



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 601 31 146 T2 2008.03.06**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 259 626 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **601 31 146.9**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US01/06113**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **01 914 501.0**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2001/062942**

(86) PCT-Anmeldetag: **26.02.2001**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **30.08.2001**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **27.11.2002**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **31.10.2007**

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

(51) Int Cl.⁸: **C12N 15/62 (2006.01)**

C07K 14/52 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

185205 P 25.02.2000 US

205331 P 18.05.2000 US

(73) Patentinhaber:

**Ludwig Institute for Cancer Research, New York,
N.Y., US; Licentia Oy, Helsinki, FI**

(74) Vertreter:

**Patentanwälte
HANSMANN-KLICKOW-HANSMANN, 22767
Hamburg**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

**ALITALO, Kari Molecular/Cancer Biology Labora,
00014 Helsinki, FI; JELTSCH, Markku M. Molecular,
00014 Helsinki, FI**

(54) Bezeichnung: **MATERIAL UND VERFAHREN DIE HYBRIDVASKULARENDOTHELWACHSTUMFAKTOREN DNS
UND PROTEINE ENTHALTEN UND SCREENINGVERFAHREN FÜR MODULATOREN**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

[0001] Die PDGF-Proteine und deren Rezeptoren (PDGFRs) sind an der Regulation der Zellproliferation, am Überleben und der Migration etlicher Zelltypen beteiligt. Die VEGF-Proteine und deren Rezeptoren (VEGFRs) spielen eine bedeutende Rolle sowohl bei der Vaskulogenese, der Entwicklung der embryonalen Vaskulatur aus frühen differenzierenden Endothelzellen, und der Angiogenese, dem Vorgang der Bildung neuer Blutgefäße aus bereits existierenden [Risau et al., *Dev Biol* 125 : 441–450 (1988); Zachary, *Intl J Biochem Cell Bio* 30 : 1169–1174 (1998); Neufeld et al., *FASEB J* 13: 9–22 (1999) Ferrara, *J Mol Med* 77: 527–543 (1999)]. Beide Prozesse hängen von der/dem streng kontrollierten Endothelzell-Proliferation, -Migration, -Differenzierung und -Überleben ab. Die Fehlfunktion des Endothelzellregulationssystems ist ein Schlüsselmerkmal von Krebs und etlichen Krankheiten, die mit einer anormalen Angiogenese verbunden sind, wie beispielsweise proliferativen Retinopathien, altersbedingter Muskeldegeneration, rheumatoider Arthritis und Psoriasis. Das Verständnis der spezifischen biologischen Funktion der Schlüsselakteure, die an der Regulation von Endothelzellen beteiligt sind, wird zu effizienteren therapeutischen Anwendungen zur Behandlung solcher Erkrankungen führen [Zachary, *Intl J Biochem Cell Bio* 30: 1169–1174 (1998); Neufeld et al., *FASEB J* 13: 9–22 (1999); Ferrara, *J Mol Med* 77: 527–543 (1999)].

Die PDGF/VEGF-Familie

[0002] Die PDGF/VEGF-Familie von Wachstumsfaktoren beinhaltet zumindest die folgenden Mitglieder: PDGF-A (siehe z.B. GenBank-Zugriffsnummer Q16889, hier aus Gründen der Klarheit als VEGF-A oder durch eine bestimmte Isoform bezeichnet), PIGF (siehe z.B. GenBank-Zugriffsnummer X54936, Plazentawachstumsfaktor), VEGF-B (siehe z.B. GenBank-Zugriffsnummer U48801; auch als bekannt als VEGF-verwandter Faktor (VEGF related factor, VRF)), VEGF-C (GenBank-Zugriffsnummer X94216; auch bekannt als VEGF-verwandtes Protein (VEGF related Protein, VRP)), VEGF-D (auch bekannt als c-fos-induzierter Wachstumsfaktor (FIGF); siehe z.B. GenBank-Zugriffsnummer S67522), NZ2 VEGF (auch bekannt als OV NZ2; siehe z.B. GenBank-Zugriffsnummer S67520), D1701 VEGF-artiges Protein (siehe z.B. GenBank-Zugriffsnummer AF106020; Meyer et al., *EMBO J* 18:363–374), und NZ10 VEGF-artiges Protein (beschrieben in der internationalen Patentanmeldung PCT/US99/25869) [Stacker und Achen, *Growth Factors* 17:1–11 (1999); Neufeld et al., *FASER J* 13:9–22 (1999); Ferrara, *J Mol Med* 77:527–543 (1999)].

[0003] Die Mitglieder der PDGF/VEGF-Familie sind gekennzeichnet durch eine Anzahl von Strukturmotiven, einschließlich einem konservierten PDGF-Motiv, das definiert ist durch die Sequenz: P-[PS]-C-V-X(3)-R-C-[GSTA]-G-C-C (SEQ ID NO: 1200). Die eckigen Klammern zeigen an, dass an dieser Position in dem Polypeptid jede der innerhalb der Klammern enthaltenen Aminosäuren stehen kann. Die in runden Klammern angegebene Ziffer zeigt die Zahl von Aminosäuren an, die den "V"- und "R"-Rest voneinander trennen. Dieses konservierte Motiv fällt in eine große Domäne von 70–150 Aminosäuren, die teilweise durch acht hochkonservierte Cystein-Reste definiert ist, die inter- und intramolekulare Disulfidbindungen bilden. Diese Domäne bildet ein Cystein-Knoten-Motiv, bestehend aus zwei Disulfidbindungen, die eine kovalent verknüpfte Ringstruktur zwischen zwei benachbarten β -Strängen bildet, und einer dritten Disulfidbindung, die den Ring durchdringt [siehe zum Beispiel [Fig. 1](#) in Muller et al., *Structure* 5: 1325–1338 (1997)], ähnlich derjenigen, die in anderen Cystein-Knoten-Wachstumsfaktoren, z.B. dem transformierenden Wachstumsfaktor β (TGF β) gefunden wird. Die Aminosäuresequenz aller bekannten PDGF/VEGF-Proteine, mit Ausnahme von VEGF-E, enthält die PDGF-Domäne. Die Proteine der PDGF/VEGF-Familie sind vornehmlich sekretierte Glykoproteine, die entweder Disulfidverknüpfte oder nicht-kovalent gebundene Homo- oder Heterodimere bilden, deren Untereinheiten in einer antiparallelen Weise angeordnet sind [Stacker und Achen, *Growth Factors* 17: 1–11 (1999); Muller et al., *Structure* 5: 1325–1338 (1997)].

Die PDGF-Unterfamilie

[0004] Die PDGFs regulieren die Zellproliferation, das Zellüberleben und die Chemotaxis vieler Zelltypen in vitro (Überblick in Heldin et al., *Biochimica et Biophysica Acta* 1378: F79–113 (1998)). Die beiden Ketten, die PDGF, PDGF-A und PDGF-B ausmachen, können homo- oder heterodimerisieren, wodurch drei verschiedene Isoformen gebildet werden: PDGF-AA, PDGF-AB oder PDGF-BB. PDGF-A ist lediglich in der Lage, den PDGF- α -Rezeptor (PDGFR- α) zu binden, wohingegen PDGF-B sowohl den PDGF- α - als auch einen zweiten PDGF-Rezeptor (PDGF- β) binden kann. In vivo zeigen die PDGF-Proteine ihre Wirkungen in einer parakrinen Weise, da sie oft in epithelialen (PDGF-A) oder endothelialen (PDGF-B) Zellen in dichter Apposition zu den PDGF-Rezeptor exprimierendem Mesenchym exprimiert werden (Übersicht in Ataliotis et al., *Int Rev Cytology* 172: 95–127 (1997)). Die Überexpression der PDGFs ist bei etlichen pathologischen Zuständen, einschließlich Malignitäten, Arteriosklerose und fibroproliferativen Erkrankungen, beobachtet worden. Bei in vitro angezoge-

nen Tumorzellen und -zelllinien erzeugte die Koexpression der PDGFs und PDGF-Rezeptoren autokrine Schleifen, die für die zelluläre Transformation wichtig sind [Betsholtz et al., Cell 39: 447–57 (1984); Keating et al., Science 239: 914–6 (1988)].

[0005] Die Bedeutung der PDGFs als Regulatoren der Zellproliferation und des Zellüberlebens ist durch Gen-Targeting-Untersuchungen an Mäusen gut illustriert worden. Homozygote Nullmutationen für entweder PDGF-A oder PDGF-B sind in Mäusen lethal. Ungefähr 50% der homozygoten PDGF-A-defizienten Mäuse haben einen früh lethalen Phänotyp, während die überlebenden Tiere einen komplexen postnatalen Phänotyp, mit Lungenemphysem aufgrund fehlerhafter Alveolarseptumbildung, und einen dermalen Phänotyp aufweisen, der durch dünne Dermis, missgestaltete Haarfollikel und dünnes Haar gekennzeichnet ist. PDGF-A wird auch für die normale Entwicklung von Oligodendrozyten und die anschließende Myelinisierung des Zentralnervensystems benötigt. Die PDGF-B-defizienten Mäuse entwickeln renale, hämatologische und kardiovaskuläre Abnormalitäten; wobei die renalen und kardiovaskulären Defekte zumindest teilweise auf das Fehlen korrekter Rekrutierung muraler Zellen (vaskulärer glatter Muskelzellen, Perizyten oder mesangialer Zellen) zu Blutgefäßen zurückzuführen sind.

Die VEGF-Unterfamilie

[0006] Die VEGF-Unterfamilie ist zusammengesetzt aus PDGF/VEGF-Mitgliedern, denen eine VEGF-Homologiedomäne (VHD) gemeinsam ist, die gekennzeichnet ist durch die Sequenz: C-X(22-24)-P[PSR]-C-V-X(3)-R-C-[GSTA]-G-C-C-X(6)-C-X(32-41)-C (SEQ ID NO: 1201). Die VHD-Domäne, bestimmt durch Analyse der VEGF-Unterfamilienmitglieder, umfasst das PDGF-Motiv, ist jedoch spezifischer.

[0007] VEGF-A wurde ursprünglich auf Basis seiner mitogenen Aktivität gegenüber Endothelzellen und auch anhand seiner Fähigkeit zur Induktion der mikrovaskulären Permeabilität aus verschiedenen Quellen gereinigt, und wird daher auch als vaskulärer Permeabilitätsfaktor (vascular permeability factor, VPF) bezeichnet. Es ist anschließend gezeigt worden, dass VEGF-A eine Reihe von biologischen Vorgängen induziert, einschließlich der Mobilisierung intrazellulären Kalziums, der Induktion der Plasminogenaktivator- und Plasminogenaktivatorinhibitor-1-Synthese, der Förderung der Monozytenmigration in vitro, der Induktion der antiapoptischen Proteinexpression in menschlichen Endothelzellen, der Induktion von Fenestrierungen in Endothelzellen, der Förderung der Zelladhäsionsmolekülexpression in Endothelzellen und der Induktion der durch Stickstoffdioxid vermittelten Vasodilatation und Hypotonie [Ferrara, J Mol Med 77:527–543 (1999); Neufeld et al., FASEB J 13: 9–22 (1999); Zachary, Intl J Biochem Cell Bio 30: 1169–1174 (1998)].

[0008] VEGF-A ist ein aus 23 kDa-Untereinheiten zusammengesetztes sekretiertes, Disulfid-verknüpftes homodimeres Glykoprotein. Fünf menschliche VEGF-A-Isoformen mit einer Länge von 121, 145, 165, 189 oder 206 Aminosäuren (VEGF_{121–206}), kodiert durch verschiedene mRNA-Spleißvarianten, sind beschrieben worden, die sämtlich in der Lage sind, die Mitogenese in Endothelzellen zu stimulieren. Jede Isoform unterscheidet sich jedoch in der biologischen Aktivität, Rezeptorspezifität und Affinität für Zelloberflächen- und extrazellulärmatrassozierte Heparansulfat-Proteoglykane, die sich wie niederaffine Rezeptoren für VEGF-A verhalten. VEGFR₁₂₁ bindet weder an Heparin noch an Heparansulfat; VEGF₁₄₅ und VEGF₁₆₅ (GenBank-Zugriffsnummer M32977) sind beide zur Bindung an Heparin befähigt; und VEGF₁₈₉ und VEGF₂₀₆ zeigen die stärkste Affinität für Heparin und Heparansulfat. VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅ und VEGF₁₆₅ werden in einer löslichen Form ausgeschieden, obwohl der größte Teil des VEGF₁₅₅ auf Zelloberflächen- und Extrazellulärmatrix-Proteoglykane beschränkt ist, wohingegen VEGF₁₈₉ und VEGF₂₀₆ mit der extrazellulären Matrix assoziiert bleiben. Sowohl VEGF₁₈₉ als auch VEGF₂₀₅ können durch Behandlung mit Heparin oder Heparinase freigesetzt werden, was darauf hinweist, dass diese Isoformen über Proteoglykane an die extrazelluläre Matrix gebunden sind. Zellgebundenes VEGF₁₈₉ kann auch durch Proteasen wie beispielsweise Plasmin gespalten werden, was zur Freisetzung eines aktiven löslichen VEGF₁₁₀ führt. Die meisten Gewebe, die VEGF exprimieren, exprimieren mehrere VEGF-Isoformen gleichzeitig, obwohl VEGF₁₂₁ und VEGF₁₆₅ die vorherrschenden Formen sind, wohingegen VEGF₂₀₆ selten festgestellt wird [Ferrara, J Mol Med 77: 527–543 (1999)]. VEGF₁₄₂ unterscheidet sich darin, dass es primär in Zellen exprimiert wird, die sich von Fortpflanzungsorganen ableiten [Neufeld et al., FASEB J 13: 9–22 (1999)].

[0009] Das Muster der VEGF-A-Expression legt seine Beteiligung an der Entwicklung und Erhaltung des normalen Gefäßsystems und an der mit Tumorstadium und anderen pathologischen Zuständen wie beispielsweise rheumatoider Arthritis verbundenen Angiogenese nahe. VEGF-A wird in embryonalen Geweben, die mit dem sich entwickelnden Gefäßsystem verbunden sind, exprimiert und wird durch zahlreiche Tumorzelllinien sekretiert. Die Analyse von Mäusen, bei denen VEGF-A durch gezielte Genzerstörung ausgeschaltet wurde, zeigt, dass VEGF-A kritisch für das Überleben ist, und dass die Entwicklung des kardiovaskulären Systems

gegenüber VEGF-A-Konzentrationsgradienten hoch empfindlich ist. Mäusen, denen eine einzelne Kopie von VEGF-A fehlt, sterben zwischen Tag 11 und 12 der Gestation. Diese Embryos zeigen ein beeinträchtigtes Wachstum und etliche Entwicklungsanomalitäten, einschließlich Defekten in der Entwicklung der sich entwickelnden Kardiovaskulatur. VEGF-A wird auch postnatal für das Wachstum, die Organentwicklung, die Regulation der Wachstumsplatten-Morphogenese und der endochondralen Knochenbildung benötigt. Der Bedarf an VEGF-A erhöht sich mit dem Alter, insbesondere nach der vierten postnatalen Woche. Bei erwachsenen Tieren ist VEGF-A primär für die aktive Angiogenese bei Vorgängen wie beispielsweise der Wundheilung und der Entwicklung des Corpus luteum erforderlich. [Neufeld et al., *FASEB J* 13: 9–22 (1999); Ferrara, *J Mol Med* 77: 527–543 (1999)]. Die VEGF-A-Expression wird primär durch Hypoxie und eine Reihe von Hormonen und Zytokinen, einschließlich des epidermalen Wachstumsfaktors (EGF), TGF- β und verschiedenen Interleukinen, beeinflusst. Die Regulation erfolgt transkriptionell und auch posttranskriptionell, beispielsweise durch erhöhte mRNA-Stabilität [Ferrara, *J Mol Med* 77: 527–543 (1999)].

[0010] PIGF, ein zweites Mitglied der VEGF-Unterfamilie, ist im Vergleich zu VEGF-A im Allgemeinen ein schlechter Stimulator der Angiogenese und der Endothelzellen-Proliferation, und die Rolle von PIGF in vivo wird nicht gut verstanden. Drei Isoformen von PIGF, hergestellt durch alternatives mRNA-Spleißen, sind beschrieben worden [Hauser et al., *Growth Factors* 9: 259–268 (1993); Maglione et al., *Oncogene* 8: 925–931 (1993)]. PIGF bildet mit VEGF-A sowohl Disulfid-verknüpfte Homodimere als auch Heterodimere. Die PIGF-VEGF-A-Heterodimere sind bei der Induzierung der Endothelzell-Proliferation und Angiogenese wirksamer als die PIGF-Homodimere. PIGF wird primär in der Plazenta exprimiert, und wird während der frühen Embryogenese auch zusammen mit VEGF-A in den trophoblastischen Riesenzellen des parietalen Dottersacks exprimiert [Stacker und Achen, *Growth Factors* 17: 1–11 (1999)].

[0011] VEGF-B, im Detail in der Veröffentlichung der internationalen Patentanmeldung Nr. WO 96/26736 und den U.S.-Patenten 5.840.693 und 5.607.918 beschrieben, hat ungefähr 44% Aminosäureidentität mit VEGF-A gemeinsam. Obwohl die biologischen Funktionen von VEGF-B in vivo weiterhin unvollständig verstanden werden, ist gezeigt worden, dass es angiogene Eigenschaften aufweist, und auch an der Zelladhäsion und -Migration und an der Regulation des Abbaus der extrazellulären Matrix beteiligt sein kann. Es wird in zwei Isoformen von 167 und 186 Aminosäureresten exprimiert, die durch alternatives Spleißen erzeugt werden. VEGF-B₁₆₇ ist über eine Heparinbindende Domäne mit der Zelloberfläche oder der extrazellulären Matrix assoziiert, wohingegen VEGF-B₁₈₆ sekretiert wird. Sowohl VEGF-B₁₆₇ als auch VEGF-B₁₈₆ können Disulfid-verknüpfte Homodimere oder Heterodimere mit VEGF-A bilden. Die Verbindung von VEGF-B₁₆₅-VEGF-B₁₈₆-Heterodimeren mit der Zelloberfläche scheint durch die VEGF-B-Komponente bestimmt zu werden, was nahelegt, dass die Heterodimerisierung für die Sequestrierung von VEGF-A wichtig sein kann. VEGF-B wird primär in embryonalen und adulten Herz- und Skelettmuskelgeweben exprimiert [Joukov et al., *J Cell Physiol* 173: 211–215 (1997); Stacker und Achen, *Growth Factors* 17: 1–11 (1999)]. Mäuse, denen VEGF-B fehlt, überleben, besitzen jedoch kleinere Herzen, eine dysfunktionale koronare Vaskulatur und zeigen eine beeinträchtigte Erholung von Herzischämie [Bellomo et al., *Circ Res* 2000; E29–E35].

[0012] Ein viertes Mitglied der VEGF-Unterfamilie, VEGF-C, umfasst eine VHD, die auf dem Aminosäureniveau ungefähr 30% identisch zu VEGF-A ist. VEGF-C wird ursprünglich als ein größeres Vorläuferprotein, Präpro-VEGF-C, exprimiert, das umfangreiche, die VHD flankierende amino- und carboxyterminale Peptidsequenzen aufweist, wobei das C-terminale Peptid tandemartig wiederholte Cystein-Reste in einem Motiv enthält, das für Balbiani-Ring-3-Protein typisch ist. Präpro-VEGF-C durchläuft eine umfangreiche proteolytische Reifung, die die aufeinander folgende Spaltung eines Signalpeptids, des C-terminalen Propeptids und des N-terminalen Propeptids beinhaltet. Sekretiertes VEGF-C-Protein besteht aus einem nichtkovalent verknüpften Homodimer, bei dem jedes Monomer die VHD enthält. Die durch partielles proteolytisches Processing hergestellten intermediären Formen von VEGF-C zeigen eine zunehmende Affinität für den VEGFR-3-Rezeptor, und das reife Protein ist auch in der Lage, an den VEGFR-2-Rezeptor zu binden. [Joikov et al., *EMBO J.*, 16(13): 3898–3911 (1997)]. Es ist auch gezeigt worden, dass ein mutiertes VEGF-C, bei dem ein einzelnes Cystein an Position 156 entweder durch eine andere Aminosäure ersetzt oder deletiert ist, die Fähigkeit verliert, VEGFR-2 zu binden, jedoch in der Lage bleibt, VEGFR-3 zu binden und zu aktivieren [Publikation der Internationalen Patentanmeldung Nr. WO 98/33917]. Bei Hausembryos wird VEGF-C-mRNA primär in der Allantois, im Halsbereich und im Metanephros exprimiert. [Joukov et al., *J Cell Physiol* 173: 211–215 (1997)]. VEGF-C ist an der Regulation der lymphatischen Angiogenese beteiligt: wenn VEGF-C in der Haut von transgenen Mäusen überexprimiert wurde, wurde ein hyperplastisches lymphatisches Gefäßnetzwerk beobachtet, was darauf hindeutet, dass VEGF-C lymphatisches Wachstum induziert [Jeltsch et al., *Science*, 276: 1423–1425 (1997)]. Die fortgesetzte Expression von VEGF-C im Erwachsenen deutet auch auf eine Rolle bei der Erhaltung von differenziertem lymphatischem Endothel hin [Ferrara, *J Mol Med* 77: 527–543 (1999)]. VEGF-C zeigt auch angiogene Eigenschaften: es kann die Migration von kapillären Rinderendothelzellen (bo-

vine capillary endothelial (BCE) cells) in Kollagen stimulieren und das Wachstum von menschlichen Endothelzellen fördern [siehe z.B. die Publikation der internationale Patentanmeldung Nr. WO 98/33917, die hier durch Inbezugnahme aufgenommen ist].

[0013] VEGF-D ist strukturell und funktionell am nächsten mit VEGF-C verwandt [siehe die Publikation der internationale Patentanmeldung Nr. WO 98/07832, durch Inbezugnahme hier aufgenommen]. Wie VEGF-C, wird VEGF-D anfänglich als Präpro-Peptid exprimiert, das einem N-terminalen und C-terminalen proteolytischen Processing unterzogen wird, und nichtkovalent verknüpfte Dimere bildet. VEGF-D stimuliert in vitro mitogene Reaktionen bei Endothelzellen. Während der Embryogenese wird VEGF-D in einem komplexen zeitlichen und räumlichen Muster exprimiert und seine Expression dauert in Herz, Lunge und Skelettmuskeln bei Erwachsenen an. Die Isolierung eines biologisch aktiven Fragments von VEGF-D, das als VEGF-D Δ N Δ C bezeichnet wird, ist in der Publikation der internationale Patentanmeldung Nr. WO 98/07832, die hier durch Inbezugnahme aufgenommen ist, beschrieben. VEGF-D Δ N Δ C besteht aus den Aminosäureresten 93 bis 201 von VEGF-D, geknüpft an das Affinitätsmarkerpeptid FLAG[®].

[0014] Vier weitere Mitglieder der VEGF-Unterfamilie sind bei Poxviren identifiziert worden, die Menschen, Schafe und Ziegen infizieren. Der Orf-Virus-kodierte VEGF-E und NZ-VEGF sind potente Mitogene und permeabilitätsverstärkende Faktoren. Beide zeigen ungefähr 25% Aminosäureidentität mit Säugetier-VEGF-A, und werden als Disulfid-verknüpfte Homodimere exprimiert. Die Infektion durch diese Viren ist gekennzeichnet durch eine pustuläre Dermatitis, die eine Endothelzellen-Proliferation und eine Gefäßpermeabilität beinhalten kann, die durch diese viralen VEGF-Proteine induziert wurde. [Ferrara, J Mol Med 77: 527–543 (1999); Stacker und Achen, Growth Factors 17: 1–11 (1999)]. VEGF-artige Proteine sind auch bei zwei weiteren Stämmen des Orf-Virus, D1701 [GenBank-Zugriffsnummer AF106020; beschrieben in Meyer et al, EMBO J 18: 363–374 (1999)] und NZ10 [beschrieben in der internationalen Patentanmeldung PCT/US99/25869, durch Inbezugnahme hier aufgenommen] identifiziert worden. Von diesen viralen VEGF-artigen Proteinen wurde gezeigt, dass sie VEGFR-2 binden, der auf Wirtsendothel vorhanden ist, und diese Bindung wichtig für die Infektionsentwicklung und die virale Induktion der Angiogenese ist [Meyer et al., EMBO J 18: 363–374 (1999); Internationale Patentanmeldung PCT/US99/25869].

PDGFR/VEGF-Rezeptoren

[0015] Sieben Zelloberflächenrezeptoren, die mit PDGF/VEGF-Familienmitgliedern Wechselwirken, sind identifiziert worden. Diese beinhalten PDGFR- α (siehe z.B., GenBank Zugr.-Nr. NM006206), PDGFR- β (siehe z.B., GenBank Zugr.-Nr. NM002609), VEGFR-1/Flt-1 (fms-artige Tyrosinkinase-1; GenBank Zugr.-Nr. X51602; De Vries et al., Science 255: 989–991 (1992)); VEGFR-2/KDR/Flk-1 (Kinase-Insertionsdomänen-haltiger Rezeptor/fötale Leberkinase-1; GenBank Zugr.-Nr. X59397 (Flk-1) und L04947 (KDR); Tennen et al., Biochem Biophys Res Comm 187: 1579–1586 (1992); Matthew et al., Proc Natl Acad Sci USA 88: 9026–9030 (1991)); VEGFR-3/Flt4 (fms-artige Tyrosinkinase 4; U.S.-Patent Nr. 5.776.755 und GenBank Zugr.-Nr. X68203 und 566407; Pajusola et al., Oncogene 9: 3545–3555 (1994)), Neuropilin-1 (GenBank Zugr.-Nr. NM003873), und Neuropilin-2 (GenBank Zugr.-Nr. NM003872). Die beiden PDGF-Rezeptoren vermitteln die Signalübertragung von PDGFs wie oben beschrieben. VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, VEGF-B, PlGF-1 und PlGF-2 binden VEGFR-1; VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E und NZ2-VEGF binden VEGFR-2; VEGF-C und VEGF-D binden VEGFR-3; VEGF₁₆₅, PlGF-2 und NZ2-VEGF binden Neuropilin-1; und VEGF₁₆₅ bindet Neuropilin-2. [Neufeld et al., FASEB J 13: 9–22 (1999); Stacker und Achen, Growth Factors 17: 1–11 (1999); Ortega et al., Fron Biosci 4: 141–152 (1999); Zachary, Intl J Biochem Cell Bio 30: 1169–1174 (1998); Petrova et al., Exp Cell Res 253: 117–130 (1999)].

[0016] Die PDGF-Rezeptoren sind Protein-Tyrosinkinaserzeptoren (PTKs), die fünf Immunglobulin-artige Schleifen in ihren extrazellulären Domänen aufweisen. VEGFR-1, VEGFR-2 und VEGFR-3 umfassen eine Untergruppe der PDGF-Unterfamilie von PTKs, die sich durch die Anwesenheit von sieben Ig-Domänen in ihrer extrazellulären Domäne und eine Split-Kinase-Domäne in der zytoplasmatischen Region unterscheiden. Sowohl Neuropilin-1 als auch Neuropilin-2 sind Nicht-PTK-VEGF-Rezeptoren. NP-1 besitzt einen extrazellulären Bereich, der eine MAN-Domäne; Homologieregionen zu den Gerinnungsfaktoren V und VIII, MFGPs und der DDR-Tyrosinkinase; und zwei CUB-artige Domänen beinhaltet.

[0017] Mehrere der VEGF-Rezeptoren werden in mehr als einer Isoform exprimiert. Eine lösliche Isoform von VEGFR-1, der die siebente Ig-artige Schleife, die Transmembrandomäne und die zytoplasmatische Region fehlt, wird in Endothelzellen humaner Nabelvenen exprimiert. Diese VEGFR-1-Isoform bindet VEGF-A mit hoher Affinität und ist in der Lage, VEGF-A-induzierte mitogene Reaktionen zu verhindern [Ferrara, J Mol Med 77: 527–543 (1999); Zachary, Intl J Biochem Cell Bio 30: 1169–1174 (1998)]. Eine C-terminal trunkierte Form

von VEGFR-2 ist ebenfalls beobachtet worden [Zachary, Intl J Biochem Cell Bio 30: 1169–1174 (1998)]. Beim Menschen existieren zwei Isoformen des VEGFR-3-Proteins, die sich in der Länge ihrer C-terminalen Enden unterscheiden. Studien legen nahe, dass die längere Isoform für die meisten biologischen Eigenschaften von VEGFR-3 verantwortlich ist.

[0018] Die Rezeptoren für die PDGFs, PDGF- α -Rezeptor (PDGFR- α) und der β -Rezeptor (PDGFR- β) werden in vielen in vitro angezogenen Zelllinien exprimiert, und werden in vivo hauptsächlich durch mesenchymale Zellen exprimiert (beschrieben in [Raines et al., Peptide growth factors and their receptors, Heidelberg, Springer-Verlag (1990)]). Wie oben erwähnt, bindet PDGF-B beide PDGFRs, während PDGF-A PDGFR- α selektiv bindet.

[0019] Gen-Targeting-Untersuchungen an Mäusen haben, ungeachtet der überlappenden Ligandenspezifitäten der PDGFRs, eindeutige physiologische Rollen für die PDGF-Rezeptoren ergeben [Rosenkranz et al., Growth Factors 16: 201–16 (1999)]. Homozygote Nullmutationen für einen der PDGF-Rezeptoren sind letal. PDGFR- α -defiziente Mäuse sterben während der Embryogenese bei e10 und zeigen unvollständigen Schädelabschluss, beeinträchtigte Neuralleistenentwicklung, Skelettdefekte und Ödeme. Die PDGFR- β -defizienten Mäuse entwickeln Phänotypen, die denen von Tieren mit PDGF-B-Mangel ähneln, die gekennzeichnet sind durch renale, hämatologische und kardiovaskuläre Abnormalitäten; wobei die renalen und kardiovaskulären Defekte zumindest teilweise auf das Fehlen einer geeigneten Rekrutierung von muralen Zellen (Gefäß-Glatt-muskelzellen, Perizyten oder mesangiale Zellen) zu Blutgefäßen zurückzuführen ist.

[0020] Die Expression von VEGFR-1 erfolgt hauptsächlich in Gefäßendothelzellen, obwohl einige auch auf Monozyten, Trophoblastenzellen und renalen mesangialen Zellen zugegen sein können [Neufeld et al., FASEB J 13: 9–22 (1999)]. Hohe Niveaus von VEGFR-1-mRNA werden auch in adulten Organen festgestellt, was darauf hindeutet, dass VEGFR-1 eine nicht mit dem Zellwachstum verbundene Funktion in ruhendem Endothel von reifen Gefäßen hat. VEGFR-1-/-Mäuse sterben in utero zwischen Tag 8,5 und 9,5. Obwohl sich bei diesen Tieren Endothelzellen entwickelten, war die Bildung funktionsfähiger Blutgefäße stark beeinträchtigt, was darauf hindeutet, dass VEGFR-1 an Zell-Zell- oder Zell-Matrix-Wechselwirkungen, die mit der Zellmigration verbunden sind, beteiligt ist. Kürzlich wurde gezeigt, dass Mäuse, die ein mutiertes VEGFR-1 exprimieren, bei dem lediglich die Tyrosinkinasedomäne fehlte, normale Angiogenese und normales Überleben zeigen, was darauf hindeutet, dass die Signalgebungsfähigkeit von VEGFR-1 nicht wesentlich ist [Neufeld et al., FASEB J 13: 9–22 (1999); Ferrara, J Mol Med 77: 527–543 (1999)].

[0021] Die VEGFR-2-Expression ähnelt derjenigen von VEGFR-1 darin, dass er allgemein im Gefäßendothel exprimiert wird, er ist jedoch auch in hämatopoetischen Stammzellen, Megakaryozyten und retinalen Vorläuferzellen vorhanden [Neufeld et al., FASEB J 13: 9–22 (1999)]. Obwohl die Expressionsmuster von VEGFR-1 und VEGFR-2 ausgedehnt überlappen, deuten Hinweise darauf hin, dass VEGFR-2 in den meisten Zelltypen der Hauptrezeptor ist, durch den die meisten der VEGFs ihre biologischen Aktivitäten ausüben. Die Untersuchung von Mausembryos mit einem VEGFR-2-Mangel zeigt darüber hinaus, dass dieser Rezeptor sowohl für die Endothelzelldifferenzierung als auch die Entwicklung von hämatopoetischen Zellen erforderlich ist [Joukov et al., J Cell Physiol 173: 211–215 (1997)].

[0022] VEGFR-3 wird während der frühen Embryogenese allgemein in Endothelzellen exprimiert. Im Verlauf späterer Stadien der Entwicklung wird die Expression von VEGFR-3 auf sich entwickelnde Lymphgefäße beschränkt [Kaipainen, A., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92: 3566–3570 (1995)]. Bei Adulten exprimieren lymphatische Endothelien und einige Hochendothelvenolen VEGFR-3, und eine erhöhte Expression tritt in lymphatischen Sinusen in metastatischen Lymphknoten und beim Lymphangiom auf. VEGFR-3 wird auch in einer Untergruppe von hämatopoetischen CD34⁺-Zellen exprimiert, die die myelopoetische Aktivität von VEGF-C vermitteln können, wie durch Überexpressionsstudien gezeigt wurde [WO 98/33917]. Zielgerichtete Zerstörung des VEGFR-3-Gens in Mausembryos führt zum Versagen der Remodellierung des primären Gefäßnetzwerks und zum Tod nach dem embryonalen Tag 9,5 [Dumont et al., Science, 282: 946–949 (1998)]. Diese Studien weisen auf eine wichtige Rolle für VEGFR-3 bei der Entwicklung der embryonalen Vaskulatur und auch während der Lymphangiogenese hin.

[0023] Strukturelle Analysen der VEGF-Rezeptoren deuten darauf hin, dass die VEGF-A-Bindungsstelle bei VEGFR-1 und VEGFR-2 in der zweiten und dritten Ig-artigen Schleife lokalisiert ist. Gleichermäßen sind die VEGF-C und VEGF-D-Bindungsstellen auf VEGFR-2 und VEGFR-3 ebenfalls innerhalb der zweiten Ig-Schleife enthalten [Taipale et al., Curr Top Microbiol Immunol 237: 85–96 (1999)]. Die zweite Ig-artige Schleife vermittelt auch die Ligandenspezifität, wie durch Domänenaustauschexperimente gezeigt wurde [Ferrara, J Mol Med 77: 527–543 (1999)]. Rezeptor-Liganden-Studien weisen darauf hin, dass durch Proteine der VEGF-Fa-

milie gebildete Dimere in der Lage sind, zwei VEGF-Rezeptormoleküle zu binden, wodurch VEGF-Rezeptoren dimerisiert werden. Die vierte Ig-artige Schleife bei VEGFR-1, und möglicherweise auch bei VEGFR-2, fungiert als Rezeptordimerisierungsdomäne, die zwei Rezeptormoleküle bei Bindung der Rezeptoren an ein Ligandendimer verknüpft [Ferrara, J Mol Med 77: 527–543 (1999)]. Obwohl die Regionen von VEGF-A, die VEGFR-1 und VEGFR-2 binden, weitgehend überlappen, ergaben Studien zwei separate Domänen innerhalb vom VEGF-A, die entweder mit VEGFR-1 oder VEGFR-2 interagieren, sowie spezifische Aminosäurereste innerhalb dieser Domänen, die für die Liganden-Rezeptor-Wechselwirkungen kritisch sind. Mutationen innerhalb einer VEGF-Rezeptor-spezifischen Domäne, die die Bindung eines bestimmten VEGF-Rezeptors spezifisch verhindern, sind ebenfalls entdeckt worden [Neufeld et al., FASEB J 13: 9–22 (1999)].

[0024] VEGFR-1 und VEGFR-2 sind strukturell ähnlich, haben gemeinsame Liganden (VEGF₁₇₁ und VEGF₁₆₅) und zeigen ähnliche Expressionsmuster während der Entwicklung. Die durch VEGFR-1 und VEGFR-2 durch denselben Liganden vermittelten Signale scheinen jedoch leicht unterschiedlich zu sein. Von VEGFR-2 wurde gezeigt, dass er in Reaktion auf VEGF-A eine Autophosphorylierung durchmacht, während eine Phosphorylierung von VEGFR-1 unter identischen Bedingungen jedoch kaum detektierbar. VEGFR-2-vermittelte Signale verursachen auffällige Veränderungen in der Morphologie, der Aktinreorganisation und der Membrankräuselung von Schweine-Aortaendothelzellen, die diesen Rezeptor rekombinant überexprimieren. In diesen Zellen vermittelte VEGFR-2 auch die ligandeninduzierte Chemotaxis und Mitogenität; wohingegen VEGFR-1-transfizierten Zellen mitogene Reaktionen auf VEGF-A fehlten. Mutationen in VEGF-A, die die Bindung an VEGFR-2 zerstören, induzieren die Proliferation von Endothelzellen nicht, wohingegen VEGF-A-Mutanten, die hinsichtlich der Bindung an VEGFR-1 defizient sind, nach wie vor in der Lage sind, die endotheliale Proliferation zu fördern. Gleichmaßen führt die VEGFR-Stimulation von Zellen, die nur VEGFR-2 exprimieren, zu einer mitogenen Reaktion, wohingegen eine vergleichbare Stimulierung von Zellen, die nur VEGFR-1 exprimieren, auch zu einer Zellmigration führt, die Zellproliferation jedoch nicht induziert. Darüber hinaus unterscheiden sich Phosphoproteine, die mit VEGFR-1 und VEGFR-2 kopräzipitieren, was darauf hindeutet, dass verschiedene Signalmoleküle mit rezeptorspezifischen intrazellulären Sequenzen Wechselwirken.

[0025] Die sich daraus ergebende Hypothese ist, dass die primäre Funktion von VEGFR-1 bei der Angiogenese darin bestehen kann, die Aktivität von VEGF-A durch dessen Bindung negativ zu regulieren und auf diese Weise seine Wechselwirkung mit VEGFR-2 zu verhindern, wohingegen von VEGFR-2 angenommen wird, dass er der Hauptvermittler von VEGF-A-Signalen in Endothelzellen ist. Diese Hypothese wird dadurch unterstützt, dass Mäuse, die hinsichtlich VEGFR-1 defizient sind, als Embryos sterben, während Mäuse, die einen VEGFR-1-Rezeptor exprimieren, der in der Lage ist, VEGF-A zu binden, dem jedoch die Tyrosinkinasedomäne fehlt, überleben und keine anormale embryonale Entwicklung oder Angiogenese zeigen. Darüber hinaus zeigen Analysen von VEGF-A-Mutanten, die nur VEGFR-2 binden, dass sie die Fähigkeit bewahren, mitogene Reaktionen in Endothelzellen zu induzieren. Die VEGF-vermittelte Migration von Monozyten ist jedoch abhängig von VEGFR-1, was darauf hindeutet, dass die Signalübertragung durch diesen Rezeptor für zumindest eine biologische Funktion wichtig ist. Darüber hinaus ist die Fähigkeit von VEGF-A, die Reifung von dendritischen Zellen zu verhindern, auch verbunden mit der VEGFR-1-Signalübertragung, was darauf hindeutet, dass VEGFR-1 in anderen Zelltypen als Endothelzellen eine Funktion ausüben kann [Ferrara, J Mol Med 77: 527–543 (1999); Zachary, Intl J Biochem Cell Bio 30: 1169–1174 (1998)].

[0026] Neuropilin-1 wurde ursprünglich als ein Rezeptor für die Familie von Collapsin/Semaphorin-Proteinen, die an der Axonlenkung beteiligt sind, kloniert [Stacker und Achen, Growth Factors 17: 1–11 (1999)]. Es wird sowohl in Endothelien als auch spezifischen Untergruppen von Neuronen während der Embryogenese exprimiert, und es wird angenommen, dass es an der Koordination der Entwicklung des neuronalen und vaskulären Systems beteiligt ist. Obwohl die Aktivierung von Neuropilin-1 in Abwesenheit von Tyrosinkinase-Rezeptoren der VEGF-Familie keine biologischen Reaktionen auszulösen scheint, führt ihre Anwesenheit auf Zellen zur effizienteren Bindung von VEGF₁₆₅ und zu VEGFR-2-vermittelten Reaktionen [Neufeld et al., FASEB J 13: 9–22 (1999)].

[0027] Neuropilin-2 wurde durch Expressionsklonierung identifiziert und ist ein Collapsin/Semaphorin-Rezeptor, der eng mit Neuropilin-1 verwandt ist. Neuropilin-2 ist dahingehend ein Isoform-spezifischer VEGF-Rezeptor, dass er lediglich VEGF₁₆₅ bindet. Wie Neuropilin-1 wird Neuropilin-2 sowohl in Endothelien als auch bestimmten Neuronen exprimiert, und soll aufgrund seiner vergleichsweise kurzen intrazellulären Domäne nicht unabhängig fungieren. Die Funktion von Neuropilin-2 bei der Gefäßentwicklung ist unbekannt [Neufeld et al., FASEB J 73: 9–22 (1999); WO 99/30157].

[0028] Die Entdeckung von VEGF-A als Schlüsselregulator der Gefäßentwicklung hat die aktive Forschung unter Einsatz von VEGF-basierter therapeutischer Angiogenese in der kardiovaskulären Medizin sowie hinsichtlich der Behandlung von Krankheiten, die durch pathologische Angiogenese gekennzeichnet sind, mit VEGF-Antagonisten, angespornt. Die anschließende Identifikation weiterer VEGF-Proteine der VEGF-Familie und deren Rolle bei der Vaskularisierung haben auch zu der Entwicklung von Therapien geführt, die auf diesen Wachstumsfaktoren basieren [Ferrara und Alitalo, *Nature Med* 5: 1359–1364 (1999)]. Tierversuche zur Ischämie hinterer Gliedmaßen und Myokardischämie unter Verwendung von VEGF-A oder VEGF-C, zugeführt durch Verabreichung von rekombinantem Protein oder Gentransfer unter Verwendung nackter DNA oder adenoviraler Vektoren, bringen diese Moleküle in Verbindung mit der Förderung der Vaskularisierung und der Erhöhung des koronaren Blutflusses. Diese viel versprechenden Ergebnisse haben zu klinischen Versuchen geführt, bei denen Patienten mit Gliedmaßenischämie durch arteriellen oder intramuskulären Gentransfer nackter VEGF₁₆₅ kodierender DNA behandelt wurden. Patienten mit Myokardischämie oder Burger-Krankheit (Thromboangiitis obliterans) wurde ebenfalls lokal VEGF₁₅₅-Plasmid DNA injiziert. Obwohl diese Versuche nicht plazebokontrolliert waren, zeigten die Patienten klinische Verbesserungen und Hinweise auf Angiogenese in Ischämiegeweben. Versuche, die den Gentransfer von nackter VEGF-C-DNA oder Gentherapie mit VEGF₁₂₁ unter Verwendung adenoviraler Vektoren zur Behandlung von Patienten mit Myokardischämie einsetzen, befinden sich gegenwärtig in Phase I [Ferrara, *J Mol Med* 77: 527–543 (1999); Neufeld et al., *FASEB J* 13: 9–22 (1999); Ferrara und Alitalo, *Nature Med* 5: 1359–1364 (1999)]. Die therapeutischen Wirkungen der Verabreichung rekombinanten VEGF-A-Proteins werden auch in laufenden klinischen Versuchen getestet. Ergebnisse aus Phase-I-Studien von Patienten mit Koronarischemie, die mit einer intrakoronaren Infusion von rekombinantem VEGF₁₆₅ behandelt wurden, zeigen Hinweise auf eine verbesserte Perfusion und Kollateralisierung. Bei den anschließenden Phase-II-Studien zeigten die Patienten jedoch keine signifikante Verbesserung gegenüber der plazebokontrollierten Gruppe. Andere potentielle therapeutische Verwendungen für die VEGF-Wachstumsfaktoren beinhalten die Verwendung von VEGF-C zur Förderung der Lymphangiogenese bei Patienten, deren axilläre Lymphknoten bei einer Brustkrebsoperation entfernt wurden. Therapien unter Verwendung von Kombinationen von Wachstumsfaktoren zur Förderung der Vaskularisierung bei Geweben können sich ebenfalls als vorteilhaft bei der Behandlung bestimmter Krankheiten erweisen [Ferrara und Alitalo, *Nature Med* 5: 1359–1364 (1999)].

[0029] Therapien, die auf der Hemmung der Aktivität von VEGF-Wachstumsfaktoren basieren, werden getestet, um Krankheitszustände zu behandeln, die durch pathologische Angiogenese gekennzeichnet sind. Die VEGF-Expression wird bei den meisten menschlichen Tumoren, einschließlich primärem Brustkrebs und Magenkrebs, hochreguliert. Studien bei Mäusen zeigen, dass die Tumor-assoziierte Angiogenese und das Wachstum von Tumorzellen durch Behandlung der Tiere mit monoklonalen Antikörpern gegen VEGF-A gehemmt werden kann. Weitere Tierversuche zeigten, dass die Expression einer dominant negativen VEGFR-2-Mutante, die die Signalübertragung durch diesen Rezeptor verhindert, oder die Verabreichung von rekombinanten VEGFR-1- oder VEGFR-2-Mutanten, die lediglich den extrazellulären Teil dieser Rezeptoren enthalten, das Wachstum etlicher Tumorzelllinien supprimiert. Diese ermutigenden Ergebnisse führten zu klinischen Versuchen unter Verwendung humanisierter hochaffiner monoklonaler Antikörper gegen VEGF-A (rh-MAK VEGF) als VEGF-A-Inhibitoren. Phase-II-Studien unter Verwendung von rh-MAK-VEGF zur Behandlung des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms, kolorektalen Karzinoms, Brust- und Nierenzellkarzinoms laufen derzeit. Verbindungen, die auf die Hemmung der VEGF-C-Aktivität gerichtet sind, werden ebenfalls auf therapeutische Verwendung bei Krebspatienten getestet: kleinmolekulare Inhibitoren von VEGF-C befinden sich in Phase-II-Versuchen und monoklonale Antikörper gegen VEGF-C treten in klinische Versuche ein.

[0030] Retinopathie, die mit Diabetes mellitus, Verschluss der retinalen Vene oder Frühgeburten verbunden ist, ist mit erhöhten Niveaus von VEGF-A korreliert worden. Tierversuche unter Verwendung monoklonaler Antikörper gegen VEGF-A oder löslicher VEGFR-1- oder vor VEGFR-2-Mutanten, die lediglich die extrazelluläre Domäne enthalten, fusioniert an die Immunglobulin-γFc-Domäne, zeigen eine Suppression der retinalen Angiogenese. VEGF-A wird auch bei der altersbedingten Makuladegeneration (AMD) festgestellt, und seine Expression wird als Ursache für die Neovaskularisierung bei dieser Erkrankung angenommen. Die intravitreale Zufuhr von rekombinantem humanisierten Anti-VEGF-A-Fab-Antikörper-Fragment oder die Injektion von 2'Fluoropyrimidin-RNA-Oligonukleotid-Liganden (Aptameren) zur Behandlung von AMD befinden sich gegenwärtig in klinischen Versuchen. Verbindungen, die die Aktivität von VEGF-Wachstumsfaktoren hemmen, können auch verwendet werden, um andere Krankheitszustände zu behandeln, die eine anomale Angiogenese beinhalten. Diese beinhalten Ischämie/Reperfusionsbedingte Hirnödeme und -schäden, Zustände, die mit Ovarhyperplasie und Hypervaskularität verbunden sind, wie beispielsweise das polyzystische Ovarsyndrom, Endometriose und ovariell Hyperstimulationssyndrom [Ferrara und Alitalo, *Nature Med* 5: 1359–1364 (1999)].

[0031] Aus der vorstehenden Diskussion wird ersichtlich, dass die VEGF-Familie von Wachstumsfaktoren, und Inhibitoren davon, ein enormes Potenzial als Therapeutika aufweist. Zum Beispiel sind solche Wachstumsfaktoren und Inhibitoren nützlich zur Förderung oder Hemmung der Angiogenese, soweit erforderlich, wie beispielsweise bei der Behandlung von Ischämie-Funktionsstörungen, der Förderung der Wundheilung oder der Hemmung oder Behebung neoplastischer Funktionsstörungen, die Angiogenese-abhängig sind. Die verschiedenen natürlich vorkommenden Mitglieder dieser Wachstumsfaktorfamilie binden jedoch oftmals mehrere Rezeptoren, und die verschiedenen bekannten Rezeptoren werden von mehreren Zelltypen exprimiert und weisen Expressionsmuster auf, die in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium und der Anwesenheit oder Abwesenheit pathologischer Zustände variieren können. Die biologischen Wirkungen jedes einzelnen Wachstumsfaktors können rezeptorabhängig, isoformabhängig und zelltypabhängig sein. Eine durch einen Rezeptor vermittelte wünschenswerte therapeutische Wirkung kann von unerwünschten Nebenwirkungen begleitet sein, die durch einen anderen Rezeptor vermittelt werden. Alternativ kann eine gewünschte therapeutische Wirkung durch Stimulation mehrerer Rezeptoren verstärkt werden, die mit einem einzelnen bekannten Wachstumsfaktor, der in der Natur auftritt, nicht simuliert werden kann. Es besteht daher ein Bedarf an neuen Peptid-Wachstumsfaktoren mit ihrem eigenen einzigartigen Profil rezeptorbindender und rezeptorstimulierender oder rezeptorhemmender Aktivitäten.

[0032] Die vorliegende Erfindung befriedigt die oben angegebenen Bedürfnisse durch Bereitstellung neuer Polypeptid-bindender Moleküle für natürlich vorkommende vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktorrezeptoren und Polynukleotide, die die neuen Polypeptide kodieren und für die rekombinante Expression der Polypeptide nützlich sind. Für die Zwecke der Beschreibung der Erfindung wird der Ausdruck "vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor" und die Abkürzung "VEGF" (ohne Modifikator) hier in einem allgemeinen Sinne verwendet, um jedes Polypeptid aus einer Wachstumsfaktorfamilie zu beschreiben, einschließlich, aber nicht beschränkt auf den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor A (VEGF-A), vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor B (VEGF-B), vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor C (VEGF-C), vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor D (VEGF-D), Plättchen-Wachstumsfaktor A (PDGF-A), Plättchen-Wachstumsfaktor B (PDGF-B), Plazentawachstumsfaktor (PIGF) und viral kodierte VEGF-artige Moleküle. VEGF-A wird im Stand der Technik allgemein als "vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor" oder als "VEGF" bezeichnet, wird hier jedoch aus Gründen der Klarheit als VEGF-A bezeichnet oder in spezifischen Isoformen (zum Beispiel VEGF₁₆₅) von VEGF-A angegeben.

[0033] In einem ersten Aspekt der Erfindung wird ein Polypeptid bereitgestellt, das eine Aminosäuresequenz umfasst, die zu mindestens 95% identisch zu den in der SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 63 oder SEQ ID NO: 163 angegebenen Aminosäuren 1–102 ist, wobei das Polypeptid an mindestens einen Rezeptor bindet, der ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus menschlichem VEGFR-1, menschlichem VEGFR-2 und menschlichem VEGFR-3.

[0034] Ein zweiter Aspekt der Erfindung stellt ein Polypeptid bereit, das eine Aminosäuresequenz umfasst, die zu mindestens 95% identisch zu den in der SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 153, SEQ ID NO: 165, SEQ ID NO: 167, SEQ ID NO: 169, SEQ ID NO: 173 oder SEQ ID NO: 175 angegebenen Aminosäuren 1–104 ist, wobei die Polypeptide an mindestens einen Rezeptor binden, der ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus menschlichem VEGFR-1, menschlichem VEGFR-2 und menschlichem VEGFR-3.

[0035] Ein dritter Aspekt der Erfindung stellt ein Polypeptid bereit, das eine Aminosäuresequenz umfasst, die zu mindestens 95% identisch zu den in der SEQ ID NO: 155, SEQ ID NO: 157 oder SEQ ID NO: 159 angegebenen Aminosäuren 1–105 ist, wobei das Polypeptid an genau einen Rezeptor bindet, der ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus menschlichem VEGFR-1, menschlichem VEGFR-2 und menschlichem VEGFR-3.

[0036] Ein vierter Aspekt der Erfindung stellt ein Polypeptid bereit, das eine Aminosäuresequenz umfasst, die zu mindestens 95% identisch zu den in der SEQ ID NO: 161 angegebenen Aminosäuren 1–103 ist, wobei das Polypeptid an menschlichen VEGFR-1, menschlichen VEGFR-2 und menschlichen VEGFR-3 bindet.

[0037] Ein fünfter Aspekt der Erfindung stellt ein Hybrid-Polypeptid bereit, das eine Aminosäuresequenz umfasst, die zumindestens 95% identisch zu dem Expressionsprodukt des Klons Nummer 11.9 (SEQ ID NO: 433), 11.13 (SEQ ID NO: 945), 12.16 (SEQ ID NO: 1185), 13.9 (SEQ ID NO: 465), 13.11 (SEQ ID NO: 529), 13.13 (SEQ ID NO: 977), 13.15 (SEQ ID NO: 1041), 14.1 (SEQ ID NO: 193), 14.5 (SEQ ID NO: 705), 14.7 (SEQ ID NO: 769), 22.3 (SEQ ID NO: 303), 22.4 (SEQ ID NO: 431), 23.12 (SEQ ID NO: 671), 23.14 (SEQ ID NO: 1119), 32.9 (SEQ ID NO: 485), 32.11 (SEQ ID NO: 549), 32.15 (SEQ ID NO: 1061), 32.16 (SEQ ID NO: 1189), 33.1 (SEQ ID NO: 213), 33.3 (SEQ ID NO: 277), 33.9 (SEQ ID NO: 469), 43.1 (SEQ ID NO: 219), 52.9 (SEQ ID NO:

487), 52.11 (SEQ ID NO: 551), 52.14 (SEQ ID NO: 1127), 53.1 (SEQ ID NO: 215), 53.7 (SEQ ID NO: 791), 61.3 (SEQ ID NO: 249), 62.1 (SEQ ID NO: 233), 62.8 (SEQ ID NO: 937), 62.10 (SEQ ID NO: 617), 62.13 (SEQ ID NO: 1001), 63.3 (SEQ ID NO: 281), 63.6 (SEQ ID NO: 857), 73.7 (SEQ ID NO: 797), 73.15 (SEQ ID NO: 1053), 74.8 (SEQ ID NO: 909), 74.10 (SEQ ID NO: 589), 74.12 (SEQ ID NO: 653), 81.9 (SEQ ID NO: 435), 81.13 (SEQ ID NO: 947), 82.5 (SEQ ID NO: 739), 82.14 (SEQ ID NO: 1123), 82.16 (SEQ ID NO: 1187), 83.9 (SEQ ID NO: 467), 83.13 (SEQ ID NO: 979), 84.1 (SEQ ID NO: 195) oder 84.5 (SEQ ID NO: 707) ist, wobei das Polypeptid an genau einen Rezeptor bindet, der ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus menschlichem VEGFR-1, menschlichem VEGFR-2 und menschlichem VEGFR-3.

[0038] Ein Polynukleotid, ein Vektor oder eine Wirtszelle, umfassend eine Nukleotidsequenz, die ein Polynukleotid gemäß einer der hinsichtlich des ersten bis fünften Aspekts der Erfindung aufgeführten Sequenzen kodiert, ist ebenfalls vorgesehen.

[0039] Der Begriff "natürlich vorkommendes Vertebraten-Gefäßendothelwachstumsfaktor-Polypeptid" bezeichnet Polypeptide mit den folgenden Eigenschaften:

- (1) das Polypeptid wird durch genomische DNA eines Wirbeltieres kodiert (zum Beispiel ein Reptil, Amphib, Vogel oder Säugetier, vorzugsweise ein Vogel oder Säugetier, am meisten bevorzugt ein Säugetier; insbesondere ein Primaten-Säugetier wie beispielsweise ein Affe, Menschenaffe oder Mensch) oder wird durch das Genom eines Vertebratenpathogens wie beispielsweise eines Säugetier-Poxvirus kodiert;
- (2) das Polypeptid umfasst vollständig oder teilweise eine Aminosäuresequenz, die durch einen Vertebraten exprimiert wird (d.h. von der Transkription/Translation der genomischen Vertebraten-DNA oder von viral induzierter Transkription/Translation im Falle von Polypeptiden, die durch virale Nukleinsäuren kodiert werden);
- (3) das Polypeptid oder der Teil umfasst eine VEGF/PDGF-Homologiedomäne (V/PHD) von etwa 70–150 Aminosäuren, die an natürlich vorkommende Rezeptoren bindet, und die teilweise gekennzeichnet ist durch das Aminosäuremotiv C-X(18-28)-P-X-C-X(4)-R-C-X-G-C(1-2)-X(6-12)-C-X(30-46)-C (SEQ ID NO: 1202), wobei X eine beliebige Aminosäure repräsentiert, und Ziffern in Klammern einen erlaubten Bereich von Aminosäuren repräsentieren (z.B. repräsentiert X(18–28) einen Abschnitt von 18–28 beliebigen Aminosäuren; C(1–2) repräsentiert eine oder zwei Cysteinreste). Die V/PHD beinhaltet im allgemeinen acht konservierte Cysteine, die ein Cystein-Knoten-Motiv bilden, ähnlich demjenigen das bei den menschlichen vaskulären endothelialen Wachstumsfaktoren A, B, C und D (VEGF-A, -B, -C und -D) und bei menschlichen Plättchenwachstumsfaktoren (PDGFs) gefunden wird. Bevorzugte Polypeptide oder Teile umfassen V/PHD, das durch das speziellere Aminosäuremotiv C-X(22-24)-P-[PSR]-C-V-X(3)-R-C-X-G-C-C-X(6)-C-X(32-41)-C (SEQ ID NO: 1203) gekennzeichnet ist, wobei die Aminosäuren in eckigen Klammern (z.B. [PSR]) Alternativen für eine einzelne Position in der Aminosäuresequenz repräsentieren; und
- (4) das Polypeptid bindet an mindestens einen Zelloberflächenrezeptor, der auf Endothelzellen exprimiert wird, die Vertebraten-Blut- oder -Lymphgefäße auskleiden oder Perizyten/Glattmuskelzellen, die Blutgefäße auskleiden und stützen. Bevorzugte Polypeptide binden an mindestens einen Zelloberflächenrezeptor, der auf Endothelzellen exprimiert wird.

[0040] Der Begriff "natürlich vorkommende Vertebraten-VEGF-Polypeptide" bedeutet daher Polypeptide, die bestimmte spezifizierte strukturelle und funktionelle Eigenschaften besitzen. Der Begriff soll in diesem Zusammenhang keine Herkunftsquelle implizieren. Rekombinant hergestellte Polypeptide, die die oben genannten Kriterien erfüllen, weil sie eine Aminosäuresequenzen oder rezeptorbindende Eigenschaften von VEGF-Polypeptiden aufweisen, die in der Natur vorkommen, werden daher als "natürlich vorkommend" angesehen. Zahlreiche beispielhafte natürlich vorkommende vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor-Polypeptide sind bereits im Stand der Technik bekannt, einschließlich, aber nicht beschränkt auf humanen vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor A (VEGF-A), vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor B (VEGF-B) vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor C (VEGF-C), vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor D (VEGF-D), Plättchenwachstumsfaktor A (PDGF-A), Plättchenwachstumsfaktor B (PDGF-B), Plazentawachstumsfaktor (PIGF); Säugetier- und Vogel-Orthologa davon (wobei der Begriff "ortholog" speziehomolog bedeutet); und vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor E (VEGF-E), NZ2 VEGF und die beiden in den Stämmen D1701 und NZ10 identifizierten VEGF-artigen Proteine, die in Poxviren identifiziert wurden. Die Verwendung natürlich vorkommender humaner VEGFs ist bevorzugt für die Zwecke der Entwicklung chimärer Moleküle, die als Humantherapeutika geeignet sind, um die Wahrscheinlichkeit für die Entwicklung von Chimerika zu minimieren, die eine Immunantwort beim Menschen erzeugen. In vielen Fällen besteht jedoch eine sehr hohe Homologie zwischen VEGF-Speziesorthologa, insbesondere in rezeptorbindenden Domänen, und es ist vorgesehen, dass nicht-menschliche natürlich vorkommende VEGFs ebenfalls verwendet werden können, um chimäre Moleküle zur Verwendung bei der Behandlung von Menschen zu erzeugen.

[0041] Chimäre Polypeptide können aus jedem Paar oder aus drei oder vier oder mehr der hier beschriebenen VEGFs oder deren Speziesorthologa abgeleitet sein.

[0042] Der Ausdruck "chimär" erfordert, dass die Aminosäuresequenz des chimären Moleküls mindestens einen Abschnitt aus ein oder mehreren Aminosäuren (vorzugsweise Abschnitte von 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 oder mehr Aminosäuren) aus jedem der natürlich vorkommenden VEGFs, aus denen sie abgeleitet sind, beinhaltet. Das chimäre Polypeptid ist daher ein "Hybrid" oder "Mosaik" aus zwei oder mehr Polypeptiden. Mit "chimär" ist gemeint, dass das erfindungsgemäße Polypeptid nicht identisch ist zu irgend einer natürlich vorkommenden VEGF-Sequenz (oder einem Fragment einer natürlichen VEGF-Sequenz).

[0043] Der Begriff "abgeleitet von" (wie in "abgeleitet von zwei oder mehr natürlich vorkommenden VEGF-Polypeptiden") bedeutet, dass, wenn die Aminosäuresequenzen des chimären Polypeptids und die zwei oder mehr natürlich vorkommenden VEGFs unter Verwendung eines Standardalgorithmus aliniert werden, im Wesentlichen alle Aminosäuren in dem chimären Polypeptid mit einem identischen Rest in einem oder mehreren der natürlich vorkommenden VEGFs aliniert sind, aus denen das chimäre Molekül abgeleitet wurde.

[0044] Standard-Proteinalinierungsalgorithmen, zum Beispiel das Clustal-Verfahren [Nucl Acids Res 22: 4673–80 (1994)], das Jotun-Hein-Verfahren [Methods Enzymol 183: 626–645 (1990)] oder das Feng-Doolittle-Verfahren [J Mol Evol 25: 351–360 (1987)], können verwendet werden, um natürlich vorkommende Vertebraten-Gefäßendothelwachstumsfaktor-Polypeptide zu alinieren, wobei solche Alinierungen durch die Anwesenheit der acht hochkonservierten Cysteine, die über die V/PHD verteilt sind, stark erleichtert wird. Es kann daher auf einfache Weise festgestellt werden, dass ein chimäres Polypeptid von zwei oder mehr natürlich vorkommenden VEGFs "abgeleitet" ist, indem eine Alinierung unter Verwendung allgemein anerkannter Protein-Alinierungsalgorithmen durchgeführt wird. Wenn nach Alinierung der Aminosäuresequenzen eines chimären Polypeptids und zweier oder mehr natürlich vorkommender VEGFs unter Verwendung eines beliebigen Standardalgorithmus im wesentlichen alle Aminosäuren in dem chimären Polypeptid mit einem identischen Rest in einem oder mehr der natürlich vorkommenden VEGFs aliniert wurden, dann wurde das chimäre Polypeptid von den natürlich vorkommenden VEGFs abgeleitet.

[0045] Die Verwendung des Begriffs "im Wesentlichen alle" spiegelt die Tatsache wieder, dass hier beschriebene Techniken zur Herstellung chimärer Polypeptide manchmal Mutationen wie beispielsweise Insertionen, Deletionen oder Substitutionen einführen, wodurch 100% Korrelation zu den Elternsequenzen verhindert wird. In solchen Fällen alinieren mindestens etwa 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% der Reste des chimären Polypeptids mit identischen Resten von mindestens einem der natürlichen VEGFs.

[0046] Wenn dem Fachmann ein chimäres Polypeptid präsentiert wird, das perfekt oder im Wesentlichen mit den natürlichen VEGF-Polypeptiden, aus denen es abgeleitet wurde, aliniert, liegt es innerhalb seines Fachkönnens, absichtlich Mutationen (insbesondere konservative Mutationen) in das chimäre Polypeptid einzuführen und solch ein modifiziertes chimäres Polypeptid auf sein Rezeptorbindungsprofil zu untersuchen.

[0047] In Zusammenhang mit solchen chimären Polypeptiden bedeutet der Begriff "mehrere Peptiduntereinheiten" zwei oder mehr Peptiduntereinheiten. Beispielhaft angegeben sind hier chimäre Polypeptide, die erhalten wurden durch Fragmentierung zweier natürlich vorkommender VEGF-cDNAs (humaner VEGF-A und humaner VEGF-C) zu neun Untereinheiten von jeweils etwa 8–16 Kodons, Rekombinieren dieser Fragmente zu allen 512 Permutationen dieser neun Untereinheiten (unter Beibehaltung der Untereinheitenreihenfolge) und Exprimieren der erhaltenen chimären cDNAs. Die Anzahl und Größe der Fragmente wird nicht als kritisches Merkmal angesehen. Wie hier beispielhaft beschrieben, werden die "Untereinheiten" durch Peptidbindungen zur Bildung einer Polypeptidkette verbunden.

[0048] In Zusammenhang mit chimären erfindungsgemäßen chimären Polypeptiden oder natürlich vorkommenden VEGF-Polypeptiden bedeutet die Feststellung des "Gefäßendothel-Wachstumsfaktorrezeptor-Bindungsprofils" die Feststellung der Rezeptoren, an die ein Polypeptid bindet, und der Rezeptoren, an die es nicht bindet. Bekannte VEGF-Rezeptoren, einschließlich VEGFR-1, VEGFR-2 und VEGFR-3, werden hier anderweitig in größerer Ausführlichkeit beschrieben. Bekannte PDGF-Rezeptoren werden hier ebenfalls an anderer Stelle in größerer Ausführlichkeit beschrieben. Wenn ein chimäres Polypeptid teilweise aus einer natürlich vorkommenden PDGF-Sequenz abgeleitet wurde, ist die Untersuchung des chimären Polypeptids auf die Bindung an PDGF-Rezeptoren als Teil der Feststellung des Rezeptorbindungsprofils vorgesehen). Als Beispiel sei genannt, dass, wenn ein chimäres Polypeptid von einem VEGF-A abgeleitet wurde, das an VEGFR-1 und VEGFR-2 bindet, und von einem VEGF-C, das an VEGFR-2 und VEGFR-3 bindet, das chimäre Polypeptid ein

anderes Rezeptorbindungsprofil als seine beiden Elternmoleküle aufweist, wenn es lediglich einen der drei Rezeptoren bindet, oder wenn es an alle drei Rezeptoren bindet oder wenn es an VEGFR-1 und VEGFR-3, nicht jedoch an VEGFR-2 bindet.

[0049] Das Screening von erfindungsgemäßen Polypeptiden auf die Bindung an die Neuropiline NP-1 und NP-2 ist nicht als Teil der Rezeptorbindungsprofilbestimmung vorgesehen, da die für die NP-1- und NP-2-Bindung verantwortlichen Bereiche von VEGF (und anderen Familienmitgliedern) Bereiche außerhalb der V/PHD-Kernregion sind. Die NP-1-Bindung wird vermittelt durch die Aminosäurereste 142 bis 185 der SEQ ID NO: 2 für VEGF-A und der Aminosäurereste 138 bis 182 für VEGF-B [Soker et al., J Biol Chem 271: 5761–7 (1996); Makinen et al., J Biol Chem 274: 21217–22 (1999)]. Wie unten erläutert, ist die Hinzufügung von Sequenzen stromabwärts oder stromaufwärts zu erfindungsgemäßen chimären Polypeptiden vorgesehen, und von einigen hinzugefügten Sequenzen ist vorgesehen, dass sie zu einer NP-1- oder NP-2-Bindung führen.

[0050] Es wird davon ausgegangen, dass die vorliegende Erfindung die erste Offenbarung eines Polypeptids bereitstellt, das in der Lage ist, an VEGFR-1, VEGFR-2 sowie VEGFR-3 zu binden. Alle Polypeptide, die dieses Rezeptorbindungsprofil aufweisen, werden als in den Bereich der Erfindung fallend angesehen.

[0051] Natürlich vorkommende VEGF-Polypeptide binden ihre jeweiligen Rezeptoren im allgemeinen mit hoher Affinität, was in diesem Zusammenhang im allgemeinen dahingehend verstanden wird, dass eine Bindung mit einer subnanomolaren Dissoziationskonstante gemeint ist. Beispielsweise bindet VEGF-A VEGFR-1 und VEGFR-2 mit einer K_d von ungefähr 16 pM beziehungsweise 760 pM; und VEGF-C bindet VEGFR-2 und VEGFR-3 mit einer K_d von ungefähr 410 pM beziehungsweise 135 pM. Da es möglich ist, ein therapeutisches Wachstumsfaktorprotein zu verabreichen, um Konzentrationen zu erreichen, die normale Serumkonzentrationen übersteigen, und solche Polypeptide so zu formulieren, dass ihre biologische Halbwertszeit erhöht ist, wird davon ausgegangen, dass chimäre Polypeptide, die eine niedrigere Rezeptoraffinität (d.h. höhere Dissoziationskonstante) aufweisen, nichtsdestotrotz als Rezeptoragonisten und -antagonisten geeignet sein werden. Für die Zwecke der Bewertung der Rezeptorbindung von chimären Polypeptiden wird ein Grenzwert bei einer Dissoziationskonstante von 50 nanomolar gewählt. Chimäre Polypeptide, die einen Rezeptor mit einer Dissoziationskonstante von weniger als 50 nanomolar binden, festgestellt durch ein beliebiges konventionelles oder anerkanntes Verfahren, wie jene, die in Coligan et al., Current Protocols in Protein Science, Vol. 2, New York, John Wiley & Sons, Inc., S. A.5 A.1–A.5 A.40 (1998), beschrieben sind, wird als an einen Rezeptor bindend gewertet, und Polypeptide mit geringeren Affinitäten werden als nichtbindend gewertet.

[0052] Es ist in der Literatur gut bekannt, dass natürlich vorkommende VEGF als Spleißvarianten und/oder als Präprotein-Moleküle und/oder als Präpro-Proteinmoleküle exprimiert werden, die einem proteolytischen Processing unterzogen werden. Erfindungsgemäße chimäre Polypeptide beinhalten chimäre (hybride) Rezeptorbindungsdomänen, wie in den vorstehenden Absätzen erläutert, und können optional zusätzliche Stromauf- oder Stromab-Sequenzen aus natürlich vorkommenden VEGFs beinhalten, einschließlich Stromauf- und Stromab-Sequenzen, die in reifen Isoformen von natürlich vorkommenden zirkulierenden VEGFs vorhanden sind; und/oder Stromauf- oder Stromab-Propeptidsequenzen, die während des normalen intrazellulären oder extrazellulären Processings entfernt werden. Zur Veranschaulichung: die in Beispiel 1 beschriebenen Polypeptide wurden unter Verwendung der Reste 34–135 (SEQ ID NO: 2) von VEGF-A und unter Verwendung von 112–216 von humanem Präpro-VEGF-C (SEQ ID NO: 22) hergestellt. Erfindungsgemäße chimäre Polypeptide beinhalten die Peptide, die tatsächlich als Beispiele angegeben sind, und beinhalten auch solche Peptide, die durch Hinzufügung von Stromauf- oder Stromab-VEGF-A- oder -VEGF-C-Sequenzen aus SEQ ID NO: 2 oder 22 modifiziert wurden. Hinsichtlich chimärer VEGF-A-/VEGF-C-Polypeptide, wie sie hier beispielhaft beschrieben sind, ist insbesondere die Hinzufügung von Stromauf- und Stromab-Sequenzen, die mit amino- und/oder carboxyterminalen Sequenzen übereinstimmen, die für natürliche VEGF-A- oder VEGF-C-Isoformen charakteristisch sind, vorgesehen.

[0053] Es ist in der Literatur auch sehr gut bekannt, Proteine mit einem Initiator-Methionin, mit einem heterologen Signalpeptid, mit einer oder mehr Markersequenzen zur Erleichterung der Aufreinigung, als Fusionen mit anderen Polypeptiden und dergleichen rekombinant zu exprimieren. Es ist ebenfalls gut bekannt, Polypeptide durch Glykosylierung, Pegylierung oder andere Modifikationen, von denen einige die Stabilität, die Zirkulationshalbwertszeit verbessern oder (im Falle der Glykosylierung) das Polypeptid endogenen vaskulären endothelialen Wachstumsfaktoren ähnlicher machen können. Chimäre Polypeptide gemäß der Erfindung können beliebige solcher Modifikationen und Hinzufügungen zu der aus zwei oder mehr natürlich vorkommenden Invertebraten-Gefäßendothelwachstumsfaktor-Polypeptiden abgeleiteten Aminosäuresequenz umfassen.

[0054] Es wird erwartet, dass eine erhöhte Rezeptorbindungsaffinität mit größerer Potenz als Rezeptorakti-

vator oder -inhibitor korreliert. Im allgemeinen sind die durch ein beliebiges anerkanntes Verfahren bestimmten Dissoziationskonstanten (K_d) ein Hinweis auf die Rezeptoraffinität, wobei eine niedrigere K_d auf eine größere Bindungsaffinität hinweist.

[0055] Die EC_{50} , oder die halbwirksame Konzentration, ist die Konzentration, die 50% der maximalen Wirkung erzeugt. Ein beispielhafter Test für die Bestimmung der EC_{50} eines mutmaßlichen Liganden für einen bestimmten Rezeptor ist unten in Beispiel 6 erläutert.

[0056] Das unten erläuterte Beispiel stellt eine Beschreibung für die Synthese und Testung zahlreicher spezifischer Hybrid-Polypeptide bereit.

[0057] Anfängliche Untersuchungen deuten darauf hin, dass die folgenden spezifischen Konstrukte (unten im Detail beschrieben) an genau einen Rezeptor binden, der ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus humanem VEGFR-1, humanem VEGFR-2 und humanem VEGFR-3: 82-14, 82-16, 22-3, 72-6, 12-14, 12-16, 32-11, 32-14, 32-15, 32-16, 52-9, 52-11, 52-14, 52-15, 14-7, 23-10, 23-12, 23-14, 33-1, 33-3, 33-6, 33-9, 53-1, 53-3, 53-7, 62-8, 62-10, 62-13, 63-3, 63-6, 73-7, 73-15, -8, 74-10, 74-12, 11-9, 11-13, 12-1, 12-5, 81-9, 81-13, 13-9, 13-11, 13-13, 13-15, 14-1, 14-5, 41-1, 43-1, 83-9, 83-13, 83-15, 61-1, 61-3, 62-1, 82-5, 84-1, 84-5.

[0058] Anfängliche Untersuchungen deuten darauf hin, dass die folgenden spezifischen Konstrukte an VEGFR-1 und VEGFR-3, nicht jedoch an VEGFR-2 binden: 12-9, 12-13, 14-9, 82-9, 82-13, 84-9.

[0059] Anfängliche Untersuchungen deuten darauf hin, dass die folgenden spezifischen Konstrukte an VEGFR-1, VEGFR-2 und VEGFR-3 binden: 12-7, 12-11, 82-11, 84-11.

[0060] Wie in größerer Ausführlichkeit unten beschrieben, scheint das vierte Fragment (X_4) Reste zu beinhalten, die für die Vermittlung der VEGFR-3-Bindungsaffinität wichtig sind. Die Fragmente 5 und 8 von VEGF-C scheinen ebenfalls zur VEGFR-3-Bindung beizutragen. Gleichmaßen deuten die Daten darauf hin, dass die Fragmente 2 und 7 von VEGF-A zur VEGFR-1 Bindung beitragen.

[0061] Die unten beschriebenen Rekombinationsexperimente zur Erzeugung von Hybridmolekülen wurden nur mit Rezeptorbindungsdomänen von humanem VEGF-A und VEGF-C durchgeführt statt mit Sequenzen, die den natürlichen sekretierten Formen von VEGF-A und VEGF-C oder Präprotein- oder Präpro-Protein-Sequenzen entsprechen. Routinemäßige rekombinante DNA-Techniken, wie sie beispielsweise in Ausubel, et al. (Hrsg.), *Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons (1994–1999) oder Sambrook et al., (Hrsg.), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, New York (1989), beschrieben sind, können verwendet werden, um Polynukleotide, die die Hybridproteine kodieren, mit Polynukleotiden, die VEGF-A- oder VEGF-C-Sequenzen kodieren, die in natürlich vorkommenden Proteinen stromaufwärts oder stromabwärts von der rezeptorbindenden Domäne gefunden werden, insbesondere Sequenzen, die in natürlich vorkommenden sekretierten und zirkulierenden Formen von VEGF-A oder VEGF-C gefunden werden, zu verbinden.

[0062] Die Erfindung stellt Hybridpolypeptide wie oben beschrieben bereit, wobei das Polypeptid darüber hinaus ein oder mehrere Aminosäuresequenzen beinhaltet, die ausgewählt sind aus der Gruppe, bestehend aus einem Präpro-VEGF-C-Signalpeptid, einem aminoterminalen Präpro-VEGF-C-Propeptid und einem carboxyterminalen Präpro-VEGF-C-Propeptid.

[0063] Die Expression von erfindungsgemäßen Polypeptiden ist jedoch nicht beschränkt auf die Expression nur mit natürlich vorkommenden flankierenden VEGF-A- oder VEGF-C-Sequenzen. Die Expression von erfindungsgemäßen Polypeptiden in Bakterien kann erreicht werden durch Einfügen eines Initiator-Methionins oder -Methionin-Lysins stromaufwärts von den Hybrid-VEGF-Sequenzen, wohingegen die Expression und Sekretion bei Säugetierzellen am einfachsten dadurch erreicht wird, dass zumindest ein Signalpeptid eingefügt wird.

[0064] Die Expression von erfindungsgemäßen Polypeptiden als Fusionen mit anderen heterologen Sequenzen wie beispielsweise Markersequenzen zur Erleichterung der Aufreinigung oder die Expression als Teil eines größeren Fusionspeptids ist ebenfalls vorgesehen. Ein beispielhafter Marker dieses Typs ist eine Polyhistidinsequenz von im Allgemeinen etwa sechs Histidin-Resten, die die Isolierung einer solchermaßen markierten Verbindung unter Einsatz von Nickel-Chelatbildung ermöglicht. Andere Kennzeichnungen und Marker wie beispielsweise der FLAG®-Marker (Eastman Kodak, Rochester, NY), die gut bekannt und routinemäßig im Stand der Technik verwendet werden, sind von der Erfindung umfasst. Beispielhafte Fusionen beinhalten die Verwendung von kommerziell erhältlichen Vektoren, die ein gewünschtes Polypeptid als Teil eines Glutathion-S-trans-

ferase(GST)-Fusionsproduktes exprimieren. Nach der Abspaltung der GST-Komponente von dem gewünschten Polypeptid kann ein zusätzlicher Glycinrest an Position –1 verbleiben. Varianten, die sich durch Expression in anderen Vektorsystemen ergeben, sind ebenfalls vorgesehen.

[0065] Mittels des hier beschriebenen Rezeptorbindungs- und -aktivitätstests stellt die vorliegende Erfindung auch Varianten (Analoge) der erfindungsgemäßen Hybridpolypeptide bereit, wobei ein oder mehrere Aminosäuren der Hybridpeptid-Aminosäuresequenz addiert, deletiert oder durch eine andere Aminosäure substituiert wurde, und wobei das Hybrid die rezeptorbindenden und/oder eine biologische Aktivität, die für das Hybridpolypeptid charakteristisch ist, bewahrt.

[0066] Substitutionsvarianten, bei denen hauptsächlich konservative Substitutionen eingeführt wurden (z.B. durch Modifikationen von Polynukleotiden, die erfindungsgemäße Polypeptide kodieren) sind als Äquivalente von erfindungsgemäßen Hybridpolypeptiden vorgesehen. Aminosäuren können nach ihren physikalischen Eigenschaften und ihrem Beitrag zur sekundären und tertiären Proteinstruktur klassifiziert werden. Als eine konservative Substitution wird im Stand der Technik ein Austausch einer Aminosäure durch eine andere Aminosäure angesehen, die ähnliche Eigenschaften aufweist. Beispielhafte konservative Austausche auf Basis der Aminosäureseitenketteneigenschaften sind in der unmittelbar folgenden Tabelle unter Verwendung der Standard-Ein-Buchstaben-Abkürzungen dargelegt.

Seitenketteneigenschaft	Aminosäure
Aliphatisch	
unpolar	G, A, P, I, L, V
polar – ungeladen	C, S, T, M, N, Q
polar – geladen	D, E, K, R
Aromatisch	F, W, Y
Andere	N, Q, D, E

[0067] Alternativ können konservative Aminosäuren wie in Lehninger [Biochemistry, Zweite Auflage; Worth Publishers, Inc. NY: NY (1975), S. 71–77] beschrieben gruppiert werden, wie in der unmittelbar folgenden Tabelle dargestellt ist.

Unpolare (hydrophobe)	Seitenkette
aliphatisch:	A, L, I, V, P
aromatisch:	F, W
schwefelhaltig:	M
grenzwertig:	G
ungeladene polare Seitenkette	
Hydroxyl:	S, T, Y
Amide:	N, Q
Sulphydryl:	C
grenzwertig	G
Positiv geladen (basisch):	K, R, H
Negativ geladen (sauer):	D, E

[0068] Die folgende Tabelle stellt noch eine weitere alternative Gruppe konservativer Aminosäureaustausche bereit. Sowohl Ein-Buchstaben- als auch Drei-Buchstaben-Abkürzungen sind dargestellt:

Ursprünglicher	Konservative
Rest	Austausche
Ala(A)	Val, Leu, Ile
Arg(R)	Lys, Gln, Asn
Asn(N)	Gln, His, Lys, Arg
Asp(D)	Glu
Cys(C)	Ser
Gln(Q)	Asn
Glu(E)	Asp
His(H)	Asn, Gln, Lys, Arg
Ile(I)	Leu, Val, Met, Ala, Phe
Leu(L)	Ile, Val, Met, Ala, Phe
Lys(K)	Arg, Gln, Asn
Met(M)	Leu, Phe, Ile
Phe(F)	Leu, Val, Ile, Ala
Pro(P)	Gly
Ser(S)	Thr
Thr(T)	Ser
Trp(W)	Tyr
Tyr(Y)	Trp, Phe, Thr, Ser
Val(V)	Ile, Leu, Met, Phe, Ala

[0069] Für viele Proteine ist es unwahrscheinlich, dass die Wirkungen einer beliebigen einzelnen oder kleinen Gruppe von Aminosäureänderungen die biologischen Eigenschaften wesentlich ändern, insbesondere wenn die Änderungen konservative Substitutionen sind, vorausgesetzt, die Änderungen werden nicht an kritischen Resten eingeführt. Bevorzugte Varianten der erfindungsgemäßen Hybridpolypeptide haben mindestens etwa 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% Aminosäureidentität mit Hybriden gemeinsam, die vollständig aus Aminosäuresequenzen bestehen, die von natürlich vorkommenden VEGFs abgeleitet sind.

[0070] Die Identität und Ähnlichkeit von verwandten Nukleinsäuremolekülen und Polypeptiden kann auf einfache Weise durch bekannte Verfahren berechnet werden. Solche Verfahren beinhalten, sind aber nicht beschränkt auf jene, die in Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., Hrsg., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., Hrsg., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Teil 1, Griffin, A. M., und Griffin, H. G., Hrsg., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. und Devereux, J., Hrsg., M. Stockton Press, New York, 1991; and Carillo et al., SIAM J. Applied Math., 48: 1073 (1988) beschrieben sind.

[0071] Bevorzugte Verfahren zur Feststellung der Identität und/oder Ähnlichkeit sind darauf ausgelegt, die größte Übereinstimmung zwischen den getesteten Sequenzen zu ergeben. Verfahren zur Feststellung der Identität und Ähnlichkeit werden in öffentlich verfügbaren Computerprogrammen beschrieben. Bevorzugte Computerprogrammverfahren zur Feststellung der Identität und Ähnlichkeit zwischen zwei Sequenzen beinhalten, sind aber nicht beschränkt auf, das GCG-Programmpaket, einschließlich GAP (Devereux et al., Nucl. Acid. Res., 12: 387 (1984); Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI), BLASTP, BLASTN und FASIA (Altschul et al., J. Mol. Biol., 215: 403–410 (1990)). Das BLASTX-Programm ist öffentlich erhältlich vom National Center for Biotechnology Information (NCBI) und anderen Quellen (BLAST-Manual, Altschul et al. NCB/NLM/NIH Bethesda, MD 20894; Altschul et al., oben). Der gut bekannte Smith-Waterman-Algorithmus kann ebenfalls zur Feststellung der Identität verwendet werden.

[0072] Bevorzugte Parameter für einen Polypeptidsequenzvergleich beinhalten folgendes:

Algorithmus: Needleman et al., J. Mol. Biol., 48, 443–453 (1970);

Vergleichsmatrix: BLOSUM 62 von Henikoff et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 10915–10919 (1992);

Lückenstrafe ("Gap Penalty"): 12

Lückenlängenstrafe ("Gap Length Penalty"): 4

Ähnlichkeitsschwellenwert ("Threshold of Similarity"): 0 Bevorzugte Parameter für Sequenzvergleiche von Nukleinsäuremolekülen beinhalten folgendes:

Algorithmus: Needleman et al., J. Mol. Biol., 48, 443–453 (1970);

Vergleichsmatrix: Übereinstimmungen = +10, Fehlpassung = 0 Lückenstrafe ("Gap Penalty"): 50

Lückenlängenstrafe ("Gap Length Penalty"): 3

[0073] Unter einer "nicht natürlich vorkommenden Gefäßendothelwachstumsfaktor-Aminosäuresequenz" wird eine Sequenz verstanden, die nicht identisch ist zu irgend einer bekannten natürlich vorkommenden Aminosäuresequenz, wie zum Beispiel in diesem Fall rezeptorbindenden Domänen von bekannten VEGF-A- oder VEGF-C-Sequenzen.

[0074] Die Erfindung stellt Polynukleotide (z.B. cDNA, cDNA mit eingeführten Introns zur Erleichterung der Expression in eukaryotischen Systemen, synthetische DNA, RNA oder Kombinationen davon, einzel- oder doppelsträngig) bereit, die eine Nukleotidsequenz umfassen, die eine Aminosäuresequenz der erfindungsgemäßen Polypeptide kodieren. Gereinigte und isolierte Polynukleotide sind bevorzugt. Aufgrund der gut bekannten Degeneration des genetischen Codes existieren mehrere Polynukleotidsequenzen, die jede erfindungsgemäße Polypeptid-Aminosäuresequenz kodieren. Solche Polynukleotide sind für die rekombinante Expression der erfindungsgemäßen Polypeptide geeignet.

[0075] Beispielhafte hochstringente Hybridisierungsbedingungen sind wie folgt: Hybridisierung bei 65°C für mindestens 12 Stunden in einer Hybridisierungslösung umfassend 5X SSPE, 5X Denhardts, 0,5% SDS und 2 mg ultraschallbehandelte nichthomologe DNA pro 100 ml Hybridisierungslösung; zweimaliges Waschen für 10 Minuten bei Raumtemperatur in einer Waschlösung umfassend 2X SSPE und 0,1% SDS; gefolgt von einer einmaligen Waschung für 15 Minuten bei 65°C mit 2X SSPE und 0,1% SDS; gefolgt von einer letzten Waschung für 10 Minuten bei 65°C mit 0,1X SSPE und 0,1% SDS. Moderate Stringenzwaschungen können erreicht werden durch Waschung mit 0,5X SSPE anstatt 0,1X SSPE in der letzten 10-minütigen Waschung bei 65°C. Niedrig stringente Waschungen können erreicht werden durch Verwendung von 1X SSPE für die 15-minütige Waschung bei 65°C und Weglassen der letzten 10-minütigen Waschung. Es ist in der Fachwelt selbstverständlich, dass Bedingungen entsprechender Stringenz durch Variieren von Temperatur und Puffer oder Salzkonzentration erreicht werden können, wie in Ausubel, et al. (Hrsg.), *Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons (1994), S. 6.0.3 bis 6.4.10, beschrieben. Modifikationen der Hybridisierungsbedingungen können empirisch ermittelt oder auf Basis der Länge und des Prozentanteils an Guanosin/Cytosin(GC)-Basenpaarung der Sonde genau berechnet werden. Die Hybridisierungsbedingungen können wie in Sambrook et al., (Hrsg.), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, New York (1989), S. 9.47 bis 9.51. beschrieben berechnet werden.

[0076] Die Erfindung stellt Vektoren bereit, die ein erfindungsgemäßes Polynukleotid umfassen. Solche Vektoren sind zum Beispiel nützlich für die Amplifikation der Polynukleotide in Wirtszellen, um geeignete Mengen davon zu erzeugen.

[0077] Der Vektor kann ein Expressionsvektor sein, wobei das erfindungsgemäße Polynukleotid funktionsfähig mit einem Polynukleotid verknüpft ist, das eine Expressionskontrollsequenz umfasst. Autonom replizierende rekombinante Expressionskonstrukte wie beispielsweise Plasmide und virale DNA-Vektoren, die die erfindungsgemäßen Polynukleotide beinhalten, sind insbesondere vorgesehen. Expressionskontroll-DNA-Sequenzen beinhalten Promotoren, Enhancer und Operatoren und werden im allgemeinen auf Basis des Expressionssystems ausgewählt, in denen das Expressionskonstrukt verwendet werden soll. Bevorzugte Promotor- und Enhancer-Sequenzen werden im allgemeinen auf die Fähigkeit zur Verstärkung der Genexpression hin ausgewählt, während Operatorsequenzen im allgemeinen auf ihre Fähigkeit zur Regulation der Genexpression hin ausgewählt werden. Expressionsvektoren sind nützlich zur rekombinanten Herstellung von erfindungsgemäßen Polypeptiden. Erfindungsgemäße Expressionskonstrukte können auch Sequenzen beinhalten, die ein oder mehrere selektierbare Marker kodieren, die die Identifikation von das Konstrukt tragenden Wirtszellen ermöglichen. Expressionskonstrukte können auch Sequenzen beinhalten, die die homologe Rekombination in einer Wirtszelle erleichtern und vorzugsweise fördern. Bevorzugte erfindungsgemäße Konstrukte beinhalten auch Sequenzen, die für die Replikation in einer Wirtszelle erforderlich sind.

[0078] Vektoren sind auch nützlich für "Gentherapie"-Behandlungsschemata, wobei ein Polynukleotid, das ein erfindungsgemäßes Polypeptid kodiert, in ein Subjekt, das einer Behandlung bedarf, die die Modulation (Stimulation oder Blockierung) von vaskulären endothelialen Wachstumsfaktorrezeptoren beinhaltet, in einer Form eingeführt wird, die die Zellen in dem Subjekt dazu veranlasst, die erfindungsgemäßen Polypeptide in vivo zu exprimieren.

[0079] Die Erfindung stellt Wirtszellen, einschließlich prokaryotischer und eukaryotischer Zellen, bereit, die mit erfindungsgemäßen Polynukleotiden oder erfindungsgemäßen Vektoren (stabil oder transient) transformiert oder transfiziert sind. Erfindungsgemäße Polynukleotide können in die Wirtszelle als Teil eines ringför-

mingen Plasmids oder als lineare DNA eingeführt werden, die eine kodierende Region eines isolierten Proteins oder einen viralen Vektor umfasst. Im Stand der Technik gut bekannte und routinemäßig praktizierte Verfahren zur Einführung von DNA in die Wirtszelle beinhalten Transformation, Transfektion, Elektroporation, Kerninjektion oder Fusion mit Trägern wie beispielsweise Liposomen, Mizellen, Geisterzellen und Protoplasten. Wie oben angegeben, sind solche Wirtszellen für die Amplifizierung der Polynukleotide und auch für die Expression der durch das Polynukleotid kodierten erfindungsgemäßen Polypeptide nützlich. Solche Wirtszellen sind in Tests nützlich, wie sie hier beschrieben werden. Für die Expression von erfindungsgemäßen Polypeptiden ist jede Wirtszelle akzeptabel, einschließlich, aber nicht beschränkt auf Bakterien-, Hefe-, Pflanzen-, Invertebraten- (z.B. Insekten-), Vertebraten- und Säugetier-Wirtszellen. Für die Entwicklung therapeutischer Zubereitungen ist die Expression in Säugetierzelllinien, insbesondere menschlichen Zelllinien, bevorzugt. Von der Verwendung von Säugetier-Wirtszellen wird erwartet, dass sie jene posttranslationalen Modifikationen (zum Beispiel Glykosylierung, Trunkierung, Lipidierung und Phosphorylierung) gewährleisten, die wünschenswert sind, um eine optimale biologische Aktivität auf erfindungsgemäße rekombinante Expressionsprodukte zu übertragen. Glykosylierte und nicht-glykosylierte Formen von Polypeptiden sind von der vorliegenden Erfindung umfasst. Gleichermäßen umfasst die Erfindung oben beschriebene Polypeptide, die kovalent modifiziert wurden, um ein oder mehrere wasserlösliche Polymer-Anhänge wie beispielsweise Polyethylenglykol, Polyoxyethylenglykol oder Polypropylenglykol zu beinhalten.

[0080] Erfindungsgemäße Polypeptide können auch chemisch synthetisiert sein.

[0081] Die Isolierung des Polypeptids aus den Zellen oder aus dem Medium, in dem die Zellen angezogen werden, wird durch im Stand der Technik bekannte Aufreinigungsverfahren erreicht, zum Beispiel konventionelle chromatographische Verfahren, einschließlich Immunaффinitätschromatographie, Rezeptoraффinitätschromatographie, Chromatographie unter Nutzung hydrophober Wechselwirkung, Lektinaффinitätschromatographie, Ausschlussfiltration, Kationen- oder Anionenaustauschchromatographie, Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC), Umkehrphasen-HPLC und dergleichen. Andere Verfahren zur Aufreinigung beinhalten jene, bei denen das gewünschte Protein als ein Fusionsprotein exprimiert und aufgereinigt wird, das eine spezifische Markierung, Kennzeichnung oder einen spezifischen chelatbildenden Rest aufweist, der durch einen spezifischen Bindungspartner oder ein spezifisches Bindungsmittel erkannt wird. Das gereinigte Protein kann gespalten werden, um das gewünschte Protein zu erhalten, oder als intaktes Fusionsprotein belassen werden. Die Abspaltung der Fusionskomponente kann eine Form des gewünschten Proteins erzeugen, die als Ergebnis des Spaltungsprozesses zusätzliche Aminosäurereste aufweist.

[0082] Ebenfalls innerhalb des Bereichs der Erfindung liegen Zusammensetzungen, die erfindungsgemäße Polypeptide oder Polynukleotide umfassen. Solche Zusammensetzungen können ein oder mehrere erfindungsgemäße Polynukleotide oder Polypeptide umfassen, die mit einem pharmazeutisch annehmbarem (z.B. sterilen und nicht toxischen) Diluens oder Träger formuliert wurden. Flüssige, halb feste oder feste Diluens sehen, die als pharmazeutische Träger, Exzipientien oder Medien dienen, sind bevorzugt. Jedes im Stand der Technik bekannte Diluens kann verwendet werden. Beispielhafte Diluenzen beinhalten, sind aber nicht beschränkt auf Wasser, Salzlösungen, Polyoxyethylensorbitanmonolaurat, Magnesiumstearat, Methyl- und Propylhydroxybenzoat, Talkum, Alginate, Stärken, Galaktose, Saccharose, Dextrose, Sorbit, Mannit, Glycerin, Kalziumphosphat, Mineralöl und Kakaobutter. Solche Formulierungen sind z.B. für die Verabreichung von erfindungsgemäßen Polypeptiden oder Polynukleotiden an Säugetier-Subjekte (einschließlich Menschen) in therapeutischen Schemata nützlich.

[0083] Gleichermäßen können erfindungsgemäße Polypeptide oder Polynukleotide zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von hier beschriebenen Funktionsstörungen verwendet werden, einschließlich, aber nicht beschränkt auf Funktionsstörungen, die durch unerwünschte Endothelzellproliferation gekennzeichnet sind und/oder Funktionsstörungen, die durch Ischämie und/oder Gefäßverschluss gekennzeichnet sind, wobei eine Neovaskularisierung erwünscht ist.

[0084] Ein Kit, umfassend ein erfindungsgemäßes Polynukleotid, Polypeptid oder eine erfindungsgemäße Zusammensetzung, verpackt in einem Behälter, wie beispielsweise einer Phiole oder Flasche, und ferner umfassend ein Etikett, das an dem Behälter befestigt oder damit verpackt ist, wobei das Etikett die Inhalte des Behälters beschreibt und Indikationen und/oder Instruktionen hinsichtlich der Verwendung des Inhaltes des Behälters zur Behandlung einer oder mehrerer Krankheitszustände, wie hier beschrieben, bereitstellt, ist ebenfalls vorgesehen.

[0085] Erfindungsgemäße Polypeptide, die an zytotoxische Mittel oder andere Mittel, die das Zellwachstum modulieren, konjugiert sind, sind vorgesehen.

[0086] Einzelsträngige Oligonukleotide können auf Grundlage der Kenntnis von Säugetier-VEGF-Polypeptidsequenzen und des universellen genetischen Codes und unter Verwendung konventioneller chemischer Synthesetechniken hergestellt werden. Beispiel 1 unten zeigt solch eine Technik, wobei synthetische Oligonukleotidpaare hergestellt und angelagert wurden, um doppelsträngige Polynukleotide mit einzelsträngigen kohäsiven Enden herzustellen, die Fragmente von menschlichem VEGF-A und menschlichem VEGF-C kodierten. cDNAs oder genomische DNAs (vorzugsweise cDNAs), die natürliche VEGFs kodieren, können unter Verwendung einer oder mehrerer Restriktionsendonukleasen, unter Verwendung von DNase I oder unter Verwendung von Exonuklease 111 fragmentiert werden [siehe z.B. Chang et al., *Nature Biotechnology* 17: 793–797 (1999) (DNase-I-Verfahren); Kikuchi et al., *Gene* 236: 159–167 (1999) (Restriktionsendonukleaseverfahren); Harayama et al., *TIBTECH* 16: 76–82 (1998) (Review); Patten et al., *Curr. Opin. Biotechnology* 8: 724–733 (1997) (Review, DNase I); Zhang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 4504–09 (1997) (DNase-I-Verfahren); Stemmer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 10747–1074 (1997) (DNase-I-Verfahren); Stemmer, *Nature* 370: 389–391 (1994) (DNase-I-Verfahren); und Ostermeier et al., *Nature Biotechnology* 17: 1205–1209 (1999) (ExoIII-Verfahren)].

[0087] Eine cDNA (kodierender oder nicht-kodierender Strang) kann als Matrize verwendet werden, um unter Verwendung von DNA-Polymerase und Kettenterminationsreagenzien komplementäre Fragmente zu synthetisieren [siehe z.B. Lehtovaara et al., *Protein Engineering* 2: 63–68 (1988)].

[0088] Polynukleotide können mit komplementären kohäsiven einzelsträngigen Enden hergestellt werden, um die Anlagerung von Fragmenten in einer gewünschten Reihenfolge unter konventionellen Anlagerungs- und Ligationsbedingungen für Polynukleotide zu erleichtern. Beispiel 1 unten bietet eine Demonstration dieser Technik, um 510 menschliche VEGF-A/VEGF-C-Hybride zu erzeugen. Solch eine Technik kann auch zur Anlagerung von Fragmentmischungen von zwei oder mehr VEGF-cDNAs, die mit Restriktionsendonukleasen verdaut wurden, geeignet sein. Alternativ können Polynukleotide gemischt und einer "Self-priming"-PCR-Reaktion unterzogen werden, die aufeinander folgende Schritte der Denaturierung, Anlagerung und Extension beinhaltet [siehe z.B. Chang et al. (1999); Kikuchi et al. (1999); Patten et al. (1997); Zhang et al. (1997); Stemmer *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 10747–1074 (1994); und Stemmer, *Nature* 370: 389–391 (1994)]. Eine PCR kann unter Bedingungen durchgeführt werden, die Fehler (Mutationen) in die PCR-Produkte einführt. Solche Mutationen führen zusätzliche molekulare Variationen ein und es wird erwartet, dass dadurch der prozentuale Anteil biologisch aktiver Moleküle insgesamt verringert wird, jedoch auch Moleküle mit unerwartet überlegenen Aktivitäten erzeugt werden können.

[0089] Hybrid-DNA-Moleküle werden durch beliebige im Stand der Technik bekannte Mittel exprimiert. In einer Variation werden die Moleküle in Expressionsvektoren kloniert, die wiederum verwendet werden, um Zellen zu transformieren oder zu transfizieren, um die Polypeptide zu exprimieren. In einer anderen Variation werden die Polynukleotide zum Screening in ein Phagendisplay-Vektorsystem kloniert [siehe z.B. Chang et al. (1999)]. Screeningtests können einen direkten Rezeptorbindungsprofiltest nach sich ziehen, wie unten in Beispiel 3 beschrieben. Alternativ kann die Rezeptorbindung indirekt durch Untersuchung auf eine durch Rezeptorbindung induzierte biologische Aktivität getestet werden. Das Screening kann das Inkontaktbringen des Hybrid-Polypeptids mit einer Zelle umfassen, die den Rezeptor exprimiert, wobei Änderungen im Zellwachstum oder Zellüberleben, die durch das Hybrid-Polypeptid induziert werden, die Bindung zwischen dem Hybrid-Polypeptid an dem Rezeptor anzeigen.

[0090] Antikörper, die gegen erfindungsgemäße Polypeptide erzeugt werden können, und erfindungsgemäße Polypeptide mit größerer Affinität als für jeden natürlich vorkommenden VEGF binden, sind ebenfalls vorgesehen. Polypeptide, die die antigenbindenden Fragmente solcher Antikörper umfassen, sind ebenfalls vorgesehen. Antikörper, die an erfindungsgemäße Polypeptide, nicht jedoch an Vertebraten-VEGF-C binden, sind vorgesehen.

[0091] Allgemein gesprochen, sind erfindungsgemäße Polypeptide nützlich zur Modulation (Stimulation oder Hemmung) zellulärer Vorgänge, die durch irgend einen der Rezeptoren der PDGF/VEGF-Familie wie beispielsweise PDGFR- α , PDGFR- β , VEGFR-1, VEGFR-2 und/oder VEGFR-3 vermittelt werden. Diese Rezeptoren können in bestimmten Prozessen einzeln und in anderen Prozessen in Kombination, in unterschiedlichem Ausmaß, beteiligt sein. Erfindungsgemäße Polypeptide besitzen viele verschiedene Rezeptorbindungsprofile, und einer der Vorteile der Erfindung besteht in der Fähigkeit, ein Polypeptid mit einem Rezeptorbindungsprofil auszuwählen, das dem Rezeptorexpressionsprofil des zu modulierenden biologischen Prozesses entspricht.

[0092] [Fig. 1](#) stellt eine perspektivische Ansicht eines dreidimensionalen Modells eines VEGF-A-Monomers

dar, bei dem ausgewählte Sekundärstrukturelemente kenntlich gemacht sind. Ein VEGF-A-kodierendes Polynukleotid wurde zur Konstruktion von VEGF-A/VEGF-C-Chimären in neun Segmente aufgeteilt, und die Kennzeichnungen 1–9 machen den Ort der Peptide kenntlich, die durch die neun Segmente jeweils kodiert werden.

[0093] [Fig. 2](#) ist ein schematisches Diagramm von 9 VEGF-A- und 9 VEGF-C-DNA-Fragmenten, die zur Konstruktion der VEGF-A/VEGF-C-Hybridmoleküle verwendet wurden. Diese Fragmente sind oben von 1 bis 9 durchnummeriert. Die N123-, N45-, C67- und 1089-Fragmentgruppen sind ebenfalls gekennzeichnet. N123 besteht aus 3 VEGF-A-Fragmenten und 3 VEGF-C-Fragmenten (Fragmente 1–3), wohingegen N45 (Fragmente 4–5), C67 (Fragmente 6–7) und C89 (Fragmente 8–9) jeweils aus 2 VEGF-A-Fragmenten und 2 VEGF-C-Fragmenten bestehen. Ausgewählte Restriktionsendonukleasestellen sind ebenfalls dargestellt.

[0094] [Fig. 3](#) stellt schematisch alle 8 möglichen DNA-Moleküle dar, die der N123-Region entsprechen, resultierend aus der Ligation verschiedener Kombinationen der Fragmente 1, 2 und 3 von VEGF-A (A1, A2 A3) und VEGF-C (C1, C2 und C3).

[0095] [Fig. 4](#) stellt schematisch alle 4 möglichen DNA-Moleküle dar, die der N45-Region entsprechen, resultierend aus der Ligation verschiedener Kombinationen der Fragmente 4 und 5 von VEGF-A und VEGF-C.

[0096] [Fig. 5](#) stellt schematisch alle 4 möglichen DNA-Moleküle dar, die der C67-Region entsprechen, resultierend aus der Ligation verschiedener Kombinationen der Fragmente 6 und 7 von VEGF-A und VEGF-C.

[0097] [Fig. 6](#) stellt schematisch alle 4 möglichen DNA-Moleküle dar, die der C89-Region entsprechen, resultierend aus der Ligation verschiedener Kombinationen der Fragmente 8 und 9 von VEGF-A und VEGF-C.

[0098] Die [Fig. 7A–Fig. 7D](#) stellen in Rahmen die durch die DNA-Fragmente A1–A9 (SEQ ID NO: 128–136) und C1–C9 (SEQ ID NO: 137–145) kodierten Aminosäuresequenzen dar, und stellen die Art und Weise dar, in der längere kodierte Aminosäuresequenzen durch Verbinden der Fragmente A1–A3 und C1–C3 in der N123-Ligation ([Fig. 7A](#)), der Fragmente A4–A5 und C4–C5 in der N45-Ligation ([Fig. 7B](#)), der Fragmente A6–A7 und C6–C7 in der C67-Ligation, und der Fragmente A8–A9 und C8–C9 in der C89-Ligation gebildet wurden. In jeder Figur repräsentieren Pfeile Peptidbindungen zwischen kodierten Aminosäuresequenzen, die aus richtiger Ligation kompatibler DNA-Fragmente und Translation der erhaltenen ligierten DNA resultieren.

[0099] [Fig. 8](#) ist ein dreidimensionales Modell, das die Wechselwirkung eines VEGF-A-Dimers mit zwei VEGFR-1-Molekülen zeigt. Reste innerhalb der VEGF-A-Monomere, die für die Kopplung mit VEGFR-1 wichtig sind, sind an den zwei Enden des VEGF-A-Dimers gebündelt und beinhalten die N-terminale Helix und Teile des β 5-Strangs.

[0100] [Fig. 9](#) ist ein dreidimensionales Modell, das die durch ein VEGF-C-Dimer gebildete Furche darstellt. Der Eingang und die Seiten dieser Furche werden durch die in Beispiel 4 beschriebenen Fragmente gebildet, die für die Vermittlung der VEGFR-3-Spezifität wichtig sind.

[0101] [Fig. 10](#) ist ein dreidimensionales Modell einer der Wechselwirkung zwischen einem VEGF-C-Dimer und einem einzelnen VEGFR-3-Molekül, extrapoliert aus dem VEGF-A/VEGFR-A-Modell.

Verfahren zur Herstellung von Peptiden

[0102] Die Peptide gemäß der vorliegenden Erfindung können unter Verwendung einer Vielzahl von Verfahren synthetisiert werden, einschließlich jener, die in der Zusammenfassung der Erfindung und den Beispielen beschrieben sind. Die Peptide gemäß der vorliegenden Erfindung können konventionellen Techniken entsprechend in Lösung oder auf einem festen Träger synthetisiert werden. Verschiedene automatische Synthetisierer sind kommerziell erhältlich und können nach bekannten Protokollen verwendet werden. Siehe z.B. Stewart und Young, Solid Phase Peptide Synthesis, 2. Aufl., Pierce Chemical Co., (1984); Tam et al., J. Am. Chem. Soc., 105: 6442, (1983); Merrifield, Science, 232: 341–347, (1986); und Barany und Merrifield, The Peptides, Gross und Meienhofer, Hrsg., Academic Press, New York, 1–284; Barany et al., Int. J. Peptide Protein Res., 30, 705–739 (1987); und U.S.-Pat. Nr. 5.424.398).

[0103] Festphasen-Peptidsyntheseverfahren verwenden ein Styrol-Divinylbenzol-Copolymer enthaltend 0,1–1,0 mNol Amine/g Polymer. Diese Verfahren für die Peptidsynthese verwenden Butyloxycarbonyl(t-BOC) oder 9-Fluorenylmethyloxycarbonyl(FMOC) zum Schutz von Alpha-Aminogruppen. Beide Verfahren beinhalten schrittweise Synthesen, wobei, beginnend am C-Terminus des Peptids, mit jedem Schritt eine einzelne Ami-

nosäure addiert wird (Coligan, et al., Current Protocols in Immunology, Wiley Interscience, 1991, Einheit 9). Nach der Vervollständigung der chemischen Synthese können die Peptide geschützt werden, um die t-BOC- oder FMOC-Aminosäure-Blockierungsgruppe zu entfernen, und durch Behandlung mit Säure bei verminderter Temperatur (z.B. flüssiges HF-10% Anisol für etwa 0,25 bis etwa 1 Stunde bei 0°C) vom Polymer abgespalten werden. Nach Verdampfung der Reagenzien werden die Peptide von dem Polymer mit 1% Essigsäurelösung extrahiert, die dann lyophilisiert wird, um das Rohmaterial zu erhalten. Dies kann normalerweise durch solche Techniken wie die Gelfiltration auf Sephadex-G15 unter Verwendung von 5% Essigsäure als Lösungsmittel gereinigt werden. Lyophilisation von geeigneten Fraktionen der Säule ergibt das homogene Peptid oder Peptid-derivate, die dann durch solche Standardtechniken wie beispielsweise Aminosäureanalyse, Dünnschichtchromatographie, Hochdruckflüssigchromatographie, Ultraviolettabsorptionsspektroskopie, molare Drehung oder Löslichkeit charakterisiert und durch Festphasen-Edman-Abbau quantifiziert werden können.

[0104] Andere Verfahren, wie beispielsweise die Selektierung von Peptiden aus einer Phagendisplaybibliothek, sind zur Verbesserung bei den speziell hier beschriebenen Peptiden erhältlich. Bibliotheken können aus Gruppen von Aminosäuren, wie hier beschrieben, hergestellt werden. Das Phagendisplay kann insbesondere bei der Identifizierung bindender Peptide effektiv sein, die gemäß der Erfindung geeignet sind. Kurz gesagt, stellt man eine Phagenbibliothek her (unter Verwendung von z.B. ml-13-, fd- oder Lambda-Phagen), die Insertionen von 4 bis etwa 80 Aminosäureresten anzeigen. Die Insertionen können zum Beispiel einen vollständigen degenerierten oder unausgewogenen Bereich repräsentieren. Anschließend kann man Phagentragende Insertionen auswählen, die an den/die Ziel-VEGF-Rezeptor(en) binden. Dieses Verfahren kann über mehrere Zyklen der Reselektion von Phagen, die den/die Ziel-Rezeptoren binden, wiederholt werden. Wiederholte Runden führen zur Anreicherung von Phagen, die bestimmte Sequenzen tragen. Eine DNA-Sequenzanalyse kann durchgeführt werden, um die Sequenzen der exprimierten Polypeptide zu identifizieren. Der minimale lineare Teil der Sequenz, der an den/die Ziel-Rezeptor(en) bindet, kann festgestellt werden. Man kann dieses Verfahren wiederholen unter Verwendung einer unausgewogenen Bibliothek, die Insertionen enthält, die die minimalen linearen Bereiche teilweise oder vollständig plus ein oder mehr zusätzliche degenerierte Reste stromaufwärts oder stromabwärts davon enthalten. Diese Techniken können erfindungsgemäße Peptide mit noch größerer Rezeptorbindungsaffinität als hier bereits beschriebene Peptide identifizieren. Das Screening des erhaltenen Peptids gegen mehrere Rezeptoren identifiziert Peptide mit multiplen Rezeptorbindungsaffinitäten. Hefe-Zwei-Hybrid-Screeningverfahren können ebenfalls verwendet werden, um Polypeptide zu identifizieren, die an den/die Ziel-Rezeptoren binden.

[0105] Alternativ kann eine Vielzahl von Expressionsvektor/Wirtssystemen verwendet werden, um die chimären Peptide gemäß der vorliegenden Erfindung zu beinhalten und zu exprimieren. Diese beinhalten, sind aber nicht beschränkt auf Mikroorganismen wie beispielsweise mit rekombinanten Bakteriophagen-, Plasmid oder Cosmid-DNA-Expressionsvektoren transformierte Bakterien, mit Hefeexpressionsvektoren transformierte Hefe; mit Virus-Expressionsvektoren (z.B. Baculovirus) infizierte Insektenzellsysteme; mit Virus-Expressionsvektoren (z.B. Blumenkohlmosaikvirus CaMV, Tabakmosaikvirus, TMV) oder mit bakteriellen Expressionsvektoren (z.B. Ti- oder pBR322-Plasmid) transfizierte Pflanzensellensysteme; oder Tierzellensysteme. Säugetierzellen, die bei der Herstellung rekombinanter Proteine geeignet sind, beinhalten, sind aber nicht beschränkt auf VERO-Zellen, HeLa-Zellen, Chinahamsterovar(CHO-)Zelllinien, COS-Zellen (wie beispielsweise COS-7), W138-, BHK-, HepG2-, 3T3-, RIN-, MDCK-, A549-, PC12-, K562- und 293-Zellen. Beispielhafte Protokolle für die rekombinante Expression des Proteins sind unten beschrieben.

[0106] Das chimäre Propeptid kann beispielsweise unter Verwendung kommerziell erhältlicher Expressionssysteme, zum Beispiel dem Pichia-Expressionssystem (Invitrogen, San Diego, CA), nach Herstelleranweisungen in Hefe rekombinant exprimiert werden. Dieses System beruht auch auf der Präpro-Alpha Sequenz zur Steuerung der Sekretion, die Transkription der Insertion wird jedoch durch den Alkoholoxidase-Promotor bei Induktion durch Methanol angetrieben.

[0107] Das sekretierte Peptid wird zum Beispiel durch die Verfahren, die zur Aufreinigung des chimären Peptids aus Bakterien- und Säugetierzellüberständen eingesetzt werden, aus dem Hefeanzuchtmedium aufgereinigt.

[0108] Alternativ kann die das Peptid kodierende cDNA in den Baculovirus-Expressionsvektor pVL1393 (PharMingen, San Diego, SA) kloniert werden. Dieser Vektor wird dann nach den Anweisungen des Herstellers (PharMingen) eingesetzt, um Spodopterafrugiperda-Zellen in sf9-proteinfreien Medien zu infizieren und rekombinantes Protein herzustellen. Das Protein wird aus den Medien unter Verwendung einer Heparin-Sepharose-Säule (Pharmacia, Piscataway, NJ) und sequenzieller "Molecularsizing"-Säulen (Amicon, Beverly, MA) aufgereinigt und konzentriert und in PBS resuspendiert. Die SDS-PAGE-Analyse zeigt eine einzelne Bande

und bestätigt die Größe des Proteins, und Edman-Sequenzierung mit einem Porton-2090-Peptidsequenzierer bestätigt dessen N-terminale Sequenzen.

[0109] Alternativ kann das Peptid in einem Insektensystem exprimiert werden. Insekten systeme für die Proteinexpression sind dem Fachmann gut bekannt. In einem solchen System wird der nukleäre Polyhedrose-Virus von *Autographa californica* (AcNPV) als Vektor zur Expression fremder Gene in *Spodoptera-frugiperda*-Zellen oder in *Trichoplusia*-Larven eingesetzt. Die peptidkodierende Sequenz wird in eine unwesentliche Region des Virus, wie beispielsweise das Polyhedrin-Gen, kloniert und unter die Kontrolle des Polyhedrin-Promotors gebracht. Die erfolgreiche Insertion des Peptids inaktiviert das Polyhedrin-Gen und erzeugt rekombinanten Virus, dem die Hülle aus dem Hüllprotein fehlt. Die rekombinanten Viren werden dann verwendet, um *S.-frugiperda*-Zellen oder *Trichoplusia*-Larven zu infizieren, in denen das Peptid exprimiert wird (Smith et al., *J Virol* 46: 584, 1983; Engelhard EK et al., *Proc Nat Acad Sci* 91: 3224-7, 1994).

[0110] In einem anderen Beispiel wird die für das Peptid kodierende DNA-Sequenz durch PCR amplifiziert und in einen geeigneten Vektor, zum Beispiel pGEX-3X (Pharmacia, Piscataway, NJ), kloniert. Der pGEX-Vektor ist dazu ausgelegt, ein Fusionsprotein herzustellen, welches durch den Vektor kodierte Glutathion-S-transferase (GST) und ein Protein umfasst, das durch ein in die Klonierungsstelle des Vektors inseriertes DNA-Fragment kodiert wird. Die Primer für die PCR können so erzeugt werden, dass sie beispielsweise eine geeignete Spaltstelle beinhalten.

[0111] Wenn der Fusionspartner nur dazu verwendet wurde, die Expression zu erleichtern oder ansonsten nicht als Anhang des interessierenden Peptids erwünscht ist, kann das rekombinante Fusionsprotein dann von dem GST-Teil des Fusionsproteins abgespalten werden. Das pGEX-3X/Chimärprotein-Konstrukt wird in *E.-coli*-XL-1-Blue-Zellen (Stratagene, La Jolla CA) transformiert und einzelne Transformanten werden isoliert und angezogen.

[0112] Plasmid-DNA von einzelnen Transformanten wird gereinigt und teilweise sequenziert unter Verwendung eines automatischen Sequenzierers, um die Anwesenheit der Nukleinsäureinsertion, die das chimäre Peptid kodiert, in der richtigen Orientierung zu bestätigen.

[0113] Besonders bevorzugte Peptidzusammensetzungen gemäß der vorliegenden Erfindung sind solche, die mit einem beliebigen Antitumor-Peptid wie beispielsweise einem Tumornekrosefaktor (TNF) konjugiert sind. In einem besonders bevorzugten Verfahren werden die TNF-Peptidchimären als rekombinante Fusionen mit "in frame" zu TNF (Novagen) kodierenden Sequenzen fusionierten peptidkodierenden Sequenzen fusioniert. Peptid-TNF-cDNA wird in den pET-11b-Vektor (Novagen) kloniert und die Expression von TNF-Peptiden in *E. coli* BL21 wird gemäß Anweisungen des Herstellers von pET-11b induziert. Lösliche TNF-Peptide werden durch Ammoniumsulfatpräparation, Hydrophobizitätsinteraktionschromatographie auf Phenyl-Sepharose-6 Fast Flow, Ionenaustauschchromatographie auf DEAE-Sepharose Fast Flow und Gelfiltrationschromatographie auf Sephacryl-S-300-HR aus Bakterienlysaten gereinigt.

[0114] Es ist vorgesehen, dass die Herstellung rekombinanten Proteins auch dazu verwendet werden kann, chimäre Peptidzusammensetzungen herzustellen. Zum Beispiel wird die Induktion der GST/Peptidchimäre erreicht durch Anzucht der transformierten XL-1-Blue-Kultur bei 37°C in LB-Medium (versetzt mit Carbenicillin) zu einer optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm von 0,4, gefolgt von einer weiteren Inkubation für 4 Stunden in Gegenwart von 0,5 mM Isopropyl-β-D-Thiogalaktopyranosid (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO).

[0115] Das Fusionsprotein, von dem erwartet wird, dass es in den Bakterien als unlösliche Einschlusskörper hergestellt wird, kann wie folgt aufgereinigt werden. Die Zellen werden durch Zentrifugationen geerntet; in 0,15 M NaCl, 10 mM Tris, pH 8, 1 mM EDTA gewaschen; und mit 0,1 mg/ml Lysozym (Sigma Chemical Co.) für 15 Minuten bei Raumtemperatur behandelt. Das Lysat wird durch Ultraschallbehandlung geklärt und die Zelltrümmer werden durch Zentrifugation für 10 Minuten bei 12.000 × g niedergeschlagen. Der Fusionsprotein-haltige Niederschlag wird in 50 mM Tris, pH 8, und 10 mM EDTA resuspendiert, über 50% Glycerin geschichtet und für 30 Minuten bei 6000 × g zentrifugiert. Der Niederschlag wird in gewöhnlicher phosphatgepufferter Salzlösung (PBS), frei von Mg⁺⁺ und Ca⁺⁺, resuspendiert. Das Fusionsprotein wird durch Fraktionierung des resuspendierten Niederschlags in einem denaturierenden SDS-Polyakrylamidgel (Sambrook et al., oben) weiter aufgereinigt. Das Gel wird in 0,4 M KCl getränkt, um das Protein sichtbar zu machen, welches ausgeschnitten und in Gel-Laufpuffer ohne SDS elektroeluiert wird. Wenn das GST/Peptidchimäre-Fusionsprotein als lösliches Protein in Bakterien hergestellt wird, kann es unter Verwendung des GST-Reinigungsmoduls (Pharmacia Biotech) gereinigt werden.

[0116] Das Fusionsprotein kann einem Verdau unterzogen werden, um das GST von dem erfindungsgemäßen chimären Peptid abzuspalten. Die Verdauungsreaktion (20–40 µg Fusionsprotein, 20–30 Einheiten menschliches Thrombin (4000 U/mg (Sigma) in 0,5 ml PBS) wird 16–48 Std. bei Raumtemperatur inkubiert und auf ein denaturierendes SDS-PAGE-Gel geladen, um die Reaktionsprodukte zu fraktionieren. Das Gel wird in 0,4 M KCl getränkt, um die Proteinbanden sichtbar zu machen. Die Identität der Proteinbande, die dem erwarteten Molekulargewicht des chimären Peptids entspricht, kann durch Aminosäuresequenzanalyse unter Verwendung eines automatisierten Sequenzierers (Applied Biosystems Modell 473A, Foster City, CA) bestätigt werden. Alternativ kann die Identität mittels Durchführung von HPLC und/oder Massenspektrometrie der Peptide bestätigt werden.

[0117] Alternativ kann die das chimäre Peptid kodierende DNA-Sequenz in ein Plasmid kloniert werden, das einen gewünschten Promotor und, optional, eine Leadersequenz beinhaltet (siehe z.B. Retter et al., Science, 240: 1041–43, 1988). Die Sequenz dieses Konstrukts kann durch automatisierte Sequenzierung bestätigt werden. Das Plasmid wird dann unter Verwendung von Standardverfahren unter Einsatz von CaCl_2 -Inkubation und Hitzeschockbehandlung der Bakterien in den E.-coli-Stamm MC1061 transformiert (Sambrook et al., oben). Die transformierten Bakterien werden in mit Carbenicillin versetztem LB-Medium angezogen und die Herstellung des exprimierten Proteins wird durch Anzucht in einem geeigneten Medium induziert. Falls vorhanden, wird die Leadersequenz die Sekretion des chimären Peptids bewirken und bei der Sekretion abgespalten.

[0118] Das sekretierte rekombinante Protein wird durch die hier beschriebenen Verfahren aus dem bakteriellen Kulturmedium aufgereinigt.

[0119] Säugetierwirtssysteme für die Expression des rekombinanten Proteins sind dem Fachmann ebenfalls gut bekannt. Wirtszellstämme können hinsichtlich der besonderen Fähigkeit, das exprimierte Protein zu verarbeiten oder bestimmte posttranslationelle Modifikationen zu produzieren, die zur Bereitstellung von Proteinaktivität nützlich sind, ausgewählt werden. Solche Modifikationen des Polypeptids beinhalten, sind aber nicht beschränkt auf, Acetylierung, Carboxylierung, Glykosylierung, Phosphorylierung, Lipidierung und Acylierung. Verschiedene Wirtszellen wie beispielsweise CHO, HeLa, MDCK, 293, WI38 und dergleichen weisen spezifische zelluläre Maschinerien und charakteristische Mechanismen für solche posttranslationellen Aktivitäten auf und können dahingehend ausgewählt werden, die korrekte Modifikation und Prozessierung des eingeführten fremden Proteins sicherzustellen.

[0120] Es ist bevorzugt, dass die transformierten Zellen für eine langfristige und hohe Erträge erzielende Proteinproduktion verwendet werden, und daher ist eine stabile Expression wünschenswert. Sobald solche Zellen einmal mit Vektoren transformiert wurden, die zusammen mit der gewünschten Expressionskassette selektierbare Marker enthalten, können die Zellen für 1–2 Tage in einem Anreicherungsmedium angezogen werden, bevor sie auf Selektionsmedium umgesetzt werden. Der selektierbare Marker ist dahingehend gestaltet, Resistenz zur Selektion zu übertragen, und seine Anwesenheit ermöglicht Wachstum und Gewinnung von Zellen, die die eingeführten Sequenzen erfolgreich exprimieren. Resistente Klumpen stabil transformierter Zellen können unter Verwendung von Zellkulturtechniken, die für die Zellen angemessen sind, proliferiert werden.

[0121] Eine Reihe von Selektionssystemen kann verwendet werden, um die Zellen, die transformiert wurden, für die Herstellung rekombinanten Proteins zu gewinnen. Solche Selektionssysteme beinhalten, sind aber nicht beschränkt auf HSV-Thymidinkinase-, Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase- und Adenin-Phosphoribosyltransferasegene in tk-, hgp^rt- bzw. ap^rt-Zellen. Antimetabolitenresistenz kann als Basis der Selektion für dhfr, das Resistenz gegenüber Methotrexat überträgt; gpt, das Resistenz gegenüber Mycophenolsäure überträgt; neo, das Resistenz gegenüber dem Aminoglykosid G418; das auch Resistenz gegenüber Chlorsulfon überträgt; und hygro, das Resistenz gegenüber Hygromycin überträgt, verwendet werden. Weitere selektierbare Gene, die nützlich sein können, beinhalten trpB, das es Zellen ermöglicht, Indol an Stelle von Tryptophan zu verwenden, oder hisD, welches es Zellen ermöglicht, Histidinol an Stelle von Histidin zu verwenden. Marker, die eine visuelle Anzeige zur Identifikation von Transformanten geben, beinhalten Anthocyane, Beta-Glucuronidase und dessen Substrat, und Luziferase und dessen Substrat Luziferin.

[0122] Für bestimmte Anwendungen kann es wünschenswert sein, Peptide oder Polypeptide gemäß der vorliegenden Erfindung herzustellen, die gegenüber proteolytischem Verdau resistent sind. Solche Peptide können nicht-hydrolysierbare Peptidbindungen beinhalten und Peptide, die Endmodifikationen wie beispielsweise ein Amid (z.B. CONH_2) am C-Terminus oder eine Acetylgruppe am N-Terminus aufweisen. Es ist vorgesehen, dass die erfindungsgemäßen Peptide modifiziert werden, so dass ihre Halbwertszeit in vivo erhöht ist, ihre physikalische Stabilität erhöht ist, die Freisetzungsgeschwindigkeit in vivo und die Geschwindigkeit der Beseitigung ("clearance") in vivo ebenfalls beeinflusst sein kann.

[0123] Um nicht-hydrolysierbare Peptide herzustellen, kann man Peptide aus einer Bibliothek nicht-hydrolysierbarer Peptide selektieren oder in ausgewählte Peptide Modifikationen, wie beispielsweise ein oder mehrere D-Aminosäuren oder ein oder mehrere nicht-hydrolysierbare Aminosäure verbindende Peptidbindungen einführen. Zum Beispiel kann man Peptide auswählen, die ein gewünschtes Rezeptorbindungsprofil aufweisen und dann diese Peptide soweit erforderlich modifizieren, um das Hydrolysepotenzial durch Proteasen zu vermindern. Zum Beispiel können Peptide zur Feststellung der Empfindlichkeit gegenüber proteolytischer Spaltung markiert und mit Zellextrakten oder gereinigten Proteasen inkubiert und dann isoliert werden, um festzustellen, welche Peptidbindungen gegenüber Proteolyse empfindlich sind, zum Beispiel durch Sequenzierung von Peptiden und proteolytischen Fragmenten. Alternativ können potentiell empfindliche Peptidbindungen durch Vergleich der Aminosäuresequenz des Peptids gemäß der vorliegenden Erfindung mit der bekannten Spaltstellenspezifität einer Reihe von Proteasen identifiziert werden. Auf Grundlage der Ergebnisse solcher Tests können einzelne Peptidbindungen, die gegenüber Proteolyse empfindlich sind, durch In-vitro-Synthese des Peptids mit nicht-hydrolysierbaren Peptidbindungen ersetzt werden.

[0124] Viele nicht-hydrolysierbare Peptidbindungen sind zusammen mit Verfahren zur Synthese von Peptiden, die solche Bindungen enthalten, im Stand der Technik bekannt. Nicht-hydrolysierbare Bindungen beinhalten $-\text{[CH}_2\text{NH]}-$ reduzierte Amid-Peptidbindungen, $-\text{[CH(CN)NH]}-$ (Cyanomethylen)amino-Peptidbindungen, $-\text{[CH}_2\text{CH(OH)]}$ -Hydroxyethylen-Peptidbindungen, $-\text{[CH}_2\text{O]}-$ Peptidbindungen und $-\text{[CH}_2\text{S]}-$ Thiomethylen-Peptidbindungen (siehe z.B. U.S.-Patent 6.172.043).

[0125] Bei der Erfindung nützliche Peptide können linear sein oder können zyklisch oder durch natürliche oder synthetische Mittel zyklisiert sein. Zum Beispiel können Disulfidbindungen zwischen Cysteinresten eine Peptidsequenz zyklisieren. Bifunktionelle Reagenzien können verwendet werden, um eine Verknüpfung zwischen zwei oder mehr Aminosäuren eines Peptids zu bilden. Andere Verfahren zur Zyklisierung von Peptiden wie beispielsweise jene, die durch Anwer et al. (Int. J. Pep. Protein Res. 36: 392–399, 1990) und Rivera-Baeza et al. (Neuropeptides 30: 327–333, 1996) beschrieben wurden, sind ebenfalls im Stand der Technik bekannt.

[0126] Darüber hinaus sind auch Nichtpeptid-Analoga von Peptiden vorgesehen, die eine stabilisierte Struktur oder einen verminderten Bioabbau ergeben. Peptid-nachahmende Analoga können auf Basis eines ausgewählten Peptids durch Ersetzung von einem oder mehreren Resten durch Nichtpeptid-Reste hergestellt werden. Vorzugsweise erlauben die Nichtpeptid-Reste es dem Peptid, seine natürliche Konformation zu bewahren oder eine bevorzugte z.B. bioaktive Konformation zu stabilisieren. Ein Beispiel für Verfahren zur Herstellung von mimetischen Nichtpeptid-Analoga aus Peptiden ist in Nachman et al., Regul. Pept. 57: 359–370 (1995) beschrieben. Der hier verwendete Ausdruck Peptid umfasst alles Vorstehende.

[0127] Die erfindungsgemäßen Polypeptide beinhalten Polypeptide, die zum Beispiel durch Glykosylierung, Amidierung, Carboxylierung oder Phosphorylierung oder durch die Erzeugung von Säureadditionssalzen, Amiden, Estern, insbesondere C-terminalen Estern, und N-Acyl-Derivaten modifiziert sind.

[0128] Wie oben beschrieben, umfasst die Erfindung auch Polypeptide, die durch Bildung kovalenter oder nicht-kovalenter Komplexe mit anderen Resten modifiziert sind. Kovalent gebundene Komplexe können durch Verknüpfung der chemischen Reste mit funktionellen Gruppen auf den Seitenketten von Aminosäuren, die die Peptide ausmachen, oder am N- oder C-Terminus hergestellt werden.

[0129] Insbesondere ist vorgesehen, dass die vorstehend genannten Peptide an eine Reportergruppe, einschließlich, aber nicht beschränkt auf eine Radiomarkierung, eine Fluoreszenzmarkierung, ein Enzym (das z.B. eine kolorimetrische oder fluorimetrische Reaktion katalysiert), ein Substrat, eine feste Matrix oder einen Träger (zum Beispiel Biotin oder Avidin) konjugiert werden können. Die Erfindung stellt entsprechend ein Molekül bereit, das ein chimäres Polypeptid umfasst, umfassend eine Mehrzahl von Peptiduntereinheiten, die aus einem oder mehr Gefäßendothelwachstumsfaktor-Polypeptiden abgeleitet sind, wobei das chimäre Polypeptid vorzugsweise darüber hinaus eine Reportergruppe umfasst, die ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus einer Radiomarkierung, einer Fluoreszenzmarkierung, einem Enzym, einem Substrat, einer festen Matrix und einem Träger. Die Verwendung solcher Markierungen ist gut bekannt und z.B. im US Patent Nr. 3.817.837, U.S.-Patent Nr. 3.850.752, U.S.-Patent Nr. 3.996.345 und im US Patent Nr. 4.277.437 beschrieben. Andere Markierungen, die geeignet sein werden, beinhalten, sind aber nicht beschränkt auf radioaktive Markierungen, Fluoreszenzmarkierungen und Chemilumineszenzmarkierungen. U.S.-Patente, die die Verwendung solcher Markierungen betreffen, beinhalten zum Beispiel das U.S.-Patent Nr. 3.817.837, U.S.-Patent Nr. 3.850.752, U.S.-Patent Nr. 3.939.350 und das US Patent Nr. 3.996.345. Jedes der Peptide gemäß der vorliegenden Erfindung kann ein, zwei oder mehrere dieser Markierungen umfassen.

[0130] Die vielen biologischen Aktivitäten, die durch die PDGF/VEGF-Rezeptorfamilie vermittelt werden (einschließlich, aber nicht beschränkt auf die Beeinflussung des Wachstums und der Migration von Gefäßendothelzellen und Blutgefäßen; die Förderung des Wachstums von lymphatischen Endothelzellen und Lymphgefäßen; die Erhöhung der vaskulären Permeabilität; und die Beeinflussung der Myelopoese) stützen zahlreiche diagnostische sowie klinische In-vitro- und In-vivo-Anwendungen für erfindungsgemäße Polypeptide, die in der Lage sind, einen oder mehrere Mitglieder der VEGF-Rezeptorfamilie zur Modulierung (Stimulierung oder Inhibierung) dieser biologischen Aktivitäten zu binden.

[0131] Es existieren vielfältige Mechanismen, durch die erfindungsgemäße Polypeptide als Wachstumsfaktoren (d.h. Agonisten oder Rezeptorstimulanzen) wirken werden. Zum Beispiel werden erfindungsgemäße Polypeptide, die Homodimere bilden, die eine oder mehrere Mitglieder der VEGF-Rezeptorfamilie binden und aktivieren, als vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktoren nützlich sein. Alternativ werden erfindungsgemäße Polypeptide, die Heterodimere mit endogenen Wachstumsfaktor-Polypeptiden (VEGF-A oder VEGF-C oder anderen Familienmitgliedern) bilden, auch wirksame Agonisten sein, vorausgesetzt, dass die so gebildeten Heterodimere in der Lage sind, Rezeptoren zur Induktion der Signalübertragung zu binden und zu aktivieren.

[0132] Es existieren vielfältige Mechanismen, durch die erfindungsgemäße Polypeptide als Inhibitoren (Antagonisten) von Wachstumsfaktoren der VEGF-Familie agieren werden. Erfindungsgemäße Polypeptide, die einen oder mehrere Rezeptoren binden, diese jedoch nicht stimulieren, werden die Stimulation des Rezeptors durch endogenen Wachstumsfaktor hemmen, wodurch sie als Inhibitor von endogenem Wachstumsfaktor agieren. Solch ein Versagen hinsichtlich der Stimulation kann vollständig oder teilweise auf die Unfähigkeit zurückzuführen sein, den Rezeptor zu dimerisieren, möglicherweise aufgrund einer Unfähigkeit des erfindungsgemäßen Hybridpolypeptids, Wachstumsfaktor-Homodimere zu bilden. Erfindungsgemäße Polypeptide, die Heterodimere mit endogenen Wachstumsfaktor-Polypeptiden bilden, werden die Stimulation von VEGF-Rezeptoren hemmen, wenn das Heterodimer keine Rezeptoren bindet, oder wenn das Heterodimer nur an einen einzelnen Rezeptor oder ein heterologes Rezeptorpaar in einer Weise bindet, die die Rezeptoraktivierung und Signalübertragung verhindert. Unabhängig vom Mechanismus sind erfindungsgemäße Polypeptide, die aktivitätszerstörende Heterodimere mit endogenen VEGF-Polypeptiden bilden (und die keine aktiven Homodimere bilden), als Antagonisten der natürlichen endogenen VEGF-Aktivität nützlich. Darüber hinaus kann jedes Polypeptid, das einen Rezeptor bindet, an ein zytotoxisches oder zytostatisches Mittel konjugiert werden, um solche Mittel einer Zielzelle zuzufügen. Die Anheftung eines solchen Mittels ist ein anderes Mittel zur Hemmung des Wachstums von Zellen, bei denen VEGF-Polypeptide eine mitogene Reaktion zeigen. Beispielhafte Toxine beinhalten Chemotherapeutika, Radionuklide, Ricin-A-Kette, Cholera toxin, Pertussistoxin etc.

[0133] Es wird auch ersichtlich sein, dass zwei oder mehr erfindungsgemäße Hybridpolypeptide gemischt werden können, und das so gebildete Heterodimer in Abhängigkeit von ihren rezeptorbindenden und -stimulierenden Eigenschaften als Modulatoren nützlich sein werden. Da erfindungsgemäße Polypeptide Hybride sind, die von natürlich vorkommenden vaskulären endothelialen Wachstumsfaktoren abgeleitet sind, die unterschiedliche Rezeptorbindungsprofile aufweisen können, ist vorgesehen, dass einige der Hybride als Aktivatoren von einem oder mehreren Rezeptoren und einige als Inhibitoren von einem oder mehreren Rezeptoren agieren werden. Hier beschriebene Verfahren und andere im Stand der Technik bekannte Verfahren können verwendet werden, um die rezeptorbindenden, rezeptoraktivierenden und rezeptorhemmenden Eigenschaften von erfindungsgemäßen Polypeptiden zu bestimmen.

[0134] Die erfindungsgemäßen Polypeptide, die einen oder mehrere VEGF-Rezeptoren binden und aktivieren, können zur Förderung der Angiogenese und/oder Lymphangiogenese nützlich sein, zum Beispiel, um die Wundheilung zu fördern, die Gewebetransplantation zu erleichtern und um die Bildung von kollateralen Gefäßen um arterielle Stenosen herum und in verletzten Geweben nach einem Infarkt zu fördern, um Ischämie zu behandeln. Auf der anderen Seite können erfindungsgemäße Polypeptide, die als Antagonisten von endogenen VEGF-Proteinen fungieren, in therapeutischen Anwendungen zur Behandlung von Krankheiten wie beispielsweise Neoplasien, Retinopathie, rheumatoider Arthritis und Psoriasis, bei denen die Suppression der Angiogenese wünschenswert ist, verwendet werden.

[0135] Erfindungsgemäße Polypeptide unterscheiden sich von natürlichen VEGF-Rezeptor-Liganden darin, dass einige von ihnen einen der VEGF-Rezeptoren selektiv binden und auf diese Weise dazu verwendet werden können, die Signalübertragung durch einen bestimmten VEGF-Rezeptor spezifisch zu induzieren. Zum Beispiel können Polypeptide, die ausschließlich die VEGFR-3-Signalübertragung induzieren, therapeutisch verwendet werden, um die lymphatischen Endothelien von Individuen, die an lymphatischen Funktionsstörungen

gen leiden, anzusteuern, um die Struktur und Funktion der lymphatischen Vaskulatur solcher Individuen zu verbessern. Solche Polypeptide können auch verwendet werden, um eine Neoplasie anzugehen, die durch Zellen gekennzeichnet ist, die VEGFR-3 auf ihren Oberflächen exprimieren. Die Chemotaxis von Monozyten/Makrophagen [Barleon et al., Blood 87: 3336–3343 (1996)] aufgrund von VEGFs wird durch VEGFR-1 vermittelt. Moleküle, die den VEGFR-1-Rezeptor spezifisch ansteuern, können daher verwendet werden, um therapeutische Wirkungen auf diesen bestimmten VEGF-Rezeptor auszuüben. Inhibitoren von VEGFR-1 können beispielsweise verwendet werden, um eine viral induzierte Angiogenese zu verhindern, und Moleküle, die VEGFR-1 spezifisch aktivieren, können verwendet werden, um die Monozyten/Makrophagen-Migration zu fördern. VEGFR-2 ist für die Angiogenese essentiell und ausreichend für die viral induzierte Angiogenese. Inhibitoren von VEGFR-2 können daher verwendet werden, um die Angiogenese, einschließlich der durch virale VEGFs induzierten, zu hemmen, wohingegen Moleküle, die VEGFR-2 stimulieren, zur Förderung der Angiogenese nützlich sein können.

[0136] Eine Untergruppe der Polypeptide gemäß der vorliegenden Erfindung kann Kombinationen von VEGF-Rezeptoren binden, die für bekannte natürliche VEGF-Liganden nicht demonstriert wurden, oder sind in der Lage, alle drei bekannten VEGF-Rezeptoren VEGFR-1, R2 und R-3 zu binden. Diese Polypeptide können für Therapien nützlich sein, bei denen die Aktivierung oder Hemmung verschiedener Kombinationen von VEGF-Rezeptoren gewünscht ist.

[0137] Erfindungsgemäße Polypeptide, die VEGFR-3 aktivieren können, können verwendet werden, um die endothelialen Funktionen von Lymphgefäßen und -geweben zu fördern, um beispielsweise den Verlust von Lymphgefäßen, Okklusionen von Lymphgefäßen, Lymphangiome und primäre idiopathische Lymphödeme, einschließlich der Milroy-Krankheit und Lymphödem praecox sowie sekundäre Lymphödeme, einschließlich jenen, die aus der Entfernung von Lymphknoten und -gefäßen, Strahlentherapie und Operationen bei der Krebs-, Trauma- und Infektionsbehandlung resultieren, zu behandeln. Polynukleotide oder Polypeptide gemäß der Erfindung könnten als bloße prophylaktische Behandlung zur Vorbeugung von Lymphödem bei Personen verabreicht werden, die einem Risiko ausgesetzt sind, ein Lymphödem zu entwickeln, oder als therapeutische Behandlung bei Personen, die unter Lymphödem leiden, um deren Symptome (z.B. Schwellung aufgrund der Ansammlung von Lymphe) zu lindern.

[0138] Die erfindungsgemäßen Polynukleotide und Polypeptide, die VEGFR-3 aktivieren, können auch verwendet werden, um das Neuwachstum oder die Permeabilität von Lymphgefäßen bei Patienten zu fördern, deren axilläre Lymphgefäße während eines operativen Eingriff bei der Behandlung von Krebs (z.B. Brustkrebs) entfernt wurden. Erfindungsgemäße Polynukleotide und Polypeptide können verwendet werden, um die Vaskularisierung bei zum Beispiel organtransplantierten Patienten zu behandeln. Eine Zusammensetzung, die das/die erfindungsgemäße(n) Polypeptid(e) enthält, kann direkt auf den isolierten Gefäßabschnitt angewendet werden, bevor er in vivo verpflanzt wird, um die Abstoßung des transplantierten Materials zu minimieren und die Vaskularisierung des transplantierten Materials zu stimulieren.

[0139] Erfindungsgemäße Polypeptide, die die VEGF-Rezeptor-Aktivität aktivieren, können verwendet werden, um Wunden, Operationsschnitte und andere Indikationen zu behandeln, bei denen vernünftigerweise anzunehmen ist, dass deren Heilung gefördert wird, wenn der Prozess der Neovaskularisierung induziert und/oder beschleunigt werden kann.

[0140] Wie in größerer Ausführlichkeit oben erklärt und in der Literatur berichtet, ist die Expression von Rezeptoren für vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktoren in bestimmten Vorläuferzellen, wie beispielsweise hämatopoetischen Vorläuferzellen, beobachtet wurden, und von VEGF-C ist myelopoetische Aktivität beobachtet worden. Diese Beobachtungen geben einen Hinweis darauf, dass Polynukleotide oder Polypeptide gemäß der Erfindung verwendet werden können, um Entzündungen, Infektionen oder Immundefunktionsstörungen durch Modulation der Proliferation, Differenzierung und Reifung, oder Migration von Immunzellen oder hämatopoetischen Zellen zu behandeln oder zu verhindern. Polynukleotide oder Polypeptide gemäß der Erfindung können auch nützlich sein zur Förderung oder Hemmung des Trafficking von Leukozyten zwischen Geweben und Lymphgefäßen und der Migration in den und aus dem Thymus.

[0141] Die erfindungsgemäßen Polynukleotide und Polypeptide können zur Stimulierung der Myelopoese (insbesondere Wachstum von neutrophilen Granulozyten) oder deren Hemmung verwendet werden.

[0142] Erfindungsgemäße Polynukleotide und Polypeptide können auch bei der Behandlung von Lungenfunktionsstörungen verwendet werden, um die Blutzirkulation in der Lunge und/oder den Gasaustausch zwischen der Lunge und dem Blutstrom zu verbessern; um die Blutzirkulation zum Herzen und die O₂-Gasperme-

abilität in Fällen von Herzinsuffizienz zu verbessern; um den Blutfluss und Gasaustausch bei chronisch-obstruktiver Atemwegserkrankung zu verbessern; und um Zustände wie beispielsweise das kongestive Herzversagen, das die Ansammlung von Flüssigkeit in z.B. der Lunge als Resultat des Anstiegs der Gefäßpermeabilität beinhaltet, zu behandeln, indem auf die Gefäßpermeabilität eine heraufsetzende Wirkung ausgeübt wird, um der Flüssigkeitsansammlung entgegenzuwirken.

[0143] Erfindungsgemäße Polynukleotide und Polypeptide könnten zur Behandlung von Malabsorptionssyndromen im Darmtrakt als Ergebnis ihrer die Blutzirkulation steigernden und die Gefäßpermeabilität steigernden Aktivitäten verwendet werden.

[0144] Polypeptide, die binden, die Signalübertragung durch einen oder mehrere VEGF-Rezeptoren jedoch nicht stimulieren, können verwendet werden, um chronische Entzündungen zu behandeln, die durch erhöhte Gefäßpermeabilität, mit Diabetes verbundene Retinopathie, rheumatoide Arthritis und Psoriasis verursacht werden.

[0145] Polynukleotide oder Polypeptide, die in der Lage sind, die Funktion von ein oder mehreren VEGF-Rezeptoren zu hemmen, können auch verwendet werden, um Ödeme, periphere Arterienverschlusskrankheit, Kaposi-Sarkom oder die anomale retinale Entwicklung bei Frühgeburten zu behandeln.

[0146] Da Angiogenese und Neovaskularisierung für das Tumorwachstum essentiell sind, kann die Hemmung der angiogenen Aktivität das weitere Wachstum verhindern und sogar zur Rückbildung von soliden Tumoren führen. Gleichmaßen kann die Hemmung der Lymphangiogenese bei Verhinderung von Metastasen dienlich sein. Erfindungsgemäße Polynukleotide und Polypeptide können durch Hemmung der Tumorangiogenese nützlich sein zur Behandlung von Neoplasien, einschließlich Sarkomen, Melanomen, Karzinomen und Gliomen.

[0147] Es ist daher vorgesehen, dass eine große Vielzahl von Krebsen unter Verwendung der Peptide gemäß der vorliegenden Erfindung behandelt werden können, einschließlich Krebsen von Gehirn (Glioblastom, Astrozytom, Oligodendrogliom, Ependymome), Lunge, Leber, Milz, Niere, Lymphknoten, Pankreas, Dünndarm, Blutzellen, Dickdarm, Magen, Brust, Endometrium, Prostata, Hoden, Eierstock, Haut, Kopf und Nacken, Speiseröhre, Knochenmark, Blut oder anderem Gewebe.

[0148] In vielen Zusammenhängen ist es nicht erforderlich, dass die Tumorzellen abgetötet oder dahingehend induziert werden, einen normalen Zelltod oder "Apoptose" durchzumachen. Um eine sinnvolle Behandlung zu erreichen, ist es vielmehr lediglich erforderlich, dass das Tumorwachstum auf ein gewisses Maß verlangsamt oder auf einen bestimmten örtlichen Bereich beschränkt wird und an der Ausbreitung zu anderen Stellen gehindert wird. Es kann jedoch sein, dass das Tumorwachstum vollständig blockiert wird, oder dass eine gewisse Tumorregression erreicht wird. Klinische Begriffe wie beispielsweise "Remission" und "Reduktion der Tumor"-Last sind ebenfalls ebenfalls in ihrer normalen Verwendung vorgesehen. Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung kann die therapeutische Wirkung aus einer Hemmung der Angiogenese und/oder einer Hemmung der Lymphangiogenese resultieren.

[0149] Die Ansteuerung von VEGFR-3 bei der Tumorbildgebung und Antitumorthérapie ist in der PCT/US99/23525 (WO 00/21560), veröffentlicht am 20. April 2000, beschrieben. Andere VEGF-Rezeptoren (z.B. VEGFR-1) sind ebenfalls bei der Tumorangiogenese oder -metastase einbezogen worden.

[0150] Es gibt Hinweise, dass zumindest VEGF-C und VEGF-D aus der VEGF-Familie von Wachstumsfaktoren zur Verhinderung von Stenose oder Restenose von Blutgefäßen von Nutzen sind. Siehe die internationale Patentanmeldung Nr. PCT/US99/24054 (WO 00/24412), "Use of VEGF-C or VEGF-D Gene or Protein to Prevent Restenosis", eingereicht am 26. Oktober 1999. Erfindungsgemäße Polypeptide und Polynukleotide werden ebenfalls für diese Indikationen von Nutzen sein.

[0151] Polynukleotide oder Polypeptide gemäß der Erfindung könnten rein als prophylaktische Behandlung zur Verhinderung von Stenose oder kurz vor und/oder gleichzeitig mit und/oder kurz nach einer perkutanen transluminalen Koronarangioplastie-Maßnahme verabreicht werden, um die Restenose des Gefäßes zu verhindern.

[0152] Mit Verhinderung von Stenose oder Restenose ist eine prophylaktische Behandlung gemeint, um die Stenose oder Restenose, die häufig bei solchen chirurgischen Maßnahmen auftritt, in der Menge/Schwere zu reduzieren oder im Wesentlichen zu unterbinden. Das Polynukleotid oder Polypeptid wird in einer Menge und

Form in die Zusammensetzung aufgenommen, die wirksam ist, die Stimulation von VEGF-Rezeptoren in einem Blutgefäß des Säugetiersubjekts zu fördern, wodurch die Stenose oder Restenose des Blutgefäßes verhindert wird.

[0153] Erfindungsgemäße Polypeptide können in einer geeigneten Weise unter Verwendung eines passenden pharmazeutisch annehmbaren Vehikels, z.B. eines pharmazeutisch annehmbaren Diluents, Adjuvans, Exzipiens oder Trägers, verabreicht werden. Die zu verabreichende Zusammensetzung gemäß den erfindungsgemäßen Verfahren umfasst (zusätzlich zu dem Polynukleotid oder Vektor) vorzugsweise eine pharmazeutisch annehmbare Trägerlösung wie beispielsweise Wasser, Salzlösung, phosphatgepufferte Salzlösung, Glukose oder andere Träger, die üblicherweise verwendet werden, um Therapeutika intramuskulär zuzuführen. Eine Multigentherapie ist ebenfalls vorgesehen, wobei die Zusammensetzung optional sowohl das/den erfindungsgemäße(n) Polynukleotid/Vektor und ein(en) weiteres/weiteren Polynukleotid/Vektor umfasst, der dazu ausgewählt wurde, Restenose zu verhindern. Beispielhafte Kandidatengene/-vektoren für die Kointransfektion mit Transgenen, die erfindungsgemäße Polypeptide kodieren, sind in der oben angegebenen Literatur beschrieben, einschließlich Genen, die zytotoxische Faktoren, zytostatische Faktoren, endotheliale Wachstumsfaktoren und Wachstums-/Migrationsinhibitoren von Glattmuskelzellen kodieren.

[0154] Die vorgenommene "Verabreichung" kann unter Verwendung beliebiger medizinisch anerkannter Mittel zur Einführung eines Therapeutikums direkt oder indirekt in die Vaskulatur eines Säugetiersubjekts vorgenommen werden, einschließlich, jedoch nicht beschränkt auf Injektionen (z.B. intravenös, intramuskulär, subkutan oder Katheter); orale Aufnahme; intranasale oder topische Verabreichung; und dergleichen.

[0155] Die therapeutische Zusammensetzung kann dem Patienten an mehreren Stellen zugeführt werden. Die mehrfachen Verabreichungen können gleichzeitig vorgenommen werden oder können über eine Zeitdauer von mehreren Stunden verabreicht werden. In bestimmten Fällen kann es vorteilhaft sein, einen kontinuierlichen Fluss der therapeutischen Zusammensetzung bereitzustellen. Eine weitere Therapie kann auf einer periodischen Basis zum Beispiel täglich, wöchentlich oder monatlich verabreicht werden.

[0156] Im allgemeinen sind perorale Dosierformen für die therapeutische Zufuhr von Peptiden ineffizient, da das Peptid, wenn solch eine Formulierung effektiv sein soll, vor der enzymatischen Umgebung des Magen-darmtraktes geschützt werden muss.

[0157] Darüber hinaus muss das Peptid in einer Weise formuliert werden, dass es leicht durch die Epithelzellbarriere in ausreichenden Konzentrationen absorbiert werden kann, um ein therapeutisches Ergebnis zu bewirken. Die erfindungsgemäßen Peptide können zur Erhöhung ihrer Effizienz mit Aufnahme- oder Absorptionsförderern formuliert werden. Solche Förderer beinhalten zum Beispiel Salicylat, Glykocholat/Linoleat, Glykocholat, Aprotinin, Bacitracin, SDS-Caprat und dergleichen. Für eine weitere Diskussion oraler Formulierungen von Peptiden für die therapeutische Zufuhr wird der Fachmann auf Fix (J. Pharm. Sci., 85(12) 1282–1285, 1996) und Oliyai und Stella (Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32: 521–544, 1993) verwiesen.

[0158] Die Mengen von Peptiden in einer gegebenen Dosis werden entsprechend der Größe des Individuums, an das die Therapie verabreicht wird, sowie den Eigenschaften der behandelten Funktionsstörung variieren. In beispielhaften Behandlungen kann es notwendig sein, etwa 50 mg/Tag, 75 mg/Tag, 100 mg/Tag, 150 mg/Tag, 200 mg/Tag, 250 mg/Tag zu verabreichen. Diese Konzentrationen können als einzelne Dosierform oder als Mehrfachdosen verabreicht werden.

[0159] Die Polypeptide können auch durch Expression solcher Polypeptide in vivo eingesetzt werden, was häufig als Gentherapie bezeichnet wird. Ein rekombinanter DNA-Vektor, der ein heterologes Segment enthält, das ein erfindungsgemäßes Polypeptid kodiert, der in der Lage ist, in einen Mikroorganismus oder eine eukaryotische Zelle inseriert zu werden, und der in der Lage ist, das kodierte Protein zu exprimieren, ist ebenfalls vorgesehen.

[0160] Im Zusammenhang mit der Behandlung von Restenose oder Stenose ist die Verabreichung direkt an den Ort der Angioplastie oder des Bypasses bevorzugt. Zum Beispiel kann die Verabreichung durch Katheter-vermittelten Transfer der Transgen-haltigen Zusammensetzung in ein Blutgefäß des Säugetiersubjekts, insbesondere in eine Koronararterie des Säugetiersubjekts, erfolgen. Beispielhafte Materialien und Verfahren für die lokale Zufuhr sind in Lincoff et al., Circulation, 90: 2070–2084 (1994); und Wilensky et al., Trends Cardiovasc. Med., 3: 163–170 (1993), beschrieben. Zum Beispiel kann die Zusammensetzung verabreicht werden unter Verwendung von Infusions-Perfusions-Ballonkathetern (vorzugsweise mikroporösen Ballonkathetern) wie jenen, die in der Literatur für intrakoronare Arzneimittelinfusionen beschrieben worden sind. Siehe z.B.

U.S.-Patent Nr. 5.713.860 (Intravaskulärer Katheter mit Infusionsanordnung); U.S.-Patent Nr. 5.087.244; U.S. Patent Nr. 5.653.689; und Wolinsky et al., J. Am. Coll. Cardiol. 15: 475–481 (1990) (Wolinsky-Infusionskatheter); und Lambert et al., Coron. Artery Dis. 4: 469–475 (1993). Die Verwendung solcher Katheter für die ortsgerichtete Somazell-Gentherapie ist z.B. in Mazur et al., Texas Heart Institute Journal, 21: 104–111 (1994), beschrieben. Wenn ein erfindungsgemäßes Polypeptid kodierendes Transgen in einem adenoviralen Vektor verabreicht wird, wird der Vektor vorzugsweise in einem pharmazeutisch annehmbaren Träger bei einem Titer von 10^7 – 10^{13} Virenpartikeln, und besonders bevorzugt bei einem Titer von 10^9 – 10^{11} Virenpartikeln verabreicht. Die Adenovirenvektor-Zusammensetzung wird bevorzugt über eine Zeitdauer von 15 Sekunden bis 30 Minuten, besonders bevorzugt 1 bis 10 Minuten, infundiert.

[0161] Bei Patienten mit Angina pectoris aufgrund einzelner oder mehrerer Läsionen in Koronararterien, bei denen auf Basis anfänglicher Koronarangiogramm-Befunde PTCA verschrieben wurde, beinhaltet ein beispielhaftes Protokoll beispielsweise die Durchführung von PTCA durch einen 7F-Führungskatheter gemäß klinischer Standardpraxis unter Verwendung des femoralen Zugangs. Wenn ein optimales Ergebnis mit PTCA allein nicht erreicht wird, wird auch ein endovaskulärer Stent implantiert. (ein nicht-optimales Ergebnis ist definiert als residuelle Stenose von $> 30\%$ des luminalen Durchmesser nach visueller Schätzung und Dissektion vom B- oder C-Typ). Der arterielle Gentransfer am Ort der Ballondilatation wird mit einem replikationsdefizienten adenoviralen Vektor, der ein erfindungsgemäßes Polypeptid exprimiert, unmittelbar nach der Angioplastie, jedoch vor der Stentimplantation, unter Verwendung eines Infusions-Perfusions-Ballonkatheters durchgeführt. Die Größe des Katheters wird danach ausgewählt, dem Durchmesser der Arterie, wie sie im Angiogramm gemessen wurden, zu entsprechen, und variiert z.B. von 3,0 bis 3,5F im Durchmesser. Der Ballon wird auf den optimalen Druck aufgepumpt und der Gentransfer wird während einer zehnminütigen Infusion bei einer Geschwindigkeit von 0,5 ml/min mit einem Virustiter von $1,15 \times 10^{10}$ vorgenommen.

[0162] Die intravaskuläre Verabreichung mit einem gelbeschichteten Katheter ist vorgesehen, wie sie in der Literatur für die Einführung anderer Transgene beschrieben ist. Siehe z.B. U.S.-Patent Nr. 5.674.192 (Katheter, beschichtet mit einem hartnäckig anhaftenden quellbaren Hydrogel-Polymer); Riessen et al., Human Gene Therapy, 4: 749–758 (1993); und Steg et al., Circulation, 96: 408–411 (1997) und 90: 1648–1656 (1994). Kurz gesagt, wird DNA in Lösung (z.B. ein erfindungsgemäßes Polynukleotid) ein oder mehrere Male ex vivo auf die Oberfläche eines aufgepumpten Angioplastie-Katheterballons aufgebracht, der mit einem Hydrogel-Polymer beschichtet ist (z.B. Schieber mit Hydroplus, Mansfield Boston Scientific Corp., Watertown, MA). Die Hydroplus-Beschichtung ist ein hydrophiles Polyacrylsäurepolymer, das mit dem Ballon quervernetzt ist, um ein Hydrogel hohen Molekulargewichts zu bilden, das eng am Ballon anhaftet. Das DNA-bedeckte Hydrogel wird trocknen gelassen, bevor der Ballon entleert wird. Erneutes Aufpumpen des Ballons intravaskulär während des Angioplastievorgangs verursacht den Transfer der DNA an die Gefäßwand.

[0163] Eine dehnbare elastische Membran oder eine ähnliche Struktur, die auf einem Ballon-Angioplastiekatheter oder Stent aufgebracht oder darin integriert ist, kann eingesetzt werden, um das ein erfindungsgemäßes Polypeptid kodierende Transgen zuzuführen (Siehe z.B. U.S.-Patente Nr. 5.707.385, 5.697.967, 5.700.286, 5.800.507 und 5.776.184).

[0164] In einer weiteren Variante wird die Zusammensetzung, die das ein erfindungsgemäßes Polypeptid kodierende Transgen enthält, extravaskulär verabreicht, z.B. unter Verwendung einer Vorrichtung, um ein Gefäß einzufassen oder einzukapseln. Siehe z.B. die internationale Patent-Publikation WO 98/20027, die eine Manschette beschreibt, die um das Äußere einer Arterie angeordnet wird (z.B. während einer Bypassoperation), um ein Transgen über ein Plasmid oder einen Liposomenvektor an die Arterienwand zuzuführen.

[0165] In einer weiteren Variante können Endothelzellen oder endotheliale Vorläuferzellen ex vivo mit dem ein erfindungsgemäßes Polypeptid kodierenden Transgen transfiziert werden und die transfizierten Zellen können an ein Säugetiersubjekt verabreicht werden. Beispielhafte Verfahren zur Beimpfung eines Gefäßtransplantats mit genetisch modifizierten Endothelzellen sind im U.S.-Patent Nr. 5.785.965 beschrieben.

[0166] Erfindungsgemäße Polynukleotide können ferner zusätzliche Sequenzen umfassen, um die Gentherapie zu erleichtern. Ein "nacktes" ein erfindungsgemäßes Polypeptid kodierendes Transgen (d.h. ein Transgen ohne einen viralen, liposomalen oder anderen Vektor zur Erleichterung der Transfektion) kann für die Gentherapie eingesetzt werden. Das erfindungsgemäße Polynukleotid umfasst vorzugsweise eine geeignete Promotor- und/oder Enhancer-Sequenz (z.B. Cytomegalovirus-Promotor/Enhancer [Lehner et al., J. Clin. Microbiol., 29: 2494–2502 (1991)]; Boshart et al., Cell, 41: 521–530 (1985)]; Rous-Sarkom-Virus-Promotor [Davis et al., Hum. Gene Ther., 4: 151 (1993)]; Tie-Promotor [Korhonen et al., Blood, 86 (5): 1828–1835 (1995)] oder Simian-Virus-40-Promotor zur Expression in den Ziel-Säugetierzellen, wobei der Promotor stromaufwärts (d.h.

5') von der Polypeptid-kodierenden Sequenz funktionsfähig verknüpft ist. Die erfindungsgemäßen Polynukleotide beinhalten des weiteren vorzugsweise eine geeignete Polyadenylierungssequenz (z.B. die Polyadenylierungssequenz von SV40 oder vom Gen des menschlichen Wachstumshormons), stromabwärts (d.h. 3') von der Polypeptid-kodierenden Sequenz funktionsfähig verknüpft. Die erfindungsgemäßen Polynukleotide umfassen auch vorzugsweise eine Nukleotidsequenz, die ein "in-frame" mit der Polypeptidsequenz fusioniertes sekretorische Signalpeptid kodiert. Das sekretorische Signalpeptid steuert die Sekretion des erfindungsgemäßen Polypeptids durch die Zellen, die das Polynukleotid exprimieren, und wird durch die Zelle von dem sekretierten Polypeptid abgespalten. Die Signalpeptidsequenz kann die eines anderen sekretierten Protein sein oder kann eine vollständig synthetische Signalsequenz sein, die bei Zellen des Säugetiersubjekts eine Sekretion bewirkt.

[0167] Das Polynukleotid kann ferner optional Sequenzen umfassen, deren einzige vorgesehene Funktion darin besteht, die Massenproduktion des Vektors, z.B. in Bakterien, zu erleichtern, beispielsweise einen bakteriellen Replikationsursprung und eine einen selektierbaren Marker kodierende Sequenz.

[0168] Es ist bevorzugt, dass solche Sondersequenzen zumindest teilweise vor der Verabreichung an Menschen abgespalten werden. Man kann solche Polynukleotide zur Erreichung einer erfolgreichen Gentherapie unter Verwendung von Verfahren herstellen und verabreichen, die in der Literatur für andere Transgene beschrieben wurden. Siehe z.B. Isner et al., *Circulation*, 91: 2687–2692 (1995); und Isner et al., *Human Gene Therapy*, 7: 989–1011 (1996).

[0169] Jeder geeignete Vektor kann verwendet werden, um das ein oder mehrere erfindungsgemäße Polypeptide kodierende Transgen in den Wirt einzuführen. Beispielhafte Vektoren, die in der Literatur beschrieben worden sind, beinhalten replikationsdefiziente retrovirale Vektoren, einschließlich, jedoch nicht beschränkt auf Lentivirus-Vektoren [Kim et al., *J. Virol.*, 72 (1): 811–816 (1998); Kingsman & Johnson, *Scrip Magazine*, Oktober, 1998, S. 43–46]; adenoassoziierte virale Vektoren [U.S.-Patent Nr. 5.474.935; U.S.-Patent Nr. 5.139.941; U.S.-Patent Nr. 5.622.856; U.S.-Patent Nr. 5.658.776; U.S.-Patent Nr. 5.773.289; U.S.-Patent Nr. 5.789.390; U.S.-Patent Nr. 5.834.441; U.S.-Patent Nr. 5.863.541; U.S.-Patent Nr. 5.851.521; U.S.-Patent Nr. 5.252.479; Gnatenko et al., *J. Investig. Med.*, 45: 87–98 (1997)]; adenovirale Vektoren [siehe z.B. U.S.-Patent Nr. 5.792.453; U.S.-Patent Nr. 5.824.544; U.S. Patent Nr. 5.707.618; U.S.-Patent Nr. 5.693.509; U.S. Patent Nr. 5.670.488; U.S.-Patent Nr. 5.585.362; Quantin et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 2581–2584 (1992); Stratford-Perricadot et al., *J. Clin. Invest.*, 90: 626–630 (1992); und Rosenfeld et al., *Cell*, 68: 143–155 (1992)]; ein adenoviral-adenoassoziiertes Virus-Hybrid (siehe zum Beispiel U.S.-Patent Nr. 5.856.152) oder ein Vakzinevirus oder ein Herpesvirus (siehe zum Beispiel U.S.-Patent Nr. 5.879.934; U.S.-Patent Nr. 5.849.571; U.S.-Patent Nr. 5.830.727; U.S.-Patent Nr. 5.661.033; U.S.-Patent Nr. 5.328.688; Lipofectinvermittelter Gentransfer (BRL); liposomale Vektoren [siehe z.B. U.S. Patent Nr. 5.631.237 (Liposomen umfassende Sendai-Virus-Proteine)]; und Kombinationen davon. Replikationsdefiziente adenovirale Vektoren sind bevorzugt.

[0170] Vorgesehene andere nicht-virale Zuführungsmechanismen beinhalten Kalziumphosphat-Präzipitation (Graham und Van Der Eb, *Virology*, 52: 456–467, 1973; Chen und Okayama, *Mol. Cell Biol.*, 7: 2745–2752, 1987; Rippe et al., *Mol. Cell Biol.*, 10: 689–695, 1990) DEAE-Dextran (Gopal, *Mol. Cell Biol.*, 5: 1188–1190, 1985), Elektroporation (Tur-Kaspa et al., *Mol. Cell Biol.*, 6: 716–718, 1986; Potter et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 81: 7161–7165, 1984), direkte Mikroinjektion (Harland und Weintraub, *J. Cell Biol.*, 101: 1094–1099, 1985.), DNA-beladene Liposomen (Nicolau und Serie, *Biochim. Biophys. Acta*, 721: 185–190, 1982; Fraley et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 3348–3352, 1979; Felgner, *Sci Am.* 276(6): 102–6, 1997; Felgner, *Hum Gene Ther.* 7(15): 1791–3, 1996), Ultraschallbehandlung von Zellen (Fechheimer et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 8463–8467, 1987), Genbeschuss unter Verwendung von Hochgeschwindigkeits-Mikroprojektilen (Yang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 9568–9572, 1990), und rezeptorvermittelte Transfektion (Wu und Wu, *J. Biol. Chem.*, 262: 4429–4432, 1987; Wu und Wu, *Biochemistry*, 27: 887–892, 1988; Wu und Wu, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 12: 159–167, 1993).

[0171] Ein Expressionskonstrukt (oder tatsächlich die oben diskutierten Peptide) kann in ein Liposom eingeschlossen sein. Liposomen sind vesikuläre Strukturen, die durch eine Phospholipid-Doppelschichtmembran und ein inneres wässriges Medium gekennzeichnet sind. Multilamellare Liposomen weisen mehrere Lipidschichten auf, die durch wässriges Medium getrennt sind. Sie bilden sich spontan, wenn Phospholipide in einem Überschuss an wässriger Lösung suspendiert werden. Die Lipidbestandteile machen vor der Bildung geschlossener Strukturen eine Selbstumlagerung durch und schließen Wasser und gelöste Solute zwischen den Lipid-Doppelschichten ein (Ghosh und Bachhawat, In: *Liver diseases, targeted diagnosis and therapy using specific receptors and ligands*, Wu G, Wu C ed., New York: Marcel Dekker, S. 87–104, 1991). Die Zugabe von DNA zu kationischen Liposomen verursacht einen topologischen Übergang von Liposomen zu optisch doppelbrechenden flüssigkristallinen kondensierten Kügelchen (Radler et al., *Science*, 275 (5301): 810–4, 1997). Die-

se DNA-Lipid-Komplexe sind potentielle nicht-virale Vektoren zur Verwendung in der Gentherapie und -zufuhr.

[0172] Die Liposomen-vermittelte Nukleinsäurezufuhr und -expression von Fremd-DNA in vitro ist sehr erfolgreich gewesen. Bei der vorliegenden Erfindung sind auch verschiedene kommerzielle Ansätze vorgesehen, die "Lipofektions"-Technologie beinhalten.

[0173] Ein Liposom kann mit einem hämagglutinierenden Virus (HVJ) komplexiert werden. Es ist gezeigt worden, dass dies die Fusion mit der Zellmembran erleichtert und den Zelleintritt von in Liposomen eingeschlossener DNA fördert (Kaneda et al., Science, 243: 375–378, 1989). Ein Liposom kann komplexiert oder in Verbindung mit nuklearen chromosomalen Nicht-Histon-Proteinen (HMG-1) (Kato et al., J. Biol. Chem., 266: 3361–3364, 1991) eingesetzt werden. Dadurch, dass solche Expressionskonstrukte bei Transfer und Expression von Nukleinsäuren in vitro und in vivo erfolgreich eingesetzt wurden, sind sie für die vorliegende Erfindung anwendbar.

[0174] Andere Vektor-Zufuhrsysteme, die eingesetzt werden können, um eine ein therapeutisches Gen kodierende Nukleinsäure einer Zelle zuzuführen, beinhalten rezeptorvermittelte Zufuhrvehikel. Diese machen sich die selektive Aufnahme von Makromolekülen durch rezeptorvermittelte Endozytose in nahezu allen eukaryotischen Zellen zu Nutze. Aufgrund der zelltypspezifischen Verteilung verschiedener Rezeptoren kann die Zufuhr hochspezifisch sein (Wu und Wu, 1993, oben).

[0175] Rezeptor-vermittelte Gen-Targeting-Vehikel bestehen im Allgemeinen aus zwei Komponenten: einem Zellrezeptor-spezifischen Liganden und einem DNA-bindenden Mittel. Etliche Liganden sind für den rezeptorvermittelten Gentransfer eingesetzt worden. Die am ausführlichsten gekennzeichneten Liganden sind Asialoglykoprotein (ASOR) (Wu und Wu, 1987, oben) und Transferrin (Wagner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87 (9): 3410–3414, 1990). Kürzlich ist ein synthetisches Neoglykoprotein, welches denselben Rezeptor wie ASOR erkennt, als Genzufuhrvehikel verwendet worden (Ferkol et al., FASEB J., 7: 1081–1091, 1993; Perales et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 91: 4086–4090, 1994) und epidermaler Wachstumsfaktor (EGF) ist ebenfalls verwendet worden, um Gene an Plattenepithelkarzinomzellen zuzuführen (Myers, EPO 0273085).

[0176] Ein Zufuhrvehikel kann einen Liganden und ein Liposom umfassen. Zum Beispiel setzten Nicolau et al. (Methods Enzymol., 149: 157–176, 1987) in Liposomen aufgenommenes Laktosylceramid ein, ein galaktose-terminales Asialogangliosid, und beobachteten einen Anstieg in der Aufnahme des Insulins durch Hepatozyten. Es ist daher machbar, dass eine Nukleinsäure, die ein therapeutisches Gen kodiert, auch durch eine beliebige Anzahl von Rezeptor-Liganden-Systemen mit oder ohne Liposomen spezifisch in einen bestimmten Zelltyp eingeführt werden kann.

[0177] Ein Expressionskonstrukt kann einfach aus nackter rekombinanter DNA oder Plasmiden bestehen. Der Transfer des Konstrukts kann durch jedes der oben genannten Verfahren vorgenommen werden, das die Zellmembran physikalisch oder chemisch permeabilisiert. Dies gilt insbesondere für den Transfer in vitro, kann jedoch gleichermaßen auch für die Verwendung in vivo gelten. Dubensky et al. (Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 81: 7529–7533, 1984) injizierten erfolgreich Polyomavirus-DNA in Form von CaPO_4 -Präzipitaten in Leber und Milz von adulten und neugeborenen Mäusen, und zeigten eine aktive Virenreplikation und akute Infektion. Benvenisty und Neshif (Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 83: 9551–9555, 1986) zeigten ebenfalls, dass die direkte intraperitoneale Injektion von CaPO_4 -präzipitierten Plasmiden zur Expression des transfizierten Gens führt.

[0178] Partikelbeschuss kann ebenfalls zum Transfer eines Expressionskonstrukts aus nackter DNA in Zellen einbezogen werden. Dieses Verfahren hängt von der Fähigkeit ab, DNA-beschichtete Mikroprojekte auf eine hohe Geschwindigkeit zu beschleunigen, was es ihnen ermöglicht, die Zellmembran zu durchdringen und in die Zellen einzutreten, ohne sie zu töten (Klein et al., Nature, 327: 70–73, 1987). Etliche Vorrichtungen zur Beschleunigung kleiner Partikel sind entwickelt worden. Eine solche Vorrichtung beruht auf einer Hochspannungsentladung zur Erzeugung eines elektrischen Stroms, der wiederum die Antriebskraft bereitstellt (Yang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 9568–9572, 1990). Die verwendeten Mikroprojekte haben aus biologisch inerten Substanzen wie beispielsweise Wolfram oder Goldkugeln bestanden.

[0179] Wenn ein viraler Vektor eingesetzt wird, beinhalten bevorzugte Polynukleotide weiterhin einen geeigneten Promotor und eine Polyadenylierungssequenz wie oben beschrieben. Darüber hinaus ist leicht ersichtlich, dass das Polynukleotid ferner Vektor-Polynukleotidsequenzen (z.B. adenovirale Polynukleotidsequenzen) beinhaltet, die mit der ein erfindungsgemäßes Polypeptid kodierenden Sequenz funktionsfähig verknüpft sind.

[0180] Ein Kit beinhaltet eine hier als nützlich zur Ausübung der Erfindung beschriebene Verbindung oder Zusammensetzung (z.B. Polynukleotide oder Polypeptide gemäß der Erfindung), verpackt in einem Behälter wie

beispielsweise einer/einem verschlossenen Flasche oder Gefäß, mit einem an dem Behälter befestigten oder in der Verpackung enthaltenen Etikett, das die Verwendung der Verbindung oder Zusammensetzung zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens beschreibt. Vorzugsweise ist die Verbindung oder Zusammensetzung in einer Einheitsdosierform verpackt. Ein Kit kann eine Zusammensetzung von sowohl einem Polynukleotid als auch einem Polypeptid beinhalten, die zusammen mit einer physikalischen Vorrichtung verpackt sind, die zur Ausführung erfindungsgemäßer Verfahren nützlich sind, wie beispielsweise ein Stent, ein Katheter, eine extravaskuläre Manschette, eine Polymerfolie oder dergleichen. Ein Kit kann Zusammensetzungen von sowohl einem Polynukleotid als auch Polypeptid gemäß der Erfindung beinhalten, verpackt zusammen mit einem Hydrogel-Polymer oder Mikropartikelpolymer oder anderen hier als nützlich für die Zuführung der Polynukleotide oder Polypeptide an einen Patienten beschriebenen Trägern.

[0181] Die Polypeptide gemäß der vorliegenden Erfindung sind nützlich bei diagnostischen oder prognostischen Tests zur Detektion der VEGF-Rezeptor-Proteinexpression. Erfindungsgemäße Polypeptide, die ein oder mehrere VEGF-Rezeptoren binden, können zur Detektion und Messung der Anwesenheit spezifischer Rezeptorproteinen in Proben zu Zwecken wie beispielsweise der medizinischen Bildgebung, der Detektion, des Screenings oder der zielgerichteten Therapie verwendet werden. Detektierbare Markierungen wie beispielsweise radioaktive oder nicht-radioaktive Markierungen, einschließlich Enzymmarkierungen oder Markierungen des Biotin/Avidin-Systems können verwendet werden, um die erfindungsgemäßen Polypeptide zu markieren. Die Polypeptide können auch kovalent oder nichtkovalent an ein geeignetes supramagnetisches, paramagnetisches, elektronendichtes, ökogenes oder radioaktives Mittel für die Bildgebung gekoppelt werden.

[0182] Ein diagnostischer Test zur Detektion veränderter Niveaus von VEGF-Rezeptorproteinen in verschiedenen Geweben ist ebenfalls vorgesehen, denn die Überexpression des Proteins im Vergleich zu normalen Kontrollgewebeproben kann das Vorhandensein einer Erkrankung oder die Empfänglichkeit für eine Erkrankung, zum Beispiel anomales Zellwachstum oder anomale Zelldifferenzierung, nachweisen. Erfindungsgemäße Polypeptide können verwendet werden, um zukünftige Metastaserisiken durch Untersuchung von Biopsiematerial auf Anwesenheit aktiver Rezeptoren oder Liganden in einem Bindungstest oder -kit unter Verwendung detektierbar markierter erfindungsgemäßer Polypeptide zu quantifizieren.

[0183] Hybridpolypeptide gemäß der Erfindung, die VEGF-Rezeptoren binden, können als spezifische Marker für bestimmte Gewebe und Zelltypen verwendet werden. Zum Beispiel können jene erfindungsgemäßen Polypeptide, die spezifisch VEGFR-3 binden, als Marker für lymphatische Endothelzellen dienen.

[0184] Gleichermaßen können erfindungsgemäße Polypeptide auf eine Fähigkeit gescreent werden, das Wachstum isolierter Zellen oder Zelllinien zu modulieren. Zum Beispiel sind bestimmte neoplastische Krankheitszustände gekennzeichnet durch das Auftreten von VEGF-Rezeptoren auf Zelloberflächen [Valtola et al., Am J Path 154: 1381–90 (1999)]. Erfindungsgemäße Polypeptide können gescreent werden, um die Fähigkeit der Polypeptide zur Modulation des Wachstums der neoplastischen Zellen festzustellen. Andere Krankheitszustände sind voraussichtlich durch Mutationen in VEGF-Rezeptoren gekennzeichnet [Fenell et al., Hum Mol Genetics 7: 2073–78 (1998)]. Erfindungsgemäße Polypeptide, die die Aktivität der mutierten Formen des VEGF-Rezeptors in einer Weise modulieren, die sich von natürlich vorkommenden vaskulären endothelialen Wachstumsfaktoren unterscheidet, werden zur Modulation der Symptome und Schwere solcher Krankheitszustände nützlich sein.

[0185] Die In-vivo-Bildgebung oder Gewebebiopsie kann ergeben, dass bestimmte neoplastische Zellen eine bestimmte Kombination von Rezeptoren exprimiert, wodurch ein Hinweis auf erfindungsgemäße Polypeptide bereitgestellt wird, die die exprimierte Gruppe von Rezeptoren binden und das Liganden-vermittelte Wachstum hemmen.

[0186] Die Verwendung einer solchen diagnostischen Bildgebung ist besonders geeignet zur Erhaltung eines Bildes von, zum Beispiel, einer Tumormasse oder der Neovaskularisierung in der Nähe einer Tumormasse. Es ist vorgesehen, dass die Peptide gemäß der vorliegenden Erfindung für die Bildgebung in einer Weise eingesetzt werden, die den im U.S.-Patent Nr. 6.107.046 offenbarten Antikörper-basierten Verfahren analog sind.

[0187] Viele geeignete Bildgebungsmittel sowie auch Verfahren zur Anheftung der Markierungsmittel an die erfindungsgemäßen Peptide sind im Stand der Technik bekannt (siehe z.B. U.S.-Patent Nr. 4.965.392, U.S.-Patent Nr. 4.472.509, U.S.-Patent Nr. 5.021.236 und U.S.-Patent Nr. 5.037.630). Die markierten Peptide werden in einem pharmazeutisch annehmbarem Träger an ein Subjekt verabreicht und an einem Zielort, der den VEGFR-3-Rezeptor aufweist, akkumuliert. Dieses Peptidbildgebungsmittel dient dann als Kontrastrea-

genz für die Röntgen-, Magnetresonanz-, Ultraschall- oder Szintigraphie-Bildgebung des Zielortes. Die Peptide gemäß der vorliegenden Erfindung sind eine zweckdienliche und wichtige Ergänzung zu dem verfügbaren Arsenal an medizinischen Bildgebungswerkzeugen für die diagnostische Untersuchung von Krebs und anderen VEGFR-3-bezogenen Funktionsstörungen.

[0188] Paramagnetische Ionen, die in den Bildgebungsmitteln gemäß der vorliegenden Erfindung nützlich sind, beinhalten zum Beispiel Chrom (III), Mangan (II), Eisen (III), Eisen (II), Kobalt (II), Nickel (II), Kupfer (II), Neodym (III), Samarium (III), Ytterbium (III), Gadolinium (III), Vanadium (II), Terbium (III), Dysprosium (III), Holmium (III) und Erbium (III). Ionen, die für die Röntgenbildgebung nützlich sind, beinhalten, sind aber nicht beschränkt auf Lanthan (III), Gold (III), Blei (II) und insbesondere Wismut (III). Radioisotope für diagnostische Anwendungen beinhalten zum Beispiel ²¹¹Astatin, ¹⁴Kohlenstoff, ⁵¹Chrom, ³⁶Chlor, ⁵⁷Kobalt, ⁶⁷Kupfer, ¹⁵²Eu, ⁶⁷Gallium, ³Wasserstoff, ¹²³Iod, ¹²⁵Iod, ¹¹¹Indium, ⁵⁹Eisen, ³²Phosphor, ¹⁸⁶Rhenium, ⁷⁵Selen, ³⁵Schwefel, ^{99m}Technetium und ⁹⁰Yttrium.

[0189] Die Peptide gemäß der vorliegenden Erfindung können gemäß Techniken, die dem Fachmann gut bekannt sind, markiert werden. Zum Beispiel können die Peptide durch Inkontaktbringen des Peptids mit Natrium- oder Kaliumiodid und einem chemischen Oxidationsmittel wie beispielsweise Natriumhypochlorit oder einem enzymatischen Oxidationsmittel wie beispielsweise Laktoperoxidase iodiert werden. Peptide können mit Technetium-99m durch Ligandenaustausch, zum Beispiel durch Reduktion von Pertechnat mit zinnhaltiger Lösung, Chelieren des reduzierten Technetiums auf einer Sephadex-Säule und Aufbringen des Peptids auf die Säule, markiert werden. Diese und andere Techniken zur Markierung von Proteinen und Peptiden sind dem Fachmann gut bekannt.

Verwendung von erfindungsgemäßen Polypeptiden in der Kombinationstherapie bei neoplastischen Funktionsstörungen

[0190] Die Resistenz von Tumorzellen gegenüber DNA-schädigenden Mitteln bildet ein Hauptproblem in der klinischen Onkologie. Ein Ziel der gegenwärtigen Krebsforschung besteht darin, Wege zu finden, die Effizienz der Chemo- und Strahlentherapie zu verbessern. Wie oben beschrieben, können die Peptide gemäß der vorliegenden Erfindung in Zusammenhang mit chemo- oder strahlentherapeutischen Eingriffen, der Immuntherapie oder mit einer anderen antiangiogenen/antilymphangiogenen Therapie verabreicht werden.

[0191] Um Zellen zu töten, das Zellwachstum zu hemmen, die Metastase zu hemmen, die Angiogenese zu hemmen oder den malignen Phänotyp von Tumorzellen via Kombinationstherapie unter Verwendung der Verfahren und Zusammensetzungen gemäß der vorliegenden Erfindung auf andere Weise umzukehren oder zu reduzieren, würde man ein(e) "Ziel"-Zelle oder -Gewebe (z.B. einen Tumor und/oder dessen Vaskulatur) im allgemeinen mit den therapeutischen Peptiden gemäß der vorliegenden Erfindung (entweder als Peptidzusammensetzung oder als das Peptid exprimierendes Expressionskonstrukt) und mindestens einem weiteren Mittel, das optional an das erfindungsgemäße Peptid konjugiert ist, in Kontakt bringen. Diese Zusammensetzungen würden in einer kombinierten Menge, die zur Tötung oder Hemmung der Proliferation des Krebses durch Töten und/oder Hemmen der Proliferation der Krebszellen und/oder der Endothelien von Blut- und Lymphgefäßen, die die Krebszellen versorgen und ihnen dienlich sind, wirksam ist, bereitgestellt werden. Dieses Verfahren kann das Inkontaktbringen der Zellen mit dem Peptid oder Expressionskonstrukt und den(dem) Mittel(n) oder Faktor(en) zur selben Zeit beinhalten. Dies kann durch Inkontaktbringen der Zelle mit einer einzelnen Zusammensetzung oder pharmakologischen Formulierung, die beide Mittel enthält, oder durch gleichzeitiges Inkontaktbringen der Zelle mit zwei verschiedenen Zusammensetzungen oder Formulierungen, wobei eine Zusammensetzung das Peptid oder Expressionskonstrukt enthält und die andere das zweite Mittel enthält, erreicht werden.

[0192] Alternativ kann die die Peptide gemäß der vorliegenden Erfindung einsetzende therapeutische Behandlung der Behandlung mit den anderen Mitteln in Zeitabständen im Bereich von Minuten bis Wochen vorangehen oder nachfolgen. Wenn das andere Mittel und das Expressionskonstrukt getrennt verabreicht werden, wird man im Allgemeinen sicherstellen, dass zwischen den jeweiligen Zufuhrzeiten keine beträchtliche Zeitdauer verstreicht, so dass das Mittel und das Peptid-basierte Therapeutikum weiterhin in der Lage sein werden, eine vorteilhafte Kombinationswirkung zu entfalten. In solchen Fällen ist es vorgesehen, dass man beide Modalitäten innerhalb von etwa 12–24 Stunden voneinander und besonders bevorzugt innerhalb von etwa 6–12 Stunden voneinander, mit einem besonders bevorzugten zeitlichen Verzug von lediglich etwa 12 Stunden, verabreichen würde. In einigen Situationen kann es jedoch wünschenswert sein, die Zeitdauer für die Behandlung beträchtlich zu verlängern, wobei mehrere Tage (2, 3, 4, 5, 6 oder 7) bis mehrere Wochen (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 oder 8) zwischen den jeweiligen Verabreichungen vergehen. Wiederholte Behandlungen mit einem

oder beiden Mitteln ist insbesondere vorgesehen. Es kann eine Antikrebstherapie zugeführt werden, die die Krebszellen direkt in einer Weise attackiert, um die Krebszelle zu töten, zu hemmen oder zu nekrotisieren, darüber hinaus wird eine therapeutische Zusammensetzung auf Basis der Peptide gemäß der vorliegenden Erfindung dem Individuen ebenfalls in einer Menge verabreicht, die wirksam ist, um eine antiangiogene und/oder antilymphangiogene Wirkung aufzuweisen. Die Peptidzusammensetzungen können nach dem anderen Antikrebsmittel, vor dem anderen Antikrebsmittel oder tatsächlich zur gleichen Zeit wie das andere Antikrebsmittel, optional an das andere Mittel konjugiert, verabreicht werden.

[0193] Mittel oder Faktoren, die zur Verwendung in einer Kombinationstherapie geeignet sind, sind beliebige chemische Verbindungen oder Behandlungsverfahren, die bei Anwendung auf eine Zelle DNA-Schäden hervorrufen. Solche Mittel und Faktoren beinhalten Strahlen und Wellen, die DNA-Schäden hervorrufen, wie beispielsweise γ -Strahlen, Röntgenstrahlen, UV-Strahlen, Mikrowellen, Elektronenemissionen und dergleichen. Eine Vielzahl von chemischen Verbindungen, die auch als "chemotherapeutische Mittel" beschrieben werden, rufen DNA-Schäden hervor, und sind sämtlich dazu vorgesehen, bei den hier offenbarten Kombinationsbehandlungsverfahren von Nutzen zu sein. Chemotherapeutische Mittel, die als nützlich vorgesehen sind, beinhalten z.B. im Adriamycin, 5-Fluoruracil (5FU), Etoposid (VP-16), Camptothecin, Actinomycin-D, Mitomycin C, Cisplatin (CDDP) und selbst Wasserstoffperoxid.

[0194] Die Verwendung einer Kombination von ein oder mehreren DNA-schädigenden Mitteln, ob strahlungsbasiert oder tatsächliche Verbindung, wie beispielsweise die Verwendung von Röntgenstrahlen mit Cisplatin oder die Verwendung von Cisplatin mit Etoposid, ist ebenfalls vorgesehen.

[0195] Bei der Krebsbehandlung würde man die Tumorzellen und/oder die Endothelien der Tumorgefäße zusätzlich zu dem ein oder mehrere erfindungsgemäße Peptide umfassenden therapeutischen Mittel mit einem Mittel in Kontakt bringen. Dies kann durch Bestrahlung des lokalisierten Tumorortes mit Strahlen wie beispielsweise Röntgenstrahlen, UV-Licht, Gammastrahlen oder selbst Mikrowellen erreicht werden. Alternativ können die Tumorzellen mit dem Mittel durch Verabreichung einer therapeutisch wirksamen Menge einer pharmazeutischen Zusammensetzung, umfassend eine Verbindung wie beispielsweise Adriamycin, 5-Fluoruracil, Etoposid, Camptothecin, Actinomycin-D, Mitomycin C oder Cisplatin, an das Subjekt mit dem Mittel in Kontakt gebracht werden. Kinaseinhibitoren sind in Kombinationstherapien mit den Peptiden gemäß der vorliegenden Erfindung ebenfalls als nützlich vorgesehen. Das Mittel kann als kombinierte therapeutische Zusammensetzung oder Kit hergestellt und verwendet werden, indem es mit einem chimären erfindungsgemäßen Peptid wie oben beschrieben kombiniert wird.

[0196] Mittel, die Nukleinsäuren, insbesondere DNA, direkt quervernetzen, sind vorgesehen, um DNA-Schäden zu erleichtern, die zu einer synergistischen, antineoplastischen Kombination mit einer Chimärpeptid-basierten Therapie führen. Mittel wie beispielsweise Cisplatin und andere DNA-alkylierende Mittel können verwendet werden. Cisplatin ist weithin zur Behandlung von Krebs verwendet worden, mit in klinischen Anwendungen verwendeten wirksamen Dosen von 20 mg/m^2 für 5 Tage alle drei Wochen für insgesamt drei Durchläufe. Cisplatin wird oral nicht absorbiert und muss daher intravenös, subkutan, intratumoral oder intraperitoneal durch Injektion zugeführt werden.

[0197] Mittel, die die DNA schädigen, beinhalten auch Verbindungen, die die DNA-Replikation, Mitose und Chromosomentrennung stören. Solche chemotherapeutischen Verbindungen beinhalten Adriamycin, auch bekannt als Doxorubicin, Etoposid, Verapamil, Podophyllotoxin und dergleichen. Bei breiter Verwendung in einer klinischen Situation zur Behandlung von Neoplasmen, werden diese Verbindungen intravenös durch Bolusinjektionen verabreicht, bei Dosen im Bereich von $25\text{--}75 \text{ mg/m}^2$ in 21-Tage-Intervallen für Adriamycin, zu $35\text{--}50 \text{ mg/m}^2$ für Etoposid intravenös oder der doppelten intravenösen Dosis oral.

[0198] Mittel, die die Synthese und Genauigkeit von Nukleinsäurevorläufern und -untereinheiten stören, führen ebenfalls zu DNA-Schäden. Von daher ist eine Anzahl von Nukleinsäurevorläufern entwickelt worden. Besonders nützlich sind Mittel, die einer ausgiebigen Erprobung unterzogen wurden und leicht erhältlich sind. Von daher werden Mittel wie beispielsweise 5-Fluoruracil (5-FU) vorzugsweise von neoplastischem Gewebe verwendet, was dieses Mittel für die Ansteuerung neoplastischer Zellen besonders nützlich macht. Obwohl ziemlich toxisch, ist 5-FU in einer großen Auswahl von Trägern anwendbar, auch topisch, obwohl intravenöse Verabreichung mit Dosen im Bereich von 3 bis 15 mg/kg/Tag häufig verwendet wird.

[0199] Beispielhaft findet sich im folgenden eine Liste von chemotherapeutischen Mitteln und den Krebsen, von denen gezeigt wurde, dass sie durch die Verabreichung solcher Mittel gesteuert werden. Kombinationen dieser Chemotherapeutika mit den Peptiden gemäß der vorliegenden Erfindung können sich als nützlich bei

der Linderung verschiedener neoplastischer Funktionsstörungen erweisen. Beispiele für diese Verbindungen beinhalten Adriamycin (auch bekannt als Doxorubicin), VP-16 (auch bekannt als Etoposid) und dergleichen, Daunorubicin (interkaliert in DNA, blockiert die DNA-abhängige RNA-Polymerase und hemmt die DNA-Synthese); Mitomycin (auch bekannt als Mutamycin und/oder Mitomycin-C) ist ein aus Medium von *Streptomyces caespitosus* isoliertes Antibiotikum, von dem gezeigt wurde, dass es eine Antitumoraktivität aufweist; Actinomycin D kann auch ein nützliches in Kombination mit den Peptiden gemäß der vorliegenden Erfindung einzusetzendes Arzneimittel sein, da Tumore, die nicht auf die systemische Behandlung reagieren, manchmal auf lokale Perfusion mit Dactinomycin reagieren, von dem ebenfalls bekannt ist, dass es die Strahlentherapie verstärkt. Es wird auch in Kombination mit primärer Operation, Strahlentherapie und anderen Arzneimitteln, insbesondere Vincristin und Cyclophosphamid, verwendet, und hat sich als wirksam gegen Ewing-Tumor, Kaposi-Sarkom und Weichgewebesarkome, Chorionkarzinom, metastatische Hodenkarzinome, Hodgkin-Krankheit und Nicht-Hodgkin-Lymphome erwiesen.

[0200] Bleomycin ist eine Mischung aus zytotoxischen Glykopeptid-Antibiotika, die von einem Stamm von *Streptomyces verticillus* isoliert wurden, und ist wirksam bei der Behandlung der folgenden Neoplasmen entweder als einzelnes Mittel oder in erprobten Kombinationen mit anderen anerkannten chemotherapeutischen Mitteln beim Plattenepithelkarzinom wie beispielsweise Kopf und Nacken (einschließlich Mund, Zunge, Tonsillen, Nasopharynx, Oropharynx, Sinus, Gaumen, Lippe, bukkale Mukosa, Zahnfleisch, Epiglottis, Larynx), Haut, Penis, Zervix und Vulva. Es ist auch bei der Behandlung von Lymphomen und Hodenkarzinom verwendet worden.

[0201] Cisplatin ist weithin verwendet worden, um Krebse wie beispielsweise metastatisches Hoden- oder Ovarkarzinom, fortgeschrittenen Blasenkrebs, Kopf- oder Nackenkrebs, Gebärmutterhalskrebs, Lungenkrebs oder andere Tumoren zu behandeln, und kann in Kombination mit den Peptiden gemäß der vorliegenden Erfindung nützlich sein. VP16 (Etoposid) wird primär zur Behandlung von Hodentumoren verwendet, in Kombination mit Bleomycin und Cisplatin, und in Kombination mit Cisplatin für kleinzelliges Lungenkarzinom. Es ist auch wirksam gegen Nicht-Hodgkin-Lymphome, akute Nicht-Lymphozyten-Leukämie, Brustkarzinom, und mit dem erworbenen Immunschwächesyndrom (AIDS) verbundenes Kaposi-Sarkom. Tumornekrosefaktor [TNF; Cachectin] Glykoprotein, das einige Arten von Krebszellen tötet, die Zytokinproduktion aktiviert, Makrophagen und Endothelzellen aktiviert, die Produktion von Kollagen und Kollagenasen fördert, ist ein Entzündungsmediator und auch ein Mediator von septischem Schock, und fördert Katabolismus, Fieber und Schlaf. TNF kann bei alleiniger Verwendung in wirksamen Dosen ziemlich toxisch sein, so dass die optimalen Regime es möglicherweise in niedrigeren Dosen in Kombination mit anderen Arzneimitteln einsetzen werden. Seine immunsuppressiven Wirkungen werden durch γ -Interferon verstärkt, so dass die Kombination möglicherweise gefährlich ist. Von einem Hybrid aus TNF und Interferon- α ist ebenfalls gefunden worden, dass es Antikrebse Wirkung besitzt.

[0202] Taxol, ein ursprünglich von der Borke der Esche, *Taxus brevifolia*, isoliertes antimitotisches Mittel und sein Derivat Paclitaxol haben sich als nützlich gegen Brustkrebs erwiesen und können in Kombinationstherapien verwendet werden. Vorteilhaft Reaktionen auf Vincristin sind bei Patienten mit verschiedenen anderen Neoplasmen, insbesondere Wilms-Tumor, Neuroblastom, Hirntumoren, Rhabdomyosarkom und Karzinomen von Brust, Blase und des männlichen und weiblichen Fortpflanzungssystems berichtet worden. Vinblastin ist auch bei denselben Krebsen wie Vincristin als nützliches Therapeutikum indiziert. Die häufigste klinische Verwendung von Vinblastin geschieht mit Neomycin und Cisplatin bei der kurativen Therapie von metastatischen Hodentumoren. Es ist auch wirksam beim Kaposi-Sarkom, Neuroblastom und der Letterer-Siwe-Krankheit (Histiozytose X) sowie beim Brustkarzinom und beim Chorionkarzinom bei Frauen.

[0203] Melphalan, auch bekannt als Alkeran, L-Phenylalanin-Lost, L-PAM oder L-Sarcocollin ist ein Derivat von Stickstofflost. Melphalan ist ein bifunktionelles alkylierendes Mittel, das wirksam ist gegen ausgewählte menschliche neoplastische Erkrankungen. Melphalan ist das aktive L-Isomere des als Medphalan bekannten D-Isomers, welches weniger aktiv ist gegen bestimmte Tiertumore, und die zur Erzeugung einer Wirkung auf Chromosomen erforderliche Dosis ist größer als die, die mit dem L-Isomer erforderlich ist. Melphalan ist in einer Form erhältlich, die für die orale Verabreichung geeignet ist, und ist verwendet worden, um multiples Myelom zu behandeln. Verfügbare Hinweise deuten darauf hin, dass etwa ein Drittel bis zur Hälfte der Patienten mit multiplem Myelom eine vorteilhafte Reaktion auf die orale Verabreichung des Arzneimittels zeigen. Melphalan ist bei der Behandlung von epitheliale Ovarkarzinom verwendet worden.

[0204] Cyclophosphamid ist im Magendarmtrakt stabil, wird gut vertragen und bei oralen und parenteralen Routen wirksam und verursacht keine lokale Blasenbildung, Nekrose, Phlebitis oder gar Schmerzen. Chlorambucil, ein bifunktionelles alkylierendes Mittel vom Stickstofflost-Typ, von dem gefunden wurde, dass es wirksam

ist gegen ausgewählte menschliche neoplastische Erkrankungen. Chlorambucil ist bei der Behandlung von chronischer lymphatischer (lymphozytischer) Leukämie, malignen Lymphomen einschließlich Lymphsarkom, Riesenfollikellymphom und Hodgkin-Krankheit indiziert. Es heilt keine dieser Funktionsstörungen, kann jedoch eine klinisch nützliche Linderung hervorrufen.

[0205] Andere Faktoren, die eine DNA-Schädigung verursachen und ausgiebig verwendet worden sind, beinhalten, was allgemein bekannt ist als Gammastrahlen, Röntgenstrahlen und/oder die direkte Zufuhr von Radioisotopen zu Tumorzellen. Andere Formen von DNA-schädigenden Faktoren sind ebenfalls vorgesehen wie beispielsweise Mikrowellen und UV-Strahlung. Es ist sehr wahrscheinlich, dass all diese Faktoren in breitem Umfang Schäden an DNA, bei Vorläufern von DNA, der Replikation und Reparatur von DNA und dem Zusammenbau und der Erhaltung von Chromosomen bewirken. Dosierungsbereiche für Röntgenstrahlen reichen von täglichen Dosen von 50 bis 200 Röntgen für längere Zeitdauern (3 bis 4 Wochen) bis zu einzelnen Dosen von 2000 bis 6000 Röntgen. Dosierungsbereiche für Radioisotope variieren in weiten Bereichen und hängen von der Halbwertszeit des Isotops, der Stärke und der emittierten Strahlenart und der Aufnahme durch die neoplastischen Zellen ab (siehe z.B. Remington's Pharmaceutical Sciences, 15. Auflage, Kapitel 33, insbesondere die Seiten 624–652). Einige Variation in der Dosierung tritt notwendigerweise in Abhängigkeit vom Zustand des behandelten Subjekts auf. Die für die Verabreichung verantwortliche Person wird in jedem Fall die angemessene Dosis für das jeweilige Subjekt bestimmen. Darüber hinaus sollten die Zubereitungen zur Verabreichung an den Menschen Standards hinsichtlich Sterilität, Pyrogenität, allgemeiner Sicherheit und Reinheit entsprechen, wie sie vom Amt für biologische Standards der US-Gesundheitsbehörde (FDA) gefordert werden.

[0206] Zusätzlich zur Kombination von Therapien auf Basis chimärer Peptide mit chemo- und Strahlentherapien ist auch vorgesehen, dass eine Kombination mit Gentherapien vorteilhaft sein wird. Zum Beispiel kann das gleichzeitige gezielte Ansteuern von Chimärpeptid-basierten Therapien und p53- oder p16-Mutationen eine verbesserte Antikrebsbehandlung erbringen. Jedes andere tumorbezogene Gen kann auf diese Weise erreichbar angesteuert werden, zum Beispiel p21, Rb, APC, DCC, NF-1, NF-2, BCRA2, p16, FHIT, WT-1, MEN-I, MEN-II, BRCA1, VHL, FCC, MCC, ras, myc, neu, raf, erb, src, fms, jun, trk, ret, gsp, hst, bcl und abl.

[0207] Zusätzlich zu den oben diskutierten Antikrebstherapien ist vorgesehen, dass die erfindungsgemäßen Peptide mit anderen Angiogenesehemmern kombiniert werden. Es wird erwartet, dass die Peptide gemäß der vorliegenden Erfindung sowohl antilymphangiogene als auch antiangiogene Eigenschaften aufweisen. Viele antiangiogene Arzneimittel können auch antilymphangiogene Eigenschaften haben.

[0208] <http://cancertrials.nci.nih.gov/news/angio> ist eine von den nationalen US-Gesundheitsinstituten (National Institutes of Health) unterhaltene Internetseite, die aktuelle Informationen über die gegenwärtig mit antiangiogenen Mitteln durchgeführten Versuche bereitstellt. Diese Mittel beinhalten zum Beispiel Marimastat (British Biotech, Annapolis MD; indiziert für nicht-kleinzelligen Lungen-, kleinzelligen Lungen- und Brustkrebs); AG3340 (Agouron, LaJolla, CA; für Glioblastoma multiforme); COL-3 (Collagenex, Newtown PA; für Hirntumoren); Neovastat (Aetema, Quebec, Canada; für Nieren- und nicht-kleinzelligen Lungenkrebs) BMS-275291 (Bristol-Myers Squibb, Wallingford CT; für metastatischen nicht-kleinzelligen Lungenkrebs); Thalidomid (Celgen; für Melanom, Kopf- und Nackenkrebs, Ovar-, metastatisches Prostata- und Kaposi-Sarkom; rezidivierenden oder metastatischen kolorektalen Krebs (mit Adjuvantien); gynäkologische Sarkome, Leberkrebs; multiples Myelom; CLL, rezidivierender oder progressiver Hirnkrebs, multiples Myelom, nicht-kleinzelliger Lungen-, nicht metastatischer Prostata-, refraktäres multiples Myelom und Nierenkrebs); Squalamin (Magainin Pharmaceuticals Plymouth Meeting, PA; nicht-kleinzelliger Krebs und Ovarkrebs); Endostatin (EntreMed, Rockville, MD; für solide Tumoren); SU5416 (Sugen, San Francisco, CA; rezidivierende Kopf- und Nacken-, fortgeschrittene solide Tumoren, Stadium-IIIb- oder -IV-Brustkrebs; rezidivierender oder progressiver Hirnkrebs (pädiatrisch); Ovarkrebs, AML; Gliom, fortgeschrittene Malignitäten, fortgeschrittener kolorektaler Krebs, von-Hippel-Lindau-Krankheit, fortgeschrittener Weichgewebekrebs; Prostatakrebs, kolorektaler Krebs, metastatisches Melanom, multiples Myelom, malignes Mesotheliom; metastatischer Nieren-, fortgeschrittener oder rezidivierender Kopf- und Nacken-, metastatischer kolorektaler Krebs); SU6668 (Sugen San Francisco, CA; fortgeschrittene Tumoren); Interferon- α ; Anti-VEGF-Antikörper (National Cancer Institute, Bethesda MD; Genentech San Francisco, CA; refraktäre solide Tumoren; metastatischer Nierenzellkrebs, bei unbehandeltem fortgeschrittenen kolorektalen Krebs); EMD121974 (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland; HIV-bezogenes Kaposi-Sarkom, progressives oder rezidivierendes anaplastisches Gliom); Interleukin 12 (Genetics Institute, Cambridge, MA; Kaposi-Sarkom) und IM862 (Cytran, Kirkland, WA; Ovarkrebs, und behandelte metastatische Krebse von Kolon- und rektalem Ursprung und Kaposi-Sarkom). Die den Mitteln in Klammern folgenden Information weist auf die Krebse hin, gegen die diese Mittel in diesen Versuchen eingesetzt werden. Es ist vorgesehen, dass jede dieser Funktionsstörungen mit den Peptiden gemäß der vorliegenden Erfindung behandelt werden kann, entweder allein oder in Kombination mit den aufgeführten Mitteln.

[0209] Weitere Merkmale der Empfindung werden anhand der folgenden Beispiele ersichtlich.

Beispiel 1

Konstruktion von VEGF-A/VEGF-C-Hybridmolekülen:

[0210] Obwohl die Aminosäurereste der rezeptorbindenden Domäne von VEGF-Familienmitgliedern konservierte Motive gemeinsam haben, zeigen diese Proteine verschiedene Rezeptorspezifitäten. In dem folgenden Experiment wurden DNA-Moleküle, die verschiedene Teile der rezeptorbindenden Domäne von entweder VEGF-A oder VEGF-C enthaltende Polypeptide kodieren, unter Verwendung eines kombinatorischen Ansatzes konstruiert, um neue Hybridmoleküle mit einzigartigen strukturellen und funktionellen Eigenschaften zu erzeugen.

[0211] Zur Erzeugung der neuen Moleküle wurden die Nukleotidsequenzen von VEGF-A und reifem VEGF-C analysiert, um örtlich begrenzte Bereiche mit Nukleotididentität festzustellen, die geeignet wären zur Erzeugung kurzer DNA-Fragmente, die synthetisiert und leicht rekombiniert werden können. Acht entsprechende Identitätsbereiche wurden in jedem Molekül als Stellen für die Fragmentierung (in neun Fragmente) und Rekombination zu chimären (Hybrid-)Molekülen ausgewählt. Diese Fragmentierungsstellen wurden auf Basis der Nukleotidsequenz und auch, weil die resultierenden Fragmente Strukturelementen (z.B. Alphahelix, Schleife etc.) auf Basis der Kristallstruktur von VEGF-A (siehe Fig. Und 1) entsprechen würden, ausgewählt.

Fragmentierung von VEGF-A

[0212] Neun Paare synthetischer Oligonukleotide wurden auf Grundlage der kodierenden Sequenz für VEGF₁₂₁ zum Zweck der Bildung von neun DNA-Fragmenten, welche die die rezeptorbindende Domäne kodierende Region von VEGF-A (entsprechend den Nukleotiden 156 bis 461 der SEQ ID NO: 1, die die Aminosäurereste 34 bis 135 der SEQ ID NO: 2 kodiert) umfassen, entwickelt. Jedes Oligonukleotidpaar umfasste eine einen Vorwärts-Primer enthaltende kodierende Sequenz und einen Rückwärts-Primer mit einer Nukleotidsequenz, die zu einem Bereich des Vorwärts-Primers komplementär war, um die Anlagerung der Primer aneinander zu einem doppelsträngigen DNA-Fragment zu ermöglichen. Entweder der Vorwärts- oder der Rückwärts-Primer jedes Paares enthielt auch eine kurze 5'- und 3'-Nukleotidsequenz, die zu keiner Sequenz ihrer gepaarten Primer komplementär war. Diese kurzen zusätzlichen Sequenzen entsprechen den oben beschriebenen örtlich begrenzten Bereichen mit Nukleotididentität. Im Anschluss an die Anlagerung der Primerpaare bildete diese zusätzliche Sequenz einzelsträngige Überhänge, die hinsichtlich der Anlagerung mit anderen doppelsträngigen aneinandergelagerten Primerpaaren kompatibel waren, wie unten in größerer Ausführlichkeit beschrieben wird. Die Nukleotidsequenzen der VEGF-A-Vorwärts- und Rückwärts-Primer sind in den Tabellen 1A bzw. 1B dargestellt.

Tabelle 1A – Vorwärts-(Kodierende)Primer für VEGF-A

A1-F	gat cCT GGG CAG AAT CAT CAC GAA GTG Gtg aaa t D P G Q N H H E V V K
A2-F	TC ATG GAT GTC TAT CAG CGC AGC TAC TGC CAT F M D V Y Q R S Y C H
A3-F	ccg aTC GAG ACA CTG GTG GAC ATC TTC CAG <u>GAATAGAAGAGC</u> P I E T L V D I F Q
A4-F	<u>CGCTCTTCGAA</u> TAC CCT GAT GAG ATC GAG TAC A E Y P D E I E Y
A5-F	tc ttc aag cca TCC TGC GTG CCC CTG ATG AGA TGT <u>GGC</u> I F K P S C V P L M R C G
A6-F	<u>CCG</u> GGT TGC TGC AAT GAC GAA GGG CTG G G C C N D E G L
A7-F	ag tgC GTT CCC ACC GAG GAG TCC. AAC ATC ACC ATG CAG ATT ATG AG E C V P T E E S N I T M Q I M R
A8-F	a att AAA CCT CAC CAA GGG CAG CAC ATC GGA GAG ATG agc ttt I K P E Q G Q H I G E M S F
A9-F	CTC CAG CAT AAC AAA TGT GAA TGT AGA CCA AAG AAA <u>GATTGAGTCTTCGC</u> L Q H N K C E C R P K K D

[0213] Die Nukleotidsequenzen der Vorwärts-Primer A1-F bis A9-F sind in den SEQ ID NO: 3–11 angegeben. Für jeden der aufgeführten Primer zeigt der obere Strang die DNA-Sequenz und der untere Strang gibt die durch den jeweiligen Primer kodierten Aminosäuren an, SEQ ID NO: 128–136. In einigen Fällen sind lediglich zwei Nukleotide eines gegebenen Kodons in einem Primer enthalten und das verbleibende Nukleotid des Kodons ist in dem vorangegangenen oder folgenden Primer enthalten. In diesen Fällen ist die Aminosäure unter dem Primer aufgeführt, der 2 der 3 Nukleotide des jeweiligen Kodons enthält. Fettdruck zeigt Nukleotide an, die für Aminosäuren kodieren, die eine Protein-Linker-Region darstellen und nicht Teil der Stamm-VEGF-A oder VEGF-C-Moleküle sind, unterstrichene Nukleotide sind solche, die während des Zusammenbaus der Fragmente zu Hybridkonstrukten entfernt werden; und in Kleinschreibstaben sind Nukleotide angegeben, die einen Überhang produzieren, wenn die Oligonukleotidpaare aneinander angelagert werden, um die 9 Fragmente zu bilden.

Tabelle 1B – Rückwärts-(Nicht-kodierende)Primer für VEGF-A

A1-R	CCACTTCGTGATGATTCTGCCCAG
A2-R	tcggATGGCAGTAGCTGCGCTGATAGACATCCATGAattttca
A3-R	<u>tcgaGCTCTTCT</u> TATTCCTGGAAGATGTCCACCAGTGTCTCGA
A4-R	tggcttgaagatGTACTCGATCTCATCAGGGTATTCGAAGAGCGgtac
A5-R	<u>catgGCCACATCTCATCAGGGGCACGCAGGA</u>

A6-R gcactCCAGCCCTTCGTCATTGCAGCAACCCGGGTAC
 A7-R aattCTCATAATCTGCATGGTGATGTTGGACTCCTCGGTGGGAAC
 A8-R CATCTCTCCGATGTGCTGCCCTTGGTGAGGTTT
 A9-R GGCCGCGAAGACTCAATCTTTCTTTGGTCTACATTACATTTGTTATGCTGGAGaaagct

[0214] Die Nukleotidsequenzen der Rückwärts-Primer A1-R bis A9-R sind in den SEQ ID NO: 12–20 wiedergegeben. Fett gedruckte, unterstrichene und Kleinbuchstaben werden wie in Tabelle 1A beschrieben verwendet.

[0215] Neun VEGF-A-Polynukleotid-Fragmente wurden durch Anlagerung eines passenden Paares synthetischer Oligonukleotidprimer zusammengesetzt. Zum Beispiel wurde Fragment A1 erzeugt durch Anlagerung von Primer A1-F mit Primer A1-R, Fragment A2 wurde erzeugt durch Anlagerung von A2-F mit A2-R und so weiter. Die Anlagerung wurde durchgeführt durch Inkubation von 2 pmol/μl jedes geeigneten Primers, 20 mM Tris/HCl, 2 mM MgCl₂ und 50 mM NaCl, pH 7,4 bei 95°C für 5 Minuten, gefolgt von einer Abkühlung der Lösung auf 37°C bei einer Geschwindigkeit von 1°C/Minute. Wie in Tabelle 1A dargestellt, kodiert A1 die Aminosäurereste 34 bis 42 und einen Teil der Aminosäure 42 der SEQ ID NO: 2; Fragment A2 kodiert einen Teil der Aminosäure 43 und der Aminosäuren 44–53 der SEQ ID NO: 2; Fragment A3 kodiert die Aminosäuren 54 bis 63 und einen Teil der Aminosäure 64 der SEQ ID NO: 2; Fragment A4 kodiert einen Teil der Aminosäure 64, der Aminosäuren 65 bis 71 und einen Teil der Aminosäure 72 der SEQ ID NO: 2; Fragment A5 kodiert einen Teil der Aminosäure 72, die Aminosäuren 73 bis 83 und einen Teil der Aminosäure 84 der SEQ ID NO: 2; Fragment A6 kodiert einen Teil der Aminosäure 84, die Aminosäuren von 80 bis 92 und einen Teil der Aminosäure 93 der SEQ ID NO: 2; Fragment A7 kodiert einen Teil der Aminosäuren 93, die Aminosäuren 94 bis 107 und einen Teil der Aminosäure 108 der SEQ ID NO: 2; Fragment A8 kodiert einen Teil der Aminosäuren 108 und die Aminosäuren 109 bis 122 der SEQ ID NO: 2; und Fragment A9 kodiert die Aminosäuren 123 bis 135 der SEQ ID NO: 2.

Fragmentierung von VEGF-C

[0216] In einer ähnlichen Weise wurden neun Paare von Oligonukleotiden auf Grundlage der Aminosäuresequenz der rezeptorbindenden Domäne von VEGF-C (entsprechend den Nukleotiden 658 bis 999 der SEQ ID NO: 21, welche die Aminosäurereste 112 bis 216 der SEQ ID NO: 22 kodieren) konstruiert und synthetisiert. Die Nukleotidsequenzen der neun Vorwärts-Primer und neun Rückwärts-Primer sind in Tabelle 2A (SEQ ID NO 23–31) und Tabelle 2B (SEQ ID NO: 32–40) wiedergegeben. Die von den neun Vorwärts-Primern kodierten Aminosäuresequenzen sind in den SEQ ID NO: 137–145 wiedergegeben.

Tabelle 2A – Vorwärts-(Kodierende) Primer für VEGF-C

C1-F	gat cCT GCA CAT TAT AAT ACC GAG ATC Ctg aaa t
	D P A H Y N T E I L K
C2-F	CT ATT GAT AAT GAG TGG AGA AAG ACT CAG TGC ATG
	S I D N E W R K T Q C M
C3-F	ccg aGA GAG GTG TGT ATC GAC GTG GGG AAG <u>GAATAGAAGAGC</u>
	P R E V C I D V G K
C4-F	<u>CGCTCTTCGAA</u> TTT GGA GTC GCG ACA AAC ACC T
	E F G V A T N T
C5-F	tc ttc aag cca CCA TGT GTG TCC GTG TAC AGA TGT <u>GGC</u>
	F F K P P C V S V Y R C G
C6-F	<u>CCG</u> GGT TGC TGC AAT AGT GAG GGG CTG C
	G C C N S E G L
C7-F	ag tgc ATG AAC ACG TCC ACG AGC TAC CTC AGC AAG ACG CTG TTT GA
	Q C M N T S T S Y L S K T L F E
C8-F	a att ACA GTG CCT CTC TCT CAA GGG CCC AAA CCA GTG ACA ATC agcttt
	I T V P L S Q G P K P V T I S F
C9-F	GCC AAT CAC ACT TCC TGC CGA TGC ATG TCT AAG CTG <u>GATTGAGTCTTCGC</u>
	A N H T S C R C M S K L D

Tabelle 2B – Vorwärts-(Kodierende)Primer für VEGF-C

CI-R	GGATCTCGGTATTATAATGTGCAG
C2-R	tcggCATGCACTGAGTCTTTCTCCACTCATTATCAATAGatttca
C3-R	<u>tcgaGCTCTTCTATTTCCTTCCCCACGTCGATACACACCTCTC</u>
C4-R	tggcttgaagaAGGTGTTTGTGCGGACTCCAAATT <u>CGAAGAGCGgtac</u>
C5-R	<u>catgGCCACATCTGTACACGGACACACATGG</u>
C6-R	gcactGCAGCCCCCTCACTATTGCAGCAACCCG <u>Ggtac</u>
C7-R	aattTCAAAACAGCGTCTTGCTGAGGTAGCTCGTGACGTGTTTCAT
C8-R	GATTGTCACTGGTTTGGGCCCTTGAGAGAGAGGCACTGT
C9-R	<u>ggccGCGAAGACTCAATCCAGCTTAGACATGCATCGGCAGGAAGTGTGATTGGCaaagct</u>

[0217] Fett gedruckte, unterstrichene und Kleinbuchstaben werden in Tabelle 2A und 2B wie in Tabelle 1A beschrieben verwendet.

[0218] Primerpaare wurden aneinandergelagert, um neun doppelsträngige DNA-Fragmente zu bilden, die zu-

sammen die rezeptorbindende Domäne von VEGF-C kodierten, und welche geeignete einzelsträngige Überhänge für die Anlagerung an andere Fragmente besaßen, wie oben für VEGF-A beschrieben.

[0219] Fragment C1 kodiert die Aminosäurereste 112 bis 120 und einen Teil der Aminosäure 121 der SEQ ID NO: 22; Fragment C2 kodiert einen Teil der Aminosäure 121 und der Aminosäuren 122 bis 132 der SEQ ID NO: 22; Fragment C3 kodiert die Aminosäuren 133 bis 142 und einen Teil der Aminosäure 143 der SEQ ID NO:22; Fragment C4 kodiert einen Teil der Aminosäure 143, der Aminosäuren 144 bis 150 und einen Teil der Aminosäure 151 der SEQ ID NO:22; Fragment C5 kodiert einen Teil der Aminosäure 151, der Aminosäuren 152 bis 162 und einen Teil der Aminosäure 163 der SEQ ID NO:22; Fragment C6 kodiert einen Teil der Aminosäure 163 und der Aminosäuren 164 bis 171 und einen Teil der Aminosäure 172 der SEQ ID NO: 22; Fragment C7 kodiert einen Teil der Aminosäure 172, der Aminosäuren 173 bis 186 und einen Teil der Aminosäure der SEQ ID NO: 22; Fragment C8 kodiert einen Teil der Aminosäure 187, der Aminosäuren 188 bis 203 der SEQ ID NO:22; und Fragment C9 kodiert die Aminosäuren 204 bis 216 der SEQ ID NO:22.

Diskussion hinsichtlich der Synthese der VEGF-A- und VEGF-C-Fragmente

[0220] Auf diese Weise wurden durch Synthetisieren und Zusammenlagern von neun Paaren von aus der VEGF-A-Aminosäuresequenz konstruierten Primern und neun Paaren von aus der VEGF-C-Aminosäuresequenz konstruierten Primern 18 DNA-Fragmente erzeugt. [Fig. 2](#) ist ein schematisches Diagramm, das die Konstruktion der 9 VEGF-A- und 9 VEGF-C-DNA-Fragmente darstellt. Die Oligonukleotide wurden dahingehend konstruiert, doppelsträngige DNA-Fragmente zu erzeugen, die bei Aneinanderlagerung einzigartige kohäsive Enden enthalten. Die Ligierung der 9 VEGF-A-DNA-Fragmente erzeugt eine einzelne lineare doppelsträngige DNA, die die Aminosäuren 34–135 von VEGF-A (SEQ ID NO:2) kodiert, und die Ligierung der 9 VEGF-C-DNA-Fragmente führt zu einer einzelnen DNA, die die Aminosäuren 112–216 von VEGF-C (SEQ ID NO: 22) kodiert.

[0221] Obwohl die Einfügung von kohäsiven Enden die Ligierung von Fragmenten in einer gewünschten Reihenfolge und Orientierung stark erleichtert, wird es ersichtlich sein, dass die Ligierung von Fragmenten auch ohne kohäsive Enden erreicht werden kann. Stumpfe Fragmente können ebenfalls hergestellt und aneinander gelagert werden, um unter Verwendung der oben beschriebenen Verfahren Hybridproteine zu erzeugen. Mit einer Stumpfendstrategie brauchen die Nukleotidsequenzen der Stammoleküle nicht auf Anwesenheit von Nukleotididentität untersucht werden, um die Erzeugung von kohäsiven Enden zu ermöglichen. Ein zusätzliches Screening nach der Ligierung kann jedoch erforderlich sein, um Hybride zu identifizieren, die Fragmente in der gewünschten Ordnung und Orientierung enthalten.

[0222] Etliche weitere Details hinsichtlich der synthetischen Primer und der doppelsträngigen DNA-Fragmente verdienen es, hervorgehoben zu werden. Erstens ist es erwähnenswert, dass für das VEGF-A-Fragment A1 und das VEGF-C-Fragment C1 die ersten beiden kodierten Aminosäuren, Asp und Pro, einen Protein-Linker bilden (kodiert durch eine manipulierte BamHI-Erkennungsstelle) und weder VEGF-A- noch VEGF-C-Sequenzen entsprechen.

[0223] Zweitens ist es unter Bezugnahme auf die [Fig. 1](#) und [Fig. 2](#) erwähnenswert, dass viele der Fragmente dahingehend konstruiert wurden, diskreten Strukturelementen innerhalb der rezeptorbindenden Domäne von Proteinen der VEGF-Familie zu entsprechen. Fragment 2 entspricht der N-terminalen Helix; Fragment 4 entspricht $\beta 2$; Fragment 6 entspricht der $\beta 3$ - $\beta 4$ -Schleife, Fragment 7 entspricht $\beta 5$; Fragment 8 entspricht der $\beta 5$ - $\beta 6$ -Schleife; und Fragment 9 entspricht $\beta 7$.

[0224] Drittens ist es erwähnenswert, dass die konstruierten sechsunddreißig Oligonukleotide nicht exakt nativen menschlichen VEGF-A- oder VEGF-C-cDNA-Sequenzen (d.h. DNA-Gegenstücken von natürlich vorkommenden menschlichen mRNA-Sequenzen) entsprechen, trotz der Tatsache, dass die Oligonukleotide dahingehend konstruiert wurden, kodierte Aminosäuresequenzen der menschlichen VEGF-A- und VEGF-C-Polypeptide zu bewahren. Zum Beispiel wurden die Oligonukleotide in einer Weise konstruiert, dass die (endogene) menschliche Nukleotidsequenz, die die rezeptorbindende Domäne sowohl von VEGFR-A als auch VEGF-C kodiert, modifiziert wurden, um neue Restriktionsstellen zu erzeugen, um längere Strecken mit Nukleotididentität bereitzustellen, wobei Überlappungen zwischen den "A"- und "C"-Fragmenten erwünscht waren, oder die Kodonnutzung für die Expression in menschlicher Zellkultur zu verbessern. Alle Nukleotidmutationen (relevant für die nativen Sequenzen) waren still. Daher sind die Aminosäuresequenzen der rezeptorbindenden Domäne von VEGF-A (resultierend aus der Anlagerung der Fragmente A1–A9) und VEGF-C (aus der Anlagerung der Fragmente C1–C9) identisch zu derjenigen des entsprechenden Stammoleküls.

[0225] Viertens, unter erneuter Bezugnahme auf [Fig. 2](#), ist es erwähnenswert, dass jedes der neun VEGF-A-Fragmente mit dem entsprechenden VEGF-C aligniert und ein kompatibles kohäsives Ende aufweist, um sich mit benachbarten Fragmenten des anderen Moleküls zusammenzulagern. Zum Beispiel entsprechen die Fragmente A1 und C1 denselben relativen Bereichen von VEGF-A beziehungsweise VEGF-C, und weisen identische kohäsive Enden an den oberen Strängen auf. Diese kohäsiven Enden sind exakt komplementär zu den kohäsiven Enden der unteren Stränge beider Fragmente A2 und C2, so dass sich A1 entweder an A2 oder C2 anlagern könnte, und C1 könnte sich auch an A2 oder C2 anlagern. Die Fragmente A2 und C2 entsprechen denselben relativen Bereichen von VEGF-A und VEGF-C, und jedes besitzt ein anderes kohäsives Ende am unteren Strang, das exakt komplementär ist zu den kohäsiven Enden der oberen Stränge der Fragmente A3 und C3 und so weiter. Auf diese Weise wurde jeder Satz von neun Fragmenten nicht lediglich dahingehend konstruiert, sich mit benachbarten Fragmenten seines Stamm-VEGF-A/VEGF-C-Moleküls zusammenzulagern, sondern auch, um sich mit benachbarten Fragmenten des anderen Moleküls zusammenzulagern.

Zusammenbau chimärer (hybrider) VEGF-Moleküle

[0226] Der Zusammenbau der 9 VEGF-A- und 9 VEGF-C-DNA-Fragmente zu Hybrid-DNAs, die Regionen sowohl von VEGF-A als auch VEGF-C beinhalten, wurde durch Ligierung verschiedener Kombinationen der VEGF-A- und VEGF-C-DNA-Fragmente bewerkstelligt. Alle DNA-Fragmente wurden nach Verdau mit geeigneten Restriktionsenzymen und Gelelektrophorese unter Verwendung von Qiaex-II-Perlen (Qiagen) isoliert. Es wird ersichtlich sein, dass, wenn die richtige Reihenfolge (1-2-3-4-5-6-7-8-9) der Fragmente bewahrt wird, die neun VEGF-A-Fragmente und die neun VEGF-C-Fragmente zu 512 unterschiedlichen Hybriden rekombiniert und zusammengelagert werden können, von denen zwei natürlich vorkommende Sequenzen (A1-A2-A3-A4-A5-A6-A7-A8-A9 und C1-C2-C3-C4-C5-C6-C7-C8-C9) repräsentieren und 510 neue Hybride repräsentieren. Alle 512 Sequenzen wurden unter Verwendung des folgenden Drei-Schritt-Verfahrens rekonstruiert.

[0227] Zuerst wurden die rezeptorbindenden Domänen von VEGF-A und VEGF-C in 4 als N123, N45, C67 und C89 bezeichneten Subdomänen geteilt, wie in [Fig. 2](#) dargestellt ist. N123 besteht aus den ersten 3 die rezeptorbindende Domäne sowohl von VEGF-A als auch VEGF-C kodierenden DNA-Fragmenten. N45, C67 und C89 bestehen jeweils aus 2 DNA-Fragmenten, wobei N45 die Fragmente 4 und 5 beinhaltet, C67 aus den Fragmenten 6 und 7 besteht und C89 die Fragmente 8 und 9 beinhaltet.

[0228] Zusammenhängende DNAs, die der N123-Region entsprachen, wurden durch Ligierung der Fragmente 1, 2 und 3 von entweder VEGF-A oder VEGF-C konstruiert, wodurch insgesamt acht mögliche verschiedene in [Fig. 3](#) schematisch dargestellte N123-DNA-Segmente hergestellt wurden. Gleichermaßen wurden zusammenhängende DNAs konstruiert, die den N45-, C67- und C89-Regionen entsprachen, indem zwei geeignete DNA-Fragmente von VEGF-A oder VEGF-C ligiert wurden. In diesen Fällen wurden alle vier möglichen verschiedenen Moleküle für jede der Regionen hergestellt. [Fig. 4](#) ist ein schematisches Diagramm, das alle vier möglichen N45-DNA-Segmente darstellt, [Fig. 5](#) stellt alle vier möglichen C67-DNA-Segmente dar und [Fig. 6](#) zeigt alle vier möglichen C89-DNA Segmente. Alle diese Moleküle wurden als Teil der Ligierungsreaktion in die multiple Klonierungsstelle des pKO-Scrambler-V912-BX-Vektors (Lexicon Genetics Inc.) kloniert. Alle Ligierungen wurden durchgeführt durch Kombinieren von 8 nmol/μl Vektor, geschnitten mit dem passenden Restriktionsenzym, das die Klonierung der Insertionen, und dephosphoryliert; jeweils 80 nmol/μl der in den Vektor zu inserierenden DNA-Fragmente; und 5 Weiss-Einheiten von T4-DNA Ligase in 50 mM Tris/HCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM ATP, 25 μg/ml BSA und 5% PEG-4000, pH 7,5, mit anschließender Inkubation für 12 Stunden bei 16°C. Die [Fig. 7A–Fig. 7D](#) stellen die Aminosäuresequenzen dar, die jeweils durch die Fragmente A1–A9 und C1–C9 kodiert werden; und stellen schematisch alle Permutationen von kodierten Peptiden dar, die aus Rekombinationen resultieren, die die acht N123-Konstrukte ([Fig. 7A](#)), vier N45-Konstrukte ([Fig. 7B](#)), vier C67-Konstrukte ([Fig. 7C](#)) und vier C89-Konstrukte ([Fig. 7D](#)) bilden.

[0229] Im zweiten Schritt wurden die N123-Fragmente mit N45-Fragmenten verbunden und die C67-Fragmente wurden mit C89-Fragmenten verbunden. Die N123- und N45-Fragmente wurden aus ihrem pKO-Scrambler-V912-Wirtsvektor durch Verdau mit Restriktionsenzymen entfernt, die die Ligation von N123 mit N45 ermöglichten, und die auch die Entfernung der nicht proteinkodierenden Regionen der Fragmente 3 und 4 (siehe Tabellen 1A, 1B, 2A und 2B) erzielte. Durch Ligierung jeder der acht verschiedenen N123-Regionen mit allen vier möglichen N45-Regionen wurden 32 unterschiedliche N-terminale Bereiche der rezeptorbindenden Domänen erhalten. Diese Klone wurden weiter in den pSecTag1-Vektor (SEQ ID NO: 41) inseriert. Der pSecTag1-Vektor ist ein kombinierter E.-coli/Säugetier-Expressionsvektor, der durch Modifikation des pSecTagA-Vektors (Invitrogen) konstruiert wurde. pSecTagA wurde dahingehend modifiziert, dass bestimmte Restriktionsschnittstellen unter Verwendung ortsgerichteter Mutagenese und synthetischer Linker eliminiert

wurden, und die EM7-Promotoren von pICZ α -A (Invitrogen) und pTRACER-CMV wurden stromabwärts zu dem CMV-Promotor von pSecTagA addiert. Sowohl pSecTagI als auch sein Stammvektor, pSecTagA, ermöglichen ein hohes Expressionsniveau in Säugerzellkultur unter Verwendung geeigneter Zelllinien, z.B. 293T-Zellen, Zeocin-Selektion von stabil transfizierten Säugetierzellen, enthalten ein Säuger-Signalpeptid für die Sekretion des exprimierten Proteins und enthalten ein C-terminales myc-Epitop und einen Polyhistidin-Marker für die Detektion, Quantifizierung und Aufreinigung des exprimierten Proteins. Der pSecTagI-Vektor unterscheidet sich vom pSpecTagA-Vektor darin, dass die Expression E. coli konstitutiv ist und Modifikation der Restriktionsstellen die Klonierung der Hybrid-Konstrukte erleichterte.

[0230] Die C67- und C89-Fragmente wurden aus ihrem pKO-Scrambler-V912-Wirtsvektor entfernt durch Verdau mit geeigneten Restriktionsenzymen, die auch die Entfernung der nicht proteinkodierenden Regionen der Fragmente 6 und 9 (siehe Tabellen 1A, 1B, 2A und 2B) erzielten. Die Ligation der vier verschiedenen C67-Moleküls mit den vier verschiedenen C89-Molekülen erzeugte 16 unterschiedliche C-terminale Hälften der rezeptorbindenden Domäne. Die C67–C89-Fragmente wurden bei dieser Ligation in den pKO-Scrambler-Vektor kloniert. Schließlich führten 512 letzte Ligationen, die die 32 verschiedenen N-terminalen Bereiche und die 16 unterschiedlichen C-terminalen Regionen kombinierten, zu insgesamt 512 unterschiedlichen Molekülen, von denen 510 Hybride sind, die aus sowohl VEGF-A- als auch VEGF-C-Aminosäureresten zusammengesetzt sind. Bei diesem Schritt wurden die 512 Konstrukte in den pSecTagI-Vektor kloniert, der die 32 verschiedenen N-terminalen Bereiche enthielt. Die verbleibenden 2 Moleküle entsprechen den ursprünglichen VEGF-A- und VEGF-C-Sequenzen, die die rezeptorbindende Domäne kodieren. Die vorhergesagten Nukleotid- und Aminosäuresequenzen für alle 512 Hybridmoleküle sind in dem Sequenzprotokoll dargestellt, das in Tabelle 2.5 zusammengefasst ist.

Tabelle 2.5

VEGF-A/VEGF-C- Chimäre	Vorhergesagte DNA-Sequenz Seq ID NO:	Vorhergesagte Proteinsequenz Seq ID NO:
AAAAAAAAA	176	177
CAAAAAAAAA	178	179
ACAAAAAAAA	180	181
CCAAAAAAAA	182	163
AACAAAAAAAA	184	185
CACAAAAAAAA	186	187
ACCAAAAAAAAA	188	189
CCCAAAAAAAAA	190	191
AAACAAAAAAAA	192	193

CAACAAAAA	194	195
ACACAAAAA	196	197
CCACAAAAA	198	199
AACCAAAAA	200	201
CACCAAAAA	202	203
ACCCAAAAA	204	205
CCCCAAAAA	206	207
AAAACAAAA	208	209
CAAACAAAA	210	211
ACAACAAAA	212	213
CCAACAAAA	214	215
AACACAAAA	216	217
CACACAAAA	218	219
ACCACAAAA	220	221
CCCACAAAA	222	223
AAACCAAAA	224	225
CAACCAAAA	226	227
ACACCAAAA	228	229
CCACCAAAA	230	231
AACCCAAAA	232	233
CACCCAAAA	234	235
ACCCAAAA	235	237
CCCCCAAAA	238	239
AAAAACAAA	240	241
CAAAACAAA	242	243
ACAAACAAA	244	245
CCAAACAAA	246	247
AACAACAAA	248	249
CACAACAAA	250	251
ACCAACAAA	252	253
CCCAACAAA	254	255
AAACACAAA	256	257
CAACACAAA	258	259

ACACACAAA	260	261
CCACACAAA	262	26J
AACCACAAA	264	265
CACCACAAA	266	267
ACCCACAAA	268	269
CCCCACAAA	270	271
AAAACCAAA	272	273
CAAACCAAA	274	275
ACAACCAAA	276	277
CCAACCAAA	278	279
AACACcAAA	280	281
CACACCAAA	282	283
ACCACCAAA	284	285
CCCACCAAA	286	287
AAACCCAAA	288	289
CAACCCAAA	290	291
ACACCCAAA	292	293
CCACCCAAA	294	295
AACCCCAAA	296	297
CACCCCAAA	298	299
ACCCCAAAA	300	301
CCCCCAAAA	302	303
AAAAAACAA	304	305
CAAAAACAA	306	307
ACAAAACAA	308	309
CCAAAACAA	310	311
AACAAACAA	312	313
CACAAACAA	314	315
ACCAAACAA	316	317
CCCAAACAA	318	319
AAACAACAA	320	321
CAACAACAA	322	323
ACACAACAA	324	325

CCACAACAA	326	327
AACCAACAA	328	329
CACCAACAA	330	331
ACCCAACAA	332	333
CCCCAACAA	334	335
AAAACACAA	336	337
CAAACACAA	338	339
ACAACACAA	340	341
CCAACACAA	342	343
AACACACAA	344	345
CACACACAA	346	347
ACCACACAA	348	349
CCCACACAA	350	351
AAACCACAA	352	353
CAACCACAA	354	355
ACACCACAA	356	357
CCACCACAA	358	359
AACCCACAA	360	361
CACCCACAA	362	363
ACCCCACAA	364	365
CCCCCACAA	366	367
AAAAACCAA	368	369
CAAAACCAA	370	371
ACAAACCAA	372	373
CCAAACCAA	374	375
AACAACCAA	376	377
CACAACCAA	378	379
ACCAACCAA	380	381
CCCAACCAA	382	383
AAACACCAA	384	385
CAACACCAA	386	387
ACACACCAA	388	389
CCACACCAA	390	391

AACCACCAA	392	393
CACCACCAA	394	395
ACCCACCAA	396	397
CCCCACCAA	398	399
AAAACCCAA	400	401
CAAACCCAA	402	403
ACAACCCAA	404	405
CCAACCCAA	406	407
AACACCCAA	408	409
CACACCCAA	410	411
ACCACCCAA	412	413
CCCACCCAA	414	415
AAACCCCAA	416	417
CAACCCCAA	418	419
ACACCCCAA	420	421
CCACCCCAA	422	423
AACCCCCAA	424	425
CACCCCCAA	426	427
ACCCCCCAA	428	429
CCCCCCCAA	430	431
AAAAAAACA	432	433
CAAAAAACA	434	435
ACAAAAACA	436	437
CCAAAAACA	438	439
AACAAAACA	440	441
CACAAAACA	442	443
ACCAAAACA	444	445
CCCAAAACA	446	447
AAACAAACA	448	449
CAACAAACA	450	451
ACACAAACA	452	453
CCACAAACA	454	455
AACCAAACA	456	457

CACCAAACA	458	459
ACCCAAACA	460	461
CCCCAAACA	462	463
AAAACAACA	464	465
CAAACAACA	466	467
ACAACAACA	468	469
CCAACAACA	470	471
AACACAACA	472	473
CACACAACA	474	475
ACCACAACA	476	477
CCCACAACA	478	479
AAACCAACA	480	481
CAACCAACA	482	483
ACACCAACA	484	485
CCACCAACA	486	487
AACCCAACA	488	489
CACCCAACA	490	491
ACCCAACA	492	493
CCCCCAACA	494	495
AAAAACACA	496	497
CAAAACACA	498	499
ACAAACACA	500	501
CCAAACACA	502	503
AACAACACA	504	505
CACAACACA	506	507
ACCAACACA	508	509
CCCAACACA	510	511
AAACACACA	512	513
CAACACACA	514	515
ACACACACA	516	517
CCACACACA	518	519
AACCACACA	520	521
CACCACACA	522	523

ACCCACACA	524	525
CCCCACACA	526	527
AAAACCACA	528	529
CAAACCACA	530	531
ACAACCACA	532	533
CCAACCACA	534	535
AACACCACA	536	537
CACACCACA	538	539
ACCACCACA	540	541
CCCACCACA	542	543
AAACCCACA	544	545
CAACCCACA	546	547
ACACCCACA	548	549
CCACCCACA	550	551
AACCCCACA	552	553
CACCCCACA	554	555
ACCCCCACA	556	557
CCCCCCACA	558	559
AAAAAACCA	560	561
CAAAAAACCA	562	563
ACAAAAACCA	564	565
CCAAAAACCA	566	567
AACAAACCA	568	569
CACAAACCA	570	571
ACCAAACCA	572	573
CCCAAACCA	574	575
AAACAACCA	576	577
CAACAACCA	578	579
ACACAACCA	580	581
CCACAACCA	582	583
AACCAACCA	584	585
CACCAACCA	586	587
ACCCAACCA	588	589

CCCCAACCA	590	591
AAAACACCA	592	593
CAAACACCA	594	595
ACAACACCA	596	597
CCAACACCA	598	599
AACACACCA	600	601
CACACACCA	602	603
ACCACACCA	604	605
CCCACACCA	606	607
AAACCACCA	608	609
CAACCACCA	610	611
ACACCACCA	612	613
CCACCACCA	614	615
AACCGACCA	616	617
CACCCACCA	618	619
ACCCCACCA	620	621
CCCCCACCA	622	623
AAAAACCCA	624	625
CAAAACCCA	626	627
ACAAACCCA	628	629
CCAAACCCA	630	631
AACAACCCA	632	633
CACAACCCA	634	635
ACCAACCCA	636	637
CCCAACCCA	638	639
AAACACCCA	640	641
CAACACCCA	642	643
ACACACCCA	644	645
CCACACCCA	646	647
AACCACCCA	648	649
CACCACCCA	650	651
ACCCACCCA	652	653
CCCCACCCA	654	655

AAAACCCCA	656	657
CAAACCCCA	658	659
ACAACCCCA	660	661
CCAACCCCA	662	663
AACACCCCA	664	665
CACACCCCA	666	667
ACCACCCCA	668	669
CCCACCCCA	670	671
AAACCCCCA	672	673
CAACCCCCA	674	675
ACACCCCCA	676	677
CCACCCCCA	678	679
AACCCCCCA	680	681
CACCCCCCA	682	683
ACCCCCCCA	684	685
CCCCCCCA	686	687
AAAAAAAAC	688	689
CAAAAAAAC	690	691
ACAAAAAAC	692	693
CCAAAAAAC	694	695
AACAAAAAC	696	697
CACAAAAAC	698	699
ACCAAAAC	700	701
CCCAAAAC	702	703
AAACAAAC	704	705
CAACAAAC	706	707
ACACAAAC	708	709
CCACAAAC	710	711
AACCAAAAC	712	713
CACCAAAAC	714	715
ACCCAAC	716	717
CCCCAAC	718	719
AAAACAAAC	720	721

CAAACAAAC	722	723
ACAACAAAC	724	725
CCAACAAAC	726	727
AACACAAAC	728	729
CACACAAAC	730	731
ACCACAAAC	732	733
CCCACAAAC	734	735
AAACCAAAC	736	737
CAACCAAAC	738	739
ACACCAAAC	740	741
CCACCAAAC	742	743
AACCCAAAC	744	745
CACCCAAAC	746	747
ACCCCAAAC	748	749
CCCCCAAAC	750	751
AAAAACAAC	752	753
CAAAACAAC	754	755
ACAAACAAC	756	757
CCAAACAAC	758	759
AACAACAAC	760	761
CACAACAAC	762	763
ACCAACAAC	764	765
CCCAACAAC	766	767
AAACACAAC	768	769
CAACACAAC	770	771
ACACACAAC	772	773
CCACACAAC	774	775
AACCACAAC	776	777
CACCACAAC	778	779
ACCCACAAC	780	781
CCCCACAAC	782	783
AAAACCAAC	784	785
CAAACCAAC	786	787

ACAACCAAC	788	789
CCAACCAAC	790	791
AACACCAAC	792	793
CACACCAAC	794	795
ACCACCAAC	796	797
CCCACCAAC	798	799
AAACCCAAC	800	801
CAACCCAAC	802	803
ACACCCAAC	804	805
CCACCCAAC	806	807
AACCCAAC	808	809
CACCCAAC	810	811
ACCCAAC	812	813
CCCCCAAC	814	815
AAAAACAC	816	817
CAAAACAC	818	819
ACAAACAC	820	821
CCAAACAC	822	823
AACAAACAC	824	825
CACAAACAC	826	827
ACCAAACAC	828	829
CCCAAACAC	830	831
AAACAACAC	832	633
CAACAACAC	834	835
ACACAACAC	636	837
CCACAACAC	838	639
AACCAACAC	640	841
CACCAACAC	842	843
ACCCAACAC	844	845
CCCCAACAC	846	847
AAAACACAC	848	849
CAAACACAC	850	851
ACAACACAC	852	853

CCAACACAC	854	855
AACACACAC	856	857
CACACACAC	858	859
ACCACACAC	860	861
CCCACACAC	862	863
AAACCACAC	864	865
CAACCACAC	866	867
ACACCACAC	868	869
CCACCACAC	870	871
AACCCACAC	872	873
CACCCACAC	874	875
ACCCACAC	876	877
CCCCACAC	878	879
AAAAACCAC	880	881
CAAAACCAC	882	883
ACAAACCAC	884	885
CCAAACCAC	886	887
AACAACCAC	888	889
CACAACCAC	890	891
ACCAACCAC	892	893
CCCAACCAC	894	895
AAACACCAC	896	897
CAACACCAC	696	899
ACACACCAC	900	901
CCACACCAC	902	903
AACCACCAC	904	905
CACCACCAC	906	907
ACCCACCAC	908	909
CCCCACCAC	910	911
AAAACCCAC	912	913
CAAACCCAC	914	915
ACAACCCAC	916	917
CCAACCCAC	918	919

AACACCCAC	920	921
CACACCCAC	922	923
ACCACCCAC	924	925
CCCACCCAC	926	927
AAACCCAC	928	929
CAACCCAC	930	931
ACACCCAC	932	933
CCACCCAC	934	935
AACCCAC	936	937
CACCCAC	938	939
ACCCAC	940	941
CCCCAC	942	943
AAAAAAC	944	945
CAAAAAAC	946	947
ACAAAAAC	948	949
CCAAAAAC	950	951
AACAAAAAC	952	953
CACAAAAAC	954	955
ACCAAAAC	956	957
CCCAAAAC	958	959
AAACAAAC	960	961
CAACAAAC	962	963
ACACAAAC	964	965
CCACAAAC	966	967
AACCAAAC	968	969
CACCAAAC	970	971
ACCCAAAC	972	973
CCCCAAAC	974	975
AAAACAAC	976	977
CAAACAAC	978	979
ACAACAAC	980	981
CCAACAAC	982	983
AACACAAC	984	985

CACACAACC	986	987
ACCACAACC	988	989
CCCACAACC	990	991
AAACCAACC	992	993
CAACCAACC	994	995
ACACCAACC	996	997
CCACCAACC	998	999
AACCCAACC	1000	1001
CACCCAACC	1002	1003
ACCCAACC	1004	1005
CCcCCAACC	1006	1007
AAAAACACC	1008	1009
CAAAACACC	1010	1011
ACAAACACC	1012	1013
CCAAACACC	1014	1015
AACAACACC	1016	1017
CACAACACC	1018	1019
ACCAACACC	1020	1021
CCCAACACC	1022	1023
AAACACACC	1024	1025
CAACACACC	1026	1027
ACACACACC	1028	1029
CCACACACC	1030	1031
AACCACACC	1032	1033
CACCACACC	1034	1035
ACCCACACC	1036	1037
CCCCACACC	1038	1039
AAAACCACC	1040	1041
CAAACCACC	1042	1043
ACAACCACC	1044	1045
CCAACCACC	1046	1047
AACACCACC	1048	1049
CACACCACC	1050	1051

ACCACCACC	1052	1053
CCCACCACC	1054	1055
AAACCCACC	1056	1057
CAACCCACC	1058	1059
ACACCCACC	1060	1061
CCACCCACC	1062	1063
AACCCACC	1064	1065
CACCCACC	1066	1067
ACCCACC	1068	1069
CCCCACC	1070	1071
AAAAACCC	1072	1073
CAAAAACCC	1074	1075
AcAAAACCC	1076	1077
CCAAAACCC	1078	1079
AACAAACCC	1080	1081
CACAAACCC	1082	1083
ACCAAACCC	1084	1085
CCCAAACCC	1086	1087
AAACAACCC	1088	1009
CAACAACCC	1090	1091
ACACAACCC	1092	1093
CCACAACCC	1094	1095
AACCAACCC	1096	1097
CACCAACCC	1098	1099
ACCCAACCC	1100	1101
CCCCAACCC	1102	1103
AAAACACCC	1104	1105
CAAACACCC	1106	1107
ACAACACCC	1108	1109
CCAACACCC	1110	1111
AACACACCC	1112	1113
CACACACCC	1114	1115
ACCACACCC	1116	1117

CCCACACCC	1118	1119
AAACCACCC	1120	1121
CAACCACCC	1122	1123
ACACCACCC	1124	1125
CCACCACCC	1126	1127
AACCCACCC	1128	1129
CACCCACCC	1130	1131
ACCCACCC	1132	1133
CCCCACCC	1134	1135
AAAAACCCC	1136	1137
CAAAACCCC	1138	1139
ACAAACCCC	1140	1141
CCAAACCCC	1142	1143
AACAACCCC	1144	1145
CACAACCCC	1146	1147
ACCAACCCC	1148	1149
CCCAACCCC	1150	1151
AAACACCCC	1152	1153
CAACACCCC	1154	1155
ACACACCCC	1156	1157
CCACACCCC	1158	1159
AACCACCCC	1160	1161
CACCACCCC	1162	1163
ACCCACCCC	1164	1165
CCCCACCCC	1166	1167
AAAACCCGC	1168	1169
CAAACCCCC	1170	1171
ACAACCCCC	1172	1173
CCAACCCCC	1174	1175
AACACCCCC	1176	1177
CACACCCCC	1178	1179
ACCACCCCC	1180	1181
CCCACCCCC	1182	1183

AAACCCCCC	1184	1185
CAACCCCCC	1186	1187
ACACCCCCC	1188	1189
CCACCCCCC	1190	1191
AACCCCCCC	1192	1193
CACCCCCCC	1194	1195
ACCCCCCCC	1196	1197
CCCCCCCCC	1198	1199

* Konstrukt-nomenklatur ist identisch zur Nomenklatur der Tabelle 3

[0231] Der Zusammenbau der Hybridmoleküle kann auch mit weniger Ligationsschritten als oben skizziert erzielt werden. Zum Beispiel kann die Ligierung von N123, N45, C67 und C89 in einer einzigen Ligationsreaktion vervollständigt werden. Durch Konstruktion von Fragmenten mit kohäsiven Enden, die lediglich mit kohäsiven Enden benachbarter Fragmenten perfekte Komplemente bilden, ist es möglich, in einer einzigen Ligationsreaktion mehrere Fragmente in einer korrekten Reihenfolge zu ligieren.

Beispiel 2

Expression der Hybridmoleküle

[0232] Jedes der 512 Konstrukte wurde getrennt transient in 293T-Zellen transfiziert, um die verschiedenen Hybridkonstrukte zu exprimieren. Die 293T-Zellen wurden gemäß Standardprotokollen in Medium, bestehend aus Dulbeccos modifiziertem Eagle-Medium (D-MEM) und 10% fötalem Rinderserum (FBS) angezogen. Vier- und zwanzig Stunden vor der Transfektion wurden konfluente Schalen 1:10 mit frischem Medium in 6 Näpfen verdünnt. Vier Stunden vor der Transfektion wurde das Medium ausgetauscht. Für jedes Konstrukt wurden 3 µg DNA unter Verwendung von Standard-Protokollen für die Kalziumphosphat-vermittelte Transfektion transfiziert [Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual S. 16.33–16.36 (1989)]. Zwanzig Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen zweimal mit warmer PBS gewaschen und 2 ml Medium wurden zu jedem Napf zugegeben.

[0233] Erste Versuche wurden durchgeführt, um festzustellen, ob die transfizierten Zellen die durch die Hybrid-DNA-Moleküle kodierten Hybrid-VEGF-Polypeptide exprimierten. Daher wurde 48 Stunden nach der Transfektion die metabolische Markierung mit ³⁵S-Methionin und ³⁵S-Cystein begonnen unter Verwendung von 1,3 ml/Napf Markierungsmedium, zusammengesetzt aus MEM, dem Cystein und Methionin fehlten, 0,1% BSA, 24 µCi ³⁵S-Methionin-Cystein/ml (Redivue PRO-MIX, Amersham). Der Zellüberstand wurde 72–78 Stunden nach der Transfektion geerntet, durch Zentrifugation geklärt und bei 4°C aufbewahrt.

[0234] Der Überstand wurde mit Anti-Pentahistidin-Antikörper (Quiagen) durch Mischen von 175 µl des Probenüberstandes mit 100 µl IP-Mischung (PBS mit 1,5% BSA, 0,05% Tween 20 und 12 µl/ml Anti-Pentahistidin-Antikörper) bei 4°C über Nacht, unter Umwälzung, immunpräzipitiert. (Der pSecTag1-Expressionsvektor wurde so konstruiert, dass er jedes der Hybrid-VEGF-Proteine mit einem Polyhistidinmarker exprimierte). Um immunpräzipitiertes Protein zu sammeln, wurden 50 µl einer 30% Protein-A-Sepharose (PAS, Pharmacia)-Aufschlammung in PBS gegeben und unter Rühren für mindestens 1,5 Stunden bei 4°C inkubiert. Standardpuffer wurde zu jeder Immunpräzipitationsprobe zugegeben und für 5 Minuten bei 95°C gekocht, währenddessen die immunpräzipitierten Proteine von der Protein-A-Sepharose dissoziierten. Nach Zentrifugation wurden 10 µl jeder Probe auf 15% SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen analysiert. Die Gele wurden getrocknet und für entweder 12 Stunden gegenüber Phosphorimager-Platten oder 4 Wochen gegenüber Röntgenfilm exponiert. Die Ergebnisse dieser Experimente sind unten in Tabelle 3 in der mit "EXP" für Expression markierten Spalte wiedergegeben. Wie in der Tabelle mit "Ja" gezeigt, waren die anfänglichen Versuche, die große Mehrzahl der Hybridkonstrukte zu exprimieren, erfolgreich. Die Konstrukte, für die in den Vorversuchen eine schwache ("schwach") und keine Expression ("keine") beobachtet wurde, sind ebenfalls angegeben. Fehlende Expression in den anfänglichen Studien ist der Vollständigkeit halber angegeben, und soll keine Schlussfolgerung hinsichtlich fehlender Lebensfähigkeit oder anderer identifizierter Probleme widerspiegeln. Es ist jedoch erwähnenswert, dass die nicht exprimierten Konstrukte nahezu alle jene chimären Moleküle waren, bei denen

das Fragment 3 von VEGF-A stammte und das Fragment 7 von VEGF-C stammte. Die Analyse der physikalischen Beziehung zwischen diesen beiden Fragmenten zeigt, dass Reste von diesen beiden Fragmenten einander auf dem atomaren Niveau kaum kontaktieren, wie anhand der VEGF-A-Kristallstruktur beurteilt wurde. Die Inkompatibilität von Fragment 3 von VEGF-A und Fragment 7 von VEGF-C mag von unkorrekter Faltung des Moleküls herrühren, die möglicherweise zum Teil von der raschen Glykosylierung des von VEGF-C stammenden Fragments 7 hervorgerufen wird, wenn das Molekül im endoplasmatischen Retikulum erscheint. Die Glykosylierungsstellen innerhalb von VEGF-A sind in einem Abstand von der rezeptorbindenden Domäne lokalisiert, wohingegen die Glykosylierungsstellen innerhalb VEGF-C näher zu der vom Fragment 3 gebildeten Region des Moleküls angeordnet sind, von der vorhergesagt wird, dass es Kontakte mit der dritten Domäne des Rezeptors bildet. Die Kohlenhydratreste können bei der Wechselwirkung zwischen Ligand und Rezeptor ebenfalls beteiligt sein.

Beispiel 3

Bindungstests von Hybridmolekülen an lösliche VEGF-Rezeptor-Fc-Fusionsproteine

[0235] Die Hybridproteine, die in 293T-Zellen exprimiert wurden (siehe Beispiel 2 und Tabelle 1), wurden auf ihre Fähigkeit getestet, lösliche VEGF-Rezeptor-Fc-Fusionsproteine zu binden. Die Bindung der Hybridproteine an alle drei VEGF-Rezeptoren, VEGFR-1, VEGFR-2 und VEGFR-3, wurde auf diese Weise analysiert. Beispielhafte Bindungstests sind in Achen et al., Proc Natl Acad Sci USA 95: 548–53 (1998) beschrieben, hier vollständig durch Inbezugnahme aufgenommen.

[0236] Es wird ersichtlich sein, dass die Bindungstests mit jeder Form natürlich vorkommender VEGF-Rezeptoren durchgeführt werden können, die die Fähigkeit bewahren, ihre entsprechenden Liganden zu binden, einschließlich, aber nicht beschränkt auf ganze Zellen, die natürlicherweise einen Rezeptor exprimieren, oder die rekombinant modifiziert wurden, um den Rezeptor zu exprimieren; trunkierte, solubilisierbare extrazelluläre ligandenbindende Domänen des Rezeptors; Fusionen, umfassend extrazelluläre Rezeptordomänen, fusioniert mit anderen Proteinen wie beispielsweise alkalischer Phosphatase (z.B. VEGFR-2-AP, beschrieben in Cao et al., J Biol. Chem. 271: 3154–62 (1996)) oder Immunglobulinsequenzen; und Fusionen, umfassend extrazelluläre Rezeptordomänen, fusioniert an Markersequenzen (z.B. einen Polyhistidinmarker), die geeignet sind, um das Protein mit einem Antikörper oder mit einem festen Träger einzufangen; und extrazelluläre Rezeptordomänen, die chemisch an einen festen Träger wie beispielsweise CNBr-aktivierte Sepharose-Perlen angeheftet wurden.

[0237] Für die vorliegenden Experimente wurde die Rezeptorbindung unter Verwendung von Konstrukten getestet, die die extrazelluläre Domäne von VEGFR-1, VEGFR-2 oder VEGFR-3, fusioniert an Ketten der konstanten Region von Immunglobulin, umfassen. Die ersten drei Ig-Domänen von VEGFR-1 wurden an das Fc-Fragment des Signal-plgPlus-Vektors (Ingenius/Novagen/R&D Systems) fusioniert. Dieses Konstrukt (VEGFR-1-Fc) wurde stabil in Drosophila-Schneider-2(S2)-Zellen exprimiert und unter Verwendung von Protein-A-Sepharose gereinigt. Die Reinheit wurde durch Silberfärbung auf einem PAGE-Gel analysiert und die Funktionalität des Fusionsproteins wurde anhand seiner Fähigkeit getestet, ³⁵S-markiertes VEGF-Protein zu binden. Der VEGFR-2-Fc-Rezeptor umfasst die ersten 3 Ig-Domänen von VEGFR-2 (kodiert durch die Nukleotide 64–972 der GenBank-Zugriffsnummer X61656), fusioniert an das Fc-Fragment des plg-Vektors. Der VEGFR-3-Fc-Rezeptor besteht gleichermaßen aus den ersten drei Ig-Domänen von VEGFR-3 (kodiert durch die Nukleotide 20–1005 der GenBank-Zugriffsnummer X68203), fusioniert an das Fc-Fragment des plg-Vektors. VEGFR-2-Fc- und VEGFR-3-Fc-Proteine wurden in 293T-Zellen exprimiert und wie oben für VEGFR-1-Fc beschrieben gereinigt.

[0238] Das Bindungstestverfahren war identisch zu der Immunpräzipitation unter Verwendung von Pentahistidin-Antikörper, beschrieben in Beispiel 2, mit Ausnahme der Zusammensetzung der Immunpräzipitations(IP)-Mischung. Die für die Rezeptorbindungsanalysen verwendeten IP-Mischungen waren wie folgt: für VEGFR-1-Bindungstests bestand die IP-Mischung aus phosphatgepufferter Salzlösung (PBS), enthaltend 1,5% BSA, 0,06% Tween 20, 3 µg/ml Heparin und 400 ng/ml VEGFR-1-Fc-Fusionsprotein (100 µl dieser IP-Mischung wurden zu 200 µl Probenüberstand zugegeben); für VEGFR-2-Bindungstests bestand die IP-Mischung aus 82% konditioniertem Zellüberstand von 293T-Zellen, die VEGFR-2-Fc-Fusionsprotein transient exprimierten, in Mischung mit 18% einer PBS-Lösung, die 5% BSA, 0,2% Tween 20 und 10 µg/ml Heparin enthielt (250 µl IP-Mischung wurden zu 200 µl Probenüberstand zugegeben); und für VEGFR-3-Bindungstests bestand die IP-Mischung aus 82% konditioniertem Zellüberstand von 293T-Zellen, die VEGFR-3-Fc-Fusionsprotein transient exprimierten, 18% PBS enthaltend 5% BSA, 0,2% Tween 20 und 10 µg/ml Heparin (250 µl IP-Mischung wurden zu 200 µl Probenüberstand zugegeben). Einige wenige ausgewählte Konstrukte (die Klone 12-1, 12-5, 12-7, 12-9, 12-11, 12-13, 12-14, 14-9, 23-1, 32-14, 52-15, 53-3, 82-7, 82-9, 82-11, 82-13, 83-15, 84-9 und

84-11) wurden mehr als einmal untersucht.

[0239] Die Ergebnisse der Bindungstests unter Verwendung von ^{35}S -markierten Hybridproteinen sind unten in Tabelle 3 zusammengefasst. Die apparenten Molekulargewichte der detektierten Proteinen lagen zwischen 18 und 27 kDa. Üblicherweise waren zwei Banden mit unterschiedlichen Bandenintensitäten sichtbar. Manchmal war die zweite Bande nur nach langer Exposition detektierbar. Die Anwesenheit von zwei Banden korreliert mit dem Ursprung der Fragmente 7 und 9 des untersuchten Hybridproteins. Fragment 7 enthält eine potentielle Glykosylierungsstelle, unabhängig davon, ob es von VEGF-A oder VEGF-C abgeleitet wurde, wohingegen Fragment 9 lediglich dann eine Glykosylierungsstelle enthält, wenn es von VEGF-C stammte. Die mehrfachen Banden sind daher wahrscheinlich auf eine differentielle Glykosylierung des analysierten Hybridprotein zurückzuführen. Im Folgenden sind vorhergesagte Banden für verschiedene Kombinationen von Glykosylierungsstellen angegeben:

- (1) Fragment 7, abgeleitet von VEGF-A, und Fragment 9 von VEGF-A, erzeugt zwei Banden von –18 und –22 kD.
- (2) Fragment 7, abgeleitet von VEGF-A und Fragment 9 von VEGF-C erzeugt eine –26-kD-Bande (eine zweite Bande von –22 kD fehlt manchmal, eine dritte extrem schwache Bande von –18 kD ist manchmal sichtbar).
- (3) Fragment 7, abgeleitet von VEGF-C, und Fragment 9 von VEGF-A erzeugt eine Bande von –22 kD (eine zweite Bande von –18 kD fehlt manchmal).
- (4) Fragment 7, abgeleitet von VEGF-C, und Fragment 9 von VEGF-C erzeugt eine Bande von –23 kDa

[0240] Die Ergebnisse des Bindungstests deuten darauf hin, dass, wenn beide Glykosylierungsstellen von VEGF-C abgeleitet waren, weniger heterogene Glykosylierung beobachtet wurde. Moleküle, die sowohl Fragment 7 von VEGF-A als auch Fragment 9 von VEGF-C enthielten, scheinen eine künstliche Hyperglykosylierung zu fördern. Die in Fragment 7 enthaltene VEGF-A-Glykosylierungsstelle ist ebenfalls für unvollständige Glykosylierung anfällig.

[0241] Die Bindungstestdaten deuten darauf hin, dass etliche Hybridmoleküle neue Bindungseigenschaften zeigen. Obwohl die Analyse nicht quantitativ war, zeigten einige der Hybridmoleküle unterschiedliche relative Signalstärken. Klon 72-10 beispielsweise scheint den größten Teil seiner Affinität für VEGFR-3 verloren zu haben, während er den größten Teil seiner Affinität für VEGFR-2 beibehalten hat. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass unter den Hybridprotein, die die Rezeptorspezifitäten für eines der Stammproteine (VEGF-A oder VEGF-C) bewahrten, einige unterschiedliche Änderungen hinsichtlich ihrer Bindungsaffinitäten zu den entsprechenden Rezeptoren durchgemacht haben.

[0242] In Tabelle 3 unten führt Spalte 1 die Bezeichnungen der untersuchten Konstrukte auf. Spalte 2 führt nacheinander die neun Fragmente jedes Konstrukt auf, wobei A = Fragment von VEGF-A und C = Fragment von VEGF-C. Die mit "EXP" gekennzeichnete Spalte 3 führt die Ergebnisse der Experimente zur Expression in 293T-Zellen, wie in Beispiel 2 beschrieben, auf. In dieser Spalte bedeutet "keine", dass kein detektierbares Protein exprimiert wurde; "schwach" bedeutet, dass eine schwache Expression detektierbar war; und "Ja" bedeutet, dass das exprimierte Protein leicht detektierbar war. Die letzten drei Spalten führen Ergebnisse der in Beispiel 3 beschriebenen Rezeptorbindungstests auf, wobei die Bindung an VEGFR-1-Fc; VEGFR-2-Fc; und VEGFR-3-Fc untersucht wurde. Für diese letzten drei Spalten bedeutet "Ja" Bindung, "keine" bedeutet keine detektierbare Bindung an den Rezeptor und "0" bedeutet, dass dieses Konstrukt in 293T-Zellen nicht exprimiert wurde, so dass es für den Bindungstest nicht verwendet werden konnte.

Tabelle 3 Ergebnisse der Hybridmolekülexpression und Rezeptorbindungsanalyse

		EXP	VEGFR-1	VEGFR-2	VEGFR-3
31-1	ACAAAAAAA	Ja	keine	keine	keine
31-5	ACAAAACAA	keine	0	0	0
31-13	ACAAACCAA	keine	0	0	0
31-9	ACAAACAAA	Ja	keine	keine	keine
31-2	ACAAAAAAC	Ja	keine	keine	keine
31-10	ACAAACAAC	Ja	keine	keine	keine
31-6	ACAAAACAC	Ja	keine	keine	keine
31-14	ACAAACCAC	keine	0	0	0
31-12	ACAAACACA	Ja	keine	keine	keine

31-11	ACAAACACA	Ja	keine	keine	keine
31-7	ACAAAACCA	keine	0	0	0
31-4	ACAAAAACC	Ja	keine	keine	keine
31-8	ACAAAACCC	Ja	0	0	0
31-3	ACAAAAACA	Ja	keine	keine	keine
31-15	ACAAACCCA	keine	0	0	0
31-16	ACAAACCCC	keine	0	0	0
21-1	CCCAAAAAA	Ja	keine	keine	keine
21-2	CCCAACAA	Ja	keine	keine	keine
21-3	CCCAACAAA	Ja	keine	keine	keine
21-4	CCCAACCAA	Ja	keine	keine	keine
21-5	CCCAAAAAC	Ja	keine	keine	keine
21-6	CCCAACAC	Ja	keine	keine	keine
21-7	CCCAACAAC	Ja	keine	keine	keine
21-8	CCCAACCAC	Ja	keine	keine	keine
21-9	CCCAAAACA	Ja	keine	keine	keine
21-10	CCCAAACCA	Ja	keine	keine	keine
21-11	CCCAACACA	Ja	keine	keine	keine
21-12	CCCAACCCA	Ja	keine	keine	keine
21-13	CCCAAAACC	Ja	keine	keine	keine
21-14	CCCAAACCC	Ja	keine	keine	keine
21-15	CCCAACACC	Ja	keine	keine	keine
21-16	CCCAACCCC	Ja	keine	keine	keine
22-1	CCCCCAAAA	Ja	keine	keine	keine
22-2	CCCCCACAA	Ja	keine	Ja	Ja
22-3	CCCCCCAAA	Ja	keine	keine	Ja
22-4	CCCCCCCCAA	Ja	keine	Ja	Ja
22-5	CCCCCAAAC	Ja	keine	keine	keine
22-6	CCCCCACAC	Ja	keine	Ja	Ja
22-7	CCCCCCAAC	Ja	keine	keine	keine
22-8	CCCCCCCAC	Ja	keine	Ja	Ja
22-9	CCCCCAACA	Ja	keine	keine	keine
22-10	CCCCCACCA	Ja	keine	Ja	Ja

22-11	CCCCCACA	Ja	keine	keine	keine
22-12	CCCCCCCCA	Ja	keine	Ja	Ja
22-13	CCCCCAACC	Ja	keine	keine	keine
22-14	CCCCCACCC	Ja	keine	Ja	Ja
22-15	CCCCCCACC	Ja	keine	keine	keine
22-16	CCCCCCCCC	Ja	keine	Ja	Ja
72-1	ACCCCAAAA	Ja	keine	keine	keine
72-2	ACCCACAAA	Ja	keine	Ja	Ja
72-3	ACCCCAAAA	Ja	keine	keine	keine
72-4	ACCCCCCAA	Ja	keine	Ja	Ja
72-5	ACCCCAAAC	Ja	keine	keine	keine
72-6	ACCCACAC	Ja	keine	keine	Ja
72-7	ACCCCAAC	Ja	keine	keine	keine
72-8	ACCCCCCAC	Ja	keine	Ja	Ja
72-9	ACCCCAACA	Ja	keine	keine	keine
72-10	ACCCACCA	Ja	keine	Ja	Ja
72-11	ACCCCCACA	Ja	keine	keine	keine
72-12	ACCCCCCCA	Ja	keine	Ja	Ja
72-13	ACCCCAACC	Ja	keine	keine	keine
72-14	ACCCACCC	Ja	keine	Ja	Ja
72-15	ACCCCACC	Ja	keine	keine	keine
72-16	ACCCCCCCC	Ja	keine	Ja	Ja
11-1	AAAAAAAAA	Ja	Ja	Ja	keine
11-2	AAAAACAA	keine	0	0	0
11-3	AAAAACAAA	Ja	Ja	Ja	keine
11-4	AAAAACCAA	keine	0	0	0
11-5	AAAAAAAAC	Ja	Ja	Ja	keine
11-6	AAAAAACAC	keine	0	0	0
11-7	AAAAACAAC	Ja	Ja	Ja	keine
11-8	AAAAACCAC	keine	0	0	0
11-9	AAAAAACA	Ja	Ja	keine	keine
11-10	AAAAAACCA	keine	0	0	0
11-11	AAAAACACA	Ja	Ja	Ja	keine

11-12	AAAAACCCA	keine	0	0	0
11-13	AAAAAAACC	Ja	Ja	keine	keine
11-14	AAAAAACCC	keine	0	0	0
11-15	AAAAACACC	Ja	Ja	Ja	keine
11-16	AAAAACCCC	keine	0	0	0
12-1	AAACCACAAA	Ja	Ja	Ja	Ja
12-2	AAACCACAA	keine	0	0	0
12-3	AAACCCAAA	Ja	Ja	Ja	keine
12-4	AAACCCCAA	keine	0	0	0
12-5	AAACCACAA	Ja	Ja	keine	keine
12-6	AAACCACAC	keine	0	0	0
12-7	AAACCCAAC	Ja	Ja	Ja	Ja
12-8	AAACCCCAC	keine	0	0	0
12-9	AAACCAACA	Ja	Ja	keine	Ja
12-10	AAACCACCA	keine	0	0	0
12-11	AAACCCACA	Ja	Ja	Ja	Ja
12-12	AAACCCCCA	keine	0	0	0
12-13	AAACCAACC	Ja	Ja	keine	Ja
12-14	AAACCACCC	Ja	keine	keine	Ja
12-15	AAACCCACC	Ja	keine	Ja	Ja
12-16	AAACCCCCC	Ja	keine	keine	Ja
81-1	CAAAAAAAAA	Ja	Ja	Ja	keine
81-2	CAAAAACAA	keine	0	0	0
81-3	CAAAACAAA	Ja	Ja	Ja	keine
81-4	CAAAACCAA	keine	0	0	0
81-5	CAAAAAAAC	Ja	Ja	Ja	keine
81-6	CAAAAACAC	keine	0	0	0
81-7	CAAAACAAC	Ja	Ja	Ja	keine
81-8	CAAAACCAC	keine	0	0	0
81-9	CAAAAAACA	Ja	Ja	keine	keine
81-10	CAAAAACCA	keine	0	0	0
81-11	CAAAACACA	Ja	Ja	Ja	keine
81-12	CAAAACCCA	keine	0	0	0

81-13	CAAAAAACC	Ja	Ja	keine	keine
81-14	CAAAAACCC	keine	0	0	0
81-15	CAAAACACC	Ja	Ja	Ja	keine
81-16	CAAAACCCC	keine	0	0	0
13-1	AAAACAAAA	Ja	Ja	Ja	keine
13-2	AAAACACAA	keine	0	0	0
13-3	AAAACCAAA	keine	0	0	0
13-4	AAAACCCAA	Ja	keine	keine	keine
13-5	AAAACAAAC	Ja	Ja	Ja	keine
13-6	AAAACACAC	Ja	keine	keine	keine
13-7	AAAACCAAC	Ja	Ja	Ja	keine
13-8	AAAACCCAC	Ja	keine	keine	keine
13-9	AAAACAACA	Ja	Ja	keine	keine
13-10	AAAACACCA	keine	0	0	0
13-11	AAAACCACA	Ja	Ja	keine	keine
13-12	AAAACCCCA	keine	0	0	0
13-13	AAAACAACC	Ja	Ja	keine	keine
13-14	AAAACACCC	Ja	keine	keine	keine
13-15	AAAACCACC	Ja	Ja	keine	keine
13-16	AAAACCCCC	keine	0	0	0
14-1	AAACAASAA	Ja	Ja	keine	keine
14-2	AAACAACAA	keine	0	0	0
14-3	AAACACAAA	Ja	Ja	Ja	keine
14-4	AAACACCAA	keine	0	0	0
14-5	AAACAASAC	Ja	Ja	keine	keine
14-6	AAACAACAC	keine	0	0	0
14-7	AAACACAAC	Ja	keine	Ja	keine
14-8	AAACACCAC	keine	0	0	0
14-9	AAACAASACA	Ja	Ja	Ja	Ja
14-10	AAACAACCA	keine	0	0	0
14-11	AAACACACA	keine	0	0	0
14-12	AAACACCCA	keine	0	0	0
14-13	AAACAASACC	Ja	keine	keine	keine

14-14	AAACAACCC	keine	0	0	0
14-15	AAACACACC	Ja	keine	keine	keine
14-16	AAACACCCC	keine	0	0	0
23-1	CCCACAAAA	Ja	keine	keine	keine
23-2	CCCACACAA	Ja	keine	keine	keine
23-3	CCCACCAAA	Ja	keine	keine	keine
23-4	CCCACCCAA	Ja	keine	keine	keine
23-5	CCCACAAAC	Ja	keine	keine	keine
23-6	CCCACACAC	Ja	keine	keine	keine
23-7	CCCACCAAC	Ja	keine	keine	keine
23-8	CCCACCCAC	Ja	keine	keine	keine
23-9	CCCACAACA	Ja	keine	keine	keine
23-10	CCCACACCA	Ja	keine	Ja	keine
23-11	CCCACCACA	Ja	keine	keine	keine
23-12	CCCACCCCA	Ja	keine	Ja	keine
23-13	CCCACAACC	Ja	keine	keine	keine
23-14	CCCACACCC	Ja	keine	Ja	keine
23-15	CCCACCACC	Ja	keine	keine	keine
23-16	CCCACCCCC	Ja	keine	keine	keine
33-1	ACAACAAAA	Ja	keine	Ja	keine
33-2	ACAACACAA	Ja	keine	keine	keine
33-3	ACAACCAAA	Ja	keine	Ja	keine
33-4	ACAACCCAA	Ja	keine	keine	keine
33-5	ACAACAAAC	Ja	keine	keine	keine
33-6	ACAACACAC	Ja	keine	keine	keine
33-7	ACAACCAAC	Ja	keine	keine	keine
33-8	ACAACCCAC	Ja	keine	keine	keine
33-9	ACAACAACA	Ja	keine	Ja	keine
33-10	ACAACACCA	keine	0	0	0
33-11	ACAACCACA	Ja	keine	keine	keine
33-12	ACAACCCCA	keine	0	0	0
33-13	ACAACAACC	Ja	keine	keine	keine
33-14	ACAACACCC	Ja	keine	keine	keine

33-15	ACAACCACC	Ja	keine	keine	keine
33-16	ACAACCCCC	Ja	keine	keine	keine
34-1	ACACAAAAA	Ja	keine	keine	keine
34-2	ACACAACAA	keine	0	0	0
34-3	ACACACAAA	Ja	keine	keine	keine
34-4	ACACACCAA	keine	0	0	0
34-5	ACACAAAAC	Ja	keine	keine	keine
34-6	ACACAACAC	keine	0	0	0
34-7	ACACACAAC	Ja	keine	keine	keine
34-8	ACACACCAC	keine	0	0	0
34-9	ACACAAACA	Ja	keine	keine	keine
34-10	ACACAACCA	keine	0	0	0
34-11	ACACACACA	Ja	keine	keine	keine
34-12	ACACACCCA	keine	0	0	0
34-13	ACACAAACC	Ja	keine	keine	keine
34-14	ACACAACCC	Ja	keine	keine	keine
34-15	ACACACACC	Ja	keine	keine	keine
34-16	ACACACCCC	keine	0	0	0
41-1	CACAAAAAA	Ja	Ja	keine	keine
41-2	CACAAACAA	keine	0	0	0
41-3	CACAACAAA	Ja	keine	keine	keine
41-4	CACAACCAA	keine	0	0	0
41-5	CACAAAAC	Ja	keine	keine	keine
41-6	CACAAACAC	Ja	keine	keine	keine
41-7	CACAACAAC	Ja	keine	keine	keine
41-8	CACAACCAC	keine	0	0	0
41-9	CACAAAACA	Ja	keine	keine	keine
41-10	CACAAACCA	keine	0	0	0
41-11	CACAACACA	Ja	keine	keine	keine
41-12	CACAACCCA	keine	0	0	0
41-13	CACAAAACC	Ja	keine	keine	keine
41-14	CACAAACCC	Ja	keine	keine	keine
41-15	CACAACACC	Ja	keine	keine	keine

41-16	CACAACCCC	Ja	keine	keine	keine
42-1	CACCCAAAA	Ja	keine	keine	keine
42-2	CACCCACAA	keine	0	0	0
42-3	CACCCCAAA	Ja	keine	keine	keine
42-4	CACCCCCAA	keine	0	0	0
42-5	CACCCAAAC	keine	0	0	0
42-6	CACCCACAC	Ja	keine	keine	keine
42-7	CACCCCAAC	Ja	keine	keine	keine
42-8	CACCCCCAC	Ja	keine	keine	keine
42-9	CACCCAACA	Ja	keine	keine	keine
42-10	CACCCACCA	Ja	keine	keine	keine
42-11	CACCCCACA	Ja	keine	keine	keine
42-12	CACCCCCCA	Ja	keine	keine	keine
42-13	CACCCAACC	Ja	keine	keine	keine
42-14	CACCCACCC	Ja	keine	keine	keine
42-15	CACCCCACC	Ja	keine	keine	keine
42-16	CACCCCCCC	Ja	keine	keine	keine
43-1	CACACAAAA	Ja	Ja	keine	keine
43-2	CACACACAA	keine	0	0	0
43-3	CACACCAAA	Ja	keine	keine	keine
43-4	CACACCCAA	keine	0	0	0
43-5	CACACAAAC	Ja	keine	keine	keine
43-6	CACACACAC	Ja	keine	keine	keine
43-7	CACACCAAC	Ja	keine	keine	keine
43-8	CACACCCAC	Ja	keine	keine	keine
43-9	CACACAACA	Ja	keine	keine	keine
43-10	CACACACCA	keine	0	0	0
43-11	CACACCACA	Ja	keine	keine	keine
43-12	CACACCCCA	keine	0	0	0
43-13	CACACAACC	Ja	keine	keine	keine
43-14	CACACACCC	Ja	keine	keine	keine
43-15	CACACCACC	Ja	keine	keine	keine
43-16	CACACCCCC	Ja	keine	keine	keine

44-1	CACCAAAAA	Ja	keine	keine	keine
44-2	CACCAACAA	Ja	keine	keine	keine
44-3	CACCACAAA	Ja	keine	keine	keine
44-4	CACCACCAA	Ja	keine	keine	keine
44-5	CACCAAAAC	Ja	keine	keine	keine
44-6	CACCAACAC	keine	0	0	0
44-7	CACCACAAC	Ja	keine	keine	keine
44-8	CACCACCAC	Ja	keine	keine	keine
44-9	CACCAAACA	Ja	keine	keine	keine
44-10	CACCAACCA	Ja	keine	keine	keine
44-11	CACCACACA	Ja	keine	keine	keine
44-12	CACCACCCA	Ja	keine	keine	keine
44-13	CACCAAACC	Ja	keine	keine	keine
44-14	CACCAACCC	Ja	keine	keine	keine
44-15	CACCACACC	Ja	keine	keine	keine
44-16	CACCACCCC	Ja	keine	keine	keine
54-1	CCACAAAAA	Ja	keine	keine	keine
54-2	CCACAACAA	keine	0	0	0
54-3	CCACACAAA	Ja	keine	keine	keine
54-4	CCACACCAA	keine	0	0	0
54-5	CCACAAAAC	Ja	keine	keine	keine
54-6	CCACAACAC	keine	0	0	0
54-7	CCACACAAC	Ja	keine	keine	keine
54-8	CCACACCAC	keine	0	0	0
54-9	CCACAAACA	Ja	keine	keine	keine
54-10	CCACAACCA	Ja	keine	keine	keine
54-11	CCACACACA	Ja	keine	keine	keine
54-12	CCACACCCA	keine	0	0	0
54-13	CCACAAACC	Ja	keine	keine	keine
54-14	CCACAACCC	keine	0	0	0
54-15	CCACACACC	Ja	keine	keine	keine
54-16	CCACACCCC	keine	0	0	0
64-1	AACCAAAAA	Ja	keine	keine	keine

64-2	AACCAACAA	Ja	keine	keine	keine
64-3	AACCACAAA	Ja	keine	keine	keine
64-4	AACCACCAA	Ja	keine	keine	keine
64-5	AACCAAAAC	Ja	keine	keine	keine
64-6	AACCAACAC	Ja	keine	keine	keine
64-7	AACCACAAC	Ja	keine	keine	keine
64-8	AACCACCAC	Ja	keine	keine	keine
64-9	AACCAAACA	Ja	keine	keine	keine
64-10	AACCAACCA	Ja	keine	keine	keine
64-11	AACCACACA	Ja	keine	keine	keine
64-12	AACCACCCA	Ja	keine	keine	keine
64-13	AACCAAACC	Ja	keine	keine	keine
64-14	AACCAACCC	Ja	keine	keine	keine
64-15	AACCACACC	Ja	keine	keine	keine
64-16	AACCACCCC	Ja	keine	keine	keine
83-1	CAAACAAAA	Ja	Ja	Ja	keine
83-2	CAAACACAA	keine	0	0	0
83-3	CAAACCAAA	Ja	Ja	Ja	keine
83-4	CAAACCCAA	keine	0	0	0
83-5	CAAACAAAC	Ja	Ja	Ja	keine
83-6	CAAACACAC	Ja	keine	keine	keine
83-7	CAAACCAAC	Ja	Ja	Ja	keine
83-8	CAAACCCAC	keine	0	0	0
83-9	CAAACAACA	Ja	Ja	keine	keine
83-10	CAAACACCA	keine	0	0	0
83-11	CAAACCACA	Ja	Ja	Ja	keine
83-12	CAAACCCCA	keine	0	0	0
83-13	CAAACAACC	Ja	Ja	keine	keine
83-14	CAAACACCC	keine	0	0	0
83-15	CAAACCACC	Ja	Ja	Ja	keine
83-16	CAAACCCCC	keine	0	0	0
24-1	CCCCAAAAA	Ja	keine	keine	keine
24-2	CCCCAACAA	Ja	keine	keine	keine

24-3	CCCCACAAA	Ja	keine	keine	keine
24-4	CCCCACCAA	Ja	keine	keine	keine
24-5	CCCCAAAAC	Ja	keine	keine	keine
24-6	CCCCAACAC	Ja	keine	keine	keine
24-7	CCCCACAAC	Ja	keine	keine	keine
24-8	CCCCACCAC	Ja	keine	keine	keine
24-9	CCCCAAACA	Ja	keine	keine	keine
24-10	CCCCAACCA	Ja	keine	keine	keine
24-11	CCCCACACA	Ja	keine	keine	keine
24-12	CCCCACCCA	Ja	keine	keine	keine
24-13	CCCCAAACC	Ja	keine	keine	keine
24-14	CCCCAACCC	Ja	keine	keine	keine
24-15	CCCCACACC	Ja	keine	keine	keine
24-16	CCCCACCCC	Ja	keine	keine	keine
32-1	ACACCAAAA	Ja	keine	keine	keine
32-2	ACACCACAA	keine	0	0	0
32-3	ACACCCAAA	Ja	keine	keine	keine
32-4	ACACCCCAA	keine	0	0	0
32-5	ACACCAAAC	Ja	keine	keine	keine
32-6	ACACCACAC	Ja	keine	keine	keine
32-7	ACACCCAAC	Ja	keine	keine	keine
32-8	ACACCCCAC	Ja	keine	keine	keine
32-9	ACACCAACA	Ja	keine	keine	Ja
32-10	ACACCACCA	keine	0	0	0
32-11	ACACCCACA	Ja	keine	keine	Ja
32-12	ACACCCCCA	keine	0	0	0
32-13	ACACCAACC	Ja	keine	keine	keine
32-14	ACACCACCC	Ja	keine	keine	Ja
32-15	ACACCCACC	Ja	keine	keine	Ja
32-16	ACACCCCCC	Ja	keine	keine	Ja
51-1	CCAAAAAAA	Ja	keine	keine	keine
51-2	CCAAAACAA	Ja	keine	keine	keine
51-3	CCAAACAAA	Ja	keine	keine	keine

51-4	CCAAACCAA	Ja	keine	keine	keine
51-5	CCAAAAAAC	Ja	keine	keine	keine
51-6	CCAAAACAC	Ja	keine	keine	keine
51-7	CCAAACAAC	Ja	keine	keine	keine
51-8	CCAAACCAC	Ja	keine	keine	keine
51-9	CCAAAAACA	Ja	keine	keine	keine
51-10	CCAAAACCA	keine	0	0	0
51-11	CCAAACACA	Ja	keine	keine	keine
51-12	CCAAACCCA	keine	0	0	0
51-13	CCAAAAACC	Ja	keine	keine	keine
51-14	CCAAAACCC	Ja	keine	keine	keine
51-15	CCAAACACC	Ja	keine	keine	keine
51-16	CCAAACCCC	keine	0	0	0
52-1	CCACC AAAA	Ja	keine	keine	keine
52-2	CCACCACAA	keine	0	0	0
52-3	CCACCCAAA	Ja	keine	keine	keine
52-4	CCACCCCAA	keine	0	0	0
52-5	CCACC AAAC	Ja	keine	keine	keine
52-6	CCACCACAC	Ja	keine	keine	keine
52-7	CCACCCAAC	Ja	keine	keine	keine
52-8	CCACCCAC	Ja	keine	keine	keine
52-9	CCACCAACA	Ja	keine	keine	Ja
52-10	CCACCACCA	keine	0	0	0
52-11	CCACCCACA	Ja	keine	keine	Ja
52-12	CCACCCCCA	keine	0	0	0
52-13	CCACCAACC	keine	0	0	0
52-14	CCACCACCC	Ja	keine	keine	Ja
52-15	CCACCCACC	Ja	keine	keine	Ja
52-16	CCACCCCCC	Ja	keine	Ja	Ja
53-1	CCAACAAAA	Ja	keine	Ja	keine
53-2	CCAACACAA	keine	0	0	0
53-3	CCAACCAAA	Ja	Ja	Ja	Ja
53-4	CCAACCCAA	keine	0	0	0

53-5	CCAACAAAC	Ja	keine	keine	keine
53-6	CCAACACAC	Ja	keine	keine	keine
53-7	CCAACCAAC	Ja	keine	Ja	keine
53-8	CCAACCCAC	Ja	keine	keine	keine
53-9	CCAACAACA	Ja	keine	keine	keine
53-10	CCAACACCA	keine	0	0	0
53-11	CCAACCACA	Ja	keine	keine	keine
53-12	CCAACCCCA	keine	0	0	0
53-13	CCAACAACC	Ja	keine	keine	keine
53-14	CCAACACCC	Ja	keine	keine	keine
53-15	CCAACCACC	Ja	keine	keine	keine
53-16	CCAACCCCC	Ja	keine	keine	keine
61-1	AACAAAAAA	Ja	Ja	keine	keine
61-2	AACAAACAA	Ja	keine	keine	keine
61-3	AACAACAAA	Ja	Ja	keine	keine
61-4	AACAACCAA	Ja	keine	keine	keine
61-5	AACAAAAAC	Ja	keine	keine	keine
61-6	AACAAACAC	Ja	keine	keine	keine
61-7	AACAACAAC	Ja	keine	keine	keine
61-8	AACAACCAC	Ja	keine	keine	keine
61-9	AACAAAACA	Ja	keine	keine	keine
61-10	AACAAACCA	Ja	keine	keine	keine
61-11	AACAACACA	Ja	keine	keine	keine
61-12	AACAACCCA	Ja	keine	keine	keine
61-13	AACAAAACC	Ja	keine	keine	keine
61-14	AACAAACCC	Ja	keine	keine	keine
61-15	AACAACACC	Ja	keine	keine	keine
61-16	AACAACCCC	Ja	keine	keine	keine
62-1	AACCCAAAA	Ja	Ja	keine	keine
62-2	AACCCACAA	Ja	0	0	0
62-3	AACCCCAAA	Ja	keine	keine	keine
62-4	AACCCCCAA	Ja	keine	keine	keine
62-5	AACCCAAAC	Ja	keine	keine	keine

62-6	AACCCACAC	Ja	keine	keine	keine
62-7	AACCCCAAC	Ja	keine	keine	keine
62-8	AACCCCCAC	Ja	keine	Ja	keine
62-9	AACCCAACA	Ja	keine	keine	keine
62-10	AACCCACCA	Ja	keine	Ja	keine
62-11	AACCCCACA	Ja	keine	Ja	Ja
62-12	AACCCCCCA	Ja	keine	keine	keine
62-13	AACCCAACC	Ja	keine	Ja	keine
62-14	AACCCACCC	Ja	keine	keine	keine
62-15	AACCCCACC	Ja	keine	keine	keine
62-16	AACCCCCCC	Ja	keine	keine	keine
63-1	AACACAAAA	Ja	Ja	Ja	keine
63-2	AACACACAA	keine	0	0	0
63-3	AACACCAAA	Ja	keine	Ja	keine
63-4	AACACCCAA	keine	0	0	0
63-5	AACACAAAC	Ja	keine	keine	keine
63-6	AACACACAC	Ja	keine	Ja	keine
63-7	AACACCAAC	Ja	keine	Ja	Ja
63-8	AACACCCAC	Ja	keine	keine	keine
63-9	AACACAACA	Ja	keine	keine	keine
63-10	AACACACCA	Ja	keine	keine	keine
63-11	AACACCACA	Ja	keine	keine	keine
63-12	AACACCCCA	Ja	0	0	0
63-13	AACACAACC	Ja	keine	keine	keine
63-14	AACACACCC	Ja	keine	keine	keine
63-15	AACACCACC	Ja	keine	keine	keine
63-16	AACACCCCC	Ja	keine	keine	keine
71-1	ACCAAAAAA	Ja	keine	keine	keine
71-2	ACCAAACAA	Ja	keine	keine	keine
71-3	ACCAACAAA	Ja	keine	keine	keine
71-4	ACCAACCAA	Ja	keine	keine	keine
71-5	ACCAAAAAC	Ja	keine	. keine	keine
71~6	ACCAAACAC	Ja	keine	keine	keine

71-7	ACCAACAAC	Ja	keine	keine	keine
71-8	ACCAACCAC	Ja	keine	keine	keine
71-9	ACCAAAACA	Ja	keine	keine	keine
71-10	ACCAAACCA	Ja	keine	keine	keine
71-11	ACCAACACA	Ja	keine	keine	keine
71-12	ACCAACCCA	Ja	keine	keine	keine
71-13	ACCAAAACC	Ja	keine	keine	keine
71-14	ACCAAACCC	Ja	keine	keine	keine
71-15	ACCAACACC	Ja	keine	keine	keine
71-16	ACCAACCCC	Ja	keine	keine	keine
73-1	ACCACAAAA	Ja	keine	keine	keine
73-2	ACCACACAA	Ja	keine	keine	keine
73-3	ACCACCAAA	Ja	keine	keine	keine
73-4	ACCACCCAA	Ja	0	0	0
73-5	ACCACAAAC	Ja	keine	keine	keine
73-6	ACCACACAC	Ja	keine	keine	keine
73-7	ACCACCAAC	Ja	keine	Ja	keine
73-8	ACCACCCAC	Ja	keine	keine	keine
73-9	ACCACAACA	Ja	keine	keine	keine
73-10	ACCACACCA	Ja	keine	keine	keine
73-11	ACCACCACA	Ja	keine	keine	keine
73-12	ACCACCCCA	Ja	keine	keine	keine
73-13	ACCACAACC	Ja	keine	keine	keine
73-14	ACCACACCC	Ja	keine	keine	keine
73-15	ACCACCACC	Ja	keine	Ja	keine
73-16	ACCACCCCC	Ja	keine	keine	keine
74-1	ACCCAAAAA	Ja	keine	keine	keine
74-2	ACCCAACAA	Ja	keine	keine	keine
74-3	ACCCACAAA	Ja	keine	keine	keine
74-4	ACCCACCAA	Ja	keine	keine	keine
74-5	ACCCAAAAC	Ja	keine	keine	keine
74-6	ACCCAACAC	Ja	keine	keine	keine
74-7	ACCCACAAC	Ja	keine	keine	keine

74-8	ACCCACCAC	Ja	keine	Ja	keine
74-9	ACCCAAACA	Ja	keine	keine	keine
74-10	ACCCAACCA	Ja	keine	Ja	keine
74-11	ACCCACACA	Ja	keine	keine	keine
74-12	ACCCACCCA	Ja	keine	Ja	keine
74-13	ACCCAAACC	Ja	keine	keine	keine
74-14	ACCCAACCC	Ja	keine	keine	keine
74-15	ACCCACACC	Ja	keine	keine	keine
74-16	ACCCACCCC	Ja	keine	keine	keine
82-1	CAACCAAAA	Ja	keine	keine	keine
82-2	CAACCACAA	keine	keine	keine	keine
82-3	CAACCCAAA	Ja	keine	keine	keine
82-4	CAACCCCAA	keine	keine	keine	keine
82-5	CAACCAAAC	Ja	Ja	keine	keine
82-6	CAACCACAC	keine	0	0	0
82-7	CAACCCAAC	Ja	Ja	Ja	Ja
82-8	CAACCCAC	keine	0	0	0
82-9	CAACCAACA	Ja	Ja	Ja	Ja
82-10	CAACCACCA	keine	0	0	0
82-11	CAACCCACA	Ja	Ja	Ja	Ja
82-12	CAACCCCCA	keine	0	0	0
82-13	CAACCAACC	Ja	Ja	keine	Ja
82-14	CAACCACCC	Ja	keine	keine	Ja
82-15	CAACCCACC	Ja	keine	Ja	Ja
82-16	CAACCCCCC	Ja	keine	keine	Ja
84-1	CAACAAAAA	Ja	Ja	keine	keine
84-2	CAACAACAA	keine	0	0	0
84-3	CAACACAAA	Ja	Ja	Ja	keine
84-4	CAACACCAA	keine	0	0	0
84-5	CAACAAAAC	Ja	Ja	keine	keine
84-6	CAACAACAC	keine	0	0	0
84-7	CAACACAAC	Ja	keine	keine	keine
84-8	CAACACCAC	keine	0	0	0

84-9	CAACAAACA	Ja	Ja	Ja	Ja
84-10	CAACAACCA	keine	0	0	0
84-11	CAACACACA	Ja	Ja	Ja	Ja
84-12	CAACACCCA	keine	0	0	0
84-13	CAACAAACC	keine	0	0	0
84-14	CAACAACCC	keine	0	0	0
84-15	CAACACACC	keine	0	0	0
84-16	CAACACCCC	keine	0	0	0

[0243] Rezeptorbindende Eigenschaften wurden nur für Konstrukte analysiert, die exprimiert wurden. Wenn ein Klon schwach exprimiert wurde, wurden seine rezeptorbindenden Eigenschaften nur analysiert, wenn deren Maß eine Unterscheidung von der endogenen VEGF-A-Expression ermöglichte, oder wenn seine Aminosäurezusammensetzung die Entfernung von endogenem VEGF-A unter Verwendung monoklonaler Anti-VEGF-A-Antikörper (R&D-Systems) vor der Untersuchung der Rezeptorbindung ermöglichte. Obwohl das Epitop, das durch diesen Anti-VEGF-A-Antikörper erkannt wird, nicht charakterisiert worden ist, deuten unsere vorläufigen Ergebnisse darauf hin, dass das Epitop innerhalb von ein oder mehreren der Fragmente 2, 3, 4, 7 oder 9 von VEGF-A lokalisiert ist. Auf diese Weise wurde die Antikörper-Präzipitation von endogenem VEGF-A für alle Konstrukte durchgeführt, bei denen die Fragmente 2, 3, 4, 7 oder 9 von VEGF-C abgeleitet wurden. Die weitere Kartierung des Epitops dieses Antikörpers kann eine ähnliche Untersuchung weiterer Konstrukte ermöglichen. Wenn eine nachfolgende Analyse darauf hindeutet, dass das Epitop sich nicht in Fragment 2 befindet, können zum Beispiel Konstrukte, bei denen Fragment 2 von VEGF-A abgeleitet wurde, ebenfalls durch dieses Verfahren analysiert werden. Dieses Verfahren wurde für die Bindung an VEGFR-1 oder VEGFR-2 durchgeführt, um festzustellen, wie viele mit niedriger Affinität bindende Hybridmoleküle aufgrund der Wechselwirkung mit endogenem VEGF nicht detektiert wurden. Die fehlende Detektion eines Signals oder die Detektion eines schwachen Signals in dem Rezeptorbindungstest zeigt nicht zwingend eine fehlende oder geringe Rezeptorbindungsaffinität an. Der spezifische Aufbau des Experiments ermöglicht keine Detektion von niedrig affinen Bindemitteln von VEGFR-1 und VEGFR-2, die schwach exprimiert werden. Daher kann es sein, dass der Bindungstest niedrig affine Bindemittel von VEGFR-1 und VEGFR-2 für einige der Hybridproteine, die schwach exprimiert wurden, nicht detektiert hat.

[0244] Bei diesem Test könnte eine ersichtlich niedrige Rezeptorbindungsaffinität eines auf geringem Niveau exprimierten Hybridmoleküls auf Heterodimerisierung mit endogenem VEGF zurückzuführen sein. Wenn zum Beispiel ein Hybridprotein selbst keine Rezeptoraffinität aufweist, aber in der Lage ist, mit endogenem VEGF-A zu dimerisieren, kann ein solches Heterodimer in der Lage sein, ein oder mehrere Rezeptoren mit niedriger Affinität zu binden. Die Aufreinigung von chimären Polypeptiden gemäß der Erfindung (z.B. unter Verwendung von Immunaффinitätschromatographie mit einem Antikörper, der entweder die myc- oder HA-Marker-Sequenzen erkennt) und unter Verwendung des gereinigten Polypeptids in Rezeptorbindungstests wird jede Unklarheit, die durch endogenes VEGF-A in konditioniertem Medium hervorgerufen wird, beseitigen. Alternativ werden die Hybridproteine in den Insektenzellen, zum Beispiel S9-Zellen, exprimiert, um eine Kontamination mit endogenem VEGF-A zu verhindern.

[0245] Das Fehlen einer Expression oder Expression auf niedrigem Niveau eines bestimmten Konstrukts kann auf die Eigenschaften des Hybridproteins selbst, Variationen in der DNA-Qualität zurückzuführen sein, oder kann Mutationen in der DNA widerspiegeln, die während der Konstruktion des Hybridklons erworben wurden. Im vorliegenden Fall wurden alle Konstrukte nach dem ersten Ligierungsschritt sequenziert und die ausgewählten Klone wurden nach dem zweiten Ligierungsschritt sequenziert. Die Analyse dieser Sequenzen deutete darauf hin, dass während des ersten Schrittes keine Mutationen auftraten, und keine der nach dem zweiten Konstruktionsschritt untersuchten Sequenzen Mutationen enthielt. Daher traten alle Mutationen, die in dem endgültigen Klon vorhanden waren, sehr wahrscheinlich während des letzten Ligierungsschritts auf.

[0246] Sechshunddreißig der 512 Klone wurden sequenziert, um die Häufigkeit festzustellen, mit der Konstrukte während der Konstruktion der Klone Mutationen erwarben, die zu Änderungen auf dem Aminosäureniveau führten. Die Konstrukte, die sequenziert wurden, waren die Klone 11-1 (SEQ ID NO: 42-43), 11-16 (SEQ ID NO: 44-45), 21-1 (SEQ ID NO: 46-47), 22-16 (SEQ ID NO: 48-49), 12-1 bis 12-16 (SEQ ID NO: 50-81) und 31-1 bis 31-16 (SEQ ID NO: 82-113). Nur 2 von 36 Klonen, 12-13 und 12-16, zeigten eine Abweichung von der erwarteten Sequenz. Klon 12-16 war einem Verlust von zwei Basenpaaren an der Ligationsverbindungs-

stelle zwischen N45 und C67 unterworfen, was zu einer Leserahmenverschiebungsmutation nach dem RCG-Trielet von Fragment C5 und einem Stopkodon nur wenige Kodons danach führte. Klon 12-13 hatte eine Punktmutationen erworben, die zu einer Substitution von Asp durch Asn an der letzten C-terminalen Aminosäure dieses Hybridproteins führt.

[0247] Von den untersuchten 512 Hybridkonstrukten wurden vier für die weitere Analyse, einschließlich der Sequenzierung, um etwaige während der Konstruktion des Hybridproteins auftretenden Mutationen festzustellen, und der Wiederholung der Bindungstests zur Bestätigung der ursprünglichen Ergebnisse, ausgewählt. Die Ergebnisse aus den Bindungstests dieser vier bestimmten Hybridproteine: Konstrukte 12-13, 12-11, 12-9 und 12-7 deuten darauf hin, dass sie neue Bindungsmuster zeigen, die bekannte VEGF-Rezeptor-Liganden nicht aufweisen. 12-9 und 12-13 zeigen eine Bindung an VEGFR-1 und VEGFR-3, aber nicht an VEGFR-2, wohingegen 12-7 und 12-11 eine Bindung an alle drei VEGF-Rezeptoren zeigen.

[0248] Diese Ergebnisse zeigen, dass es möglich ist, durch kombinatorische Vorgehensweisen VEGF-verwandte Wachstumsfaktoren bereitzustellen, die modifizierte Eigenschaften aufweisen. Von den in einigen Fällen konstruierten neuen Molekülen wurde gezeigt, dass sie im Vergleich zu ihren Wildtyp-Vorläufern modifizierte biologische Wirkungen aufweisen und daher in Anwendungen verwendet werden können, bei denen Spezifität und Feinabstimmung biologischer Wirkungen erforderlich ist. Insbesondere zeigen diese Experimente, dass es möglich ist, einen "Super-VEGF", wie beispielsweise die Klone 12-7 und 12-11, zu konstruieren, die alle drei bekannten VEGFRs binden und daher bei der Induktion des Gefäßwachstum eine einzigartige Potenz aufweisen sollten.

Beispiel 4

Untersuchung von VEGF-A- und VEGF-C-Rezeptor bindenden Epitopen

[0249] Die VEGF-A/VEGF-C-Hybridproteine können verwendet werden, um Wechselwirkungen zwischen VEGF-A oder VEGF-C und deren Rezeptoren zu untersuchen. Die Analyse der Ergebnisse aus den Rezeptorbindungstests, wie sie beispielsweise in Tabelle 3 Beispiel 3 beschrieben sind, ermöglichen die sorgfältige Untersuchung der rezeptorbindenden Epitope dieser zwei VEGF-Wachstumsfaktoren. Die Fähigkeit bestimmter Hybridproteine, einen der VEGF-Rezeptoren zu binden, kann mit der Anwesenheit von einem oder mehreren bestimmten Fragmenten korreliert werden, die von einem der Stammoleküle abgeleitet wurden. Solche Daten können dabei helfen, Aminosäurereste zu bestimmen, die für die Bindung an einen spezifischen VEGF-Rezeptor wichtig sind. Die Kenntnis der genauen rezeptorbindenden Epitope eines bestimmten VEGF-Proteins kann die Konstruktion von hemmenden Molekülen erleichtern, die für therapeutische Zwecke nützlich sind.

[0250] Einundzwanzig VEGF-Reste, die für die Kopplung mit VEGFR-1 wichtig sind, sind in groß- und fettgedrucktem Text angegeben:

GQNHHEVV**KFMDVY**QRS**Y**CHPIETLVDIFQEYPDEIEY**IFK**PSCVPLIv1RCG

GCCN**DEGLE**CVPTTEESNITM**QIMRIKPHQGQHIG**EMSFLQHKN**CECRPK**

KD (SEQ ID NO: 1209)

[0251] Daten aus den Chimären-Experimenten deuten darauf hin, dass jene Reste aus Fragment 2, die der N-terminalen Helix entsprechen und Reste aus Fragment 7, die dem β 5-Strang entsprechen, für die Verleihung von VEGFR-1-Spezifität besonders wichtig sind. [Fig. 8](#) ist ein dreidimensionales Modell der Wechselwirkung eines VEGF-A-Dimers mit zwei VEGFR-1-Molekülen. Die beiden VEGF-A-Monomere sind grün beziehungsweise blau gefärbt. Die Domäne 2 der zwei VEGFR-1-Rezeptoren ist in Grau dargestellt. Rot repräsentiert den Ort von Resten innerhalb der VEGF-A-Monomere, die für die VEGFR-1-Kopplung wichtig sind. Diese Reste sind an den beiden Enden des VEGF-Dimers gebündelt und beinhalten die N-terminale Helix und einen Teil des β 5-Strangs.

[0252] Die entsprechenden einundzwanzig Reste in VEGF-C, die analog an der Kopplung von VEGFR-3 beteiligt wären, sind unten in groß- und fettgedrucktem Text angegeben:

AHYNTEIL**KS**IDNEW**RK**TQ**CM**PREVCIDVGKEFGVATNT**FFK**PPCVSVYRC

GGCCN**SEGL**QCMNTSTSYLSK**TLFEITVPL**SQ**GLPK**PVTISFANHTSC**RCM**

SKLD (Sequenz 1210)

[0253] Interessanterweise deutet die Analyse der Rezeptorbindungsmuster aus den Chimären-Experimenten darauf hin, dass ein VEGF-C-abgeleitetes Fragment 4 (das den β 2-Strang des Moleküls enthält) für die VEGFR-3-Bindungsspezifität absolut notwendig ist. Die Fragmente 5 (welches den β 3-Strang enthält) und 8 scheinen zwei andere wichtige VEGF-C-Fragmente für die VEGFR-3-Bindung darzustellen. Die Aminosäuresequenz der VEGF-C-Fragmente 4 und 5 ist EFGVATNTFFKPPCVSVYRCG (SEQ ID NO: 1205). Das Restequintett TNTFxxxP (SEQ ID NO: 1204) ist besonders erwähnenswert, weil diese Reste bei VEGF-C von Mensch, Wachtel und Rind und bei menschlichem VEGF-D konserviert sind, die alle VEGFR-3 binden. Die analogen Reste in menschlichem VEGF-A, die VEGFR-3 nicht binden, weichen ab: IEYIxxxS (SEQ ID NO: 1211). **Fig. 10** ist ein dreidimensionales Modell der Wechselwirkung zwischen Bereichen eines VEGF-C-Dimers und einem einzelnen VEGFR-3-Molekül, extrapoliert aus dem VEGF-A/VEGFR-1-Modelle. Blau und grün repräsentieren die beiden VEGF-C-Monomere und grau repräsentiert VEGFR-3. Fragment 5 des grünen VEGF-C-Monomers ist in orange gezeigt und Fragment 4 desselben Monomers ist in weiß dargestellt. Reste in Rot sind jene innerhalb der Fragmente 4 oder 5 lokalisierten, die möglicherweise in Kontakt mit dem Rezeptor stehen.

[0254] **Fig. 9** ist ein dreidimensionales Modell, das die Furche darstellt, die zwischen den Fragmenten gebildet wurde, die wichtig für die VEGFR-3-Spezifität zu sein scheinen. Von dieser Furche wird gemutmaßt, dass sie die Linker-Region zwischen Domäne 2 und 3 des VEGFR-3-Rezeptors beherbergt. Der Eingang und die Seiten dieser Furche werden durch die Fragmente gebildet, die für die Verleihung der VEGFR-3-Spezifität wichtig zu sein scheinen. Das Grün und Blau weist auf die zwei VEGF-C-Monomeren hin, und das Grau bezeichnet das VEGFR-3-Rezeptormolekül. Die VEGF-C-Reste, von denen angenommen wird, dass sie an der Bindung von VEGFR-3 beteiligt sind, sind in gelb gezeigt.

[0255] Obwohl die Fragmente 6 und 9 an der Wechselwirkung zwischen den VEGF-Rezeptoren beteiligt sind, scheinen diese Fragmente an der Bestimmung der Rezeptorspezifität nicht beteiligt zu sein.

Beispiel 5

Analyse der Rezeptor-Aktivierung oder -Hemmung durch die Hybrid-VEGF-Proteine

[0256] Die VEGF-A/VEGF-C-Hybridproteine können für therapeutische Anwendungen verwendet werden, bei denen entweder die Aktivierung oder Hemmung von einem oder mehreren VEGF-Rezeptoren erwünscht ist. Zum Beispiel kann ein Kandidaten-Hybridprotein zu stabilen Zelllinien zugegeben werden, die einen bestimmten VEGF-Rezeptor exprimieren, dessen Aktivierung für das Zellüberleben notwendig ist. Das Überleben der Zelllinie zeigt, dass das Kandidaten-Hybridprotein in der Lage ist, diesen bestimmten VEGF-Rezeptor zu binden und zu aktivieren. Auf der anderen Seite zeigt der Tod der Zelllinie, dass das Kandidaten-Hybridprotein den Rezeptor nicht aktiviert. Beispielhafte Beispiele solcher Zellüberlebenstests sind in der Publikation der internationalen Patentmeldung Nr. WO 98/07832 und in Achen et al., Proc Natl Acad Sci USA 95: 548–553 (1998) beschrieben.

[0257] Dieser Test setzt Ba/F3-NYK-EpoR-Zellen ein, die Ba/F3-Prä-B-Zellen sind, die mit einem Plasmid transfiziert worden sind, der einen chimären Rezeptor kodiert, der aus der extrazellulären Domäne von VEGFR-2 und der zytoplasmatischen Domäne des Erythropoietin-Rezeptors (EpoR) besteht. Diese Zellen werden routinemäßig in Interleukin-3 (IL-3) passagiert und sterben in Abwesenheit von IL-3. Wenn die Signalübertragung jedoch von der zytoplasmatischen Domäne des chimären Rezeptors induziert wird, überleben diese Zellen und proliferieren in Abwesenheit von IL-3. Solch eine Signalgebung wird durch Liganden induziert, die an die VEGFR-2-Extrazellulardomäne des chimären Rezeptors binden. Zum Beispiel veranlasst die Bindung von VEGF-A oder VEGF-D an die VEGFR-2-Extrazellulardomäne die Zellen dazu, in Abwesenheit von IL-3 zu überleben und zu proliferieren. Elterliche Ba/F3-Zellen, denen der chimäre Rezeptor fehlt, werden weder durch VEGF-A noch durch VEGF-D dahingehend induziert, in Abwesenheit von IL-3 zu proliferieren, was darauf hindeutet, dass die Reaktionen des Ba/F3-NYK-EpoR-Zellen auf diese Liganden vollständig von dem chimären Rezeptor abhängig sind.

[0258] Kandidaten-Hybridproteine können auf Bindung an die VEGFR-2-Extrazellulardomäne und anschlie-

ßende Aktivierung des chimären Rezeptors getestet werden, indem das Zellüberleben in Abwesenheit von IL-3 untersucht wird. Auf der andern Seite werden Hybridproteine, die die Bindung von VEGFR-2-Liganden, wie beispielsweise VEGF-A oder VEGF-D an die extrazelluläre Domäne oder die Aktivierung der zytoplasmatischen Domäne stören, den Zelltod in Abwesenheit von IL-3 verursachen.

[0259] Zellen werden, solange erforderlich, in Anwesenheit von IL-3 kultiviert, dann dreimal in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen, in IL-3-freiem Zellkulturmedium (Dulbeccos modifiziertes Eagle-Medium (DMEM), versetzt mit fötalem Kälberserum (10%), L-Glutamin (1%), Geneticin (1 mg/ml), Streptomycin (100 µg/ml) und Penicillin (60 µg/ml)) resuspendiert und zurück auf 72-Napf-Kulturplatten (Nunc, Dänemark) zu einer Dichte von ungefähr 1000 Zellen/Napf plattiert. Zur Untersuchung auf Rezeptoraktivität werden Kandidaten-Hybridproteine zu Kulturennäpfen bei einer Endkonzentration von 10^{-10} bis 10^{-5} M zugegeben und für 1 Stunde bei 37°C in 10% CO₂ kultiviert. Zur Untersuchung der Fähigkeit des Kandidaten-Hybridprotein, die Aktivierung des VEGFR-2/EpoR zu hemmen, wird rekombinantes VEGF-A oder VEGF-D zu Hybridproteinhaltigen Näpfen in einer Konzentration zugegeben, um ein nahezu maximales Überleben der Ba/F3-NYK-EpoR-Zellen zu erzeugen (typischerweise 500 ng/ml). Positivkontrollkulturen enthalten entweder VEGF-A- oder VEGF-D-Überstand allein und Negativkontrollkulturen enthalten weder Hybridprotein noch Wachstumsfaktor. Die Zellen werden dann für 48 Stunden in Kultur angezogen, wonach eine Lösung von 3-(3,4-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid (MTT; 500 µg/ml) zu den Kulturen zugegeben und für weitere 30 Minuten inkubiert wird. MTT wird durch Mitochondrien zu einem blauen Formazan-Produkt umgewandelt, wodurch lebende Zellen blau angefärbt werden. Überlebende blaue Zellen in Experimenten, in denen entweder die Aktivierung (Hybridprotein allein) oder Hemmung (Hybridprotein + VEGF-A oder VEGF-D) untersucht wurde, wurden unter einem Mikroskop mit invertierter Optik (100x Vergrößerung) gezählt und mit dem Zellüberleben in den Näpfen der Positivkontrolle (VEGF-A oder VEGF-D allein) verglichen. Das Zellüberleben wird normalisiert, so dass das Überleben in den Negativkontrollen auf 0 gesetzt wird (typischerweise wurden in den Negativkontrollen keine lebensfähigen Zellen beobachtet), während das Überleben in Positivkontrollen auf 100% gesetzt wird (typischerweise 300–400 Zellen/Napf).

[0260] Die Daten werden durch Einweg-Varianzanalyse (ANOVA) analysiert, mit einem post-hoc durchgeführten multiplen Vergleichstest nach Bonferroni, um auf Unterschiede zwischen einzelnen Kulturen von Hybridprotein allein (zur Untersuchung der Bindung und Aktivierung des Rezeptors) oder Hybridprotein + VEGF-A oder VEGF-D (zur Untersuchung der Hemmung der Rezeptoraktivierung), mit VEGF-A oder VEGF-D allein (Positivkontrolle) zu testen.

[0261] Die Wiederholung desselben Tests unter Verwendung von mit verschiedenen chimären Rezeptoren (zum Beispiel VEGFR-3/EpoR) transfizierten Zellen ermöglicht das Screening auf Aktivierung verschiedener VEGFRs.

VEGFR-2(KDR)- und VEGFR-3(Flt4)-Autophosphorylierungstests

[0262] Als alternativer Aktivitätsindikator kann auch die Fähigkeit eines Hybridproteins untersucht werden, die Autophosphorylierung eines bestimmten VEGF-Rezeptors zu stimulieren. Ein Kandidaten-Hybridprotein wird zu Zellen zugegeben, die einen bestimmten VEGF-Rezeptor exprimieren. Die Zellen werden dann lysiert und mit Anti-VEGF-Rezeptor-Antiserum immunpräzipitiert und durch Western-Blotting unter Verwendung von Anti-Phosphotyrosin-Antikörpern analysiert, um eine Hybridproteininduzierte Phosphorylierung des VEGF-Rezeptors festzustellen.

[0263] Ein Expressionsvektor, der ein erfindungsgemäßes Hybrid-VEGF-Molekül kodierendes Polynukleotid umfasst, wird in eine geeignete Wirtszelle (z.B. 293-EBNA-Zellen unter Verwendung einer Kalziumphosphat-Transfektionsmethode transfiziert. Etwa 48 Stunden nach der Transfektion wird das Wachstumsmedium der transfizierten Zellen gewechselt (z.B. zu DMEM-Medium ohne fötales Kälberserum) und die Zellen werden inkubiert (z.B. für 36 weitere Stunden), um ein konditioniertes Medium zu liefern. Das konditionierte Medium wird gesammelt und bei $5000 \times g$ für 20 Minuten zentrifugiert, und der Überstand wird konzentriert.

[0264] Das konzentrierte konditionierte Medium wird verwendet, um Zellen zu stimulieren, die einen VEGF-Rezeptor exprimieren. Zum Beispiel werden PAE-KDR-Zellen (Pajusola et al., *Oncogene*, 9: 3545–55 (1994); Waltenberger et al., *J Biol. Chem.*, 269: 26988–26995 (1994)) in Hams F12-Medium-10% fötales Kälberserum (FCS) angezogen, oder konfluente NIH-3T3-Zellen, die VEGFR-3 exprimieren, werden in DMEM-Medium angezogen. Die Zellen werden über Nacht in DMEM Medium oder Hams F12, versetzt mit 0,2% Rinderserumalbumin (BSA), ausgehungert und dann für 5 Minuten mit den unkonzentrierten, 2-fach, 5-fach und/oder 10-fach konzentrierten konditionierten Medien inkubiert. Rekombinanter menschlicher

VEGF-A oder VEGF-C und konditioniertes Medium von "mock"-transfizierten Zellen sind beispielhafte Kontrollen. Zusätzlich zu konditioniertem Medium können gereinigte Hybridpolypeptide bei diesem oder bei anderen hier beschriebenen Tests eingesetzt werden.

[0265] Nach Stimulation mit konditioniertem Medium werden die Zellen zweimal mit eiskalter Tris-gepufferter Salzlösung (TBS), enthaltend 100 mM Natriumorthovanadat, gewaschen und in RIPA-Puffer, enthaltend 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), 0,1 U/ml Aprotinin und 100 mM Natriumorthovanadat, lysiert. Die Lysate werden einer Ultraschallbehandlung unterzogen, durch Zentrifugationen bei $16.000 \times g$ für 20 Minuten geklärt und für 3–6 Stunden auf Eis mit 3–5 μ l für VEGFR-3 oder VEGFR-2 spezifischen Antiseren inkubiert. Immunpräzipitate werden an Protein-A-Sepharose gebunden, dreimal mit RIPA-Puffer, enthaltend 1 mM PMSF, 1 mM Natriumorthovanadat, gewaschen, zweimal mit 10 mM Tris-HCl (pH 7,4) gewaschen und einer SDS-PAGE unter Verwendung eines 7%-Gels unterzogen. Polypeptide werden durch Western-Blotting auf Nitrozellulose übertragen und unter Verwendung von Phosphotyrosin-spezifischen monoklonalen Antikörpern PY20 (Transduction Laboratories) oder Rezeptorspezifischem Antiserum und dem ECL-Detektionsverfahren (Amersham Corp.) analysiert.

[0266] Die Fähigkeit eines Hybridpolypeptids, die Autophosphorylierung (detektiert unter Verwendung der Anti-Phosphotyrosin-Antikörper) zu stimulieren, wird als Stimulation des Rezeptors bewertet. Das Niveau der beobachteten Stimulation für verschiedene Konzentrationen von Hybridpolypeptid im Verhältnis zu bekannten Konzentrationen von VEGF-A oder VEGF-C ergibt einen Hinweis auf die Rezeptorstimulationspotenz. Polypeptide, von denen sich gezeigt hat, dass sie den Rezeptor binden, jedoch unfähig sind, die Rezeptorphosphorylierung zu stimulieren, werden als Inhibitoren gewertet. Inhibitorische Aktivität kann ferner durch Mischen eines bekannten Rezeptoragonisten wie beispielsweise rekombinantes VEGF-A oder VEGF-C mit entweder Medium allein oder mit konzentriertem konditioniertem Medium getestet werden, um festzustellen, ob das konzentrierte konditionierte Medium die VEGF-A-vermittelte oder VEGF-C-vermittelte Rezeptorphosphorylierung hemmt.

[0267] In anfänglichen Experimenten zur Untersuchung der durch ausgewählte VEGFR-2 oder VEGFR-3 bindende Hybridmoleküle vermittelten Tyrosinphosphorylierung von VEGFR-2 und VEGFR-3 wurde beobachtet, dass alle getesteten Hybridproteine in der Lage waren, die Phosphorylierung des Rezeptors zu induzieren, jedoch in einem geringeren Maß als die, die durch VEGF-A oder VEGF-C vermittelt wurde. Weitere Untersuchungen der Expressionsniveaus der Hybridproteine in dem Baculovirus-System, das verwendet wurde, um die Proteine herzustellen, deuten darauf hin, dass die Proteine nicht alle in vergleichbaren Mengen exprimiert werden. Die unterschiedlichen Expressionsniveaus der Hybridproteine können einen Teil der niedrigeren Aktivitäten erklären, die diese Proteine bei Untersuchung auf ihre Fähigkeit zur Stimulation der Tyrosinphosphorylierung von VEGFR-2 und VEGFR-3 aufweisen. Darüber hinaus korreliert das Maß der unter Verwendung dieses bestimmten Tests ermittelten durch diese Hybridmoleküle induzierten Phosphorylierung möglicherweise nicht mit der biologischen Aktivität in vivo.

Beispiel 6

Analyse der Rezeptorbindungsaffinitäten von Hybridproteinen

[0268] Die vorläufige Analyse der 512 Hybridproteine weist darauf hin, dass eine Anzahl von ihnen in der Lage sind, einen oder mehrere der VEGFRs binden. Darüber hinaus deuten die Ergebnisse dieses Experiments darauf hin, dass einige unterschiedliche Bindungsaffinitäten zu einem oder mehreren VEGFRs zeigen. Für diese Experimente wird das Hybridprotein in einem Insektenzellensystem, z.B. S9-Zellen, exprimiert, um eine Kontamination mit in Säugetierzellen gefundenem VEGF-A auszuschließen. Um die relativen Bindungsaffinitäten ausgewählter Hybridproteine zu messen, wird ein ELISA-artiger Ansatz verwendet. Zum Beispiel werden Verdünnungsreihen konkurrierender VEGFR-1-IgG-Fusionsproteine und eine Untersättigungskonzentration des mit dem myc-Epitop markierten Kandidaten-Hybridproteins in mit VEGFR-1 beschichtete Mikrotiterplatten gegeben und inkubiert, bis sich ein Gleichgewicht einstellt. Die Platten werden dann gewaschen, um ungebundenes Protein zu entfernen. Hybridmoleküle, die an die VEGFR-1-beschichteten Platten gebunden bleiben, werden unter Verwendung eines an einen leicht detektierbaren Marker, zum Beispiel Meerrettichperoxidase, konjugierten Anti-myc-Antikörpers detektiert. Die Bindungsaffinitäten (EC_{50}) können als die Konzentration des konkurrierenden VEGF-IgG-Fusionsproteins ermittelt werden, die zu einer halbmaximalen Bindung führt. Diese Werte können mit jenen verglichen werden, die aus der Analyse von VEGF-A oder VEGF-C zur Feststellung von Änderungen der Bindungsaffinität von einem oder mehreren der VEGFRs erhalten wurden. Gleichmaßen wird die Bindung an VEGFR-2 erreicht durch Verwendung von VEGFR-2-IgG-Fusionsprotein, und die Bindung an VEGFR-3 wird bestimmt unter Verwendung eines VEGFR-3-IgG-Fusionsproteins.

Beispiel 7

Durch VEGF-A/VEGF-C-Hybridproteine vermittelte Endothelzellmigration in Kollagengel

[0269] Sowohl VEGF-A als auch VEGF-C stimulieren die Endothelzellmigration in Kollagengel. Die Hybridproteine werden untersucht, um festzustellen, ob sie in der Lage sind, die Endothelzellmigration in Kollagengel zu stimulieren, wodurch ein weiteres Indiz auf biologische Aktivität bereitgestellt wird. Beispielhafte Beispiele eines solchen Zellmigrationstests sind in der Publikation der internationalen Patentanmeldung Nr. WO 98/33917 beschrieben. Kurz gesagt, werden bovine kapilläre Endothelzellen (BCE) auf eine Kollagenschicht in Gewebekulturplatten geimpft. Konditionierte Medien von mit einem Expressionsvektor transfizierten Zellen, die das Kandidaten-Hybridprotein herstellen, werden in Näpfen platziert, die ungefähr 4 mm von dem Ort der angehefteten BCE-Zellen entfernt in Kollagengel hergestellt wurden. Die Zahl der BCE-Zellen, die aus dem ursprünglichen Gebiet in dem Kollagengel in Richtung der das Hybridprotein enthaltenden Näpfe gewandert sind, wird dann gezählt, um die Fähigkeit des Hybridproteins zu ermitteln, die Zellmigration zu induzieren.

[0270] BCE-Zellen (Folkman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 76: 5217–5221 (1979)) werden wie in Pertovaara et al., J. Biol. Chem., 269: 6271–74 (1994) beschrieben kultiviert. Kollagengele werden durch Mischen von Typ-I-Kollagen-Stammlösung (5 mg/ml in 1 mM HCl) mit einem gleichen Volumen von 2 × MEM und 2 Volumina MEM, enthaltend 10% Neugeborenen-Kälberserum, um eine endgültige Kollagenkonzentration von 1,25 mg/ml zu ergeben, hergestellt. Gewebekulturplatten (5 cm Durchmesser) werden mit einer etwa 1 mm dicken Schicht der Lösung beschichtet, die bei 37° polymerisiert wird. BCE-Zellen werden auf diese Schicht aufgeimpft.

[0271] Für die Migrationstests wird es den Zellen ermöglicht, sich im Inneren eines Kunststoffringes (1 cm Durchmesser) anzuheften, der auf der ersten Kollagenschicht platziert wird. Nach 30 Minuten wird der Ring entfernt und nicht angeheftete Zellen werden fortgewaschen. Eine zweite Schicht Kollagen und eine Schicht Wachstumsmedium (5% Neugeborenen-Kälberserum (NCS)), verfestigt durch 0,75% Agar mit niedrigem Schmelzpunkt (FMC BioProducts, Rockland), werden zugegeben. Auf beiden Seiten des Zelflecks wird in einem Abstand von 4 mm ein Napf (3 mm Durchmesser) durch alle Schichten gestanzt und Medien, die ein Hybrid-VEGF-Polypeptid enthalten (oder Medien allein oder Medien, die VEGF-A oder VEGF-C enthalten, um als Kontrolle zu dienen) werden täglich in die Näpfe pipettiert. Mikrofotografien der von dem Fleckenrand fortwandernden Zellen werden z.B. nach sechs Tagen durch ein Olympus-CK2-Inversmikroskop, das mit einer Phasenkontrastoptik ausgestattet ist, angefertigt. Die migrierenden Zellen werden nach Kernfärbung mit dem fluoreszierenden Farbstoff Bisbenzimid (1 mg/ml, Hoechst 33258, Sigma) gezählt.

[0272] Die Zahl von Zellen, die in verschiedenen Abständen von der ursprünglichen Anheftungsstelle zu Näpfen wandern, die durch die nicht-transfizierten (Kontrolle) oder transfizierten ("mock"; Hybrid; VEGF-C; oder VEGF-A) Zellen konditionierte Medien enthalten, werden 6 Tage nach Zugabe der Medien bestimmt. Die Zahl von Zellen, die aus dem ursprünglichen Anheftungsring herauswanderten, werden in fünf angrenzenden Quadranten von 0,5 mm × 0,5 mm unter Verwendung eines Mikroskopokularlinsenrasters und 10x Vergrößerung mit einem Fluoreszenzmikroskop ausgezählt. Zellen, die weiter als 0,5 mm wanderten, werden in gleicher Weise gezählt, indem das Raster in 0,5-mm-Schritten versetzt wird.

[0273] Die Fähigkeit eines Hybridpolypeptids, die Migration von BCE-Zellen zu induzieren, zeigt eine Rezeptoragonistenaktivität an. Die Zahl von in Anwesenheit eines Hybridproteins migrierenden Zellen im Vergleich zu einer gleichen Konzentration von VEGF-A oder VEGF-C gibt einen Hinweis auf die Stärke der Agonistenaktivität. Polypeptide, von denen gezeigt wurde, dass sie die auf BCE-Zellen exprimierten Rezeptoren binden, jedoch unfähig sind, die Migration zu stimulieren, werden als potentielle Inhibitoren gewertet. Eine hemmende Aktivität kann ferner getestet werden durch Mischen eines bekannten Rezeptoragonisten wie beispielsweise rekombinantem VEGF-A oder VEGF-C mit entweder Medium allein oder mit konzentrierten konditionierten Medien, um festzustellen, ob die konzentrierten konditionierten Medien die VEGF-A-vermittelte oder VEGF-C-vermittelte BCE-Migration hemmen.

Beispiel 8

Analyse der Fähigkeit von Hybridproteinen, die Gefäßpermeabilität zu induzieren

[0274] Sowohl VEGF-A als auch VEGF-C sind in der Lage, die Permeabilität von Blutgefäßen zu erhöhen. Die Hybridproteine werden getestet, um festzustellen, welche dieser Proteine diese biologische Aktivität besitzen und welche sie hemmen. Zum Beispiel werden Gefäßpermeabilitätstests gemäß Miles und Miles, J. Phy-

siol 118: 228–257 (1952), verwendet, um die Hybridproteine zu analysieren. Kurz gesagt, wird Tieren, beispielsweise Meerschweinchen, im Anschluss an die intravenöse Injektion eines Vitalfarbstoffes, wie beispielsweise Pontamin-Himmelblau, intradermal eine das zu untersuchende Kandidaten-Hybridprotein enthaltende Zusammensetzung injiziert. Für Kontrollen werden in gleicher Weise Medien allein oder VEGF-A oder VEGF-C enthaltende Medien indiziert. Nach einer Zeitdauer wird die Ansammlung von Farbstoff an der Injektionsstelle auf der Haut gemessen. Jene Hybridproteine, die die Permeabilität erhöhen, werden im Vergleich zu jenen Hybridproteinen, die die Gefäßpermeabilität nicht induzieren, zu einer größeren Ansammlung von Farbstoff an der Injektionsstelle führen.

[0275] In einer Variante dieses Tests werden Hybridpolypeptide, von denen angenommen wird, Inhibitoren von VEGF-A oder VEGF-C zu sein, zunächst mit VEGF-A oder VEGF-C in verschiedenen Verhältnissen (z.B. 50:1, 10:1, 5:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:5, 1:10) gemischt und die Mischungen werden intradermal in die Tiere injiziert. Auf diese Weise wird die Fähigkeit der Hybridpolypeptide, die VEGF-A-vermittelte oder VEGF-C-vermittelte Gefäßpermeabilität zu hemmen, getestet.

Beispiel 9

Endothelzellproliferationstest

[0276] Die mitogene Aktivität von Hybridproteinen kann untersucht werden unter Verwendung von Endothelzellproliferationstests, wie sie beispielsweise in Breier et al., Dev 114: 521–532 (1992), hier durch Inbezugnahme vollständig aufgenommen, beschrieben sind. Die Hybridproteine werden in einer Säugetierzelllinie, z.B. COS-Zellen, exprimiert. Kulturüberstände werden dann gesammelt und auf mitogene Wirkung auf Rinderaortaendothel(BAE)-Zellen untersucht, indem die Überstände zu den BAE-Zellen zugegeben werden. Nach drei Tagen werden die Zellen mit Trypsin dissoziiert und unter Verwendung eines Zytometers gezählt, um jede Wirkung des Hybridproteins auf die proliferative Aktivität der BAE-Zellen festzustellen. Als Negativkontrollen können mit 10% FCS versetztes DMEM und die konditionierten Medien von untransfizierten COS-Zellen oder von mit Vektor allein transfizierten COS-Zellen verwendet werden. Überstände von mit Konstrukten transfizierten Zellen, die Proteine exprimieren, von denen gezeigt wurde, dass sie die Proliferation von BAE-Zellen induzieren (z.B. VEGF-A) können als Positivkontrolle verwendet werden.

Beispiel 10

Untersuchung der Fähigkeit von durch den menschlichen K14-Keratinpromotor exprimierten Hybridproteinen, das Wachstum von Lymphgefäßen in Haut von transgenen Mäusen zu induzieren

[0277] Es wurden Versuche in transgenen Mäusen durchgeführt, um die spezifischen Wirkungen der Überexpression von Hybridproteinen in Geweben zu analysieren. Die physiologischen Wirkungen in vivo geben einen Hinweis auf das Rezeptoraktivierungs-/hemmungsprofil und einen Hinweis auf die potentielle therapeutische Wirkung eines Hybridproteins. In einer Variante wird der menschliche K14-Keratinpromotor, der in den Basalzellen von stratifizierten Plattenepithelien aktiv ist [Vassar et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 86: 1563–1567 (1989)], als Expressionskontrollelement in dem rekombinanten Hybridprotein-Transgen verwendet. Der den K14-Promotor enthaltende Vektor ist in Vassar et al., Genes Dev, 5: 714–727 (1991) und Nelson et al., J. Cell Biol. 97: 244–251 (1983) beschrieben.

[0278] Ein den K14-Promotor, die Hybridprotein-cDNA und das K14-Polyadenylierungssignal enthaltendes DNA-Fragment wird synthetisiert, isoliert und in fertilisierte Oozyten des FVB-NIH-Mausstammes injiziert. Die injizierten Zygoten werden in Ovidukte scheinsschwangerer C57BL/6 × DBA/2J-Hybridmäuse transplantiert. Die resultierenden Gründermäuse werden anschließend durch Polymerasekettenreaktion von "Tail"-DNA unter Verwendung geeigneter Primer oder durch Southern-Analyse auf Anwesenheit des Transgens untersucht.

[0279] Diese transgenen Mäusen werden dann hinsichtlich Hinweisen auf Angiogenese oder Lymphangiogenese in der Haut, wie beispielsweise die Lymphangiogenese, die bei transgenen Mäusen beobachtet wird, die VEGF-C überexprimieren [siehe internationale Publikation WO 98/33917], untersucht. Die histologische Untersuchung transgener K14-VEGF-C-Mäuse zeigte, dass die dorsale Dermis im Vergleich zu der Haut von Wildtyp-Wurfgefährten atrophisch war und Bindegewebe durch große Lakunen ersetzt wurde, denen rote Blutzellen fehlten, die jedoch mit einer dünnen Endothelschicht ausgekleidet waren. Diese vergrößerten gefäßartigen Strukturen ähnelten jenen, die bei menschlichen Lymphangiomen beobachtet werden. Die Zahl von Hautanhangsorganen und Haarfollikeln war reduziert. In der Schnauzenregion wurde ebenfalls eine erhöhte Anzahl von Gefäßen beobachtet.

[0280] Die Untersuchung der Gefäße in der Haut von transgenen Mäusen unter Verwendung von Antikörpern, die Proteine erkennen, die entweder für Blut- oder Lymphgefäße spezifisch sind, kann darüber hinaus die Identität dieser Gefäße verifizieren. Die Kollagentypen IV, XVIII [Muragaki et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92: 8763–8776 (1995)] und Laminin werden in Gefäßendothelzellen exprimiert, während die Desmoplakine I und II (erogen) in lymphatischen Endothelzellen exprimiert werden. Siehe Schmelz et al., Differentiation 57: 97–117 (1994).

Beispiel 11

Analyse von Hybridproteinen bei der Förderung oder Hemmung der Myelopoese

[0281] Die Überexpression von VEGF-C in der Haut von transgenen K14-VEGF-C Mäusen korreliert mit einer bestimmten Veränderung in den Leukozytenpopulationen [siehe die internationale Veröffentlichung WO 98/33917]. Namentlich waren die gemessenen Populationen von Neutrophilen bei transgenen Mäusen merklich erhöht. Diese Effekte der Hybridproteine auf die Hämatopoese können unter Verwendung von fluoreszenz-aktivierter Zellsortierungsanalyse unter Verwendung von Antikörpern, die Proteine erkennen, die auf bestimmten Leukozytenzellpopulationen exprimiert werden, analysiert werden. Leukozytenpopulationen werden in Blutproben analysiert, die von in Beispiel 13 beschriebenen transgenen F1-Mäusen und von ihren nicht-transgenen Wurfgenossen genommen wurden.

Beispiel 12

Wirkungen von Hybridproteinen auf Wachstum und Differenzierung menschlicher CD34⁺-Vorläuferzellen in vitro

[0282] Die Zugabe von VEGF-C zu Kulturen von Nabelschnurblut-CD34⁺-Zellen induziert die Zellproliferation. Kokulturen von GM-CSF, IL-3, GM-CSF + IL-3 oder GM-CSF + SCF mit VEGF-C führt zu einem Anstieg der Anteile von myeloiden Zellen [siehe die internationale Veröffentlichung WO 98/33917]. Erfindungsgemäße Hybridproteine können auch auf ihre Fähigkeit untersucht werden, das Wachstum von CD34⁺-Vorläuferzellen in vitro zu induzieren. Menschliche CD34⁺-Vorläuferzellen (HPC, 10×10^3) werden aus Knochenmark oder Nabelschnurblut-Mononukleazellen unter Verwendung des MACS-CD34-Vorläuferzell-Isolierungskits (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland) nach Anweisung des Herstellers isoliert und in RPMI-1640-Medium, versetzt mit L-Glutamin (2,5 mM), Penicillin (125 IE/ml), Streptomycin (125 µg/ml) und gepooltem 10% umbilikalischen Nabelschnurblut(CB)-Plasma bei 37°C in einer befeuchteten Atmosphäre in Anwesenheit von 5% CO₂ für sieben Tage mit oder ohne Hybridprotein bei Konzentrationen im Bereich von 10 ng/ml bis 1 µg/ml inkubiert. Nach sieben Tagen wurde die Gesamtzellzahl in jeder Kultur ermittelt.

[0283] Die kostimulatorische Wirkung von Hybridproteinen in Kulturen, die entweder mit rekombinantem menschlichen Stammzellfaktor (rhSCF, 20 ng/ml PreproTech, Rocky Hill, NY) allein oder einer Kombination aus Granulozyten-Makrophagenkoloniestimulierendem Faktor (rhGM-CSF, 100 ng/ml, Sandoz, Basel, Schweiz) plus SCF 11 versetzt wurden, kann ebenfalls untersucht werden. Es können auch Experimente durchgeführt werden, um die kostimulatorischen Wirkungen von Hybridprotein auf den Gesamtzellertrag von serumfreien Kulturen von CB-CD34⁺-HPC-Zellen zu analysieren, die entweder mit GM-CSF allein, IL-3 (rhIL-3, 100 U/ml, Behring AG, Marburg, Deutschland) allein; oder einer Kombination aus GM-CSF plus IL-3 versetzt wurden.

[0284] Zellen von den oben beschriebenen (7-Tages-)plasmaergänzten Kulturen werden auch auf die Expression des frühen Granulomonocytenmarkermoleküls Lysozym (LZ) und Myeloperoxidase (MPO) sowie den Lipopolysaccharid(LPS)-Rezeptor CD14 unter Verwendung von Immunfluoreszenz untersucht.

[0285] In einer anderen Reihe von Experimenten wurden CD34⁺-Zellen in Medium, versetzt mit 50 ng/ml M-CSF, mit oder ohne 100 ng/ml Hybridprotein für sieben Tage kultiviert. Nach sieben Tagen wurden die Kulturen analysiert, um den prozentualen Anteil von CD14⁺-Zellen und die mittlere Fluoreszenzintensität zu bestimmen.

Beispiel 13

Analyse von Hybridproteinen unter Verwendung von CAM-Tests

[0286] Der in Oh et al., Dev Biol 188: 96–109 (1997) beschriebene Chorioallantoismembran(CAM)-Test ist ein

häufig verwendetes Verfahren zur Untersuchung der In-vivo-Wirkungen angiogener Faktoren. Unter Verwendung dieses Tests hat sich gezeigt, dass VEGF-Wachstumsfaktoren, einschließlich sowohl VEGF-A als auch VEGF-C, die Entwicklung von Blutgefäßen induzieren [Oh et al., Dev Biol 188: 96–109 (1997)]. Dieses Verfahren kann daher verwendet werden, um die angiogenen Eigenschaften der Hybridproteine zu studieren.

[0287] Kurz gesagt wird an Tag 4 der Entwicklung ein Fenster in die Eischale von Hühnern oder in Wachteleier geschnitten. Die Embryonen werden auf normale Entwicklung geprüft, das Fenster in der Eischale wird mit Klebeband verschlossen und die Eier werden bis Tag 13 der Entwicklung inkubiert. Ungefähr 3,3 µg Hybridprotein, gelöst in 5 µl destilliertem Wasser, werden zu Thermanox-Deckgläsern (Nunc, Naperville, IL) gegeben, die in Scheiben mit einem Durchmesser von ungefähr 5 mm geschnitten wurden, und luftgetrocknet. Scheiben ohne zugegebenes Protein werden als Kontrolle verwendet. Die getrockneten Scheiben werden dann auf die Chorioallantoismembran (CAM) der Eier aufgebracht. Nach 3 Tagen werden die Scheiben entfernt und in 3% Glutaraldehyd und 2% Formaldehyd fixiert und in 0,12 M Natriumkacodylat-Puffer gespült. Die fixierten Proben werden fotografiert und für Semi(0,75-µm)- und Ultradünn(70-nm)-Schnitte in Eponharz (Serva, Deutschland) eingebettet. Sowohl Semi- als auch Ultradünnschnitte werden unter Verwendung eines Ultracut S (Leica, Deutschland) geschnitten. Ultradünnschnitte werden durch ein EM in 10 (Zeiss, Deutschland) analysiert. Die Proben werden dann auf Hinweise von Wachstum neuer Kapillaren untersucht, was darauf hindeuten würde, dass das untersuchte Hybridprotein in der Lage ist, die Angiogenese zu stimulieren.

Beispiel 14

Analyse der Homo- oder Heterodimerisierung der VEGF-A/VEGF-C-Hybridproteine

[0288] Die Aktivierung von Tyrosin-Rezeptoren wird häufig durch Liganden-induzierte Rezeptordimerisierung vermittelt. Die Untersuchung von Wechselwirkungen zwischen VEGF und VEGFR-2 deutet darauf hin, dass die Rezeptordimerisierung mittels Ligandendimerisierung erzielt wird, indem beide Rezeptoren einen Teil von jedem der zwei Ligandenproteine binden, die das Homo- oder Heterodimer ausmachen. Mutanten-VEGF-Proteine, die an VEGFR-2 binden können, aber nicht dimerisieren können, können den Rezeptor nicht aktivieren [Fuh et al., J Biol Clin 273: 11197–11204 (1998)]. Alle VEGF-Familienmitglieder sind zur Homo- und/oder Heterodimerisierung befähigt. VEGF-A und VEGF-C bilden keine Heterodimere miteinander. Einige der VEGF-A/VEGF-C-Hybridproteine können jedoch miteinander oder mit einem oder beiden Stammolekülen dimerisieren. Die Hybridproteine können auch zur Homodimerisierung befähigt sein. Die folgenden Protokolle sind dazu ausgelegt, die Dimerisierungsfähigkeiten der Hybridproteine zu identifizieren. Ein Kandidaten-Hybridprotein wird mit einem anderen Hybridprotein oder einem der Stammoleküle in einer Zelllinie, z.B. 293T- oder S9-Zellen, koexprimiert. Extrakte von diesen Zellen werden hergestellt und unter Verwendung eines Antikörpers, der nur eines der beiden untersuchten Proteine erkennt, für die Immunpräzipitation verwendet. Die immunpräzipitierten Proteine werden dann einer SDS-PAGE unterzogen und analysiert. Wenn beide Proteine in dem Gel detektiert werden, trat eine Heterodimerisierung zwischen den beiden untersuchten Proteinen auf. Wenn auf der anderen Seite lediglich das Protein detektiert wird, das durch den Antikörper erkannt wird, der bei der Immunpräzipitation verwendet wurde, trat keine Dimerisierung zwischen den beiden Proteinen auf. Da die Dimerisierung für die Rezeptoraktivierung kritisch zu sein scheint, wird von Hybridproteinen, die den Rezeptor binden, jedoch nicht mit Selbst- oder mit natürlichen VEGF-Wachstumsfaktoren, die endogen von den Zellen exprimiert werden, dimerisieren, erwartet, dass sie Inhibitoren der endogenen Gefäßendothelwachstumsfaktoraktivität sind.

[0289] Heterodimere, die ein erfindungsgemäßes Polypeptid mit anderen erfindungsgemäßen Polypeptiden oder mit natürlich vorkommenden Mitgliedern der VEGF-Familie von Wachstumsfaktoren umfassen, können im wesentlichen wie in Cao et al., J. Biol. Chem., 271: 3154–62 (1996) beschrieben erzeugt werden. Kurz gesagt, wird ein rekombinant hergestelltes Hybridpolypeptid in einem äquimolaren Verhältnis mit einem anderen rekombinant hergestellten interessierenden Polypeptid, wie beispielsweise einem VEGF-A-, VEGF-B-, VEGF-C-, VEGF-D-, PIGF-, PDGFα-, PDGFβ- oder c-fos-induzierten Wachstumsfaktor-Polypeptid gemischt. (Siehe z.B. Collins et al., Nature, 316: 748–750 (1985) (PDGF-β, GenBank Zugr.-Nr. X02811); Claesson-Welsh et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86 (13): 4917–4921 (1989) (PDGF-α, GenBank Zugr.-Nr. M22734); Claesson-Welsh et al., Mol. Cell. Biol. 8: 3476–3486 (1988) (PDGF-β, GenBank Zugr.-Nr. M21616); Olofsson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 93: 2576–2581 (1996) (VEGF-β, GenBank Zugr.-Nr. U48801); Maglione et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 88(20):9267–9271 (1996) (PIGF, GenBank Zugr.-Nr. X54936); Heldin et al., Growth Factors, 8: 245–252 (1993); Folkman, Nature Med., 1: 27–31 (1995); Friesel et al., FASEB J, 9: 919–25 (1995); Mustonen et al., J. Cell. Biol., 129: 895–98 (1995); Orlandini, S., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93(21): 11675–11680 (1996); und andere andernorts hier zitierte. Die gemischten Polypeptide werden in Gegenwart von Guanidin-HCl und DTT inkubiert. Die Thiolgruppen werden dann mittels S-Sulfonierung geschützt, und das

Protein wird über Nacht dialysiert, anfangs gegen Harnstoff/Glutathion-SH, Glutathion-S-S-Glutathion und anschließend gegen 20 mM Tris-HCl.

[0290] Die Heterodimere werden gescreent, um deren Bindungsaffinität hinsichtlich Rezeptoren der VEGF/PDGF-Familie (insbesondere VEGFR-1, VEGFR-2 und VEGFR-3) und deren Fähigkeit, die Rezeptoren zu stimulieren, zu bestimmen (z.B. die Untersuchung auf Dimer-stimulierte Rezeptorphosphorylierung in Zellen, die den interessierenden Rezeptor auf ihrer Oberfläche exprimieren). Die Bindungstests können kompetitive Bindungstests sein, wie beispielsweise jene, die hier und im Stand der Technik beschrieben sind. In den anfänglichen Bindungstests sind rekombinant hergestellte Proteine einsetzbar, die die extrazellulären Domänen von Rezeptoren umfassen, wie in vorstehenden Beispielen für VEGFR-2 und VEGFR-3 beschrieben. Heterodimere, die Rezeptoren binden und stimulieren, sind als rekombinante Wachstumsfaktorpolypeptide nützlich. Heterodimere, die Rezeptoren binden, jedoch nicht stimulieren, sind als Wachstumsfaktorantagonisten nützlich. Heterodimere, die in den Screeningstests agonistische oder antagonistische Aktivitäten zeigen, werden unter Verwendung von z.B. Endothelzellmigrationstests, Gefäßpermeabilitätstests und In-vivo-Tests weiter gescreent. Es wird aus den vorstehenden Beispielen auch ersichtlich sein, dass Dimere, die zwei VEGF-C-Polypeptide (d.h. Dimere aus identischen VEGF-C-Polypeptiden sowie Dimere aus unterschiedlichen VEGF-C-Polypeptiden) umfassen, unter Einsatz derselben Tests vorteilhaft auf agonistische und antagonistische Aktivitäten gescreent werden können.

Beispiel 15

Bestimmung der biologischen Halbwertszeit der VEGF-A/VEGF-C-Hybridproteine

[0291] Die Kenntnis der biologischen Halbwertszeit einer Verbindung in vivo ist wertvoll für therapeutische Anwendungen. Obwohl die biologische Halbwertszeit der Hybridproteine nicht in vivo bestimmt wurde, deuten vorläufige Ergebnisse in vitro darauf hin, dass die oben beschriebenen VEGF-A/VEGF-C-Hybridproteine verschiedene Halbwertszeiten aufweisen. Die Inkubation von bestimmten Hybridproteinen enthaltenden Zellüberständen bei 4°C für ungefähr zwei Monate ergibt für die verschiedenen Hybridproteine unterschiedliche Proteininstabilitäten. Die Untersuchung der biologischen In-vivo-Halbwertszeit kann durch Injektion von Iod-markiertem Hybridprotein in Tiere festgestellt werden. Kurz gesagt werden 50 µg Hybridprotein unter Verwendung von IODO-GEN (Pierce) nach Anweisungen des Herstellers zu einer spezifischen Radioaktivität von ungefähr 2–10 µCi/µg Protein iodiert. Die iodierten Proteine werden unter Verwendung von PD-10 Sephadex (Pharmacia) nach Herstelleranweisungen gereinigt. 12–16 Wochen alte Mäuse (Gewicht 20–25 g) werden im Verlaufe des Experiments mit Natriumpentobarbital (1 mg/20 g Mäusekörpergewicht) anästhesiert. 5–10 pmol des radiomarkierten Proteins, verdünnt in 100 µl steriler Salzlösung, werden über 30 Sekunden in die Schwanzvenen injiziert. Zu bestimmten Zeitpunkten (1 min, 2 min, 4 min, 8 min, 15 min, 30 min, 60 min und 120 min) werden 41–50 µl Blut durch periorbitale Blutung oder aus der Schwanzarterie entnommen. 25 µl der Plasmafraktion jeder Blutprobe werden dann auf Whatman-Filterpapier getupft, mit 10% Trichloressigsäure (TCA) präzipitiert und mit Ethanol gespült. Die Menge in der Plasmafraktion vorhandenem radiomarkierten Proteins wird durch Quantifizierung der Radioaktivität unter Verwendung eines Gammazählers bestimmt. Polypeptide, die im Vergleich zu den natürlich vorkommenden VEGFs eine verbesserte Halbwertszeit zeigen, sind eine bevorzugte Gattung erfindungsgemäßer Polypeptide. Polypeptide, die 25%, 50%, 75% oder 100% Verbesserung der Halbwertszeit gegenüber den natürlich vorkommenden VEGF-C zeigen, sind besonders bevorzugt.

Beispiel 16

Konstruktion von Hybridmolekülen unter Verwendung anderer Proteine der VEGF-oder PDGF-Familie

[0292] Das in Beispiel 1 beschriebene Verfahren kann erweitert werden, um Hybridmoleküle unter Verwendung von jedem der PDGF/VEGF-Wachstumsfaktoren zu erzeugen. Mitglieder der PDGF/VEGF-Familie, die zumindest VEGF-A (SEQ ID NO: 1 und 2), PlGF (SEQ ID NO: 114 und 115), VEGF-B (SEQ ID NO: 116 und 117), VEGF-C (SEQ ID NO: 21 und 22), VEGF-D (SEQ ID NO: 118 und 119), VEGF-E (SEQ ID NO: 120 und 121) und NZ2-VEGF (SEQ ID NO: 122 und 123), D1701-VEGF (SEQ ID NO: 150 und 151); NZ10-VEGF [beschrieben in SEQ ID NO: 11 der internationalen Patentanmeldung PCT/US99/25869, PDGF-A (SEQ ID NO: 124 und 125), PDGF-B (SEQ ID NO: 126 und 127) und Fallotin (SEQ ID NO: 148 und 149) umfassen, teilen genügend Homologie innerhalb der rezeptorbindenden Domäne miteinander, um die Konstruktion von Oligonukleotiden mit einzigartigen kohäsiven Enden, wie in Beispiel 1 hinsichtlich VEGF-A und VEGF-C gelehrt, zu ermöglichen. Wie durch die erfolgreichen Ergebnisse in den Beispielen 1–3 gezeigt, reichen Oligonukleotide, die dahingehend konstruiert wurden, doppelsträngige Fragmente mit kohäsiven Enden bereitzustellen, die eine Länge von nur 3–6 Basen aufweisen, aus, um eine erfolgreiche Rekombination zu neuen Hybridmolekü-

len (mit sehr wenigen unbeabsichtigten Mutationen) zu erlauben.

[0293] Obwohl die Anwesenheit von kohäsiven Enden die Ligierung von Fragmenten in einer gewünschten Reihenfolge und Orientierung stark erleichtert, wird es ersichtlich sein, dass die Ligierung von Fragmenten auch ohne kohäsive Enden erreicht werden kann. Stumpfbändige Fragmente können ebenfalls synthetisiert und aneinander gelagert werden, um unter Verwendung des oben beschriebenen Verfahrens Hybridproteine zu erzeugen. Mit einer Stumpfbündestrategie müssen die Nukleotidsequenzen der Stammoleküle nicht auf Anwesenheit von Nukleotididentität untersucht werden, um die Erzeugung von kohäsiven Enden zu ermöglichen. Ein zusätzliches Screening nach der Ligierung kann jedoch erforderlich sein, um Hybride zu identifizieren, die Fragmente in der gewünschten Ordnung und Orientierung enthalten.

[0294] Unter Anwendung solcher Richtlinien werden Oligonukleotidpaare wie in Beispiel 1 beschrieben konstruiert und aneinandergelagert, um DNA-Fragmente des Rezeptors für die Bindungsdomäne von zwei oder mehr VEGF-Proteinen bereitzustellen. Die kombinatorische Ligation der verschiedenen DNA-Fragmente erzeugt neue Hybridpolypeptide, die auf Rezeptorbindung und auf biologische Eigenschaften wie beispielsweise die Fähigkeit, Endothelzellwachstum und -migration zu stimulieren oder zu hemmen und die Gefäßpermeabilität zu modulieren, gescreent werden.

Beispiel 17

Erzeugung von Hybridmolekülen unter Verwendung von PCR-gestütztem DNA-Shuffling

[0295] Das folgende Protokoll stellt eine alternative "DNA-Shuffling"-Methodik zur Erzeugung hybrider Gefäßendothelwachstumsfaktor-kodierender Polynukleotide und Polypeptide bereit. DNA-Shuffling-Verfahren sind in der Literatur für Enzyme wie beispielsweise Antibiotikaresistenz vermittelnde Proteine und einige wenige andere Proteinfamilien beschrieben worden [siehe Chang et al., *Nature Biotechnology*, 17: 793–797 (1999); Kikuchi et al., *Gene*, 236: 159–167 (1999); Harayama et al., *TIBTECH*, 16: 76–82 (1998); Crameri et al., *Nature*, 391: 288–291 (1998); Patten et al., *Curr. Opin. Biotechnology*, 8: 724–733 (1997); Zhang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 4504–09 (1997); Stemmer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 10747–1074 (1994); und Stemmer, *Nature*, 370: 389–391 (1994), alle vollständig durch Inbezugnahme hier aufgenommen].

[0296] Zwei oder mehrere cDNAs, die Gefäßendothelwachstumsfaktor-Polypeptide kodieren, werden zunächst kloniert und amplifiziert. In einer bevorzugten Ausführungsform werden nur jene Bereiche der cDNAs, die mindestens VEGF-Rezeptor-Bindungsdomänen kodieren, und optional zusätzliche kleine 5'- und 3'-Sequenzen der cDNA kodieren, amplifiziert.

[0297] Die gereinigten und isolierten cDNAs werden unter Verwendung von Restriktionsendonukleasen und/oder DNaseI zu Fragmenten von etwa 10–75 Basenpaaren verdaut, und die Fragmente dieses gewünschten Größenbereichs werden gereinigt und isoliert (zum Beispiel durch Agarosegelelektrophorese, Elektroelution und Ethanolpräzipitation).

[0298] Die gereinigten und isolierten Fragmente von den zwei oder mehr VEGFs werden gemischt und einer "Selfpriming"-Polymerasekettenreaktion unterzogen, um die Fragmente durcheinanderzumischen, um neue Hybridmoleküle zu bilden. Beispielhafte PCR-Protokolle sind in Kikuchi et al. (1999) und Stemmer (1994) dargestellt. Die Anlagerungstemperaturen in den PCR-Reaktionen wird auf Grundlage des Ausmaßes der Sequenzidentität zwischen den ursprünglichen cDNAs eingestellt, um sicherzustellen, dass die Anlagerung von heterologen Sequenzen, die unvollständige Passungen enthalten, möglich ist. Nach Durchführung von 22–50 PCR-Zyklen ohne Primer, wird eine Teilmenge der PCR-Reaktion ausgewählt und als Matrize für die zweite PCR-Runde mit Primern auf Basis von 5'- und 3'-Sequenzen der ursprünglichen cDNAs verwendet. Vorzugsweise enthalten die Primer auch Restriktionsendonuklease-Erkennungssequenzen, um die Klonierung der in der zweiten Runde erhaltenen PCR-Produkte in einen Expressionsvektor zu erleichtern.

[0299] Die erhaltenen Klone werden in einen Expressionsvektor ligiert und in Wirtszellen transformiert oder transfiziert, um die dadurch kodierten neuen Hybrid-VEGF-Polypeptide (falls vorhanden) zu exprimieren. Die Proteine werden unter Verwendung von Rezeptorbindungs- und/oder -aktivitätstests wie in den vorstehenden Beispielen beschrieben gescreent, um jene Klone auszuwählen, die Polypeptide kodieren, die gewünschte Rezeptoragonisten-/Antagonistenprofile aufweisen.

[0300] SEQ ID NO: 1 & 2 sind die Nukleotid- und Aminosäuresequenzen von VEGF-A
 SEQ ID NO: 3–11 sind VEGF-A-Vorwärtsprimer
 SEQ ID NO: 12–20 sind VEGF-A-Rückwärtsprimer
 SEQ ID NO: 21 & 22 sind die Nukleotid- und Aminosäuresequenzen von VEGF-C
 SEQ ID NO: 23–31 sind VEGF-C-Vorwärtsprimer
 SEQ ID NO: 32–40 sind VEGF-C Rückwärtsprimer
 SEQ ID NO: 41 ist die Nukleotidsequenz von pSecTagI
 SEQ ID NO: 42 & 43 sind die Nukleotid- und Aminosäuresequenzen von Klon 11-1. Die VEGF-Rezeptorbindungsdomäne (abgeleitet von VEGF-A und VEGF-C) entspricht den Aminosäuren 1–102 von SEQ ID NO: 43.
 SEQ ID NO: 44 & 45 sind die Nukleotid- und Aminosäuresequenzen von Klon 11-16 (VEGF-Rezeptorbindungsdomäne = Aminosäuren 1–104 von SEQ ID NO: 45).
 SEQ ID NO: 46 & 47 sind die Nukleotid- und Aminosäuresequenzen von Klon 22-1 (VEGF-Rezeptorbindungsdomäne = Aminosäuren 1–103 von SEQ ID NO: 47)
 SEQ ID NO: 48 & 49 sind die Nukleotid- und Aminosäuresequenzen von Klon 22-16 (VEGF-Rezeptorbindungsdomäne = Aminosäuren 1–105 von SEQ ID NO: 49)
 SEQ ID NO: 50–51 sind die Nukleotid- und Aminosäuresequenzen von Klon 12-1 (VEGF-Rezeptorbindungsdomäne = Aminosäuren 1–102 von SEQ ID NO: 51)
 SEQ ID NO: 52–53 sind die Nukleotid- und Aminosäuresequenzen von Klon 12-2 (VEGF-Rezeptorbindungsdomäne = Aminosäuren 1–102 von SEQ ID NO: 53)
 SEQ ID NO: 54–55 sind die Nukleotid- und Aminosäuresequenzen von Klon 12-3 (VEGF-Rezeptorbindungsdomäne = Aminosäuren 1–102 von SEQ ID NO: 55)
 SEQ ID NO: 56–57 sind die Nukleotid- und Aminosäuresequenzen von Klon 12-4 (VEGF-Rezeptorbindungsdomäne = Aminosäuren 1–102 von SEQ ID NO: 57)
 SEQ ID NO: 58–59 sind die Nukleotid- und Aminosäuresequenzen von Klon 12-5 (VEGF-Rezeptorbindungsdomäne = Aminosäuren 1–102 von SEQ ID NO: 59)
 SEQ ID NO: 60–61 sind die Nukleotid- und Aminosäuresequenzen von Klon 12-6 (VEGF-Rezeptorbindungsdomäne = Aminosäuren 1–102 von SEQ ID NO: 61)
 SEQ ID NO: 62–63 sind die Nukleotid- und Aminosäuresequenzen von Klon 12-7 (VEGF-Rezeptorbindungsdomäne = Aminosäuren 1–102 von SEQ ID NO: 63)
 SEQ ID NO: 64–65 sind die Nukleotid- und Aminosäuresequenzen von Klon 12-8 (VEGF-Rezeptorbindungsdomäne = Aminosäuren 1–102 von SEQ ID NO: 65)
 SEQ ID NO: 66–67 sind die Nukleotid- und Aminosäuresequenzen von Klon 12-9 (VEGF-Rezeptorbindungsdomäne = Aminosäuren 1–104 von SEQ ID NO: 67)
 SEQ ID NO: 68–69 sind die Nukleotid- und Aminosäuresequenzen von Klon 12-10 (VEGF-Rezeptorbindungsdomäne = Aminosäuren 104 von SEQ ID NO: 69)
 SEQ ID NO: 70–71 sind die Nukleotide und Aminosäuresequenzen von Klon 12-11 (VEGF-Rezeptorbindungsdomäne = Aminosäuren 1–104 von SEQ ID NO: 71)
 SEQ ID NO: 72–73 sind die Nukleotid und Aminosäuresequenzen von Klon 12-12 (VEGF-Rezeptorbindungsdomäne = Aminosäuren 1–104 von SEQ ID NO: 73)
 SEQ ID NO: 74–75 sind die Nukleotide und Aminosäuresequenzen von Klon 12-13 (VEGF-Rezeptorbindungsdomäne = Aminosäuren 1–104 von SEQ ID NO: 75)
 SEQ ID NO: 76–77 sind die Nukleotid- und Aminosäuresequenzen von Klon 12-14 (VEGF-Rezeptorbindungsdomäne = Aminosäuren 1–104 von SEQ ID NO: 77)
 SEQ ID NO: 78–79 sind die Nukleotid- und Aminosäuresequenzen von Klon 12-15 (VEGF-Rezeptorbindungsdomäne = Aminosäuren 1–104 von SEQ ID NO: 79)
 SEQ ID NO: 80–81 sind die Nukleotid- und Aminosäuresequenzen von Klon 12-16 (VEGF-Rezeptorbindungsdomäne = Aminosäuren 1–54 von SEQ ID NO: 81)
 SEQ ID NO: 82–83 sind die Nukleotid- und Aminosäuresequenzen von Klon 31-1 (VEGF-Rezeptorbindungsdomäne = Aminosäuren 1–103 von SEQ ID NO: 83)
 SEQ ID NO: 84–85 sind die Nukleotid- und Aminosäuresequenzen von Klon 31-2 (VEGF-Rezeptorbindungsdomäne = Aminosäuren 1–103 von SEQ ID NO: 85)
 SEQ ID NO: 86–87 sind die Nukleotid- und Aminosäuresequenzen von Klon 31-3 (VEGF Rezeptorbindungsdomäne = Aminosäuren 1–103 von SEQ ID NO: 87)
 SEQ ID NO: 88–89 sind die Nukleotid- und Aminosäuresequenzen von Klon 31-4 (VEGF-Rezeptorbindungsdomäne = Aminosäuren 1–103 von SEQ ID NO: 89)
 SEQ ID NO: 90–91 sind die Nukleotid- und Aminosäuresequenzen von Klon 31-5 (VEGF-Rezeptorbindungsdomäne = Aminosäuren 1–103 von SEQ ID NO: 91)
 SEQ ID NO: 92–93 sind die Nukleotid- und Aminosäuresequenzen von Klon 31-6 (VEGF-Rezeptorbindungsdomäne = Aminosäuren 1–103 von SEQ ID NO: 93)

domäne = Aminosäuren 1–103 von SEQ ID NO: 93)
 SEQ ID NO: 94–95 sind die Nukleotid- und Aminosäuresequenzen von Klon 31-7 (VEGF-Rezeptorbindungsdomäne = Aminosäuren 1–103 von SEQ ID NO: 95)
 SEQ ID NO: 96–97 sind die Nukleotid- und Aminosäuresequenzen von Klon 31-8 (VEGF-Rezeptorbindungsdomäne = Aminosäuren 1–103 von SEQ ID NO: 97)
 SEQ ID NO: 98–99 sind die Nukleotid- und Aminosäuresequenzen von Klon 31-9 (VEGF-Rezeptorbindungsdomäne = Aminosäuren 1–105 von SEQ ID NO: 99)
 SEQ ID NO: 100–101 sind die Nukleotid- und Aminosäuresequenzen von Klon 31-10 (VEGF-Rezeptorbindungsdomäne = Aminosäuren 1–105 von SEQ ID NO: 101)
 SEQ ID NO: 102–103 sind die Nukleotid- und Aminosäuresequenzen von Klon 31-11 (VEGF-Rezeptorbindungsdomäne = Aminosäuren 1–105 von SEQ ID NO: 103)
 SEQ ID NO: 104–105 sind die Nukleotid- und Aminosäuresequenzen von Klon 31-12 (VEGF-Rezeptorbindungsdomäne = Aminosäuren 1–105 von SEQ ID NO: 105)
 SEQ ID NO: 106–107 sind die Nukleotid- und Aminosäuresequenzen von Klon 31-13 (VEGF-Rezeptorbindungsdomäne = Aminosäuren 1–105 von SEQ ID NO: 107)
 SBQ ID NO: 108–109 sind die Nukleotid- und Aminosäuresequenzen von Klon 31-14 (VEGF-Rezeptorbindungsdomäne = Aminosäuren 1–105 von SEQ ID NO: 109)
 SEQ ID NO: 110–111 sind die Nukleotid- und Aminosäuresequenzen von Klon 31-15 (VEGF-Rezeptorbindungsdomäne = Aminosäuren 1–105 von SEQ ID NO: 111)
 SEQ ID NO: 112–113 sind die Nukleotid- und Aminosäuresequenzen von Klon 31-16 (VEGF-Rezeptorbindungsdomäne = Aminosäuren 1–105 von SEQ ID NO: 113)
 SEQ ID NO: 114 & 115 sind die Nukleotid- und Aminosäuresequenzen von PIGF
 SEQ ID NO: 116 & 117 sind die Nukleotid- und Aminosäuresequenzen von VEGF-B
 SEQ ID NO: 118 & 119 sind die Nukleotid- und Aminosäuresequenzen von VEGF-D
 SEQ ID NO: 120 & 121 sind die Nukleotid- und Aminosäuresequenzen von VEGF-E
 SEQ ID NO: 122 & 123 sind die Nukleotid- und Aminosäuresequenzen von NZ2-VEGF
 SEQ ID NO: 124 & 125 sind die Nukleotid- und Aminosäuresequenzen von PDGF-A
 SEQ ID NO: 126 & 127 sind die Nukleotid- und Aminosäuresequenzen von PDGF-B
 SEQ ID NO: 128–136 sind die Aminosäuresequenzen der Fragmente A1–A9
 SEQ ID NO: 137–145 sind die Aminosäuresequenzen der Fragmente C1–C9
 SEQ ID NO: 146 & 147 sind die Nukleotid- und Aminosäuresequenzen der 232-Aminosäure-Isoform von VEGF-A
 SEQ ID NO: 148 & 149 sind die Nukleotid- und Aminosäuresequenzen von Fallotein
 SEQ ID NO: 150 & 151 sind die Nukleotid- und Aminosäuresequenzen D1701-VEGF
 SEQ ID NO: 152 & 153 sind die Nukleotid- und Aminosäuresequenzen von Klon 14-9 (VEGF-Rezeptorbindungsdomäne = Aminosäuren 1–104 von SEQ ID NO: 153)
 SEQ ID NO: 154 & 155 sind die Nukleotid- und Aminosäuresequenzen von Klon 23-10 (VEGF-Rezeptorbindungsdomäne = Aminosäuren 1–105 von SEQ ID NO: 155)
 SEQ ID NO: 156 & 157 sind die Nukleotid- und Aminosäuresequenzen von Klon 32-14 (VEGF-Rezeptorbindungsdomäne = Aminosäuren 1–105 von SEQ ID NO: 157)
 SEQ ID NO: 158 & 159 sind die Nukleotid- und Aminosäuresequenzen von Klon 52-15 (VEGF-Rezeptorbindungsdomäne = Aminosäuren 1–105 von SEQ ID NO: 159)
 SEQ ID NO: 160 & 161 sind die Nukleotid- und Aminosäuresequenzen von Klon 53-3 (VEGF-Rezeptorbindungsdomäne = Aminosäuren 1–103 von SEQ ID NO: 161)
 SEQ ID NO: 162 & 163 sind die Nukleotid- und Aminosäuresequenzen von Klon 82-7 (VEGF-Rezeptorbindungsdomäne = Aminosäuren 1–102 von SEQ ID NO: 163)
 SEQ ID NO: 164 & 165 sind die Nukleotid- und Aminosäuresequenzen von Klon 82-9 (VEGF-Rezeptorbindungsdomäne = Aminosäuren 1–104 von SEQ ID NO: 165)
 SEQ ID NO: 166 & 167 sind die Nukleotid- und Aminosäuresequenzen von Klon 82-11 (VEGF-Rezeptorbindungsdomäne = Aminosäuren 1–104 von SEQ ID NO: 167)
 SEQ ID NO: 168 & 169 sind die Nukleotid- und Aminosäuresequenzen von Klon 82-13 (VEGF-Rezeptorbindungsdomäne = Aminosäuren 1–104 von SEQ ID NO: 169)
 SEQ ID NO: 170 & 171 sind die Nukleotid- und Aminosäuresequenzen von Klon 83-15 (VEGF-Rezeptorbindungsdomäne = Aminosäuren 1–104 von SEQ ID NO: 171)
 SEQ ID NO: 172 & 173 sind die Nukleotid- und Aminosäuresequenzen von Klon 84-9 (VEGF-Rezeptorbindungsdomäne = Aminosäuren 1–104 von SEQ ID NO: 173)
 SEQ JOD NO: 174 & 175 sind die Nukleotid- und Aminosäuresequenzen von Klon 84-11 (VEGF-Rezeptorbindungsdomäne = Aminosäuren 1–104 von SEQ ID NO: 175)
 SEQ ID NO: 176–1199 sind oben in Beispiel 1 in Tabelle 2.5 verzeichnet
 SEQ ID NO: 1200 ist die Sequenzformel P-[PS]-C-V-X(3)-R-C-[GSTA]-G-C-C

SEQ ID NO: 1201 ist die Sequenzformel C-X(22-24)-P-[PSR]-C-V-X(3)-R-C-[GS-TA]-G-C-C-X(6)-C-X(32-41)-C
SEQ ID NO: 1202 ist die Sequenzformel C-X(18-28)-P-X-C-X(4)-R-C-X-G-C(1-2)-X(6-12)-C-X(30-46)-C
SEQ ID NO: 1203 ist die Sequenzformel C-X(22-24)-P-[PSR]-C-V-X(3)-R-C-X-G-C-C-X(6)-C-X(32-41)-C
SEQ ID NO: 1204 ist die Sequenzformel TNTFxxxP
SEQ ID NO: 1205 ist die Sequenzformel EFGVATNTFFKPPCVSVYRCG
SEQ ID NO: 1206 ist die Sequenzformel TNTFFKPP
SEQ ID NO: 1207 ist die Sequenzformel TNTFFKPPCVxxxR
SEQ ID NO: 1208 ist die Sequenzformel TNTFFKPPCVxxxRCGGCC
SEQ ID NO: 1209 ist eine Sequenz einer VEGF-Region, die an der VEGFR-1-Binding beteiligt ist
SEQ ID NO: 1210 ist eine Sequenz einer VEGF-C-Region, die an der VEGFR-3-Binding beteiligt ist
SEQ ID NO: 1211 ist die Sequenzformel IEYlxxxS
SEQ ID NO: 1212 ist die Sequenzformel TNTFXnP

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Ludwig Institute for Cancer Research
Helsinki University Liscensing Ltd. Oy

<120> MATERIALIEN UND VERFAHREN, DIE HYBRIDVASKULARENDOTHELWACHSTUMFAKTOR-DNAS
UND -PROTEINE BEINHALTEN

<130> 28967/35977A

<140>

<141>

<150> US 60/205,331

<151> 2000-05-18

<150> US 60/185,205

<151> 2000-02-25

<160> 175

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 990

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (57) .. (629)

<400> 1

```

cagtgtgctg gcgggcccggc gcgagccggc ccggccccgg tcgggcctcc gaaacc atg 59
                                                    Met
                                                    1

aac ttt ctg ctg tct tgg gtg cat tgg agc ctc gcc ttg ctg ctc tac 107
Asn Phe Leu Leu Ser Trp Val His Trp Ser Leu Ala Leu Leu Leu Tyr
           5                      10                      15

ctc cac cat gcc aag tgg tcc cag gct gca ccc atg gca gaa gga gga 155
Leu His His Ala Lys Trp Ser Gln Ala Ala Pro Met Ala Glu Gly Gly
           20                      25                      30

ggg cag aat cat cac gaa gtg gtg aag ttc atg gat gtc tat cag cgc 203
Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg
           35                      40                      45

agc tac tgc cat cca atc gag acc ctg gtg gac atc ttc cag gag tac 251
Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu Tyr
           50                      55                      60                      65

cct gat gag atc gag tac atc ttc aag cca tcc tgt gtg ccc ctg atg 299
Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu Met
           70                      75                      80

cga tgc ggg ggc tgc tgc aat gac gag ggc ctg gag tgt gtg ccc act 347
Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val Pro Thr
           85                      90                      95

gag gag tcc aac atc acc atg cag att atg cgg atc aaa cct cac caa 395

```

Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His Gln
 100 105 110
 ggc cag cac ata gga gag atg agc ttc cta cag cac aac aaa tgt gaa 443
 Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn Lys Cys Glu
 115 120 125
 tgc aga cca aag aaa gat aga gca aga caa gaa aat ccc tgt ggg cct 491
 Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg Ala Arg Gln Glu Asn Pro Cys Gly Pro
 130 135 140 145
 tgc tca gag cgg aga aag cat ttg ttt gta caa gat ccg cag acg tgt 539
 Cys Ser Glu Arg Arg Lys His Leu Phe Val Gln Asp Pro Gln Thr Cys
 150 155 160
 aaa tgt tcc tgc aaa aac aca gac tgc cgt tgc aag gcg agg cag ctt 587
 Lys Cys Ser Cys Lys Asn Thr Asp Ser Arg Cys Lys Ala Arg Gln Leu
 165 170 175
 gag tta aac gaa cgt act tgc aga tgt gac aag ccg agg cgg 629
 Glu Leu Asn Glu Arg Thr Cys Arg Cys Asp Lys Pro Arg Arg
 180 185 190
 tgagccggggc aggaggaagg agcctccctc aggggtttcgg gaaccagatc tctcaccagg 689
 aaagactgat acagaacgat cgatacagaa accacgctgc cgccaccaca ccatcaccat 749
 cgacagaaca gtccttaatc cagaaacctg aaatgaagga agaggagact ctgcgcagag 809
 cactttgggt cgggagggcg agactccggc ggaagcattc ccgggagggt gaccagcac 869
 ggtccctctt ggaattggat tcgccatttt atttttcttg ctgctaaatc accgagcccg 929
 gaagattaga gagttttatt tctgggattc ctgtagacac accgcggccg ccagcacact 989
 g 990

<210> 2
 <211> 191
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2
 Met Asn Phe Leu Leu Ser Trp Val His Trp Ser Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 Tyr Leu His His Ala Lys Trp Ser Gln Ala Ala Pro Met Ala Glu Gly
 20 25 30
 Gly Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln
 35 40 45
 Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu
 50 55 60
 Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu
 65 70 75 80
 Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val Pro
 85 90 95
 Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His

100	105	110
Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn Lys Cys		
115	120	125
Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg Ala Arg Gln Glu Asn Pro Cys Gly		
130	135	140
Pro Cys Ser Glu Arg Arg Lys His Leu Phe Val Gln Asp Pro Gln Thr		
145	150	155
Cys Lys Cys Ser Cys Lys Asn Thr Asp Ser Arg Cys Lys Ala Arg Gln		
165	170	175
Leu Glu Leu Asn Glu Arg Thr Cys Arg Cys Asp Lys Pro Arg Arg		
180	185	190

<210> 3
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artifizielle Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der artifiziiellen Sequenz:
 Oligonukleotid

<400> 3
 gatcctgggc agaatcatca cgaagtgggtg aaat

34

<210> 4
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artifizielle Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der artifiziiellen Sequenz:
 Oligonukleotid

<400> 4
 tcatggatgt ctatcagcgc agctactgcc at

32

<210> 5
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> Artifizielle Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der artifiziiellen Sequenz:
 Oligonukleotid

<400> 5
 ccgatcgaga cactgggtgga catcttccag gaatagaaga gc

42

<210> 6
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artifizielle Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der artifiziellen Sequenz:
 Oligonukleotid

<400> 6
 cgctcttcga ataccctgat gagatcgagt aca 33

<210> 7
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Artifizielle Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der artifiziellen Sequenz:
 Oligonukleotid

<400> 7
 tcttcaagcc atcctgcgtg cccctgatga gatgtggc 38

<210> 8
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artifizielle Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der artifiziellen Sequenz:
 Oligonukleotid

<400> 8
 ccgggttgct gcaatgacga agggctgg 28

<210> 9
 <211> 46
 <212> DNA
 <213> Artifizielle Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der artifiziellen Sequenz:
 Oligonukleotid

<400> 9
 agtgcgttcc caccgaggag tccaacatca ccatgcagat tatgag 46

<210> 10
 <211> 43
 <212> DNA
 <213> Artifizielle Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der artifiziellen Sequenz:
 Oligonukleotid

<400> 10
 aattaaacct caccaagggc agcacatcgg agagatgagc ttt 43

<210> 11
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> Artifizielle Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der artifiziellen Sequenz:
Oligonukleotid

<400> 11

ctccagcata acaaatgtga atgtagacca aagaaagatt gagtcttcgc 50

<210> 12

<211> 24

<212> DNA

<213> Artifizielle Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der artifiziellen Sequenz:
Oligonukleotid

<400> 12

ccacttcgtg atgattctgc ccag 24

<210> 13

<211> 42

<212> DNA

<213> Artifizielle Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der artifiziellen Sequenz:
Oligonukleotid

<400> 13

tcggatggca gtagctgcgc tgatagacat ccatgaattt ca 42

<210> 14

<211> 42

<212> DNA

<213> Artifizielle Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der artifiziellen Sequenz:
Oligonukleotid

<400> 14

tcgagctctt ctattcctgg aagatgtcca ccagtgtctc ga 42

<210> 15

<211> 48

<212> DNA

<213> Artifizielle Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der artifiziellen Sequenz:
Oligonukleotid

<400> 15

tggcttgaag atgtactcga tctcatcagg gtattcgaag agcggtac 48

<210> 16

<211> 31

<212> DNA

<213> Artifizielle Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der artifiziellen Sequenz:
Oligonukleotid

<400> 16

catggccaca tctcatcagg ggcacgcagg a

31

<210> 17

<211> 37

<212> DNA

<213> Artifizielle Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der artifiziellen Sequenz:
Oligonukleotid

<400> 17

gcactccagc ccttcgcat tgcagcaacc cgggtac

37

<210> 18

<211> 45

<212> DNA

<213> Artifizielle Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der artifiziellen Sequenz:
Oligonukleotid

<400> 18

aattctcata atctgcatgg tgatgttgga ctctcgggtg ggaac

45

<210> 19

<211> 33

<212> DNA

<213> Artifizielle Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der artifiziellen Sequenz:
Oligonukleotid

<400> 19

catctctccg atgtgctgcc cttggtgagg ttt

33

<210> 20

<211> 60

<212> DNA

<213> Artifizielle Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der artifiziellen Sequenz:
Oligonukleotid

<400> 20

ggccgcgaag actcaatctt tctttggtct acattcacat ttgttatgct ggagaaagct 60

<210> 21

```
<211> 1997
<212> DNA
<213> Homo sapiens
```

```
<220>  
<221> CDS  
<222> (352)..(1608)
```

<400> 21																
ccccccccgc	ctctccaaaa	agctacaccg	acgcgggaccg	cggcgggcgtc	ctccctcgcc	60										
ctcgccttcac	ctcgcggggt	ccgaatgcgg	ggagctcggga	tgtccggttt	cctgtgagggc	120										
ttttacctga	caccgcgcgc	ctttccccgg	cactggctgg	gagggcgccc	tgcaaagttg	180										
ggaacgcgga	gccccggacc	cgctccccgc	gcctccggct	cgcgcagggg	gggtcgccgg	240										
gaggagcccc	ggggagaggg	accaggaggg	gcccgcggcc	tgcaggggc	gcccgcgccc	300										
ccacccctgc	ccccgccagc	ggaccgggtcc	cccacccccg	gtccttccac	c	atg	cac	357								
							Met	His								
							1									
ttg	ctg	ggc	ttc	ttc	tct	gtg	gcg	tgt	tct	ctg	ctc	gcc	gct	gcg	ctg	405
Leu	Leu	Gly	Phe	Phe	Ser	Val	Ala	Cys	Ser	Leu	Leu	Ala	Ala	Ala	Leu	
		5					10					15				
ctc	ccg	ggc	cct	gcg	gag	gcg	ccc	gcc	gcc	gcc	gcc	gcc	ttc	gag	tcc	453
Leu	Pro	Gly	Pro	Arg	Glu	Ala	Pro	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Phe	Glu	Ser	
		20					25					30				
gga	ctc	gac	ctc	tgc	gac	gcg	gag	ccc	gac	gcg	ggc	gag	gcc	acg	gct	501
Gly	Leu	Asp	Leu	Ser	Asp	Ala	Glu	Pro	Asp	Ala	Gly	Glu	Ala	Thr	Ala	
35					40					45			50			
tat	gca	agc	aaa	gat	ctg	gag	gag	cag	tta	cgg	tct	gtg	tcc	agt	gta	549
Tyr	Ala	Ser	Lys	Asp	Leu	Glu	Glu	Gln	Leu	Arg	Ser	Val	Ser	Ser	Val	
				55					60					65		
gat	gaa	ctc	atg	act	gta	ctc	tac	cca	gaa	tat	tgg	aaa	atg	tac	aag	597
Asp	Glu	Leu	Met	Thr	Val	Leu	Tyr	Pro	Glu	Tyr	Trp	Lys	Met	Tyr	Lys	
				70					75					80		
tgt	cag	cta	agg	aaa	gga	ggc	tgg	caa	cat	aac	aga	gaa	cag	gcc	aac	645
Cys	Gln	Leu	Arg	Lys	Gly	Gly	Trp	Gln	His	Asn	Arg	Glu	Gln	Ala	Asn	
				85			90							95		
ctc	aac	tca	agg	aca	gaa	gag	act	ata	aaa	ttt	gct	gca	gca	cat	tat	693
Leu	Asn	Ser	Arg	Thr	Glu	Glu	Thr	Ile	Lys	Phe	Ala	Ala	Ala	His	Tyr	
				100			105							110		
aat	aca	gag	atc	ttg	aaa	agt	att	gat	aat	gag	tgg	aga	aag	act	caa	741
Asn	Thr	Glu	Ile	Leu	Lys	Ser	Ile	Asp	Asn	Glu	Trp	Arg	Lys	Thr	Gln	
115							120					125			130	
tgc	atg	cca	cgg	gag	gtg	tgt	ata	gat	gtg	ggg	aag	gag	ttt	gga	gtc	789
Cys	Met	Pro	Arg	Glu	Val	Cys	Ile	Asp	Val	Gly	Lys	Glu	Phe	Gly	Val	
				135					140							145
gcg	aca	aac	acc	ttc	ttt	aaa	cct	cca	tgt	gtg	tcc	gtc	tac	aga	tgt	837
Ala	Thr	Asn	Thr	Phe	Phe	Lys	Pro	Pro	Cys	Val	Ser	Val	Tyr	Arg	Cys	

150					155					160					
ggg ggt tgc tgc aat agt gag ggg ctg cag tgc atg aac acc agc acg	885														
Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys Met Asn Thr Ser Thr															
165 170 175															
agc tac ctc agc aag acg tta ttt gaa att aca gtg cct ctc tct caa	933														
Ser Tyr Leu Ser Lys Thr Leu Phe Glu Ile Thr Val Pro Leu Ser Gln															
180 185 190															
ggc ccc aaa cca gta aca atc agt ttt gcc aat cac act tcc tgc cga	981														
Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Ala Asn His Thr Ser Cys Arg															
195 200 205 210															
tgc atg tct aaa ctg gat gtt tac aga caa gtt cat tcc att att aga	1029														
Cys Met Ser Lys Leu Asp Val Tyr Arg Gln Val His Ser Ile Ile Arg															
215 220 225															
cgt tcc ctg cca gca aca cta cca cag tgt cag gca gcg aac aag acc	1077														
Arg Ser Leu Pro Ala Thr Leu Pro Gln Cys Gln Ala Ala Asn Lys Thr															
230 235 240															
tgc ccc acc aat tac atg tgg aat aat cac atc tgc aga tgc ctg gct	1125														
Cys Pro Thr Asn Tyr Met Trp Asn Asn His Ile Cys Arg Cys Leu Ala															
245 250 255															
cag gaa gat ttt atg ttt tcc tcg gat gct gga gat gac tca aca gat	1173														
Gln Glu Asp Phe Met Phe Ser Ser Asp Ala Gly Asp Asp Ser Thr Asp															
260 265 270															
gga ttc cat gac atc tgt gga cca aac aag gag ctg gat gaa gag acc	1221														
Gly Phe His Asp Ile Cys Gly Pro Asn Lys Glu Leu Asp Glu Glu Thr															
275 280 285 290															
tgt cag tgt gtc tgc aga gcg ggg ctt cgg cct gcc agc tgt gga ccc	1269														
Cys Gln Cys Val Cys Arg Ala Gly Leu Arg Pro Ala Ser Cys Gly Pro															
295 300 305															
cac aaa gaa cta gac aga aac tca tgc cag tgt gtc tgt aaa aac aaa	1317														
His Lys Glu Leu Asp Arg Asn Ser Cys Gln Cys Val Cys Lys Asn Lys															
310 315 320															
ctc ttc ccc agc caa tgt ggg gcc aac cga gaa ttt gat gaa aac aca	1365														
Leu Phe Pro Ser Gln Cys Gly Ala Asn Arg Glu Phe Asp Glu Asn Thr															
325 330 335															
tgc cag tgt gta tgt aaa aga acc tgc ccc aga aat caa ccc cta aat	1413														
Cys Gln Cys Val Cys Lys Arg Thr Cys Pro Arg Asn Gln Pro Leu Asn															
340 345 350															
cct gga aaa tgt gcc tgt gaa tgt aca gaa agt cca cag aaa tgc ttg	1461														
Pro Gly Lys Cys Ala Cys Glu Cys Thr Glu Ser Pro Gln Lys Cys Leu															
355 360 365 370															
tta aaa gga aag aag ttc cac cac caa aca tgc agc tgt tac aga cgg	1509														
Leu Lys Gly Lys Lys Phe His His Gln Thr Cys Ser Cys Tyr Arg Arg															
375 380 385															
cca tgt acg aac cgc cag aag gct tgt gag cca gga ttt tca tat agt	1557														
Pro Cys Thr Asn Arg Gln Lys Ala Cys Glu Pro Gly Phe Ser Tyr Ser															
390 395 400															

gaa gaa gtg tgt cgt tgt gtc cct tca tat tgg aaa aga cca caa atg 1605
 Glu Glu Val Cys Arg Cys Val Pro Ser Tyr Trp Lys Arg Pro Gln Met
 405 410 415

agc taagattgta ctgttttcca gttcatcgat tttctattat ggaaaactgt 1658
 Ser

gttgccacag tagaactgtc tgtgaacaga gagacccttg tgggtccatg ctaacaaaga 1718

caaaagtctg tcttttctga accatgtgga taactttaca gaaatggact ggagctcatc 1778

tgcaaaaggc ctcttgtaaa gactggtttt ctgccaatga ccaaacagcc aagattttcc 1838

tcttgtgatt tctttaaaag aatgactata taattttatt ccactaaaaa tattgtttct 1898

gcattcattt ttatagcaac aacaattggg aaaactcact gtgatcaata tttttatata 1958

atgcaaaata tgtttaaaat aaaatgaaaa ttgtattat 1997

<210> 22

<211> 419

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

Met His Leu Leu Gly Phe Phe Ser Val Ala Cys Ser Leu Leu Ala Ala
 1 5 10 15

Ala Leu Leu Pro Gly Pro Arg Glu Ala Pro Ala Ala Ala Ala Ala Phe
 20 25 30

Glu Ser Gly Leu Asp Leu Ser Asp Ala Glu Pro Asp Ala Gly Glu Ala
 35 40 45

Thr Ala Tyr Ala Ser Lys Asp Leu Glu Glu Gln Leu Arg Ser Val Ser
 50 55 60

Ser Val Asp Glu Leu Met Thr Val Leu Tyr Pro Glu Tyr Trp Lys Met
 65 70 75 80

Tyr Lys Cys Gln Leu Arg Lys Gly Gly Trp Gln His Asn Arg Glu Gln
 85 90 95

Ala Asn Leu Asn Ser Arg Thr Glu Glu Thr Ile Lys Phe Ala Ala Ala
 100 105 110

His Tyr Asn Thr Glu Ile Leu Lys Ser Ile Asp Asn Glu Trp Arg Lys
 115 120 125

Thr Gln Cys Met Pro Arg Glu Val Cys Ile Asp Val Gly Lys Glu Phe
 130 135 140

Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser Val Tyr
 145 150 155 160

Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys Met Asn Thr
 165 170 175

Ser Thr Ser Tyr Leu Ser Lys Thr Leu Phe Glu Ile Thr Val Pro Leu
 180 185 190

Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Ala Asn His Thr Ser

195					200					205						
Cys	Arg	Cys	Met	Ser	Lys	Leu	Asp	Val	Tyr	Arg	Gln	Val	His	Ser	Ile	
210					215					220						
Ile	Arg	Arg	Ser	Leu	Pro	Ala	Thr	Leu	Pro	Gln	Cys	Gln	Ala	Ala	Asn	
225					230					235					240	
Lys	Thr	Cys	Pro	Thr	Asn	Tyr	Met	Trp	Asn	Asn	His	Ile	Cys	Arg	Cys	
245					250					255						
Leu	Ala	Gln	Glu	Asp	Phe	Met	Phe	Ser	Ser	Asp	Ala	Gly	Asp	Asp	Ser	
260					265					270						
Thr	Asp	Gly	Phe	His	Asp	Ile	Cys	Gly	Pro	Asn	Lys	Glu	Leu	Asp	Glu	
275					280					285						
Glu	Thr	Cys	Gln	Cys	Val	Cys	Arg	Ala	Gly	Leu	Arg	Pro	Ala	Ser	Cys	
290					295					300						
Gly	Pro	His	Lys	Glu	Leu	Asp	Arg	Asn	Ser	Cys	Gln	Cys	Val	Cys	Lys	
305					310					315					320	
Asn	Lys	Leu	Phe	Pro	Ser	Gln	Cys	Gly	Ala	Asn	Arg	Glu	Phe	Asp	Glu	
325					330					335						
Asn	Thr	Cys	Gln	Cys	Val	Cys	Lys	Arg	Thr	Cys	Pro	Arg	Asn	Gln	Pro	
340					345					350						
Leu	Asn	Pro	Gly	Lys	Cys	Ala	Cys	Glu	Cys	Thr	Glu	Ser	Pro	Gln	Lys	
355					360					365						
Cys	Leu	Leu	Lys	Gly	Lys	Lys	Phe	His	His	Gln	Thr	Cys	Ser	Cys	Tyr	
370					375					380						
Arg	Arg	Pro	Cys	Thr	Asn	Arg	Gln	Lys	Ala	Cys	Glu	Pro	Gly	Phe	Ser	
385					390					395					400	
Tyr	Ser	Glu	Glu	Val	Cys	Arg	Cys	Val	Pro	Ser	Tyr	Trp	Lys	Arg	Pro	
405					410					415						

Gln Met Ser

<210> 23

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificielle Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der artifiziiellen Sequenz:
Oligonukleotid

<400> 23

gatcctgcac attataataac cgagatcctg aaat

34

<210> 24

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificielle Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der artifiziellen Sequenz:
 Oligonukleotid

<400> 24
 ctattgataa tgagtggaga aagactcagt gcatg 35

<210> 25
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> Artifizielle Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der artifiziellen Sequenz:
 Oligonukleotid

<400> 25
 ccgagagagg tgtgtatcga cgtggggaag gaatagaaga gc 42

<210> 26
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artifizielle Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der artifiziellen Sequenz:
 Oligonukleotid

<400> 26
 cgctcttcga atttgagtc gcgacaaaca cct 33

<210> 27
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Artifizielle Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der artifiziellen Sequenz:
 Oligonukleotid

<400> 27
 tcttcaagcc accatgtgtg tccgtgtaca gatgtggc 38

<210> 28
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artifizielle Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der artifiziellen Sequenz:
 Oligonukleotid

<400> 28
 ccgggttgct gcaatagtg ggggctgc 28

<210> 29
 <211> 46
 <212> DNA

<213> Artifizielle Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der artifiziiellen Sequenz:
Oligonukleotid

<400> 29

agtgcacgaa cacgtccacg agctaccta gcaagacgct gtttga 46

<210> 30

<211> 49

<212> DNA

<213> Artifizielle Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der artifiziiellen Sequenz:
Oligonukleotid

<400> 30

aattacagtg cctctctctc aagggcccaa accagtgaca atcagcttt 49

<210> 31

<211> 50

<212> DNA

<213> Artifizielle Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der artifiziiellen Sequenz:
Oligonukleotid

<400> 31

gccaatcaca cttcctgccg atgcatgtct aagctggatt gactcttcgc 50

<210> 32

<211> 24

<212> DNA

<213> Artifizielle Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der artifiziiellen Sequenz:
Oligonukleotid

<400> 32

ggatctcggg attataatgt gcag 24

<210> 33

<211> 45

<212> DNA

<213> Artifizielle Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der artifiziiellen Sequenz:
Oligonukleotid

<400> 33

tcggcatgca ctgagtcttt ctccactcat tatcaataga ttcca 45

<210> 34

<211> 42
 <212> DNA
 <213> Artifizuelle Sequenz

 <220>
 <223> Beschreibung der artifizuellen Sequenz:
 Oligonukleotid

 <400> 34
 tcgagctctt ctattccttc cccacgtcga tacacacctc tc 42

 <210> 35
 <211> 48
 <212> DNA
 <213> Artifizuelle Sequenz

 <220>
 <223> Beschreibung der artifizuellen Sequenz:
 Oligonukleotid

 <400> 35
 tggcttgaag aaggtgtttg tcgcgactcc aaattcgaag agcgggtac 48

 <210> 36
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artifizuelle Sequenz

 <220>
 <223> Beschreibung der artifizuellen Sequenz:
 Oligonukleotid

 <400> 36
 catggccaca tctgtacacg gacacacatg g 31

 <210> 37
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artifizuelle Sequenz

 <220>
 <223> Beschreibung der artifizuellen Sequenz:
 Oligonukleotid

 <400> 37
 gcactgcagc ccctcactat tgcagcaacc cgggtac 37

 <210> 38
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artifizuelle Sequenz

 <220>
 <223> Beschreibung der artifizuellen Sequenz:
 Oligonukleotid

 <400> 38
 aatttcaaac agcgtcttgc tgaggtagct cgtggacgtg ttcac 45

<210> 39
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artifizielle Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der artifiziiellen Sequenz:
 Oligonukleotid

<400> 39
 gattgtcact .ggtttgggcc cttgagagag aggcactgt 39

<210> 40
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Artifizielle Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der artifiziiellen Sequenz:
 Oligonukleotid

<400> 40
 ggccgcgaag actcaatcca gcttagacat gcacgcgcag gaagtgtgat tggcaaagct 60

<210> 41
 <211> 5070
 <212> DNA
 <213> Artifizielle Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der artifiziiellen Sequenz: pSecTagI-
 Vektor

<400> 41
 gacggatcgg gagatctccc gatcccctat ggtcgactct cagtacaatc tgctctgatg 60
 ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtgtt ggaggtcgct gagtagtgcy 120
 cgagcaaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg aagaatctgc 180
 ttagggtttag gcgtttttgcg ctgcttcgcg atgtacgggc cagatatacg cgttgacatt 240
 gattattgac tagttattaa tagtaatcaa ttacggggtc attagttcat agcccatata 300
 tggagtcccg cgttacataa cttacggtaa atggcccgcg tggctgaccg cccaacgacc 360
 cccgcccatt gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc 420
 attgacgtca atgggtggac tatttacggg aaactgcccc cttggcagta catcaagtgt 480
 atcatatgcc aagtagcccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt 540
 atgcccagta catgacctta tgggactttc ctacttggca gtacatctac gtattagtca 600
 tcgctattac catggtgatg cggtttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg 660
 actcacggggg atttccaagt ctccacccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc 720
 aaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgta acaactccgc cccattgacg caaatgggcg 780
 gtaggcgtgt acggtgggag gtctatataa gcagagctcg gcggtgttga caattaatca 840

tcggcatagt atatacggcat agtataatac gacaagggtga ggaactaaac catggagaca 900
 gacacactcc tgctatgggt actgctgctc tgggttccag gttccactgg tgacgcggcc 960
 caggatccgt ctcccatgcc gatttgggtct tcgaacaaaa actcatctca gaagaggatc 1020
 tgaatagcgc cgtcgaccat catcatcatc atcattgagt ttaaaccgcg tgatcagcct 1080
 cgactgtgcc ttctagttagc cagccatctg ttgtttgccc ctccccctg ccttccttga 1140
 ccctggaagg tgccactccc actgtccttt cctaataaaa tgaggaaatt gcatcgcat 1200
 gtctgagtag gtgtcattct attctggggg gtgggggtggg gcaggacagc aagggggagg 1260
 attgggaaga taatagcagg catgctgggg atgcggtggg ctctatggct tctgaggcgg 1320
 aaagaaccag ctggggctct aggggggtatc ccacgcgcc ctgtagcggc gattaagcg 1380
 cggcgggtgt ggtggttacg cgcagcgtga ccgctacact tgccagcgcc ctagcggccg 1440
 ctcttttcgc tttcttcctt tcctttctcg ccacgttcgc cggctttccc cgtcaagctc 1500
 taaatcgggg catcccttta gggttccgat ttagtgcttt acggcacctc gaccccaaaa 1560
 aacttgatta gggatgaggt tcacgtagtg ggccatcgcc ctgatagacg gtttttcgcc 1620
 ctttgacgtt ggagtccacg ttctttaata gtggactctt gttccaaact ggaacaacac 1680
 tcaacctat ctcggtctat tcttttgatt tataagggat tttggggatt tcggcctatt 1740
 ggtaaaaaa tgagctgatt taacaaaaat ttaacgcgaa ttaattctgt ggaatgtgtg 1800
 tcagttaggg tgtggaaagt cccagggctc ccagcaggc agaagtatgc aaagcatgca 1860
 tctcaattag tcagcaacca ggtgtggaaa gtccccaggc tccccagcag gcagaagtat 1920
 gcaaagcatg catctcaatt agtcagcaac catagtcccg cccctaactc cgcccatccc 1980
 gccctaact ccgccagtt ccgccattc tccgccccat ggctgactaa ttttttttat 2040
 ttatgcagag gccgaggccg cctctgcctc tgagctattc cagaagtagt gaggaggctt 2100
 ttttgagggc ctaggctttt gcaaaaagct cccgggagct tgtatatcca ttttcggatc 2160
 tgatcagcac gtgttgacaa ttaatcatcg gcatagtata tcggcatagt ataatacgac 2220
 aaggtaggga actaaaccat ggctaagttg accagtgccg ttccgggtgct caccgcgcgc 2280
 gacgtcgccg gagcggtcga gttctggacc gaccggctcg ggttctcccg ggacttcgtg 2340
 gaggacgact tcgccggtgt ggtccgggac gacgtgacct tgttcatcag cgcggtccag 2400
 gaccaggtgg tgccggacaa caccctggcc tgggtgtggg tgcgcggcct ggacgagctg 2460
 tacgccgagt ggtcggaggt cgtgtccacg aacttcggg acgcctccgg gccggccatg 2520
 accgagatcg gcgagcagcc gtggggggcg gagttcgccc tgcgcgaccc ggccggcaac 2580
 tgcggtgact tcgtggccga ggagcaggac tgacacgtgc tacgagattt cgattccacc 2640
 gccgccttct atgaaaggtt gggcttcgga atcgttttcc gggacgcgg ctggatgatc 2700
 ctccagcgcg gggatctcat gctggagttc ttcgccacc ccaacttgtt tattgcagct 2760

tataatgggtt acaaataaag caatagcatc acaaatttca caaataaagc atttttttca 2820
ctgcattcta gttgtggttt gtccaaactc atcaatgtat cttatcatgt ctgtataaccg 2880
tcgacctcta gctagagctt ggcgtaatca tggcatagc tgtttcctgt gtgaaattgt 2940
tatccgctca caattccaca caacatacga gccggaagca taaagtgtaa agcctgggggt 3000
gcctaagtag tgagctaact cacattaatt gcgttgcgct cactgcccgc tttccagtcg 3060
ggaaacctgt cgtgccagct gcattaatga atcggccaac gcgoggggag aggcgggtttg 3120
cgtattgggc gctcttcgcg ttctctcgctc actgactcgc tgcgctcggt cgttcggctg 3180
cggcgagcgg tatcagctca ctcaaaggcg gtaatacggg tatccacaga atcaggggat 3240
aacgcaggaa agaacatgtg agcaaaaggc cagcaaaagg ccaggaaccg taaaaaggcc 3300
gcgttgctgg cgtttttcca taggtctcgc cccctgacg agcatcaca aaatcgacgc 3360
tcaagtcaga ggtggcgaaa cccgacagga ctataaagat accaggcggt tccccctgga 3420
agctccctcg tgcgctctcc tgttcggacc ctgccgctta ccggatacct gtccgccttt 3480
ctcccttcgg gaagcgtggc gctttctcaa tgctcacgct gtaggtatct cagttcggtg 3540
taggtcgttc gctccaagct gggctgtgtg cacgaacccc ccgttcagcc cgaccgctgc 3600
gccttatccg gtaactatcg tcttgagtcc aaccgggtaa gacacgactt atcgccactg 3660
gcagcagcca ctggtaacag gattagcaga gcgaggtatg taggcgggtgc tacagagttc 3720
ttgaagtggg ggcctaacta cggtacact agaaggacag tatttggtat ctgcgctctg 3780
ctgaagccag ttaccttcgg aaaaagagtt ggtagctctt gatccggcaa acaaaccacc 3840
gctggtagcg gtgggttttt tgtttgcaag cagcagatta cgcgcagaaa aaaaggatct 3900
caagaagatc ctttgatctt ttctacgggg tctgacgctc agtggaacga aaactcacgt 3960
taagggatth ttggtcatgag attatcaaaa aggatcttca cctagatcct tttaaattaa 4020
aatgaagtt ttaaataat ctaaagtata tatgagtaaa cttgggtctga cagttaccaa 4080
tgcttaatca gtgaggcacc tatctcagcg atctgtctat ttogttcatc catagttgcc 4140
tgactccccg tcgtgtagat aactacgata cgggagggct taccatctgg cccagtgct 4200
gcaatgatac cgcgagaccc acgctcaccg gctccagatt tatcagcaat aaaccagcca 4260
gccggaaggg ccgagcgag aagtggctct gcaactttat ccgcctccat ccagtctatt 4320
aattgttgcc ggggaagctag agtaagtagt tcgccagtta atagtttgcg caacgttggt 4380
gccattgcta caggcatcgt ggtgtcacgc tcgtcgtttg gtatggcttc attcagctcc 4440
ggttcccaac gatcaaggcg agttacatga tccccatgt tgtgcaaaaa agcgggttagc 4500
tccttcgggtc ctccgatcgt tgtcagaagt aagttggccg cagtgttatc actcatgggt 4560
atggcagcac tgcataattc tcttactgtc atgccatccg taagatgctt ttctgtgact 4620
ggtgagtact caaccaagtc attctgagaa tagtgtatgc ggcgaccgag ttgctcttgc 4680

```

ccggcggtcaa tacgggataa taccgcgcc catagcagaa ctttaaaagt gctcatcatt 4740
ggaaaacggtt cttcggggcg aaaactotca aggatcttac cgctgttgag atccagttcg 4800
atgtaaccca ctcgtgcacc caactgatct tcagcatctt ttactttcac cagcgtttct 4860
gggtgagcaa aaacaggaag gcaaaatgcc gcaaaaaagg gaataagggc gacacggaaa 4920
tggtgaatac tcatactctt cctttttcaa tattattgaa gcatttatca gggttattgt 4980
ctcatgagcg gatacatatt tgaatgtatt tagaaaaata aacaaatagg ggttccgcgc 5040
acatttcccc gaaaagtgcc acctgacgtc 5070

```

<210> 42

<211> 388

<212> DNA

<213> Artifizielle Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der artifiziiellen Sequenz: Hybrid-DNA

<220>

<221> CDS

<222> (8)..(385)

<400> 42

```

ggatcct ggg cag aat cat cac gaa gtg gtg aaa ttc atg gat gtc tat 49
      Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr
        1                      5                      10

cag cgc agc tac tgc cat ccg atc gag aca ctg gtg gac atc ttc cag 97
Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln
  15                      20                      25                      30

gaa tac cct gat gag atc gag tac atc ttc aag cca tcc tgc gtg ccc 145
Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro
          35                      40                      45

ctg atg aga tgt ggg ggt tgc tgc aat gac gaa ggg ctg gag tgc gtt 193
Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val
          50                      55                      60

ccc acc gag gag tcc aac atc acc atg cag att atg aga att aaa cct 241
Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro
          65                      70                      75

cac caa ggg cag cac atc gga gag atg agc ttt ctc cag cat aac aaa 289
His Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn Lys
          80                      85                      90

tgt gaa tgt aga cca aag aaa gat ttg gtc ttc gaa caa aaa ctc atc 337
Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys Leu Ile
          95                      100                      105                      110

tca gaa gag gat ctg aat agc gcc gtc gac cat cat cat cat cat cat 385
Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His
          115                      120                      125

tga 388

```

<210> 43
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Artifizielle Sequenz

<400> 43

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

<210> 44
 <211> 394
 <212> DNA
 <213> Artifizielle Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der artifiziellen Sequenz: Hybrid-DNA

<220>

<221> CDS

<222> (8)..(391)

<400> 44

ggatcct	ggg	cag	aat	cat	cac	gaa	gtg	gtg	aaa	ttc	atg	gat	gtc	tat		49
	Gly	Gln	Asn	His	His	Glu	Val	Val	Lys	Phe	Met	Asp	Val	Tyr		
	1				5					10						
cag	cgc	agc	tac	tgc	cat	ccg	atc	gag	aca	ctg	gtg	gac	atc	ttc	cag	97
Gln	Arg	Ser	Tyr	Cys	His	Pro	Ile	Glu	Thr	Leu	Val	Asp	Ile	Phe	Gln	
	15				20					25				30		
gaa	tac	cct	gat	gag	atc	gag	tac	atc	ttc	aag	cca	tcc	tgc	gtg	ccc	145
Glu	Tyr	Pro	Asp	Glu	Ile	Glu	Tyr	Ile	Phe	Lys	Pro	Ser	Cys	Val	Pro	
				35					40					45		
ctg	atg	aga	tgt	ggg	ggg	tgc	tgc	aat	agt	gag	ggg	ctg	cag	tgc	atg	193
Leu	Met	Arg	Cys	Gly	Gly	Cys	Cys	Asn	Ser	Glu	Gly	Leu	Gln	Cys	Met	
			50					55					60			
aac	acg	tcc	acg	agc	tac	ctc	agc	aag	acg	ctg	ttt	gaa	att	aca	gtg	241
Asn	Thr	Ser	Thr	Ser	Tyr	Leu	Ser	Lys	Thr	Leu	Phe	Glu	Ile	Thr	Val	
		65					70					75				

cct ctc tct caa ggg ccc aaa cca gtg aca atc agc ttt gcc aat cac 289
 Pro Leu Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Ala Asn His
 80 85 90

act tcc tgc cga tgc atg tct aag ctg gat ttg gtc ttc gaa caa aaa 337
 Thr Ser Cys Arg Cys Met Ser Lys Leu Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys
 95 100 105 110

ctc atc tca gaa gag gat ctg aat agc gcc gtc gac cat cat cat cat 385
 Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His
 115 120 125

cat cat tga 394
 His His

<210> 45

<211> 128

<212> PRT

<213> Artifizielle Sequenz

<400> 45

Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg
 1 5 10 15

Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu Tyr
 20 25 30

Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu Met
 35 40 45

Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys Met Asn Thr
 50 55 60

Ser Thr Ser Tyr Leu Ser Lys Thr Leu Phe Glu Ile Thr Val Pro Leu
 65 70 75 80

Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Ala Asn His Thr Ser
 85 90 95

Cys Arg Cys Met Ser Lys Leu Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys Leu Ile
 100 105 110

Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His
 115 120 125

<210> 46

<211> 391

<212> DNA

<213> Artifizielle Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der artifiziiellen Sequenz: Hybrid-DNA

<220>

<221> CDS

<222> (8)..(388)

<400> 46

ggatcct gca cat tat aat acc gag atc ctg aaa tct att gat aat gag 49
 Ala His Tyr Asn Thr Glu Ile Leu Lys Ser Ile Asp Asn Glu
 1 5 10

```

tgg aga aag act cag tgc atg ccg aga gag gtg tgt atc gac gtg ggg 97
Trp Arg Lys Thr Gln Cys Met Pro Arg Glu Val Cys Ile Asp Val Gly
15 20 25 30

aag gaa ttt gga gtc gcg aca aac acc ttc ttc aag cca cca tgt gtg 145
Lys Glu Phe Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val
35 40 45

tcc gtg tac aga tgt ggg ggt tgc tgc aat gac gaa ggg ctg gag tgc 193
Ser Val Tyr Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys
50 55 60

gtt ccc acc gag gag tcc aac atc acc atg cag att atg aga att aaa 241
Val Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys
65 70 75

cct cac caa ggg cag cac atc gga gag atg agc ttt ctc cag cat aac 289
Pro His Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn
80 85 90

aaa tgt gaa tgt aga cca aag aaa gat ttg gtc ttc gaa caa aaa ctc 337
Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys Leu
95 100 105 110

atc tca gaa gag gat ctg aat agc gcc gtc gac cat cat cat cat cat 385
Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His
115 120 125

cat tga 391
His

```

<210> 47

<211> 127

<212> PRT

<213> Artifizielle Sequenz

<400> 47

```

Ala His Tyr Asn Thr Glu Ile Leu Lys Ser Ile Asp Asn Glu Trp Arg
1 5 10 15

Lys Thr Gln Cys Met Pro Arg Glu Val Cys Ile Asp Val Gly Lys Glu
20 25 30

Phe Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser Val
35 40 45

Tyr Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val Pro
50 55 60

Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His
65 70 75 80

Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn Lys Cys
85 90 95

Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys Leu Ile Ser
100 105 110

Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His
115 120 125

```

<210> 48
 <211> 397
 <212> DNA
 <213> Artifizielle Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der artifiziiellen Sequenz: Hybrid-DNA

<220>
 <221> CDS
 <222> (8)..(394)

<400> 48
 ggatcct gca cat tat aat acc gag atc ctg aaa tct att gat aat gag 49
 Ala His Tyr Asn Thr Glu Ile Leu Lys Ser Ile Asp Asn Glu
 1 5 10

tgg aga aag act cag tgc atg ccg aga gag gtg tgt atc gac gtg ggg 97
 Trp Arg Lys Thr Gln Cys Met Pro Arg Glu Val Cys Ile Asp Val Gly
 15 20 25 30

aag gaa ttt gga gtc gcg aca aac acc ttc ttc aag cca cca tgt gtg 145
 Lys Glu Phe Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val
 35 40 45

tcc gtg tac aga tgt ggg ggt tgc tgc aat agt gag ggg ctg cag tgc 193
 Ser Val Tyr Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys
 50 55 60

atg aac acg tcc acg agc tac ctc agc aag acg ctg ttt gaa att aca 241
 Met Asn Thr Ser Thr Ser Tyr Leu Ser Lys Thr Leu Phe Glu Ile Thr
 65 70 75

gtg cct ctc tct caa ggg ccc aaa cca gtg aca atc agc ttt gcc aat 289
 Val Pro Leu Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Ala Asn
 80 85 90

cac act tcc tgc cga tgc atg tct aag ctg gat ttg gtc ttc gaa caa 337
 His Thr Ser Cys Arg Cys Met Ser Lys Leu Asp Leu Val Phe Glu Gln
 95 100 105 110

aaa ctc atc tca gaa gag gat ctg aat agc gcc gtc gac cat cat cat 385
 Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His
 115 120 125

cat cat cat tga 397
 His His His

<210> 49
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> Artifizielle Sequenz

<400> 49
 Ala His Tyr Asn Thr Glu Ile Leu Lys Ser Ile Asp Asn Glu Trp Arg
 1 5 10 15

Lys Thr Gln Cys Met Pro Arg Glu Val Cys Ile Asp Val Gly Lys Glu
 20 25 30

```

Phe Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser Val
   35                               40                               45

Tyr Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys Met Asn
   50                               55                               60

Thr Ser Thr Ser Tyr Leu Ser Lys Thr Leu Phe Glu Ile Thr Val Pro
   65                               70                               75                               80

Leu Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Ala Asn His Thr
   85                               90                               95

Ser Cys Arg Cys Met Ser Lys Leu Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys Leu
  100                               105                               110

Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His
  115                               120                               125

```

His

<210> 50

<211> 322

<212> DNA

<213> Artifizielle Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der artifiziiellen Sequenz: Hybrid-DNA

<220>

<221> CDS

<222> (8)..(322)

<400> 50

```

ggatcct ggg cag aat cat cac gaa gtg gtg aaa ttc atg gat gtc tat 49
      Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr
        1                               5                               10

cag cgc agc tac tgc cat ccg atc gag aca ctg gtg gac atc ttc cag 97
Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln
  15                               20                               25                               30

gaa ttt gga gtc gcg aca aac acc ttc ttc aag cca cca tgt gtg tcc 145
Glu Phe Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser
        35                               40                               45

gtg tac aga tgt ggg ggt tgc tgc aat gac gaa ggg ctg gag tgc gtt 193
Val Tyr Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val
   50                               55                               60

ccc acc gag gag tcc aac atc acc atg cag att atg aga att aaa cct 241
Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro
   65                               70                               75

cac caa ggg cag cac atc gga gag atg agc ttt ctc cag cat aac aaa 289
His Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn Lys
   80                               85                               90

tgt gaa tgt aga cca aag aaa gat ttg gtc ttc 322
Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Leu Val Phe
   95                               100                               105

```

<210> 51
 <211> 105
 <212> PRT
 <213> Artifizielle Sequenz

<400> 51
 Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg
 1 5 10 15
 Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu Phe
 20 25 30
 Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser Val Tyr
 35 40 45
 Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val Pro Thr
 50 55 60
 Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His Gln
 65 70 75 80
 Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn Lys Cys Glu
 85 90 95
 Cys Arg Pro Lys Lys Asp Leu Val Phe
 100 105

<210> 52
 <211> 388
 <212> DNA
 <213> Artifizielle Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der artifiziiellen Sequenz: Hybrid-DNA

<220>
 <221> CDS
 <222> (8)..(385)

<400> 52
 ggatcct ggg cag aat cat cac gaa gtg gtg aaa ttc atg gat gtc tat 49
 Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr
 1 5 10
 cag cgc agc tac tgc cat ccg atc gag aca ctg gtg gac atc ttc cag 97
 Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln
 15 20 25 30
 gaa ttt gga gtc gcg aca aac acc ttc ttc aag cca cca tgt gtg tcc 145
 Glu Phe Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser
 35 40 45
 gtg tac aga tgt ggg ggt tgc tgc aat gac gaa ggg ctg gag tgc atg 193
 Val Tyr Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Met
 50 55 60
 aac acg tcc acg agc tac ctc agc aag acg ctg ttt gaa att aaa cct 241
 Asn Thr Ser Thr Ser Tyr Leu Ser Lys Thr Leu Phe Glu Ile Lys Pro
 65 70 75
 cac caa ggg cag cac atc gga gag atg agc ttt ctc cag cat aac aaa 289
 His Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn Lys
 80 85 90

tgt gaa tgt aga cca aag aaa gat ttg gtc ttc gaa caa aaa ctc atc 337
 Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys Leu Ile
 95 100 105 110

tca gaa gag gat ctg aat agc gcc gtc gac cat cat cat cat cat cat 385
 Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His
 115 120 125

tga 388

<210> 53

<211> 126

<212> PRT

<213> Artifizielle Sequenz

<400> 53

Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg
 1 5 10 15

Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu Phe
 20 25 30

Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser Val Tyr
 35 40 45

Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Met Asn Thr
 50 55 60

Ser Thr Ser Tyr Leu Ser Lys Thr Leu Phe Glu Ile Lys Pro His Gln
 65 70 75 80

Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn Lys Cys Glu
 85 90 95

Cys Arg Pro Lys Lys Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu
 100 105 110

Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His
 115 120 125

<210> 54

<211> 388

<212> DNA

<213> Artifizielle Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der artifiziiellen Sequenz: Hybrid-DNA

<220>

<221> CDS

<222> (8)..(385)

<400> 54

ggatcct ggg cag aat cat cac gaa gtg gtg aaa ttc atg gat gtc tat 49
 Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr
 1 5 10

cag cgc agc tac tgc cat ccg atc gag aca ctg gtg gac atc ttc cag 97
 Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln

15	20	25	30	
gaa ttt gga gtc gcg aca aac acc ttc ttc aag cca cca tgt gtg tcc				145
Glu Phe Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser				
	35	40	45	
gtg tac aga tgt ggg ggt tgc tgc aat agt gag ggg ctg cag tgc gtt				193
Val Tyr Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys Val				
	50	55	60	
ccc acc gag gag tcc aac atc acc atg cag att atg aga att aaa cct				241
Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Glu Ile Met Arg Ile Lys Pro				
	65	70	75	
cac caa ggg cag cac atc gga gag atg agc ttt ctc cag cat aac aaa				289
His Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn Lys				
	80	85	90	
tgt gaa tgt aga cca aag aaa gat ttg gtc ttc gaa caa aaa ctc atc				337
Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys Leu Ile				
	95	100	105	110
tca gaa gag gat ctg aat agc gcc gtc gac cat cat cat cat cat cat				385
Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His				
	115	120	125	
tga				388

<210> 55
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Artifizielle Sequenz

<400> 55
 Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg
 1 5 10 15
 Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu Phe
 20 25 30
 Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser Val Tyr
 35 40 45
 Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys Val Pro Thr
 50 55 60
 Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His Gln
 65 70 75 80
 Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn Lys Cys Glu
 85 90 95
 Cys Arg Pro Lys Lys Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu
 100 105 110
 Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His
 115 120 125

<210> 56
 <211> 388

<212> DNA

<213> Artifizielle Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der artifiziiellen Sequenz: Hybrid-DNA

<220>

<221> CDS

<222> (8)..(385)

<400> 56

```

ggatcct ggg cag aat cat cac gaa gtg gtg aaa ttc atg gat gtc tat 49
      Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr
        1             5             10

cag cgc agc tac tgc cat ccg atc gag aca ctg gtg gac atc ttc cag 97
Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln
  15             20             25             30

gaa ttt gga gtc gcg aca aac acc ttc ttc aag cca cca tgt gtg tcc 145
Glu Phe Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser
             35             40             45

gtg tac aga tgt ggg ggt tgc tgc aat agt gag ggg ctg cag tgc atg 193
Val Tyr Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys Met
      50             55             60

aac acg tcc acg agc tac ctc agc aag acg ctg ttt gaa att aaa cct 241
Asn Thr Ser Thr Ser Tyr Leu Ser Lys Thr Leu Phe Glu Ile Lys Pro
      65             70             75

cac caa ggg cag cac atc gga gag atg agc ttt ctc cag cat aac aaa 289
His Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn Lys
      80             85             90

tgt gaa tgt aga cca aag aaa gat ttg gtc ttc gaa caa aaa ctc atc 337
Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys Leu Ile
      95             100             105             110

tca gaa gag gat ctg aat agc gcc gtc gac cat cat cat cat cat cat 385
Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His
             115             120             125

tga 388

```

<210> 57

<211> 126

<212> PRT

<213> Artifizielle Sequenz

<400> 57

```

Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg
  1             5             10             15

Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu Phe
      20             25             30

Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser Val Tyr
      35             40             45

Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys Met Asn Thr
      50             55             60

```

```

Ser Thr Ser Tyr Leu Ser Lys Thr Leu Phe Glu Ile Lys Pro His Gln
 65              70              75              80

Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn Lys Cys Glu
              85              90              95

Cys Arg Pro Lys Lys Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu
              100             105             110

Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His
              115             120             125

```

<210> 58

<211> 322

<212> DNA

<213> Artifizielle Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der artifiziiellen Sequenz: Hybrid-DNA

<220>

<221> CDS

<222> (8)..(322)

<400> 58

```

ggatcct ggg cag aat cat cac gaa gtg gtg aaa ttc atg gat gtc tat 49
      Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr
        1              5              10

cag cgc agc tac tgc cat ccg atc gag aca ctg gtg gac atc ttc cag 97
Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln
 15              20              25              30

gaa ttt gga gtc gcg aca aac acc ttc ttc aag cca cca tgt gtg tcc 145
Glu Phe Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser
              35              40              45

gtg tac aga tgt ggg ggt tgc tgc aat gac gaa ggg ctg gag tgc gtt 193
Val Tyr Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val
 50              55              60

ccc acc gag gag tcc aac atc acc atg cag att atg aga att aaa cct 241
Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro
 65              70              75

cac caa ggg cag cac atc gga gag atg agc ttt gcc aat cac act tcc 289
His Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Ala Asn His Thr Ser
 80              85              90

tgc cga tgc atg tct aag ctg gat ttg gtc ttc 322
Cys Arg Cys Met Ser Lys Leu Asp Leu Val Phe
 95              100             105

```

<210> 59

<211> 105

<212> PRT

<213> Artifizielle Sequenz

<400> 59

```

Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg
 1              5              10              15

```

```

Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu Phe
      20                      25                      30

Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser Val Tyr
      35                      40                      45

Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val Pro Thr
      50                      55                      60

Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His Gln
      65                      70                      75                      80

Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Ala Asn His Thr Ser Cys Arg
      85                      90                      95

Cys Met Ser Lys Leu Asp Leu Val Phe
      100                      105

```

<210> 60

<211> 388

<212> DNA

<213> Artifizielle Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der artifiziellen Sequenz: Hybrid-DNA

<220>

<221> CDS

<222> (8)..(385)

<400> 60

```

ggatcct ggg cag aat cat cac gaa gtg gtg aaa ttc atg gat gtc tat 49
      Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr
      1                      5                      10

cag cgc agc tac tgc cat ccg atc gag aca ctg gtg gac atc ttc cag 97
Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln
      15                      20                      25                      30

gaa ttt gga gtc gcg aca aac acc ttc ttc aag cca cca tgt gtg tcc 145
Glu Phe Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser
      35                      40                      45

gtg tac aga tgt ggg ggt tgc tgc aat gac gaa ggg ctg gag tgc atg 193
Val Tyr Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Met
      50                      55                      60

aac acg tcc acg agc tac ctc agc aag acg ctg ttt gaa att aaa cct 241
Asn Thr Ser Thr Ser Tyr Leu Ser Lys Thr Leu Phe Glu Ile Lys Pro
      65                      70                      75

cac caa ggg cag cac atc gga gag atg agc ttt gcc aat cac act tcc 289
His Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Ala Asn His Thr Ser
      80                      85                      90

tgc cga tgc atg tct aag ctg gat ttg gtc ttc gaa caa aaa ctc atc 337
Cys Arg Cys Met Ser Lys Leu Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys Leu Ile
      95                      100                      105                      110

tca gaa gag gat ctg aat agc gcc gtc gac cat cat cat cat cat cat 385
Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His
      115                      120                      125

```

tga

388

<210> 61

<211> 126

<212> PRT

<213> Artifizielle Sequenz

<400> 61

Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg
 1 5 10 15

Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu Phe
 20 25 30

Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser Val Tyr
 35 40 45

Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Met Asn Thr
 50 55 60

Ser Thr Ser Tyr Leu Ser Lys Thr Leu Phe Glu Ile Lys Pro His Gln
 65 70 75 80

Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Ala Asn His Thr Ser Cys Arg
 85 90 95

Cys Met Ser Lys Leu Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu
 100 105 110

Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His
 115 120 125

<210> 62

<211> 388

<212> DNA

<213> Artifizielle Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der artifiziellen Sequenz: Hybrid-DNA

<220>

<221> CDS

<222> (8)..(385)

<400> 62

ggatcct ggg cag aat cat cac gaa gtg gtg aaa ttc atg gat gtc tat 49
 Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr
 1 5 10

cag cgc agc tac tgc cat ccg atc gag aca ctg gtg gac atc ttc cag 97
 Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln
 15 20 25 30

gaa ttt gga gtc gcg aca aac acc ttc ttc aag cca cca tgt gtg tcc 145
 Glu Phe Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser
 35 40 45

gtg tac aga tgt ggg ggt tgc tgc aat agt gag ggg ctg cag tgc gtt 193
 Val Tyr Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys Val
 50 55 60

```

ccc acc gag gag tcc aac atc acc atg cag att atg aga att aaa cct 241
Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro
      65              70              75

cac caa ggg cag cac atc gga gag atg agc ttt gcc aat cac act tcc 289
His Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Ala Asn His Thr Ser
      80              85              90

tgc cga tgc atg tct aag ctg gat ttg gtc ttc gaa caa aaa ctc atc 337
Cys Arg Cys Met Ser Lys Leu Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys Leu Ile
      95              100             105             110

tca gaa gag gat ctg aat agc gcc gtc gac cat cat cat cat cat cat 385
Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His
      115             120             125

tga 388

```

<210> 63
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Artifizielle Sequenz

```

<400> 63
Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg
 1              5              10              15

Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu Phe
      20              25              30

Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser Val Tyr
      35              40              45

Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys Val Pro Thr
      50              55              60

Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His Gln
      65              70              75              80

Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Ala Asn His Thr Ser Cys Arg
      85              90              95

Cys Met Ser Lys Leu Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu
      100             105             110

Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His
      115             120             125

```

<210> 64
 <211> 388
 <212> DNA
 <213> Artifizielle Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der artifiziellen Sequenz: Hybrid-DNA

<220>
 <221> CDS
 <222> (8)..(385)

<400> 64

```

ggatcct ggg cag aat cat cac gaa gtg gtg aaa ttc atg gat gtc tat 49
      Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr
        1                5                10

cag cgc agc tac tgc cat ccg atc gag aca ctg gtg gac atc ttc cag 97
Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln
  15                20                25                30

gaa ttt gga gtc gcg aca aac acc ttc ttc aag cca cca tgt gtg tcc 145
Glu Phe Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser
      35                40                45

gtg tac aga tgt ggg ggt tgc tgc aat agt gag ggg ctg cag tgc atg 193
Val Tyr Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys Met
      50                55                60

aac acg tcc acg agc tac ctc agc aag acg ctg ttt gaa att aaa cct 241
Asn Thr Ser Thr Ser Tyr Leu Ser Lys Thr Leu Phe Glu Ile Lys Pro
      65                70                75

cac caa ggg cag cac atc gga gag atg agc ttt gcc aat cac act tcc 289
His Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Ala Asn His Thr Ser
      80                85                90

tgc cga tgc atg tct aag ctg gat ttg gtc ttc gaa caa aaa ctc atc 337
Cys Arg Cys Met Ser Lys Leu Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys Leu Ile
      95                100                105                110

tca gaa gag gat ctg aat agc gcc gtc gac cat cat cat cat cat cat 385
Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His
      115                120                125

tga 388

```

<210> 65

<211> 126

<212> PRT

<213> Artifizielle Sequenz

<400> 65

```

Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg
  1                5                10                15

Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu Phe
      20                25                30

Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser Val Tyr
      35                40                45

Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys Met Asn Thr
      50                55                60

Ser Thr Ser Tyr Leu Ser Lys Thr Leu Phe Glu Ile Lys Pro His Gln
      65                70                75                80

Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Ala Asn His Thr Ser Cys Arg
      85                90                95

Cys Met Ser Lys Leu Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu
      100                105                110

Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His

```

115

120

125

<210> 66

<211> 394

<212> DNA

<213> Artifizielle Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der artifiziiellen Sequenz: Hybrid-DNA

<220>

<221> CDS

<222> (8)..(391)

<400> 66

```

ggatcct ggg cag aat cat cac gaa gtg gtg aaa ttc atg gat gtc tat 49
      Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr
        1                      5                      10

```

```

cag cgc agc tac tgc cat ccg atc gag aca ctg gtg gac atc ttc cag 97
Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln
  15                      20                      25                      30

```

```

gaa ttt gga gtc gcg aca aac acc ttc ttc aag cca cca tgt gtg tcc 145
Glu Phe Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser
          35                      40                      45

```

```

gtg tac aga tgt ggg ggt tgc tgc aat gac gaa ggg ctg gag tgc gtt 193
Val Tyr Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val
      50                      55                      60

```

```

ccc acc gag gag tcc aac atc acc atg cag att atg aga att aca gtg 241
Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Thr Val
      65                      70                      75

```

```

cct ctc tct caa ggg ccc aaa cca gtg aca atc agc ttt ctc cag cat 289
Pro Leu Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Leu Gln His
      80                      85                      90

```

```

aac aaa tgt gaa tgt aga cca aag aaa gat ttg gtc ttc gaa caa aaa 337
Asn Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys
  95                      100                      105                      110

```

```

ctc atc tca gaa gag gat ctg aat agc gcc gtc gac cat cat cat cat 385
Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His
      115                      120                      125

```

```

cat cat tga 394
His His

```

<210> 67

<211> 128

<212> PRT

<213> Artifizielle Sequenz

<400> 67

```

Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg
  1                      5                      10                      15

```

```

Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu Phe

```

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

<211> 394

<213> Artifizielle Sequenz

<223> Beschreibung der artifiziellen Sequenz: Hybrid-DNA

<221> CDS

<222> (8) .. (391)

ctc atc tca gaa gag gat ctg aat agc gcc gtc gac cat cat cat cat 385

Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His
 115 120 125

cat cat tga
 His His

394

<210> 69
 <211> 128
 <212> PRT
 <213> Artifizielle Sequenz

<400> 69

Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg
 1 5 10 15

Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu Phe
 20 25 30

Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser Val Tyr
 35 40 45

Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Met Asn Thr
 50 55 60

Ser Thr Ser Tyr Leu Ser Lys Thr Leu Phe Glu Ile Thr Val Pro Leu
 65 70 75 80

Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Leu Gln His Asn Lys
 85 90 95

Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys Leu Ile
 100 105 110

Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His
 115 120 125

<210> 70
 <211> 394
 <212> DNA
 <213> Artifizielle Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der artifiziiellen Sequenz: Hybrid-DNA

<220>

<221> CDS

<222> (8)..(391)

<400> 70

ggatcct ggg cag aat cat cac gaa gtg gtg aaa ttc atg gat gtc tat 49
 Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr
 1 5 10

cag cgc agc tac tgc cat ccg atc gag aca ctg gtg gac atc ttc cag 97
 Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln
 15 20 25 30

gaa ttt gga gtc gcg aca aac acc ttc ttc aag cca cca tgt gtg tcc 145
 Glu Phe Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser
 35 40 45

```

gtg tac aga tgt ggg ggt tgc tgc aat agt gag ggg ctg cag tgc gtt 193
Val Tyr Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys Val
      50              55              60

ccc acc gag gag tcc aac atc acc atg cag att atg aga att aca gtg 241
Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Thr Val
      65              70              75

cct ctc tct caa ggg ccc aaa cca gtg aca atc agc ttt ctc cag cat 289
Pro Leu Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Leu Gln His
      80              85              90

aac aaa tgt gaa tgt aga cca aag aaa gat ttg gtc ttc gaa caa aaa 337
Asn Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys
      95              100             105             110

ctc atc tca gaa gag gat ctg aat agc gcc gtc gac cat cat cat cat 385
Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His
      115             120             125

cat cat tga 394
His His

```

<210> 71
 <211> 128
 <212> PRT
 <213> Artifizielle Sequenz

```

<400> 71
Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg
  1              5              10              15

Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu Phe
      20              25              30

Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser Val Tyr
      35              40              45

Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys Val Pro Thr
      50              55              60

Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Thr Val Pro Leu
      65              70              75              80

Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Leu Gln His Asn Lys
      85              90              95

Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys Leu Ile
      100             105             110

Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His
      115             120             125

```

<210> 72
 <211> 394
 <212> DNA
 <213> Artifizielle Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der artifizuellen Sequenz: Hybrid-DNA

<220>

<221> CDS

<222> (8)..(391)

<400> 72

```

ggatcct ggg cag aat cat cac gaa gtg gtg aaa ttc atg gat gtc tat 49
      Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr
        1                      5                      10

cag cgc agc tac tgc cat ccg atc gag aca ctg gtg gac atc ttc cag 97
Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln
 15                      20                      25                      30

gaa ttt gga gtc gcg aca aac acc ttc ttc aag cca cca tgt gtg tcc 145
Glu Phe Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser
                      35                      40                      45

gtg tac aga tgt ggg ggt tgc tgc aat agt gag ggg ctg cag tgc atg 193
Val Tyr Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys Met
      50                      55                      60

aac acg tcc acg agc tac ctc agc aag acg ctg ttt gaa att aca gtg 241
Asn Thr Ser Thr Ser Tyr Leu Ser Lys Thr Leu Phe Glu Ile Thr Val
      65                      70                      75

cct ctc tct caa ggg ccc aaa cca gtg aca atc agc ttt ctc cag cat 289
Pro Leu Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Leu Gln His
      80                      85                      90

aac aaa tgt gaa tgt aga cca aag aaa gat ttg gtc ttc gaa caa aaa 337
Asn Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys
      95                      100                      105                      110

ctc atc tca gaa gag gat ctg aat agc gcc gtc gac cat cat cat cat 385
Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His
      115                      120                      125

cat cat tga 394
His His

```

<210> 73

<211> 128

<212> PRT

<213> Artifizielle Sequenz

<400> 73

```

Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg
 1                      5                      10                      15

Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu Phe
      20                      25                      30

Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser Val Tyr
      35                      40                      45

Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys Met Asn Thr
      50                      55                      60

Ser Thr Ser Tyr Leu Ser Lys Thr Leu Phe Glu Ile Thr Val Pro Leu
      65                      70                      75                      80

Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Leu Gln His Asn Lys

```

85

90

95

Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys Leu Ile
 100 105 110

Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His
 115 120 125

<210> 74

<211> 394

<212> DNA

<213> Artificielle Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der artifiziellen Sequenz: Hybrid-DNA

<220>

<221> CDS

<222> (8)..(391)

<400> 74

ggatcct ggg cag aat cat cac gaa gtg gtg aaa ttc atg gat gtc tat 49
 Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr
 1 5 10

cag cgc agc tac tgc cat ccg atc gag aca ctg gtg gac atc ttc cag 97
 Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln
 15 20 25 30

gaa ttt gga gtc gcg aca aac acc ttc ttc aag cca cca tgt gtg tcc 145
 Glu Phe Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser
 35 40 45

gtg tac aga tgt ggg ggt tgc tgc aat gac gaa ggg ctg gag tgc gtt 193
 Val Tyr Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val
 50 55 60

ccc acc gag gag tcc aac atc acc atg cag att atg aga att aca gtg 241
 Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Thr Val
 65 70 75

cct ctc tct caa ggg ccc aaa cca gtg aca atc agc ttt gcc aat cac 289
 Pro Leu Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Ala Asn His
 80 85 90

act tcc tgc cga tgc atg tct aag ctg aat ttg gtc ttc gaa caa aaa 337
 Thr Ser Cys Arg Cys Met Ser Lys Leu Asn Leu Val Phe Glu Gln Lys
 95 100 105 110

ctc atc tca gaa gag gat ctg aat agc gcc gtc gac cat cat cat cat 385
 Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His
 115 120 125

cat cat tga 394
 His His

<210> 75

<211> 128

<212> PRT

<213> Artifizielle Sequenz

<400> 75

Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg
 1 5 10 15

Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu Phe
 20 25 30

Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser Val Tyr
 35 40 45

Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val Pro Thr
 50 55 60

Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Thr Val Pro Leu
 65 70 75 80

Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Ala Asn His Thr Ser
 85 90 95

Cys Arg Cys Met Ser Lys Leu Asn Leu Val Phe Glu Gln Lys Leu Ile
 100 105 110

Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His
 115 120 125

<210> 76

<211> 328

<212> DNA

<213> Artifizielle Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der artifiziiellen Sequenz: Hybrid-DNA

<220>

<221> CDS

<222> (8)..(322)

<400> 76

ggatcct ggg cag aat cat cac gaa gtg gtg aaa ttc atg gat gtc tat 49
 Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr
 1 5 10

cag cgc agc tac tgc cat ccg atc gag aca ctg gtg gac atc ttc cag 97
 Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln
 15 20 25 30

gaa ttt gga gtc gcg aca aac acc ttc ttc aag cca cca tgt gtg tcc 145
 Glu Phe Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser
 35 40 45

gtg tac aga tgt ggg ggt tgc tgc aat gac gaa ggg ctg gag tgc atg 193
 Val Tyr Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Met
 50 55 60

aac acg tcc acg agc tac ctc agc aag acg ctg ttt gaa att aca gtg 241
 Asn Thr Ser Thr Ser Tyr Leu Ser Lys Thr Leu Phe Glu Ile Thr Val
 65 70 75

cct ctc tct caa ggg ccc aaa cca gtg aca atc agc ttt gcc aat cac 289
 Pro Leu Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Ala Asn His

80

85

90

act tcc tgc cga tgc atg tct aag ctg gat ttg gtcttc 328
 Thr Ser Cys Arg Cys Met Ser Lys Leu Asp Leu
 95 100 105

<210> 77

<211> 105

<212> PRT

<213> Artifizielle Sequenz

<400> 77

Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg
 1 5 10 15

Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu Phe
 20 25 30

Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser Val Tyr
 35 40 45

Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Met Asn Thr
 50 55 60

Ser Thr Ser Tyr Leu Ser Lys Thr Leu Phe Glu Ile Thr Val Pro Leu
 65 70 75 80

Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Ala Asn His Thr Ser
 85 90 95

Cys Arg Cys Met Ser Lys Leu Asp Leu
 100 105

<210> 78

<211> 394

<212> DNA

<213> Artifizielle Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der artifiziellen Sequenz: Hybrid-DNA

<220>

<221> CDS

<222> (8)..(391)

<400> 78

ggatcct ggg cag aat cat cac gaa gtg gtg aaa ttc atg gat gtc tat 49
 Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr
 1 5 10

cag cgc agc tac tgc cat ccg atc gag aca ctg gtg gac atc ttc cag 97
 Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln
 15 20 25 30

gaa ttt gga gtc gcg aca aac acc ttc ttc aag cca cca tgt gtg tcc 145
 Glu Phe Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser
 35 40 45

gtg tac aga tgt ggg ggt tgc tgc aat agt gag ggg ctg cag tgc gtt 193
 Val Tyr Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys Val
 50 55 60

```

ccc acc gag gag tcc aac atc acc atg cag att atg aga att aca gtg 241
Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Thr Val
      65              70              75

cct ctc tct caa ggg ccc aaa cca gtg aca atc agc ttt gcc aat cac 289
Pro Leu Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Ala Asn His
      80              85              90

act tcc tgc cga tgc atg tct aag ctg gat ttg gtc ttc gaa caa aaa 337
Thr Ser Cys Arg Cys Met Ser Lys Leu Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys
      95              100             105             110

ctc atc tca gaa gag gat ctg aat agc gcc gtc gac cat cat cat cat 385
Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His
      115             120             125

cat cat tga 394
His His

```

```

<210> 79
<211> 128
<212> PRT
<213> Artifizielle Sequenz

```

```

<400> 79
Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg
  1              5              10              15

Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu Phe
      20              25              30

Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser Val Tyr
      35              40              45

Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys Val Pro Thr
      50              55              60

Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Thr Val Pro Leu
      65              70              75              80

Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Ala Asn His Thr Ser
      85              90              95

Cys Arg Cys Met Ser Lys Leu Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys Leu Ile
      100             105             110

Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His
      115             120             125

```

```

<210> 80
<211> 392
<212> DNA
<213> Artifizielle Sequenz

```

```

<220>
<223> Beschreibung der artifiziiellen Sequenz: Hybrid-DNA

```

```

<220>
<221> CDS
<222> (8)..(169)

```

<400> 80

```

ggatcct ggg cag aat cat cac gaa gtg gtg aaa ttc atg gat gtc tat 49
      Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr
        1             5             10

```

```

cag cgc agc tac tgc cat ccg atc gag aca ctg gtg gac atc ttc cag 97
Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln
  15             20             25             30

```

```

gaa ttt gga gtc gcg aca aac acc ttc ttc aag cca cca tgt gtg tcc 145
Glu Phe Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser
          35             40             45

```

```

gtg tac aga tgt ggg ttg ctg caa tagtgagggg ctgcagtgca tgaacacgtc 199
Val Tyr Arg Cys Gly Leu Leu Gln
          50

```

```

cacgagctac ctcagcaaga cgctgtttga aattacagtg cctctctctc aagggcccaa 259
accagtgcaca atcagctttg ccaatcacac ttcctgccga tgcattgtcta agctggattt 319
ggctttcgaa caaaaactca tctcagaaga ggatctgaat agcgccgtcg accatcatca 379

```

```

tcatcatcat tga 392

```

<210> 81

<211> 54

<212> PRT

<213> Artifizielle Sequenz

<400> 81

```

Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg
  1             5             10             15

```

```

Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu Phe
          20             25             30

```

```

Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser Val Tyr
          35             40             45

```

```

Arg Cys Gly Leu Leu Gln
          50

```

<210> 82

<211> 391

<212> DNA

<213> Artifizielle Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der artifizuellen Sequenz: Hybrid-DNA

<220>

<221> CDS

<222> (8)..(388)

<400> 82

```

ggatcct ggg cag aat cat cac gaa gtg gtg aaa tot att gat aat gag 49
      Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Ser Ile Asp Asn Glu
        1             5             10

```

```

tgg aga aag act cag tgc atg ccg atc gag aca ctg gtg gac atc ttc 97

```

```

Trp Arg Lys Thr Gln Cys Met Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe
 15                20                25                30

cag gaa tac cct gat gag atc gag tac atc ttc aag cca tcc tgc gtg   145
Gln Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val
          35                40                45

ccc ctg atg aga tgt ggg ggt tgc tgc aat gac gaa ggg ctg gag tgc   193
Pro Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys
          50                55                60

gtt ccc acc gag gag tcc aac atc acc atg cag att atg aga att aaa   241
Val Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys
          65                70                75

cct cac caa ggg cag cac atc gga gag atg agc ttt ctc cag cat aac   289
Pro His Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn
          80                85                90

aaa tgt gaa tgt aga cca aag aaa gat ttg gtc ttc gaa caa aaa ctc   337
Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys Leu
          95                100                105                110

atc tca gaa gag gat ctg aat agc gcc gtc gac cat cat cat cat cat   385
Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His
          115                120                125

cat tga
His
                                                                    391

<210> 83
<211> 127
<212> PRT
<213> Artifizielle Sequenz

<400> 83
Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Ser Ile Asp Asn Glu Trp Arg
 1                5                10                15

Lys Thr Gln Cys Met Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu
          20                25                30

Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu
          35                40                45

Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val Pro
          50                55                60

Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His
          65                70                75                80

Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn Lys Cys
          85                90                95

Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys Leu Ile Ser
          100                105                110

Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His
          115                120                125

```

<210> 84
 <211> 391
 <212> DNA
 <213> Artifizielle Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der artifiziiellen Sequenz: Hybrid-DNA

<220>
 <221> CDS
 <222> (8)..(388)

<400> 84
 ggatcct ggg cag aat cat cac gaa gtg gtg aaa tct att gat aat gag 49
 Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Ser Ile Asp Asn Glu
 1 5 10

tgg aga aag act cag tgc atg ccg atc gag aca ctg gtg gac atc ttc 97
 Trp Arg Lys Thr Gln Cys Met Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe
 15 20 25 30

cag gaa tac cct gat gag atc gag tac atc ttc aag cca tcc tgc gtg 145
 Gln Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val
 35 40 45

ccc ctg atg aga tgt ggg ggt tgc tgc aat gac gaa ggg ctg gag tgc 193
 Pro Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys
 50 55 60

atg aac acg tcc acg agc tac ctc agc aag acg ctg ttt gaa att aaa 241
 Met Asn Thr Ser Thr Ser Tyr Leu Ser Lys Thr Leu Phe Glu Ile Lys
 65 70 75

cct cac caa ggg cag cac atc gga gag atg agc ttt ctc cag cat aac 289
 Pro His Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn
 80 85 90

aaa tgt gaa tgt aga cca aag aaa gat ttg gtc ttc gaa caa aaa ctc 337
 Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys Leu
 95 100 105 110

atc tca gaa gag gat ctg aat agc gcc gtc gac cat cat cat cat cat 385
 Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His
 115 120 125

cat tga 391
 His

<210> 85
 <211> 127
 <212> PRT
 <213> Artifizielle Sequenz

<400> 85
 Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Ser Ile Asp Asn Glu Trp Arg
 1 5 10 15

Lys Thr Gln Cys Met Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu
 20 25 30

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

<210> 86

<211> 391

<212> DNA

<213> Artifizielle Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der artifiziiellen Sequenz: Hybrid-DNA

<220>

<221> CDS

<222> (8)..(388)

<400> 86

ggatcct ggg cag aat cat cac gaa gtg gtg aaa tct att gat aat gag 49
 Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Ser Ile Asp Asn Glu
 1 5 10

tgg aga aag act cag tgc atg ccg atc gag aca ctg gtg gac atc ttc 97
 Trp Arg Lys Thr Gln Cys Met Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe
 15 20 25 30

cag gaa tac cct gat gag atc gag tac atc ttc aag cca tcc tgc gtg 145
 Gln Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val
 35 40 45

ccc ctg atg aga tgt ggg ggt tgc tgc aat agt gag ggg ctg cag tgc 193
 Pro Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys
 50 55 60

gtt ccc acc gag gag tcc aac atc acc atg cag att atg aga att aaa 241
 Val Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys
 65 70 75

cct cac caa ggg cag cac atc gga gag atg agc ttt ctc cag cat aac 289
 Pro His Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn
 80 85 90

aaa tgt gaa tgt aga cca aag aaa gat ttg gtc ttc gaa caa aaa ctc 337
 Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys Leu
 95 100 105 110

atc tca gaa gag gat ctg aat agc gcc gtc gac cat cat cat cat cat 385
 Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His
 115 120 125

cat tga
His

391

<210> 87
<211> 127
<212> PRT
<213> Artifizielle Sequenz

<400> 87
Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Ser Ile Asp Asn Glu Trp Arg
1 5 10 15
Lys Thr Gln Cys Met Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu
20 25 30
Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu
35 40 45
Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys Val Pro
50 55 60
Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His
65 70 75 80
Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn Lys Cys
85 90 95
Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys Leu Ile Ser
100 105 110
Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His
115 120 125

<210> 88
<211> 391
<212> DNA
<213> Artifizielle Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der artifiziiellen Sequenz: Hybrid-DNA

<220>
<221> CDS
<222> (8)..(388)

<400> 88
ggatcct ggg cag aat cat cac gaa gtg gtg aaa tct att gat aat gag 49
Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Ser Ile Asp Asn Glu
1 5 10
tgg aga aag act cag tgc atg ccg atc gag aca ctg gtg gac atc ttc 97
Trp Arg Lys Thr Gln Cys Met Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe
15 20 25 30
cag gaa tac cct gat gag atc gag tac atc ttc aag cca tcc tgc gtg 145
Gln Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val
35 40 45
ccc ctg atg aga tgt ggg ggt tgc tgc aat agt gag ggg ctg cag tgc 193
Pro Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys

50	55	60	
atg aac acg tcc acg agc tac ctc agc aag acg ctg ttt gaa att aaa			241
Met Asn Thr Ser Thr Ser Tyr Leu Ser Lys Thr Leu Phe Glu Ile Lys			
65	70	75	
cct cac caa ggg cag cac atc gga gag atg agc ttt ctc cag cat aac			289
Pro His Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn			
80	85	90	
aaa tgt gaa tgt aga cca aag aaa gat ttg gtc ttc gaa caa aaa ctc			337
Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys Leu			
95	100	105	110
atc tca gaa gag gat ctg aat agc gcc gtc gac cat cat cat cat cat			385
Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His			
115	120	125	
cat tga			391
His			

<210> 89

<211> 127

<212> PRT

<213> Artifizielle Sequenz

<400> 89

Gly	Gln	Asn	His	His	Glu	Val	Val	Lys	Ser	Ile	Asp	Asn	Glu	Trp	Arg
1				5				10						15	

Lys	Thr	Gln	Cys	Met	Pro	Ile	Glu	Thr	Leu	Val	Asp	Ile	Phe	Gln	Glu
		20						25					30		

Tyr	Pro	Asp	Glu	Ile	Glu	Tyr	Ile	Phe	Lys	Pro	Ser	Cys	Val	Pro	Leu
		35					40					45			

Met	Arg	Cys	Gly	Gly	Cys	Cys	Asn	Ser	Glu	Gly	Leu	Gln	Cys	Met	Asn
	50					55					60				

Thr	Ser	Thr	Ser	Tyr	Leu	Ser	Lys	Thr	Leu	Phe	Glu	Ile	Lys	Pro	His
65					70					75				80	

Gln	Gly	Gln	His	Ile	Gly	Glu	Met	Ser	Phe	Leu	Gln	His	Asn	Lys	Cys
			85						90					95	

Glu	Cys	Arg	Pro	Lys	Lys	Asp	Leu	Val	Phe	Glu	Gln	Lys	Leu	Ile	Ser
			100					105					110		

Glu	Glu	Asp	Leu	Asn	Ser	Ala	Val	Asp	His	His	His	His	His	His	His
		115					120				125				

<210> 90

<211> 391

<212> DNA

<213> Artifizielle Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der artifizuellen Sequenz: Hybrid-DNA

<220>

<221> CDS

<222> (8)..(388)

<400> 90

```

ggatcct ggg cag aat cat cac gaa gtg gtg aaa tct att gat aat gag 49
      Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Ser Ile Asp Asn Glu
        1              5              10

tgg aga aag act cag tgc atg ccg atc gag aca ctg gtg gac atc ttc 97
Trp Arg Lys Thr Gln Cys Met Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe
  15              20              25              30

cag gaa tac cct gat gag atc gag tac atc ttc aag cca tcc tgc gtg 145
Gln Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val
      35              40              45

ccc ctg atg aga tgt ggg ggt tgc tgc aat gac gaa ggg ctg gag tgc 193
Pro Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys
      50              55              60

gtt ccc acc gag gag tcc aac atc acc atg cag att atg aga att aaa 241
Val Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys
      65              70              75

cct cac caa ggg cag cac atc gga gag atg agc ttt gcc aat cac act 289
Pro His Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Ala Asn His Thr
      80              85              90

tcc tgc cga tgc atg tct aag ctg gat ttg gtc ttc gaa caa aaa ctc 337
Ser Cys Arg Cys Met Ser Lys Leu Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys Leu
  95              100              105              110

atc tca gaa gag gat ctg aat agc gcc gtc gac cat cat cat cat cat 385
Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His
      115              120              125

cat tga 391
His

```

<210> 91

<211> 127

<212> PRT

<213> Artifizielle Sequenz

<400> 91

```

Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Ser Ile Asp Asn Glu Trp Arg
  1              5              10              15

Lys Thr Gln Cys Met Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu
      20              25              30

Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu
      35              40              45

Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val Pro
      50              55              60

Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His
      65              70              75              80

Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Ala Asn His Thr Ser Cys
      85              90              95

```

Arg Cys Met Ser Lys Leu Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys Leu Ile Ser
 100 105 110

Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His
 115 120 125

<210> 92

<211> 391

<212> DNA

<213> Artifizielle Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der artifiziiellen Sequenz: Hybrid-DNA

<220>

<221> CDS

<222> (8)..(388)

<400> 92

```

ggatcct ggg cag aat cat cac gaa gtg gtg aaa tct att gat aat gag 49
      Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Ser Ile Asp Asn Glu
        1             5             10

tgg aga aag act cag tgc atg ccg atc gag aca ctg gtg gac atc ttc 97
Trp Arg Lys Thr Gln Cys Met Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe
  15             20             25             30

cag gaa tac cct gat gag atc gag tac atc ttc aag cca tcc tgc gtg 145
Gln Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val
             35             40             45

ccc ctg atg aga tgt ggg ggt tgc tgc aat gac gaa ggg ctg gag tgc 193
Pro Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys
             50             55             60

atg aac acg tcc acg agc tac ctc agc aag acg ctg ttt gaa att aaa 241
Met Asn Thr Ser Thr Ser Tyr Leu Ser Lys Thr Leu Phe Glu Ile Lys
      65             70             75

cct cac caa ggg cag cac atc gga gag atg agc ttt gcc aat cac act 289
Pro His Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Ala Asn His Thr
      80             85             90

tcc tgc cga tgc atg tct aag ctg gat ttg gtc ttc gaa caa aaa ctc 337
Ser Cys Arg Cys Met Ser Lys Leu Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys Leu
  95             100             105             110

atc tca gaa gag gat ctg aat agc gcc gtc gac cat cat cat cat cat 385
Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His
             115             120             125

cat tga 391
His

```

<210> 93

<211> 127

<212> PRT

<213> Artifizielle Sequenz

<400> 93

Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Ser Ile Asp Asn Glu Trp Arg

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

<210> 94

<211> 391

<212> DNA

<213> Artifizielle Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der artifiziellen Sequenz: Hybrid-DNA

<220>

<221> CDS

<222> (8)..(388)

<400> 94

ggatcct ggg cag aat cat cac gaa gtg gtg aaa tct att gat aat gag	49
Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Ser Ile Asp Asn Glu	
1 5 10	
tgg aga aag act cag tgc atg ccg atc gag aca ctg gtg gac atc ttc	97
Trp Arg Lys Thr Gln Cys Met Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe	
15 20 25 30	
cag gaa tac cct gat gag atc gag tac atc ttc aag cca tcc tgc gtg	145
Gln Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val	
35 40 45	
ccc ctg atg aga tgt ggg ggt tgc tgc aat agt gag ggg ctg cag tgc	193
Pro Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys	
50 55 60	
gtt ccc acc gag gag tcc aac atc acc atg cag att atg aga att aaa	241
Val Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys	
65 70 75	
cct cac caa ggg cag cac atc gga gag atg agc ttt gcc aat cac act	289
Pro His Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Ala Asn His Thr	
80 85 90	
tcc tgc cga tgc atg tct aag ctg gat ttg gtc ttc gaa caa aaa ctc	337

```

Ser Cys Arg Cys Met Ser Lys Leu Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys Leu
 95                      100                      105                      110

atc tca gaa gag gat ctg aat agc gcc gtc gac cat cat cat cat cat 385
Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His
                      115                      120                      125

cat tga 391
His

```

```

<210> 95
<211> 127
<212> PRT
<213> Artificielle Sequenz

```

```

<400> 95
Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Ser Ile Asp Asn Glu Trp Arg
 1                      5                      10                      15

Lys Thr Gln Cys Met Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu
                20                      25                      30

Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu
                35                      40                      45

Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys Val Pro
 50                      55                      60

Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His
 65                      70                      75                      80

Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Ala Asn His Thr Ser Cys
                85                      90                      95

Arg Cys Met Ser Lys Leu Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys Leu Ile Ser
                100                      105                      110

Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His
 115                      120                      125

```

```

<210> 96
<211> 391
<212> DNA
<213> Artificielle Sequenz

```

```

<220>
<223> Beschreibung der artifiziellen Sequenz: Hybrid-DNA

```

```

<220>
<221> CDS
<222> (8)..(388)

```

```

<400> 96
ggatcct ggg cag aat cat cac gaa gtg gtg aaa tct att gat aat gag 49
      Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Ser Ile Asp Asn Glu
        1                      5                      10

tgg aga aag act cag tgc atg ccg atc gag aca ctg gtg gac atc ttc 97
Trp Arg Lys Thr Gln Cys Met Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe
 15                      20                      25                      30

```

cag gaa tac cct gat gag atc gag tac atc ttc aag cca tcc tgc gtg 145
 Gln Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val
 35 40 45

ccc ctg atg aga tgt ggg ggt tgc tgc aat agt gag ggg ctg cag tgc 193
 Pro Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys
 50 55 60

atg aac acg tcc acg agc tac ctc agc aag acg ctg ttt gaa att aaa 241
 Met Asn Thr Ser Thr Ser Tyr Leu Ser Lys Thr Leu Phe Glu Ile Lys
 65 70 75

cct cac caa ggg cag cac atc gga gag atg agc ttt gcc aat cac act 289
 Pro His Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Ala Asn His Thr
 80 85 90

tcc tgc cga tgc atg tct aag ctg gat ttg gtc ttc gaa caa aaa ctc 337
 Ser Cys Arg Cys Met Ser Lys Leu Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys Leu
 95 100 105 110

atc tca gaa gag gat ctg aat agc gcc gtc gac cat cat cat cat cat 385
 Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His
 115 120 125

cat tga 391
 His

<210> 97

<211> 127

<212> PRT

<213> Artifizielle Sequenz

<400> 97

Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Ser Ile Asp Asn Glu Trp Arg
 1 5 10 15

Lys Thr Gln Cys Met Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu
 20 25 30

Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu
 35 40 45

Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys Met Asn
 50 55 60

Thr Ser Thr Ser Tyr Leu Ser Lys Thr Leu Phe Glu Ile Lys Pro His
 65 70 75 80

Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Ala Asn His Thr Ser Cys
 85 90 95

Arg Cys Met Ser Lys Leu Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys Leu Ile Ser
 100 105 110

Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His
 115 120 125

<210> 98

<211> 397

<212> DNA

<213> Artifizielle Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der artifiziellen Sequenz: Hybrid-DNA

<220>

<221> CDS

<222> (8)..(394)

<400> 98

```

ggatcct ggg cag aat cat cac gaa gtg gtg aaa tct att gat aat gag    49
      Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Ser Ile Asp Asn Glu
        1                5                10

tgg aga aag act cag tgc atg ccg atc gag aca ctg gtg gac atc ttc    97
Trp Arg Lys Thr Gln Cys Met Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe
  15                20                25                30

cag gaa tac cct gat gag atc gag tac atc ttc aag cca tcc tgc gtg    145
Gln Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val
      35                40                45

ccc ctg atg aga tgt ggg ggt tgc tgc aat gac gaa ggg ctg gag tgc    193
Pro Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys
      50                55                60

gtt ccc acc gag gag tcc aac atc acc atg cag att atg aga att aca    241
Val Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Thr
      65                70                75

gtg cct ctc tct caa ggg ccc aaa cca gtg aca atc agc ttt ctc cag    289
Val Pro Leu Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Leu Gln
      80                85                90

cat aac aaa tgt gaa tgt aga cca aag aaa gat ttg gtc ttc gaa caa    337
His Asn Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Leu Val Phe Glu Gln
      95                100                105                110

aaa ctc atc tca gaa gag gat ctg aat agc gcc gtc gac cat cat cat    385
Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His
      115                120                125

cat cat cat tga    397
His His His

```

<210> 99

<211> 129

<212> PRT

<213> Artifizielle Sequenz

<400> 99

```

Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Ser Ile Asp Asn Glu Trp Arg
  1                5                10                15

Lys Thr Gln Cys Met Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu
      20                25                30

Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu
      35                40                45

Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val Pro
      50                55                60

```

```

Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Thr Val Pro
65                               70                               75                               80

Leu Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Leu Gln His Asn
                               85                               90                               95

Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys Leu
                               100                            105                            110

Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His
115                               120                               125

```

His

<210> 100
 <211> 397
 <212> DNA
 <213> Artifizielle Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der artifiziellen Sequenz: Hybrid-DNA

<220>
 <221> CDS
 <222> (8)..(394)

```

<400> 100
ggatcct ggg cag aat cat cac gaa gtg gtg aaa tct att gat aat gag 49
      Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Ser Ile Asp Asn Glu
      1                               5                               10

tgg aga aag act cag tgc atg ccg atc gag aca ctg gtg gac atc ttc 97
Trp Arg Lys Thr Gln Cys Met Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe
15                               20                               25                               30

cag gaa tac cct gat gag atc gag tac atc ttc aag cca tcc tgc gtg 145
Gln Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val
                               35                               40                               45

ccc ctg atg aga tgt ggg ggt tgc tgc aat gac gaa ggg ctg gag tgc 193
Pro Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys
                               50                               55                               60

atg aac acg tcc acg agc tac ctc agc aag acg ctg ttt gaa att aca 241
Met Asn Thr Ser Thr Ser Tyr Leu Ser Lys Thr Leu Phe Glu Ile Thr
65                               70                               75

gtg cct ctc tct caa ggg ccc aaa cca gtg aca atc agc ttt ctc cag 289
Val Pro Leu Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Leu Gln
80                               85                               90

cat aac aaa tgt gaa tgt aga cca aag aaa gat ttg gtc ttc gaa caa 337
His Asn Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Leu Val Phe Glu Gln
95                               100                            105                            110

aaa ctc atc tca gaa gag gat ctg aat agc gcc gtc gac cat cat cat 385
Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His
115                               120                               125

cat cat cat tga 397
His His His

```

<210> 101
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> Artifizielle Sequenz

<400> 101
 Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Ser Ile Asp Asn Glu Trp Arg
 1 5 10 15
 Lys Thr Gln Cys Met Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu
 20 25 30
 Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu
 35 40 45
 Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Met Asn
 50 55 60
 Thr Ser Thr Ser Tyr Leu Ser Lys Thr Leu Phe Glu Ile Thr Val Pro
 65 70 75 80
 Leu Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Leu Gln His Asn
 85 90 95
 Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys Leu
 100 105 110
 Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His
 115 120 125
 His

<210> 102
 <211> 397
 <212> DNA
 <213> Artifizielle Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der artifiziiellen Sequenz: Hybrid-DNA

<220>
 <221> CDS
 <222> (8)..(394)

<400> 102
 ggatcct ggg cag aat cat cac gaa gtg gtg aaa tct att gat aat gag 49
 Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Ser Ile Asp Asn Glu
 1 5 10
 tgg aga aag act cag tgc atg ccg atc gag aca ctg gtg gac atc ttc 97
 Trp Arg Lys Thr Gln Cys Met Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe
 15 20 25 30
 cag gaa tac cct gat gag atc gag tac atc ttc aag cca tcc tgc gtg 145
 Gln Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val
 35 40 45
 ccc ctg atg aga tgt ggg ggt tgc tgc aat agt gag ggg ctg cag tgc 193
 Pro Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys
 50 55 60

gtt ccc acc gag gag tcc aac atc acc atg cag att atg aga att aca 241
 Val Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Thr
 65 70 75

gtg cct ctc tct caa ggg ccc aaa cca gtg aca atc agc ttt ctc cag 289
 Val Pro Leu Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Leu Gln
 80 85 90

cat aac aaa tgt gaa tgt aga cca aag aaa gat ttg gtc ttc gaa caa 337
 His Asn Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Leu Val Phe Glu Gln
 95 100 105 110

aaa ctc atc tca gaa gag gat ctg aat agc gcc gtc gac cat cat cat 385
 Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His
 115 120 125

cat cat cat tga 397
 His His His

<210> 103

<211> 129

<212> PRT

<213> Artifizielle Sequenz

<400> 103

Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Ser Ile Asp Asn Glu Trp Arg
 1 5 10 15

Lys Thr Gln Cys Met Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu
 20 25 30

Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu
 35 40 45

Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys Val Pro
 50 55 60

Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Thr Val Pro
 65 70 75 80

Leu Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Leu Gln His Asn
 85 90 95

Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys Leu
 100 105 110

Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His
 115 120 125

His

<210> 104

<211> 397

<212> DNA

<213> Artifizielle Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der artifiziiellen Sequenz: Hybrid-DNA

<220>

<221> CDS

<222> (8)..(394)

<400> 104

```

ggatcct ggg cag aat cat cac gaa gtg gtg aaa tct att gat aat gag 49
      Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Ser Ile Asp Asn Glu
        1                      5                      10

tgg aga aag act cag tgc atg ccg atc gag aca ctg gtg gac atc ttc 97
Trp Arg Lys Thr Gln Cys Met Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe
  15                      20                      25                      30

cag gaa tac cct gat gag atc gag tac atc ttc aag cca tcc tgc gtg 145
Gln Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val
      35                      40                      45

ccc ctg atg aga tgt ggg ggt tgc tgc aat agt gag ggg ctg cag tgc 193
Pro Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys
      50                      55                      60

atg aac acg tcc acg agc tac ctc agc aag acg ctg ttt gaa att aca 241
Met Asn Thr Ser Thr Ser Tyr Leu Ser Lys Thr Leu Phe Glu Ile Thr
      65                      70                      75

gtg cct ctc tct caa ggg ccc aaa cca gtg aca atc agc ttt ctc cag 289
Val Pro Leu Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Leu Gln
      80                      85                      90

cat aac aaa tgt gaa tgt aga cca aag aaa gat ttg gtc ttc gaa caa 337
His Asn Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Leu Val Phe Glu Gln
      95                      100                      105                      110

aaa ctc atc tca gaa gag gat ctg aat agc gcc gtc gac cat cat cat 385
Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His
      115                      120                      125

cat cat cat tga 397
His His His

```

<210> 105

<211> 129

<212> PRT

<213> Artifizielle Sequenz

<400> 105

```

Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Ser Ile Asp Asn Glu Trp Arg
  1                      5                      10                      15

Lys Thr Gln Cys Met Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu
      20                      25                      30

Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu
      35                      40                      45

Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys Met Asn
      50                      55                      60

Thr Ser Thr Ser Tyr Leu Ser Lys Thr Leu Phe Glu Ile Thr Val Pro
      65                      70                      75                      80

Leu Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Leu Gln His Asn
      85                      90                      95

```

Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys Leu
 100 105 110

Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His
 115 120 125

His

<210> 106

<211> 397

<212> DNA

<213> Artificielle Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der artifiziellen Sequenz: Hybrid-DNA

<220>

<221> CDS

<222> (8)..(394)

<400> 106

ggatcct ggg cag aat cat cac gaa gtg gtg aaa tct att gat aat gag 49
 Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Ser Ile Asp Asn Glu
 1 5 10

tgg aga aag act cag tgc atg ccg atc gag aca ctg gtg gac atc ttc 97
 Trp Arg Lys Thr Gln Cys Met Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe
 15 20 25 30

cag gaa tac cct gat gag atc gag tac atc ttc aag cca tcc tgc gtg 145
 Gln Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val
 35 40 45

ccc ctg atg aga tgt ggg ggt tgc tgc aat gac gaa ggg ctg gag tgc 193
 Pro Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys
 50 55 60

gtt ccc acc gag gag tcc aac atc acc atg cag att atg aga att aca 241
 Val Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Thr
 65 70 75

gtg cct ctc tct caa ggg ccc aaa cca gtg aca atc agc ttt gcc aat 289
 Val Pro Leu Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Ala Asn
 80 85 90

cac act tcc tgc cga tgc atg tct aag ctg gat ttg gtc ttc gaa caa 337
 His Thr Ser Cys Arg Cys Met Ser Lys Leu Asp Leu Val Phe Glu Gln
 95 100 105 110

aaa ctc atc tca gaa gag gat ctg aat agc gcc gtc gac cat cat cat 385
 Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His
 115 120 125

cat cat cat tga 397
 His His His

<210> 107

<211> 129

<212> PRT

<213> Artificielle Sequenz

<400> 107

```

Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Ser Ile Asp Asn Glu Trp Arg
 1             5             10             15

Lys Thr Gln Cys Met Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu
      20             25             30

Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu
      35             40             45

Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val Pro
      50             55             60

Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Thr Val Pro
      65             70             75             80

Leu Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Ala Asn His Thr
      85             90             95

Ser Cys Arg Cys Met Ser Lys Leu Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys Leu
      100            105            110

Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His
      115            120            125

```

His

<210> 108

<211> 397

<212> DNA

<213> Artifizielle Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der artifiziellen Sequenz: Hybrid-DNA

<220>

<221> CDS

<222> (8)..(394)

<400> 108

```

ggatcct ggg cag aat cat cac gaa gtg gtg aaa tct att gat aat gag      49
      Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Ser Ile Asp Asn Glu
      1             5             10

tgg aga aag act cag tgc atg ccg atc gag aca ctg gtg gac atc ttc      97
Trp Arg Lys Thr Gln Cys Met Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe
      15             20             25             30

cag gaa tac cct gat gag atc gag tac atc ttc aag cca tcc tgc gtg      145
Gln Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val
      35             40             45

ccc ctg atg aga tgt ggg ggt tgc tgc aat gac gaa ggg ctg gag tgc      193
Pro Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys
      50             55             60

atg aac acg tcc acg agc tac ctc agc aag acg ctg ttt gaa att aca      241
Met Asn Thr Ser Thr Ser Tyr Leu Ser Lys Thr Leu Phe Glu Ile Thr
      65             70             75

gtg cct ctc tct caa ggg ccc aaa cca gtg aca atc agc ttt gcc aat      289
Val Pro Leu Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Ala Asn

```

80	85	90	
cac act tcc tgc cga tgc atg tct aag ctg gat ttg gtc ttc gaa caa			337
His Thr Ser Cys Arg Cys Met Ser Lys Leu Asp Leu Val Phe Glu Gln			
95	100	105	110
aaa ctc atc tca gaa gag gat ctg aat agc gcc gtc gac cat cat cat			385
Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His			
	115	120	125
cat cat cat tga			397
His His His			

<210> 109
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> Artifizielle Sequenz

<400> 109
 Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Ser Ile Asp Asn Glu Trp Arg
 1 5 10 15
 Lys Thr Gln Cys Met Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu
 20 25 30
 Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu
 35 40 45
 Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Met Asn
 50 55 60
 Thr Ser Thr Ser Tyr Leu Ser Lys Thr Leu Phe Glu Ile Thr Val Pro
 65 70 75 80
 Leu Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Ala Asn His Thr
 85 90 95
 Ser Cys Arg Cys Met Ser Lys Leu Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys Leu
 100 105 110
 Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His
 115 120 125
 His

<210> 110
 <211> 397
 <212> DNA
 <213> Artifizielle Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der artifiziiellen Sequenz: Hybrid-DNA

<220>
 <221> CDS
 <222> (8)..(394)

<400> 110
 ggatcct ggg cag aat cat cac gaa gtg gtg aaa tct att gat aat gag 49

DE 601 31 146 T2 2008.03.06

[illegible]

<211> 129

<213> Art

Gly Gln A

Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Ser Ile Asp Asn Glu Trp Arg
1 5 10 15

Lys Thr Gln Cys Met Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu
20 25 30

Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu
35 40 45

Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys Val Pro
50 55 60

Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Thr Val Pro
65 70 75 80

Leu Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Ala Asn His Thr
85 90 95

Ser Cys Arg Cys Met Ser Lys Leu Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys Leu
100 105 110

Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His

115

120

125

His

<210> 112

<211> 397

<212> DNA

<213> Artifizielle Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der artifizuellen Sequenz: Hybrid-DNA

<220>

<221> CDS

<222> (8)..(394)

<400> 112

```

ggatcct ggg cag aat cat cac gaa gtg gtg aaa tct att gat aat gag 49
      Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Ser Ile Asp Asn Glu
        1                      5                      10

tgg aga aag act cag tgc atg ccg atc gag aca ctg gtg gac atc ttc 97
Trp Arg Lys Thr Gln Cys Met Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe
  15                      20                      25                      30

cag gaa tac cct gat gag atc gag tac atc ttc aag cca tcc tgc gtg 145
Gln Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val
          35                      40                      45

ccc ctg atg aga tgt ggg ggt tgc tgc aat agt gag ggg ctg cag tgc 193
Pro Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys
          50                      55                      60

atg aac acg tcc acg agc tac ctc agc aag acg ctg ttt gaa att aca 241
Met Asn Thr Ser Thr Ser Tyr Leu Ser Lys Thr Leu Phe Glu Ile Thr
        65                      70                      75

gtg cct ctc tct caa ggg ccc aaa cca gtg aca atc agc ttt gcc aat 289
Val Pro Leu Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Ala Asn
      80                      85                      90

cac act tcc tgc cga tgc atg tct aag ctg gat ttg gtc ttc gaa caa 337
His Thr Ser Cys Arg Cys Met Ser Lys Leu Asp Leu Val Phe Glu Gln
      95                      100                      105                      110

aaa ctc atc tca gaa gag gat ctg aat agc gcc gtc gac cat cat cat 385
Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His
          115                      120                      125

cat cat cat tga 397
His His His

```

<210> 113

<211> 129

<212> PRT

<213> Artifizielle Sequenz

<400> 113

```

Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Ser Ile Asp Asn Glu Trp Arg
  1                      5                      10                      15

```

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

His

<210> 114
 <211> 1645
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (322)..(768)

<220>

<400> 114
 gggattcggg cgcgccagct acgggaggac ctggagtggc actgggcgcc cgacggacca 60
 tccccgggac cgcctgccc ctgcggccc cgccccgccg ggccgctccc cgtcgggttc 120
 cccagccaca gccttaccta cgggctcctg actccgcaag gcttccagaa gatgctcgaa 180
 ccaccggccg gggcctcggg gcagcagtga gggaggcgtc cagcccccca ctcagctctt 240
 ctctctctgt gccaggggct ccccggggga tgagcatggt ggttttccct cggagcccc 300
 tggctcggga cgtctgagaa g atg ccg gtc atg agg ctg ttc cct tgc ttc 351
 Met Pro Val Met Arg Leu Phe Pro Cys Phe
 1 5 10
 ctg cag ctc ctg gcc ggg ctg gcg ctg cct gct gtg ccc ccc cag cag 399
 Leu Gln Leu Leu Ala Gly Leu Ala Leu Pro Ala Val Pro Pro Gln Gln
 15 20 25
 tgg gcc ttg tct gct ggg aac ggc tcg tca gag gtg gaa gtg gta ccc 447
 Trp Ala Leu Ser Ala Gly Asn Gly Ser Ser Glu Val Glu Val Val Pro
 30 35 40
 ttc cag gaa gtg tgg ggc cgc agc tac tgc cgg gcg ctg gag agg ctg 495
 Phe Gln Glu Val Trp Gly Arg Ser Tyr Cys Arg Ala Leu Glu Arg Leu
 45 50 55

```

gtg gac gtc gtg tcc gag tac ccc agc gag gtg gag cac atg ttc agc 543
Val Asp Val Val Ser Glu Tyr Pro Ser Glu Val Glu His Met Phe Ser
    60                65                70

cca tcc tgt gtc tcc ctg ctg cgc tgc acc ggc tgc tgc ggc gat gag 591
Pro Ser Cys Val Ser Leu Leu Arg Cys Thr Gly Cys Cys Gly Asp Glu
    75                80                85                90

aat ctg cac tgt gtg ccg gtg gag acg gcc aat gtc acc atg cag ctc 639
Asn Leu His Cys Val Pro Val Glu Thr Ala Asn Val Thr Met Gln Leu
                95                100                105

cta aag atc cgt tct ggg gac cgg ccc tcc tac gtg gag ctg acg ttc 687
Leu Lys Ile Arg Ser Gly Asp Arg Pro Ser Tyr Val Glu Leu Thr Phe
                110                115                120

tct cag cac gtt cgc tgc gaa tgc cgg cct ctg cgg gag aag atg aag 735
Ser Gln His Val Arg Cys Glu Cys Arg Pro Leu Arg Glu Lys Met Lys
                125                130                135

ccg gaa agg tgc ggc gat gct gtt ccc cgg agg taaccacccc cttggaggag 788
Pro Glu Arg Cys Gly Asp Ala Val Pro Arg Arg
    140                145

agagacccccg caccgggctc gtgtatttat taccgtcaca ctcttcagtg actcctgctg 848

gtacctgccc tctatttatt agccaactgt ttccctgctg aatgcctcgc tcccttcaag 908

acgagggggca gggaaggaca ggaccctcag gaattcagtg ccttcaacaa cgtgagagaa 968

agagagaagc cagccacaga cccctgggag cttccgcttt gaaagaagca agacacgtgg 1028

cctcgtgagg ggcaagctag gcccagagg ccctggaggt ctccaggggc ctgcagaagg 1088

aaagaagggg gccctgctac ctgttcttg gctcaggct ctgcacagac aagcagccct 1148

tgctttcgga gctcctgtcc aaagtaggga tgcggtattct gctggggccg ccacggcctg 1208

gtggtgggaa ggccggcagc gggcggaggg gattcagcca cttccccctc ttcttctgaa 1268

gatcagaaca ttcagctctg gagaacagtg gttgcctggg ggcttttgcc actccttgtc 1328

ccccgtgatc tcccctcaca ctttgccatt tgcttgctact gggacattgt tctttccggc 1388

cgaggtgcca ccacctgcc ccactaaga gacacataca gagtgggccc cgggctggag 1448

aaagagctgc ctggatgaga aacagctcag ccagtgggga tgaggtcacc aggggaggag 1508

cctgtgcgtc ccagctgaag gcagtggcag gggagcaggt tccccaaggg ccctggcacc 1568

cccacaagct gtccctgcag ggccatctga ctgccaaagg agattctctt gaataaagta 1628

ttctagtgtg gaaacgc
                1645

<210> 115
<211> 149
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 115

```

```

Met Pro Val Met Arg Leu Phe Pro Cys Phe Leu Gln Leu Leu Ala Gly
 1              5              10              15

Leu Ala Leu Pro Ala Val Pro Pro Gln Gln Trp Ala Leu Ser Ala Gly
      20              25              30

Asn Gly Ser Ser Glu Val Glu Val Val Pro Phe Gln Glu Val Trp Gly
      35              40              45

Arg Ser Tyr Cys Arg Ala Leu Glu Arg Leu Val Asp Val Val Ser Glu
      50              55              60

Tyr Pro Ser Glu Val Glu His Met Phe Ser Pro Ser Cys Val Ser Leu
      65              70              75              80

Leu Arg Cys Thr Gly Cys Cys Gly Asp Glu Asn Leu His Cys Val Pro
      85              90              95

Val Glu Thr Ala Asn Val Thr Met Gln Leu Leu Lys Ile Arg Ser Gly
      100             105             110

Asp Arg Pro Ser Tyr Val Glu Leu Thr Phe Ser Gln His Val Arg Cys
      115             120             125

Glu Cys Arg Pro Leu Arg Glu Lys Met Lys Pro Glu Arg Cys Gly Asp
      130             135             140

Ala Val Pro Arg Arg
145

```

```

<210> 116
<211> 570
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<221> CDS
<222> (4)..(570)

```

```

<400> 116
acc atg agc cct ctg ctc cgc cgc ctg ctg ctc gcc gca ctc ctg cag 48
    Met Ser Pro Leu Leu Arg Arg Leu Leu Leu Ala Ala Leu Leu Gln
      1              5              10              15

ctg gcc ccc gcc cag gcc cct gtc tcc cag cct gat gcc cct ggc cac 96
Leu Ala Pro Ala Gln Ala Pro Val Ser Gln Pro Asp Ala Pro Gly His
      20              25              30

cag agg aaa gtg gtg tca tgg ata gat gtg tat act cgc gct acc tgc 144
Gln Arg Lys Val Val Ser Trp Ile Asp Val Tyr Thr Arg Ala Thr Cys
      35              40              45

cag ccc cgg gag gtg gtg gtg ccc ttg act gtg gag ctc atg ggc acc 192
Gln Pro Arg Glu Val Val Val Pro Leu Thr Val Glu Leu Met Gly Thr
      50              55              60

gtg gcc aaa cag ctg gtg ccc agc tgc gtg act gtg cag cgc tgt ggt 240
Val Ala Lys Gln Leu Val Pro Ser Cys Val Thr Val Gln Arg Cys Gly
      65              70              75

ggc tgc tgc cct gac gat ggc ctg gag tgt gtg ccc act ggg cag cac 288
Gly Cys Cys Pro Asp Asp Gly Leu Glu Cys Val Pro Thr Gly Gln His

```

80	85	90	95	
caa gtc cgg atg	cag atc ctc atg atc	cgg tac ccg agc agt	cag ctg	336
Gln Val Arg Met	Gln Ile Leu Met Ile	Arg Tyr Pro Ser Ser	Gln Leu	
	100	105	110	
ggg gag atg tcc	ctg gaa gaa cac agc	cag tgt gaa tgc aga	cct aaa	384
Gly Glu Met Ser	Leu Glu Glu His Ser	Gln Cys Glu Cys Arg	Pro Lys	
	115	120	125	
aaa aag gac agt	gct gtg aag cca gac	agc ccc agg ccc ctc	tgc cca	432
Lys Lys Asp Ser	Ala Val Lys Pro	Asp Ser Pro Arg	Pro Leu Cys Pro	
	130	135	140	
cgc tgc acc cag	cac cac cag cgc	cct gac ccc cgg	acc tgc cgc tgc	480
Arg Cys Thr Gln	His His Gln Arg	Pro Asp Pro Arg	Thr Cys Arg Cys	
	145	150	155	
cgc tgc cga cgc	cgc agc ttc ctc	cgt tgc caa ggg	cgg ggc tta gag	528
Arg Cys Arg Arg	Arg Ser Phe Leu	Arg Cys Gln Gly	Arg Gly Leu Glu	
	160	165	170	175
ctc aac cca gac	acc tgc agg tgc	cgg aag ctg cga	agg tga	570
Leu Asn Pro Asp	Thr Cys Arg Cys	Arg Lys Leu Arg	Arg	
	180	185		
<210> 117				
<211> 188				
<212> PRT				
<213> Homo sapiens				
<400> 117				
Met Ser Pro Leu	Leu Arg Arg Leu	Leu Leu Ala Ala	Leu Leu Gln Leu	
1	5	10	15	
Ala Pro Ala Gln	Ala Pro Val Ser	Gln Pro Asp Ala	Pro Gly His Gln	
	20	25	30	
Arg Lys Val Val	Ser Trp Ile Asp	Val Tyr Thr Arg	Ala Thr Cys Gln	
	35	40	45	
Pro Arg Glu Val	Val Val Pro Leu	Thr Val Glu Leu	Met Gly Thr Val	
	50	55	60	
Ala Lys Gln Leu	Val Pro Ser Cys	Val Thr Val Gln	Arg Cys Gly Gly	
	65	70	75	80
Cys Cys Pro Asp	Asp Gly Leu Glu	Cys Val Pro Thr	Gly Gln His Gln	
	85	90	95	
Val Arg Met Gln	Ile Leu Met Ile	Arg Tyr Pro Ser	Ser Gln Leu Gly	
	100	105	110	
Glu Met Ser Leu	Glu Glu His Ser	Gln Cys Glu Cys	Arg Pro Lys Lys	
	115	120	125	
Lys Asp Ser Ala	Val Lys Pro Asp	Ser Pro Arg Pro	Leu Cys Pro Arg	
	130	135	140	
Cys Thr Gln His	His Gln Arg Pro	Asp Pro Arg Thr	Cys Arg Cys Arg	
	145	150	155	160

Cys Arg Arg Arg Ser Phe Leu Arg Cys Gln Gly Arg Gly Leu Glu Leu
 165 170 175

Asn Pro Asp Thr Cys Arg Cys Arg Lys Leu Arg Arg
 180 185

<210> 118
 <211> 2029
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (411)..(1472)

<400> 118
 gttgggttcc agctttctgt agctgtaagc attggtggcc acaccacctc cttacaaagc 60
 aactagaacc tgcggcatatc attggagaga tttttttaat tttctggaca tgaagtaa 120
 ttagagtgtt ttctaatttc aggtagaaga catgtccacc ttctgattat ttttggagaa 180
 cattttgatt tttttcatct ctctctcccc acccctaaga ttgtgcaaaa aaagcgtacc 240
 ttgcctaatt gaaataattt cattggattt tgatcagaac tgattatttg gttttctgtg 300
 tgaagttttg aggtttcaaa ctttccttct ggagaatgcc ttttgaaaca attttctcta 360
 gctgcctgat gtcaactgct tagtaatcag tggatattga aatattcaaa atg tac 416
 Met Tyr
 1
 aga gag tgg gta gtg gtg aat gtt ttc atg atg ttg tac gtc cag ctg 464
 Arg Glu Trp Val Val Val Asn Val Phe Met Met Leu Tyr Val Gln Leu
 5 10 15
 gtg cag ggc tcc agt aat gaa cat gga cca gtg aag cga tca tct cag 512
 Val Gln Gly Ser Ser Asn Glu His Gly Pro Val Lys Arg Ser Ser Gln
 20 25 30
 tcc aca ttg gaa cga tct gaa cag cag atc agg gct gct tct agt ttg 560
 Ser Thr Leu Glu Arg Ser Glu Gln Gln Ile Arg Ala Ala Ser Ser Leu
 35 40 45 50
 gag gaa cta ctt cga att act cac tct gag gac tgg aag ctg tgg aga 608
 Glu Glu Leu Leu Arg Ile Thr His Ser Glu Asp Trp Lys Leu Trp Arg
 55 60 65
 tgc agg ctg agg ctc aaa agt ttt acc agt atg gac tct cgc tca gca 656
 Cys Arg Leu Arg Leu Lys Ser Phe Thr Ser Met Asp Ser Arg Ser Ala
 70 75 80
 tcc cat cgg tcc act agg ttt gcg gca act ttc tat gac att gaa aca 704
 Ser His Arg Ser Thr Arg Phe Ala Ala Thr Phe Tyr Asp Ile Glu Thr
 85 90 95
 cta aaa gtt ata gat gaa gaa tgg caa aga act cag tgc agc cct aga 752
 Leu Lys Val Ile Asp Glu Glu Trp Gln Arg Thr Gln Cys Ser Pro Arg
 100 105 110

gaa acg tgc gtg gag gtg gcc agt gag ctg ggg aag agt acc aac aca	800
Glu Thr Cys Val Glu Val Ala Ser Glu Leu Gly Lys Ser Thr Asn Thr	
115 120 125 130	
ttc ttc aag ccc cct tgt gtg aac gtg ttc cga tgt ggt ggc tgt tgc	848
Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Asn Val Phe Arg Cys Gly Gly Cys Cys	
135 140 145	
aat gaa gag agc ctt atc tgt atg aac acc agc acc tcg tac att tcc	896
Asn Glu Glu Ser Leu Ile Cys Met Asn Thr Ser Thr Ser Tyr Ile Ser	
150 155 160	
aaa cag ctc ttt gag ata tca gtg cct ttg aca tca gta cct gaa tta	944
Lys Gln Leu Phe Glu Ile Ser Val Pro Leu Thr Ser Val Pro Glu Leu	
165 170 175	
gtg cct gtt aaa gtt gcc aat cat aca ggt tgt aag tgc ttg cca aca	992
Val Pro Val Lys Val Ala Asn His Thr Gly Cys Lys Cys Leu Pro Thr	
180 185 190	
gcc ccc cgc cat cca tac tca att atc aga aga tcc atc cag atc cct	1040
Ala Pro Arg His Pro Tyr Ser Ile Ile Arg Arg Ser Ile Gln Ile Pro	
195 200 205 210	
gaa gaa gat cgc tgt tcc cat tcc aag aaa ctc tgt cct att gac atg	1088
Glu Glu Asp Arg Cys Ser His Ser Lys Lys Leu Cys Pro Ile Asp Met	
215 220 225	
cta tgg gat agc aac aaa tgt aaa tgt gtt ttg cag gag gaa aat cca	1136
Leu Trp Asp Ser Asn Lys Cys Lys Cys Val Leu Gln Glu Glu Asn Pro	
230 235 240	
ctt gct gga aca gaa gac cac tct cat ctc cag gaa cca gct ctc tgt	1184
Leu Ala Gly Thr Glu Asp His Ser His Leu Gln Glu Pro Ala Leu Cys	
245 250 255	
ggg cca cac atg atg ttt gac gaa gat cgt tgc gag tgt gtc tgt aaa	1232
Gly Pro His Met Met Phe Asp Glu Asp Arg Cys Glu Cys Val Cys Lys	
260 265 270	
aca cca tgt ccc aaa gat cta atc cag cac ccc aaa aac tgc agt tgc	1280
Thr Pro Cys Pro Lys Asp Leu Ile Gln His Pro Lys Asn Cys Ser Cys	
275 280 285 290	
ttt gag tgc aaa gaa agt ctg gag acc tgc tgc cag aag cac aag cta	1328
Phe Glu Cys Lys Glu Ser Leu Glu Thr Cys Cys Gln Lys His Lys Leu	
295 300 305	
ttt cac cca gac acc tgc agc tgt gag gac aga tgc ccc ttt cat acc	1376
Phe His Pro Asp Thr Cys Ser Cys Glu Asp Arg Cys Pro Phe His Thr	
310 315 320	
aga cca tgt gca agt ggc aaa aca gca tgt gca aag cat tgc cgc ttt	1424
Arg Pro Cys Ala Ser Gly Lys Thr Ala Cys Ala Lys His Cys Arg Phe	
325 330 335	
cca aag gag aaa agg gct gcc cag ggg ccc cac agc cga aag aat cct	1472
Pro Lys Glu Lys Arg Ala Ala Gln Gly Pro His Ser Arg Lys Asn Pro	
340 345 350	
tgattcagcg ttccaagttc cccatccctg tcatttttaa cagcatgctg ctttgccaag	1532

ttgctgtcac tgtttttttc ccagggtgta aaaaaaaaaat ccatttttaca cagcaccaca 1592
 gtgaatccag accaaccttc cattcacacc agctaaggag tccctgggttc attgatggat 1652
 gtctttctagc tgcagatgcc tctgcgcacc aaggaatgga gaggagggga cccatgtaat 1712
 cctttttgttt agttttgttt ttgttttttg gtgaatgaga aagggtgtgct ggtcatggaa 1772
 tggcagggtgt catatgactg attactcaga gcagatgagg aaaactgtag tctctgagtc 1832
 ctttgctaata cgcaactctt gtgaattatt ctgattcttt tttatgcaga atttgattcg 1892
 tatgatcagt actgactttc tgattactgt ccagcttata gtcttccagt ttaatgaact 1952
 accatctgat gtttcatatt taagtgtatt taaagaaaat aaacaccatt attcaagcca 2012
 aaaaaaaaaa aaaaaaaa 2029

<210> 119
 <211> 354
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 119
 Met Tyr Arg Glu Trp Val Val Val Asn Val Phe Met Met Leu Tyr Val
 1 5 10 15
 Gln Leu Val Gln Gly Ser Ser Asn Glu His Gly Pro Val Lys Arg Ser
 20 25 30
 Ser Gln Ser Thr Leu Glu Arg Ser Glu Gln Gln Ile Arg Ala Ala Ser
 35 40 45
 Ser Leu Glu Glu Leu Leu Arg Ile Thr His Ser Glu Asp Trp Lys Leu
 50 55 60
 Trp Arg Cys Arg Leu Arg Leu Lys Ser Phe Thr Ser Met Asp Ser Arg
 65 70 75 80
 Ser Ala Ser His Arg Ser Thr Arg Phe Ala Ala Thr Phe Tyr Asp Ile
 85 90 95
 Glu Thr Leu Lys Val Ile Asp Glu Glu Trp Gln Arg Thr Gln Cys Ser
 100 105 110
 Pro Arg Glu Thr Cys Val Glu Val Ala Ser Glu Leu Gly Lys Ser Thr
 115 120 125
 Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Asn Val Phe Arg Cys Gly Gly
 130 135 140
 Cys Cys Asn Glu Glu Ser Leu Ile Cys Met Asn Thr Ser Thr Ser Tyr
 145 150 155 160
 Ile Ser Lys Gln Leu Phe Glu Ile Ser Val Pro Leu Thr Ser Val Pro
 165 170 175
 Glu Leu Val Pro Val Lys Val Ala Asn His Thr Gly Cys Lys Cys Leu
 180 185 190
 Pro Thr Ala Pro Arg His Pro Tyr Ser Ile Ile Arg Arg Ser Ile Gln

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

Asn Pro

<210> 120
 <211> 1830
 <212> DNA
 <213> Orf-Virus

<220>
 <221> CDS
 <222> (312)..(755)

<400> 120
 cggccacgcg gccgcgaact gcgcgctcgc gcgcgtggcg accgcgctga cgcgccgcgt 60
 gcccgcgagc cggcacggcc tcgcggaggg cggcacgccg ccgtggacgc tgctgctggc 120
 ggtggccgcg gtggcggtgc tcggcggtgt ggcaatttcg ctgctgcgcc gcgcgctaag 180
 aatacggttt agatactcaa agtctatcca gacacttaga gtgtaacttt gagtaaaaaa 240
 tgtaaatact aacgccaaaa tttcgatagt tgtaagcaa tatataacat ttttaaaacg 300
 tcatcaccag c atg aag tta aca gct acg tta caa gtt gtt gtt gca ttg 350
 Met Lys Leu Thr Ala Thr Leu Gln Val Val Val Ala Leu
 1 5 10
 tta ata tgt atg tat aat ttg cca gaa tgc gtg tct cag agt aat gat 398
 Leu Ile Cys Met Tyr Asn Leu Pro Glu Cys Val Ser Gln Ser Asn Asp
 15 20 25

tca cct cct tca acc aat gac tgg atg cgt aca cta gac aaa agt ggt 446
 Ser Pro Pro Ser Thr Asn Asp Trp Met Arg Thr Leu Asp Lys Ser Gly
 30 35 40 45
 tgt aaa cct aga gat act gtt gtt tat ttg gga gaa gaa tat cca gaa 494
 Cys Lys Pro Arg Asp Thr Val Val Tyr Leu Gly Glu Glu Tyr Pro Glu
 50 55 60
 agc act aac cta caa tat aat ccc cgg tgc gta act gtt aaa cga tgc 542
 Ser Thr Asn Leu Gln Tyr Asn Pro Arg Cys Val Thr Val Lys Arg Cys
 65 70 75
 agt ggt tgc tgt aac ggt gac ggt caa ata tgt aca gcg gtt gaa aca 590
 Ser Gly Cys Cys Asn Gly Asp Gly Gln Ile Cys Thr Ala Val Glu Thr
 80 85 90
 aga aat aca act gta aca gtt tca gta acc ggc gtg tct agt tcg tct 638
 Arg Asn Thr Thr Val Thr Val Ser Val Thr Gly Val Ser Ser Ser Ser
 95 100 105
 ggt act aat agt ggt gta tct act aac ctt caa aga ata agt gtt aca 686
 Gly Thr Asn Ser Gly Val Ser Thr Asn Leu Gln Arg Ile Ser Val Thr
 110 115 120 125
 gaa cac aca aag tgc gat tgt att ggt aga aca acg aca aca cct acg 734
 Glu His Thr Lys Cys Asp Cys Ile Gly Arg Thr Thr Thr Thr Pro Thr
 130 135 140
 acc act agg gaa cct aga cga taactaataa caaaaaatgt ttatttttgt 785
 Thr Thr Arg Glu Pro Arg Arg
 145
 aaataacttaa ttattacaca ctttacaata atctcaaaaa taaattgcgt gcccgacgg 845
 ctgcagctgg tgacgtgct gtgtcacaca ctgcgtattc gattcaagtt cactaacgcc 905
 actaaactag ttgtgctgt ccgagtgtta accgtacgtc aaactaacat cttacctgtc 965
 cgtgacaaga actaaaactt gaaccacata tttttaaaagt atatttaaca aaatcactca 1025
 cactcacaca atcataaaca ccacaaccac aaccaaacac gcatgagaat taatattctt 1085
 acttatccgt aacactctat gctgtacatc aacgcatcag agcagtctga gtctgactaa 1145
 tggcggcaaa cggaacgca ggcgcgacat aatcactgag aatctccgca gcaaccgctc 1205
 aaggacatct ctagcgctaa cggctgtttg tcattcccc gtgtgttcat ctcacacgac 1265
 attgtgaccg tcgcaaagca cacattcaaa gtgccgcatg tggaagaatt caccgtcgag 1325
 acacacacca taattaaaca agatcagtgc ataagagaga ttagcattct acagcacacc 1385
 acgtgcgaat acggacctcg taattgttta gactagaaca cctctggtct aaacaacatg 1445
 tccgatctta gaacagagtt tatgacgcat atgtaactgt gttctttatg tagaagttat 1505
 cttttatgtc actcccttgt cttagatgag ttatacatga catgatgtat gtgtcgcccc 1565
 cggcgcgcg gggcgctcgg cggcggggct gctgcgcgcg gcgggccccg ggtggcgggc 1625
 gctggcgcg cgctgcggc gcggcgcgcg ggcgggtag cggccccgcc gcccgggcg 1685
 ccgcgcgac ccttgccccg gaccaggcgc cacggagcaa agtgaaaaag gaccgcctag 1745

cagtcgagac cctcccgccg cagccgcgac accccacacc cgccttccac ccgccagacg 1805
 ccaacaccac agccaacaag catgc 1830

<210> 121
 <211> 148
 <212> PRT
 <213> Orf-Virus

<400> 121
 Met Lys Leu Thr Ala Thr Leu Gln Val Val Val Ala Leu Leu Ile Cys
 1 5 10 15
 Met Tyr Asn Leu Pro Glu Cys Val Ser Gln Ser Asn Asp Ser Pro Pro
 20 25 30
 Ser Thr Asn Asp Trp Met Arg Thr Leu Asp Lys Ser Gly Cys Lys Pro
 35 40 45
 Arg Asp Thr Val Val Tyr Leu Gly Glu Glu Tyr Pro Glu Ser Thr Asn
 50 55 60
 Leu Gln Tyr Asn Pro Arg Cys Val Thr Val Lys Arg Cys Ser Gly Cys
 65 70 75 80
 Cys Asn Gly Asp Gly Gln Ile Cys Thr Ala Val Glu Thr Arg Asn Thr
 85 90 95
 Thr Val Thr Val Ser Val Thr Gly Val Ser Ser Ser Ser Gly Thr Asn
 100 105 110
 Ser Gly Val Ser Thr Asn Leu Gln Arg Ile Ser Val Thr Glu His Thr
 115 120 125
 Lys Cys Asp Cys Ile Gly Arg Thr Thr Thr Thr Pro Thr Thr Thr Arg
 130 135 140
 Glu Pro Arg Arg
 145

<210> 122
 <211> 851
 <212> DNA
 <213> Orf-Virus

<220>
 <221> CDS
 <222> (2)..(223)

<400> 122
 c ggc cac gcg gcc gcg aac tgc gcg ctc gcg cgc gtg gcg acc gcg ctg 49
 Gly His Ala Ala Ala Asn Cys Ala Leu Ala Arg Val Ala Thr Ala Leu
 1 5 10 15
 acg cgc cgc gtg ccc gcg agc cgg cac ggc ctc gcg gag ggc ggc acg 97
 Thr Arg Arg Val Pro Ala Ser Arg His Gly Leu Ala Glu Gly Gly Thr
 20 25 30
 ccg ccg tgg acg ctg ctg ctg gcg gtg gcc gcg gtg acg gtg ctc ggc 145
 Pro Pro Trp Thr Leu Leu Leu Ala Val Ala Ala Val Thr Val Leu Gly
 35 40 45

gtg gtg gcg gtt tca ctg ctg cgg cgc gcg ctg cgg gta cgc tac cgc 193
 Val Val Ala Val Ser Leu Leu Arg Arg Ala Leu Arg Val Arg Tyr Arg
 50 55 60

ttc gcg cgg ccg gcc gcg ctg cgc gcg tag ccgcgcaaaa tgtaaattat 243
 Phe Ala Arg Pro Ala Ala Leu Arg Ala
 65 70

aacgccaac ttttaagggt gaggcgccat gaagttgctc gtcggcatac tagtagccgt 303
 gtgcttgca cagtatctgc tgaacgcgga cagcaacacg aaaggatggt ccgaagtgct 363
 gaaaggcagc gagtgcaagc ctaggccgat tggtgttcct gtaagcgaga cgcacccaga 423
 gctgacttct cagcgggtca acccgccgtg tgtcacgttg atgcgatgcg gcgggtgctg 483
 caacgacgag agcttggaat gcgtcccccac ggaagaagta aacgtgagca tggaactcct 543
 gggggcgctc ggctccggtg gtaacgggat gcaacgtctg agcttcgtag agcataagaa 603
 atgcgattgt agaccacgat tcacaaccac gccaccgacg accacaaggc cgcccagaag 663
 acgccgctag aactttttat ggaccgcaga tccaaacgat ggatgcgatc aggtacatgc 723
 ggaagaaggc gccacggagc aaagtgaaaa aggaccgcct agcagtcgag accctcccg 783
 cgcagccgcg gacacccac acccgccctc caccgccag acgccaacac cgcagccaac 843
 aagcatgc 851

<210> 123
 <211> 73
 <212> PRT
 <213> Orf-Virus

<400> 123
 Gly His Ala Ala Ala Asn Cys Ala Leu Ala Arg Val Ala Thr Ala Leu
 1 5 10 15
 Thr Arg Arg Val Pro Ala Ser Arg His Gly Leu Ala Glu Gly Gly Thr
 20 25 30
 Pro Pro Trp Thr Leu Leu Leu Ala Val Ala Ala Val Thr Val Leu Gly
 35 40 45
 Val Val Ala Val Ser Leu Leu Arg Arg Ala Leu Arg Val Arg Tyr Arg
 50 55 60
 Phe Ala Arg Pro Ala Ala Leu Arg Ala
 65 70

<210> 124
 <211> 2305
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (404)..(991)

<400> 124

```

ttcttggggc tgatgtccgc aaatatgcag aattaccggc cgggtcgctc ctgaagccag 60
cgcgggggagc gagcgcgggc gcggccagca ccgggaacgc accgaggaag aagcccagcc 120
cccgcctcc gcccttccg tccccacccc ctaccggcg gcccaggagg ctccccggct 180
gcggcgcgca ctccctgttt ctctctctcc tggctggcgc tgccctgcctc tccgcactca 240
ctgctcgccg ggcgcgctcc gccagctccg tgctccccgc gccacctcc tccggggcgc 300
gtccctaag ggatggtact gaatttcgcc gccacaggag accggctgga gcgcccgc 360
cgcgctcgc ctctctccg agcagccagc gcctcgggac gcg atg agg acc ttg 415
                               Met Arg Thr Leu
                               1

gct tgc ctg ctg ctc ctc ggc tgc gga tac ctc gcc cat gtt ctg gcc 463
Ala Cys Leu Leu Leu Leu Gly Cys Gly Tyr Leu Ala His Val Leu Ala
  5                      10                      15                      20

gag gaa gcc gag atc ccc cgc gag gtg atc gag agg ctg gcc cgc agt 511
Glu Glu Ala Glu Ile Pro Arg Glu Val Ile Glu Arg Leu Ala Arg Ser
                25                      30                      35

cag atc cac agc atc cgg gac ctc cag cga ctc ctg gag ata gac tcc 559
Gln Ile His Ser Ile Arg Asp Leu Gln Arg Leu Leu Glu Ile Asp Ser
                40                      45                      50

gta ggg agt gag gat tct ttg gac acc agc ctg aga gct cac ggg gtc 607
Val Gly Ser Glu Asp Ser Leu Asp Thr Ser Leu Arg Ala His Gly Val
                55                      60                      65

cac gcc act aag cat gtg ccc gag aag cgg ccc ctg ccc att cgg agg 655
His Ala Thr Lys His Val Pro Glu Lys Arg Pro Leu Pro Ile Arg Arg
                70                      75                      80

aag aga agc atc gag gaa gct gtc ccc gct gtc tgc aag acc agg acg 703
Lys Arg Ser Ile Glu Glu Ala Val Pro Ala Val Cys Lys Thr Arg Thr
                85                      90                      95                      100

gtc att tac gag att cct cgg agt cag gtc gac ccc acg tcc gcc aac 751
Val Ile Tyr Glu Ile Pro Arg Ser Gln Val Asp Pro Thr Ser Ala Asn
                105                      110                      115

ttc ctg atc tgg ccc ccg tgc gtg gag gtg aaa cgc tgc acc ggc tgc 799
Phe Leu Ile Trp Pro Pro Cys Val Glu Val Lys Arg Cys Thr Gly Cys
                120                      125                      130

tgc aac acg agc agt gtc aag tgc cag ccc tcc cgc gtc cac cac cgc 847
Cys Asn Thr Ser Ser Val Lys Cys Gln Pro Ser Arg Val His His Arg
                135                      140                      145

agc gtc aag gtg gcc aag gtg gaa tac gtc agg aag aag cca aaa tta 895
Ser Val Lys Val Ala Lys Val Glu Tyr Val Arg Lys Lys Pro Lys Leu
                150                      155                      160

aaa gaa gtc cag gtg agg tta gag gag cat ttg gag tgc gcc tgc gcg 943
Lys Glu Val Gln Val Arg Leu Glu Glu His Leu Glu Cys Ala Cys Ala
                165                      170                      175                      180

acc aca agc ctg aat ccg gat tat cgg gaa gag gac acg gat gtg agg 991
Thr Thr Ser Leu Asn Pro Asp Tyr Arg Glu Glu Asp Thr Asp Val Arg

```

185

190

195

tgaggatgag cgcagccct ttcctgggac atggatgtac atggcgtgtt acattcctga 1051
 acctactatg tacgggtgctt tattgccagt gtgcgggtctt tgttctcctc cgtgaaaaac 1111
 tgtgtccgag aacactcggg agaacaaaga gacagtgcac atttgtttaa tgtgacatca 1171
 aagcaagtat tgtagcactc ggtgaagcag taagaagctt ccttgtcaaa aagagagaga 1231
 gagagagaga gagagaaaac aaaaccacaa atgacaaaaa caaacggac tcacaaaaat 1291
 atctaaactc gatgagatgg agggtcgccc cgtgggatgg aagtgcagag gtctcagcag 1351
 actggatttc tgtccgggtg gtcacaggtg cttttttgcc gaggatgcag agcctgcttt 1411
 gggaacgact ccagaggggt gctggtgggc tctgcagggc ccgcaggaag caggaatgtc 1471
 ttggaaaaccg ccacgcgaac tttagaaacc acacctctc gctgtagtat ttaagcccat 1531
 acagaaacct tcctgagagc cttaagtggg tttttttttt gtttttgttt tgtttttttt 1591
 ttttttgttt tttttttttt tttttttttt tacaccataa agtgattatt aagcttcctt 1651
 ttactctttg gctagctttt tttttttttt tttttttttt tttttttaat tatctcttgg 1711
 atgacattta caccgataac acacaggctg ctgtaactgt caggacagtg cgacgggtatt 1771
 tttcctagca agatgcaaac taatgagatg tattaataa aacatggat acctacctat 1831
 gcatcatttc ctaaagtgtt ctggctttgt gtttctccct taccctgctt tatttggtta 1891
 ttaagccat tttgaaagaa ctatgcgtca accaatcgta cgccgtccct gcggcacctg 1951
 cccagagcc cgtttgtggc tgagtgcaca cttgttcccc gcagtgcaca cctagaatgc 2011
 tgtgttccca cgcggcacgt gagatgcatt gccgcttctg tctgtgttgt tgggtgtgcc 2071
 tgggtgccgtg gtggcggtca ctccctctgc tgccagtgtt tggacagAAC ccaaattctt 2131
 tatttttggg aagatattgt gctttacctg tattaacaga aatgtgtgtg tgtggtttgt 2191
 ttttttgtaa aggtgaagtt tgtatgttta cctaataatta cctgttttgt atacctgaga 2251
 gcctgctatg ttcttctttt gttgatccaa aattaataaa aaaataccac caac 2305

<210> 125

<211> 196

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 125

Met Arg Thr Leu Ala Cys Leu Leu Leu Leu Gly Cys Gly Tyr Leu Ala
 1 5 10 15

His Val Leu Ala Glu Glu Ala Glu Ile Pro Arg Glu Val Ile Glu Arg
 20 25 30

Leu Ala Arg Ser Gln Ile His Ser Ile Arg Asp Leu Gln Arg Leu Leu
 35 40 45

Glu Ile Asp Ser Val Gly Ser Glu Asp Ser Leu Asp Thr Ser Leu Arg

50

55

60

Ala His Gly Val His Ala Thr Lys His Val Pro Glu Lys Arg Pro Leu
65 70 75 80

Pro Ile Arg Arg Lys Arg Ser Ile Glu Glu Ala Val Pro Ala Val Cys
85 90 95

Lys Thr Arg Thr Val Ile Tyr Glu Ile Pro Arg Ser Gln Val Asp Pro
100 105 110

Thr Ser Ala Asn Phe Leu Ile Trp Pro Pro Cys Val Glu Val Lys Arg
115 120 125

Cys Thr Gly Cys Cys Asn Thr Ser Ser Val Lys Cys Gln Pro Ser Arg
130 135 140

Val His His Arg Ser Val Lys Val Ala Lys Val Glu Tyr Val Arg Lys
145 150 155 160

Lys Pro Lys Leu Lys Glu Val Gln Val Arg Leu Glu Glu His Leu Glu
165 170 175

Cys Ala Cys Ala Thr Thr Ser Leu Asn Pro Asp Tyr Arg Glu Glu Asp
180 185 190

Thr Asp Val Arg
195

<210> 126

<211> 2137

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (983)..(1705)

<400> 126

ccctgcctgc ctccctgcgc acccgagcc tccccgctg cctccctagg gctcccctcc 60
ggccgccagc gccattttt cattccctag atagagatac tttgcgcgca cacacataca 120
tacgcgcgca aaaaggaaaa aaaaaaaaaa aagcccaccc tccagcctcg ctgcaaagag 180
aaaaccggag cagccgcagc tcgcagctcg cagcccgag cccgcagagg acgcccagag 240
cggcgagcgg gcgggcagac ggaccgacgg actcgcgccg cgtccacctg tcggccggggc 300
ccagccgagc gcgcagcggg cacgccgcgc gcgcggagca gccgtgcccg ccgcccgggc 360
ccgccgccag ggcgcacacg ctcccgcccc cctaccgggc ccggggggga gtttgcacct 420
ctccctgccg gggtgctcga gctgcggttg caaagccaac tttggaaaaa gttttttggg 480
ggagacttgg gccttgaggt gccagctcc gcgctttccg attttggggg cctttccaga 540
aaatgttgca aaaaagctaa gccggcgggc agaggaaaac gctgtagcc ggcgagtga 600
gacgaacat cgactgccgt gttccttttc ctcttgagg ttggagtccc ctgggcgccc 660
ccacacggct agacgcctcg gctggttcgc gacgcagccc cccggccgtg gatgctgcac 720

```

tcgggctcgg gatccgccca ggtagcggcc tcggaccag gtcctgcgcc caggtcctcc 780
cctgcccccc agcgacggag ccggggccgg gggcggcggc gccgggggca tgcgggtgag 840
ccgcggctgc agaggcctga gcgcctgac gccgcggacc cgagccgagc ccacccccct 900
ccccagcccc ccaccctggc cgcggggggc gcgcgctcga tctacgcgtt cggggccccg 960
cggggccggg cccggagtcg gc atg aat cgc tgc tgg gcg ctc ttc ctg tct 1012
Met Asn Arg Cys Trp Ala Leu Phe Leu Ser
1 5 10

ctc tgc tgc tac ctg cgt ctg gtc agc gcc gag ggg gac ccc att ccc 1060
Leu Cys Cys Tyr Leu Arg Leu Val Ser Ala Glu Gly Asp Pro Ile Pro
15 20 25

gag gag ctt tat gag atg ctg agt gac cac tcg atc cgc tcc ttt gat 1108
Glu Glu Leu Tyr Glu Met Leu Ser Asp His Ser Ile Arg Ser Phe Asp
30 35 40

gat ctc caa cgc ctg ctg cac gga gac ccc gga gag gaa gat ggg gcc 1156
Asp Leu Gln Arg Leu Leu His Gly Asp Pro Gly Glu Glu Asp Gly Ala
45 50 55

gag ttg gac ctg aac atg acc cgc tcc cac tct gga ggc gag ctg gag 1204
Glu Leu Asp Leu Asn Met Thr Arg Ser His Ser Gly Gly Glu Leu Glu
60 65 70

agc ttg gct cgt gga aga agg agc ctg ggt tcc ctg acc att gct gag 1252
Ser Leu Ala Arg Gly Arg Arg Ser Leu Gly Ser Leu Thr Ile Ala Glu
75 80 85 90

ccg gcc atg atc gcc gag tgc aag acg cgc acc gag gtg ttc gag atc 1300
Pro Ala Met Ile Ala Glu Cys Lys Thr Arg Thr Glu Val Phe Glu Ile
95 100 105

tcc cgg cgc ctc ata gac cgc acc aac gcc aac ttc ctg gtg tgg ccg 1348
Ser Arg Arg Leu Ile Asp Arg Thr Asn Ala Asn Phe Leu Val Trp Pro
110 115 120

ccc tgt gtg gag gtg cag cgc tgc tcc ggc tgc tgc aac aac cgc aac 1396
Pro Cys Val Glu Val Gln Arg Cys Ser Gly Cys Cys Asn Asn Arg Asn
125 130 135

gtg cag tgc cgc ccc acc cag gtg cag ctg cga cct gtc cag gtg aga 1444
Val Gln Cys Arg Pro Thr Gln Val Gln Leu Arg Pro Val Gln Val Arg
140 145 150

aag atc gag att gtg cgg aag aag cca atc ttt aag aag gcc acg gtg 1492
Lys Ile Glu Ile Val Arg Lys Lys Pro Ile Phe Lys Lys Ala Thr Val
155 160 165 170

acg ctg gaa gac cac ctg gca tgc aag tgt gag aca gtg gca gct gca 1540
Thr Leu Glu Asp His Leu Ala Cys Lys Cys Glu Thr Val Ala Ala Ala
175 180 185

cgg cct gtg acc cga agc ccg ggg ggt tcc cag gag cag cga gcc aaa 1588
Arg Pro Val Thr Arg Ser Pro Gly Gly Ser Gln Glu Gln Arg Ala Lys
190 195 200

acg ccc caa act cgg gtg acc att cgg acg gtg cga gtc cgc cgg ccc 1636

```

```

Thr Pro Gln Thr Arg Val Thr Ile Arg Thr Val Arg Val Arg Arg Pro
    205                      210                      215

ccc aag ggc aag cac cgg aaa ttc aag cac acg cat gac aag acg gca 1684
Pro Lys Gly Lys His Arg Lys Phe Lys His Thr His Asp Lys Thr Ala
    220                      225                      230

ctg aag gag acc ctt gga gcc taggggcatc ggcaggagag tgtgtgggca 1735
Leu Lys Glu Thr Leu Gly Ala
    235                      240

gggttatttta atatggtatt tgctgtattg ccccatggg gccttggagt agataatatt 1795

gtttccctcg tccgtctgtc tcgatgcctg attcggacgg ccaatggtgc ctccccacc 1855

cctccacgtg tccgtccacc ctccatcag cgggtctcct ccagcggcc tccggctctt 1915

gccacgacgc tcaagaagaa aaagaaggac tgaactccat cgccatcttc ttcccttaac 1975

tccaagaact tgggataaga gtgtgagaga gactgatggg gtcgctcttt gggggaaacg 2035

ggttccttcc cctgcacctg gcctggggcca cacctgagcg ctgtggactg tcctgaggag 2095

ccctgaggac ctctcagcat agcctgcctg atccctgaac cc 2137

<210> 127
<211> 241
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 127
Met Asn Arg Cys Trp Ala Leu Phe Leu Ser Leu Cys Cys Tyr Leu Arg
  1                      5                      10                      15

Leu Val Ser Ala Glu Gly Asp Pro Ile Pro Glu Glu Leu Tyr Glu Met
    20                      25                      30

Leu Ser Asp His Ser Ile Arg Ser Phe Asp Asp Leu Gln Arg Leu Leu
    35                      40                      45

His Gly Asp Pro Gly Glu Glu Asp Gly Ala Glu Leu Asp Leu Asn Met
    50                      55                      60

Thr Arg Ser His Ser Gly Gly Glu Leu Glu Ser Leu Ala Arg Gly Arg
    65                      70                      75                      80

Arg Ser Leu Gly Ser Leu Thr Ile Ala Glu Pro Ala Met Ile Ala Glu
    85                      90                      95

Cys Lys Thr Arg Thr Glu Val Phe Glu Ile Ser Arg Arg Leu Ile Asp
    100                      105                      110

Arg Thr Asn Ala Asn Phe Leu Val Trp Pro Pro Cys Val Glu Val Gln
    115                      120                      125

Arg Cys Ser Gly Cys Cys Asn Asn Arg Asn Val Gln Cys Arg Pro Thr
    130                      135                      140

Gln Val Gln Leu Arg Pro Val Gln Val Arg Lys Ile Glu Ile Val Arg
    145                      150                      155                      160

```

Lys Lys Pro Ile Phe Lys Lys Ala Thr Val Thr Leu Glu Asp His Leu
 165 170 175
 Ala Cys Lys Cys Glu Thr Val Ala Ala Ala Arg Pro Val Thr Arg Ser
 180 185 190
 Pro Gly Gly Ser Gln Glu Gln Arg Ala Lys Thr Pro Gln Thr Arg Val
 195 200 205
 Thr Ile Arg Thr Val Arg Val Arg Arg Pro Pro Lys Gly Lys His Arg
 210 215 220
 Lys Phe Lys His Thr His Asp Lys Thr Ala Leu Lys Glu Thr Leu Gly
 225 230 235 240

Ala

<210> 128
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artifizielle Sequenz

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

<400> 128
 Asp Pro Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys
 1 5 10

<210> 129
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artifizielle Sequenz

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

<400> 129
 Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg Ser Tyr Cys His
 1 5 10

<210> 130
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artifizielle Sequenz

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

<400> 130
 Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln
 1 5 10

<210> 131
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artifizuelle Sequenz

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

<400> 131
 Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr
 1 5

<210> 132
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artifizuelle Sequenz

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

<400> 132
 Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu Met Arg Cys Gly
 1 5 10

<210> 133
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artifizuelle Sequenz

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

<400> 133
 Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu
 1 5

<210> 134
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artifizuelle Sequenz

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

<400> 134
 Glu Cys Val Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg
 1 5 10 15

<210> 135
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artifizuelle Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der artifizuellen Sequenz: synthetisches

Peptid

<400> 135

Ile	Lys	Pro	His	Gln	Gly	Gln	His	Ile	Gly	Glu	Met	Ser	Phe
1				5					10				

<210> 136

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificielle Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der artifiziiellen Sequenz: synthetisches Peptid

<400> 136

Leu	Gln	His	Asn	Lys	Cys	Glu	Cys	Arg	Pro	Lys	Lys	Asp
1				5						10		

<210> 137

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificielle Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der artifiziiellen Sequenz: synthetisches Peptid

<400> 137

Asp	Pro	Ala	His	Tyr	Asn	Thr	Glu	Ile	Leu	Lys
1				5					10	

<210> 138

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificielle Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der artifiziiellen Sequenz: synthetisches Peptid

<400> 138

Ser	Ile	Asp	Asn	Glu	Trp	Arg	Lys	Thr	Gln	Cys	Met
1				5					10		

<210> 139

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificielle Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der artifiziiellen Sequenz: synthetisches Peptid

<400> 139

Pro	Arg	Glu	Val	Cys	Ile	Asp	Val	Gly	Lys
1				5					10

<210> 140
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificielle Sequenz

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

<400> 140
 Glu Phe Gly Val Ala Thr Asn Thr
 1 5

<210> 141
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificielle Sequenz

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

<400> 141
 Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser Val Tyr Arg Cys Gly
 1 5 10

<210> 142
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificielle Sequenz

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

<400> 142
 Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu
 1 5

<210> 143
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificielle Sequenz

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

<400> 143
 Gln Cys Met Asn Thr Ser Thr Ser Tyr Leu Ser Lys Thr Leu Phe Glu
 1 5 10 15

<210> 144
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificielle Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der artifiziellen Sequenz: synthetisches

Peptid

<400> 144

Ile	Thr	Val	Pro	Leu	Ser	Gln	Gly	Pro	Lys	Pro	Val	Thr	Ile	Ser	Phe
1				5					10					15	

<210> 145

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificielle Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der artifiziellen Sequenz: synthetisches Peptid

<400> 145

Ala	Asn	His	Thr	Ser	Cys	Arg	Cys	Met	Ser	Lys	Leu	Asp
1				5				10				

<210> 146

<211> 815

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (69)..(767)

<400> 146

gaattcgaat tccagtgtgc tggcgggcgc gcgcgagccg cgccggcccc ggctgggcct 60

ccgaaacc	atg	aac	ttt	ctg	ctg	tct	tgg	gtg	cat	tgg	agc	ctc	gcc	ttg	110
	Met	Asn	Phe	Leu	Leu	Ser	Trp	Val	His	Trp	Ser	Leu	Ala	Leu	
	1				5					10					

ctg	ctc	tac	ctc	cac	cat	gcc	aag	tgg	tcc	cag	gct	gca	ccc	atg	gca	158
Leu	Leu	Tyr	Leu	His	His	Ala	Lys	Trp	Ser	Gln	Ala	Ala	Pro	Met	Ala	
15					20					25				30		

gaa	gga	gga	ggg	cag	aat	cat	cac	gaa	gtg	gtg	aag	ttc	atg	gat	gtc	206
Glu	Gly	Gly	Gly	Gln	Asn	His	His	Glu	Val	Val	Lys	Phe	Met	Asp	Val	
			35						40					45		

tat	cag	cgc	agc	tac	tgc	cat	cca	atc	gag	acc	ctg	gtg	gac	atc	ttc	254
Tyr	Gln	Arg	Ser	Tyr	Cys	His	Pro	Ile	Glu	Thr	Leu	Val	Asp	Ile	Phe	
			50					55					60			

cag	gag	tac	cct	gat	gag	atc	gag	tac	atc	ttc	aag	cca	tcc	tgt	gtg	302
Gln	Glu	Tyr	Pro	Asp	Glu	Ile	Glu	Tyr	Ile	Phe	Lys	Pro	Ser	Cys	Val	
		65					70					75				

ccc	ctg	atg	cga	tgc	ggg	ggc	tgc	tgc	aat	gac	gag	ggc	ctg	gag	tgt	350
Pro	Leu	Met	Arg	Cys	Gly	Gly	Cys	Cys	Asn	Asp	Glu	Gly	Leu	Glu	Cys	
	80					85					90					

gtg	ccc	act	gag	gag	tcc	aac	atc	acc	atg	cag	att	atg	cgg	atc	aaa	398
Val	Pro	Thr	Glu	Glu	Ser	Asn	Ile	Thr	Met	Gln	Ile	Met	Arg	Ile	Lys	
	95				100					105				110		

cct	cac	caa	ggc	cag	cac	ata	gga	gag	atg	agc	ttc	cta	cag	cac	aac	446
Pro	His	Gln	Gly	Gln	His	Ile	Gly	Glu	Met	Ser	Phe	Leu	Gln	His	Asn	

115	120	125	
aaa tgt gaa tgc aga cca aag aaa gat aga gca aga caa gaa aaa aaa			494
Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg Ala Arg Gln Glu Lys Lys			
130	135	140	
tca gtt cga gga aag gga aag ggg caa aaa cga aag cgc aag aaa tcc			542
Ser Val Arg Gly Lys Gly Lys Gly Gln Lys Arg Lys Arg Lys Lys Ser			
145	150	155	
cgg tat aag tcc tgg agc gtg tac gtt ggt gcc cgc tgc tgt cta atg			590
Arg Tyr Lys Ser Trp Ser Val Tyr Val Gly Ala Arg Cys Cys Leu Met			
160	165	170	
ccc tgg agc ctc cct ggc ccc cat ccc tgt ggg cct tgc tca gag cgg			638
Pro Trp Ser Leu Pro Gly Pro His Pro Cys Gly Pro Cys Ser Glu Arg			
175	180	185	190
aga aag cat ttg ttt gta caa gat ccg cag acg tgt aaa tgt tcc tgc			686
Arg Lys His Leu Phe Val Gln Asp Pro Gln Thr Cys Lys Cys Ser Cys			
195	200	205	
aaa aac aca gac tcg cgt tgc aag gcg agg cag ctt gag tta aac gaa			734
Lys Asn Thr Asp Ser Arg Cys Lys Ala Arg Gln Leu Glu Leu Asn Glu			
210	215	220	
cgt act tgc aga tgt gac aag ccg agg cgg tga gccgggctgg aggaaggagc			787
Arg Thr Cys Arg Cys Asp Lys Pro Arg Arg			
225	230		
ctccctcagg gtttcgggaa ccagatcc			815
<210> 147			
<211> 232			
<212> PRT			
<213> Homo sapiens			
<400> 147			
Met Asn Phe Leu Leu Ser Trp Val His Trp Ser Leu Ala Leu Leu Leu			
1	5	10	15
Tyr Leu His His Ala Lys Trp Ser Gln Ala Ala Pro Met Ala Glu Gly			
20	25	30	
Gly Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln			
35	40	45	
Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu			
50	55	60	
Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu			
65	70	75	80
Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val Pro			
85	90	95	
Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His			
100	105	110	
Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn Lys Cys			

115					120					125				
Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg Ala Arg Gln Glu Lys Lys Ser Val														
130						135					140			
Arg Gly Lys Gly Lys Gly Gln Lys Arg Lys Arg Lys Lys Ser Arg Tyr						150					155			160
145														
Lys Ser Trp Ser Val Tyr Val Gly Ala Arg Cys Cys Leu Met Pro Trp						165					170			175
Ser Leu Pro Gly Pro His Pro Cys Gly Pro Cys Ser Glu Arg Arg Lys						180					185			190
His Leu Phe Val Gln Asp Pro Gln Thr Cys Lys Cys Ser Cys Lys Asn						195					200			205
Thr Asp Ser Arg Cys Lys Ala Arg Gln Leu Glu Leu Asn Glu Arg Thr						210					215			220
Cys Arg Cys Asp Lys Pro Arg Arg						225								230
<210> 148														
<211> 3007														
<212> DNA														
<213> Homo sapiens														
<220>														
<221> CDS														
<222> (492)..(1529)														
<400> 148														
gcccgagag cgcacatctat tggcagcttt gttattgatc agaaactgct cgccgccgac 60														
ttggcttoca gtctggctgc gggcaaccct tgagttttcg cctctgtcct gtccccgaa 120														
ctgacaggtg ctcccagcaa cttgctgggg acttctcgcc gctccccgc gtccccaccc 180														
cctcattcct ccctcgctt caccaccacc cccaccactt cgccacagct caggatttgt 240														
ttaaacccttg ggaaactggg tcaggtccag gttttgcttt gatccttttc aaaaactgga 300														
gacacagaag agggctctag gaaaaagttt tggatgggat tatgtggaaa ctaccctgcg 360														
attctctgct gccagagcag gctcggcgct tccacccag tgcagccttc ccctggcggt 420														
ggtgaaagag actcgggagt cgctgcttcc aaagtgccg ccgtgagtga gctctcacc 480														
cagtcagcca a atg agc ctc ttc ggg ctt ctc ctg ctg aca tct gcc ctg 530														
Met Ser Leu Phe Gly Leu Leu Leu Leu Thr Ser Ala Leu														
1 5 10														
gcc ggc cag aga cag ggg act cag gcg gaa tcc aac ctg agt agt aaa 578														
Ala Gly Gln Arg Gln Gly Thr Gln Ala Glu Ser Asn Leu Ser Ser Lys														
15 20 25														
ttc cag ttt tcc agc aac aag gaa cag aac gga gta caa gat cct cag 626														
Phe Gln Phe Ser Ser Asn Lys Glu Gln Asn Gly Val Gln Asp Pro Gln														
30 35 40 45														
cat gag aga att att act gtg tct act aat gga agt att cac agc cca 674														

DE 601 31 146 T2 2008.03.06

His	Glu	Arg	Ile	Ile	Thr	Val	Ser	Thr	Asn	Gly	Ser	Ile	His	Ser	Pro		
				50					55					60			
agg	ttt	cct	cat	act	tat	cca	aga	aat	acg	gtc	ttg	gta	tggt	aga	tta	722	
Arg	Phe	Pro	His	Thr	Tyr	Pro	Arg	Asn	Thr	Val	Leu	Val	Trp	Arg	Leu		
			65					70					75				
gta	gca	gta	gag	gaa	aat	gta	tggt	ata	caa	ctt	acg	ttt	gat	gaa	aga	770	
Val	Ala	Val	Glu	Glu	Asn	Val	Trp	Ile	Gln	Leu	Thr	Phe	Asp	Glu	Arg		
			80				85					90					
ttt	ggg	ctt	gaa	gac	cca	gaa	gat	gac	ata	tgc	aag	tat	gat	ttt	gta	818	
Phe	Gly	Leu	Glu	Asp	Pro	Glu	Asp	Asp	Ile	Cys	Lys	Tyr	Asp	Phe	Val		
	95					100				105							
gaa	gtt	gag	gaa	ccc	agt	gat	gga	act	ata	tta	ggg	cgc	tggt	tgt	ggt	866	
Glu	Val	Glu	Glu	Pro	Ser	Asp	Gly	Thr	Ile	Leu	Gly	Arg	Trp	Cys	Gly		
110					115					120					125		
tct	ggt	act	gta	cca	gga	aaa	cag	att	tct	aaa	gga	aat	caa	att	agg	914	
Ser	Gly	Thr	Val	Pro	Gly	Lys	Gln	Ile	Ser	Lys	Gly	Asn	Gln	Ile	Arg		
				130					135					140			
ata	aga	ttt	gta	tct	gat	gaa	tat	ttt	cct	tct	gaa	cca	ggg	ttc	tgc	962	
Ile	Arg	Phe	Val	Ser	Asp	Glu	Tyr	Phe	Pro	Ser	Glu	Pro	Gly	Phe	Cys		
			145					150					155				
atc	cac	tac	aac	att	gtc	atg	cca	caa	ttc	aca	gaa	gct	gtg	agt	cct	1010	
Ile	His	Tyr	Asn	Ile	Val	Met	Pro	Gln	Phe	Thr	Glu	Ala	Val	Ser	Pro		
			160				165					170					
tca	gtg	cta	ccc	cct	tca	gct	ttg	cca	ctg	gac	ctg	ctt	aat	aat	gct	1058	
Ser	Val	Leu	Pro	Pro	Ser	Ala	Leu	Pro	Leu	Asp	Leu	Leu	Asn	Asn	Ala		
			175				180				185						
ata	act	gcc	ttt	agt	acc	ttg	gaa	gac	ctt	att	cga	tat	ctt	gaa	cca	1106	
Ile	Thr	Ala	Phe	Ser	Thr	Leu	Glu	Asp	Leu	Ile	Arg	Tyr	Leu	Glu	Pro		
190					195					200					205		
gag	aga	tggt	cag	ttg	gac	tta	gaa	gat	cta	tat	agg	cca	act	tggt	caa	1154	
Glu	Arg	Trp	Gln	Leu	Asp	Leu	Glu	Asp	Leu	Tyr	Arg	Pro	Thr	Trp	Gln		
			210						215					220			
ctt	ctt	ggc	aag	gct	ttt	gtt	ttt	gga	aga	aaa	tcc	aga	gtg	gtg	gat	1202	
Leu	Leu	Gly	Lys	Ala	Phe	Val	Phe	Gly	Arg	Lys	Ser	Arg	Val	Val	Asp		
			225					230					235				
ctg	aac	ctt	cta	aca	gag	gag	gta	aga	tta	tac	agc	tgc	aca	cct	cgt	1250	
Leu	Asn	Leu	Leu	Thr	Glu	Glu	Val	Arg	Leu	Tyr	Ser	Cys	Thr	Pro	Arg		
			240				245					250					
aac	ttc	tca	gtg	tcc	ata	agg	gaa	gaa	cta	aag	aga	acc	gat	acc	att	1298	
Asn	Phe	Ser	Val	Ser	Ile	Arg	Glu	Glu	Leu	Lys	Arg	Thr	Asp	Thr	Ile		
	255					260					265						
ttc	tggt	cca	ggt	tgt	ctc	ctg	gtt	aaa	cgc	tgt	ggt	ggg	aac	tgt	gcc	1346	
Phe	Trp	Pro	Gly	Cys	Leu	Leu	Val	Lys	Arg	Cys	Gly	Gly	Asn	Cys	Ala		
270					275					280					285		
tgt	tgt	ctc	cac	aat	tgc	aat	gaa	tgt	caa	tgt	gtc	cca	agc	aaa	gtt	1394	
Cys	Cys	Leu	His	Asn	Cys	Asn	Glu	Cys	Gln	Cys	Val	Pro	Ser	Lys	Val		
				290					295					300			

DE 601 31 146 T2 2008.03.06

```

act aaa aaa tac cac gag gtc ctt cag ttg aga cca aag acc ggt gtc 1442
Thr Lys Lys Tyr His Glu Val Leu Gln Leu Arg Pro Lys Thr Gly Val
      305                      310                      315

agg gga ttg cac aaa tca ctc acc gac gtg gcc ctg gag cac cat gag 1490
Arg Gly Leu His Lys Ser Leu Thr Asp Val Ala Leu Glu His His Glu
      320                      325                      330

gag tgt gac tgt gtg tgc aga ggg agc aca gga gga tag ccgcatcacc 1539
Glu Cys Asp Cys Val Cys Arg Gly Ser Thr Gly Gly
      335                      340                      345

accagcagct cttgcccaga gctgtgcagt gcagtggctg attctattag agaacgtatg 1599

cgttatctcc atccttaatc tcagttgttt gcttcaagga cctttcatct tcaggattta 1659

cagtgcattc tgaaagagga gacatcaaac agaattagga gttgtgcaac agctcttttg 1719

agaggaggcc taaaggacag gagaaaaggt cttcaatcgt ggaaagaaaa ttaaattgtg 1779

tattaaatag atcaccagct agtttcagag ttaccatgta cgtattccac tagctgggtt 1839

ctgtatttca gttcttttga tacggcttag ggtaatgtca gtacaggaaa aaaactgtgc 1899

aagtgagcac ctgattccgt tgccttgctt aactctaaag ctccatgtcc tgggcctaaa 1959

atcgtataaa atctggattt tttttttttt ttttgtcat attcacatat gtaaaccaga 2019

acattctatg tactacaaac ctgggtttta aaaaggaact atgttgctat gaattaaact 2079

tgtgtcgtgc tgataggaca gactggattt ttcattttc ttattaaaat ttctgccatt 2139

tagaagaaga gaactacatt catggtttgg aagagataaa cctgaaaaga agagtggcct 2199

tatcttcact ttatcgataa gtcagtttat ttgtttcatt gtgtacattt ttatattctc 2259

cttttgacat tataactgtt ggcttttcta atcttgttaa atatatctat ttttaccaaa 2319

ggattttaat attctttttt atgacaactt agatcaacta tttttagctt ggtaaatttt 2379

tctaaacaca attgttatag ccagaggaac aaagatgata taaaatattg ttgctctgac 2439

aaaaatacat gtatttcatt ctogtatggg gctagagtta gattaatctg cattttaaaa 2499

aactgaattg gaatagaatt ggtaagttgc aaagactttt tgaaaataat taaattatca 2559

tatcttccat tcctgttatt ggagatgaaa ataaaaagca acttatgaaa gtagacattc 2619

agatocagcc attactaacc tattcctttt ttggggaaat ctgagcctag ctcagaaaaa 2679

cataaagcac cttgaaaaag acttggcagc ttcttgataa agcgtgctgt gctgtgcagt 2739

aggaacacat cctatttatt gtgatgttgt ggttttatta tcttaaactc tgttccatac 2799

acttgataaa atacatggat atttttatgt acagaagtat gtctcttaac cagttcactt 2859

attgtactct ggcaatttaa aagaaaatca gtaaaatatt ttgcttgtaa aatgcttaat 2919

atcgtgccta gggtatgtgg tgactatttg aatcaaaaat gtattgaatc atcaaataaa 2979

agaatgtggc tattttgggg agaaaatt

```

3007

<210> 149
 <211> 345
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 149

```

Met Ser Leu Phe Gly Leu Leu Leu Leu Thr Ser Ala Leu Ala Gly Gln
  1           5           10           15

Arg Gln Gly Thr Gln Ala Glu Ser Asn Leu Ser Ser Lys Phe Gln Phe
      20           25           30

Ser Ser Asn Lys Glu Gln Asn Gly Val Gln Asp Pro Gln His Glu Arg
      35           40           45

Ile Ile Thr Val Ser Thr Asn Gly Ser Ile His Ser Pro Arg Phe Pro
      50           55           60

His Thr Tyr Pro Arg Asn Thr Val Leu Val Trp Arg Leu Val Ala Val
      65           70           75           80

Glu Glu Asn Val Trp Ile Gln Leu Thr Phe Asp Glu Arg Phe Gly Leu
      85           90           95

Glu Asp Pro Glu Asp Asp Ile Cys Lys Tyr Asp Phe Val Glu Val Glu
      100          105          110

Glu Pro Ser Asp Gly Thr Ile Leu Gly Arg Trp Cys Gly Ser Gly Thr
      115          120          125

Val Pro Gly Lys Gln Ile Ser Lys Gly Asn Gln Ile Arg Ile Arg Phe
      130          135          140

Val Ser Asp Glu Tyr Phe Pro Ser Glu Pro Gly Phe Cys Ile His Tyr
      145          150          155          160

Asn Ile Val Met Pro Gln Phe Thr Glu Ala Val Ser Pro Ser Val Leu
      165          170          175

Pro Pro Ser Ala Leu Pro Leu Asp Leu Leu Asn Asn Ala Ile Thr Ala
      180          185          190

Phe Ser Thr Leu Glu Asp Leu Ile Arg Tyr Leu Glu Pro Glu Arg Trp
      195          200          205

Gln Leu Asp Leu Glu Asp Leu Tyr Arg Pro Thr Trp Gln Leu Leu Gly
      210          215          220

Lys Ala Phe Val Phe Gly Arg Lys Ser Arg Val Val Asp Leu Asn Leu
      225          230          235          240

Leu Thr Glu Glu Val Arg Leu Tyr Ser Cys Thr Pro Arg Asn Phe Ser
      245          250          255

Val Ser Ile Arg Glu Glu Leu Lys Arg Thr Asp Thr Ile Phe Trp Pro
      260          265          270

Gly Cys Leu Leu Val Lys Arg Cys Gly Gly Asn Cys Ala Cys Cys Leu
      275          280          285

His Asn Cys Asn Glu Cys Gln Cys Val Pro Ser Lys Val Thr Lys Lys

```

290

295

300

Tyr His Glu Val Leu Gln Leu Arg Pro Lys Thr Gly Val Arg Gly Leu
 305 310 315 320

His Lys Ser Leu Thr Asp Val Ala Leu Glu His His Glu Glu Cys Asp
 325 330 335

Cys Val Cys Arg Gly Ser Thr Gly Gly
 340 345

<210> 150

<211> 399

<212> DNA

<213> Orf-Virus

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(399)

<400> 150

atg aag ttt ctc gtc ggc ata ctg gta gct gtg tgc ttg cac cag tat 48
 Met Lys Phe Leu Val Gly Ile Leu Val Ala Val Cys Leu His Gln Tyr
 1 5 10 15

ctg ctg aac gcg gac agc acg aaa aca tgg tcc gaa gtg ttt gaa aac 96
 Leu Leu Asn Ala Asp Ser Thr Lys Thr Trp Ser Glu Val Phe Glu Asn
 20 25 30

agc ggg tgc aag cca agg ccg atg gtc ttt cga gta cac gac gag cac 144
 Ser Gly Cys Lys Pro Arg Pro Met Val Phe Arg Val His Asp Glu His
 35 40 45

ccg gag cta act tct cag cgg ttc aac ccg ccg tgt gtc acg ttg atg 192
 Pro Glu Leu Thr Ser Gln Arg Phe Asn Pro Pro Cys Val Thr Leu Met
 50 55 60

cga tgc ggc ggg tgc tgc aac gac gag agc tta gaa tgc gtc ccc acg 240
 Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Ser Leu Glu Cys Val Pro Thr
 65 70 75 80

gaa gag gca aac gta acg atg caa ctc atg gga gcg tcg gtc tcc ggt 288
 Glu Glu Ala Asn Val Thr Met Gln Leu Met Gly Ala Ser Val Ser Gly
 85 90 95

ggt aac ggg atg caa cat ctg agc ttc gta gag cat aag aaa tgc gat 336
 Gly Asn Gly Met Gln His Leu Ser Phe Val Glu His Lys Lys Cys Asp
 100 105 110

tgt aaa cca cca ctc acg acc acg cca ccg acg acc aca agg ccg ccc 384
 Cys Lys Pro Pro Leu Thr Thr Thr Pro Pro Thr Thr Thr Arg Pro Pro
 115 120 125

aga aga cgc cgc tag 399
 Arg Arg Arg Arg
 130

<210> 151

<211> 132

<212> PRT

<213> Orf-Virus

<400> 151

Met Lys Phe Leu Val Gly Ile Leu Val Ala Val Cys Leu His Gln Tyr
 1 5 10 15

Leu Leu Asn Ala Asp Ser Thr Lys Thr Trp Ser Glu Val Phe Glu Asn
 20 25 30

Ser Gly Cys Lys Pro Arg Pro Met Val Phe Arg Val His Asp Glu His
 35 40 45

Pro Glu Leu Thr Ser Gln Arg Phe Asn Pro Pro Cys Val Thr Leu Met
 50 55 60

Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Ser Leu Glu Cys Val Pro Thr
 65 70 75 80

Glu Glu Ala Asn Val Thr Met Gln Leu Met Gly Ala Ser Val Ser Gly
 85 90 95

Gly Asn Gly Met Gln His Leu Ser Phe Val Glu His Lys Lys Cys Asp
 100 105 110

Cys Lys Pro Pro Leu Thr Thr Thr Pro Pro Thr Thr Thr Arg Pro Pro
 115 120 125

Arg Arg Arg Arg
 130

<210> 152

<211> 328

<212> DNA

<213> Artifizielle Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der artifiziellen Sequenz: Hybrid-DNA

<220>

<221> CDS

<222> (8)..(322)

<400> 152

ggatcct ggg cag aat cat cac gaa gtg gtg aaa ttc atg gat gtc tat 49
 Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr
 1 5 10

cag cgc agc tac tgc cat ccg atc gag aca ctg gtg gac atc ttc cag 97
 Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln
 15 20 25 30

gaa ttt gga gtc gcg aca aac acc ttc ttc aag cca tcc tgc gtg ccc 145
 Glu Phe Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro
 35 40 45

ctg atg aga tgt ggg ggt tgc tgc aat gac gaa ggg ctg gag tgc gtt 193
 Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val
 50 55 60

ccc acc gag gag tcc aac atc acc atg cag att atg aga att aca gtg 241
 Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Thr Val
 65 70 75

cct ctc tct caa ggg ccc_aaa cca gtg aca_atc_agc ttt_ctc cag cat 289

Pro Leu Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Leu Gln His
 80 85 90

aac aaa tgt gaa tgt aga cca aag aaa gat ttg gtcttc 328
 Asn Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Leu
 95 100 105

<210> 153
 <211> 105
 <212> PRT
 <213> Artifizielle Sequenz

<400> 153
 Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg
 1 5 10 15

Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu Phe
 20 25 30

Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu Met
 35 40 45

Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val Pro Thr
 50 55 60

Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Thr Val Pro Leu
 65 70 75 80

Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Leu Gln His Asn Lys
 85 90 95

Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Leu
 100 105

<210> 154
 <211> 331
 <212> DNA
 <213> Artifizielle Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der artifiziiellen Sequenz: Hybrid-DNA

<220>
 <221> CDS
 <222> (8)..(322)

<400> 154
 ggatcct gca cat tat aat acc gag atc ctg aaa tct att gat aat gag 49
 Ala His Tyr Asn Thr Glu Ile Leu Lys Ser Ile Asp Asn Glu
 1 5 10

tgg aga aag act cag tgc atg ccg aga gag gtg tgt atc gac gtg ggg 97
 Trp Arg Lys Thr Gln Cys Met Pro Arg Glu Val Cys Ile Asp Val Gly
 15 20 25 30

aag gaa tac cct gat gag atc gag tac atc ttc aag cca cca tgt gtg 145
 Lys Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Pro Cys Val
 35 40 45

tcc gtg tac aga tgt ggg ggt tgc tgc aat gac gaa ggg ctg gag tgc 193
 Ser Val Tyr Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys

50

55

60

atg aac acg tcc acg agc tac ctc agc aag acg ctg ttt gaa att aca 241
 Met Asn Thr Ser Thr Ser Tyr Leu Ser Lys Thr Leu Phe Glu Ile Thr
 65 70 75

gtg cct ctc tct caa ggg ccc aaa cca gtg aca atc agc ttt ctc cag 289
 Val Pro Leu Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Leu Gln
 80 85 90

cat aac aaa tgt gaa tgt aga cca aag aaa gat ttggtcttc 331
 His Asn Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp
 95 100 105

<210> 155

<211> 105

<212> PRT

<213> Artifizielle Sequenz

<400> 155

Ala His Tyr Asn Thr Glu Ile Leu Lys Ser Ile Asp Asn Glu Trp Arg
 1 5 10 15

Lys Thr Gln Cys Met Pro Arg Glu Val Cys Ile Asp Val Gly Lys Glu
 20 25 30

Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser Val
 35 40 45

Tyr Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Met Asn
 50 55 60

Thr Ser Thr Ser Tyr Leu Ser Lys Thr Leu Phe Glu Ile Thr Val Pro
 65 70 75 80

Leu Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Leu Gln His Asn
 85 90 95

Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp
 100 105

<210> 156

<211> 331

<212> DNA

<213> Artifizielle Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der artifiziellen Sequenz: Hybrid-DNA

<220>

<221> CDS

<222> (8)..(322)

<400> 156

ggatcct ggg cag aat cat cac gaa gtg gtg aaa tct att gat aat gag 49
 Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Ser Ile Asp Asn Glu
 1 5 10

tgg aga aag act cag tgc atg ccg atc gag aca ctg gtg gac atc ttc 97
 Trp Arg Lys Thr Gln Cys Met Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe
 15 20 25 30

DE 601 31 146 T2 2008.03.06

```

cag gaa ttt gga gtc gcg aca aac acc ttc ttc aag cca cca tgt gtg 145
Gln Glu Phe Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val
      35              40              45

tcc gtg tac aga tgt ggg ggt tgc tgc aat gac gaa ggg ctg gag tgc 193
Ser Val Tyr Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys
      50              55              60

atg aac acg tcc acg agc tac ctc agc aag acg ctg ttt gaa att aca 241
Met Asn Thr Ser Thr Ser Tyr Leu Ser Lys Thr Leu Phe Glu Ile Thr
      65              70              75

gtg cct ctc tct caa ggg ccc aaa cca gtg aca atc agc ttt gcc aat 289
Val Pro Leu Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Ala Asn
      80              85              90

cac act tcc tgc cga tgc atg tct aag ctg gat ttggtcttc 331
His Thr Ser Cys Arg Cys Met Ser Lys Leu Asp
      95              100              105

```

<210> 157
 <211> 105
 <212> PRT
 <213> Artifizielle Sequenz

```

<400> 157
Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Ser Ile Asp Asn Glu Trp Arg
  1              5              10              15

Lys Thr Gln Cys Met Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu
      20              25              30

Phe Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser Val
      35              40              45

Tyr Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Met Asn
      50              55              60

Thr Ser Thr Ser Tyr Leu Ser Lys Thr Leu Phe Glu Ile Thr Val Pro
      65              70              75              80

Leu Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Ala Asn His Thr
      85              90              95

Ser Cys Arg Cys Met Ser Lys Leu Asp
      100              105

```

<210> 158
 <211> 331
 <212> DNA
 <213> Artifizielle Sequenz

 <220>
 <223> Beschreibung der artifiziellen Sequenz: Hybrid-DNA

 <220>
 <221> CDS
 <222> (8)..(322)

 <400> 158

```

ggatcct gca cat tat aat acc gag atc ctg aaa tct att gat aat gag 49
      Ala His Tyr Asn Thr Glu Ile Leu Lys Ser Ile Asp Asn Glu
        1             5             10

tgg aga aag act cag tgc atg ccg atc gag aca ctg gtg gac atc ttc 97
Trp Arg Lys Thr Gln Cys Met Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe
  15             20             25             30

cag gaa ttt gga gtc gcg aca aac acc ttc ttc aag cca cca tgt gtg 145
Gln Glu Phe Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val
          35             40             45

tcc gtg tac aga tgt ggg ggt tgc tgc aat agt gag ggg ctg cag tgc 193
Ser Val Tyr Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys
          50             55             60

gtt ccc acc gag gag tcc aac atc acc atg cag att atg aga att aca 241
Val Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Thr
          65             70             75

gtg cct ctc tct caa ggg ccc aaa cca gtg aca atc agc ttt gcc aat 289
Val Pro Leu Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Ala Asn
          80             85             90

cac act tcc tgc cga tgc atg tct aag ctg gat ttggtcttc 331
His Thr Ser Cys Arg Cys Met Ser Lys Leu Asp
  95             100             105

```

<210> 159

<211> 105

<212> PRT

<213> Artifizielle Sequenz

<400> 159

```

Ala His Tyr Asn Thr Glu Ile Leu Lys Ser Ile Asp Asn Glu Trp Arg
  1             5             10             15

Lys Thr Gln Cys Met Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu
          20             25             30

Phe Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser Val
          35             40             45

Tyr Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys Val Pro
          50             55             60

Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Thr Val Pro
          65             70             75             80

Leu Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Ala Asn His Thr
          85             90             95

Ser Cys Arg Cys Met Ser Lys Leu Asp
          100             105

```

<210> 160

<211> 325

<212> DNA

<213> Artifizielle Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der artifiziellen Sequenz: Hybrid-DNA

<220>

<221> CDS

<222> (8)..(322)

<400> 160

```

ggatcct gca cat tat aat acc gag atc ctg aaa tct att gat aat gag   49
      Ala His Tyr Asn Thr Glu Ile Leu Lys Ser Ile Asp Asn Glu
        1              5              10

tgg aga aag act cag tgc atg ccg atc gag aca ctg gtg gac atc ttc   97
Trp Arg Lys Thr Gln Cys Met Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe
  15              20              25              30

cag gaa tac cct gat gag atc gag tac atc ttc aag cca cca tgt gtg   145
Gln Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Pro Cys Val
              35              40              45

tcc gtg tac aga tgt ggg ggt tgc tgc aat agt gag ggg ctg cag tgc   193
Ser Val Tyr Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys
              50              55              60

gtt ccc acc gag gag tcc aac atc acc atg cag att atg aga att aaa   241
Val Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys
        65              70              75

cct cac caa ggg cag cac atc gga gag atg agc ttt ctc cag cat aac   289
Pro His Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn
        80              85              90

aaa tgt gaa tgt aga cca aag aaa gat ttg gtc ttc                   325
Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Leu Val
  95              100              105

```

<210> 161

<211> 105

<212> PRT

<213> Artifizielle Sequenz

<400> 161

```

Ala His Tyr Asn Thr Glu Ile Leu Lys Ser Ile Asp Asn Glu Trp Arg
  1              5              10              15

Lys Thr Gln Cys Met Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu
        20              25              30

Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser Val
        35              40              45

Tyr Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys Val Pro
        50              55              60

Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His
        65              70              75              80

Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn Lys Cys
        85              90              95

Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Leu Val

```

100

105

<210> 162

<211> 322

<212> DNA

<213> Artifizielle Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der artifiziiellen Sequenz: Hybrid-DNA

<220>

<221> CDS

<222> (8)..(322)

<400> 162

```

ggatcct gca cat tat aat acc gag atc ctg aaa ttc atg gat gtc tat 49
      Ala His Tyr Asn Thr Glu Ile Leu Lys Phe Met Asp Val Tyr
        1             5             10

cag cgc agc tac tgc cat ccg atc gag aca ctg gtg gac atc ttc cag 97
Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln
  15             20             25             30

gaa ttt gga gtc gcg aca aac acc ttc ttc aag cca cca tgt gtg tcc 145
Glu Phe Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser
          35             40             45

gtg tac aga tgt ggg ggt tgc tgc aat agt gag ggg ctg cag tgc gtt 193
Val Tyr Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys Val
      50             55             60

ccc acc gag gag tcc aac atc acc atg cag att atg aga att aaa cct 241
Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro
      65             70             75

cac caa ggg cag cac atc gga gag atg agc ttt gcc aat cac act tcc 289
His Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Ala Asn His Thr Ser
      80             85             90

tgc cga tgc atg tct aag ctg gat ttg gtc ttc 322
Cys Arg Cys Met Ser Lys Leu Asp Leu Val Phe
  95             100             105

```

<210> 163

<211> 105

<212> PRT

<213> Artifizielle Sequenz

<400> 163

```

Ala His Tyr Asn Thr Glu Ile Leu Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg
  1             5             10             15

Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu Phe
      20             25             30

Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser Val Tyr
      35             40             45

Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys Val Pro Thr
      50             55             60

```

Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His Gln
 65 70 75 80

Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Ala Asn His Thr Ser Cys Arg
 85 90 95

Cys Met Ser Lys Leu Asp Leu Val Phe
 100 105

<210> 164

<211> 328

<212> DNA

<213> Artifizielle Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der artifiziiellen Sequenz: Hybrid-DNA

<220>

<221> CDS

<222> (8)..(322)

<400> 164

ggatcct gca cat tat aat acc gag atc ctg aaa ttc atg gat gtc tat 49
 Ala His Tyr Asn Thr Glu Ile Leu Lys Phe Met Asp Val Tyr
 1 5 10

cag cgc agc tac tgc cat ccg atc gag aca ctg gtg gac atc ttc cag 97
 Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln
 15 20 25 30

gaa ttt gga gtc gcg aca aac acc ttc ttc aag cca cca tgt gtg tcc 145
 Glu Phe Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser
 35 40 45

gtg tac aga tgt ggg ggt tgc tgc aat gac gaa ggg ctg gag tgc gtt 193
 Val Tyr Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val
 50 55 60

ccc acc gag gag tcc aac atc acc atg cag att atg aga att aca gtg 241
 Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Thr Val
 65 70 75

cct ctc tct caa ggg ccc aaa cca gtg aca atc agc ttt ctc cag cat 289
 Pro Leu Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Leu Gln His
 80 85 90

aac aaa tgt gaa tgt aga cca aag aaa gat ttg gtcttc 328
 Asn Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Leu
 95 100 105

<210> 165

<211> 105

<212> PRT

<213> Artifizielle Sequenz

<400> 165

Ala His Tyr Asn Thr Glu Ile Leu Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg
 1 5 10 15

Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu Phe
 20 25 30

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

<210> 166

<211> 328

<212> DNA

<213> Artifizuelle Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der artifizuellen Sequenz: Hybrid-DNA

<220>

<221> CDS

<222> (8)..(322)

<400> 166

ggatcct gca cat tat aat acc gag atc ctg aaa ttc atg gat gtc tat 49
 Ala His Tyr Asn Thr Glu Ile Leu Lys Phe Met Asp Val Tyr
 1 5 10

cag cgc agc tac tgc cat ccg atc gag aca ctg gtg gac atc ttc cag 97
 Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln
 15 20 25 30

gaa ttt gga gtc gcg aca aac acc ttc ttc aag cca cca tgt gtg tcc 145
 Glu Phe Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser
 35 40 45

gtg tac aga tgt ggg ggt tgc tgc aat agt gag ggg ctg cag tgc gtt 193
 Val Tyr Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys Val
 50 55 60

ccc acc gag gag tcc aac atc acc atg cag att atg aga att aca gtg 241
 Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Thr Val
 65 70 75

cct ctc tct caa ggg ccc aaa cca gtg aca atc agc ttt ctc cag cat 289
 Pro Leu Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Leu Gln His
 80 85 90

aac aaa tgt gaa tgt aga cca aag aaa gat ttg gtcttc 328
 Asn Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Leu
 95 100 105

<210> 167

<211> 105

<212> PRT

<213> Artifizuelle Sequenz

<400> 167

Ala His Tyr Asn Thr Glu Ile Leu Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg
 1 5 10 15

Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu Phe
 20 25 30

Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser Val Tyr
 35 40 45

Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys Val Pro Thr
 50 55 60

Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Thr Val Pro Leu
 65 70 75 80

Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Leu Gln His Asn Lys
 85 90 95

Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Leu
 100 105

<210> 168

<211> 328

<212> DNA

<213> Artifizielle Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der artifiziiellen Sequenz: Hybrid-DNA

<221> CDS

<222> (8)..(322)

<400> 168

ggatcct gca cat tat aat acc gag atc ctg aaa ttc atg gat gtc tat 49
 Ala His Tyr Asn Thr Glu Ile Leu Lys Phe Met Asp Val Tyr
 1 5 10

cag cgc agc tac tgc cat ccg atc gag aca ctg gtg gac atc ttc cag 97
 Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln
 15 20 25 30

gaa ttt gga gtc gcg aca aac acc ttc ttc aag cca cca tgt gtg tcc 145
 Glu Phe Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser
 35 40 45

gtg tac aga tgt ggg ggt tgc tgc aat gac gaa ggg ctg gag tgc gtt 193
 Val Tyr Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val
 50 55 60

ccc acc gag gag tcc aac atc acc atg cag att atg aga att aca gtg 241
 Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Thr Val
 65 70 75

cct ctc tct caa ggg ccc aaa cca gtg aca atc agc ttt gcc aat cac 289
 Pro Leu Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Ala Asn His
 80 85 90

act tcc tgc cga tgc atg tct aag ctg gat ttg gtcttc 328
 Thr Ser Cys Arg Cys Met Ser Lys Leu Asp Leu
 95 100 105

<210> 169
 <211> 105
 <212> PRT
 <213> Artifizielle Sequenz

<400> 169
 Ala His Tyr Asn Thr Glu Ile Leu Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg
 1 5 10 15
 Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu Phe
 20 25 30
 Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser Val Tyr
 35 40 45
 Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val Pro Thr
 50 55 60
 Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Thr Val Pro Leu
 65 70 75 80
 Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Ala Asn His Thr Ser
 85 90 95
 Cys Arg Cys Met Ser Lys Leu Asp Leu
 100 105

<210> 170
 <211> 328
 <212> DNA
 <213> Artifizielle Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der artifiziiellen Sequenz: Hybrid-DNA

<220>
 <221> CDS
 <222> (8)..(322)

<400> 170
 ggatcct gca cat tat aat acc gag atc ctg aaa ttc atg gat gtc tat 49
 Ala His Tyr Asn Thr Glu Ile Leu Lys Phe Met Asp Val Tyr
 1 5 10
 cag cgc agc tac tgc cat ccg atc gag aca ctg gtg gac atc ttc cag 97
 Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln
 15 20 25 30
 gaa tac cct gat gag atc gag tac atc ttc aag cca cca tgt gtg tcc 145
 Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser
 35 40 45
 gtg tac aga tgt ggg ggt tgc tgc aat agt gag ggg ctg cag tgc gtt 193
 Val Tyr Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys Val
 50 55 60
 ccc acc gag gag tcc aac atc acc atg cag att atg aga att aca gtg 241
 Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Thr Val
 65 70 75

cct ctc tct caa ggg ccc aaa cca gtg aca atc agc ttt gcc aat cac 289
 Pro Leu Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Ala Asn His
 80 85 90

act tcc tgc cga tgc atg tct aag ctg gat ttg gtcttc 328
 Thr Ser Cys Arg Cys Met Ser Lys Leu Asp Leu
 95 100 105

<210> 171

<211> 105

<212> PRT

<213> Artifizielle Sequenz

<400> 171

Ala His Tyr Asn Thr Glu Ile Leu Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg
 1 5 10 15

Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu Tyr
 20 25 30

Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser Val Tyr
 35 40 45

Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys Val Pro Thr
 50 55 60

Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Thr Val Pro Leu
 65 70 75 80

Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Ala Asn His Thr Ser
 85 90 95

Cys Arg Cys Met Ser Lys Leu Asp Leu
 100 105

<210> 172

<211> 328

<212> DNA

<213> Artifizielle Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der artifiziellen Sequenz: Hybrid-DNA

<220>

<221> CDS

<222> (8)..(322)

<400> 172

ggatcct gca cat tat aat acc gag atc ctg aaa ttc atg gat gtc tat 49
 Ala His Tyr Asn Thr Glu Ile Leu Lys Phe Met Asp Val Tyr
 1 5 10

cag cgc agc tac tgc cat ccg atc gag aca ctg gtg gac atc ttc cag 97
 Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln
 15 20 25 30

gaa ttt gga gtc gcg aca aac acc ttc ttc aag cca tcc tgc gtg ccc 145
 Glu Phe Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro
 35 40 45

ctg atg aga tgt ggg ggt tgc tgc aat gac gaa ggg ctg gag tgc gtt 193
 Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val
 50 55 60

ccc acc gag gag tcc aac atc acc atg cag att atg aga att aca gtg 241
 Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Thr Val
 65 70 75

cct ctc tct caa ggg ccc aaa cca gtg aca atc agc ttt ctc cag cat 289
 Pro Leu Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Leu Gln His
 80 85 90

aac aaa tgt gaa tgt aga cca aag aaa gat ttg gtcttc 328
 Asn Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Leu
 95 100 105

<210> 173

<211> 105

<212> PRT

<213> Artifizielle Sequenz

<400> 173

Ala His Tyr Asn Thr Glu Ile Leu Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg
 1 5 10 15

Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu Phe
 20 25 30

Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu Met
 35 40 45

Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val Pro Thr
 50 55 60

Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Thr Val Pro Leu
 65 70 75 80

Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Leu Gln His Asn Lys
 85 90 95

Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Leu
 100 105

<210> 174

<211> 328

<212> DNA

<213> Artifizielle Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der artifiziiellen Sequenz: Hybrid-DNA

<220>

<221> CDS

<222> (8)..(322)

<400> 174

ggatcct gca cat tat aat acc gag atc ctg aaa ttc atg gat gtc tat 49
 Ala His Tyr Asn Thr Glu Ile Leu Lys Phe Met Asp Val Tyr
 1 5 10

```

cag cgc agc tac tgc cat ccg atc gag aca ctg gtg gac atc ttc cag 97
Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln
15 20 25 30

gaa ttt gga gtc gcg aca aac acc ttc ttc aag cca tcc tgc gtg ccc 145
Glu Phe Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro
35 40 45

ctg atg aga tgt ggg ggt tgc tgc aat agt gag ggg ctg cag tgc gtt 193
Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys Val
50 55 60

ccc acc gag gag tcc aac atc acc atg cag att atg aga att aca gtg 241
Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Thr Val
65 70 75

cct ctc tct caa ggg ccc aaa cca gtg aca atc agc ttt ctc cag cat 289
Pro Leu Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Leu Gln His
80 85 90

aac aaa tgt gaa tgt aga cca aag aaa gat ttg gtcttc 328
Asn Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Leu
95 100 105

```

<210> 175
 <211> 105
 <212> PRT
 <213> Artifizielle Sequenz

```

<400> 175
Ala His Tyr Asn Thr Glu Ile Leu Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg
1 5 10 15

Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu Phe
20 25 30

Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu Met
35 40 45

Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys Val Pro Thr
50 55 60

Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Thr Val Pro Leu
65 70 75 80

Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Leu Gln His Asn Lys
85 90 95

Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Leu
100 105

```

Patentansprüche

1. Polypeptid, umfassend eine Aminosäuresequenz, die mindestens zu 95 % identisch mit den Aminosäuren 1–102 – wie in SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:59, SEQ ID NO:63 oder SEQ ID NO:163 dargelegt – ist, wobei das Polypeptid an mindestens einen Rezeptor bindet, der aus der Gruppe ausgewählt ist, bestehend aus humanem VEGFR-1, humanem VEGFR-2 und humanem VEGFR-3.

2. Polypeptid, umfassend eine Aminosäuresequenz, die mindestens zu 95 % identisch mit den Aminosäuren 1–104 – wie in SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:77, SEQ ID NO:153, SEQ ID NO:165, SEQ ID NO:167, SEQ ID NO:169, SEQ ID NO:173 oder SEQ ID NO:175 dargelegt – ist, wobei das Polypeptid an mindestens einen Rezeptor bindet, der aus der Gruppe ausgewählt ist, bestehend aus humanem VEGFR-1, humanem VEGFR-2 und humanem VEGFR-3.

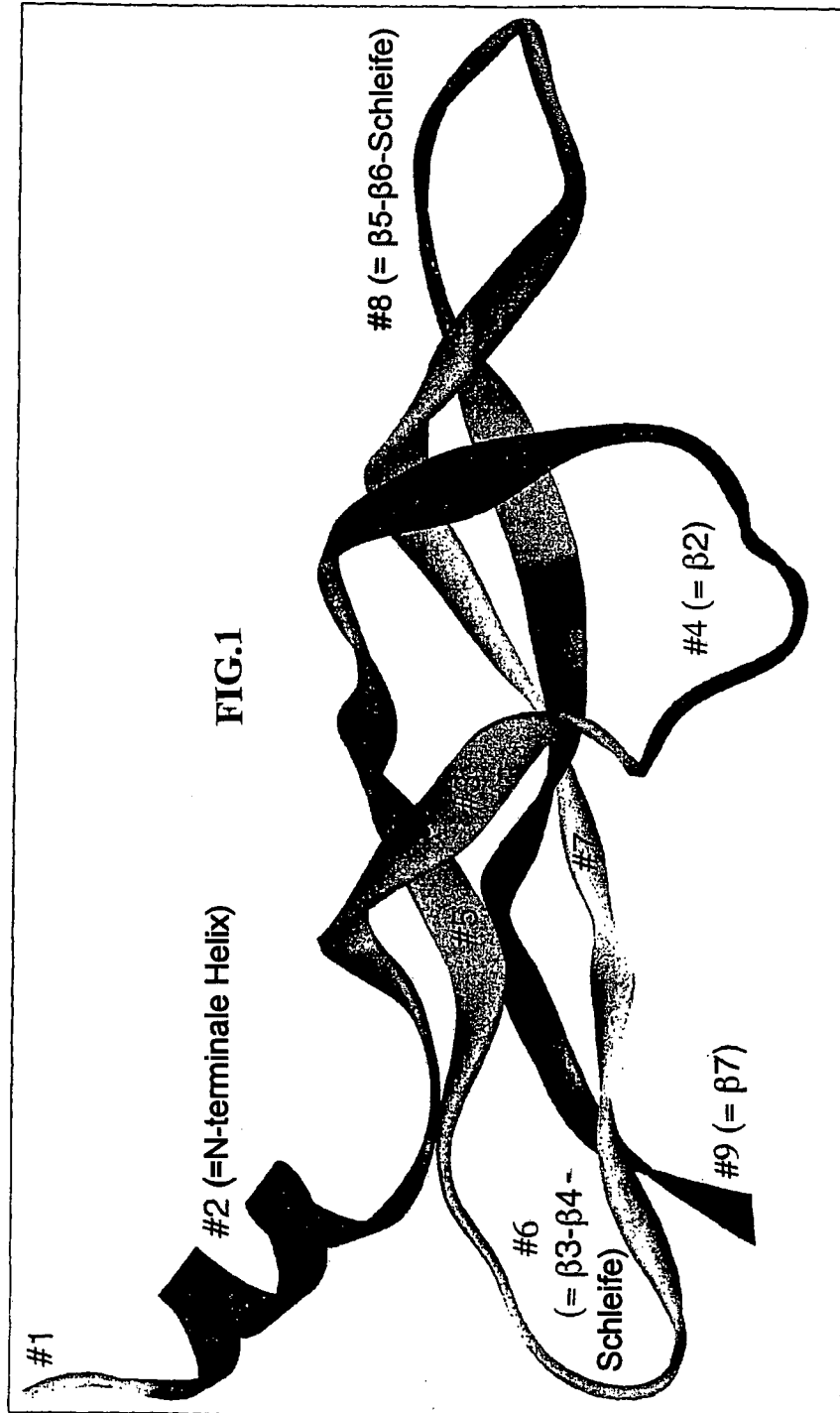
3. Polypeptid, umfassend eine Aminosäuresequenz, die mindestens zu 95 % identisch mit den Aminosäuren 1–105 – wie in SEQ ID NO:155, SEQ ID NO:157 oder SEQ ID NO:159 dargelegt – ist, wobei das Polypeptid an genau einen Rezeptor bindet, der aus der Gruppe ausgewählt ist, bestehend aus humanem VEGFR-1, humanem VEGFR-2 und humanem VEGFR-3.

4. Polypeptid, umfassend eine Aminosäuresequenz, die mindestens zu 95 % identisch mit den Aminosäuren 1–103 – wie in SEQ ID NO:161 dargelegt – ist, wobei das Polypeptid an den humanen VEGFR-1, humanen VEGFR-2 und humanen VEGFR-3 bindet.

5. Hybrid-Polypeptid, umfassend eine Aminosäuresequenz, die mindestens zu 95 % identisch mit dem Expressionsprodukt des Klon Nummer 11.9 (SEQ ID NO:433), 11.13 (SEQ ID NO:945), 12.16 (SEQ ID NO:1185), 13.9 (SEQ ID NO:465), 13.11 (SEQ ID NO:529), 13.13 (SEQ ID NO:977), 13.15 (SEQ ID NO:1041), 14.1 (SEQ ID NO:193), 14.5 (SEQ ID NO:705), 14.7 (SEQ ID NO:769), 22.3 (SEQ ID NO:303), 22.4 (SEQ ID NO:431), 23.12 (SEQ ID NO:671), 23.14 (SEQ ID NO:1119), 32.9 (SEQ ID NO:485), 32.11 (SEQ ID NO:549), 32.15 (SEQ ID NO:1061), 32.16 (SEQ ID NO:1189), 33.1 (SEQ ID NO:213), 33.3 (SEQ ID NO:277), 33.9 (SEQ ID NO:469), 43.1 (SEQ ID NO:219), 52.9 (SEQ ID NO:487), 52.11 (SEQ ID NO:551), 52.14 (SEQ ID NO:1127), 53.1 (SEQ ID NO:215), 53.7 (SEQ ID NO:791), 61.3 (SEQ ID NO:249), 62.1 (SEQ ID NO:233), 62.8 (SEQ ID NO:937), 62.10 (SEQ ID NO:617), 62.13 (SEQ ID NO:1001), 63.3 (SEQ ID NO:281), 63.6 (SEQ ID NO:857), 73.7 (SEQ ID NO:797), 73.15 (SEQ ID NO:1053), 74.8 (SEQ ID NO:909), 74.10 (SEQ ID NO:589), 74.12 (SEQ ID NO:653), 81.9 (SEQ ID NO:435), 81.13 (SEQ ID NO:947), 82.5 (SEQ ID NO:739), 82.14 (SEQ ID NO:1123), 82.16 (SEQ ID NO:1187), 83.9 (SEQ ID NO:467), 83.13 (SEQ ID NO:979), 84.1 (SEQ ID NO:195) oder 84.5 (SEQ ID NO:707) ist, wobei das Polypeptid an genau einen Rezeptor bindet, der aus der Gruppe ausgewählt ist, bestehend aus humanem VEGFR-1, humanem VEGFR-2 und humanem VEGFR-3.

6. Polynukleotid, Vektor oder Wirtszelle, umfassend eine Nukleotidsequenz, kodierend für ein Polypeptid nach einem der Ansprüche 1–5.

Es folgen 7 Blatt Zeichnungen



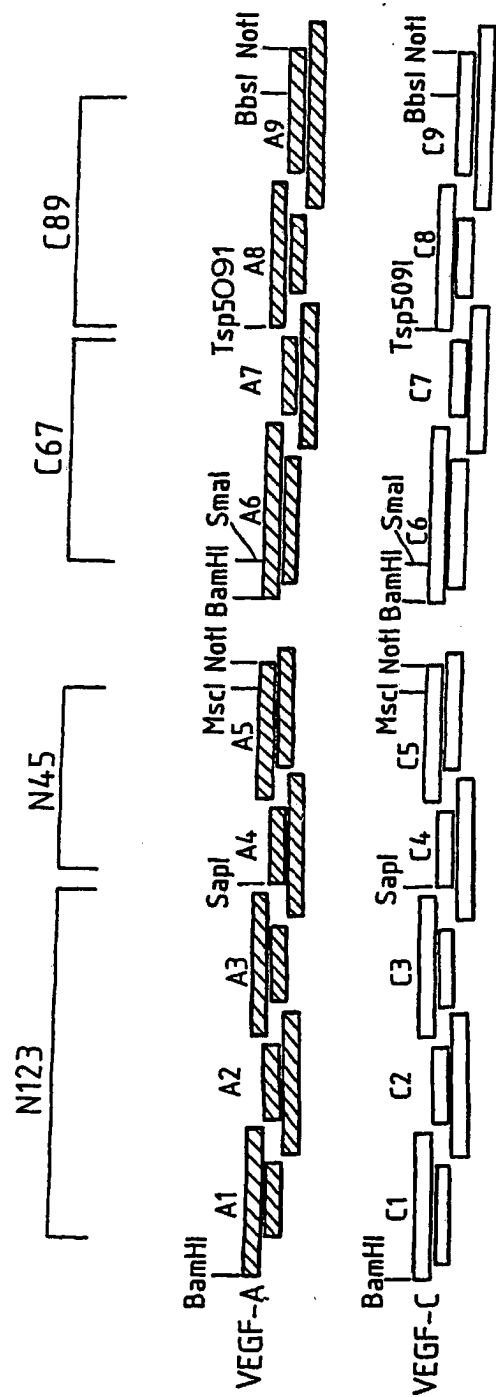


FIG. 2

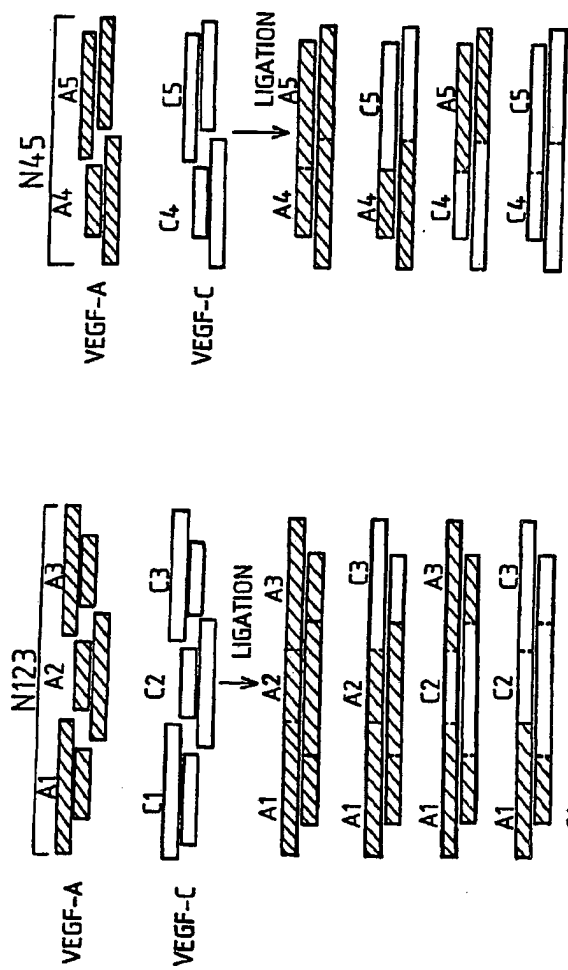


FIG. 4

FIG. 3

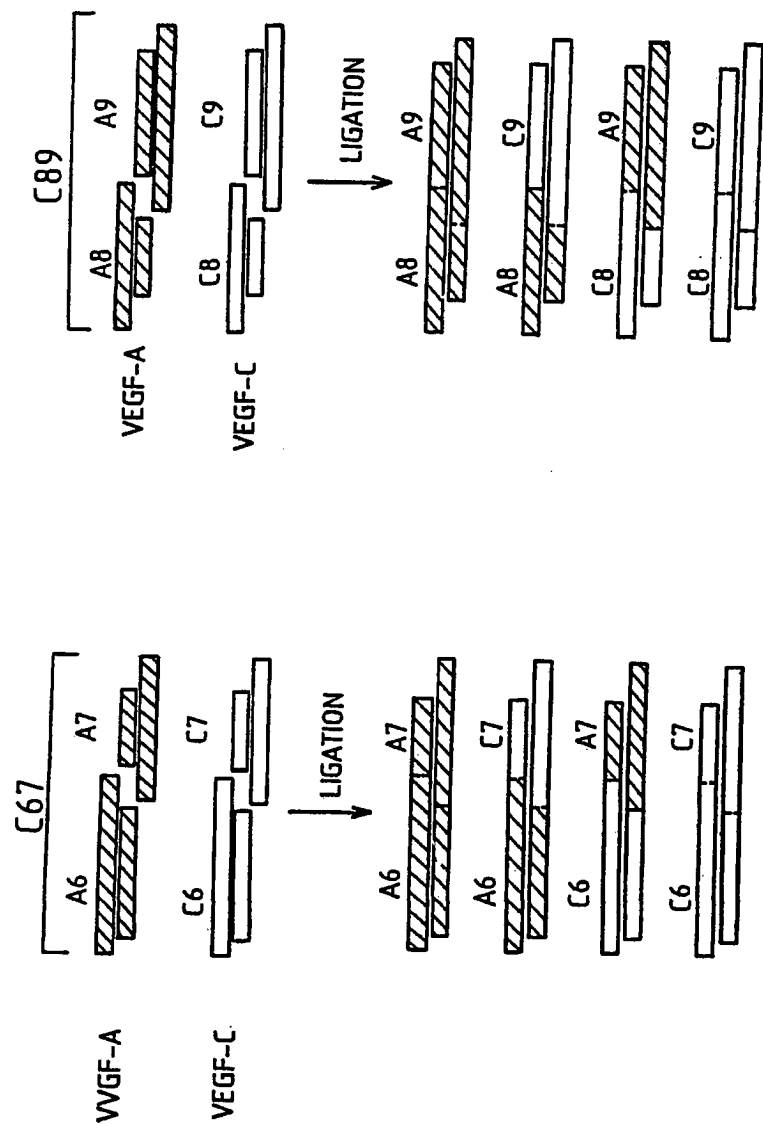


FIG. 5

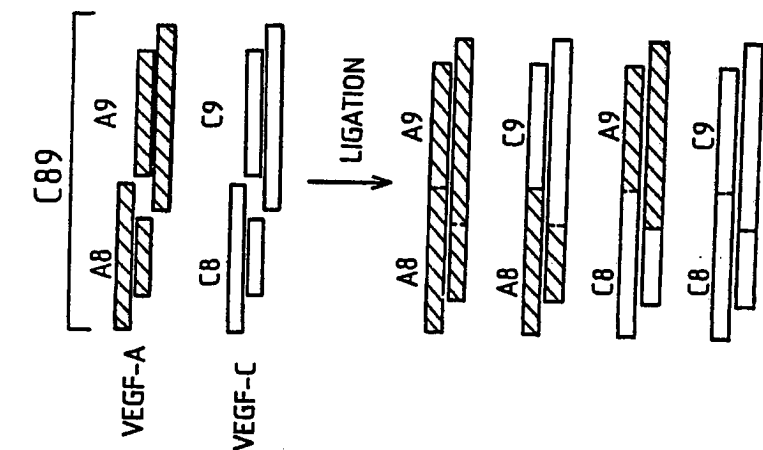
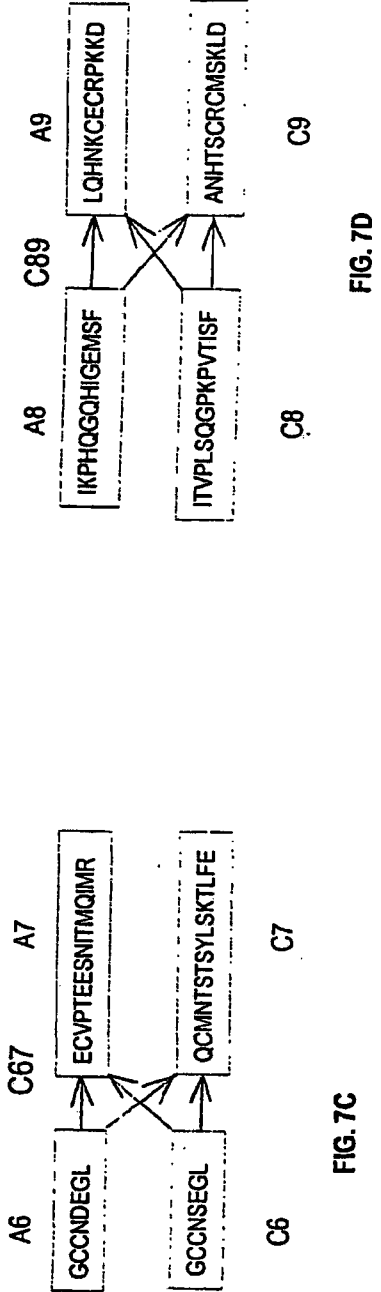
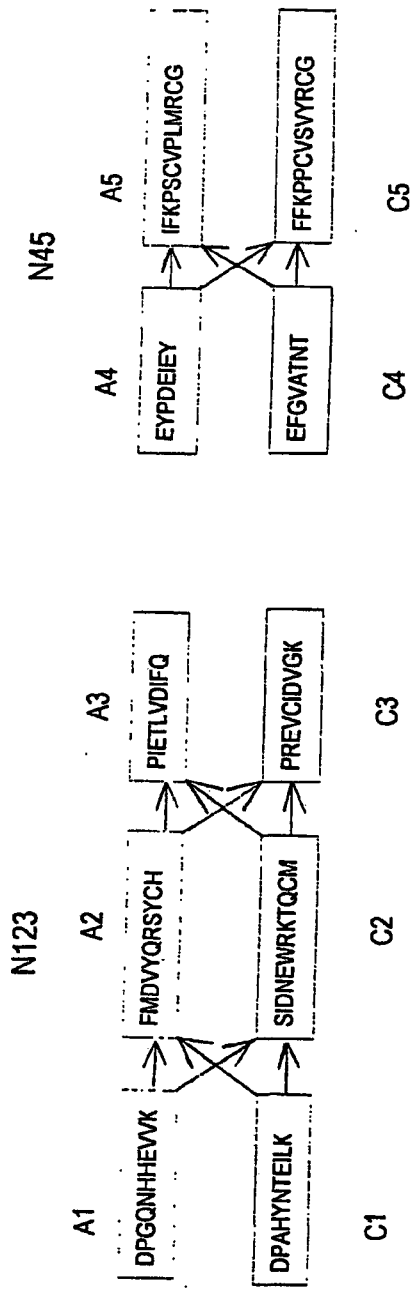
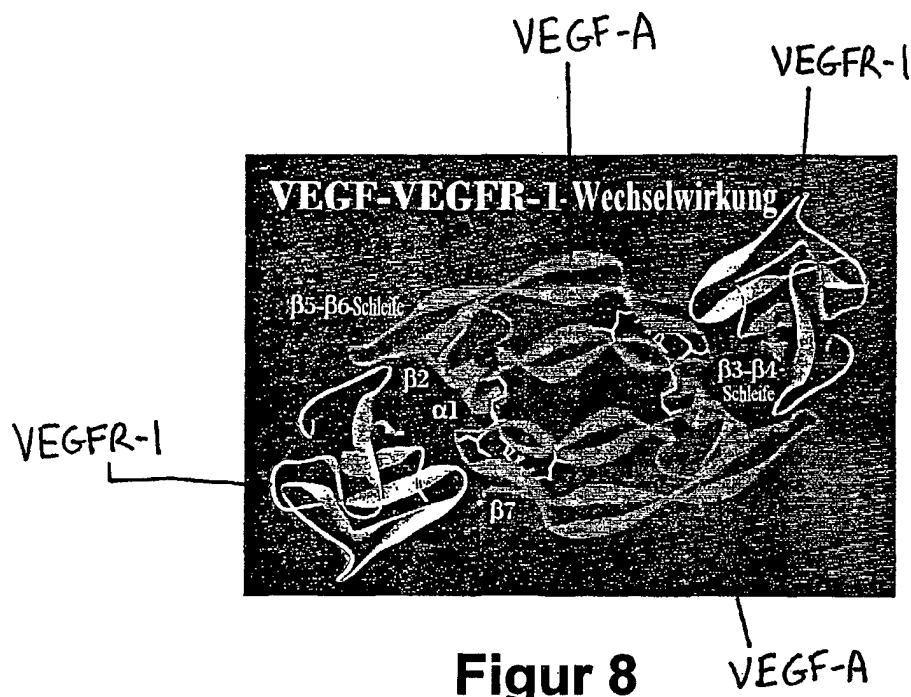
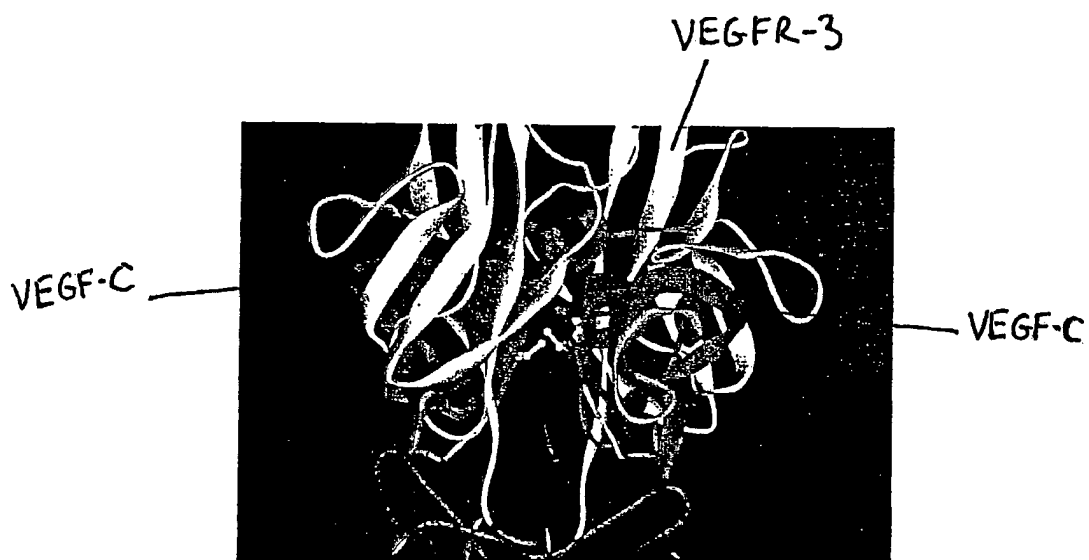


FIG. 6

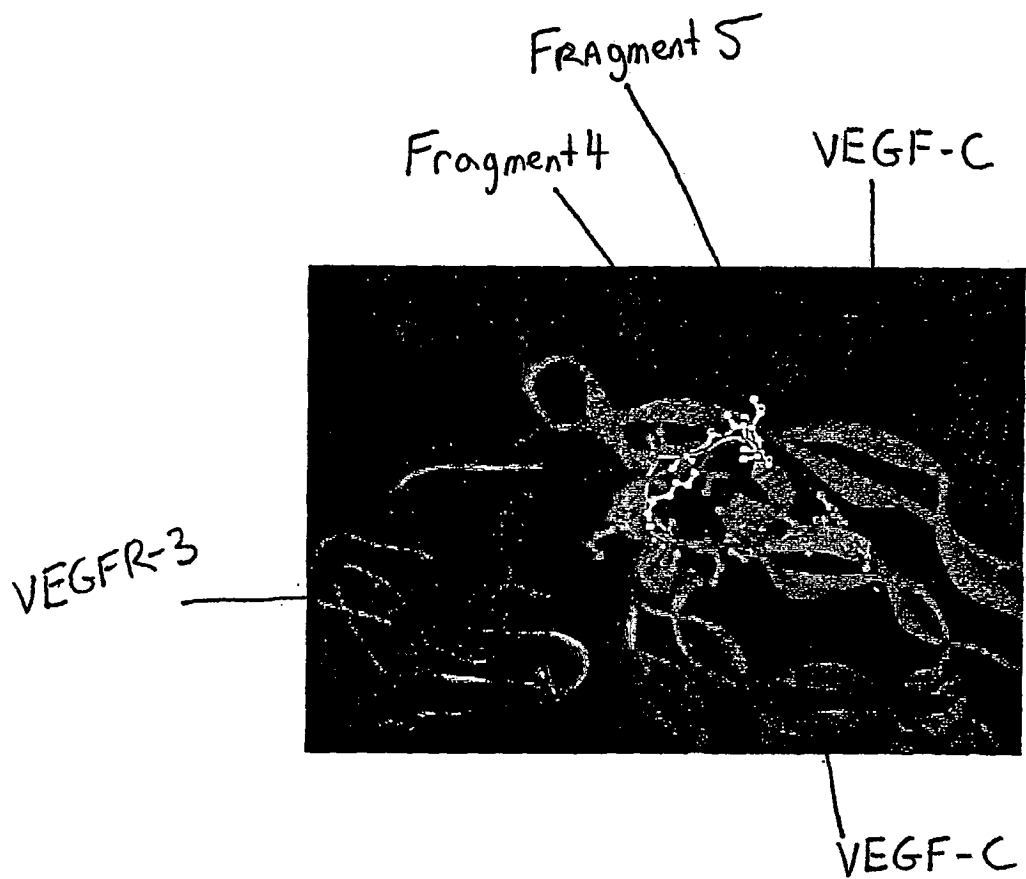




Figur 8



Figur 9



Figur 10