Met Met Phe Ile Lys  
 305 310 315 320

Thr Cys Ala Cys His Tyr Asn Cys Pro Gly Asp Asn Asp Ile Phe Glu  
 325 330 335

Ser Leu Tyr Tyr Arg Lys Met Tyr Gly Asp Met Ala  
 340 345

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 2075

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; CTGF-cDNA-Kodiersequenz

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (130) .. (1176)

&lt;400&gt; 7

```

cccgcccgac agccccgaga cgacagcccg gcgcgtcccg gtccccacct ccgaccaccg 60
ccagegctcc aggccccgcg ctccccgctc gccgccaccg cgccctccgc tccgcccgcga 120
gtgccaacc atg acc gcc gcc agt atg gcc ccc gtc cgc gtc gcc ttc gtg 171
      Met Thr Ala Ala Ser Met Gly Pro Val Arg Val Ala Phe Val
              1              5              10

gtc ctc ctc gcc ctc tgc agc cgg ccg gcc gtc ggc cag aac tgc agc 219
Val Leu Leu Ala Leu Cys Ser Arg Pro Ala Val Gly Gln Asn Cys Ser
  15              20              25              30

ggg ccg tgc cgg tgc ccg gac gag ccg gcg ccg cgc tgc ccg gcg ggc 267
Gly Pro Cys Arg Cys Pro Asp Glu Pro Ala Pro Arg Cys Pro Ala Gly
              35              40              45

gtg agc ctc gtg ctg gac ggc tgc ggc tgc tgc cgc gtc tgc gcc aag 315
Val Ser Leu Val Leu Asp Gly Cys Gly Cys Cys Arg Val Cys Ala Lys
              50              55              60

cag ctg ggc gag ctg tgc acc gag cgc gac ccc tgc gac ccg ccc aag 363
Gln Leu Gly Glu Leu Cys Thr Glu Arg Asp Pro Cys Asp Pro His Lys
              65              70              75

ggc ctc ttc tgt gac ttc ggc tcc ccg gcc aac cgc aag atc ggc gtg 411
Gly Leu Phe Cys Asp Phe Gly Ser Pro Ala Asn Arg Lys Ile Gly Val
  80              85              90

tgc acc gcc aaa gat ggt gct ccc tgc atc ttc ggt ggt acg gtg tac 459
Cys Thr Ala Lys Asp Gly Ala Pro Cys Ile Phe Gly Gly Thr Val Tyr
  95              100              105              110

cgc agc gga gag tcc ttc cag agc agc tgc aag tac cag tgc acg tgc 507
Arg Ser Gly Glu Ser Phe Gln Ser Ser Cys Lys Tyr Gln Cys Thr Cys
              115              120              125

ctg gac ggg gcg gtg ggc tgc atg ccc ctg tgc agc atg gac gtt cgt 555

```

Leu	Asp	Gly	Ala	Val	Gly	Cys	Met	Pro	Leu	Cys	Ser	Met	Asp	Val	Arg		
			130					135					140				
ctg	ccc	agc	cct	gac	tgc	ccc	ttc	ccg	agg	agg	gtc	aag	ctg	ccc	ggg	603	
Leu	Pro	Ser	Pro	Asp	Cys	Pro	Phe	Pro	Arg	Arg	Val	Lys	Leu	Pro	Gly		
		145					150					155					
aaa	tgc	tgc	gag	gag	tgg	gtg	tgt	gac	gag	ccc	aag	gac	caa	acc	gtg	651	
Lys	Cys	Cys	Glu	Glu	Trp	Val	Cys	Asp	Glu	Pro	Lys	Asp	Gln	Thr	Val		
	160					165					170						
gtt	ggg	cct	gcc	ctc	gcg	gct	tac	cga	ctg	gaa	gac	acg	ttt	ggc	cca	699	
Val	Gly	Pro	Ala	Leu	Ala	Ala	Tyr	Arg	Leu	Glu	Asp	Thr	Phe	Gly	Pro		
175					180					185					190		
gac	cca	act	atg	att	aga	gcc	aac	tgc	ctg	gtc	cag	acc	aca	gag	tgg	747	
Asp	Pro	Thr	Met	Ile	Arg	Ala	Asn	Cys	Leu	Val	Gln	Thr	Thr	Glu	Trp		
				195					200					205			
agc	gcc	tgt	tcc	aag	acc	tgt	ggg	atg	ggc	atc	tcc	acc	cgg	gtt	acc	795	
Ser	Ala	Cys	Ser	Lys	Thr	Cys	Gly	Met	Gly	Ile	Ser	Thr	Arg	Val	Thr		
			210					215					220				
aat	gac	aac	gcc	tcc	tgc	agg	cta	gag	aag	cag	agc	cgc	ctg	tgc	atg	843	
Asn	Asp	Asn	Ala	Ser	Cys	Arg	Leu	Glu	Lys	Gln	Ser	Arg	Leu	Cys	Met		
		225					230					235					
gtc	agg	cct	tgc	gaa	gct	gac	ctg	gaa	gag	aac	att	aag	aag	ggc	aaa	891	
Val	Arg	Pro	Cys	Glu	Ala	Asp	Leu	Glu	Glu	Asn	Ile	Lys	Lys	Gly	Lys		
	240					245					250						
aag	tgc	atc	cgt	act	ccc	aaa	atc	tcc	aag	cct	atc	aag	ttt	gag	ctt	939	
Lys	Cys	Ile	Arg	Thr	Pro	Lys	Ile	Ser	Lys	Pro	Ile	Lys	Phe	Glu	Leu		
255					260					265					270		
tct	ggc	tgc	acc	agc	atg	aag	aca	tac	cga	gct	aaa	ttc	tgt	gga	gta	987	
Ser	Gly	Cys	Thr	Ser	Met	Lys	Thr	Tyr	Arg	Ala	Lys	Phe	Cys	Gly	Val		
				275					280					285			
tgt	acc	gac	ggc	cga	tgc	tgc	acc	ccc	cac	aga	acc	acc	acc	ctg	ccg	1035	
Cys	Thr	Asp	Gly	Arg	Cys	Cys	Thr	Pro	His	Arg	Thr	Thr	Thr	Leu	Pro		
			290					295						300			
gtg	gag	ttc	aag	tgc	cct	gac	ggc	gag	gtc	atg	aag	aag	aac	atg	atg	1083	
Val	Glu	Phe	Lys	Cys	Pro	Asp	Gly	Glu	Val	Met	Lys	Lys	Asn	Met	Met		
	305						310					315					
ttc	atc	aag	acc	tgt	gcc	tgc	cat	tac	aac	tgt	ccc	gga	gac	aat	gac	1131	
Phe	Ile	Lys	Thr	Cys	Ala	Cys	His	Tyr	Asn	Cys	Pro	Gly	Asp	Asn	Asp		
	320					325					330						
atc	ttt	gaa	tcg	ctg	tac	tac	agg	aag	atg	tac	gga	gac	atg	gca		1176	
Ile	Phe	Glu	Ser	Leu	Tyr	Tyr	Arg	Lys	Met	Tyr	Gly	Asp	Met	Ala			
335					340					345							
tgaagccaga	gagtgagaga	cattaactca	ttagactgga	acttgaactg	attcacatct	1236											
catttttccg	taaaaatgat	ttcagtagca	caagttat	aaatctg	tttcttaactgg	1296											
gggaaaagat	tcccacccaa	ttcaaaacat	tgtgccatgt	caaacaaata	gtctatcttc	1356											
cccagacact	ggtttgaaga	atgttaagac	ttgacagtgg	aactacatta	gtacacagca	1416											

ccagaatgta tattaagggtg tggcttttagg agcagtggga ggggtaccggc ccggtttagta 1476  
 tcatcagatc gactcttata cgagtaatat gcctgctatt tgaagtgtaa ttgagaagga 1536  
 aaatttttagc gtgctcactg acctgcctgt agccccagtg acagctagga tgtgcattct 1596  
 ccagccatca agagactgag tcaagttggt ccttaagtca gaacagcaga ctcagctctg 1656  
 acattctgat tcgaatgaca ctgttcagga atcggaatcc tgtcgattag actggacagc 1716  
 ttgtggcaag tgaatttgcc tgtaacaagc cagattttttt aaaatttata ttgtaaatat 1776  
 tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tatatatata tatatatgta cagttatcta agttaattta 1836  
 aagttgtttg tgcccttttta tttttgtttt taatgctttg atatttcaat gttagcctca 1896  
 atttctgaac accataggta gaatgtaaag cttgtctgat cgttcaaagc atgaaatgga 1956  
 tacttatatg gaaattctgc tcagatagaa tgacagtccg tcaaaacaga ttgtttgcaa 2016  
 aggggaggga tcagtgtctt ggcaggctga tttctaggta ggaaatgtgg tagctcacg 2075

<210> 8

<211> 349

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

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

Pro Ala Leu Ala Ala Tyr Arg Leu Glu Asp Thr Phe Gly Pro Asp Pro  
 180 185 190  
 Thr Met Ile Arg Ala Asn Cys Leu Val Gln Thr Thr Glu Trp Ser Ala  
 195 200 205  
 Cys Ser Lys Thr Cys Gly Met Gly Ile Ser Thr Arg Val Thr Asn Asp  
 210 215 220  
 Asn Ala Ser Cys Arg Leu Glu Lys Gln Ser Arg Leu Cys Met Val Arg  
 225 230 235 240  
 Pro Cys Glu Ala Asp Leu Glu Glu Asn Ile Lys Lys Gly Lys Lys Cys  
 245 250 255  
 Ile Arg Thr Pro Lys Ile Ser Lys Pro Ile Lys Phe Glu Leu Ser Gly  
 260 265 270  
 Cys Thr Ser Met Lys Thr Tyr Arg Ala Lys Phe Cys Gly Val Cys Thr  
 275 280 285  
 Asp Gly Arg Cys Cys Thr Pro His Arg Thr Thr Thr Leu Pro Val Glu  
 290 295 300  
 Phe Lys Cys Pro Asp Gly Glu Val Met Lys Lys Asn Met Met Phe Ile  
 305 310 315 320  
 Lys Thr Cys Ala Cys His Tyr Asn Cys Pro Gly Asp Asn Asp Ile Phe  
 325 330 335  
 Glu Ser Leu Tyr Tyr Arg Lys Met Tyr Gly Asp Met Ala  
 340 345

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

&lt;400&gt; 9

ggggatctgt gacgagccca aggac

25

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 26

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

&lt;400&gt; 10

gggaattcga ccaggcagtt ggctcg

26

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 26

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

&lt;400&gt; 11

ggggatcctg tgatgaagac agcatt

26

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 26

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

&lt;400&gt; 12

gggaattcaa cgatgcattt ctggcc

26

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisches Peptid

&lt;400&gt; 13

Asp	Gly	Cys	Gly	Cys	Cys	Lys	Val	Cys	Ala	Lys	Gln	Leu	Asn	Glu	Asp
1				5					10					15	

Cys	Ser	Lys	Thr	Gln
				20

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisches Peptid

&lt;400&gt; 14

Pro	Asn	Cys	Lys	His	Gln	Cys	Thr	Cys	Ile	Asp	Gly	Ala	Val	Gly	Cys
1				5					10					15	

Ile	Pro	Leu	Cys	Pro
				20

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisches Peptid

&lt;400&gt; 15

Cys Ile Val Gln Thr Thr Ser Trp Ser Gln Cys Ser Lys Ser Cys Gly  
 1 5 10 15

Thr Gly Ile Ser Thr Arg Val Thr  
 20

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 26

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisches Peptid

&lt;400&gt; 16

Ile Ser Thr Arg Val Thr Asn Asp Asn Pro Glu Cys Arg Leu Val Lys  
 1 5 10 15

Glu Thr Arg Ile Cys Glu Val Arg Pro Cys  
 20 25

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisches Peptid

&lt;400&gt; 17

Lys Tyr Cys Gly Ser Cys Val Asp Gly Arg Cys Cys Thr Pro Leu Gln  
 1 5 10 15

Thr Arg Thr Val Lys  
 20

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 39

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer fH1

&lt;400&gt; 18

gcggcacatgca gcgcgaccgc gaaatcccca gaaccagtc

39

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 42

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer rH1



&lt;400&gt; 19

tcgcgctgca tgccgcgccc gcttttaggc tgctgtacac tg

42

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 32

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer fH2

&lt;400&gt; 20

gtcgcggcat acgcgccc aa atactgcggc tc

32

&lt;210&gt; 21

&lt;211&gt; 31

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer rH2

&lt;400&gt; 21

gcgcgtatgc cgcgacactg gagcatcctg c

31

&lt;210&gt; 22

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Beschreibung der künstlichen Sequenz: Stromauf-PCR-Primer

&lt;400&gt; 22

cagaccacgt cttggtcc

18

&lt;210&gt; 23

&lt;211&gt; 19

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Beschreibung der künstlichen Sequenz: Stromab-PCR-Primer

&lt;400&gt; 23

gaataggctg tacagtcgg

19

&lt;210&gt; 24

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

&lt;400&gt; 24

**cacaacagaa gccaggaacc**

20

&lt;210&gt; 25

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Beschreibung der künstlichen Sequenz: unterer PCR-Primer

&lt;400&gt; 25

**gaggggacga cgacagtatc**

20

&lt;210&gt; 26

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Beschreibung der künstlichen Sequenz: oberer PCR-Primer

&lt;400&gt; 26

**caacggagcc aggggaggtg**

20

&lt;210&gt; 27

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Beschreibung der künstlichen Sequenz: unterer Wildtyp-PCR-Primer

&lt;400&gt; 27

**cggcgacaca gaaccaacaa**

20

&lt;210&gt; 28

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Beschreibung der künstlichen Sequenz: unterer mutierter PCR-Primer

&lt;400&gt; 28

**gaggggacga cgacagtatc**

20

&lt;210&gt; 29

<211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisches Peptid

<400> 29

His His Leu Gly Gly Ala Lys Gln Ala Gly Asp Val  
 1 5 10

<210> 30  
 <211> 37  
 <212> PRT  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisches Peptid

<400> 30

Ser Leu Lys Ala Gly Ala Ala Cys Ser Ala Thr Ala Lys Ser Pro Glu  
 1 5 10 15

Pro Val Arg Phe Thr Tyr Ala Gly Cys Ser Ser Val Ala Ala Tyr Ala  
 20 25 30

Pro Lys Tyr Cys Gly  
 35

<210> 31  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisches Peptid

<400> 31

Gly Arg Gly Asp Ser Pro  
 1 5

<210> 32  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisches Peptid

<400> 32

Gly Arg Gly Glu Ser Pro  
 1 5

<210> 33

<211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: TSP1

<400> 33

Gly Gln Lys Cys Ile Val Gln Thr Thr Ser Trp Ser Gln Cys Ser Lys  
 1 5 10 15  
 Ser

<210> 34  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: TSP2

<400> 34

Ser Trp Ser Gln Cys Ser Lys Ser Cys Gly Thr Gly Ile Ser Thr Arg  
 1 5 10 15  
 Val Thr Asn Asp  
 20

<210> 35  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: TSP3

<400> 35

Gly Ile Ser Thr Arg Val Thr Asn Asp Asn Pro Glu Cys Arg Leu Val  
 1 5 10 15  
 Lys Glu Thr Arg  
 20

<210> 36  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: TSP4

<400> 36

Arg Leu Val Lys Glu Thr Arg Ile Cys Glu Val Arg Pro Cys Gly Gln  
 1 5 10 15

<210> 37  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: H1

<400> 37

**Tyr Ser Ser Leu Lys Lys Gly Lys Lys Cys Ser Lys Thr Lys Lys Ser**  
           1                          5                          10                          15  
**Pro Glu**

<210> 38  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: H2

<400> 38

**Ser Ser Val Lys Lys Tyr Arg Pro Lys Tyr Cys Gly Ser**  
           1                          5                          10

### Patentansprüche

1. Isoliertes Cyr61-Fragment, das die Haftung von Endothelzellen und Fibroblasten unterstützt, worin das Fragment eine Sequenz aus Aminosäuren innerhalb der Domäne III von Cyr61 mit Seq.-ID Nr. 2 oder von menschlichem Cyr61 mit Seq.-ID Nr. 4 umfasst und aus Seq.-ID Nr. 33 besteht oder aus einer Aminosäuresequenz besteht, die zu zumindest 95 % ähnlich zu Seq.-ID Nr. 33 ist.

2. Cyr61-Fragment nach Anspruch 1, das zu 99 % ähnlich zu Seq.-ID Nr. 33 ist.

3. Cyr61-Fragment nach Anspruch 1, das aus Seq.-ID Nr. 33 besteht.

4. Isoliertes Polynucleotid, das für ein Cyr61-Fragment nach einem der Ansprüche 1 bis 3 kodiert.

5. Isolierter Antikörper, der spezifisch an ein Cyr61-Fragment nach einem der Ansprüche 1 bis 3 bindet.

6. Antikörper nach Anspruch 5, der spezifisch an ein aus Seq.-ID Nr. 33 bestehendes Cyr61-Fragment bindet.

7. Verwendung einer Zusammensetzung, die ein Cyr61-Fragment nach einem der Ansprüche 1 bis 3 umfasst, bei der Herstellung eines Medikaments zur Behandlung einer Erkrankung oder eines Leidens im Zusammenhang mit Onkogenese oder Angiogenese.

8. Verwendung einer Zusammensetzung, die einen Antikörper nach Anspruch 5 oder Anspruch 6 umfasst, bei der Herstellung eines Medikaments zur Behandlung einer Krankheit oder eines Leidens im Zusammenhang mit Onkogenese oder Angiogenese.

9. Cyr61-Fragment nach einem der Ansprüche 1 bis 3, das mit einer anderen Verbindung verbunden ist.

Es folgen 2 Blatt Zeichnungen

## Anhängende Zeichnungen

CYR61 M--SSSTFRTLAVAVTLHL----TRLALST-CPAAC--HCPL-APKCAPGVGLVRDGGCGCKVCAK 58  
 CEF10 M--GSAGARP-ALAAALLCL--ARLALGSPCAVC--QCPAA-APQCAPGVGLVPDGGCGCKVCAK 58  
 FISPI2 M--LASVAGPISLA-LVLLALCTRATGODCSAQC--QCAAEAAHPCAPAGVSLVLDGGCCCRVCAK 61  
 CTGF M--TAASMGVVRVAFVLLALCSRPAVGQNCSPC--RCPDEPAPRCPAGVSLVLDGGCCCRVCAK 62  
 NOV METGGGGLPVLLLLLLLRPCEVSGREAAACPRPCGGRCPAEP-PRCAPGVPAVLDDGGCCCLVCAR 65

CYR61 QLNEDCSKTQPCDHTKGLECNFGASSTALKGICRAQSEGRPCYNSRIYONGESFQPNCKHQCTCI 124  
 CEF10 QLNEDCSRTQPCDHTKGLECNFGASPAATNGICRAQSEGRPCYNSKIYONGESFQPNCKHQCTCI 124  
 FISPI2 QLGELCTERDPCDPHKGLFCDFGSPANRKIGVCTAK-DGAPCVFGGSVYRSGESFQSSCKYQCTCL 126  
 CTGF QLGELCTERDPCDPHKGLFCDFGSPANRKIGVCTAK-DGAPCIFGGTVYRSGESFQSSCKYQCTCL 127  
 NOV ORGESCSPLLPCEDESGLYCDRGPEDGGGAGICMVL-EGDNCVFDGMIYRNGETFPSPCKYQCTCR 130

CYR61 DGAVGCIPLCPOELSLPNLGCNPRLVKVSGQCCEEWVCDEDSIK-DSLDD-ODDLLGLDASEVEL 188  
 CEF10 DGAVGCIPLCPOELSLPNLGCPSRPLVKVPGQCCEEWVCDESKDALEEGFFSKEFGLDASEGEL 190  
 FISPI2 DGAVGCVPLCSMDVRLPSDPCPFPRRVKLPKGCKCEWVCDEPKDRTAVGP-----ALAAAYRLED 185  
 CTGF DGAVGCMPLCSMDVRLPSDPCPFPRRVKLPKGCKCEWVCDEPKDQTVVGP-----ALAAAYRLED 186  
 NOV DGOIGCLPRCNLGLLLPGDPCPFPRKIEVPGECCCKWVCDPRDEVLLGGF-----AMAAAYRQEA 189

FIGUR 1

Cyr61	TRNNELIAIGKSSLKRLPVFGTEPRVLFNPLHAHGOKCIVOTTSWSQCSKSCGTGISTRVTNDNP	254
CEf10	TRNNELIAIVKGG-LKMLPVFGSEPQ-----SRAFENPKCIVOTTSWSQCSKTCGTGISTRVTNDNP	251
FISp12	T-----FGPDP-----TMMRANCLVQTTSEWASCSKTGCMGISTRVTNDNT	225
CTGF	T-----FGPDP-----TMIRANCLVQTTSEWASCSKTGCMGISTRVTNDNA	226
Nov	T-----LGIDV-----SDSSANCIEQTTSEWASCSKSCGMGFSTRVTNRNQ	229

Cyr61	ECRLVKETRICEVRPCGQPVYSSLKGGKKCSKTKKSPPEVRFTYAGCSSVKKYRPKYCGSCVDGRC	320
CEf10	DCKLIKETRICEVRPCGQPSYASLKGKKCTKTKKSPSPVRFTYAGCSSVKKYRPKYCGSCVDGRC	317
FISp12	FCRLEKOSRLCMVRPCEADLEENIKGGKKCIRTTPKIAKPVKFELSGCTSVKTYRAKFCGVCCTDGRC	291
CTGF	SCRLEKOSRLCMVRPCEADLEENIKGGKKCIRTTPKISKPIKFELSGCTSMKTYRAKFCGVCCTDGRC	292
Nov	QCEMVKOTRLCMMRPCEN-EEPSDKGGKKCIQTKKSMKAVRFEYKNCTSVQTYKPRYCGLCNDGRC	294

Cyr61	CTPLQTRTVKMRFRCEDGEMFSKNVMM-IQSCKNYNCPHPNEASFRLY--SLFNDIHKFRD	379
CEf10	CTPQQTRTVKIRFRCDGETFTKSVM-IOSCRCNYPNCPHANE-YPFY--RLVNDIHKFRD	376
FISp12	CTPHRTTTLPVEFKCPDGEIMKKN-MMFIKTCACHYNCPGDNDIFESLYYRKMVGDMA	348
CTGF	CTPHRTTTLPVEFKCPDGEVMKKN-MMFIKTCACHYNCPGDNDIFESLYYRKMVGDMA	349
Nov	CTPHNTKTIQVEFRCPQGGKFLKKP-MMLINTCVCHGNCPOSNNAFFQPLDPMSEAKI	351

FIGUR. 1