



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 698 38 888 T2 2008.12.11

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 1 650 219 B1

(51) Int Cl.⁸: C07K 1/00 (2006.01)

(21) Deutsches Aktenzeichen: 698 38 888.7

(96) Europäisches Aktenzeichen: 05 023 238.8

(96) Europäischer Anmeldetag: 07.10.1998

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 26.04.2006

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: 19.12.2007

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 11.12.2008

(30) Unionspriorität:

62250 P	17.10.1997	US
65311 P	13.11.1997	US
83322 P	28.04.1998	US
90863 P	26.06.1998	US
105413	26.06.1998	US

(73) Patentinhaber:

Genentech, Inc., South San Francisco, Calif., US

(74) Vertreter:

LEINWEBER & ZIMMERMANN, 80331 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

Goddard, Audrey, San Francisco CA 94131, US;
Godowski, Paul J., Burlingame CA 94010, US;
Gurney, Austin L., San Francisco, CA 94114, US;
Mark, Melanie R., Burlingame, CA 94010, US;
Yang, Ruey-Bing, San Mateo, CA 94403, US

(54) Bezeichnung: Menschliche Toll-Homologe

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 eingelebt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

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

Beschreibung**GEBIET DER ERFINDUNG**

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft allgemein die Identifizierung und Isolierung von neuen, hierin als DNA47361 bezeichneten DNAs, und die rekombinante Produktion neuer menschlicher (als PRO385 bezeichneter) Toll-Homologe, für welche diese DNAs kodieren.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0002] Membrangebundene Proteine und Rezeptoren können eine wichtige Rolle bei der Ausbildung, Differenzierung und Erhaltung vielzelliger Organismen spielen. Das Schicksal vieler individueller Zellen, z. B. die Vermehrung, Migration, Differenzierung oder Wechselwirkung mit anderen Zellen ist typischerweise von Informationen bestimmt, die von anderen Zellen und/oder aus der unmittelbaren Umgebung erhalten werden. Diese Informationen werden häufig von sekretierten Polypeptiden (beispielsweise mitogenen Faktoren, Überlebensfaktoren, zytotoxischen Faktoren, Differenzierungsfaktoren, Neuropeptiden und Hormonen) übertragen, die dann wieder von verschiedenen Zellrezeptoren oder membrangebundenen Proteinen erhalten und interpretiert werden. Derartige membrangebundene Proteine und Zellrezeptoren umfassen, sind jedoch nicht eingeschränkt auf Cytokinrezeptoren, Rezeptorkinasen, Rezeptorphosphatasen, an Zell-Zell-Wechselwirkungen beteiligte Rezeptoren und Zelladhäsionsmoleküle, wie z. B. Selectine und Integrine. Zum Beispiel wird die Übertragung von Signalen, die Zellwachstum und Differenzierung regulieren, zum Teil durch Phosphorylierung verschiedener Zellproteine reguliert. Proteintyrosinkinasen – Enzyme, die diesen Prozess katalysieren – können ebenfalls als Wachstumsfaktorrezeptoren agieren. Beispiele umfassen Fibroblastenwachstumsfaktor-Rezeptor und Nervenwachstumsfaktor-Rezeptor.

[0003] Membrangebundene Proteine und Rezeptormoleküle haben verschiedene industrielle Anwendungsmöglichkeiten, einschließlich als pharmazeutische und diagnostische Mittel. Rezeptor-Immunoadhäsine können beispielsweise als therapeutische Mittel eingesetzt werden, um die Rezeptor-Ligand-Wechselwirkung zu blockieren. Die membrangebundenen Proteine können außerdem für das Screening von potentiellen Peptid-Inhibitoren oder kleinen Inhibitor-Molekülen der maßgeblichen Rezeptor/Ligand-Wechselwirkung eingesetzt werden.

[0004] Es werden von der Industrie sowie in der Wissenschaft Anstrengungen unternommen, neue native Rezeptorproteine zu identifizieren. Viele Anstrengungen konzentrieren sich auf das Screening von rekombinanten Säugetier-DNA-Bibliotheken, um die kodierenden Sequenzen für neue Rezeptorproteine zu identifizieren.

[0005] Die Klonierung des Toll-Gens von *Drosophila*, eines Prädeterminations-Gens, das eine zentrale Rolle bei der Etablierung des embryonalen, dorsal-ventralen Musters spielt, ist von Hashimoto et al., Cell 52, 269–279 (1988) beschrieben worden. Das *Drosophila*-Toll-Gen kodiert für ein integrales Membranprotein mit einer extrazytoplasmatischen Domäne von 803 Aminosäuren und einer zytoplasmatischen Domäne von 269 Aminosäuren. Die extrazytoplasmatische Domäne weist ein potentielles membran durchdringendes Segment auf und enthält mehrere Kopien eines an Leucin reichen Segments, eines Strukturmotivs, das sich in vielen Transmembranproteinen findet. Das Toll-Protein steuert die Bildung des dorsal-ventralen Musters in *Drosophila*-Embryos und aktiviert den Transkriptionsfaktor Dorsal bei Bindung an seinen Liganden Spätzle. (Morisato und Anderson, Cell 76, 677–688 (1994).) In der adulten *Drosophila* nimmt der Toll/Dorsal-Signalweg an der gegen Pilze gerichteten Immunantwort teil. (Lenaitre et al., Cell 86, 973–983 (1996)).

[0006] Ein menschliches Homolog des *Drosophila*-Toll-Proteins ist von Medzhitov et al., Nature 388, 394–397 (1997) beschrieben worden. Dieses menschliche Toll ist wie das *Drosophila*-Toll ein Transmembranprotein des Typs I mit einer extrazellulären Domäne bestehend aus 21 tandemwiederholten, an Leucin reichen Motiven (an Leucin reiche Region – LRR), die durch eine Nicht-LRR-Region voneinander getrennt sind, und einer zytoplasmatischen Domäne, die zur zytoplasmatischen Domäne des menschlichen Interleukin-1-(IL-1)-Rezeptors homolog ist. Eine konstitutiv aktive Mutante des menschlichen, in menschliche Zelllinien transfizierten Tolls erwies sich als fähig, die Aktivierung von NF-κB und die Expression von NF-κB-gesteuerten Genen für die Entzündungs-Cytokine IL-1, IL-6 und IL-8, sowie die Expression des konstimulatorischen Moleküls B7.1, das für die Aktivierung nativer T-Zellen erforderlich ist, zu induzieren. Es ist vorgeschlagen worden, das Toll in Wirbeltieren als nicht-klonaler Rezeptor des Immunsystems fungiert, der Signale zur Aktivierung einer angeborenen sowie einer adaptiven Immunantwort in Wirbeltieren auslösen kann. Das von Medzhitov et al. (siehe oben) beschriebene menschliche Toll-Gen wurde am stärksten in Milz und Peripherblut-Leukozyten (PBL) exprimiert, und die Autoren schlugen vor, dass seine Expression in anderen Geweben auf die Gegenwart von Makropha-

gen und dendritischen Zeilen zurückzuführen sein könnten, in denen es als Frühwarnsystem für Infektionen agieren könnte. Die öffentliche GenBank-Datenbank enthält die folgenden Toll-Sequenzen: Tollt (DNAX# HSU88540-1, die mit der zufallssequenzierten Volllängen-cDNA #HUMRSC786-1 identisch ist); Toll2 (DNAX# HSU88871-1); Toll3 (DNAX# HSU88879-1); und Toll4 (DNAX# HSU88880-1, die mit der von Medzhitov et al. (siehe oben) beschriebenen Sequenz identisch ist). Eine Toll-Teilsequenz (Toll5) ist von GenBank unter DNAX# HSU88881-1 verfügbar.

[0007] Weitere menschliche Homologe des Drosophila-Toll-Proteins, die als Toll-artige Rezeptoren (huTLRs1-5) bezeichnet werden, wurden kürzlich kloniert und erwiesen sich als das Spiegelbild der topographischen Struktur des Drosophila-Gegenstücks (Rock et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 588–593 (1998)). Die Überexpression einer konstitutiv aktiven Mutante von einem der menschlichen TLR (Toll-Protein-Homolog – Medzhitov et al. (siehe oben); TLR4 – Rock et al. (siehe oben)) führt zur Aktivierung von NF-κB und der Induktion der Entzündungs-Cytokine und konstimulatorischen Moleküle. Medzhitov et al. (siehe oben).

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0008] Die Anmelder haben einen neuen cDNA-Klon identifiziert, der für neue menschliche Toll-Polypeptide kodiert, die in der vorliegenden Erfindung als PRO285 (kodiert von DNA40021), PRO286 (kodiert von DNA42668) und PRO358 (kodiert von DNA47361) bezeichnet werden.

[0009] In einer ihrer Ausführungsformen stellt die Erfindung ein isoliertes Nucleinsäuremolekül bereit, das eine DNA umfasst, die für ein Polypeptid kodiert, das zumindest 80% Sequenzidentität, vorzugsweise zumindest 95% Sequenzidentität mit (a) einem DNA-Molekül aufweist, das für ein PRO358-Polypeptid kodiert, das die Aminosäurereste 20 bis 811 aus **Fig. 12A–B** (Seq.-ID Nr. 13) aufweist, oder zum Komplement des DNA-Moleküls. Das komplementäre DNA-Molekül bleibt vorzugsweise unter zumindest mäßig stringenten und, gegebenenfalls, unter hochstringenten Bedingungen stabil an eine derartige kodierende Nucleinsäuresequenz gebunden.

[0010] In einer weiteren Ausführungsform umfasst das isolierte Nucleinsäuremolekül ein Polynucleotid, das zumindest 95% Sequenzidentität mit einem Polynucleotid aufweist, das für ein Polypeptid kodiert, das die Sequenz der Aminosäuren 1 bis 811 aus **Fig. 12A–B** (Seq.-ID Nr. 13) oder das Komplement des DNA-Moleküls umfasst.

[0011] In einer speziellen Ausführungsform stellt die Erfindung ein isoliertes Nucleinsäuremolekül bereit, das DNA umfasst, die für native PRO358-Polypeptide oder Varianten davon mit oder ohne die N-terminale Signalsequenz und mit oder ohne die Transmembranregionen der entsprechenden Sequenzen voller Länge kodiert. In einem ihrer Aspekte umfasst die isolierte Nucleinsäure DNA, die für ein reifes, natives PRO358-Polypeptid voller Länge kodiert, das die Aminosäurereste 1 bis 811 aus **Fig. 12A–B** (Seq.-ID Nr. 13) aufweist oder komplementär zu einer derartigen kodierenden Nucleinsäuresequenz ist. In einem weiteren Aspekt betrifft die Erfindung ein isoliertes Nucleinsäuremolekül, das für ein natives PRO358-Polypeptid ohne eine N-terminale Signalsequenz kodierende DNA umfasst oder komplementär zu einer derartigen kodierenden Nucleinsäuresequenz ist. In noch einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung Nucleinsäure, die für inaktivierte Formen oder für Formen der nativen PRO385-Proteine voller Länge kodiert, bei denen die Transmembrandomäne deletiert ist.

[0012] In einem weiteren Aspekt betrifft die Erfindung ein isoliertes Nucleinsäuremolekül, das für ein PRO358-Polypeptid kodiert, das DNA umfasst, die an das Komplement der Nucleinsäure zwischen den Resten von 111 bis einschließlich 2544 aus **Fig. 13A–B** (Seq.-ID Nr. 14) hybridisiert. Vorzugsweise tritt die Hybridisierung unter stringenten Hybridisierungs- und Waschbedingungen auf.

[0013] In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung umfasst das isolierte Nucleinsäuremolekül den am 7. November 1997 unter der ATCC-Nummer 209431 hinterlegten Klon (DNA 47361-1249).

[0014] In noch einer weiteren Ausführungsform stellt die Erfindung einen Vektor bereit, der DNA umfasst, die für PRO358-Polypeptide oder ihre in den Ansprüchen dargelegten Varianten kodiert. Folglich kann der Vektor jegliche der hierin oben definierten isolierten Nucleinsäuremoleküle umfassen.

[0015] In einer besonderen Ausführungsform stellt die Erfindung einen Vektor bereit, der ein Polynucleotid umfasst, das zumindest etwa 80% Sequenzidentität aufweist, vorzugsweise zumindest etwa 85% Sequenzidentität, noch bevorzugter zumindest etwa 90% Sequenzidentität, am bevorzugtesten zumindest etwa 95%

Sequenzidentität mit einem Polynucleotid, das für ein Polynucleotid kodiert, das die Sequenz der Aminosäuren 20 bis 811 aus **Fig. 12A-B** (Seq.-ID Nr. 13) oder das Komplement eines solchen Polynucleotids umfasst. In einer besonderen Ausführungsform umfasst der Vektor DNA, die für das neue Toll-Homolog (PRO358) mit oder ohne die N-terminalen Signalsequenz (etwa Aminosäuren 1 bis 19) oder eine Transmembrandomäne (etwa Aminosäuren 576–595), deletierte oder inaktivierte Variante davon oder die extrazelluläre Domäne (etwa Aminosäuren 20 bis 595) des reifen Proteins oder ein Protein kodiert, das eine beliebige dieser Sequenzen umfasst. Eine Wirtszelle, die einen solchen Vektor umfasst, wird ebenfalls bereitgestellt.

[0016] Eine einen derartigen Vektor enthaltende Wirtszelle wird ebenfalls bereitgestellt. Beispielhaft können die Wirtszellen CHO-Zellen, E. coli oder Hefe sein.

[0017] Außerdem wird ein Verfahren zur Herstellung von PRO358-Polypeptiden bereitgestellt und umfasst das Kultivieren von Wirtszellen unter Bedingungen, die zur Expression von PRO358 und Gewinnung von PRO358 aus der Zellkultur geeignet sind.

[0018] In einer weiteren Ausführungsform stellt die Erfindung isolierte PRO358-Polypeptide bereit. Die Erfindung stellt ein isoliertes PRO358-Polypeptid nativer Sequenz oder Varianten davon bereit. Insbesondere stellt die Erfindung ein isoliertes PRO358-Polypeptid nativer Sequenz bereit, die in bestimmten Ausführungsformen die Aminosäuresequenz umfasst, die Reste 20 bis 575 oder 20 bis 811 oder 1 bis 811 aus **Fig. 12A-B** (Seq.-ID Nr. 13) umfasst.

[0019] In einer weiteren Ausführungsform stellt die Erfindung Hybridmoleküle bereit, die PRO358-Polypeptide umfassen, die an eine heterologe Polypeptid- oder Aminosäuresequenz fusioniert sind. Ein Beispiel eines derartigen Hybridmoleküls umfasst ein PRO358-Polypeptid, das an eine Epitopmarkersequenz oder an eine Fc-Region eines Immunglobulins fusioniert ist. Ein Beispiel eines derartigen Hybridmoleküls umfasst ein PRO358-Polypeptid (einschließlich seiner Varianten, bei denen das Signalpeptid und/oder die Transmembrandomäne und gegebenenfalls die intrazelluläre Domäne deletiert sind), das an eine Epitopmarkersequenz oder an eine Fc-Region eines Immunglobulins fusioniert ist. In einer bevorzugten Ausführungsform enthält die Fusion die extrazelluläre Domäne von PRO285, fusioniert an eine konstante Immunglobulinregion, die zumindest die CH2- und CH3-Domänen umfasst.

[0020] In einer weiteren Ausführungsform stellt die Erfindung einen Antikörper bereit, der spezifisch an PRO358-Polypeptide bindet. Gegebenenfalls ist der Antikörper ein monoklonaler Antikörper. Die Erfindung umfasst speziell Antikörper mit Doppelspezifitäten, z. B. bispezifische Antikörper, die mehr als ein Toll-Polypeptid binden.

[0021] Die Erfindung betrifft außerdem eine Zusammensetzung, die einen spezifisch an ein PRO358-Polypeptid bindenden Antikörper in Kombination mit einem pharmazeutisch annehmbaren Träger umfasst, sowie die medizinischen Verwendungen derartiger Antikörper, insbesondere zur Behandlung von septischem Schock.

KURZBESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0022] **Fig. 1** zeigt das Expressionsmuster des menschlichen Toll-Rezeptors 2 (huTLR2) (Rock et al., siehe oben). a. Northern-Analyse von mehreren menschlichen, mit einer TLR2-Sonde sondierten Immungeweben. PBL, Peripherblut-Leukozyten. b. Angereicherte Expression von TLR2- in Makrophagen und transkriptionelle Up-Regulation von TLR2 als Reaktion auf LPS. Quantitative RT-PCR wurde verwendet, um die relativen Expressionsstärken von TLR2 in PBL, T-Zellen, Makrophagen (MΦ) und LPS-stimulierten Makrophagen (MΦ + LPS) zu ermitteln.

[0023] **Fig. 2.** TLR2 vermittelt LPS-induzierte Signalisierung. a. 293-Zellen, die TLR2 stabil exprimieren, erwerben LPS-Reaktionsfähigkeit. Entweder eine Population stabiler, gD.TLR2 exprimierender Klone (293-TLR2 pop1) oder ein einzelner Klon von gD.TLR2 exprimierenden Zellen (293-TLR2-Klon 1) oder Kontrollzellen (293-MSCV), die mit dem Expressionsvektor alleine stabil transfiziert waren, wurden mit pGL3.ELAM.tk vorübergehend transfiziert und dann mit 1 µg/ml 055:B5-Enhancer für 6 Stunden mit oder ohne LBP in serumfreiem Medium stimuliert. Die Aktivierung des ELAM-Enhancers wurde wie in den Beispielen beschrieben gemessen. Es wurden Ergebnisse aus zwei unabhängigen Experimenten erlangt. Keine Stimulierung wurde bei Verwendung des Kontroll-Reporterplasmids beobachtet, dem der ELAM-Enhancer fehlte (Daten nicht dargestellt). Die Expression des Reporterplasmids war in unbehandelten Zellen oder in mit LBP alleine behandelten Zellen gleich (Daten nicht dargestellt). b. Western-Blot, der die Expression von epitopmarkiertem TLR2 in 293-Zellen

zeigt. c. Zeitverlauf der TLR2-abhängigen, LPS-induzierten Aktivierung und Translokation von NF-κB. Kernextrakte wurden hergestellt aus Zellen, die mit 055:B5-LPS (10 µg/ml) und LBP für die angegebenen Zeiten behandelt waren (oben), oder aus Zellen, die mit 1 µM Cycloheximid (CHX) für 1 Stunde vorbehandelt und mit 1 µg/ml LPS für 1 Stunde in Gegenwart von LBP in serumfreiem Medium stimuliert waren (unten). d. Wirkung von mCD14 auf die NF-κB-Aktivierung durch TLR2. Vektor-Kontrolle (193-MSCV) oder 293-TLR2-pop1-Zellen wurden mit dem Reporterplasmid und einem CD14-Expressionsvektor (+mCD14) bzw. Vektor-Kontrolle (-mCD14) transfiziert. Nach 24 Stunden wurden die transfizierten Zellen mit 055:B5-LPS für 6 Stunden in Gegenwart von LBP in serumfreiem Medium stimuliert. Die dargestellten Daten repräsentieren drei unabhängige Experimente.

[0024] [Fig. 3](#). Domänenfunktion von TLR2 bei der Signalisierung. a. Illustrationen von verschiedenen TLR2-Konstrukten. TLR2-WT, die epitopmarkierte Form von TLR2 voller Länge, TLR2-Δ1 und -Δ2 stellen eine von 13 bzw. 141 Aminosäuren am Carboxylterminus dar. CD4-TLR2, ein menschliches CD4-TLR2-Hybrid, bei dem die extrazelluläre Domäne von TLR2 durch die Aminosäuren 1–205 von menschlichem CD4 ersetzt ist. EDC, extrazelluläre Domäne; TM, Transmembranregion; ICD, intrazelluläre Domäne. b. C-terminale Reste, die für die IL-1R- und TLR2-Signalübertragung entscheidend sind. Restenummern sind an der rechten Seite jedes Proteins dargestellt. Der Pfeil bezeichnet die Position der TLR2-Δ1-Trunkation. *, Reste, die für die IL-1R-Signalübertragung entscheidend sind (Heguy et al., J. Biol. Chem. 267, 2605–2609 (1992); Croston et al., J. Biol. Chem. 270, 16514–16517 (1995)). I, identische Aminosäure;;, konservative Änderungen. c. TLR-R2-Varianten sind unfähig, NF-κB als Reaktion auf LPS und LBP zu induzieren. 293-Zellen wurden vorübergehend mit pGL3.ELAM.tk und Expressionsvektoren transfiziert, die für TLR2 oder TLR2-Varianten voller Länge wie angegeben kodieren. Die Zellen wurden außerdem mit einem CD14-Expressionsplasmid (+mCD14) oder mit einem Kontrollplasmid (-mCD14) transfiziert. Die gleich starke Expression jedes Proteins wird mittels Western-Blot unter Verwendung von entweder Anti-gD- oder CD4-Antikörper bestätigt (unten). Der Luciferase-Test wurde wie in den Beispielen beschrieben durchgeführt. Die Daten wurden aus Doppelexperimenten erhalten.

[0025] [Fig. 4](#). Hohe Potenz von *E. coli* K12 LPS (LCD25) und seine Bindung an TLR2. a. Dosis-Reaktions-Kurve verschiedener LPS-Präparate. b. Spezifische Wechselwirkung von [³H]-LPS (LCD25) mit der extrazellulären Domäne von TLR2. Spezifische Bindung wurde an TLR2-Fc, nicht jedoch an entweder Fc alleine oder an Fusionsproteine beobachtet, welche die extrazellulären Domänen von Rse, Axl, Her2 oder Her4 enthielten. Die Bindung an TLR2-Fc trat spezifisch mit LCD25-LPS in Konkurrenz, nicht jedoch mit detoxifiziertem LPS.

[0026] [Fig. 5](#). TLR2 ist für die LPS-induzierte IL-8-Expression erforderlich. 293-MSCV-Vektorkontroll- und 293-TLR2-Zellen, die mCD14 vorübergehend exprimierten, wurden mit LBP alleine oder gemeinsam mit dem angegebenen Typ von LPS bei Konzentrationen von 1 µg/ml in serumfreiem Medium für 6 Stunden stimuliert. Es wurden gleiche Mengen an poly-(A)-RNAs für die Northern-Analyse verwendet.

[0027] [Fig. 6](#). Nucleotidsequenz, die für huTLR2 kodiert (Seq.-ID Nr. 11) kodiert.

[0028] [Fig. 7](#). Aminosäuresequenz von huTLR2 (Seq.-ID Nr. 12).

[0029] [Fig. 8](#) zeigt die abgeleitete Aminosäuresequenz eines menschlichen Toll-Proteins nativer Sequenz, die PRO358 genannt wird (Seq.-ID Nr. 13). In der Figur bilden die Aminosäuren 1 bis 19 eine mutmaßliche Signalsequenz, die Aminosäuren 20 bis 575 sind die mutmaßliche extrazelluläre Domäne, wobei die Aminosäuren 20 bis 54 die Eigenschaften von leucinreichen Wiederholungen aufweisen, die Aminosäuren 576 bis 595 sind eine mutmaßliche Transmembrandomäne, während die Aminosäuren 596 bis 811 eine intrazelluläre Domäne bilden.

[0030] [Fig. 9A–B](#) (Seq.-ID Nr. 14) zeigen die Nucleotidsequenz einer menschlichen Toll-Protein-cDNA nativer Sequenz, die DNA47361 genannt wird, die für das reife, Volllängen-Toll-Protein PRO358 kodiert. Da die dargestellte Sequenz gewisse äußere Sequenzen enthält, ist das ATG-Startcodon unterstrichen und das TAA-Stopcodon eingeklemmt.

AUSFÜHRLICHE BESCHREIBUNG DER BEVORZUGTEN AUSFÜHRUNGSFORMEN

I. Definitionen

[0031] Die Ausdrücke „PRO358-Polypeptid“, „PRO358“, „PRO358-Tollhomolog“ und grammatischen Varianten davon umfassen bei Verwendung hierin die nativen Sequenzen von PRO358-Toll-Proteinen und Varian-

ten (die hierin genauer definiert werden). Das PRO358-Polypeptid kann aus zahlreichen Quellen, wie z. B. aus menschlichen Gewebetypen oder aus einer anderen Quelle, isoliert oder durch Rekombinations- oder Syntheseverfahren oder durch beliebige Kombination dieser und ähnlicher Techniken hergestellt werden.

[0032] Ein „PRO358 nativer Sequenz“ umfasst ein Polypeptid aus der Natur, das dieselbe Sequenz wie PRO358 aufweist. Derartige Toll-Polypeptide nativer Sequenz können aus der Natur isoliert und durch rekombinante oder synthetische Mittel hergestellt werden. Der Ausdruck „PRO358 nativer Sequenz“ umfasst ausdrücklich natürlich vorkommende trunkierte oder sekretierte Formen der hierin offebarten PRO358-Polypeptide (z. B. eine Sequenz der extrazellulären Domäne), natürlich vorkommende Variantenformen (z. B. alternativ gespleißte Formen) und natürlich vorkommende allelische Varianten. In einer der Ausführungsformen der Erfindung ist das PRO358 nativer Sequenz ein reifes oder Vollängen-PRO358-Polypeptid nativer Sequenz, das die Aminosäuren 20 bis 811 aus **Fig. 12A–B** (Seq.-ID Nr. 13) mit oder ohne N-terminale Signalsequenz (Aminosäuren 1 bis 19) und mit oder ohne N-terminales Methionin umfasst. In einer weiteren Ausführungsform ist das PRO358 nativer Sequenz die lösliche Form des Vollängen-PRO358, das die extrazelluläre Domäne des Vollängenproteins (Aminosäuren 29 bis 575) mit oder ohne die N-terminale Signalsequenz umfasst, und mit oder ohne N-terminales Methionin.

[0033] Unter dem Ausdruck „PRO358-Variante“ wird ein unten definiertes, aktives PRO358-Polypeptid verstanden, das zumindest 80%, vorzugsweise zumindest etwa 85%, noch bevorzugter zumindest etwa 90%, am bevorzugtesten zumindest etwa 95% Aminosäuresequenzidentität zu PRO358 aufweist, das die in **Fig. 12A–B** (Seq.-ID Nr. 13) gezeigte, abgeleitete Aminosäuresequenz aufweist. Derartige Varianten umfassen beispielsweise PRO358-Polypeptide, worin ein oder mehrere Aminosäurereste am N- oder C-Terminus der Sequenzen aus **Fig. 11A–B** (Seq.-ID Nr. 13) addiert bzw. deletiert sind. Varianten umfassen insbesondere transmembrandomänendeletierte und inaktivierte Varianten der nativen Sequenz PRO358, die auch Teil oder alles ihrer intrazellulären deletierten Domäne aufweisen können. Bevorzugte Varianten sind jene, die einen hohen Grad an Sequenzidentität zur extrazellulären Domäne eines PRO358-Polypeptids nativer Sequenz aufweisen. In einer speziellen Ausführungsform behalten die PRO358-Varianten der vorliegenden Erfindung zumindest einen C-terminalen Abschnitt der intrazellulären Domäne des entsprechenden nativen Proteins bei, und besonders bevorzugt behalten sie den Großteil der intrazellulären und extrazellulären Domänen bei. Allerdings können derartige Varianten in Abhängigkeit von ihrer vorgesehenen Verwendung verschiedene Aminosäureänderungen, z. B. Substitutionen, Deletionen und/oder Insertionen, innerhalb dieser Regionen aufweisen.

[0034] „Prozentuelle(%)Aminosäuresequenzidentität“ bezüglich der hierin identifizierten PRO358-Sequenzen ist als der prozentuelle Anteil an Aminosäureresten in einer Kandidatensequenz definiert, die mit den Aminosäureresten in der PRO358-Sequenz identisch sind, und zwar nach gegebenenfalls erforderlicher Angleichung der Sequenzen und Einführung von Lücken, um die maximale prozentuelle Sequenzidentität zu erlangen, wobei jegliche konservativen Substitutionen als Teil der Sequenzidentität unberücksichtigt bleiben. Eine Angleichung zum Zwecke der Ermittlung der prozentuellen Aminosäuresequenzidentität kann auf verschiedene fachbekannte Arten erzielt werden, beispielsweise unter Verwendung öffentlich zugänglicher Computersoftware, wie z. B. BLAST-, ALIGN- oder Megalign-(DNASTAR-)Software. Der Fachmann kann die geeigneten Parameter zur Messung der Angleichung ermitteln, einschließlich jeglicher Algorithmen, die zur Erzielung maximaler Angleichung über die volle Länge der verglichenen Sequenzen benötigt werden. Die ALIGN-Software wird zur Ermittlung der Aminosäuresequenzidentität bevorzugt.

[0035] In einem speziellen Aspekt ist die „prozentuelle(%)Aminosäuresequenzidentität“ bezüglich der PRO358-Sequenzen hierin als der prozentuelle Anteil an Aminosäureresten in einer Kandidatensequenz definiert, die mit den Aminosäureresten in der PRO358-Sequenz identisch sind, und zwar nach gegebenenfalls erforderlicher Angleichung der Sequenzen und Einführung von Lücken, um die maximale prozentuelle Sequenzidentität zu erlangen, wobei jegliche konservativen Substitutionen als Teil der Sequenzidentität nicht berücksichtigt werden. Die hierin verwendeten %-Identität-Werte werden mittels WU-BLAST-2 erzeugt, das von (Altschul et al., Methods in Enzymology 266, 460–480 (1996); <http://blastwustl.edu/blast/README.html>) erhalten wurde. WU-BLAST-2 verwendet mehrere Suchparameter, wovon die meisten auf Standardwerte eingestellt werden. Die verstellbaren Parameter werden auf die folgenden Werte eingestellt: Overlap span = 1, overlap fraction = 0,125, Word threshold (T) = 11. Die HSP S- und HSP S2-Parameter sind dynamische Werte und werden vom Programm selbst in Abhängigkeit von der Zusammensetzung der jeweiligen Sequenz und Zusammensetzung der jeweiligen Datenbank festgesetzt, gegen die die Sequenz von Interesse durchsucht wird; jedoch können die Werte verstellt werden, um die Empfindlichkeit zu steigern. Ein Wert für die %-Aminosäuresequenzidentität wird ermittelt, indem die Anzahl identischer Reste durch die Gesamtanzahl an Resten der „längerer“ Sequenz in der angeglichenen Region dividiert wird (mittels WU-Blast-2 zur Maximierung der Angleichung eingeführte Lücken werden ignoriert).

[0036] Der Ausdruck „Positive“ umfasst im Zusammenhang mit dem wie oben beschrieben durchgeführten Sequenzvergleich Reste in den verglichenen Sequenzen, die nicht identisch sind, sondern ähnliche Eigenschaften aufweisen (z. B. als Folge konservativer Substitutionen). Der %-Wert an Positiven wird ermittelt, indem der Bruchteil an Resten, die in der BLOSUM-62-Matrix eine positive Bewertung erhalten, durch die Gesamtanzahl der Reste in der oben definierten, längeren Sequenz dividiert wird.

[0037] „Prozentuelle(%)Nucleinsäuresequenzidentität“ ist bezüglich der hierin identifizierten DNA47361-Sequenzen als der prozentuelle Anteil an Nucleotiden in einer Kandidatensequenz definiert, die mit den Nucleotiden in den DNA47361-Sequenzen identisch sind, und zwar nach gegebenenfalls erforderlicher Angleichung der Sequenzen und Einführung von Lücken, um die maximale prozentuelle Sequenzidentität zu erlangen. Eine Angleichung zum Zwecke der Ermittlung der prozentuellen Nucleinsäuresequenzidentität kann auf verschiedene fachbekannte Weisen erzielt werden, beispielsweise unter Verwendung öffentlich zugänglicher Computersoftware, wie z. B. BLAST-, ALIGN- oder Megalign-(DNASTAR-)Software. Der Fachmann kann die geeigneten Parameter zur Messung der Angleichung ermitteln, einschließlich jeglicher Algorithmen, die zur Erzielung maximaler Angleichung über die volle Länge der verglichenen Sequenzen benötigt werden. Die ALIGN-Software wird zur Ermittlung der Nucleinsäuresequenzidentität bevorzugt.

[0038] Im Speziellen ist die „prozentuelle(%)Nucleinsäuresequenzidentität“ bezüglich der kodierenden Sequenz der PRO358-Polypeptide hierin als prozentueller Anteil von Nucleotidresten in einer Kandidatensequenz definiert, die mit den Nucleotidresten in der für PRO358 kodierenden Sequenz identisch sind. Die hierin verwendeten Identitätswerte wurden mittels BLASTN-Modul des auf Standardparameter eingestellten WU-BLAST-2 erzeugt, wobei „overlap span“ und „overlap fraction“ auf 1 bzw. 0,125 eingestellt waren.

[0039] Unter „isoliert“ wird bei der Beschreibung der verschiedenen hierin offebarten Polypeptide ein Polypeptid verstanden, das identifiziert und aus einer Komponente seiner natürlichen Umgebung abgesondert und/oder gewonnen worden ist. Verunreinigende Komponenten seiner natürlichen Umgebung sind Materialien, die typischerweise die diagnostischen oder therapeutischen Verwendungen für das Polypeptid stören würden und können Enzyme, Hormone und andere proteinische oder nicht-proteinische Gelöststoffe umfassen. In bevorzugten Ausführungsformen wird das Polypeptid gereinigt, und zwar (1) auf ein Ausmaß, das ausreicht, um zumindest 15 Reste N-terminaler oder interner Aminosäuresequenz durch Verwendung eines Drehbecher-Sequenzierers zu erlangen, oder (2) bis zur Homogenität mittels SDS-PAGE unter nicht reduzierenden oder reduzierenden Bedingungen unter Verwendung von Coomassie-Blau- oder vorzugsweise Silberfärbung. Isoliertes Polypeptid umfasst Polypeptid *in situ* in rekombinanten Zellen, da zumindest eine Komponente der natürlichen Umgebung von PRO358 nicht vorhanden sein wird. Für gewöhnlich wird jedoch das isolierte Polypeptid durch zumindest einen Reinigungsschritt hergestellt.

[0040] Ein „isoliertes“ DNA47361-Nucleinsäuremolekül ist ein Nucleinsäuremolekül, das identifiziert und von zumindest einem verunreinigenden Nucleinsäuremolekül abgetrennt ist, mit dem es für gewöhnlich in der natürlichen Quelle der DNA47361-Nucleinsäure assoziiert ist. Ein isoliertes DNA47361-Nucleinsäuremolekül liegt nicht in der Form oder in dem Milieu vor, in der/dem es sich in der Natur findet. Isolierte DNA47361-Nucleinsäuremoleküle unterscheiden sich daher von dem DNA47361-Nucleinsäuremolekül, wie es in natürlichen Zellen existiert. Jedoch umfasst ein isoliertes DNA47361-Nucleinsäuremolekül in Zellen enthaltene DNA47361-Nucleinsäuremoleküle, die für gewöhnlich DNA47361 exprimieren, wo sich das Nucleinsäuremolekül beispielsweise an einem anderen chromosomal Orte als dem natürlichen Zellen befindet.

[0041] „Toll-Rezeptor 2“, „TLR2“ und „huTLR2“ werden austauschbar verwendet und beziehen sich auf einen von Rock et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 588–593 (1998) als „HuTLR2“ bezeichneten menschlichen Toll-Rezeptor. Die Nucleotid- und Aminosäuresequenzen von huTLR2 sind in **Fig. 10** (Seq.-ID Nr. 11) bzw. 11 (Seq.-ID Nr. 12) gezeigt.

[0042] Der Ausdruck „Expressionsvektor“ wird verwendet, um einen Vektor zu definieren, in dem eine für ein hierin beschriebenes Toll-Homolog-Protein kodierende Nucleinsäure operabel an Kontrollsequenzen gebunden ist, die fähig sind, seine Expression in geeigneten Wirtszellen zu beeinflussen. Vektoren tragen für gewöhnlich eine Replikationsstelle (obgleich dies nicht erforderlich ist wenn Chromosomenintegration erfolgt). Expressionsvektoren umfassen außerdem Markersequenzen, die fähig sind, für eine Phänotypselektion in transformierten Zellen zu sorgen. Beispielweise wird *E. coli* typischerweise unter Verwendung von pBR322 transformiert, einem von einer *E. coli*-Spezies hergeleiteten Plasmid (Bolivar et al., Gene 2, 95 (1977)). pBR322 enthält Gene für Ampicillin- und Tetracyclin-Resistenz und stellt daher ein einfaches Mittel zur Identifizierung transformierter Zellen sowohl zum Zwecke der Klonierung, als auch zum Zwecke der Expression bereit. Expressionsvektoren werden außerdem im Idealfall Sequenzen enthalten, die zur Kontrolle der Transkri-

tion und Translation zweckdienlich sind, z. B. Promotoren und Shine-Dalgarno-Sequenzen (für Prokaryoten) oder Promotoren und Enhancer (für Säugetierzellen). Die Promotoren können, müssen aber nicht induzierbar sein; sogar für leistungsfähige konstitutive Promotoren, wie z. B. den CMV-Promotor für Säugetierwirte erwies sich, dass sie LHR ohne Wirtszelltoxizität produzieren. Obgleich es denkbar ist, dass Expressionsvektoren keinerlei die Expression kontrollierende, replikative Sequenzen oder Selektionsgene enthalten müssen, kann ihre Abwesenheit die Identifizierung von Hybridtransformanten und die Erzielung eines hohen Ausmaßes an Hybridimmunglobulinexpression behindern.

[0043] Der Ausdruck „Kontrollsequenzen“ bezieht sich auf DNA-Sequenzen, die zur Expression einer operabel gebundenen kodierenden Sequenz in einem bestimmten Wirtsorganismus notwendig sind. Die Kontrollsequenzen, die beispielsweise für Prokaryoten geeignet sind, umfassen einen Promotor, gegebenenfalls eine Operatorsequenz und eine Ribosombindungsstelle. Eukaryotische Zellen setzen bekanntermaßen Promotoren, Polyadenylierungssignale und Enhancer ein.

[0044] Eine Nucleinsäure ist „operabel gebunden“, wenn sie in eine funktionelle Beziehung zu einer anderen Nucleinsäuresequenz gesetzt ist. Beispielsweise ist DNA für eine Präsequenz oder einen Sekretionsleader operabel an DNA für ein Polypeptid gebunden, wenn sie als Präprotein exprimiert wird, das an der Sekretion des Polypeptids beteiligt ist; ein Promotor oder Enhancer ist operabel an eine kodierende Sequenz gebunden, wenn er die Transkription der Sequenz beeinflusst; oder eine Ribosombindungsstelle ist operabel an eine kodierende Sequenz gebunden, wenn sie so positioniert ist, dass die Translation erleichtert wird. Im Allgemeinen bedeutet „operabel gebunden“, dass die verbundenen DNA-Sequenzen zusammenhängend sind und im Falle eines Sekretionsleaders zusammenhängend sind und sich in Lesephase befinden. Jedoch müssen Enhancer nicht zusammenhängend sein. Die Bindung wird durch Ligation an zweckdienlichen Restriktionsstellen erzielt. Falls derartige Stellen nicht vorhanden sind, dann werden synthetische Oligonucleotidadaptoren oder Linker gemäß herkömmlicher Praxis verwendet.

[0045] Der Ausdruck „Antikörper“ wird im weitesten Sinne verwendet und umfasst im Speziellen einzelne monoklonale Anti-PRO358-Antikörper (einschließlich Agonisten-, Antagonisten- und neutralisierende Antikörper) und Anti-PRO358-Antikörperzusammensetzungen mit polyepitopischer Spezifität. Der Ausdruck „monoklonaler Antikörper“ bezieht sich bei Verwendung hierin auf einen Antikörper, der aus einer Population von im Wesentlichen homogenen Antikörper erlangt wurde, d. h., dass die Population umfassenden individuellen Antikörper mit Ausnahme von möglichen natürlich vorkommenden Mutationen, die in geringen Mengen vorhanden sein können, identisch sind.

[0046] Der Ausdruck „Antagonist“ wird hierin im weitesten Sinne verwendet und umfasst jegliches Molekül, das eine biologische Aktivität eines hierin offenbarten Toll-Rezeptors teilweise oder vollständig blockiert, verhindert, hemmt oder neutralisiert. In ähnlicher Weise wird der Ausdruck „Agonist“ im weitesten Sinne verwendet und umfasst jegliches Molekül, das eine biologische Aktivität eines hierin offenbarten nativen Toll-Rezeptors nachahmt oder verstärkt. Geeignete Agonisten- oder Antagonisten-Moleküle umfassen ausdrücklich Agonisten- und Antagonisten-Antikörper oder Antikörper-Fragmente, Fragmente oder Aminosäuresequenzvarianten nativer Toll-Rezeptor-Polypeptide, Peptide, kleine organische Moleküle usw.

[0047] „Aktiv“ oder „Aktivität“ beziehen sich zum Zwecke hierin auf (eine) Form(en) von PRO358, welche die biologischen und/oder immunogenen Aktivitäten von nativem oder natürlich vorkommendem PRO358 beibehalten. Eine bevorzugte „Aktivität“ ist die Fähigkeit, die Aktivierung von NF-κB und/oder die Expression von NF-κB-kontrollierten Genen für die Entzündungscytokine IL-1, IL-6 und IL-8 zu induzieren. Eine weitere bevorzugte „Aktivität“ ist die Fähigkeit, die erworbene und/oder adaptive Immunantwort in Wirbeltieren zu aktivieren. Eine außerdem bevorzugte „Aktivität“ ist die Fähigkeit, die Gegenwart von an Mikroorganismen vorhandenen konservativen Molekülstrukturen wahrzunehmen und im Speziellen die Fähigkeit, die Lipopolysaccharid-(LPS-)Signalisierung zu vermitteln. Dieselbe Definition von „Aktivität“ trifft auf Agonisten (z. B. Agonisten-Antikörper) von PRO358-Polypeptiden zu. Wie oben erwähnt ist die „Aktivität“ eines Antagonisten (einschließlich Agonisten-Antikörper) eines PRO358-Polypeptids als die Fähigkeit definiert, jeglichen der oben identifizierten Aktivitäten eines PRO358-Polypeptids entgegenzuwirken, z. B. teilweise oder vollständig zu blockieren, zu verhindern, zu hemmen oder zu neutralisieren.

[0048] Die „Stringenz“ von Hybridisierungsreaktionen kann von einem gewöhnlich Fachkundigen leicht ermittelt werden und ist im Allgemeinen eine empirische Berechnung, die von der Sondenlänge, Waschtemperatur und Salzkonzentration abhängt. Im Allgemeinen erfordern längere Sonden höhere Temperaturen für die richtige Annelierung, während kürzere Sonden niedrigere Temperaturen benötigen. Die Hybridisierung hängt im Allgemeinen von der Fähigkeit denaturierter DNA ab, wieder zu annelieren, wenn komplementäre Strände in

einem Milieu unter ihrer Schmelztemperatur zugegen sind. Je höher der Grad an erwünschter Homologie zwischen Sonde und hybridisierbarer Sequenz, desto höher die relative Temperatur, die eingesetzt werden kann. Es folgt daraus, dass höhere relative Temperaturen dazu neigen, die Reaktionsbedingungen stringenter zu machen, während niedrigere Temperaturen dies weniger tun. Für weitere Einzelheiten und Erklärungen zur Stringenz und zu Hybridisierungsreaktionen siehe Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology (1995).

[0049] Die hierin definierten „stringenten Bedingungen“ oder „Bedingungen hoher Stringenz“ können durch jene gekennzeichnet sein die: (1) niedrige Ionenstärke und hohe Temperatur fürs Waschen einsetzen, beispielsweise 0,015 M Natriumchlorid/0,0015 M Natriumcitrat/0,1% Natriumdodecylsulfat bei 50°C; (2) ein Denaturierungsmittel während der Hybridisierung einsetzen, wie z. B. Formamid, beispielsweise 50% (Vol./Vol.) Formamid mit 0,1% Rinderserumalbumin/0,1% Ficoll/0,1% Polyvinylpyrrolidon/50 mM Natriumphosphatpuffer bei pH 6,5 mit 750 mM Natriumchlorid, 75 mM Natriumcitrat bei 42°C; (3) 50% Formamid, 5 × SSC (0,75 M NaCl, 0,075 M Natriumcitrat), 50 mM Natriumphosphat (pH 6,8), 0,1% Natriumpyrophosphat, 5 × Denhardt-Lösung, beschallte Lachsspermien-DNA (50 µg/ml), 0,1% SDS und 10% Dextransulfat bei 42°C mit Waschvorgängen bei 42°C in 0,2 × SSC (Natriumchlorid/Natriumcitrat) und 50% Formamid bei 55°C, gefolgt von einem aus EDTA enthaltendem 0,1 × SSC bei 55°C bestehendem Waschvorgang hoher Stringenz einsetzen.

[0050] „Mäßig stringente Bedingungen“ können so festgelegt werden, wie sie von Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, New York, Cold Spring Harbor Press (1989) beschrieben sind, und umfassen die Verwendung von Waschlösung und Hybridisierungsbedingungen (z. B. Temperatur, Ionenstärke und %-SDS), die weniger stringent als die oben beschriebenen sind. Ein Beispiel mäßig stringenter Bedingungen ist die Inkubation über Nacht bei 37°C in einer Lösung, die Folgendes umfasst: 20% Formamid, 5 × SSC (150 mM NaCl, 15 mM Trinatriumcitrat), 50 mM Natriumphosphat (pH 7,6), 5 × Denhardt-Lösung, 10% Dextransulfat und 20 mg/ml denaturierte, gescherte Lachsspermien-DNA, gefolgt vom Waschen der Filter in 1 × SSC bei etwa 37–50°C. Der Fachmann wird erkennen, wie Temperatur, Ionenstärke usw. erforderlichenfalls einzustellen sind, um Einflussgrößen, wie z. B. Sondenlänge und dergleichen Rechnung zu tragen.

[0051] Der Ausdruck „epitopmarkiert“ bezieht sich bei Verwendung hierin auf ein Hybridpolypeptid, das ein an ein „Markerpolypeptid“ fusioniertes FIZZ-Polypeptid umfasst. Das Markerpolypeptid hat eine ausreichende Anzahl von Resten, um ein Epitop bereitzustellen, gegen das ein Antikörper hergestellt werden kann, ist jedoch ausreichend kurz, so dass es nicht die Aktivität des Polypeptids stört, an das es fusioniert ist. Das Markerpolypeptid ist außerdem vorzugsweise ziemlich einzigartig, so dass der Antikörper im Wesentlichen nicht mit anderen Epitopen kreuzreagiert. Geeignete Markerpolypeptide weisen im Allgemeinen zumindest sechs Aminosäurereste und üblicherweise zwischen etwa 8 und 50 Aminosäureresten (vorzugsweise zwischen etwa 10 und 20 Aminosäureresten) auf.

[0052] Wie hierin verwendet bezeichnet der Ausdruck „Immunoadhäsins“ antikörperartige Moleküle, welche die Bindungsspezifität eines heterologen Proteins (eines „Adhäsins“) mit den Effektorfunktionen konstanter Immunglobulindomänen vereint. Strukturell umfassen die Immunoadhäsine eine Fusion einer Aminosäuresequenz mit der gewünschten Bindungsspezifität, die nicht die Antigenerkennungs- und Bindungsstelle eines Antikörpers ist (d. h. heterolog ist), mit der Sequenz der konstanten Immunglobulindomäne. Der Adhäsin-Abschnitt eines Immunoadhäsinsmoleküls ist typischerweise eine zusammenhängende Aminosäuresequenz, die zumindest die Bindungsstelle eines Rezeptors oder eines Liganden umfasst. Die Sequenz der konstanten Immunglobulindomäne im Immunoadhäsin kann von jeglichem Immunglobulin, wie z. B. IgG-1-, IgG-2-, IgG-3- oder IgG-4-Subtypen, IgA (einschließlich IgA-1 und IgA-2), IgE, IgD oder IgM erlangt werden.

[0053] „Behandlung“ bezieht sich auf therapeutische Behandlung sowie auf prophylaktische oder präventive Maßnahmen, worin das Ziel die Verlangsamung (Linderung) des pathologischen Leidens oder Störung ist, auf die abgezielt wird. Jene, die einer Behandlung bedürfen, umfassen jene, bei denen die Störung bereits vorliegt, sowie jene, die für die Störung anfällig sind oder jene, die vor der Störung zu bewahren sind.

[0054] „Chronische“ Verabreichung bezieht sich auf Verabreichung des/der Mittel(s) auf kontinuierliche Weise im Gegensatz zur akuten Weise, so dass die anfängliche therapeutische Wirkung (Aktivität) für einen längeren Zeitraum aufrechterhalten wird.

[0055] „Säugetier“ zum Zwecke der Behandlung bezieht sich auf jegliches als Säugetier klassifiziertes Tier, einschließlich Menschen, Nutztiere, Zoo-, Sport- und Haustiere, wie z. B. Hunde, Katzen, Rinder, Pferde, Schafe, Schweine usw. Vorzugsweise ist das Säugetier der Mensch.

[0056] Verabreichung „in Kombination mit“ einem oder mehreren weiteren therapeutischen Mitteln umfasst simultane (gleichzeitige) und aufeinander folgende Verabreichung in beliebiger Reihenfolge.

[0057] Der Ausdruck „Lipopolsaccharid“ oder „LPS“ wird hierin als Synonym von „Endotoxin“ verwendet. Lipopolysaccharide (LPS) sind charakteristische Komponenten der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien, z. B. *Escherichia coli*. Sie bestehen aus einem Polysaccharid-Abschnitt und einem Fett, das Lipid A genannt wird. Das Polysaccharid, das sich von Spezies zu Spezies unterscheidet, besteht aus der O-spezifischen Kette (aufgebaut aus sich wiederholenden Einheiten von drei bis acht Zuckern) und dem zweiteiligen Kern. Lipid A umfasst praktisch immer zwei Glucosamin-Zucker, die durch Phosphat und eine variable Anzahl an Fettsäuren modifiziert sind. Für weitere Informationen siehe beispielsweise Rietschel und Brade, Scientific American, August 1992, S. 54–61.

[0058] Der Ausdruck „septischer Schock“ wird hierin im weitesten Sinne verwendet, einschließlich aller Definitionen, die in Bone, Ann. Intern. Med. 114, 332–333 (1991), offenbart sind. Im Speziellen beginnt septischer Schock mit einer systemischen Reaktion auf Infektion, einem Syndrom, das Sepsis genannt wird. Wenn dieses Syndrom zu Blutunterdruck und Organ-Dysfunktion führt, wird es septicus Schock genannt. Septischer Schock kann durch Gram-positive Organismen und Pilze sowie durch Endotoxin enthaltende Gram-negative Organismen ausgelöst werden. Demgemäß ist die vorliegende Definition nicht auf „Endotoxin-Schock“ eingeschränkt.

II. Zusammensetzungen und Verfahren der Erfindung

A. PRO358 voller Länge

[0059] Die vorliegende Erfindung stellt neu identifizierte und isolierte Nucleotidsequenzen bereit, die für ein Polypeptid kodieren, die in der vorliegenden Anmeldung PRO358 genannt werden. Insbesondere haben die Anmelder cDNAs identifiziert und isoliert, die für PRO358-Polypeptide kodieren, wie in den untenstehenden Beispielen ausführlicher offenbart wird. Unter Verwendung von BLAST- und FastA-Sequenzangleichungscomputerprogrammen haben die Anmelder gefunden, dass die kodierende Sequenz von PRO358 höchst homolog zu den DNA-Sequenzen HSU88540_1, HSU88878_1, HSU88879_1, HSU88880_1, HSU88881_1 und HSU79260_1 in der Gen-Bank-Datenbank ist. Mit Ausnahme von HSU79260_1 sind die angeführten Proteine als menschliche tollähnliche Rezeptoren identifiziert worden.

[0060] Demgemäß wird derzeit angenommen, dass die in der vorliegenden Anmeldung offenbarten PRO358-Proteine neu identifizierte menschliche Homologe des *Drosophila*-Proteins Toll sind und wahrscheinlich eine wichtige Rolle bei der adaptiven Immunität spielen. Im Spezielleren könnte PRO358 an Entzündungen, septischem Schock und Reaktion auf Pathogene beteiligt sein und möglicherweise eine Rolle bei verschiedenen medizinischen Leiden spielen, die durch Immunreaktion verschärft werden, wie z. B. bei Diabetes, ALS, Krebs, Rheumatoïdarthritis und Geschwüren. Die Rolle von PRO358 als Pathogenmustererkennungsrezeptoren, die die Gegenwart konservierter Molekularstrukturen wahrnehmen, die an Mikroben vorkommen, wird durch die in der vorliegenden Anmeldung offenbarten Daten weiter erhärtet, wobei die Daten zeigen, dass ein bekannter menschlicher Toll-Rezeptor, TLR2, ein direkter Vermittler der LPS-Signalisierung ist.

B. PRO358-Varianten

[0061] Zusätzlich zu den hierin beschriebenen PRO358 nativer Sequenz und voller Länge ist vorgesehen, dass Varianten dieser Sequenzen hergestellt werden können. PRO358-Varianten können hergestellt werden, indem geeignete Nucleotidveränderungen in die PRO358-DNA eingeführt oder die gewünschten Varianten-Polypeptide synthetisiert werden. Der Fachkundige wird anerkennen, dass Aminosäureveränderungen die posttranskriptionellen Prozesse der PRO358-Polypeptide verändern können, wie z. B. Verändern der Anzahl oder Position von Glykosylierungsstellen oder Verändern der Merkmale der Membranverankerung.

[0062] Variationen im PRO358 nativer Sequenz und voller Länge oder in verschiedenen Domänen von hierin beschriebenem PRO358 können beispielsweise unter Anwendung jeglicher Technik oder Richtlinien für konservative und nicht-konservative Mutationen vorgenommen werden, wie sie beispielsweise im US-Patent Nr. 5.364.934 dargelegt sind. Variationen können eine Substitution, Deletion oder Insertion eines oder mehrerer für das PRO358-Polypeptid kodierender Codons sein, das in einer Veränderung der Aminosäuresequenz im Vergleich zu entsprechenden Polypeptiden nativer Sequenz resultiert. Gegebenenfalls erfolgt die Variation durch Substitution von zumindest einer Aminosäure mit jeglicher anderen Aminosäure in einer oder mehreren Domänen von PRO358. Bei der Entscheidung, welcher Aminosäurerest ohne nachteilige Beeinflussung der

gewünschten Aktivität insertiert, substituiert oder deletiert werden könnte, kann man sich durch Vergleichen der Sequenz von PRO358 mit jener von homologen, bekannten Proteinmolekülen und Minimieren der Anzahl an vorgenommenen Aminosäuresequenzänderungen in Regionen hoher Homologie leiten lassen. Aminosäuresubstitutionen können das Ergebnis des Ersetzens einer Aminosäure durch eine andere Aminosäure sein, die ähnliche strukturelle und/oder chemische Eigenschaften aufweist, wie z. B. das Ersetzen eines Leucins durch ein Serin, d. h. konservative Aminosäureersetzungen. Insertionen oder Deletionen können gegebenenfalls im Bereich von 1 bis 5 Aminosäuren liegen. Die zulässige Variation kann ermittelt werden, indem Insertionen, Deletionen oder Substitutionen von Aminosäuren in der Sequenz vorgenommen und die resultierenden Varianten auf Aktivität in dem in den unten stehenden Beispielen beschriebenen In-vitro-Test getestet werden.

[0063] Die Variationen können unter Anwendung von Verfahren hergestellt werden, die auf dem Gebiet der Erfindung bekannt sind, wie z. B. Oligonucleotid-vermittelte (ortsgerichtete) Mutagenese, Alanin-Scanning und PCR-Mutagenese. Ortsgerichtete Mutagenese (Carter et al., Nucl. Acids Res. 13, 4331 (1986); Zoller et al., Nucl. Acids Res. 10, 6487 (1987)), Kassettenmutagenese (Wells et al., Gene 34, 315 (1985)), Restriktionsselektionsmutagenese (Wells et al., Philos. Trans. R. Soc. London SerA 317, 415 (1986)) oder andere bekannte Techniken können an der klonierten DNA durchgeführt werden, um die PRO358-Varianten-DNA herzustellen.

[0064] Scanning-Aminosäureanalyse kann außerdem eingesetzt werden, um eine oder mehrere Aminosäuren entlang einer zusammenhängenden Sequenz zu identifizieren. Unter den bevorzugten Scanning-Aminosäuren sind relativ kleine, neutrale Aminosäuren. Derartige Aminosäuren umfassen Alanin, Glycin, Serin und Cystein. Alanin ist typischerweise eine bevorzugte Scanning-Aminosäure unter dieser Gruppe, da sie die über den Beta-Kohlenstoff hinausgehende Seitenkette eliminiert und mit geringerer Wahrscheinlichkeit die Hauptkettenkonformation der Variante verändert.

[0065] Alanin ist außerdem typischerweise bevorzugt, weil es die häufigste Aminosäure ist. Weiters findet es sich häufig sowohl in verborgenen, als auch in exponierten Positionen (Creighton, *The Proteins*, W. H. Freeman & Co., N. Y.; Chothia, J. Mol. Biol. 150, 1 (1976)). Falls Alaninsubstitution keine ausreichenden Mengen der Variante liefert, kann eine isoterische Aminosäure verwendet werden.

[0066] Varianten der hierin offenbarten PRO358-Toll-Proteine umfassen Proteine, bei denen die Transmembrandomänen deletiert oder inaktiviert worden sind. Transmembranregionen sind höchst hydrophobe oder lipophile Domänen, welche die geeignete Größe aufweisen, um die Lipid-Doppelschicht der Zellmembran zu durchdringen. Es wird von diesen angenommen, dass sie die nativen, reifen PRO285-, PRO286- und PRO358-Polypeptide in der Zellmembran verankern. Im PRO358 erstreckt sich die Transmembrandomäne von etwa der Aminosäureposition 576 bis etwa zur Aminosäureposition 595.

[0067] Die Deletion oder Substitution der Transmembrandomäne erleichtert die Gewinnung und stellt eine lösliche Form eines PRO358-Polypeptids bereit, indem dessen Zell- oder Membranlipid-Affinität vermindert und dessen Wasserlöslichkeit verbessert wird. Wenn die Transmembran- und Zytoplasma-Domänen deletiert werden, vermeidet man die Einführung potentiell immunogener Epitope entweder durch Exposition von ansonsten intrazellulären Polypeptiden, die vom Körper als fremd erkannt werden könnten, oder durch Insertion heterologer Polypeptide, die potentiell immunogen sind. Ein prinzipieller Vorteil eines transmembrandomänen-deletierten PRO358 ist es, dass es in das Kulturmedium rekombinanter Wirt sekretiert wird. Diese Variante ist in Körperflüssigkeiten wie Blut löslich und hat keine nennenswerte Affinität für Zellmembranlipide, was seine Gewinnung aus rekombinanter Zellkultur beträchtlich vereinfacht.

[0068] Es ist aus der bevorstehenden Diskussion offensichtlich, dass Substitutionen, Deletionen, Insertionen oder beliebige Kombinationen davon eingeführt werden können, um zum endgültigen Konstrukt zu gelangen. Es kann allgemein gesagt werden, dass lösliche Varianten keine funktionstüchtige Transmembrandomäne aufweisen und vorzugsweise keine funktionsfähige zytoplasmatische Sequenz aufweisen werden. Dies kann im Allgemeinen durch Deletion der maßgeblichen Domäne erzielt werden, obgleich adäquate Insertions- oder Substitutionsvarianten zu diesem Zweck ebenfalls wirkungsvoll sind. Beispielsweise wird die Transmembrandomäne durch jegliche Aminosäuresequenz, z. B. eine zufällige oder vorherbestimmte Sequenz von etwa 5 bis 50 Serinen, Threoninen, Lysinen, Arginin, Glutaminen, Asparaginsäuren und ähnliche hydrophile Reste substituiert, die allesamt ein hydrophiles Hydropathie-Profil aufweisen. Wie die Deletions-(trunkierten) PRO285-, PRO286- und PRO358-Varianten werden diese Varianten in das Kulturmedium rekombinanter Wirt sekretiert.

[0069] Weitere Deletionsvarianten der reifen PRO358-Polypeptide voller Länge (oder transmembrandomänen-deletierte und inaktivierte Formen davon) umfassen Varianten, aus denen das N-terminale Signalpeptid

(vermutlich identifiziert für PRO358 als Aminosäuren 1 bis 26) und/oder das initiierte Methionin deletiert worden sind. Die native Signalsequenz könnte auch durch ein anderes (heterologes) Signalpeptid, das jenes eines anderen Toll-artigen Proteins sein könnte, oder durch eine andere menschliche oder nicht-menschliche (z. B. Bakterien-, Hefe- oder nicht-menschliche Säugetier-) Signalsequenz ersetzt werden.

[0070] Es wird angenommen, dass die intrazelluläre Domäne und insbesondere ihr C-terminaler Abschnitt für die biologische Funktion dieser Polypeptide wichtig ist. Wenn es demgemäß das Ziel ist, Varianten herzustellen, die die biologische Aktivität eines entsprechenden Toll-artigen Proteins beibehalten, wird zumindest ein wesentlicher Teil dieser Regionen beibehalten und wenn Veränderungen, wenn überhaupt, vorgenommen werden, umfassen sie konservative Aminosäuresubstitutionen und/oder Insertionen oder Aminosäuren, die hinsichtlich ihrer Eigenschaften jenen ähnlich sind, die in der Region vorhanden sind, in welche die Aminosäure insertiert wird. Wenn jedoch eine wesentliche Modifizierung der biologischen Funktion eines nativen Toll-Rezeptors erforderlich ist (wenn es z. B. das Ziel ist, Antagonisten der jeweiligen Toll-Polypeptide herzustellen), umfassen die Veränderungen die Substitution und/oder Insertion von Aminosäuren, die sich hinsichtlich ihrer Eigenschaften von der Aminosäure an der abgezielten Position im entsprechenden nativen Toll-Polypeptid unterscheiden.

[0071] Natürlich vorkommende Aminosäuren werden auf Basis der gemeinsamen Seitenketteneigenschaften in Gruppen unterteilt:

- (1) hydrophob: Norleucin, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) neutral hydrophob: Cys, Ser, Thr;
- (3) sauer: Asp, Glu;
- (4) basisch: Asn, Gln, His, Lys, Arg;
- (5) Reste, welche die Kettenausrichtung beeinflussen: Gly, Pro; und
- (6) aromatisch: Trp, Tyr, Phe.

[0072] Konservative Substitutionen umfassen den Austausch eines Elements innerhalb einer der Gruppen durch ein anderes Element derselben Gruppe, wogegen nicht-konservative Substitutionen das Austauschen eines Elements einer dieser Klassen gegen ein anderes bedingen. Von Varianten, die durch nicht-konservative Substitutionen erlangt wurden, wird erwartet, dass sie in erheblicheren Veränderungen der biologischen Eigenschaften/Funktion der erlangten Variante resultieren.

[0073] Aminosäureinsertionen umfassen amino- und/oder carboxyl-terminale Fusionen, die hinsichtlich der Länge von einem Rest bis zu Polypeptiden reichen, die hundert oder mehr Reste enthalten, sowie Intrasequenz-Insertionen einzelner oder mehrerer Aminosäurereste. Intrasequenz-Insertionen (d. h. Insertionen innerhalb der Aminosäuresequenz des PRO358-Proteins) können im Allgemeinen im Bereich von etwa 1 bis 10 Resten, bevorzugter 1 bis 5 Resten, bevorzugter 1 bis 3 Resten liegen. Beispiele terminaler Insertionen umfassen die PRO358-Polypeptide mit einem N-terminalen Methioninrest, einem Artefakt seiner direkten Expression in bakterieller rekombinanter Zellkultur, und die Fusion einer heterologen N-terminalen Signalsequenz mit dem N-Terminus des PRO358-Moleküls, um die Sekretion des reifen 1-TRAF-Proteins aus rekombinanten Wirtszellen zu erleichtern. Derartige Signalsequenzen werden im Allgemeinen von der daher dazu homologen vorgesehenen Wirtszellspezies erhalten.

[0074] Geeignete Sequenzen umfassen STII oder Ipp für E. coli, Alpha-Faktor für Hefe und Virussignale, wie z. B. Herpes gD für Säugetierzellen.

[0075] Andere Insertionsvarianten der hierin offenbarten nativen Toll-artigen Moleküle umfassen die Fusion des N- oder C-Terminus des Moleküls nativer Sequenz an immunogene Polypeptide, z. B. bakterielle Polypeptide, wie z. B. β -Lactamase oder ein Enzym, dass vom trp-Locus von E. coli kodiert wird, oder Hefeprotein, und C-terminale Fusionen mit Proteinen, die eine längere Halbwertszeit aufweisen, wie z. B. Immunglobulinregionen (vorzugsweise konstante Immunglobulinregionen, um Immunadhäsine zu liefern), Albumin oder Ferritin, wie beschrieben in der am 6. April 1989 veröffentlichten WO 89/02922. Zur Produktion von Immunglobulinfusionen siehe auch US-Patent Nr. 5.428.130, erteilt am 27. Juni 1995.

[0076] Da es häufig schwierig ist, die Eigenschaften einer Toll-artigen Proteinvariante im Voraus vorherzusagen, ist einzusehen, dass ein Screening notwendig sein wird, um die optimale Variante auszuwählen. Zu diesem Zweck sind biochemische oder andere Screeningtests griffbereit, wie z. B. jene, die hierin unten beschrieben sind.

C. Modifikationen der PRO358-Toll-Proteine

[0077] Kovalente Modifikationen der menschlichen PRO358-Toll-Homologe sind im Schutzmfang dieser Erfindung enthalten. Eine Art der kovalenten Modifizierung umfasst das Umsetzen der abgezielten Aminosäurereste des PRO358-Proteins mit einem organischen Derivatisierungsmittel, das fähig ist, mit ausgewählten Seitenketten oder den Resten des N- oder C-Terminus zu reagieren. Die Derivatisierung mit bifunktionellen Reagenzien ist beispielsweise zur Vernetzung von PRO358 mit einer wasserunlöslichen Trägermatrix oder Oberfläche zweckdienlich, und zwar zur Verwendung im Verfahren zur Reinigung von Anti-PRO358-Antikörpern und umgekehrt. Häufig verwendete Vernetzungsmittel umfassen z. B. 1,1-Bis(diazoacetyl)-2-phenylethan, Glutaraldehyd, N-Hydroxysuccinimidester, z. B. Ester mit 4-azidosalicylsäure, homobifunktionelle Imidoester, einschließlich Disuccinimidylester wie z. B. 3,3'-Dithiobis-(succinimidylpropionat), bifunktionale Maleimide wie z. B. Bis-N-maleimido-1,8-octan und Mittel wie z. B. Methyl-3[(p-azidophenyl)dithio]propioimidat.

[0078] Andere Modifizierungen umfassen die Deamidierung von Glutamyl- und Asparagylresten zu den entsprechenden Glutamyl- bzw. Aspartylresten, Hydroxylierung von Prolin und Lysin, Phosphorylierung von Hydroxygruppen von Seryl- und Threonylresten, Methylierung der α-Aminogruppen von Lysin-, Arginin- und Histidinseitenketten (T. E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W. H. Freeman & Co., San Francisco, S. 79–86 (1983)), Acetylierung des N-terminalen Amins und Amidierung jeglicher C-terminalen Carboxylgruppen.

[0079] Die Derivatisierung mit bifunktionellen Reagenzien ist zur Herstellung intramolekularer Aggregate der Toll-antigen Rezeptoren hierin mit Polypeptiden sowie zur Vernetzung dieser Polypeptide an eine wasserunlösliche Trägermatrix oder Oberfläche zur Verwendung in Tests oder für Affinitätsreinigung zweckdienlich. Außerdem stellt eine Untersuchung von Interkettenvernetzungen direkte Informationen über die Konformationsstruktur bereit. Häufig verwendete Vernetzungsmittel umfassen 1,1-Bis(diazoacetyl)-2-phenylethan, Glutaraldehyd, N-Hydroxysuccinimidester, homobifunktionelle Imidoester und bifunktionelle Maleimide. Derivatisierungsmittel, wie z. B. Methyl-3-[(p-azidophenyl)dithio]propioimidat liefern photoaktivierbare Zwischenprodukte, die fähig sind, Vernetzungen in Gegenwart von Licht zu bilden. Alternativ dazu werden reaktive wasserunlösliche Matrices, wie z. B. mit Bromcyan aktivierte Kohlenhydrate und die in den US-Patenten Nr. 3.959.642; 3.969.287; 3.691.016; 4.195.128; 4.247.642; 4.229.537; 4.055.635; und 4.330.440 beschriebenen reaktiven Substrate für die Proteinimmobilisierung und Vernetzung eingesetzt.

[0080] Ein weiterer Typ der kovalenten Modifizierung der PRO358-Polypeptide, der im Schutzmfang dieser Erfindung enthalten ist, umfasst das Verändern des nativen Glykosylierungsmusters des Polypeptids. Unter „Verändern des nativen Glykosylierungsmusters“ wird für die Zwecke hierin das Deleteieren einer oder mehrerer Kohlenhydratgruppierungen, die sich in der nativen Sequenz finden (entweder durch Entfernen der zugrunde liegenden Glykosylierungsstelle oder durch Deleteieren der Glykosylierung durch chemische und/oder enzymatische Mittel), und/oder das Anfügen einer oder mehrerer Glykosylierungsstellen verstanden, die in der nativen Sequenz nicht vorkommen. Außerdem umfasst der Ausdruck qualitative Änderungen der Glykosylierung der nativen Proteine, umfassend eine Veränderung der Beschaffenheit und Anteile der vorliegenden Kohlenhydrate.

[0081] Das Anfügen von Glykosylierungsstellen an die PRO358-Polypeptide kann durch Verändern der Aminosäuresequenz erzielt werden. Die Veränderung kann beispielsweise durch Anfügen oder Ersatz eines Serin- oder Threoninrestes an/in die/der native(n) Sequenz vorgenommen werden (für O-gebundene Glykosylierungsstellen). Die Aminosäuresequenz kann gegebenenfalls durch Änderungen auf DNA-Ebene verändert werden, insbesondere durch Mutieren der für die PRO358-Polypeptide kodierenden DNA an vorgewählten Basen, so dass Codons erzeugt werden, die in die gewünschten Aminosäuren translatiert werden.

[0082] Ein weiteres Mittel zur Erhöhung der Anzahl an Kohlenhydratgruppierungen an den PRO358-Polypeptiden ist die chemische oder enzymatische Kopplung von Glykosiden an das Polypeptid. Derartige Verfahren sind auf dem Gebiet der Erfindung beschrieben, z. B. in WO 87/05330, veröffentlicht am 11. September 1987 und in Aplin und Wriston, CRC Crit. Rev. Biochem., S. 259–306 (1981).

[0083] Die Entfernung von Kohlenhydratgruppierungen, die an den PRO285-, PRO286- und PRO358-Polypeptiden vorhanden sind, kann chemisch oder enzymatisch oder durch Mutationssubstitution von Codons erzielt werden, die für Aminosäurereste kodieren, die als Glykosylierungsziele dienen. Chemische Deglykosylierungstechniken sind auf dem Gebiet der Erfindung bekannt und werden beispielsweise von Hakimuddin et al., Arch. Biochem. Biophys. 259, 52 (1987) und von Edge et al., Anal. Biochem. 118, 131 (1981) beschrieben. Die enzymatische Spaltung von Kohlenhydratgruppierungen an Polypeptiden kann durch Verwendung einer Viel-

zahl von Endo- und Exo-Glykosidasen wie von Thotakura et al., Meth. Enzymol. 138, 350 (1987) beschrieben erzielt werden.

[0084] Eine weitere Art der kovalenten Modifizierung umfasst das Binden der PRO358-Polypeptide an eine Vielzahl von nicht-proteinartigen Polymeren, z. B. Polyethylenglycol (PEG), Polypropylenglykol oder Polyoxyalkylene in der Weise, wie sie in den US-Patenten Nr. 4.640.835; 4.496.689; 4.301.144; 4.670.417; 4.791.192 oder 4.179.337 dargelegt ist.

[0085] Die PRO358-Polypeptide der vorliegenden Erfindung können außerdem auf eine Weise modifiziert werden, bei der ein Hybridmolekül gebildet wird, das PRO358 oder ein Fragment davon umfasst, das an ein(e) weitere(s), heterologe(s) Polypeptid oder Aminosäuresequenz fusioniert ist. In einer der Ausführungsformen umfasst ein derartiges Hybridmolekül eine Fusion des PRO358-Polypeptids mit einem Marker-Polypeptid, das ein Epitop bereitstellt, an das ein Anti-Marker-Antikörper selektiv binden kann. Der Epitop-Marker wird im Allgemeinen am Amino- oder Carboxyterminus eines nativen PRO358-Moleküls oder einer Variante davon platziert. Die Gegenwart derartiger Epitop-markierter Formen kann unter Verwendung eines Antikörpers gegen das Marker-Polypeptid nachgewiesen werden. Außerdem ermöglicht die Bereitstellung des Epitop-Markers die einfache Reinigung der PRO358-Polypeptide mittels Affinitätsreinigung unter Verwendung eines Anti-Marker-Antikörpers oder einer anderen Art von Affinitätsmatrix, die an den Epitop-Marker bindet.

[0086] Verschiedene Marker-Polypeptide und ihre jeweiligen Antikörper sind auf dem Gebiet der Erfindung wohlbekannt. Beispiele umfassen Poly-Histidin-(Poly-His-) oder Poly-Histidin-Glycin-(Poly-His-Gly-) Epitop-Marker; das flu-HA-Marker-Polypeptid und sein Antikörper 12CA5 (Field et al., Mol. Cell. Biol. 8, 2159–2165 (1988)); den c-myc-Marker und die 8F9-, 3C7-, 6E10-, G4-, B7- und 9E10-Antikörper dagegen (Evan et al., Molecular and Cellular Biology 5, 3610–3616 (1985)); und der Herpes-Simplex-Virus-Glykoprotein D (gD-) Marker und sein Antikörper (Paborsky et al., Protein Engineering 3(6), 547–553 (1990)). Andere Marker-Polypeptide umfassen das Flag-Peptid (Hopp et al., BioTechnology 6, 1204–1210 (1988)); das KT3-Epitop-Peptid (Martin et al., Science 255, 192–194 (1992)); ein α-Tubulin-Epitop-Peptid (Skinner et al., J. Biol. Chem. 266, 15163–15166 (1991)); und den T7-Gen-10-Protein-Peptidmarker (Lutz-Freyermuth et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 6393–6397 (1990)).

[0087] In einer weiteren Ausführungsform kann das Hybridmolekül eine Fusion der PRO358-Polypeptide oder von Fragmenten davon mit einem Immunglobulin oder einer bestimmten Region eines Immunglobulins umfassen. Für eine zweiwertige Form des Hybridmoleküls könnte eine derartige Fusion die an die Fc-Region eines Ig-, wie z. B. IgG-Moleküls sein. Die Ig-Fusionen umfassen vorzugsweise die Substitution einer löslichen (transmembrandomänendeletierten oder inaktivierten) Form eines PRO358-Polypeptids anstelle von zumindest einer variablen Region in einem Ig-Molekül. Zur Produktion von Immunglobulinfusionen siehe auch US-Patent Nr. 5.428.130, erteilt am 27. Juni 1995.

D. Herstellung von PRO358-Polypeptiden

[0088] Die untenstehende Beschreibung betrifft in erster Linie die Herstellung von PRO358-Toll-Homologen durch Kultivieren von Zellen, die mit einem Vektor transformiert oder transfiziert sind, der für diese Proteine kodierende Nucleinsäure (z. B. DNA47361) enthält. Es ist selbstverständlich vorgesehen, dass alternative Verfahren, die auf dem Gebiet der Erfindung wohlbekannt sind, zur Herstellung von PRO358 oder Varianten davon eingesetzt werden können. Zum Beispiel können die PRO358-Sequenz oder Abschnitte davon durch direkte Peptidsynthese unter Verwendung von Festphasentechniken hergestellt werden (siehe z. B. Stewart et al., Solid-Phase Peptide Synthesis, W. H. Freeman Co., San Francisco, CA (1969); Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85, 2149–2154 (1963)). Eine In-vitro-Proteinsynthese kann unter Verwendung manueller Techniken oder automatisiert durchgeführt werden. Die automatisierte Synthese kann beispielsweise unter Verwendung eines Applied Biosystems Peptide Synthesizers (Foster City, CA) unter Anwendung der Anleitungen des Herstellers erzielt werden. Verschiedene Abschnitte von PRO358 können chemisch gesondert oder kombiniert unter Anwendung chemischer oder enzymatischer Verfahren synthetisiert werden, um PRO358 voller Länge herzustellen.

1. Isolierung von für PRO358 kodierender DNA

[0089] Für PRO358 kodierende DNA kann aus einer cDNA-Bibliothek erlangt werden, die aus Geweben hergestellt wurde, von denen angenommen wird, das sie die PRO358-mRNA besitzen und sie in einem nachweisbaren Ausmaß exprimieren. Demgemäß kann menschliche PRO358-DNA leicht aus einer aus menschlichem Gewebe hergestellten cDNA-Bibliothek auf eine Weise erlangt werden, wie sie in den Beispielen beschrieben

wird. Das zugrunde liegende Gen kann ebenfalls aus einer Genom-Bibliothek oder durch Oligonucleotidsynthese erlangt werden. Zusätzlich zu den in den Beispielen beschriebenen Bibliotheken kann für die menschlichen Toll-Proteine der vorliegenden Erfindung kodierende DNA beispielsweise aus Milzzellen oder Peripherblut-Leukozyten (PBL) isoliert werden.

[0090] Bibliotheken können mit Sonden (wie z. B. Antikörpern gegen das PRO358-Protein oder Oligonucleotide von zumindest etwa 20–80 Basen) gescreent werden, die so konstruiert sind, dass sie das Gen von Interesse oder das von ihm kodierte Protein identifizieren. Das Screenen der cDNA- oder Genom-Bibliothek mit der gewählten Sonde kann unter Verwendung von Standardverfahren durchgeführt werden, wie zum Beispiel jenen, die in Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) beschrieben sind. Ein alternatives Mittel zur Isolierung des für PRO358 kodierenden Gens ist die Verwendung des PCR-Verfahrens (Sambrook et al., siehe oben; Dieffenbach et al., PCR Primer: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1995)).

[0091] Die unten stehenden Beispiele beschreiben Techniken zum Screenen einer cDNA-Bibliothek. Die als Sonden gewählten Oligonucleotidsequenzen sollten von ausreichender Länge und ausreichend eindeutig sein, damit falsch-positive Resultate minimiert werden. Das Oligonucleotid ist vorzugsweise markiert, so dass es bei Hybridisierung an DNA in der gescreenten Bibliothek nachgewiesen werden kann. Markierungsverfahren sind auf dem Gebiet der Erfindung wohlbekannt und umfassen die Verwendung von radioaktiven Markern wie z. B. ^{32}P -markiertes ATP, Biotinylierung oder Enzymmarkierung. Hybridisierungsbedingungen, einschließlich mäßiger und hoher Stringenz werden in Sambrook et al., siehe oben, bereitgestellt.

[0092] Bei derartigen Bibliotheks-Screeningverfahren identifizierte Sequenzen können mit anderen bekannten Sequenzen, die in öffentlichen Datenbanken, wie z. B. GenBank oder anderen privaten Sequenzdatenbanken hinterlegt und verfügbar sind, verglichen und an diese angeglichen werden. Sequenzidentität (entweder auf Aminosäure- oder auf Nucleotid-Ebene) innerhalb definierter Regionen des Moleküls oder über die volle Länge der Sequenz hinweg kann durch Sequenzangleichung unter Verwendung von Computersoftwareprogrammen, wie z. B. ALIGN, DNASTAR und INHERIT ermittelt werden, die verschiedene Algorithmen einsetzen, um Homologie/Sequenzidentität zu messen.

[0093] Nucleinsäure, die eine für Protein kodierende Sequenz aufweist, kann durch Screenen ausgewählter cDNA- oder Genom-Bibliotheken unter Verwendung der hierin erstmals offenbarten, hergeleiteten Aminosäuresequenz erlangt werden, und, falls erforderlich, unter Verwendung herkömmlicher Primerextensionsverfahren, wie sie in Sambrook et al., siehe oben, beschrieben sind, um Vorläufer und Prozessierungzwischenprodukte von mRNA nachzuweisen, die nicht in cDNA revers transkribiert worden sind.

2. Auswahl und Transformation von Wirtszellen

[0094] Wirtszellen werden mit hierin zur Produktion der menschlichen Toll-Proteine beschriebenen Expressions- oder Klonierungsvektoren transfiziert oder transformiert und auf herkömmlichen Nährmedien kultiviert, die in geeigneter Weise zur Induktion von Promotoren, zum Selektieren von Transformanten oder Amplifizieren der für die gewünschten Sequenzen kodierenden Gene modifiziert worden sind. Die Kultivierungsbedingungen, wie z. B. Medium, Temperatur, pH und dergleichen können vom geübten Fachmann ohne übermäßiges Experimentieren gewählt werden. Im Allgemeinen finden sich Prinzipien, Protokolle und praktische Techniken zur Maximierung der Produktivität von Zellkulturen in Mammalian Cell Biotechnology: A Practical Approach, M. Butler (Hrsg.), IRL Press (1991) und Sambrook et al. siehe oben.

[0095] Verfahren der Transfektion sind dem Durchschnittsfachmann bekannt, beispielsweise CaPO_4 und Elektroporation. In Abhängigkeit von der verwendeten Wirtszelle wird die Transformation unter Verwendung von Standardtechniken durchgeführt, die für derartige Zellen geeignet sind. Die Calciumbehandlung, die wie in Sambrook et al. (siehe oben) beschrieben Calciumchlorid einsetzt, oder die Elektroporation werden allgemein für Prokaryoten oder andere Zellen verwendet, die wesentliche Zellwandbarrieren enthalten. Die Infektion mit Agrobacterium tumefaciens wird zur Transformation gewisser Pflanzenzellen verwendet, wie von Shaw et al., Gene 23, 315 (1983) und in der am 29. Juni 1989 veröffentlichten WO 89/05859 beschrieben wird. Für Säugetierzellen ohne derartige Zellwände kann das Calciumphosphat-Präzipitationsverfahren von Graham und van der Eb, Virology 52, 456–457 (1978) eingesetzt werden. Allgemeine Aspekte von Säugetierzellen-Wirtsystemtransformationen sind im US-Patent Nr. 4.399.216 beschrieben worden. Transformationen in Hefe werden typischerweise nach dem Verfahren von Van Solingen et al., J. Bact. 130, 946 (1977) und Hsiao et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 3829 (1979) ausgeführt. Jedoch können auch andere Verfahren zur Einführung von DNA in Zellen verwendet werden, wie z. B. mittels Kernmikroinjektion, Elektroporation, Bakterienprotoplas-

tenfusion mit intakten Zellen, oder Polykationen, z. B. Polybren, Polyornithin. Zu verschiedenen Techniken zur Transformation von Säugetierzellen siehe Keown et al., Methods in Enzymology 185, 527–537 (1990) und Mansour et al., Nature 336, 348–352 (1988).

[0096] Geeignete Wirtszellen zur Klonierung oder Expression der DNA in die Vektoren hierin umfassen Prokaryoten-, Hefe- oder höhere Eukaryotenzellen. Geeignete Prokaryoten umfassen, sind jedoch nicht eingeschränkt auf Eubakterien, wie z. B. Gramnegative oder Gram-positive Organismen, beispielsweise Enterobacteriaceae, wie z. B. *E. coli*. Verschiedene *E. coli*-Stämme sind öffentlich zugänglich, wie z. B. *E. coli* K12-Stamm MM294 (ATCC 31.446); *E. coli* X1776 (ATCC 31.537); *E. coli*-Stamm W3110 (ATCC 27.325) und K5 772 (ATCC 53.635).

[0097] Zusätzlich zu Prokaryoten sind eukaryotische Mikroben, wie z. B. Fadenpilze oder Hefe geeignete Klonierungs- und Expressionswirte für menschliche Toll-kodierende Vektoren. *Saccharomyces cerevisiae* ist ein häufig verwendetes niedriger eukaryotischer Wirtsmikroorganismus.

[0098] Geeignete Wirtszellen zur Expression der glykosylierten menschlichen Toll-Proteine stammen von mehrzelligen Organismen. Beispiele von Zellen wirbelloser Tiere umfassen Insektenzellen, wie z. B. *Drosophila S2* und *Spodoptera Sf9* sowie Pflanzenzellen. Beispiele zweckdienlicher Säugetierwirtszelllinien umfassen Chinahamster-Eierstock-(CHO-) und COS-Zellen. Speziellere Beispiele umfassen die mit SV40 transformierte Affennieren-CV1-Linie (COS-7, ATCC CRL 1651); menschliche embryonale Nierenlinie (293 oder 293-Zellen, subkloniert zum Wachstum in Suspensionskultur, Graham et al., J. Gen Virol. 36, 59 (1977)); Chinahamster-Eierstockzellen/-DHFR (CHO, Urlaub und Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 4216 (1980)); Maus-Sertolizellen (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23, 243–251 (1980)); menschliche Lungenzellen (W138, ATCC CCL 75); menschliche Leberzellen (Hep G2, HB 8065); und Maus-Mammatumor (MMT 060562, ATCC CCL51). Es wird davon ausgegangen, dass der Fachmann auf dem Gebiet der Erfindung fähig ist, die geeignete Wirtszelle auszuwählen.

3. Auswahl und Verwendung eines Replikationsvektors

[0099] Die für PRO358 kodierende Nucleinsäure (z. B. cDNA oder genomische DNA) kann zur Klonierung (DNA-Amplifikation) oder zur Expression in einen replizierbaren Vektor insertiert werden. Es sind verschiedene Vektoren öffentlich zugänglich. Der Vektor kann in Form eines Plasmids, Cosmids, Virusteilchens oder Phagen vorliegen. Die geeignete Nucleinsäuresequenz kann durch eine Vielzahl von Verfahren in den Vektor insertiert werden. Im Allgemeinen wird DNA in (eine) geeignete Restriktionsendonuclease(n) unter Anwendung von Techniken insertiert, die auf dem Gebiet der Erfindung bekannt sind. Vektorkomponenten umfassen im Allgemeinen, sind jedoch nicht eingeschränkt auf eine oder mehrere Signalsequenzen, einen Replikationsstartpunkt, ein oder mehrere Markergene, ein Enhancerelement, einen Promotor und eine Transkriptionsterminationssequenz. Die Konstruktion geeigneter Vektoren, die eine oder mehrere dieser Komponenten enthalten, setzt standardmäßige Ligationstechniken ein, die dem geübten Fachmann bekannt sind.

[0100] Die PRO358-Proteine können nicht nur direkt rekombinant produziert werden, sondern auch als Fusionpolypeptid mit einem heterologen Polypeptide, das eine Signalsequenz und ein anderes Polypeptid mit einer spezifischen Spaltstelle am N-Terminus des reifen Proteins oder Polypeptids sein kann. Im Allgemeinen kann die Signalsequenz eine Komponente des Vektors sein, oder kann ein Abschnitt der PRO358-DNA sein, die in den Vektor insertiert wird. Die Signalsequenz kann eine eukaryotische Signalsequenz sein, die beispielsweise aus der Gruppe der Alkalische-Phosphatase-, Penicillinase-, Ipp- oder hitzestabilen Enterotoxin II-Leader gewählt ist. Für die Hefesekretion kann die Signalsequenz z. B. der Hefe-Invertase-Leader, α-Faktor-Leader (einschließlich *Saccharomyces*- und *Kluyveromyces*-α-Faktor-Leader, Letzterer beschrieben im US-Patent Nr. 5.010.182) oder Saure-Phosphatase-Leader, der Glucoamylase-Leader aus *C. albicans* (EP 362.179, veröffentlicht am 4. April 1990) oder das in der am 15. November 1990 veröffentlichten WO 90/13646 beschriebene Signal sein. Bei der Säugetierzelleexpression können Säugetier-Signalsequenzen verwendet werden, um die Sekretion des Proteins zu steuern, wie z. B. Signalsequenzen aus sekretierten Polypeptiden derselben oder einer verwandten Spezies, sowie virale Sekretionsleader.

[0101] Expressions- sowie Klonierungsvektoren enthalten eine Nucleinsäuresequenz, die es dem Vektor ermöglicht, sich in einer oder mehreren gewählten Wirtszellen zu replizieren. Derartige Sequenzen sind für eine Vielzahl von Bakterien, Hefe und Viren bekannt. Der Replikationsstartpunkt aus dem Plasmid pBR322 ist für die meisten Gramnegativen Bakterien geeignet, der 2 μ -Plasmid-Startpunkt ist für Hefe geeignet und verschiedene Virusstartpunkte (SV40, Polyoma, Adenovirus, VSV oder BPV) sind zur Klonierung von Vektoren in Säugetierzellen geeignet.

[0102] Expressions- und Klonierungsvektoren enthalten typischerweise ein Selektionsgen, das auch selektierbarer Marker genannt wird. Typische Selektionsgene kodieren für Proteine, die (a) Resistenz gegen Antibiotika oder andere Toxine verleihen, z. B. Ampicillin, Neomycin, Methotrexat oder Tetracyclin verleihen, (b) auoxotrophe Defekte komplementieren oder (c) kritische Nährstoffe bereitstellen, die aus komplexen Medien nicht verfügbar sind, z. B. das für D-Alanin-Racemase kodierende Gen für Bacilli.

[0103] Ein Beispiel geeigneter selektierbarer Marker für Säugetierzellen sind jene, welche die Identifizierung von Zellen ermöglichen, die zur Aufnahme der PRO-358-Nucleinsäure kompetent sind, wie z. B. DHFR oder Thymidinkinase. Eine geeignete Wirtszelle beim Einsatz von DHFR der Wildform ist die hinsichtlich DHFR-Aktivität defiziente CHO-Zelllinie, die wie von Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 4216 (1980) beschrieben hergestellt und vermehrt wird. Ein geeignetes Selektionsgen zur Verwendung in Hefe ist das im Hefeplasmid YRp7 vorhandene trp1-Gen (Stinchcomb et al., Nature 282, 39 (1979); Kingsman et al., Gene 7, 141 (1979); Tschemper et al., Gene 10, 157 (1980)). Das trp1-Gen stellt einen Selektionsmarker für einen mutierten Hefestamm bereit, dem die Fähigkeit fehlt, sich in Tryptophan zu vermehren, beispielsweise ATCC Nr. 44076 oder PEP4-1 (Jones, Genetics 85, 12 (1977)).

[0104] Expressions- und Klonierungsvektoren enthalten üblicherweise einen Promotor, der operabel an die für das PRO358-Protein kodierende Nucleinsäuresequenz gebunden ist, um die mRNA-Synthese zu steuern. Promotoren, die von einer Vielzahl an möglichen Wirtszellen erkannt werden, sind wohlbekannt. Zur Verwendung bei prokaryotischen Wirten geeignete Promotoren umfassen die β -Lactamase- und Lactose-Promotor-systeme (Chang et al., Nature 275, 615 (1978); Goeddel et al., Nature 281, 544 (1979)), Alkalische-Phosphatase, ein Tryptophan-(trp-)Promotorsystem (Goeddel, Nucleic Acids Res. 8, 4057 (1980); EP 36.776) und Hybridgetmotoren, wie z. B. den tac-Promotor (deBoer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 21–25 (1983)). Promotoren zur Verwendung in bakteriellen Systemen werden außerdem eine Shine-Dalgarno-(S. D.-) Sequenz enthalten, die operabel an die für PRO358 kodierende DNA gebunden ist.

[0105] Beispiele geeigneter Promotorsequenzen zur Verwendung bei Hefewirten umfassen die Promotoren für 3-Phosphoglycerokinase (Hitzeman et al., J. Biol. Chem. 255, 2073 (1980)) oder andere glykolytische Enzyme (Ness et al., J. Adv. Enzyme Reg. 7, 149 (1968); Holland, Biochemistry 17, 4900 (1978)), wie z. B. Enolase, Glyceraldehyd-3-phosphatdehydrogenase, Hexokinase, Pyruvatdecarboxylase, Phosphofructokinase, Glucose-6-phosphat-isomerase, 3-Phosphoglyceratmutase, Pyruvatekinase, Triosephosphat-isomerase, Phosphoglucoseisomerase und Glucokinase.

[0106] Andere Hefepromotoren, die induzierbare Promotoren mit dem zusätzlichen Vorteil der Wachstumsbedingungen kontrollierten Transkription sind, sind die Promotorregionen für Alkoholdehydrogenase 2, Isocytochrom C, Saure-Phosphatase, mit dem Stickstoffmetabolismus assoziierte, abbauende Enzyme, Metallothionein, Glyceraldehyd-3-phosphatdehydrogenase und Enzyme, die für Maltose- und Galactoseverwertung verantwortlich sind. Geeignete Vektoren und Promotoren zur Verwendung bei der Hefexpression werden in EP 73.657 näher beschrieben.

[0107] Die Transkription von PRO358 aus Vektoren in Säugetier-Wirtszellen wird beispielsweise von Vektoren gesteuert, die aus den Genomen von Viren, z. B. Polyoma-Virus, Geflügelpocken-Virus (UK 2.211.504, veröffentlicht am 5. Juli 1989), Adenovirus (wie z. B. Adenovirus 2), Rinder-Papillomavirus, Vogel-Sarcomavirus, Cytomegalovirus, einem Retrovirus, Hepatitis-B-Virus und Simian-Virus 40 (SV40), aus heterologen Säugetier-Promotoren, z. B. dem Actinpromotor oder einem Immunglobulin-Promotor und aus Hitzeschock-Promotoren unter der Voraussetzung erlangt werden, dass derartige Promotoren mit den Wirtszellsystemen kompatibel sind.

[0108] Die Transkription einer für das PRO358-Polypeptid kodierenden DNA durch höhere Eukaryoten kann gesteigert werden, indem eine Enhancersequenz in den Vektor insertiert wird. Enhancer sind cis-agierende DNA-Elemente, die üblicherweise 10 bis 300 bp lang sind, die an einem Promotor agieren, um seine Transkription zu steigern. Es sind zahlreiche Enhancersequenzen aus Säugetiergenen bekannt (Globin, Elastase, Albumin, α -Fetoprotein und Insulin). Typischerweise wird man jedoch einen Enhancer aus einem Virus eukaryotischer Zellen verwenden. Beispiele umfassen den SV40-Enhancer, den Polyoma-Enhancer an der späten Seite des Replikationsstartpunkts und Adenovirus-Enhancer. Die Enhancer können an einer Position 5' oder 3' der für PRO358 kodierenden Sequenz gespleißt werden, befinden sich jedoch vorzugsweise an einer Stelle 5' des Promotors.

[0109] Bei eukaryotischen Wirtszellen (Hefe, Pilze, Insekten, Pflanzen, Tiere, Mensch oder kernhaltigen Zellen aus anderen mehrzelligen Organismen) verwendete Expressionsvektoren werden außerdem Sequenzen

enthalten, die zur Termination der Transkription und zur Stabilisierung der mRNA notwendig sind. Derartige Sequenzen sind üblicherweise von den 5'- und, gelegentlich, 3'-untranslatierten Regionen eukaryotischer oder viraler DNAs oder cDNAs erhältlich. Diese Regionen enthalten Nucleotidsegmente, die als polyadenyierte Fragmente im untranslatierten Abschnitt der für PRO358 kodierenden mRNA transkribiert werden.

[0110] Weitere Verfahren, Vektoren und Wirtszellen, die zur Anpassung an die Synthese von PRO285 in rekombinanter Wirbeltierzellkultur geeignet sind, werden in Gething et al., Nature 293, 620–625 (1981); Mantei et al., Nature 281, 40–46 (1979); EP 117.060; und EP 117.058 beschrieben.

4. Detektion von Genamplifikation/Genexpression

[0111] Genamplifikation und/oder Genexpression kann in einer Probe direkt gemessen werden, beispielsweise durch herkömmliches Southern-Blotting, Northern-Blotting zur Quantifizierung der mRNA-Transkription (Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 5201–5205 (1980)), Dot-Blotting (DNA-Analyse) oder In-situ-Hybridisierung unter Verwendung einer geeignet markierten Sonde auf Basis der hierin bereitgestellten Sequenzen. Alternativ dazu können Antikörper eingesetzt werden, die spezifische Duplexe, einschließlich DNA-Duplexe, RNA-Duplexe und DNA-RNA-Hybrid duplexe oder DNA-Protein-Duplexe erkennen können. Die Antikörper können ihrerseits markiert sein und der Test kann ausgeführt werden, wo der Duplex an eine Oberfläche gebunden ist, so dass bei der Bildung des Duplex an der Oberfläche die Gegenwart von an den Duplex gebundenem Antikörper nachgewiesen werden kann.

[0112] Die Genexpression kann alternativ dazu durch immunologische Verfahren, wie z. B. immunohistochemische Färbung von Zellen oder Gewebeschnitten und Tests von Zellkultur- oder Körperflüssigkeiten gemessen werden, um die Expression des Genprodukts direkt zu quantifizieren. Für die immunohistochemische Färbung und/oder den Test von Probenflüssigkeiten zweckdienliche Antikörper können entweder monoklonale oder polyklonale Antikörper sein und in jeglichem Säugetier hergestellt werden. Zweckdienlicherweise können die Antikörper gegen PRO358-Polypeptide nativer Sequenz oder gegen ein synthetische Peptid auf Basis der hierin bereitgestellten DNA-Sequenzen oder gegen eine an PRO358-DNA fusionierte und für ein spezifisches Antikörperepitop kodierende exogene Sequenz hergestellt werden.

5. Polypeptidreinigung

[0113] PRO358-Formen können aus Zellkulturmedium oder aus Wirtszellsaten gewonnen werden. Falls es membrangebunden ist, kann es unter Verwendung einer geeigneten Tensidlösung (z. B. Triton-X 100) oder durch enzymatische Spaltung aus der Membran freigesetzt werden. Bei der Expression von PRO358 eingesetzte Zellen können durch verschiedene physikalische oder chemische Mittel, wie z. B. Einfrier-Auftau-Zyklen, Beschallung, mechanisches Aufbrechen oder zelllysierende Mittel aufgebrochen werden.

[0114] Es kann wünschenswert sein, PRO358 von rekombinanten Zellproteinen oder Polypeptiden abzutrennen. Die folgenden Verfahren sind beispielgebend für geeignete Reinigungsverfahren: mittels Fraktionierung an Silika oder an einem Ionentauscherharz, wie z. B. DEAE; Chromatofokussierung; SDS-PAGE; Ammoniumsulfatfällung; Gelfiltration, beispielsweise unter Verwendung von Sephadex G-75; Protein A-Sepharose-Säulen zur Entfernung von Verunreinigungen, wie z. B. IgG; und metallkomplexierende Säulen zur Bindung Ektop-markierter Formen des Toll-Proteins. Verschiedene Verfahren der Proteinreinigung können eingesetzt werden, und derartige Verfahren sind auf dem Gebiet der Erfindung bekannt und beispielsweise bei Deutscher, Methods in Enzymology 182 (1990); Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, Springer-Verlag; New York (1982) beschrieben. Der/die Reinigungsschritt(e) hängt/hängen beispielsweise von der Beschaffenheit des verwendeten Produktionsprozesses und dem jeweils produzierten Toll-Protein ab.

E. Verwendungen für die Toll-Proteine und kodierenden Nucleinsäuren

[0115] Nucleotidsequenzen (oder ihr Komplement), die für Toll-Proteine der vorliegenden Erfindung kodieren, haben verschiedene Anwendungen auf dem Gebiet der Molekularbiologie, einschließlich Verwendungen als Hybridisierungssonden, bei der Chromosomen- und Genkartierung und bei der Erzeugung von Anti-Sense-RNA und DNA. Toll-Nucleinsäure wird auch für die Herstellung von PRO358-Polypeptiden durch hierin beschriebene rekombinante Techniken zweckdienlich sein.

[0116] Die DNA40021-Gene nativer Sequenz und voller Länge, die für PRO358 oder Abschnitte davon kodieren, können als Hybridisierungssonden für eine cDNA-Bibliothek verwendet werden, um das Gen voller Länge zu isolieren oder noch weitere Gene zu isolieren (beispielsweise jene, die für natürlich vorkommende

Varianten von PRO358 oder ihre weiteren menschlichen Homologe oder Homologe aus anderen Spezies kodieren), die eine gewünschte Sequenzidentität mit der in **Fig. 1**, **Fig. 3** und 12A–B offenbarten PRO358-Sequenz aufweisen. Optional beträgt die Länge der Sonden etwa 20 bis etwa 50 Basen. Die Hybridisierungssonden können von der Nucleotidsequenz aus **Fig. 13A–B** (Seq.-ID Nr. 14) abgeleitet werden oder aus genomischen Sequenzen, die Promotoren, Enhancerelemente und Introns einer nativen Sequenz umfassen. Beispielsweise wird ein Screeningverfahren das Isolieren der kodierenden Region von PRO358 unter Verwendung der bekannten DNA-Sequenz umfassen, um eine gewählte Sonde von etwa 40 Basen zu synthetisieren. Hybridisierungssonden können mit einer Reihe von Markern markiert sein, einschließlich Radionukleotiden, wie z. B. ^{32}P oder ^{35}S , oder enzymatischen Markern, wie z. B. alkalische Phosphatase, an die Sonde gekoppelt über Avidin/Biotin-Kopplungssysteme. Markierte Sonden mit einer Sequenz, die zu derjenigen von PRO358 (DNA 47361) der vorliegenden Erfindung komplementär ist, können zum Screenen von Bibliotheken menschlicher cDNA, genomicscher DNA oder mRNA verwendet werden, um zu ermitteln, an welche Elemente derartiger Bibliotheken die Sonde hybridisiert. Hybridisierungstechniken werden in den unten stehenden Beispielen ausführlicher beschrieben.

[0117] Die Sonden können außerdem in PCR-Techniken eingesetzt werden, um einen Pool von Sequenzen zur Identifizierung nahe verwandter Toll-Sequenzen zu erzeugen.

[0118] Nucleotidsequenzen, die für ein Toll-Protein hierin kodieren, können außerdem verwendet werden, um Hybridisierungssonden zur Kartierung des Gens zu konstruieren, das für dieses Toll-Protein kodiert, sowie für die genetische Analyse von Individuen mit genetischen Störungen. Die hierin bereitgestellten Nucleotidsequenzen können an ein Chromosom und spezifische Regionen eines Chromosoms kartiert werden, und zwar unter Anwendung bekannter Techniken, wie z. B. In-situ-Hybridisierung, Bindungsanalyse gegen bekannte chromosomale Marker und Hybridisierungs-Screening mit Bibliotheken.

[0119] Die menschlichen Toll-Proteine der vorliegenden Erfindung können außerdem in Tests verwendet werden, um andere Proteine oder Moleküle zu identifizieren, die an der Toll-vermittelten Signalübertragung beteiligt sind. Beispielsweise ist PRO358 zweckdienlich bei der Identifizierung der bislang unbekannten natürlichen Liganden menschlicher Toll-Proteine oder anderer Faktoren, die (direkt oder indirekt) an der Aktivierung und/oder Signalisierung durch einen menschlichen Toll-Rezeptor, wie z. B. potentielle, mit einem Toll-Rezeptor assoziierte Kininasen beteiligt sind. Außerdem können Inhibitoren der Rezeptor/Ligand-Bindungswechselwirkung identifiziert werden. An derartigen Bindungswechselwirkungen beteiligte Proteine können außerdem verwendet werden, um auf Peptide oder kleine Moleküle zu screenen, die Inhibitoren oder Agonisten der Bindungswechselwirkung sind. Es können Screeningtests konstruiert werden, um Leitsubstanzen zu finden, welche die biologische Aktivität eines nativen Toll-Polypeptids oder eines Liganden für ein natives Toll-Polypeptid nachahmen. Derartige Screeningtests umfassen Tests, die dem Hochdurchsatz-Screening chemischer Bibliotheken zugänglich sind, wodurch sie sich besonders zur Identifizierung kleiner Moleküle als Medikamentenkandidaten eignen. Vorgesehene kleine Moleküle umfassen synthetische organische oder anorganische Verbindungen. Die Tests können in einer Vielzahl von Formaten durchgeführt werden, einschließlich Protein-Protein-Bindungstests, biochemische Screeningtests, Immuntests und auf Zellen basierende Tests, die auf dem Gebiet der Erfindung gut charakterisiert sind.

[0120] In-vitro-Tests setzen ein Gemisch aus Verbindungen, einschließlich eines Toll-Rezeptor-Polypeptids ein, das Teil eines Fusionsprodukts mit einem anderen Peptid oder Polypeptid, z. B. einem Marker zur Detektion oder Verankerung usw. sein kann. Das Testgemisch kann außerdem (für Bindungstests) ein natürliches intra- oder extrazelluläres Toll-bindendes Ziel umfassen (d. h., einen Toll-Liganden oder ein weiteres Molekül, das bekanntermaßen den Toll-Rezeptor aktiviert und/oder durch diesen signalisiert). Obgleich native Bindungsziele verwendet werden können, wird häufig bevorzugt, einen Abschnitt derartiger nativer Bindungsziele zu verwenden (z. B. Peptide), solange der Abschnitt für eine Bindungsaffinität und Avidität gegenüber dem gegenständlichen Toll-Protein sorgt, die im Test leicht gemessen werden kann. Das Testgemisch enthält außerdem einen pharmakologischen Kandidaten-Wirkstoff. Kandidaten-Wirkstoffe umfassen zahlreiche chemische Klassen und sind typischerweise organische Verbindungen, vorzugsweise kleine organische Verbindungen und werden aus einer Reihe von Quellen erlangt, einschließlich aus Bibliotheken synthetischer oder natürlicher Verbindungen. Eine Vielzahl anderer Reagenzien kann ebenfalls im Gemisch enthalten sein, wie z. B. Salze, Puffer, neutrale Proteine, z. B. Albumin, Detergenzien, Proteaseinhibitoren, Nucleaseinhibitoren, antimikrobielle Mittel usw.

[0121] Bei In-vitro-Bindungstests wird das erhaltende Gemisch unter Bedingungen inkubiert, wonach das Toll-Protein ohne die Gegenwart des Kandidaten-Moleküls das zelluläre Bindungsziel, einen Abschnitt oder ein Analogon davon spezifisch mit einer Referenzaffinität bindet. Die Komponenten des Gemisches können in jeg-

licher Reihenfolge zugegeben werden, die für die erforderlichen Bindungen sorgt, und Inkubationen können bei jeglicher Temperatur durchgeführt werden, welche die optimale Bindung fördert. Inkubationszeiten werden gleichermaßen für optimale Bindung gewählt, jedoch auch minimiert, um ein schnelles Hochdurchsatz-Screening zu erleichtern.

[0122] Nach der Inkubation wird die durch das Mittel beeinflusste Bindung zwischen dem Toll-Protein und einem oder mehreren Bindungszielen mithilfe jeglicher zweckmäßigen Technik nachgewiesen. Für zellfreie Bindungstests wird häufig ein Trennschritt verwendet, um gebundene von ungebundenen Komponenten zu trennen. Die Trennung kann durch Präzipitation (z. B. TCA-Präzipitation, Immunopräzipitation usw.), Immobilisierung (z. B. an ein festes Substrat) usw., gefolgt vom Waschen, zum Beispiel Membranfiltration (z. B. Ionentauscherpapier P-18 von Whatman, hydrophobe GFC-Membran von Polyfiltronic usw.), Gelchromatographie (z. B. Gelfiltration, Affinität usw.) herbeigeführt werden. Für Toll-abhängige Transkriptionstests wird die Bindung durch eine Änderung der Expression eines Toll-abhängigen Reporters nachgewiesen.

[0123] Die Detektion kann auf jegliche zweckdienliche Weise ausgeführt werden. Für zellfreie Bindungstests umfasst einer der Komponenten für gewöhnlich einen Marker oder sie ist daran gekoppelt. Der Marker kann einen direkten Nachweis als Radioaktivität, Lumineszenz, optische Dichte oder Elektronendichte bereitstellen, oder einen indirekten Nachweis bereitstellen, wie z. B. einen Epitopmarker, ein Enzym usw. Eine Vielzahl an Verfahren kann verwendet werden, um den Marker in Abhängigkeit von der Beschaffenheit des Markers und anderen Testkomponenten nachzuweisen, z. B. durch optische Dichte oder Elektronendichte, Strahlungsemisionen, strahlungslose Energieübertragungen usw. oder indirekt mit Antikörperkonjugaten.

[0124] Nucleinsäuren, die für PRO358 oder ihre modifizierten Formen kodieren, können außerdem verwendet werden, um entweder transgene nicht-menschliche Tiere oder nicht-menschliche „Knockout“-Tiere zu erzeugen, die wiederum bei der Entwicklung und beim Screening therapeutisch zweckdienlicher Reagenzien verwendbar sind. Ein transgenes Tier (z. B. eine Maus oder Ratte) ist ein nicht-menschliches Tier mit Zellen, die ein Transgen enthalten, wobei das Transgen in einem pränatalen, z. B. embryonalen Stadium in das Tier oder einen Vorfahren des Tiers eingeführt worden ist. Ein Transgen ist eine DNA, die in das Genom einer Zelle integriert ist, aus dem sich ein transgenes Tier entwickelt. cDNA kann verwendet werden, um für PRO358 kodierende, genomische DNA zu klonieren, und zwar in Übereinstimmung mit etablierten Techniken und den genetischen Sequenzen, die zur Erzeugung transgener Tiere verwendet werden, die Zellen enthalten, die für PRO358 kodierende DNA exprimieren. Verfahren zur Erzeugung von nicht-menschlichen transgenen Tieren, insbesondere Tieren wie z. B. Mäusen und Ratten, sind auf dem Gebiet der Erfindung üblich geworden und sind beispielsweise in den US-Patenten Nr. 4.736.866 und 4.870.009 beschrieben. Typischerweise wird auf bestimmte Zellen für die Transgeninkorporation mit gewebespezifischen Enhancern abgezielt. Transgene nicht-menschliche Tiere, die eine Kopie eines in einem embryonalen Stadium in die Keimbahn des Tiers eingeführte Kopie eines für PRO358 kodierenden Transgens enthalten, können verwendet werden, um die Wirkung der erhöhten Expression von für PRO358 kodierender DNA zu untersuchen. Derartige Tiere können als Versuchstiere für Reagenzien verwendet werden, von denen angenommen wird, dass sie Schutz vor z. B. pathologischen Zuständen verleihen, die mit seiner Expression verbunden sind. Gemäß diesem Aspekt der Erfindung wird ein Tier mit dem Reagens behandelt und ein verminderter Auftreten des pathologischen Zustands im Vergleich zu unbehandelten, das Transgen tragenden Tieren würde eine mögliche therapeutische Intervention für den pathologischen Zustand anzeigen.

[0125] Alternativ dazu können nicht-menschliche Wirbeltier- (z. B. Säugetier-)Homologe von PRO358 verwendet werden, um ein nicht-menschliches „Knockout“-Tier zu konstruieren, das ein defizientes oder verändertes für PRO358 kodierendes Gen aufweist, und zwar als Folge der homologen Rekombination zwischen dem endogenen, für PRO358-Protein kodierenden Gen und veränderter genetischer, für PRO358 kodierender, in eine embryonale Zelle des nicht-menschlichen Tiers eingeführter DNA. Beispielsweise kann für PRO358 kodierende cDNA verwendet werden, um für PRO358 kodierende genomische DNA nach etablierten Techniken zu klonieren. Ein Abschnitt der für PRO358 kodierenden genetischen DNA kann deletiert oder durch ein anderes Gen ersetzt werden, wie z. B. durch ein Gen, das für einen selektierbaren Marker kodiert, der zur Beobachtung der Integration verwendet werden kann. Typischerweise sind mehrere Kilobasen unveränderter, flankierender DNA (sowohl am 5'- als auch am 3'-Ende) im Vektor enthalten (siehe z. B. Thomas und Capecchi, Cell 51, 503 (1987) für eine Beschreibung von homologen Rekombinationsvektoren). Der Vektor wird in eine embryonale nicht-menschliche Stammzelllinie eingeführt (z. B. durch Elektroporation) und es werden Zellen ausgewählt, in denen die eingeführte DNA homolog mit der endogenen DNA rekombiniert hat (Siehe z. B. Li et al., Cell 69, 915 (1992)). Die gewählten Zellen werden dann in eine Blastozyste eines nicht-menschlichen Tiers (z. B. einer Maus oder Ratte) injiziert, um Aggregationshybride auszubilden (siehe z. B. Bradley, in: Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, E. J. Robertson (Hrsg.),

IRL, Oxford, S. 113–152 (1987)). Ein nicht-menschlicher Hybridembryo kann dann in ein geeignetes scheinträgliches, weibliches, nicht-menschliches Pflegetier implantiert und der Embryo ausgetragen werden, um ein nicht-menschliches „Knockout“-Tier zu erzeugen. Nachkommen, welche die homolog rekombinierte rekombinante DNA in ihren Keimzellen beherbergen, können mittels Standardtechniken identifiziert und verwendet werden, um Tiere zu züchten, bei denen alle Zellen des Tiers die homolog rekombinierte DNA enthalten. Nicht-menschliche Knockout-Tiere können beispielsweise hinsichtlich ihrer Fähigkeit charakterisiert werden, sich gegen gewisse pathologische Zustände zu wehren, und hinsichtlich ihrer Entwicklung pathologischer Zustände aufgrund der Abwesenheit der PRO358-Polypeptide.

[0126] Für die hierin offenbarten Toll-Polypeptide kodierende Nucleinsäure kann außerdem in der Gentherapie verwendet werden. Bei Gentherapieanwendungen werden Gene in Zellen eingeführt, um die In-vivo-Synthese eines therapeutisch wirksamen Genprodukts, z. B. zum Ersatz eines defizienten Gens zu erzielen. „Gentherapie“ umfasst sowohl die herkömmliche Gentherapie, wobei eine dauerhafte Wirkung durch eine einzige Behandlung erzielt wird, als auch die Verabreichung von gentherapeutischen Mitteln, was die einmalige oder wiederholte Verabreichung einer therapeutisch wirksamen DNA oder mRNA umfasst. Antisense-RNAs und DNAs können als therapeutische Mittel zum Blockieren der Expression gewisser Gene in vivo verwendet werden. Es ist bereits gezeigt worden, dass kurze Antisense-Oligonucleotide in Zellen importiert werden können, wo sie als Inhibitoren agieren, und zwar trotz ihrer niedrigen intrazellulären Konzentrationen, die von ihrer beschränkten Aufnahme durch die Zellmembran verursacht werden (Zamecnik et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 4143–4146 (1986)). Die Oligonucleotide können modifiziert werden, um ihre Aufnahme zu erhöhen, z. B. durch Substituieren ihrer negativ geladenen Phosphodiestergruppen durch ungeladene Gruppen.

[0127] Es gibt eine Reihe von verfügbaren Techniken zur Einführung von Nucleinsäuren in lebensfähige Zellen. Die Techniken variieren in Abhängigkeit davon, ob die Nucleinsäure in vitro, oder in vivo in die Zellen des vorgesehenen Wirts transferiert wird. Techniken, die für den Transfer von Nucleinsäure in Säugetierzellen in vitro geeignet sind, umfassen die Verwendung von Liposomen, Elektroporation, Mikroinjektion, Zellfusion, DEAE-Dextran, das Calciumphosphatpräzipitationsverfahren usw. Die gegenwärtig bevorzugten In-vivo-Gentransfertechniken umfassen die Transfektion mit viralen (typischerweise retroviralen) Vektoren und die Virus-hüllprotein-Liposom-vermittelte Transfektion (Dzau et al., Trends in Biotechnology 11, 205–210 (1993)). Unter manchen Umständen ist es wünschenswert, die Nucleinsäurequelle mit einem Mittel bereitzustellen, das auf die Zielzellen abzielt, wie z. B. einem für ein Zelloberflächenmembranprotein oder die Zielzelle spezifischen Antikörper, einem Liganden für einen Rezeptor auf der Zielzelle usw. Wo Liposomen eingesetzt werden, können Proteine, die an ein mit Endozytose in Verbindung stehendes Oberflächenmembranprotein binden, zum Abzielen und/oder zur Erleichterung der Aufnahme verwendet werden, z. B. Capsidproteine oder Fragmente davon, die für einen bestimmten Zelltyp tropisch sind, Antikörper für Proteine, die im Zyklus internalisiert werden, Proteine, die auf intrazelluläre Lokalisierung abzielen und die intrazelluläre Halbwertszeit erhöhen. Die Technik der Rezeptor-vermittelten Endozytose wird beispielsweise von Wu et al., J. Biol. Chem. 262, 4429–4432 (1987), und Wagner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 3410–3414 (1990) beschrieben. Für einen Überblick über die gegenwärtig bekannten Genmarkierungs- und Gentherapie-Protokolle siehe Anderson et al., Science 256, 808–813 (1992).

[0128] Die verschiedenen im Zusammenhang mit den Toll-Proteinen hierin aufgezählten Verwendungen sind auch für Agonisten der nativen Toll-Rezeptoren gültig, die zumindest eine biologische Funktion eines naiven Toll-Rezeptors nachahmen.

F. Anti-Toll-Protein-Antikörper

[0129] Die vorliegende Erfindung stellt außerdem Anti-Toll-Protein-Antikörper bereit. Beispielhafte Antikörper umfassen polyklonale, monoklonale, humanisierte, bispezifische Antikörper und Heterokonjugat-Antikörper.

1. Polyclonale Antikörper

[0130] Die Anti-Toll-Protein-Antikörper können polyklonale Antikörper umfassen. Verfahren zur Herstellung polyklonaler Antikörper sind dem geübten Fachmann bekannt. Polyclonale Antikörper können in einem Säugetier beispielsweise durch eine oder mehrere Injektionen eines Immunisierungsmittels und, falls erwünscht, eines Adjuvans hergestellt werden. Typischerweise wird das Immunisierungsmittel und/oder Adjuvan durch mehrere subkutane oder intraperitoneale Injektionen in das Säugetier injiziert. Es kann zweckdienlich sein, das Immunisierungsmittel an ein Protein zu konjugieren, das im zu immunisierenden Säugetier bekanntermaßen immunogen ist. Beispiele derartiger immunogener Proteine umfassen, sind jedoch nicht eingeschränkt auf Keyhole-Limpet-Hämocyanin, Serumalbumin, Rinderthyroglobulin und Sojabohnen-Trypsininhibitor. Beispiele

von Adjuvantien, die eingesetzt werden können, umfassen Freund'sches komplettes Adjuvans und MPL-TDM-Adjuvans(Monophosphoryl-Lipid A, synthetisches Trehalosedicorynomycolat). Das Immunisierungsprotokoll kann vom Fachmann auf dem Gebiet der Erfindung ohne übermäßiges Experimentieren gewählt werden.

2. Monoklonale Antikörper

[0131] Die Anti-Toll-Protein-Antikörper können alternativ dazu monoklonale Antikörper sein. Monoklonale Antikörper können unter Verwendung von Hybridomverfahren hergestellt werden, wie z. B. jenen, die von Kohler und Milstein, Nature 256, 495 (1975) beschrieben werden. In einem Hybridomverfahren wird eine Maus, ein Hamster oder ein anderes geeignetes Wirtstier typischerweise mit einem Immunisierungsmittel immunisiert, um Lymphozyten hervorzubringen, die Antikörper produzieren oder zur Produktion von Antikörpern fähig sind, die spezifisch an das Immunisierungsmittel binden. Alternativ dazu können Lymphozyten *in vitro* immunisiert werden.

[0132] Das Immunisierungsmittel wird typischerweise die PRO358-Polypeptide oder ein Fusionsprotein davon umfassen. Im Allgemeinen werden entweder Peripherblutzlymphozyten (PBLs) verwendet, falls Zellen menschlichen Ursprungs erwünscht sind, oder es werden Milzzellen oder Lymphknotenzellen verwendet, falls nicht-menschliche Säugetierquellen gewünscht sind. Die Lymphozyten werden dann mit einer immortalisierten Zelllinie unter Verwendung eines geeigneten Fusionierungsmittels, wie z. B. Polyethylenglykol, fusioniert, um eine Hybridomzelle auszubilden (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, S. 59–103 (1986)). Immortalisierte Zelllinien sind für gewöhnlich transformierte Säugetierzellen, insbesondere Myelomzellen, die von Nagern, Rind und Mensch stammen. Üblicherweise werden Ratten- oder Maus-Myelomzelllinien eingesetzt. Die Hybridomzellen können in einem geeigneten Kulturmedium kultiviert werden, das vorzugsweise eine oder mehrere Substanzen enthält, die das Wachstum oder Überleben der unfusionierten, immobilisierten Zellen hemmt. Wenn beispielsweise den Ausgangszellen das Enzym Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HGPRT oder HPRT) fehlt, wird das Medium für die Hybridome typischerweise Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin („HAT-Medium“) umfassen, wobei diese Substanzen das Wachstum von HGPRT-defizienten Zellen verhindert.

[0133] Bevorzugte immobilisierte Zelllinien sind jene, die effizient fusionieren, eine starke Expression des Antikörpers durch die selektierten, Antikörper produzierenden Zellen fördern und gegen ein Medium, wie z. B. HAT-Medium empfindlich sind. Bevorzugtere immobilisierte Zelllinien sind Maus-Myelomlinien, die beispielsweise vom Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California und der American Type Culture Collection, Rockville, Maryland bezogen werden können. Menschliche Myelomzelllinien und Maus-Mensch-Hetero-myelomzelllinien sind außerdem für die Produktion menschlicher monoklonaler Antikörper beschrieben worden (Kozbor, J. Immunol. 133, 3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker Inc., New York, S. 51–63 (1987)).

[0134] Das Kulturmedium, in dem die Hybridomzellen kultiviert werden, kann dann auf die Gegenwart von gegen PRO358 gerichteten Antikörpern getestet werden. Vorzugsweise wird die Bindungsspezifität der von den Hybridomzellen produzierten monoklonalen Antikörper mittels Immunopräzipitation oder durch einen *In-vitro*-Bindungstest, wie z. B. den Radioimmunttest (RIA) oder Enzyme-linked-immunosorbent-assay (ELISA) bestimmt. Derartige Techniken und Tests sind auf dem Gebiet der Erfindung bekannt. Die Bindungsaffinität des monoklonalen Antikörpers kann beispielsweise mittels Scatchard-Analyse von Munson und Pollard, Anal. Biochem. 107, 220 (1980) bestimmt werden.

[0135] Nach Identifizierung der gewünschten Hybridomzellen können die Klone mittels Grenzverdünnungsverfahren subkloniert und mittels Standardverfahren gezüchtet werden (Goding, siehe oben). Geeignete Kulturmedien zu diesem Zweck umfassen beispielsweise Dulbecco's Modified Eagle's Medium und RPMI-1640-Medium. Alternativ dazu können die Hybridomzellen *in vivo* in Aszites in einem Säugetier gezüchtet werden.

[0136] Die von den Subklonen sekretierten monoklonalen Antikörper können aus dem Kulturmedium oder aus der Aszitesflüssigkeit durch herkömmliche Immunglobulinreinigungsverfahren, wie z. B. Protein A-Sepharose, Hydroxylapatitchromatographie, Gelelektrophorese, Dialyse oder Affinitätschromatographie isoliert oder gereinigt werden.

[0137] Die monoklonalen Antikörper können außerdem durch DNA-Rekombinationsverfahren hergestellt werden, wie z. B. jenen, die im US-Patent Nr. 4.816.567 beschrieben sind. Für die monoklonalen Antikörper

der Erfindung kodierende DNA kann leicht unter Anwendung herkömmlicher Verfahren isoliert und sequenziert werden (z. B. durch Verwendung von Oligonucleotidsonden, die fähig sind, spezifisch an Gene zu binden, die für die Schwer- und Leichtketten von Maus-Antikörpern kodieren). Die Hybridomzellen der Erfindung dienen als bevorzugte Quelle derartiger DNA. Wenn sie einmal isoliert ist, kann die DNA in Expressionsvektoren platziert werden, die dann in Wirtszellen, wie z. B. Simian-COS-Zellen, Chinahamster-Eierstock-(CHO-)Zellen oder Myelomzellen transfiziert werden, die ansonsten kein Immunglobulinprotein produzieren, um die Synthese monoklonaler Antikörper in rekombinanten Wirtszellen zu erlangen. Die DNA kann außerdem modifiziert werden, beispielsweise durch Ersetzen der kodierenden Sequenz für menschliche konstante Domänen der Schwer- und Leichtketten anstelle der homologen Maus-Sequenzen (US-Patent Nr. 4.816.567; Morrison et al., siehe oben) oder durch kovalentes Verbinden der gesamten oder eines Abschnitts der kodierenden Sequenz für ein Nicht-Immunglobulin-Polypeptid an die für Immunglobulin kodierenden Sequenzen. Die konstanten Domänen eines Antikörpers der Erfindung oder die variablen Domänen einer der Antigen-kombinierenden Stellen eines Antikörpers der Erfindung können durch ein derartiges Nicht-Immunglobulin-Polypeptid ersetzt werden, um einen bivalenten Hybridantikörper zu erzeugen.

[0138] Die Antikörper können monovalente Antikörper sein. Verfahren zur Herstellung monovalenter Antikörper sind auf dem Gebiet der Erfindung wohlbekannt. Beispielsweise umfasst eines der Verfahren die rekombinante Expression von Immunglobulin-Leichtkette und modifizierter Schwerkette. Die Schwerkette ist im Allgemeinen an einem beliebigen Punkt in der Fc-Region trunkiert, so dass die Schwerkettengruppenvernetzung verhindert wird. Alternativ dazu werden die maßgeblichen Cysteinreste durch einen anderen Aminosäurerest ersetzt oder werden deletiert, um eine Vernetzung zu verhindern.

[0139] In-vitro-Verfahren sind ebenfalls zur Herstellung monovalenter Antikörper geeignet. Der Verdau von Antikörpern zur Produktion von Fragmenten davon, insbesondere Fab-Fragmenten, kann unter Verwendung routinemäßiger Techniken erzielt werden, die auf dem Gebiet der Erfindung bekannt sind.

3. Humanisierte und menschliche Antikörper

[0140] Die Anti-Toll-Antikörper der Erfindung können außerdem humanisierte Antikörper und menschliche Antikörper umfassen. Humanisierte Formen nicht-menschlicher Antikörper (z. B. Maus-Antikörper) sind Chimaäre Immunglobuline, Immunglobulinketten oder Fragmente davon (wie z. B. Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ oder andere antigenbindende Untersequenzen von Antikörpern), die eine Minimalsequenz enthalten, die von einem nicht-menschlichen Immunglobulin stammt. Humanisierte Antikörper umfassen menschliche Immunglobuline (Empfänger-Antikörper), bei denen Reste einer Complementary-determining-region (CDR) des Empfängers durch Reste aus einer CDR einer nicht-menschlichen Spezies (Spender-Antikörper), wie z. B. Maus, Ratte oder Kaninchen mit der gewünschten Spezifität ersetzt sind. In manchen Fällen werden Fv-Gerüstreste des menschlichen Immunglobulins durch die entsprechenden nicht-menschlichen Reste ersetzt. Humanisierte Antikörper können außerdem Reste umfassen, die sich weder im Empfänger-Antikörper, noch in den importierten CDR- oder Gerüst-Sequenzen finden. Im Allgemeinen wird der humanisierte Antikörper im Wesentlichen alle von zumindest einer und typischerweise zwei variablen Domänen umfassen, bei denen alle oder im Wesentlichen alle der CDR-Regionen jenen eines nicht-menschlichen Immunglobulins entsprechen und alle oder im Wesentlichen alle der FR-Regionen jene einer menschlichen Immunglobulin-Konsensussequenz sind. Der humanisierte Antikörper wird im Optimalfall außerdem zumindest einen Abschnitt einer konstanten Immunglobulinregion (Fc), typischerweise jene eines menschlichen Immunglobulins umfassen (Jones et al., Nature 321, 522–525 (1986); Riechmann et al., Nature 332, 323–329 (1988); und Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2, 593–596 (1992)).

[0141] Verfahren zur Humanisierung nicht-menschlicher Antikörper sind auf dem Gebiet der Erfindung wohlbekannt. Im Allgemeinen weist ein humanisierter Antikörper einen oder mehrere Aminosäurereste auf, die in diesen aus einer nicht-menschlichen Quelle eingeführt worden sind. Diese nicht-menschlichen Aminosäurereste werden häufig als „Import“-Reste bezeichnet, die typischerweise einer variablen „Import“-Domäne entnommen sind. Die Humanisierung kann im Wesentlichen nach dem Verfahren von Winter und Mitarbeitern (Jones et al., Nature 321, 522–525 (1986); Riechmann et al., Nature 332, 323–327 (1988); Verhoeyen et al., Science 239, 1534–1536 (1988)) durch Ersetzen von Sequenzen eines menschlichen Antikörpers durch die entsprechenden Nager-CDRs oder CDR-Sequenzen durchgeführt werden. Demgemäß sind derartige „humanisierte“ Antikörper Hybridantikörper (US-Patent Nr. 4.816.567), worin im Wesentlichen weniger als eine intakte menschliche variable Domäne durch die entsprechende Sequenz aus einer nicht-menschlichen Spezies ersetzt worden ist. In der Praxis sind humanisierte Antikörper typischerweise menschliche Antikörper, bei denen manche CDR-Reste und möglicherweise manche FR-Reste durch Reste aus analogen Stellen in Nager-Antikörpern ersetzt sind.

[0142] Menschliche Antikörper können außerdem unter Verwendung verschiedener Techniken hergestellt werden, die auf dem Gebiet der Erfindung bekannt sind, einschließlich Phagen-Display-Bibliotheken (Hoogenboom und Winter, J. Mol. Biol. 227, 381 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol. 222, 581 (1991)). Die Techniken von Cole et al. und Boerner et al. sind zur Herstellung menschlicher monoklonaler Antikörper ebenfalls verfügbar (Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, S. 77 (1985) und Boerner et al., J. Immunol. 147(1), 86–95 (1991)). Gleichermaßen können menschliche Antikörper durch Einführen menschlicher Immunglobulin-Loci in transgene Tiere, z. B. Mäuse hergestellt werden, bei denen die endogenen Immunglobulogene teilweise oder vollständig inaktiviert worden sind. Bei Exposition wird die Produktion menschlicher Antikörper beobachtet, die jener in Menschen beobachteten in allen Aspekten, einschließlich Gen-Umordnung, Assemblierung und Antikörperrepertoire sehr ähnlich ist. Dieser Ansatz wird beispielsweise in den US-Patenten Nr. 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.661.016 und in den folgenden wissenschaftlichen Publikationen beschrieben: Marks et al., Bio/Technology 10, 779–783 (1992); Lonberg et al., Nature 368, 856–859 (1994); Morrison, Nature 368, 812–13 (1994); Fishwild et al., Nature Biotechnology 14, 845–51 (1996); Neuberger, Nature Biotechnology 14, 826 (1996); Lonberg und Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13, 65–93 (1995).

4. Bispezifische Antikörper

[0143] Bispezifische Antikörper sind monoklonale, vorzugsweise menschliche oder humanisierte Antikörper, die Bindungsspezifitäten für zumindest zwei verschiedene Antigene aufweisen. Im vorliegenden Fall kann einer der Bindungsspezifitäten für das PRO358-Protein, die andere für ein anderes Antigen und vorzugsweise für ein Zelloberflächenprotein oder einen Rezeptor oder eine Rezeptor-Untereinheit sein. Es ist außerdem möglich, bispezifische Antikörper herzustellen, die Spezifitäten gegen zwei unterschiedliche Toll-artige Proteine, wie z. B. beliebige zwei der in der vorliegenden Anmeldung offenbarten Toll-Homologe, oder ein hierin offenbartes Toll-Protein und ein auf dem Gebiet der Erfindung bekanntes Toll-Protein, z. B. TLR2 aufweisen. Derartige bispezifische Antikörper könnten die Erkennung verschiedener Pathogenmuster durch Toll-Rezeptoren blockieren und es wird daher von ihnen erwartet, dass sie signifikante Vorteile bei der Behandlung von Sepsis und septischem Schock aufweisen.

[0144] Verfahren zur Herstellung bispezifischer Antikörper sind auf dem Gebiet der Erfindung bekannt. Herkömmlicherweise basiert die rekombinante Produktion bispezifischer Antikörper auf der Coexpression von zwei Immunglobulin-Schwerketten/Leichtketten-Paaren, wobei die beiden Schwerketten verschiedene Spezifitäten aufweisen (Milstein und Cuello, Nature 305, 537–539 (1983)). Wegen der zufälligen Auswahl von Immunglobulin-Schwer- und Leichtketten produzieren diese Hybridome(Quadrome) ein mögliches Gemisch aus zehn verschiedenen Antikörpermolekülen, von denen nur eines die richtige bispezifische Struktur aufweist. Die Reinigung des richtigen Moleküls wird üblicherweise durch affinitätschromatographische Schritte erzielt. Ähnliche Verfahren sind in der am 13. Mai 1993 veröffentlichten WO 93/08829 und in Traunecker et al., EMBO J. 10, 3655–3659 (1991) offenbart.

[0145] Variable Domänen von Antikörpern mit den gewünschten Bindungsspezifitäten (Antikörper-Antigen-kombinierenden Stellen) können an Immunglobulinsequenzen konstanter Domänen fusioniert werden. Die Fusion erfolgt vorzugsweise mit der konstanten Domäne einer Immunglobulin-Schwerkette, die zumindest einen Teil der Gelenks-, CH2- und CH3-Regionen umfasst. Es wird bevorzugt, dass die erste konstante Region der Schwerkette (CH1), welche die für Leichtkettenbindung benötigte Stelle enthält, in zumindest einer der Fusionen zugegen ist. DNAs, die für die Immunglobulin-Schwerketten-Fusionen und, falls erwünscht, für die Immunglobulin-Leichtkette kodieren, werden in gesonderte Expressionsvektoren insertiert und werden in einen geeigneten Wirtsorganismus transfiziert. Für weitere Einzelheiten zur Erzeugung bispezifischer Antikörper siehe beispielsweise Suresh et al., Methods in Enzymology 121, 210 (1986).

5. Heterokonjugat-Antikörper

[0146] Heterokonjugat-Antikörper liegen ebenfalls im Schutzmfang der vorliegenden Erfindung. Heterokonjugat-Antikörper sind aus zwei kovalent verbundenen Antikörpern zusammengesetzt. Derartige Antikörper sind zum Abzielen von Immunsystemzellen auf unerwünschte Zellen (US-Patent Nr. 4.676.980) und zur Behandlung der HIV-Infektion (WO 91/00360; WO 92/200373; EP 03089) vorgeschlagen worden. Es ist vorgesehen, dass die Antikörper *in vitro* unter Verwendung bekannter Verfahren der synthetischen Proteinchemie, einschließlich jener Verfahren, die Vernetzungsmittel umfassen, hergestellt werden können. Beispielsweise können Immunotoxine unter Verwendung einer Disulfidaustauschreaktion oder durch Bilden einer Thioetherbindung konstruiert werden. Beispiele geeigneter Reagenzien zu diesem Zweck umfassen Iminothiolat und Methyl-4-mercaptopbutyrimidat und jene, die beispielsweise im US-Patent Nr. 4.676.980 offenbart sind.

G. Verwendungen für Anti-Toll-Protein-Antikörper

[0147] Die Anti-Toll-Antikörper der Erfindung haben verschiedene Verwendungsmöglichkeiten. Zum Beispiel können Anti-PRO-358-Antikörper in diagnostischen Tests auf PRO358 verwendet werden, z. B. zur Detektion seiner Expression in spezifischen Zellen, Geweben oder Serum. Verschiedenartige diagnostische, auf dem Gebiet der Erfindung bekannte Testtechniken können verwendet werden, wie z. B. kompetitive Bindungstests, direkte oder indirekte Sandwich-Tests und Immunpräzipitationstests, die entweder in heterogenen oder in homogenen Phasen durchgeführt werden (Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, CRC Press Inc., S. 147–158 (1987)). Die in diagnostischen Tests verwendeten Antikörper können mit einer nachweisbaren Gruppierung markiert sein. Die nachweisbare Gruppierung sollte fähig sein, entweder direkt oder indirekt ein nachweisbares Signal zu produzieren. Zum Beispiel kann die nachweisbare Gruppierung ein Radioisotop, wie z. B. ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S oder ^{125}I , eine fluoreszierende oder chemilumineszente Verbindung, wie z. B. Fluorescein-Isothiocyanat, Rhodamin oder Luciferin, oder ein Enzym, wie z. B. alkalische Phosphatase, β -Galactosidase oder Meerrettichperoxidase sein. Es kann jegliches auf dem Gebiet der Erfindung bekannte Verfahren zur Konjugation des Antikörpers an eine nachweisbare Gruppierung eingesetzt werden, einschließlich jener Verfahren, die von Hunter et al., Nature 144, 945 (1962); David et al., Biochemistry 13, 1014 (1974); Pain et al., J. Immunol. Meth. 40, 219 (1981); und Nygren, J. Histochem. and Cytochem. 30, 407 (1982) beschrieben werden.

[0148] Anti-PRO358-Antikörper sind außerdem zur Affinitätsreinigung dieser Proteine aus rekombinanter Zellkultur oder aus natürlichen Quellen zweckdienlich. Bei diesem Verfahren werden die Antikörper gegen diese Toll-Proteine auf einem geeigneten Träger, wie z. B. Sephadex-Harz oder Filterpapier unter Anwendung von Verfahren immobilisiert, die auf dem Gebiet der Erfindung wohlbekannt sind. Der immobilisierte Antikörper wird dann mit einer das Toll-Protein enthaltenden Probe kontaktiert, und danach wird der Träger mit einem geeigneten Lösungsmittel gewaschen, das im Wesentlichen alles Material mit Ausnahme des an den immobilisierten Antikörper gebundenen PRO358-Proteins entfernt. Schließlich wird der Träger mit einem anderen geeigneten Lösungsmittel gewaschen, welches das Protein vom Antikörper freisetzt.

[0149] Anti-Toll-Rezeptor (d. h. Anti-PRO358-Antikörper) kann auch zur Blockierung der biologischen Aktivitäten der entsprechenden Toll-Rezeptoren zweckdienlich sein. Es wird angenommen, dass die hauptsächliche Funktion der Familie von Toll-Rezeptoren jene ist, als Pathogenerkennungsrezeptoren zu fungieren, welche die Gegenwart von auf Mikroben vorhandenen konservierten Molekülmustern wahrnehmen. Lipopolysaccharide (LPS, auch als Endotoxine bekannt), potentiell letale, von verschiedenen Bakterien produzierte Moleküle, binden an das Lipopolysaccharid-bindende Protein (LBP) im Blut. Der gebildete Komplex aktiviert dann einen als CD14 bekannten Rezeptor. Es gibt auf dem Gebiet der Erfindung keinen Konsens darüber, was als nächstes geschieht. Nach einer Hypothese instruiert CD14 nicht direkt Makrophagen, Cytokine, Zelladhäsionsproteine und Enzyme zu produzieren, die an der Produktion entzündungsfördernder Vermittler niedrigen Molekulargewichts beteiligt sind, sondern ermöglicht es dem LPS, einen zweiten Rezeptor zu aktivieren. Alternativ dazu ist vorgeschlagen worden, dass LPS gewisse Rezeptoren direkt, ohne die Hilfe von LBP oder CD14 aktivieren könnten. Die in der vorliegenden Anmeldung offenbarten Daten weisen darauf hin, dass die menschlichen Toll-artigen Rezeptoren Signalisierungsrezeptoren sind, die durch LPS in einer LBP- und CD14-reaktiven Weise aktivieren. Da dieser Mechanismus unter physiologischen Bedingungen zu einem häufig fatalen, septischen Schock genannten Syndrom führen kann, könnten Anti-Toll-Rezeptor-Antikörper (genau wie andere Toll-Rezeptor-Antagonisten) bei der Behandlung von septischem Schock zweckdienlich sein. Es ist vorauszusehen, dass die verschiedenen Toll-Rezeptoren unterschiedliche Pathogene erkennen könnten, z. B. verschiedene Stämme von Gram-negativen oder Gram-positiven Bakterien. Demgemäß kann unter gewissen Umständen eine Kombinationstherapie mit einem Gemisch von Antikörpern, die spezifisch verschiedene Toll-Rezeptoren binden, oder die Verwendung von bispezifischen Anti-Toll-Antikörpern wünschenswert sein.

[0150] Es wird hierin speziell gezeigt, dass Anti-huTLR2-Antikörper besonders zweckdienlich zur Blockierung der Induktion dieses Rezeptors durch LPS sind. Da gezeigt worden ist, dass LPS-Exposition zu septischem Schock führen kann (Parrillo, N. Engl. J. Med. 328, 1471–1477 (1993)), sind Anti-huTLR2-Antikörper bei der Behandlung von septischem Schock möglicherweise zweckdienlich.

[0151] Die vorangehend im Zusammenhang mit den Anti-Toll-Rezeptor-Antikörpern aufgezählten therapeutischen und diagnostischen Verwendungen sind auch auf andere Toll-Antagonisten, d. h., andere Moleküle (Proteine, Peptide, kleine organische Moleküle usw.) anwendbar, welche die Toll-Rezeptor-Aktivierung und/oder die durch Toll-Rezeptoren vermittelte Signalübertragung blockieren.

[0152] Angesichts ihres therapeutischen Potenzials werden die Toll-Proteine (einschließlich Varianten der na-

tiven Toll-Homologe) und ihre Agonisten und Antagonisten (einschließlich, jedoch nicht eingeschränkt auf Anti-Toll-Antikörper) in Zusammensetzungen inkorporiert, die für therapeutische Verwendung zweckdienlich sind. Therapeutische Zusammensetzungen werden zur Lagerung hergestellt, indem der aktive Bestandteil mit dem gewünschten Reinheitsgrad mit optionalen physiologisch annehmbaren Trägern, Exzipienten oder Stabilisatoren (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16. Ausg., A. Osol (Hrsg.), Ausgabe 1980) in Form lyophilisierter Formulierungen oder wässriger Lösungen vermischt wird. Annehmbare Träger, Exzipienten oder Stabilisatoren sind für Empfänger bei den eingesetzten Dosierungen und Konzentrationen nicht toxisch und umfassen Puffer, wie z. B. Phosphat, Citrat und andere organische Säuren; Antioxidantien, einschließlich Ascorbinsäure; niedermolekulare (weniger als etwa 10 Reste) Polypeptide; Proteine, wie z. B. Serumalbumin, Gelatine oder Immunglobuline; hydrophile Polymere, wie z. B. Polyvinylpyrrolidon, Aminosäuren, wie z. B. Glycin, Glutamin, Asparagin, Arginin oder Lysin; Monosaccharide, Disaccharide und andere Kohlenhydrate, einschließlich Glucose, Mannose oder Dextrine; Komplexierungsmittel, wie z. B. EDTA; Zuckerkohole, wie z. B. Mannit oder Sorbitol; salzbildende Gegenionen, wie z. B. Natrium; und/oder nichtionische Tenside, wie z. B. Tween, Pluronics oder PEG.

[0153] Die aktiven Bestandteile können außerdem in Mikrokapseln, die beispielsweise durch Koazervationstechniken oder durch Grenzflächenpolymerisation hergestellt werden, beispielsweise Hydroxymethylcellulose- oder Gelatine-Mikrokapseln bzw. Poly-(methylmethacrylat)-Mikrokapseln, in kolloidalen Medikamentabgabesystemen (beispielsweise Liposomen, Albumin-Mikrokügelchen, Mikroemulsionen, Nanoteilchen und Nanokapseln) oder in Makroemulsionen eingeschlossen sein. Derartige Techniken sind in Remington's Pharmaceutical Sciences (siehe oben) offenbart.

[0154] Die zur Verabreichung in vivo zu verwendenden Formulierungen müssen steril sein. Die kann leicht mittels Filtration durch Sterilfiltrationsmembranen von oder nach der Lyophilisierung und Rekonstitution erzielt werden.

[0155] Therapeutische Zusammensetzungen hierin werden im Allgemeinen in einen Behälter gefüllt, der eine sterile Füllöffnung aufweist, beispielsweise in einen Beutel für intravenöse Lösungen oder in ein Fläschchen mit einem von einer Injektionsnadel durchstechbaren Stopfen.

[0156] Der Verabreichungsweg steht mit bekannten Verfahren im Einklang, z. B. Injektion oder Infusion über intravenöse, intraperitoneale, intrazerebrale, intramuskuläre, intraokulare, intraarterielle oder intraläsionale Wege, topische Verabreichung oder durch Depotsysteme.

[0157] Geeignete Beispiele von Präparaten mit nachhaltiger Freisetzung umfassen semipermeable Polymermatrices in Form von Formteilchen, z. B. Filmen oder Mikrokapseln. Matrices für nachhaltige Freisetzung umfassen Polyester, Hydrogele, Polylactide (US-Patente Nr. 3.773.919, EP 58.481), Copolymeren von L-Glutaminsäure und γ-Ethyl-L-glutamat (U. Sidman et al., Biopolymers 22(1), 547–556 (1983)), Poly-(2-hydroxyethylmethacrylat) (R. Langer et al., J. Biomed. Mater. Res. 15, 167–277 (1981) und R. Langer, Chem. Tech. 12, 98–105 (1982)), Ethylenvinylacetat (R. Langer et al., Id.) oder Poly-D-(–)-3-hydroxybuttersäure (EP 133.988). Zusammensetzungen mit nachhaltiger Freisetzung umfassen außerdem Liposomen. Liposomen, die ein Molekül enthalten, das im Schutzmfang der Erfindung liegt, werden durch an sich bekannte Verfahren hergestellt: DE 3.218.121; Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 3688–3692 (1985); Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 4030–4034 (1980); EP 52322; EP 36676 A, EP 88046; EP 143949; EP 142641; Japanische Patentanmeldung 83-118008; US-Patente Nr. 4.485.045 und 4.544.545; und EP 102.324. Für gewöhnlich sind die Liposomen vom kleinen (etwa 200–800 Angström) unilamellaren Typ, bei dem der Lipidgehalt höher als etwa 30 Mol-% Cholesterin ist, wobei der gewählte Anteil auf die optimale NT-4-Therapie eingestellt wird.

[0158] Eine wirksame Menge des aktiven Bestandteils wird beispielsweise von den therapeutischen Zielen, dem Verabreichungsweg und dem Leiden des Patienten abhängen. Demgemäß wird notwendig sein, dass der Therapeut die Dosierung titriert und den Verabreichungsweg wie erforderlich modifiziert, um die optimale therapeutische Wirkung zu erzielen. Eine typische tägliche Dosis kann im Bereich von 1 µg/kg bis zu 100 mg/kg oder mehr in Abhängigkeit von den oben erwähnten Faktoren liegen. Typischerweise wird der Kliniker ein Molekül der vorliegenden Erfindung verabreichen, bis eine Dosis erreicht ist, die für die erforderliche biologische Wirkung sorgt. Der Fortschritt der Therapie kann leicht durch herkömmliche Tests verfolgt werden.

[0159] Die folgenden Beispiele werden ausschließlich zu illustrativen Zwecken bereitgestellt und beabsichtigen in keiner Weise eine Einschränkung des Schutzmangels der vorliegenden Erfindung.

[0160] Alle in der vorliegenden Patentbeschreibung zitierten Patente und Literaturstellen sind hiermit zur

Gänze durch Verweis aufgenommen.

BEISPIELE

[0161] Im Handel erhältlich Reagenzien, auf die in den Beispielen Bezug genommen wird, wurden, sofern nicht anders angegeben, nach den Anleitungen der Hersteller verwendet. Die Quelle jener Zellen, die in den folgenden Beispielen und in der gesamten Patentbeschreibung durch ATCC-Zugangsnummern gekennzeichnet sind, ist die American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA.

BEISPIEL 1

Isolierung von cDNA-Klonen, die für menschliches PRO358 kodieren

[0162] Die Sequenzen einer extrazellulären Domäne (ECD) (einschließlich der Sekretionssignalsequenz, wenn eine vorliegt) aus bekannten Elementen der menschlichen Toll-Rezeptorfamilie wurden verwendet, um EST-Datenbanken zu durchsuchen. Die EST-Datenbanken umfassten öffentliche EST-Datenbanken (z. B. GenBank) und eine proprietäre EST-Datenbank (LIFESEQ™, Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA). Die Suche wurde unter Verwendung des BLAST- oder BLAST2-Computerprogramms durchgeführt [Altschul et al.; Methods in Enzymology 266, 460–480 (1996)] als Vergleich der ECD-Proteinsequenzen mit einer 6-Raster-Translation der EST-Sequenzen. Diese vergleichen, die zu einer BLAST-Zahl von 70 (oder in einigen Fällen 90) oder mehr führten, die nicht für bekannte Proteine kodierten, wurden geclustered und in Consensus-DNA-Sequenzen mit dem Programm „phrap“ angeordnet (Phil Green, University of Washington, Seattle, Washington).

[0163] Ein EST wurde in der Incyte Datenbank identifiziert (INC3115949).

[0164] Auf Basis der EST-Sequenz wurden Oligonukleotide synthetisiert, um durch PCR eine DNA-Bibliothek zu identifizieren, welche die Sequenz von Interesse enthielt und zur Verwendung als Sonden, zum Isolieren eines Klons der für PRO358 kodierenden Sequenz voller Länge.

[0165] Ein Paar von PCR-Primern (Vorwärts und Rückwärts) wurde synthetisiert:

TCCCACCAGGTATCATAAACTGAA

(Seq.-ID Nr. 15)

TTATAGACAATCTGTTCTCATCAGAGA

(Seq.-ID Nr. 16)

[0166] Es wurde auch eine Sonde synthetisiert:

AAAAAGCATACTTGAATGGCCCAAGGATAGGTGTAAATG

(Seq.-ID Nr. 17)

[0167] Um mehrere Bibliotheken auf eine Quelle eines Klons voller Länge zu screenen, wurde DNA aus den Bibliotheken mittels PCR-Amplifikation mit dem oben festgelegten PCR-Primerpaar gescreent. Eine positive Bibliothek wurde dann verwendet, um für das PRO358-Gen kodierende Klone unter Verwendung des Sonde-noligonukleotids und eines der PCR-Primer zu isolieren.

[0168] RNA zur Herstellung der cDNA-Bibliotheken wurde aus menschlichem Knochenmark isoliert (LIB256). Die cDNA-Bibliotheken, die verwendet wurden, um die cDNA-Klone zu isolieren, wurden durch Standardverfahren unter Verwendung von im Handel erhältlichen Reagenzien wie z. B. von Invitrogen, San Diego, CA hergestellt. Die cDNA wurde mit Oligo-dT geprimed, das eine NotI-Stelle enthielt, stumpfendig an Sall-Adaptoren gebunden, die mit Hämokinase behandelt worden waren, mit NotI gespalten, in geeigneter Weise durch Gelektrophorese auf eine bestimmte Größe gebracht und in einer definierten Ausrichtung in den einzigartigen Xhol- und NotI-Stellen in einen geeigneten Klonierungsvektor kloniert (wie z. B. pRKB oder pRKD, pRK5B ist ein Vorläufer von pRK5D, der nicht die Sfil-Stelle enthält, siehe Holmes et al.; Science 253, 1278–1280 (1991)).

[0169] DNA-Sequenzierung der Klone, die wie oben beschrieben isoliert wurden, ergab die DNA-Sequenz voller Länge für PRO358 (**Fig. 13A**, und **13B**, Seq.-ID Nr. 14) und die abgeleitete Proteinsequenz für PRO358 (**Fig. 12A** und **12B**, Seq.-ID Nr. 13).

[0170] Die gesamte Nucleotidsequenz des identifizierten Klons (DNA47361) ist in den **Fig. 13A–B** (Seq.-ID Nr. 14) dargestellt. Klon DNA47361 enthält einen einzigen offenen Leseraster mit einer offensichtlichen Translationsinitiationsstelle (ATG-Startsignal) an Nucleotidpositionen, die in den **Fig. 13A** und **13B** unterstrichen sind. Der vorhergesagte Polypeptidvorläufer ist 811 Aminosäuren lang, einschließlich einer mutmaßlichen Signalsequenz (Aminosäuren 1 bis 19), einer extrazellulären Domäne (Aminosäuren 20 bis 575, einschließlich leucinreicher Wiederholungen in der Region von Position 55 bis Position 575), einer mutmaßlichen Transmembrandomäne (Aminosäuren 576 bis 595). Klon DNA47361 (DNA47361-1249 genannt) ist bei der ATCC hinterlegt worden und es wurde diesem die ATCC-Hinterlegungsnummer 209431 zugeteilt.

[0171] Auf Basis einer BLAST- und FastA-Sequenzangleichungsanalyse (unter Verwendung des Computerprogramms ALIGN) der Sequenz voller Länge von PRO358 ist die DNA ein menschliches Homolog des *Drosophila-Toll-Proteins* und ist zu den folgenden menschlichen Toll-Proteinen homolog: Tollt (DNAX# HSU88540-1, das mit der zufallssequenzierten cDNA# HUMRSC786-1 voller Länge identisch ist); Toll2 (DNAX# HSU88878-1); Toll3 (DNAX# HSU88879-1); und Toll4 (DNAX# HSU88880-1).

Beispiel 2

Verwendung von PRO358-DNA als Hybridisierungssonde

[0172] Das folgende Verfahren beschreibt die Verwendung einer für PRO358 kodierenden Nucleotidsequenz als Hybridisierungssonde. In der folgenden Beschreibung werden diese Proteine kollektiv als „Toll-Homologe“ bezeichnet.

[0173] Die kodierende Sequenz eines Toll-Homologs umfassende DNA wird als Sonde eingesetzt, um auf homologe DNAs (wie z. B. jene, die für natürlich vorkommende Varianten dieser speziellen Toll-Proteine kodieren) in cDNA-Bibliotheken menschlicher Gewebe oder Genombibliotheken menschlicher Gewebe zu scannen.

[0174] Hybridisierung und Waschen von Filtern, die eine der beiden Bibliothek-DNAs enthalten, werden unter den folgenden hochstringenten Bedingungen durchgeführt. Die Hybridisierung von radioaktiv markierter, Toll-Homolog-hergeleiteter Sonde an die Filter wird in einer Lösung aus 50% Formamid, 5 × SSC, 0,1% SDS, 0,1% Natriumpyrophosphat, 50 mM Natriumphosphat, pH 6,8, 2 × Denhardt-Lösung und 10% Dextranulfat bei 42°C für 20 Stunden durchgeführt. Das Waschen der Filter wird in einer wässrigen Lösung von 0,1 × SSC und 0,1% SDS bei 42°C durchgeführt.

[0175] DNAs, die eine gewünschte Sequenzidentität mit der DNA aufweisen, die für das Toll-Homolog voller Länge und nativer Sequenz kodiert, können dann unter Verwendung von auf dem Gebiet der Erfindung bekannten Standardtechniken identifiziert werden.

Beispiel 3

Expression von PRO358 in E. coli

[0176] Dieses Beispiel illustriert die Herstellung einer unglykosylierten Form von PRO358 („Toll-Homolog“) durch rekombinante Expression in *E. coli*.

[0177] Die für ein Toll-Homolog kodierende DNA-Sequenz wird zunächst unter Verwendung gewählter PCR-Primer amplifiziert. Die Primer sollten Restriktionsenzymstellen enthalten, die den Restriktionsenzymstellen am gewählten Expressionsvektor entsprechen. Es kann eine Vielzahl an Expressionsvektoren eingesetzt werden. Ein Beispiel eines geeigneten Vektors ist pBR322 (das aus *E. coli* stammt; siehe Bolivar et al., Gene 2, 95 (1977)), das Gene für Ampicillin- und Tetracyclinresistenz enthält. Der Vektor wird mit Restriktionsenzym verdaut und dephosphoryliert. Die mittels PCR amplifizierten Sequenzen werden dann in den Vektor ligiert. Der Vektor wird vorzugsweise Sequenzen umfassen, die für ein Antibiotikaresistenzgen, einen trp-Promotor, einen Polyhis-Leader (einschließlich der ersten sechs STII-Codons, Polyhis-Sequenz und Enterokinase-Spaltstelle), die kodierende Region, Lambda-Transkriptionsfaktor und ein argU-Gen kodieren.

[0178] Das Ligationsgemisch wird dann verwendet, um einen gewählten *E. coli*-Stamm unter Anwendung der in Sambrook et al., siehe oben, beschriebenen Verfahren zu transformieren. Transformanten werden aufgrund ihrer Fähigkeit identifiziert, sich auf LB-Platten zu vermehren, worauf gegen Antibiotikum resistente Kolonien selektiert werden. Plasmid-DNA kann isoliert und mittels Restriktionsanalyse und DNA-Sequenzierung bestätigt werden.

tigt werden.

[0179] Selektierte Klone können über Nacht in Flüssigkulturmedium, wie z. B. mit Antibiotika ergänzter LB-Brühe gezüchtet werden. Die Übernachtkultur kann anschließend verwendet werden, um eine Kultur im größeren Maßstab zu inokulieren. Die Zellen werden dann auf die gewünschte optische Dichte gezüchtet, wobei während der Züchtung der Promotor eingeschaltet wird.

[0180] Nach dem Kultivieren der Zellen für mehrere weitere Stunden können die Zellen mittels Zentrifugation geerntet werden. Das mittels Zentrifugation erlangte Zellpellet kann unter Verwendung von verschiedenen, auf dem Gebiet der Erforschung bekannten Mitteln solubilisiert und das solubilisierte Toll-Homolog dann unter Verwendung einer Metallchelatsäule unter Bedingungen gereinigt werden, die eine starke Bindung des Proteins ermöglichen.

Beispiel 4

Expression von PRO358 in Säugetierzellen

[0181] Dieses Beispiel illustriert die Herstellung einer glykosylierten Form von PRO358 („Toll-Homolog“) durch rekombinante Expression in Säugetierzellen.

[0182] Der Vektor pRK5 (Siehe EP 307.247, veröffentlicht am 15. März 1989) wird als Expressionsvektor eingesetzt. Gegebenenfalls wird die für Toll-Homolog kodierende DNA mit gewählten Restriktionsenzymen in pRK5 ligiert, um die Insertion der für Toll-Homolog kodierenden DNA unter Verwendung von Ligationsverfahren zu ermöglichen, wie sie z. B. in Sambrook et al., siehe oben, beschrieben werden. Der resultierende Vektor wird pRK5-PRO358 genannt.

[0183] In einer der Ausführungsformen können die Wirtszellen 293-Zellen sein. Menschliche 293-Zellen (ATCC CCL 1573) werden in Gewebekulturplatten auf Konfluenz gezüchtet, und zwar in Medium, wie z. B. in mit Fötalkälberserum und gegebenenfalls Nährstoffkomponenten und/oder Antibiotika ergänztem DMEM. Etwa 10 µg pRK5-PRO-358-DNA wird mit etwa 1 µg für das VA-RNA-Gen kodierender DNA (Thimmappaya et al., Cell 31, 543 (1982)) vermischt und in 500 µl 1 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, 0,227 M CaCl₂ gelöst. Diesem Gemisch werden tropfenweise 500 µl 50 mM HEPES (pH 7,35), 280 mM NaCl, 1,5 mM NaPO₄ zugegeben und es wird die Bildung eines Präzipitats für 10 Minuten bei 25°C ermöglicht. Das Präzipitat wird suspendiert und den 293-Zellen zugegeben und für etwa vier Stunden bei 37°C absetzen gelassen. Das Kulturmedium wird abgesaugt und es werden 2 ml 20%iges Glycerin in PBS für 30 Sekunden zugegeben. Die 293-Zellen werden dann mit serumfreiem Medium gewaschen, worauf frisches Medium zugesetzt und die Zellen für etwa 5 Tage kultiviert werden.

[0184] Ungefähr 24 Stunden nach den Transfektionen wird das Kulturmedium entfernt und durch Kulturmedium (alleine) oder Kulturmedium ersetzt, das 200 µCi/ml ³⁵S-Cystein und 200 µCi/ml ³⁵S-Methionin enthält. Nach 12 Stunden Inkubation wird das konditionierte Medium gesammelt, mit einem Zentrifugenfilter konzentriert und auf ein 15%-iges SDS-Gel geladen. Das verarbeitete Gel kann getrocknet und zur Belichtung eines Film für eine definierte Zeit verwendet werden, um die Gegenwart von Polypeptid nachzuweisen. Die die transfizierten Zellen enthaltenden Kulturen können einer weiteren Inkubation (in serumfreiem Medium) unterzogen und das Medium in ausgewählten Biostests getestet werden.

[0185] In einer alternativen Technik kann Toll-Homolog-DNA vorübergehend in 293-Zellen eingeführt werden, und zwar unter Anwendung des von Somparyrac et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 12, 7575 (1981) beschriebenen Verfahrens. 293-Zellen werden in einer Spinnerflasche auf maximale Dichte gezüchtet und es werden 700 µg pRK5-PRO(358)-DNA zugegeben. Die Zellen werden zunächst mittels Zentrifugation aus der Spinnerflasche konzentriert und mit PBS gewaschen. Das DNA-Dextran-Präzipitat wird am Zellpellet für vier Stunden inkubiert. Die Zellen werden mit 20% Glycerin für 90 Sekunden behandelt, mit Gewebekulturmedium gewaschen und wieder in die Gewebekulturmedium, 5 µg/ml Rinderinsulin und 0,1 µg/ml Rindertransferrin enthaltende Spinnerflasche rückgeführt. Nach etwa vier Tagen wird das konditionierte Medium zentrifugiert und filtriert, um Zellen und Trümmer zu entfernen. Die das entsprechende exprimierte Toll-Homolog enthaltende Probe kann dann mit einem beliebigen gewählten Verfahren, wie z. B. Dialyse und/oder Säulenchromatographie konzentriert und gereinigt werden.

[0186] In einer weiteren Ausführungsform können die Toll-Homologe in CHO-Zellen exprimiert werden. Die pRK5-Vektoren können unter Verwendung bekannter Reagenzien, wie z. B. CaPO₄ oder DEAE-Dextran in

CHO-Zellen transfiziert werden. Wie oben beschrieben können die Zellkulturen inkubiert und das Medium durch Kulturmedium (alleine) oder Kulturmedium ersetzt werden, das einen radioaktiven Marker, wie z. B. ^{35}S -Methinin enthält. Nach dem Feststellen der Gegenwart von PRO358-Polypeptid kann das Kulturmedium durch serumfreies Medium ersetzt werden. Vorzugsweise werden die Kulturen für etwa 6 Tage inkubiert und das konditionierte Medium dann geerntet. Das das exprimierte Toll-Homolog enthaltende Medium kann dann mit einem beliebigen gewählten Verfahren konzentriert und gereinigt werden.

[0187] Epitopmarkierte Toll-Homologe können ebenfalls in Wirts-CHO-Zellen exprimiert werden. Die Toll-Homolog-DNA kann aus dem pRK5-Vektor heraus subkloniert werden. Das Subklon-Insert kann einer PCR unterzogen werden, um In-Frame mit dem gewählten Epitopmarker, wie z. B. dem Poly-His-Marker in einen Baculovirus-Expressionsvektor zu fusionieren. Das Poly-His-markierte Insert kann dann in einen SV40-angetriebenen Vektor subkloniert werden, der einen Selektionsmarker, wie z. B.

[0188] DHFR zur Selektion stabiler Klone enthält. Schließlich können die CHO-Zellen (wie oben beschrieben) mit dem SV40-angetriebenen Vektor transfiziert werden. Es kann wie oben beschrieben eine Markierung durchgeführt werden, um die Expression zu verifizieren. Das das exprimierte Poly-His-markierte Toll-Homolog enthaltende Kulturmedium kann dann mit einem beliebigen gewählten Verfahren, wie z. B. Ni²⁺-Chelat-Affinitätschromatographie konzentriert und gereinigt werden.

Beispiel 5

Expression von PRO358 in Hefe

[0189] Das folgende Verfahren beschreibt die rekombinante Expression von PRO358 („Toll-Homolog“) in Hefe.

[0190] Zunächst werden Expressionsvektoren für intrazelluläre Produktion oder Sekretion eines Toll-Homologs aus dem ADH2/GAPDH-Promotor konstruiert. Für das gewünschte Toll-Homolog kodierende DNA, ein gewähltes Signalpeptid und der Promotor werden in geeignete Restriktionsenzymstellen im gewählten Plasmid insertiert, um die intrazelluläre Expression zu steuern. Zur Sekretion kann für das gewählte Toll-Homolog kodierende DNA in das gewählte Plasmid kloniert werden, und zwar zusammen mit für den ADH2/GAPDH-Promotor kodierender DNA, der Hefe-α-Faktor-Sekretionssignal/Leader-Sequenz und Linkersequenzen (falls benötigt) zur Sekretion.

[0191] Hefezellen, wie z. B. Stamm AB110, können dann mit den oben beschriebenen Expressionsplasmiden transformiert und in gewählten Fermentationsmedien kultiviert werden. Die Überstände der transformierten Hefe können mittels Präzipitation mit 10% Trichloressigsäure und Trennung mittels SDS-PAGE, gefolgt von Färbung der Gele mit Coomassie-Blau-Farbstoff analysiert werden.

[0192] Rekombinante Toll-Homologe können anschließend isoliert und gereinigt werden, indem die Hefezellen aus dem Fermentationsmedium mittels Zentrifugation entfernt werden und das Medium dann unter Verwendung gewählter Kartuschenfilter konzentriert wird. Das das Toll-Homolog enthaltende Konzentrat kann unter Verwendung gewählter Säulenchromatographieharze weiter gereinigt werden.

Beispiel 6

Expression von PRO358 in Baculovirus-infizierten Insektenzellen

[0193] Das folgende Verfahren beschreibt die rekombinante Expression von PRO358 („Toll-Homolog“) in Baculovirus-infizierten Insektenzellen.

[0194] Die für das Toll-Homolog kodierende Sequenz wird stromauf eines in einem Baculovirus-Expressionsvektor enthaltenen Epitopmarkers fusioniert. Derartige Epitopmarker umfassen Poly-His-Marker und Immunoglobulinmarker (wie z. B. Fc-Regionen von IgG). Es kann eine Vielzahl von Plasmiden eingesetzt werden, einschließlich Plasmide, die aus handelsüblichen Plasmiden, wie z. B. pVL1393 (Novagen) stammen. Zusammenfassend wird die kodierende Sequenz oder der gewünschte Abschnitt der kodierenden Sequenz (wie z. B. die für die extrazelluläre Domäne kodierende Sequenz) mittels PCR mit Primern amplifiziert, die zu den 5'- und 3'-Regionen komplementär sind. Der 5'-Primen kann flankierende (gewählte) Restriktionsenzymstellen enthalten. Das Produkt wird dann mit diesen gewählten Restriktionsenzymen verdaut und in den Expressionsvektor subkloniert.

[0195] Der rekombinante Baculovirus wird durch Cotransfizieren des obigen Plasmids und BaculoGold™-Virus-DNA (Pharmingen) in *Spodoptera frugiperda*- („Sf9“-) Zellen (ATCC CRL 1711) unter Verwendung von Lipofectin (im Handel von GIBCO-BRL erhältlich) erzeugt. Nach 4–5 Tagen Inkubation bei 28°C werden die freigesetzten Viren geerntet und für weitere Amplifikationen verwendet. Virusinfektion und Proteinexpression werden wie von O'Reilly et al., *Baculovirus expression vectors: A Laboratory Manual*, Oxford University Press, Oxford (1994) beschrieben durchgeführt.

[0196] Exprimiertes Poly-His-markiertes Toll-Homolog kann dann zum Beispiel mittels Ni²⁺-Chelat-Affinitätschromatographie wie folgt gereinigt werden. Extrakte aus rekombinanten virusinfizierten Sf9-Zellen werden wie von Rupert et al., *Nature* 362, 175–179 (1993) beschrieben hergestellt. Zusammenfassend werden Sf9-Zellen in Beschallungspuffer (25 mM Hepes, pH 7,9, 12,5 mM MgCl₂, 0,1 mM EDTA; 10% Glycerin; 0,1% NP-40; 0,4 M KCl) gewaschen, resuspendiert und zweimal für 20 Sekunden auf Eis beschallt. Die beschallten Proben werden mittels Zentrifugation geklärt und der Überstand wird 50-fach in Beladungspuffer (50 mM Phosphat, 300 mM NaCl, 10% Glycerin, pH 7,8) verdünnt und durch ein 0,45 µm-Filter filtriert. Eine Ni²⁺-NTA-Agarosesäule (im Handel von Qiagen erhältlich) wird mit einem Bettvolumen von 5 ml hergestellt, mit 25 ml Wasser gewaschen und mit 25 ml Beladungspuffer äquilibriert. Der filtrierte Zellextrakt wird mit 0,5 ml pro Minute auf die Säule aufgegeben. Die Säule wird mit Beladungspuffer bis zum Erreichen der A₂₈₀-Basislinie gewaschen, worauf das Fraktionensammeln begonnen wird. Als nächstes wird die Säule mit einem zweiten Waschpuffer (50 mM Phosphat; 300 mM NaCl, 10% Glycerin, pH 6,0) gewaschen, der unspezifisch gebundenes Protein eluiert. Nach neuerlichem Erreichen der A₂₈₀-Basislinie wird die Säule mit einem Gradienten von 0 bis 500 mM Imidazol im zweiten Waschpuffer entwickelt. Es werden 1 ml-Fraktionen gesammelt und mittels SDS-PAGE und Silberfärbung oder Western-Blot mit an alkalische Phosphatase konjugiertem Ni²⁺-NTA(Qiagen) analysiert. Das eluierte, His₁₀-markierte Polypeptid enthaltende Fraktionen werden vereinigt und gegen Beladungspuffer dialysiert.

[0197] Alternativ dazu kann die Reinigung von IgG-markierten (oder Fc-markierten) Toll-Homologen unter Verwendung bekannter Chromatographietechniken, einschließlich beispielsweise Protein A- oder Protein G-Säulenchromatographie durchgeführt werden.

Beispiel 7 (Bezugsbeispiel)

NF-κB-Test

[0198] Da die Toll-Proteine über den NF-κB-Weg signalisieren, kann ihre biologische Aktivität in einem NF-κB-Test getestet werden. Bei diesem Test werden Jurkat-Zellen vorübergehend unter Verwendung von Lipofectamin-Reagens (Gibco-BRL) nach den Anleitungen des Herstellers transfiziert. 1 µg pB2XLuc-Plasmid, welches das NF-κB-angetriebene Luciferase-Gen enthält, wird mit 1 µg pSRαN-Expressionsvektor mit oder ohne das für PRO285 kodierende Insert cotransfiziert. Als positive Kontrolle werden Zellen mit PMA (Phorbol-Myristylacetat; 20 ng/ml) und PHA (Phytohämagglutinin, 2 µg/ml) für drei bis vier Stunden behandelt. Die Zellen werden 2 oder 3 Tage später zur Messung von Luciferaseaktivität unter Verwendung von Reagenzien von Promega lysiert.

Beispiel 8

Herstellung von Antikörpern, die PRO358 binden

[0199] Dieses Beispiel illustriert die Herstellung monoklonaler Antikörper, die PRO358 („Toll-Homolog“) spezifisch binden können.

[0200] Techniken zur Produktion der monoklonalen Antikörper sind auf dem Gebiet der Erfindung bekannt und werden beispielsweise in Goding (siehe oben) beschrieben. Immunogene, die eingesetzt werden können, umfassen gereinigte Toll-Homologe, das gewünschte Toll-Homolog enthaltende Fusionsproteine und Zellen, die rekombinante Toll-Homologe an der Zelloberfläche exprimieren. Die Wahl des Immunogens kann vom geübten Fachmann ohne übermäßiges Experimentieren getroffen werden.

[0201] Mäuse, wie z. B. Balb/c, werden mit dem in komplettem Freund'schem Adjuvans emulgierten Toll-Homolog-Immunogen immunisiert und in einer Menge von 1–100 Mikrogramm subkutan oder intraperitoneal injiziert. Alternativ dazu wird das Immunogen in MPL-TDM-Adjuvans (Ribi Immunochemical Research, Mailton, MT) emulgiert und in die Hinterpfoten des Tiers injiziert. Die immunisierten Mäuse werden dann 10 bis 12 Tage später mit zusätzlichem, im gewählten Adjuvans emulgierten Immunogen geboostet. Danach können die Mäuse

se außerdem mit zusätzlichen Immunisierungsinjektionen für mehrere Wochen geboostet werden. Serumproben können aus den Mäusen in regelmäßigen Abständen mittels retroorbitaler Blutung zum Testen in ELISA-Tests erlangt werden, um Antikörper nachzuweisen.

[0202] Nachdem ein geeigneter Antikörpertiter detektiert worden ist, können die bezüglich Antikörper "positiven" Tiere mit einer letzten intravenösen Injektion eines Toll-Homologs injiziert werden. Drei bis vier Tage später werden die Mäuse getötet und die Milzzellen gesammelt. Die Milzzellen werden dann (unter Verwendung von 35%igem Polyethylenglykol) mit einer gewählten Maus-Myelomzelllinie, wie z. B. P3X63AgU.1 (erhältlich von ATCC, Nr. CRL 1597) fusioniert. Die Fusionen liefern Hybridomzellen, die dann in 96-Napf-Gewebekulturplatten ausplattiert werden können, die HAT-(Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin) Medium enthalten, um die Vermehrung von nicht fusionierten Zellen, Myelomhybridren und Milzzellhybridren zu hemmen.

[0203] Die Hybridomzellen werden in einem ELISA auf Reaktivität gegen das entsprechende Toll-Homolog getestet. Die Feststellung „positiver“ Hybridomzellen, welche die gewünschten monoklonalen Antikörper gegen ein Toll-Homolog sekretieren, ist dem Fachmann auf dem Gebiet der Erfindung bekannt.

[0204] Die positiven Hybridomzellen können intraperitoneal in syngenetische Balb/c-Mäuse injiziert werden, um Aszites zu produzieren, welche die monoklonalen Anti-Toll-Homolog-Antikörper enthalten. Alternativ dazu können die Hybridomzellen in Gewebekulturflaschen oder Rollflaschen gezüchtet werden. Die Reinigung der in den Aszites produzierten monoklonalen Antikörper kann unter Verwendung von Ammoniumsulfatfällung, gefolgt von Gelausschlusschromatographie erzielt werden. Alternativ dazu kann Affinitätschromatographie auf Basis der Bindung von Antikörper an Protein A oder Protein G eingesetzt werden.

Beispiel 9

HuTLR2 vermittelt Lipopolysaccharid-(LPS-) induzierte Zellsignalisierung

Verfahren

[0205] Reagenzien. [³H]-markiertes, unmarkiertes LCD25 und LPS aus S. minnesota R595 wurden von List Biochemicals (Campbell, CA) und alle anderen LPS von Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO) bezogen. LP wurde als konditioniertes Medium aus mit einem menschlichen LBP-Expressionsvektor transfizierten 293-Zellen bereitgestellt. Das TLR2-Fc-Fusionsprotein wurde mittels Baculovirus-System produziert und wie beschrieben gereinigt. Market al., J. Biol. Chem. 269, 10720–10728 (1994).

[0206] Konstruktion von Expressionsplasmiden. Eine für menschliches TLR2 kodierende cDNA wurde aus einer menschlichen Fötallungenbibliothek kloniert. Die vorhergesagte Aminosäuresequenz stimmte mit der vorher veröffentlichten Sequenz (Rock et al., siehe oben) mit Ausnahme einer Glu→Asp-Substitution an der Aminosäure 726 überein. Die aminosäureterminale Epitopmarker-Version von TLR2 (dG.TLR2) wurde konstruiert, indem eine Xhol-Restriktionsstelle unmittelbar stromauf von Leucin an Position 17 (der ersten Aminosäure der vorhergesagten reifen Form von TLR2) angefügt und dieses an die Aminosäuren 1–53 von Glykoprotein D aus Herpes-Simplex-Virus Typ 1 wie beschrieben gebunden wurde. Mark et al., siehe oben. PCR-Produkte wurden sequenziert und in einen Säugetier-Expressionsvektor subkloniert, der das Puromycin-Resistenzgen enthält. C-terminale Trunkationsvarianten von gD.TLR2 wurden konstruiert, indem die cDNA an einer in der kodierenden Sequenz der intrazellulären Domäne vorhandenen Bspl-Stelle (Variante Δ1) oder Nsil-Stelle (Variante Δ2) und an einer im 3'-Polylinker des Expressionsvektors vorhandenen NotI-Stelle verdaut wurde, gefolgt von Ligation von Oligonucleotidlinkern.

- Δ1: 5'-TCA GCG GTA AGC-3' (Seq.-ID Nr. 18) und
5'-GGC CGC TTA CCG C-3' (Seq.-ID Nr. 19)
- Δ2: 5'-TAA GCT TAA CG-3' (Seq.-ID Nr. 20) und
5'-GGC CGC TTA AGC TTA TGC A-3' (Seq.-ID Nr. 21).

[0207] Das CD4/TLR2-Hybrid wurde mittels PCR konstruiert und enthielt die Aminosäuren 1–205 (das Signalpeptid und zwei Immunglobulin-artige Domänen) von menschlichem CD4 fusioniert an die Aminosäuren 588–784 (die Transmembrandomäne und intrazelluläre Domäne) von menschlichem TLPR2 mit einem vom Linker kodierten Valin an der Verbindungsstelle der CD4- und TLR2-Sequenzen. Das pGL3.ELAM.tk-Reporterplasmid enthielt

5'-GGT ACC TTC TGA CAT CAT TGT AAT TTT AAG CAT CGT GGA TAT TCC CGG GAA AGT
 TTT TGG ATG CCA TTG GGG ATT TCC TCT TTA GAT CTG GCG CGG TCC CAG GTC CAC
 TTC GCA TAT TAA GGT GAC GCG TGT GGC CTC GAA CAC CGA GCG ACC CTG CAG CGA
 CCC GCA AGC TT-3' (Seq.-ID Nr. 22),

insertiert zwischen den SacI- und HindIII-Stellen des Luciferase-Reporterplasmids pGL3 (Promega). Die C-terminale Epitopmarker-Version LBP (LBP-FLAG) wurde mittels PCR konstruiert, indem eine Asc1-Stelle anstelle des nativen Stopcodons angefügt und dieses Fragment in pRK5-FLAG subkloniert wurde, was in der C-terminalen Anfügung der Aminosäuren GRA DYK DDD DK resultierte (Seq.-ID Nr. 23).

[0208] Stabile Zelllinien/Pools. Menschliche 293-Urnierenzellen wurden in LGDMEM/HAM-F12-(50:50)-Medium gezüchtet, das mit 10% FBS, 2 mM Glutamin und Penicillin/Streptomycin ergänzt war. Zur stabilen Expression von gD.TLR2 wurden die Zellen mit dem gD.TLR2-Expressionsvektor transfiziert und bei einer Endkonzentration von 1 µg/ml auf Puromycinresistenz selektiert. Ein stabiler Pool von Zellen (293-TLR2 pop1) wurde mittels FACS unter Verwendung eines Antikörpers gegen den gD-Marker isoliert. Sowohl der Pool, als auch der Einzelzellenkロン (293-TLR2-Klon 1) wurden mittels FACS- und Western-Blot-Analyse wie in Mark et al. (siehe oben) beschrieben charakterisiert.

[0209] Luciferase-Reportertest und Gel-Retentionsanalyse (EMSA). Elterliche oder stabile 29332-Zellen (2×10^5 Zellen pro Napf) wurden in Sechs-Napf-Platten geimpft und am folgenden Tag mit den Expressionsplasmiden zusammen mit 0,5 µg des Luciferase-Reporterplasmids pGL3-ELAM.tk und 0,05 µg des Renilla-Luciferase-Reportervektors als innere Kontrolle transfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen entweder mit LPS, LBP oder mit beiden, LPS und LBP behandelt und es wurde die Genaktivität gemessen. Die Daten werden als relative Luciferaseaktivität ausgedrückt, indem die Glühwürmchen-Luciferaseaktivität durch jene der Renilla-Luciferase dividiert wird. Für EMSA wurden Kernextrakte hergestellt und in einer DNA-Bindungsreaktion mit 5'-[³²P]-radiomarkierten, eine Consensus-NF-κB-Stelle enthaltenden Oligonucleotiden (Santa Cruz Biotechnology, sc-2511) verwendet. Die Identität von NF-κB im Komplex wurde mittels Supershift mit Antikörpern gegen NF-κB bestätigt (Daten nicht dargestellt).

[0210] RNA-Expression. Der Gewebe-Northern-Blot wurde von Clontech bezogen und mit einer Sonde hybridisiert, welche die extrazelluläre Domäne von TLR2 umfasst. Polyadenyierte mRNA wurde aus 293-Zellen oder 293-TLR2-Zellen isoliert, und es wurden Northern-Blots mit menschlichem IL-8-cDNA-Fragment sondiert. TLR2-Expression wurde unter Anwendung quantitativer PCR unter Verwendung der Realtime „Taq-Man™“-Technologie ermittelt und an einem Sequenzdetektor, Modell 770 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) im Wesentlichen wie beschrieben analysiert (Luoh et al., J. Mol. Endocrinol. 18, 77–85 (1997)).

[0211] Die Vorwärts- und Rückwärtsprimer

5'-GCG GGA AGG ATT TTG CGT AA-3' (Seq.-ID Nr. 24) und

5'-GAT CCC AAC TAG ACA AAG ACT GGT C-3' (Seq.-ID Nr. 25)

wurden zusammen mit einer Hybridisierungssonde

5'-TGA GAG CTG CGA TAA AGT CCT AGG TTC CCA TAT-3' (Seq.-ID Nr. 26)

eingesetzt, die am 5'-Nucleotid mit einem Reporterfarbstoff FAM und am 3'-Nucleotid mit einem Quench-Farbstoff TAMRA markiert war. Makrophagen/Monozyten wurden 16 Stunden mit 1 µg/ml LPS behandelt.

[0212] Rezeptorbindungstest. Um die direkte Bindung zu ermitteln, wurden 20 ng [³H]-LPS mit 600 ng TLR2-Fc in 100 µl Bindungspuffer (150 mM NaCl, 20 mM Hepes, 0,03% BSA) vermischt, der 15 µl Protein A-Sepharose enthielt. Nach 3 Stunden Inkubation bei Raumtemperatur wurden Protein A-Sepharose-Proben zweimal mit kaltem PBS/0,1% NP-40 gewaschen und in 1% SOS und 25 mM EDTA enthaltendem Bindungspuffer resuspendiert und gezählt.

Ergebnisse

[0213] In Drosophila ist der Toll-Rezeptor für die Bildung des embryonalen dorsal-ventralen Musters erforderlich und nimmt außerdem an der fungiziden Immunantwort in der adulten Fliege teil. Belvin und Anderson, Ann. Rev. Cell. Biol. 12, 393–416 (1996); Lemaitre et al., Cell 86, 973–983 (1996). Toll ist ein Transmembranprotein

des Typs I, das eine extrazelluläre Domäne mit mehreren an Leucin reichen Wiederholungen (LRRs) und eine zytoplasmatische Domäne mit Sequenzhomologie zum Interleukin-1-Rezeptor (IL-1R) und mehrere Pflanzen-Krankheitsresistenzproteine enthält. Wie vorher erwähnt gibt es mehrere menschliche Homologe, die kloniert worden sind, wovon manche in der vorliegenden Anmeldung als neue Proteine offenbart sind. Diese menschlichen Proteine spiegeln die topographische Struktur ihres *Drosophila*-Gegenstücks wider. Es hat sich erwiesen, dass die Überexpression einer konstitutiv aktiven Mutante von einem menschlichen TLR (TLR4) zur Aktivierung von NF-κB und Induktion der Entzündungscytokine und konstimulatorischen Molekülen führt (Medzhitov et al. und Rocke et al., siehe oben).

[0214] Um zu untersuchen, ob menschliche TLRs an der LPS-induzierten Zellaktivierung beteiligt sein könnten, untersuchten die Erfinder zunächst die Expression von TLRs in einer Reihe von Immungeweben. Von einem der TLRs, TLR2, erwies sich, dass es in allen untersuchten Lymphgeweben exprimiert wurde, wobei die stärkste Expression in Peripherblutleukozyten auftrat (**Fig. 5a**). Die Expression von TLRs ist in Monozyten/Makrophagen, den hauptsächlichen CD14-exprimirenden und LPS-reaktiven Zellen angereichert. Interessanterweise wird TLR2 bei Stimulierung isolierter Monozyten/Makrophagen mit LPS up-reguliert (**Fig. 5b**), und zwar auf ähnliche Weise, wie es für CD14 beschrieben worden ist (Matsuura et al., Eur. J. Immunol. 22, 1663–1665 (1992); Croston et al., J. Biol. Chem. 270, 16517–16517 (1995)).

[0215] Dieses Ergebnis regte die Erfinder an zu ermitteln, ob TLR2 an der LPS-vermittelten Zellsignalisierung beteiligt ist. Die Erfinder konstruierten embryonale 293-Zellen derart, dass sie eine Version von TLR2 (gD-TLR2) exprimierten, die einen aminoterminalen Epitopmarker enthielt. Es wurde ein stabiler Pool von Klonen sowie ein einzelner Klon isoliert, von denen gezeigt wurde, dass sie ein neues Protein von etwa 105 kDa exprimierten (**Fig. 6b**), das mit der vorhergesagten Größe von TLR2 (~89 kDa) und der Gegenwart von 4 möglichen Glykosylierungsstellen übereinstimmte. Die Erfinder untersuchten die Reaktion von 293- oder 293-TLR2-Zellen und LBP durch Messen der Expression eines vom NF-κB-reaktiven Enhancer des E-Selectin-Gens angetriebenen Reportergens (Croston et al., siehe oben). Während weder LPS- noch LBP-Behandlung alleine in signifikanter Genaktivierung resultierten, resultierte die Zugabe von beiden, LPS und LBP, in einer beträchtlichen Induktion der Reportergenaktivität in TLR2 exprimierenden Zellen, nicht jedoch in Kontroll-293-Zellen (**Fig. 6a**). Darüber hinaus fanden die Erfinder unter Verwendung eines Gel-Retentionstests (EMSA), dass LPS in Kombination mit LBP NK-κB-Aktivität in TLR2-exprimierenden Zellen induzierte (**Fig. 6c**). Die Kinetik der LPS-induzierten NF-κB-Aktivität in 293-TLR2-Zellen glich jener von Knochenmark- und Nicht-Knochenmarkzellen (Delude et al., J. Biol. Chem. 269, 22253–22260 (1994); Lee et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 9930–9934 (1993)) insofern, als das die Ansammlung von NF-κB im Kern innerhalb von 30 Minuten nach der Exposition mit LPS maximal ist. Die Aktivierung von NF-κB durch LPS/LBP in 293-TLR2-Zellen erfordert keine De-novo-Proteinsynthese, da die Vorbehandlung mit Cycloheximid (**Fig. 6c**) oder Actinomycin D (nicht dargestellt) die NF-κB-Aktivierung nicht hemmt.

[0216] Sowohl die membrangebundene Form von CD14 (mCD14), die auf Knochenmarkzellen vorhanden ist, als auch lösliches CD14 (sCD14), das im Plasma vorhanden ist (Bazil et al., Eur. J. Immunol. 16, 1583–1589 (1986)), verstärken die Reaktivität von Zellen gegen LPS. Die Erfinder beobachteten, dass 293-Zellen wenig oder kein CD14 an ihrer Oberfläche exprimieren (Daten nicht dargestellt). Jedoch erhöhte die vorübergehende Transfektion von 293-Zellen mit mCD14 die Empfindlichkeit und das Ausmaß der TLR2-vermittelten LPS-Reaktionsfähigkeit (**Fig. 6d**).

[0217] Die oben präsentierten Daten legten nahe, dass TLR2 als Signalüberträger für LPS fungieren könnte. Um die Rolle der intrazellulären Domäne von TLR2 bei der Vermittlung der LPS-Reaktion zu untersuchen, ermittelten die Erfinder, ob TLR2-Varianten mit C-terminalen Trunkationen von entweder 13 (TLR-Δ1) oder 141 Aminosäuren (TLR2-Δ2) den ELAM-Reporter in vorübergehend transfizierten 293-Zellen regulieren können. Die Erfinder beobachteten, dass beide C-terminalen Trunkierungsvarianten bezüglich der Aktivierung des Reportergens defizient waren, obgleich die Erfinder eine Expression dieser Rezeptoren an der Zelloberfläche mittels FACS-Analyse (nicht dargestellt) und mittels Western-Blot (**Fig. 7c**) nachweisen konnten. Die Region der intrazellulären, TLR2-Δ1-deletierten Domäne zeigt eine auffällige Ähnlichkeit mit einer Region der intrazellulären IL-1R-Domäne, die für die Assoziation mit der IL-1R-assoziierten Kinase IRAK erforderlich ist (Croston et al., siehe oben) (**Fig. 7b**). Die Erfinder wiesen außerdem nach, dass die extrazelluläre Domäne (ECD) von TLR2 für die LPS-Reaktionsfähigkeit insofern erforderlich ist, als dass eine TLR2-Variante, bei der die ECD von TLR2 durch einen Abschnitt der ECD von CD4 ersetzt war, ebenfalls nicht auf LPS reagierte (**Fig. 7a** und 7b).

[0218] LPS ist eine komplexe Glykolipid, das aus der proximalen hydrophoben Lipid A-Gruppierung, der distalen hydrophilen O-Antigen-Polysaccharidregion und dem Kernsaccharid besteht, das Lipid A- und O-Anti-

gen-Strukturen verbindet. Im Gegensatz zum Lipid A-Abschnitt besteht eine beträchtliche Diversität unter den O-Antigen-Strukturen aus verschiedenen Gram-negativen Bakterien. Lipid A ist für LPS-Reaktionen verantwortlich und Behandlungen, welche die Fettsäureseitenketten von Lipid A entfernen, inaktivieren LPS. Die Erfinder verglichen die Potenz von aus verschiedenen Gram-negativen Bakterien hergestelltem LPS sowie LPS, das mittels alkalischer Hydrolyse „entgiftet“ worden ist. Die Erfinder beobachteten, dass aus *Escherichia coli* vom Serotyp LCD25 für die Aktivierung von TLR2 um nahezu zwei Größenordnungen wirksamer war als das serologisch unterschiedliche 055:85-LPS aus *Escherichia coli* ([Fig. 8a](#)). Aus *S. minnesota* R595-LPS hergestelltes LPS ist ebenfalls ein wirksamer Induktor der TLR2-Aktivität, während TLR2 nicht auf „entgiftetes LPS“ reagierte.

[0219] Die Erfinder untersuchten, ob TLR2 LPS bindet, indem ermittelt wurde, ob eine lösliche Form der extrazellulären TLR2-Domäne (TLR2-Fc) ³H-markiertes LPS in einem In-vitro-Test band. Die Erfinder beobachteten, dass ³H-LCD25-LPS das TLR2-Fc-Fusionsprotein band, nicht jedoch entweder Fc alleine oder Fusionsproteine, die die ECD mehrerer anderer Rezeptoren enthielten ([Fig. 8b](#)). Diese Bindung stand in spezifischer Konkurrenz zu unmarkiertem LCD25-LPS, nicht jedoch zu entgiftetem LPS. Die vorläufige Analyse der Bindung von LPS an TLR2-Fc legt nahe, dass die Kd relativ niedrig ist (500–700 nM) und dass die Kinetik der Bindung sehr langsam ist (Daten nicht dargestellt). Die Erfinder vermuten, dass andere Proteine, wie z. B. LBP die Bindung von LPS an TLR2 in vivo verstärken könnten, ganz wie das Überführen von LPS von seiner freien, aggregierten Form (mizellaren Form) in CD14 durch LBP. Dies steht im Einklang mit den In-vivo-Ergebnissen der Erfinder, die zeigen, dass LBP erforderlich ist, um eine empfindliche Reaktion von TLR2 auf LPS zu erlangen ([Fig. 6a](#)).

[0220] Die ILS-Behandlung von Makrophagen bewirkt die Expression einer Reihe von Entzündungscytokinen. Gleichermassen resultierte die Expression von TLR2 in 293-Zellen in einer > 100fachen Induktion von IL-8-mRNA als Reaktion auf LPS/LBP, während entgiftetes LPS in diesem Test inaktiv ist ([Fig. 9](#)).

[0221] Diese Daten legen nahe, dass TLR2 eine essentielle Rolle bei der angeborenen Immunreaktion, der ersten Verteidigungslinie gegen mikrobielle Pathogene spielt. TLR2 und CD14 werden beide an Knochenmarkzellen exprimiert und ihre Induktion wird bei LPS-Behandlung koordiniert induziert. Die Expression von TLR2 in Nicht-Knochenmarkszellen verleiht normalen, nicht reaktionsfähigen Zellen LPS-Reaktionsfähigkeit durch einen Mechanismus, der von LBP abhängt und durch die Expression von mCD14 verstärkt wird. Die LPS-Behandlung von TLR2-exprimierenden Zellen resultiert in der Aktivierung von NF-κB und anschließender Induktion von Genen, welche die adaptive Reaktion auslösen, wie z. B. IL-8 ([Fig. 9](#)). Die Daten der Erfinder legen nahe, dass TLR2 sowohl an der Wahrnehmung der Gegenwart von LPS, als auch an der Übertragung dieser Information über die Plasmamembran hinweg teilnimmt, da intakte extrazelluläre und intrazelluläre Domänen für LPS-Reaktionen erforderlich sind. Darüber hinaus ist eine Region im C-terminalen Schwanz von TLR2, der Homologie zu einem Abschnitt des IL-1R aufweist, der für die Assoziation mit IRAK erforderlich ist, für die NF-κB-Aktivierung notwendig.

[0222] *Drosophila-Toll* und der Toll-verwandte Rezeptor 18-Wheeler spielen eine wichtige Rolle bei der Induktion antimikrobieller Peptide als Reaktion auf Bakterien bzw. Pilze.

[0223] Medzhitov et al., siehe oben. Genetische Daten haben Spätzle als Ligand für Toll bei der Bildung von dorsoventralen Mustern impliziert und zur Vermutung geführt, dass ein Homolog von Spätzle für die Regulation menschlicher TLRs bei der Immunreaktion von Bedeutung sein könnte. Die Beobachtungen der Erfinder, dass die Aktivierung von TLR2 durch LPS nicht durch Cycloheximid blockiert wird und dass die extrazelluläre Domäne von TLR2 ein niedrigaffiner Rezeptor für LPS in vitro ist, steht im Einklang mit einem Modell, bei dem TLR2 an der LPS-Erkennung teilnimmt. Die Daten der Erfinder schließen die Möglichkeit nicht aus, dass andere Proteine (wie z. B. ein Spätzle-Homolog) die Reaktion von TLR2 auf LPS modifizieren könnte. Es ist anzumerken, dass, obgleich extrazelluläre Domänen von TLR2 und *Drosophila-Toll* beide LRRS enthalten, diese weniger als 20% Aminosäureidentität aufweisen. Zweitens sind LRR-Proteine „Mustererkennungsrezeptoren“ (PRRs) für eine Vielzahl von Molekülen, wie z. B. Proteine, Peptide und Kohlenhydrate. Dangl et al., Cell 91, 17–24 (1997). Drittens ist die Erforderlichkeit von Spätzle bei der *Drosophila*-Immunreaktion nicht so eindeutig wie jene von Toll. Im Gegensatz zu Defekten in Toll induzieren Spätzle-Mutanten normale Ausmaße der antimikrobiellen Peptide Defensin und Attacin und sind hinsichtlich der Cecropin A-Expression nach Pilzexposition nur partiell defizient und hinsichtlich der Aktivierung von Dorsal als Reaktion auf Verletzung nicht defizient. Lemaitre et al., Cell 86, 973–983 (1996); Lemaitre et al., EMBO J. 14, 536–545 (1995).

[0224] Wie vorhin erwähnt, ist TLR2 ein Mitglied der großen Familie der menschlichen, mit Toll in Beziehung stehenden Rezeptoren, einschließlich der drei neuen Rezeptoren (kodiert von DNA47361), die in der vorlie-

genden Anmeldung speziell offenbart sind. Die in diesem Beispiel dargelegten Daten sowie der Beweis der Beteiligung von TLR4 an der Aktivierung von NF-κB-reaktiven Genen legen nahe, dass es eine Hauptfunktion dieser Rezeptorenfamilie ist, als Erkennungsrezeptoren für Pathogenmuster zu agieren, welche die Gegenwart von konservierten, an Mikroben vorhandenen molekularen Strukturen wahrnehmen, wie es ursprünglich von Janeway und Kollegen vorgeschlagen worden ist (Medzhitov et al., siehe oben). Die menschliche TLR-Familie könnte ein Ziel für therapeutische Strategien zur Behandlung von septischem Schock darstellen.

Beispiel 10

In-situ-Hybridisierung

[0225] Die In-situ-Hybridisierung ist eine mächtige und vielseitige Technik zur Detektion und zur Lokalisierung von Nucleinsäuresequenzen in Zell- oder Gewebepräparaten. Sie kann beispielsweise zweckdienlich sein, um Orte der Genexpression zu identifizieren, die Gewebeverteilung der Transkription zu analysieren, Virusinfektion zu identifizieren und zu lokalisieren, Veränderungen der spezifischen mRNA-Synthese zu verfolgen und die Chromosomenkartierung zu unterstützen.

[0226] Die In-situ-Hybridisierung wurde nach einer optimierten Version des Protokolls von Lu und Gillett, Cell Vision 1, 169–176 (1994) unter Verwendung PCR-erzeugter, ^{33}P -markierter Ribosonden durchgeführt. Zusammenfassend wurden formalinfixierte, in Paraffin eingebettete menschliche Gewebe geschnitten, entparaffiniert, in Proteinase K (20 g/ml) für 15 Minuten bei 37°C deproteinisiert und für die In-situ-Hybridisierung wie von Lu und Gillett (siehe oben) beschrieben weiterverarbeitet. Eine [^{33}P]-UTP-markierte Antisense-Ribosonde wurde aus einem PCR-Produkt erzeugt und bei 55°C über Nacht hybridisiert. Die Objekträger wurden in die Kerneulsion Kodak NTB2 eingetaucht und für 4 Wochen exponiert.

Synthese der ^{33}P -Ribosonde

[0227] 6,0 µl (125 mCi) ^{33}P -UTP (Amersham BF 1002, SA < 2.000 Ci/mmol) wurden mittels Speed-Vac getrocknet. Jedem getrockneten ^{33}P -UTP enthaltenden Röhrchen wurden die folgenden Bestandteile zugegeben:
 2,0 µl 5 × Transkriptionspuffer
 1,0 µl DTT (100 mM)
 2,0 µl NTP-Gemisch (2,5 mM:10 µ; jeweils 10 mM GTP, CTP und ATP + 10 µl H₂O)
 1,0 µl UTP (50 µM)
 1,0 µl Rnasin
 1,0 µl DNA-Templat (1 µg)
 1,0 µl H₂O
 1,0 µl RNA-Polymerase (für PCR-Produkte T3 = AS, T7 = S, für gewöhnlich)

[0228] Die Röhrchen wurden bei 37°C für eine Stunde inkubiert. Es wurde 1 µl RQ1-DNase zugegeben, gefolgt von Inkubation bei 37°C für 15 Minuten. 90 µl TE (10 mM Tris pH 7,6/1 mM EDTA pH 8,0) wurden zugegeben und das Gemisch wurde auf DE81-Papier pipettiert. Die verbleibende Lösung wurde in eine Microcon-50-Ultrafiltrationseinheit aingebracht und unter Verwendung von Programm 10 (6 Minuten) zentrifugiert. Die Filtrationseinheit wurde über ein zweites Röhrchen invertiert und unter Verwendung von Programm 2 (3 Minuten) zentrifugiert. Nach der letzten Zentrifugation zur Gewinnung wurden 100 µl TE zugegeben. 1 µl des Endprodukts wurde auf DE81-Papier pipettiert und in 6 ml Biofluor II gezählt.

[0229] Die Sonde wurde auf einem TBE/Harnstoff-Gel laufen gelassen. 1–3 µl der Sonde oder 5 µl der RNA Mrk III wurden zu 3 µl Beladungspuffer zugegeben. Nach Erhitzen auf einem Heizblock bei 95°C für drei Minuten wurde das Gel sofort auf Eis gelegt. Die Näpfe des Gels wurden gespült, die Probe aufgegeben und bei 180–250 Volt für 45 Minuten laufen gelassen. Das Gel wurde in Saranfolie eingewickelt und einem XAR-Film mit einer Verstärkerfolie für eine Stunde bis über Nacht in der Gefriertruhe bei –70°C exponiert.

^{33}P -Hybridisierung

[0230] Vorbehandlung gefrorener Schnitte. Die Objekträger wurden aus der Gefriertruhe entnommen, auf Aluminiumschalen gegeben und bei Raumtemperatur für 5 Minuten aufgetaut. Die Schalen wurden für fünf Minuten in einen 55°C-Inkubator gegeben, um die Kondensation zu vermindern. Die Objekträger wurden für 10 Minuten in 4% Paraformaldehyd auf Eis im Abzug fixiert und in 0,5 × SSC für 5 Minuten bei Raumtemperatur gewaschen (25 ml 20 × SSC + 975 ml SQ-H₂O). Nach Deproteinierung in 0,5 µg/ml Proteinase K für 10 Minuten bei 37°C (12,5 µl einer Stammlösung mit 10 mg/ml in 250 ml des vorgewärmten, RNase-freien RNase-Puffers)

wurden die Schnitte in 0,5 µ SSC für 10 Minuten bei Raumtemperatur gewaschen. Die Schnitte wurden in 70%, 95%, 100% Ethanol für jeweils 2 Minuten entwässert.

[0231] Vorbehandlung von in Paraffin eingebetteten Schnitten. Die Objektträger wurden entparaffiniert, in SQ-H₂O gegeben und zweimal in 2 × SSC bei Raumtemperatur für jeweils 5 Minuten gespült. Die Schnitte wurden deproteinisiert, und zwar in 20 µg/ml Proteinase K (500 µl von 10 mg/ml in 250 ml Rnase-freiem Puffer, 37°C, 15 Minuten) – menschlicher Embryo, oder 8 × Proteinase K (100 µl in 250 ml Rnase-Puffer, 37°C, 30 Minuten) – Formalingewebe. Anschließendes Spülen in 0,5 × SSC und Entwässerung wurden wie oben beschrieben durchgeführt.

[0232] Vorhybridisierung. Die Objektträger wurden in einer Kunststoffbox ausgelegt, die mit Box-Puffer- (4 × SSC, 50% Formamid) gesättigtem Filterpapier ausgekleidet war. Das Gewebe wurde mit 50 µl Hybridisierungspuffer (3,75 g Dextranulfat + 6 ml SQ-H₂O) bedeckt, mittels Vortex vermischt und in der Mikrowelle für 2 Minuten mit gelockertem Verschluss erhitzt. Nach dem Abkühlen auf Eis wurden 18,75 ml Formamid, 3,75 ml 20 × SSC und 9 ml SQ-H₂O zugegeben, das Gewebe mittels Vortex gut durchmischt und bei 42°C für 1–4 Stunden inkubiert.

[0233] Hybridisierung. 1,0 × 10⁶ cpm Sonde und 1,0 µl tRNA (Stammlösung mit 50 mg/ml) je Objektträger wurden bei 95°C für 3 Minuten erhitzt. Die Objektträger wurden auf Eis abgekühlt und es wurden 48 µl Hybridisierungspuffer je Objektträger zugegeben. Nach dem Vortexten wurden 50 µl ³³P-Gemisch zu 50 µl der Vorhybridisierung am Objektträger zugegeben. Die Objektträger wurden über Nacht bei 55°C inkubiert.

[0234] Waschen. Es wurde für 2 × 10 Minuten mit 2 × SSC, EDTA bei Raumtemperatur (400 ml 20 × SSC + 16 ml 0,25 M EDTA, V_f = 4L) gewaschen, gefolgt von RNaseA-Behandlung bei 37°C für 30 Minuten (500 µl mit 10 mg/ml in 250 ml Rnase-Puffer = 20 µg/ml). Die Objektträger wurden 2 × 10 Minuten mit 2 × SSC, EDTA bei Raumtemperatur gewaschen. Die Stringenz-Waschbedingungen waren die folgenden: 2 Stunden bei 55°C, 0,1 × SSC, EDTA (20 ml 20 × SSC + 16 ml EDTA, V_f = 4L).

Ergebnisse

PRO358 (DNA47361)

[0235] Das Expressionsmuster von PRO358 (DNA47361) in menschlichen Erwachsenen- und fötalen Geweben wurde untersucht. Die folgenden Sonden wurden verwendet, basierend auf der Volllängen-DNA47361-Sequenz synthetisiert:

Oligo 1: GGA TTC TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC TGG CAA TAA ACT GGA GAC ACT

(Seq.-ID Nr. 29)

Oligo 2: CTA TGA AAT TAA CCC TCA CTA AAG GGA TTG AGT TGT TCT TGG GTT GTT

(Seq.-ID Nr. 30)

[0236] In diesem Versuch wurde Expression in darmassoziiertem Lymphoidgewebe und sich entwickelnden Folliculi lymphatici lienales der Milz im Fötus festgestellt. Geringgradige Expression war in der pALS-Region von normalem erwachsenem Milzgewebe festzustellen. Obwohl alle anderen Gewebe negativ waren, ist es möglich, dass geringe Expressionslevel in anderen Gewebetypen unter empfindlichen Bedingungen beobachtet werden könnten.

Hinterlegung von Material

[0237] Die folgenden Materialien sind bei der American Type Culture Collection, 12301 Parklaven Drive, Rockville, MD, USA (ATCC) hinterlegt.

Material	ATCC-Hinterlegungsnummer	Hinterlegungsdatum
DNA47361-1249	209431	7. November 1997

[0238] Diese Hinterlegung wurde gemäß den Bestimmungen des „Budapester Vertrags über die internationale Anerkennung der Hinterlegung von Mikroorganismen für die Zwecke von Patentverfahren“ (Budapester Vertrag) und den darin enthaltenen Regelungen vorgenommen. Dies garantiert die Erhaltung einer lebensfähigen Kultur der Hinterlegung für 30 Jahre vom Datum der Hinterlegung an. Die Hinterlegung wird von der ATCC un-

ter den Bedingungen des Budapester Vertrags zur Verfügung gestellt und unterliegt einer Vereinbarung zwischen Genentech Inc. und ATCC, was die ständige und uneingeschränkte Verfügbarkeit der Nachkommenschaft der Kultur der Hinterlegung für die Öffentlichkeit bei Erteilung des entsprechenden US-Patents oder bei Veröffentlichung jeglicher US- oder ausländischer Patentanmeldung gewährleistet, was auch immer zuerst eintritt, und die Verfügbarkeit der Nachkommenschaft für jemanden vom US-Commissioner für Patente und Warenzeichen bestimmten gewährleistet, der dazu gemäß 35 USC § 122 und den entsprechenden Regelungen des Commissioner (einschließlich 37 CFR § 1,14 mit besonderer Bezugnahme auf 886 OG 638).

[0239] Der Zessionar der vorliegenden Anmeldung hat zugestimmt, dass die Materialien, falls eine Kultur der hinterlegten Materialien bei Kultivierung unter geeigneten Bedingungen abstirbt, verloren geht oder zerstört wird, nach Benachrichtigung unverzüglich durch andere derselben Art ersetzt werden. Die Verfügbarkeit der hinterlegten Materialien ist nicht als Zugeständnis auszulegen, die Erfindung entgegen der unter der Amtsgewalt jeglicher Regierung gemäß ihrer Patentrechte gewährten Rechte in die Praxis umzusetzen.

[0240] Die vorangehende niedergeschriebene Patentschrift wird als ausreichend erachtet, einem Fachkundigen zu ermöglichen, die Erfindung in die Praxis umzusetzen. Die vorliegende Erfindung wird durch das hinterlegte Konstrukt in seinen Ansprüchen nicht eingeschränkt, da die hinterlegte Ausführungsform als einzelne Illustration gewisser Aspekte der Erfindung gedacht ist, und jegliche funktionell gleichwertigen Konstrukte daher im Schutzmfang dieser Erfindung liegen. Die Hinterlegung von Material hierin stellt kein Eingeständnis dar, dass die hierin enthaltende niedergeschriebene Beschreibung unzulänglich ist, um die praktische Umsetzung irgendeines Aspekts der Erfindung, einschließlich ihrer besten Ausführungsart zu ermöglichen, noch ist sie dahingehend auszulegen, dass sie den Schutzmfang der Ansprüche auf die speziellen Illustrationen einschränkt, die sie verkörpert. Tatsächlich werden verschiedene Modifizierungen der Erfindung zusätzlich zu jenen, die hierin dargestellt und beschrieben sind, dem Fachkundigen auf dem Gebiet der Erfindung aus der vorhergehenden Beschreibung offensichtlich und liegen im Schutzmfang der beigefügten Ansprüche.

Sequenzprotokoll

<110> GENENTECH, INC. 698 38 888.7-08

<120> MENSCHLICHE TOLL-HOMOLOGE

<130> 11669.53-WO-01

<140> PCT/US98/21141

<141> 07.10.1998

<150> 09/105.413

<151> 26.06.1998

<150> 60/090.863

<151> 26.06.1998

<150> 60/083.322

<151> 28.04.1998

<150> 60/065.311

<151> 13.11.1997

<150> 60/062.250

<151> 17.10.1997

<160> 30

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 1049

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Val Phe Pro Met Trp Thr Leu Lys Arg Gln Ile Leu Ile Leu Phe
1 5 10 15

Asn Ile Ile Leu Ile Ser Lys Leu Leu Gly Ala Arg Trp Phe Pro Lys
20 25 30

Thr Leu Pro Cys Asp Val Thr Leu Asp Val Pro Lys Asn His Val Ile
35 40 45

Val Asp Cys Thr Asp Lys His Leu Thr Glu Ile Pro Gly Gly Ile Pro.
50 55 60

DE 698 38 888 T2 2008.12.11

Thr Asn Thr Asn Leu Thr Leu Thr Ile Asn His Ile Pro Asp Ile
 65 70 75 80

Ser Pro Ala Ser Phe His Arg Leu Asp His Leu Val Glu Ile Asp Phe
 85 90 95

Arg Cys Asn Cys Val Pro Ile Pro Leu Gly Ser Lys Asn Asn Met Cys
 100 105 110

Ile Lys Arg Leu Gln Ile Lys Pro Arg Ser Phe Ser Gly Leu Thr Tyr
 115 120 125

Leu Lys Ser Leu Tyr Leu Asp Gly Asn Gln Leu Leu Glu Ile Pro Gln
 130 135 140

Gly Leu Pro Pro Ser Leu Gln Leu Leu Ser Leu Glu Ala Asn Asn Ile
 145 150 155 160

Phe Ser Ile Arg Lys Glu Asn Leu Thr Glu Leu Ala Asn Ile Glu Ile
 165 170 175

Leu Tyr Leu Gly Gln Asn Cys Tyr Tyr Arg Asn Pro Cys Tyr Val Ser
 180 185 190

Tyr Ser Ile Glu Lys Asp Ala Phe Leu Asn Leu Thr Lys Leu Lys Val
 195 200 205

Leu Ser Leu Lys Asp Asn Asn Val Thr Ala Val Pro Thr Val Leu Pro
 210 215 220

Ser Thr Leu Thr Glu Leu Tyr Leu Tyr Asn Asn Met Ile Ala Lys Ile
 225 230 235 240

Gln Glu Asp Asp Phe Asn Asn Leu Asn Gln Leu Gln Ile Leu Asp Leu
 245 250 255

Ser Gly Asn Cys Pro Arg Cys Tyr Asn Ala Pro Phe Pro Cys Ala Pro
 260 265 270

Cys Lys Asn Asn Ser Pro Leu Gln Ile Pro Val Asn Ala Phe Asp Ala
 275 280 285

Leu Thr Glu Leu Lys Val Leu Arg Leu His Ser Asn Ser Leu Gln His
 290 295 300

Val Pro Pro Arg Trp Phe Lys Asn Ile Asn Lys Leu Gln Glu Leu Asp
 305 310 315 320

DE 698 38 888 T2 2008.12.11

Leu Ser Gln Asn Phe Leu Ala Lys Glu Ile Gly Asp Ala Lys Phe Leu
325 330 335

His Phe Leu Pro Ser Leu Ile Gln Leu Asp Leu Ser Phe Asn Phe Glu
340 345 350

Leu Gln Val Tyr Arg Ala Ser Met Asn Leu Ser Gln Ala Phe Ser Ser
355 360 365

Leu Lys Ser Leu Lys Ile Leu Arg Ile Arg Gly Tyr Val Phe Lys Glu
370 375 380

Leu Lys Ser Phe Asn Leu Ser Pro Leu His Asn Leu Gln Asn Leu Glu
385 390 400

Val Leu Asp Leu Gly Thr Asn Phe Ile Lys Ile Ala Asn Leu Ser Met
405 410 415

Phe Lys Gln Phe Lys Arg Leu Lys Val Ile Asp Leu Ser Val Asn Lys
420 425 430

Ile Ser Pro Ser Gly Asp Ser Ser Glu Val Gly Phe Cys Ser Asn Ala
435 440 445

Arg Thr Ser Val Glu Ser Tyr Glu Pro Gln Val Leu Glu Gln Leu His
450 455 460

Tyr Phe Arg Tyr Asp Lys Tyr Ala Arg Ser Cys Arg Phe Lys Asn Lys
465 470 475 480

Glu Ala Ser Phe Met Ser Val Asn Glu Ser Cys Tyr Lys Tyr Gly Gln
485 490 495

Thr Leu Asp Leu Ser Lys Asn Ser Ile Phe Phe Val Lys Ser Ser Asp
500 505 510

Phe Gln His Leu Ser Phe Leu Lys Cys Leu Asn Leu Ser Gly Asn Leu
515 520 525

Ile Ser Gln Thr Leu Asn Gly Ser Glu Phe Gln Pro Leu Ala Glu Leu
530 535 540

Arg Tyr Leu Asp Phe Ser Asn Asn Arg Leu Asp Leu Leu His Ser Thr
545 550 555 560

Ala Phe Glu Glu Leu His Lys Leu Glu Val Leu Asp Ile Ser Ser Asn
565 570 575

DE 698 38 888 T2 2008.12.11

Ser His Tyr Phe Gln Ser Glu Gly Ile Thr His Met Leu Asn Phe Thr
580 585 590

Lys Asn Leu Lys Val Leu Gln Lys Leu Met Met Asn Asp Asn Asp Ile
595 600 605

Ser Ser Ser Thr Ser Arg Thr Met Glu Ser Glu Ser Leu Arg Thr Leu
610 615 620

Glu Phe Arg Gly Asn His Leu Asp Val Leu Trp Arg Glu Gly Asp Asn
625 630 635 640

Arg Tyr Leu Gln Leu Phe Lys Asn Leu Leu Lys Leu Glu Glu Leu Asp
645 650 655

Ile Ser Lys Asn Ser Leu Ser Phe Leu Pro Ser Gly Val Phe Asp Gly
660 665 670

Met Pro Pro Asn Leu Lys Asn Leu Ser Leu Ala Lys Asn Gly Leu Lys
675 680 685

Ser Phe Ser Trp Lys Lys Leu Gln Cys Leu Lys Asn Leu Glu Thr Leu
690 695 700

Asp Leu Ser His Asn Gln Leu Thr Thr Val Pro Glu Arg Leu Ser Asn
705 710 715 720

Cys Ser Arg Ser Leu Lys Asn Leu Ile Leu Lys Asn Asn Gln Ile Arg
725 730 735

Ser Leu Thr Lys Tyr Phe Leu Gln Asp Ala Phe Gln Leu Arg Tyr Leu
740 745 750

Asp Leu Ser Ser Asn Lys Ile Gln Met Ile Gln Lys Thr Ser Phe Pro
755 760 765

Glu Asn Val Leu Asn Asn Leu Lys Met Leu Leu Leu His His Asn Arg
770 775 780

Phe Leu Cys Thr Cys Asp Ala Val Trp Phe Val Trp Trp Val Asn His
785 790 795 800

Thr Glu Val Thr Ile Pro Tyr Leu Ala Thr Asp Val Thr Cys Val Gly
805 810 815

Pro Gly Ala His Lys Gly Gln Ser Val Ile Ser Leu Asp Leu Tyr Thr
820 825 830

DE 698 38 888 T2 2008.12.11

Cys Glu Leu Asp Leu Thr Asn Leu Ile Leu Phe Ser Leu Ser Ile Ser
835 840 845

Val Ser Leu Phe Leu Met Val Met Met Thr Ala Ser His Leu Tyr Phe
850 855 860

Trp Asp Val Trp Tyr Ile Tyr His Phe Cys Lys Ala Lys Ile Lys Gly
865 870 875 880

Tyr Gln Arg Leu Ile Ser Pro Asp Cys Cys Tyr Asp Ala Phe Ile Val
885 890 895

Val Ala Lys Leu Glu Asp Pro Arg Glu Lys His Phe Asn Leu Cys Leu
915 920 925

Glu Glu Arg Asp Trp Leu Pro Gly Gln Pro Val Leu Glu Asn Leu Ser
930 935 940

Gln Ser Ile Gln Leu Ser Lys Lys Thr Val Phe Val Met Thr Asp Lys
 945 950 955 960

Tyr Ala Lys Thr Glu Asn Phe Lys Ile Ala Phe Tyr Leu Ser His Gln
965 970 975

Arg Leu Met Asp Glu Lys Val Asp Val Ile Ile Leu Ile Phe Leu Glu
980 985 990

Lys Pro Phe Gln Lys Ser Lys Phe Leu Gln Leu Arg Lys Arg Leu Cys
995 1000 1005

Gly Ser Ser Val Leu Glu Trp Pro Thr Asn Pro Gln Ala His Pro Tyr
1010 1015 1020

Phe Trp Gln Cys Leu Lys Asn Ala Leu Ala Thr Asp Asn His Val Ala
1025 1030 1035 1040

Tyr Ser Gln Val Phe Lys Glu Thr Val
1045

<210> 2
<211> 3283
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 2

cccatctcaa gctgatcttg gcacccctca tgctctgctc tttcaaccca gacctctaca 60
 ttccattttg gaagaagact aaaaatggtg tttccaatgt ggacactgaa gagacaaattt 120
 cttatccccc ttaacataat cccatccctt aaactccctt gggcttagatg gtttcctaaa 180
 actctgcctt gtgatgtcac tctggatgtt ccaaagaacc atgtgatcgt ggactgcaca 240
 gacaaggcatt tgacagaaat tcctggaggt attccacgaa acaccacgaa cctcaccctc 300
 accatctaacc acataccaga catctcccc gcttccttc acagactgaa ccattctggta 360
 gagatcgatt tcagatgca cttgttaccc attccactgg ggtcaaaaaa caacatgtgc 420
 atcaagaggc tgcatgatcc acccagaagc ttttagtggac tcacttattt aaaatccctt 480
 tacctggatg gaaaccagct actagagata ccgcagggcc tcccgccctg cttacagctt 540
 ctcaagccctt agggccaaacaa catctttcc atcagaaaaa agaatctaac agaactggcc 600
 aacatagaaa tactctaccc gggccaaaac tggttatttac gaaatccctt ttatgtttca 660
 tattcaatag agaaagatgc cttccctaaac ttgacaaaatg taaaagtgtt ctccctgaaa 720
 gataacaatg tcacagccgt ccctactgtt ttgcctatcta ctttaacaga actatatctc 780
 tacaacaaca tgattgcaaa aatccaagaa gatgattta ataacctcaa ccaattacaa 840
 attcttgacc taagtggaaa ttgcctcgat tggttataatg ccccatccctt ttgtgcgcgg 900
 tgtaaaaata attctccctt acagatccctt gtaatgctt ttgatgcgtt gacagaatta 960
 aaagttttac gtctacacag taactctctt cagcatgtgc ccccaagatg gtttaagaac 1020
 atcaacaaac tccaggaact ggatctgtcc caaaacttct tggccaaaga aattggggat 1080
 gctaaatccctt tgcatccctt ccccaagccctc atccaaattgg atctgtctt caattttgaa 1140
 ctccaggctt atcgtgcattc tatgaatctt tcacaaggcat tttcttcaact gaaaagccctg 1200
 aaaattctgc ggatcagagg atatgtctt aaagagttga aaagctttaa cctctcgcca 1260
 ttacataatc ttcaaaaatct tgaagttctt gatcttggca ctaactttat aaaaattgtt 1320
 aacccatcgca tgtttaaaca attaaaaga ctgaaagtca tagatcttc agtgaataaaa 1380
 atatcacctt caggagattc aagtgaagtt ggcttctgtt caaatgccag aacttctgtt 1440
 gaaagttatg aaccccaaggt cctggaaacaa ttacatttt tcaagatatga taagtatgca 1500
 aggagttgca gattaaaaa caaagaggct tctttcatgt ctgttatga aagctgttac 1560
 aagatgggc agacccatggaa tctaagttaa aatagtatat tttttgttcaaa gtcctctgtat 1620
 tttcaggcatc ttttttcctt caaatgcctt aatctgttca gaaatctcat tagccaaact 1680
 cttaatggca gtgaattcca accttttagca gagctgagat atttggactt ctccaacaaac 1740
 cggcttgcatt tactccattt aacagcattt gaagagcttc acaaactggaa agttctggat 1800
 ataaggatgtt atagccatca ttttcaatca gaaggaattt ctcataatgtt aaactttacc 1860
 aagaacctaa aggttctgtt gaaactgtt gatgaacgaca atgacatctc ttctccacc 1920
 agcaggacca tggagagtga gtctttttaga actctggat tcaagggaaa tcacttagat 1980
 gttttatggaa gagaaggatgtt taacagatata ttacaatttt tcaagaatctt gctaaaatttt 2040
 gaggaattttagt acatctctt aaattccctt agtttttgc cttctggatg ttttggatgtt 2100
 atgcctccaa atctaaagaa tctcttttgc gccaaaaatg ggctcaaatc tttcagttgg 2160
 aagaaactcc agtgtctt gaaacctggaa actttggacc tcagccacaa ccaactgacc 2220
 actgtccctt agagatttac caactgttcc agaagccctca agaatctgtt tctttaagaat 2280
 aatcaaataatca ggagttctgtt gaaatgtt gatgttgc ttttccatgtt gctttttttttt 2340
 gatctcagctt caaataaaaat ccagatgtt cttttccatgtt gttttttttttt 2400
 aacaatctgtt agatgttgc ttttccatgtt aatcggttcc ttttccatgtt gttttttttttt 2460
 tggtttgc ttttccatgtt gttttttttttt 2520
 acttgcgttgg gggccaggagc acacaagggc caaatgtt gttttttttttt 2580
 ttttccatgtt gttttttttttt 2640
 cttttccatgtt gttttttttttt 2700
 ttttccatgtt gttttttttttt 2760
 gttttttttttt 2820

gtggccaaac tggaaagaccc aagagagaaaa catttaatt tatgtctcgaa gaaaaggac 2880
 tggttaccag ggcagccagt tctggaaaac ctttcccaga gcatacagct tagcaaaaag 2940
 acagtgttg tcatgacaga caagtatgca aagactgaaa attttaaagat agcattttac 3000
 ttgtccccatc agaggctcat ggatgaaaaa gttgatgtga ttatcttcat atttcttgag 3060
 aagccctttc agaagtccaa gtccctccag ctccgaaaaa gctctgtgg gagttctgtc 3120
 cttgagtggc caacaaaccc gcaagctcac ccatacttct gcagtgtct aaagaacgcc 3180
 ctggccacag acaatcatgt ggctatagt caggtgttca aggaaacggt ctagcccttc 3240
 tttgcaaaac acaactgcct agtttaccaa ggagaggcct ggc 3283

<210> 3

<211> 1041

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

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

DE 698 38 888 T2 2008.12.11

Leu Ala Trp Asn Cys Tyr Phe Asn Lys Val Cys Glu Lys Thr Asn Ile
 180 185 190

 Glu Asp Gly Val Phe Glu Thr Leu Thr Asn Leu Glu Leu Leu Ser Leu
 195 200 205

 Ser Phe Asn Ser Leu Ser His Val Pro Pro Lys Leu Pro Ser Ser Leu
 210 215 220

 Arg Lys Leu Phe Leu Ser Asn Thr Gln Ile Lys Tyr Ile Ser Glu Glu
 225 230 235 240

 Asp Phe Lys Gly Leu Ile Asn Leu Thr Leu Leu Asp Leu Ser Gly Asn
 245 250 255

 Cys Pro Arg Cys Phe Asn Ala Pro Phe Pro Cys Val Pro Cys Asp Gly
 260 265 270

 Gly Ala Ser Ile Asn Ile Asp Arg Phe Ala Phe Gln Asn Leu Thr Gln
 275 280 285

 Leu Arg Tyr Leu Asn Leu Ser Ser Thr Ser Leu Arg Lys Ile Asn Ala
 290 295 300

 Ala Trp Phe Lys Asn Met Pro His Leu Lys Val Leu Asp Leu Glu Phe
 305 310 315 320

 Asn Tyr Leu Val Gly Glu Ile Val Ser Gly Ala Phe Leu Thr Met Leu
 325 330 335

 Pro Arg Leu Glu Ile Leu Asp Leu Ser Phe Asn Tyr Ile Lys Gly Ser
 340 345 350

 Tyr Pro Gln His Ile Asn Ile Ser Arg Asn Phe Ser Lys Leu Leu Ser
 355 360 365

 Leu Arg Ala Leu His Leu Arg Gly Tyr Val Phe Gln Glu Leu Arg Glu
 370 375 380

 Asp Asp Phe Gln Pro Leu Met Gln Leu Pro Asn Leu Ser Thr Ile Asn
 385 390 395 400

 Leu Gly Ile Asn Phe Ile Lys Gln Ile Asp Phe Lys Leu Phe Gln Asn
 405 410 415

 Phe Ser Asn Leu Glu Ile Ile Tyr Leu Ser Glu Asn Arg Ile Ser Pro
 420 425 430

DE 698 38 888 T2 2008.12.11

Leu Val Lys Asp Thr Arg Gln Ser Tyr Ala Asn Ser Ser Ser Phe Gln
 435 440 445

Arg His Ile Arg Lys Arg Arg Ser Thr Asp Phe Glu Phe Asp Pro His
 450 455 460

Ser Asn Phe Tyr His Phe Thr Arg Pro Leu Ile Lys Pro Gln Cys Ala
 465 470 475 480

Ala Tyr Gly Lys Ala Leu Asp Leu Ser Leu Asn Ser Ile Phe Phe Ile
 485 490 495

Gly Pro Asn Gln Phe Glu Asn Leu Pro Asp Ile Ala Cys Leu Asn Leu
 500 505 510

Ser Ala Asn Ser Asn Ala Gln Val Leu Ser Gly Thr Glu Phe Ser Ala
 515 520 525

Ile Pro His Val Lys Tyr Leu Asp Leu Thr Asn Asn Arg Leu Asp Phe
 530 535 540

Asp Asn Ala Ser Ala Leu Thr Glu Leu Ser Asp Leu Glu Val Leu Asp
 545 550 555 560

Leu Ser Tyr Asn Ser His Tyr Phe Arg Ile Ala Gly Val Thr His His
 565 570 575

Leu Glu Phe Ile Gln Asn Phe Thr Asn Leu Lys Val Leu Asn Leu Ser
 580 585 590

His Asn Asn Ile Tyr Thr Leu Thr Asp Lys Tyr Asn Leu Glu Ser Lys
 595 600 605

Ser Leu Val Glu Leu Val Phe Ser Gly Asn Arg Leu Asp Ile Leu Trp
 610 615 620

Asn Asp Asp Asp Asn Arg Tyr Ile Ser Ile Phe Lys Gly Leu Lys Asn
 625 630 635 640

Leu Thr Arg Leu Asp Leu Ser Leu Asn Arg Leu Lys His Ile Pro Asn
 645 650 655

Glu Ala Phe Leu Asn Leu Pro Ala Ser Leu Thr Glu Leu His Ile Asn
 660 665 670

Asp Asn Met Leu Lys Phe Phe Asn Trp Thr Leu Leu Gln Gln Phe Pro
 675 680 685

DE 698 38 888 T2 2008.12.11

Arg Leu Glu Leu Leu Asp Leu Arg Gly Asn Lys Leu Leu Phe Leu Thr
690 695 700

Asp Ser Leu Ser Asp Phe Thr Ser Ser Leu Arg Thr Leu Leu Leu Ser
705 710 715 720

His Asn Arg Ile Ser His Leu Pro Ser Gly Phe Leu Ser Glu Val Ser
725 730 735

Ser Leu Lys His Leu Asp Leu Ser Ser Asn Leu Leu Lys Thr Ile Asn
740 745 750

Lys Ser Ala Leu Glu Thr Lys Thr Thr Lys Leu Ser Met Leu Glu
755 760 765

Leu His Gly Asn Pro Phe Glu Cys Thr Cys Asp Ile Gly Asp Phe Arg
770 775 780

Arg Trp Met Asp Glu His Leu Asn Val Lys Ile Pro Arg Leu Val Asp
785 790 795 800

Val Ile Cys Ala Ser Pro Gly Asp Gln Arg Gly Lys Ser Ile Val Ser
805 810 815

Leu Glu Leu Thr Thr Cys Val Ser Asp Val Thr Ala Val Ile Leu Phe
820 825 830

Phe Phe Thr Phe Ile Thr Thr Met Val Met Leu Ala Ala Leu Ala
835 840 845

His His Leu Phe Tyr Trp Asp Val Trp Phe Ile Tyr Asn Val Cys Leu
850 855 860

Ala Lys Val Lys Gly Tyr Arg Ser Leu Ser Thr Ser Gln Thr Phe Tyr
865 870 875 880

Asp Ala Tyr Ile Ser Tyr Asp Thr Lys Asp Ala Ser Val Thr Asp Trp
885 890 895

Val Ile Asn Glu Leu Arg Tyr His Leu Glu Glu Ser Arg Asp Lys Asn
900 905 910

Val Leu Leu Cys Leu Glu Glu Arg Asp Trp Asp Pro Gly Leu Ala Ile
915 920 925

Ile Asp Asn Leu Met Gln Ser Ile Asn Gln Ser Lys Lys Thr Val Phe
930 935 940

DE 698 38 888 T2 2008.12.11

Val Leu Thr Lys Lys Tyr Ala Lys Ser Trp Asn Phe Lys Thr Ala Phe
945 950 955 960

Tyr Leu Ala Leu Gln Arg Leu Met Asp Glu Asn Met Asp Val Ile Ile
965 970 975

Phe Ile Leu Leu Glu Pro Val Leu Gln His Ser Gln Tyr Leu Arg Leu
980 985 990

Arg Gln Arg Ile Cys Lys Ser Ser Ile Leu Gln Trp Pro Asp Asn Pro
995 1000 1005

Lys Ala Glu Gly Leu Phe Trp Gln Thr Leu Arg Asn Val Val Leu Thr
1010 1015 1020

Glu Asn Asp Ser Arg Tyr Asn Asn Met Tyr Val Asp Ser Ile Lys Gln
1025 1030 1035 1040

Tyr

<210> 4

<211> 4199

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

gggtaccatt ctgcgctgct gcaagttacq gaataaaaaa ttagaacaac agaaacatgg 60
aaaacatgtt ctttcagtcg tcaatgctga cctgcatttt cctgctaata tctggttcct 120
gtgagttatg cgccgaagaa aattttctta gaagctatcc ttgtgtatgag aaaaagcaaa 180
atgactcagt tattgcagag tgtagcaatc gtcgactaca ggaagttccc caaacggtgg 240
gcaaatatgt gacagaacta gacctgtctg ataatttcat cacacacata acgaatgaat 300
catttcaagg gctgaaaaat ctcaactaaaa taaatctaaa ccacaacccc aatgtacagc 360
accagaacgg aaatcccggt atacaatcaa atggcttcaa tatcacagac gggcattcc 420
tcaacctaaa aaacctaagg gagttactgc ttgaagacaa ccagttaccc caaataccct 480
ctggtttgcc agagtctttg acagaactta gtctaattca aaacaatata tacaacataa 540
ctaaagaggg catttcaaga ctatataact taaaaatct ctatggcc tggactgct 600
attttaacaa agtttgcgag aaaactaaca tagaagatgg agtatttcaa acgctgacaa 660
atttggagtt gctatcaacta tctttcaatt ctcttcaca cgtgccaccc aaactgccaa 720
gctccctacg caaactttt ctgagcaaca cccagatcaa atacattagt gaagaagatt 780
tcaagggatt gataaaattta acattactag atttaagcgg gaactgtccg aggtgtttca 840
atgccccatt tccatgcgtg ccttgtatg gtgggtcttc aattaatata gatcggtttg 900
cttttcaaaa cttgacccaa ctgcataacc taaaacctctc tagcaattcc ctcaggaaga 960
ttaatgctgc ctggtttaaa aatatgcctc atctgaaggt gctggatctt gaattcaact 1020
attttagtggg agaaatagtc tctggggcat ttttaacgt gctgccccgc ttagaaatac 1080
ttgacttgc ttttaactat ataaaggaga gttatccaca gcatattaat atttccagaa 1140
acttctctaa actttgtct ctacggcat tgcatttaag aggttatgtg ttccaggaac 1200

tcagagaaga tgatttccag cccctgatgc agcttccaaa ctatcgact atcaacttgg 1260
 gtattaattt tattaagcaa atcgatttca aactttcca aaatttctcc aatctggaaa 1320
 ttatTTactt gtcagaaaac agaaatcac cgTTggtaaa agatacccg cagagtatg 1380
 caaatagttc ctctttcaa cgcatatcc ggaaacgacg ctcaacagat ttgagttt 1440
 acccacattc gaacTTtat cattcaccc gtccttaat aaagccacaa tggctgctt 1500
 atggaaaagc ctagattt agcctcaaca gtatTTctt cattgggcca aaccaattt 1560
 aaaatctcc tgacattgcc tggtaaaatc tgtctgaaa tagcaatgt caagtgttaa 1620
 gtggaaactga atttcagcc attcctcatg tcaaataattt ggatttgaca aacaatagac 1680
 tagactttga taatgcttagt gctcttactg aattgtccga cttggaaagt ctatctca 1740
 gctataattc acactattc agaatagcag gcgtaacaca tcatcttagaa ttatttcaaa 1800
 atttcacaaa tctaaaagtt taaaacttga gccacacaa catttataact ttaacagata 1860
 agtataaccc ggaaagcaag tccctggtag aattatTTt cagtggaat cgccttgaca 1920
 ttttggaa tggatgtgac aacaggata tctccatttt caaaggcttc aagaatctga 1980
 cacgtctgga ttatccctt aataggctga agcacatccc aatgaagca ttcccttaatt 2040
 tgccagcqag tctcaactgaa ctacatataat atgataatat gttaaagtt tttaacttgg 2100
 cattactcca gcagtttcct cgtctcgagt tgcttgactt acgtggaaac aaactactct 2160
 tttaactga tagcctatct gactttacat cttcccttcg gacactgctg ctgagtcata 2220
 acaggatttcc acacccatccc tctggcttc ttctgttactg cagtagtctg aagcacctcg 2280
 atttaagttc caatctgcta aaaacaatca acaaattccgc acttgaaact aagaccacca 2340
 ccaaattatc tatgttggaa ctacacggaa acccccttga atgcacactgt gacattggag 2400
 attccgaag atggatggat gaaacatctga atgtcaaaat tcccagactg gtatgtca 2460
 ttgttgcag tcctggggat caaaggggg aagttttgtt gaggctggag ctaacaactt 2520
 gtgttccaga tggatattat ttttccac gttttttatc accaccatgg 2580
 ttatgttggc tggcttggct caccatTTt ttactggga tggatgggtt atatataatg 2640
 tggatggatca aaggtaaaa ggctacaggat ctcttccac atcccaaact ttctatgt 2700
 ctatcatttc ttatgacacc aaagatgcct ctgttactga ctgggtgata aatgagctgc 2760
 gctaccaccc tgaagagagc cgagacaaaa acgttccct tggatgttag gagggtt 2820
 gggacccggg atggccatc atcgacaacc tcatgcagag catcaaccaa agcaagaaaa 2880
 cagttttgtt ttttacccaa aaatatgcaa aagctggaa ctttttttact gcttttact 2940
 tggcttgcg tggatgtatg gatgagaaca tggatgtat ttttacccatc tggatggatc 3000
 cagtttaca gcatttcag tatttggggc tacggcagcg gatctgtt 3060
 tccagtgcc tgacaacccg aaggcagaag gcttggggc gcaactctg agaaatgtgg 3120
 tcttgcgttca aatgatttca cggatataaca atatgtatgtt cttttttttt 3180
 aactgacgtt aagtcatgtt ttcgcgcatt aataaagatg caaaggaatg acatTTctgt 3240
 attagttatc tatttgcgtt taacaaattt tccccaaact tagtggtttta aaacaacaca 3300
 tttgctggcc cacagttttt gagggcagg agtccaggcc cagcataact gggcttctg 3360
 ctcagggtgt ttcaggaggct gcaatgttgg tggatccatc agacataaggc atcaactgggg 3420
 tcacactcat gtggatgttt tctggattca attcccttcg ggcttggc caaaggctat 3480
 actcatgttca gccatgcgag cctctccac aaggcagctt gcttcatcg agctagcaaa 3540
 aaagagaggt tggatgttca aatgttggat tttttttttt aatgttggatca aaaaatgtat 3600
 atctcatcac tttggccata ttctatTTt tagaagtaaa ccacaggccc caccatgttcc 3660
 atggatgttca ccacccatgtt ccaggggaaa cagctgttca acaagatgtt gagctctgtt 3720
 tggatgttca ggttcatcaac tttttccct tggatgttgg cttggatgg cttgttccat 3780
 tggatgttca ttttttttca aatgttggat tggatgttgg cttggatgg cttgttccat 3840
 ctaacacatcc ttcttttcaa ttttttttca aatgttggat tggatgttgg cttggatgg 3900
 ttaagctgtt gtttataattt atcatatatac tatggatca tggatgttgg tttttttt 3960
 tggatgttgg ttttttttca aatgttggat tggatgttgg cttggatgg cttgttccat 4020
 ggttttttca aatgttggat tggatgttgg cttggatgg cttgttccat 4080

catttttaa aagtatgcag ctaaattcga agctttggc ctatattgtt aattgccatt 4140
 gctgtaaatc taaaatgaa tgaataaaaaa tgtttcattt tacaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 4199

<210> 5
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 5
 taaagaccca gctgtgaccg

20

<210> 6
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 6
 atccatgagc ctctgatggg

20

<210> 7
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 7
 atttatgtct cgaggaaagg gactggttac cagggcagcc agttc

45

<210> 8
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 8
 gccgagacaa aaacgttctc c

21

<210> 9
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 9
 catccatgtt ctcatccatt agcc

24

<210> 10
 <211> 46
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 10

tcgacaacct catgcagagc atcaacccaaa gcaagaaaaac agtatt .

46

<210> 11

<211> 2602

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 11

gttatgccta gaaaacattt ctcagaatt agaattacga tatgtgtca aacacaatga 60
 cttatggaa cctctttat ttgttaggtt aagcactgga caatgccaca tacttgtgg 120
 atggtgtggg tcttgggggt catcatcagc ctctccaagg aagaatccctc caatcaggct 180
 tctctgtctt gtgaccgcaa tggtatctgc aaggcgagct caggatctt aaactccatt 240
 ccctcagggc tcacagaagc tgtaaaaagc cttgacctgt ccaacaacag gatcacctac 300
 attagcaaca gtgacctaca gaggtgtgtg aacccagg ctctggtgct gacatccaat 360
 ggaattaaca caatacgagga agattcttt tcttccctgg gcagtcttga acatttagac 420
 ttatcctata attacttatac taatttatcg tcttcctgg tcaagccccct ttctcttta 480
 acattcttaa acttactggg aaatccttac aaaaccctag gggaaacatc tctttttct 540
 catctcacaa aattgcaa at cctgagagtg ggaaatatgg acacccctcac taagattcaa 600
 agaaaagatt ttgctggact tacccctt gaggaacttg agattgtgc ttcagatcta 660
 cagagctatg agccaaaaag tttgaagtca attcagaatg taagtcatct gatccttcat 720
 atgaagcagc atatttact gctggagatt ttttagatg ttacaagttc cgtggatgt 780
 ttggaaactgc gagatactga tttggacact ttcattttt cagaactate cactggtgaa 840
 acaaattcat tgattaaaaa gtttacattt agaaatgtga aaatcaccga tgaaagttt 900
 tttcaggtta tgaaactttt gaatcagatt tctggattgt tagaatttga gttttagtgc 960
 tgtaccctta atggagttgg taatttttaga gcatctgata atgacagagt tatagatcca 1020
 ggtaaaagtgg aaacgttaac aatccggagg ctgcatttttcaaggttttcaatttat 1080
 gatctgagca ctttatatttccatcactacagaa agatggaaaaa gaatcacatg agaaaacagt 1140
 aaagtttttc tggttcccttgc tttactttca caacattttaa aatcattttaga atacttggat 1200
 ctcagtgaaa attttagtgg tgaagaatac ttgaaaaatt cagcctgtga ggatgcctgg 1260
 ccctctctac aaactttat tttttaggaa aatcatttgg catcatttga aaaaaccgg 1320
 gagactttgc tcactctgaa aaacttgcact aacattgata tcagtaagaa tagtttcat 1380
 tctatgcctg aaacttgtca gtggccagaa aagatgaaat atttgcatttgcactcaca 1440
 cgaatacaca gtgtaacagg ctgcattccc aagacactgg aaatttttaga ttttagcaac 1500
 aacaatctca atttattttc tttttagtgc cgcattttca aagaacttta tatttccaga 1560
 aataagtgtga tgactctacc agatgcctcc ctcttaccctt tgttacttagt attgaaaatc 1620
 agtaggaatg caataactac gtttcttaag gagcaacttg actcatttca cacactgaag 1680
 actttggaaag ctgggtggca taacttcatt tgctccctgtg aattccctctc ctttacttgc 1740
 gagcagcaag cactggccaa agtcttgatt gattggccag caaatttgcacttgcactc 1800
 ccattttccatg tgcgtggcca gcagggttcag gatgtccggcc tctcggtgtc ggaatgtcac 1860
 aggacagcac tgggtgtctgg catgtgtgt gctctgttcc tgctgtatccct gctcaccgggg 1920
 gtccctgtgcc accgttttca tggcctgtgg tataatggaaa tgatgtgggc ctggctccag 1980
 gccaaaagga agcccaaggaa agtcccaagc aggaacatct gctatgtgc atttggatcc 2040
 tacagtgagc gggatgccta ctgggtggag aacccatttgc tccaggagct ggagaacttgc 2100
 aatccccccct tcaagttgtg ttttccataaag cggacttca tccctggcaat gttggatcatt 2160
 gacaatatca ttgactccat tgaaaagagc cacaatccatg tctttgtgtc ttctgaaaac 2220
 tttgtgaaga gttgatgtgggca caagttatgaa ctggacttct cccatttccg tctttttgtat 2280
 gagaacaatg atgctgcccatttctt ctggagccca ttgagaaaaa agccatttcc 2340

cagcgcttct gcaagctgcg gaagataatg aacaccaaga cctacctgga gtggcccatg 2400
 gacgaggctc agcggaaagg atttgggtta aatctgagag ctgcgataaa gtccttagtt 2460
 cccatattta agaccagtct ttgtcttagtt gggatctta tgtcactagt tatagttaa 2520
 ttcatcaga cataattata taaaaactac gtggatgtac cgtcatttga ggacttgctt 2580
 actaaaacta caaaaactca aa 2602

<210> 12

<211> 784

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

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

DE 698 38 888 T2 2008.12.11

Ser Leu Lys Ser Ile Gln Asn Val Ser His Leu Ile Leu His Met Lys
195 200 205

Gln His Ile Leu Leu Leu Glu Ile Phe Val Asp Val Thr Ser Ser Val
210 215 220

Glu Cys Leu Glu Leu Arg Asp Thr Asp Leu Asp Thr Phe His Phe Ser
225 230 235 240

Glu Leu Ser Thr Gly Glu Thr Asn Ser Leu Ile Lys Lys Phe Thr Phe
245 250 255

Arg Asn Val Lys Ile Thr Asp Glu Ser Leu Phe Gln Val Met Lys Leu
260 265 270

Leu Asn Gln Ile Ser Gly Leu Leu Glu Leu Glu Phe Asp Asp Cys Thr
275 280 285

Leu Asn Gly Val Gly Asn Phe Arg Ala Ser Asp Asn Asp Arg Val Ile
290 295 300

Asp Pro Gly Lys Val Glu Thr Leu Thr Ile Arg Arg Leu His Ile Pro
305 310 315 320

Arg Phe Tyr Leu Phe Tyr Asp Leu Ser Thr Leu Tyr Ser Leu Thr Glu
325 330 335

Arg Val Lys Arg Ile Thr Val Glu Asn Ser Lys Val Phe Leu Val Pro
340 345 350

Cys Leu Leu Ser Gln His Leu Lys Ser Leu Glu Tyr Leu Asp Leu Ser
355 360 365

Glu Asn Leu Met Val Glu Glu Tyr Leu Lys Asn Ser Ala Cys Glu Asp
370 375 380

Ala Trp Pro Ser Leu Gln Thr Leu Ile Leu Arg Gln Asn His Leu Ala
385 390 395 400

Ser Leu Glu Lys Thr Gly Glu Thr Leu Leu Thr Leu Lys Asn Leu Thr
405 410 415

Asn Ile Asp Ile Ser Lys Asn Ser Phe His Ser Met Pro Glu Thr Cys
420 425 430

Gln Trp Pro Glu Lys Met Lys Tyr Leu Asn Leu Ser Ser Thr Arg Ile
435 440 445

His Ser Val Thr Gly Cys Ile Pro Lys Thr Leu Glu Ile Leu Asp Val
 450 455 460

Ser Asn Asn Asn Leu Asn Leu Phe Ser Leu Asn Leu Pro Gln Leu Lys
 465 470 475 480

Glu Leu Tyr Ile Ser Arg Asn Lys Leu Met Thr Leu Pro Asp Ala Ser
 485 490 495

Leu Leu Pro Met Leu Leu Val Leu Lys Ile Ser Arg Asn Ala Ile Thr
 500 505 510

Thr Phe Ser Lys Glu Gln Leu Asp Ser Phe His Thr Leu Lys Thr Leu
 515 520 525

Glu Ala Gly Gly Asn Asn Phe Ile Cys Ser Cys Glu Phe Leu Ser Phe
 530 535 540

Thr Gln Glu Gln Gln Ala Leu Ala Lys Val Leu Ile Asp Trp Pro Ala
 545 550 555 560

Asn Tyr Leu Cys Asp Ser Pro Ser His Val Arg Gly Gln Gln Val Gln
 565 570 575

Asp Val Arg Leu Ser Val Ser Glu Cys His Arg Thr Ala Leu Val Ser
 580 585 590

Gly Met Cys Cys Ala Leu Phe Leu Leu Ile Leu Leu Thr Gly Val Leu
 595 600 605

Cys His Arg Phe His Gly Leu Trp Tyr Met Lys Met Met Trp Ala Trp
 610 615 620

Leu Gln Ala Lys Arg Lys Pro Arg Lys Ala Pro Ser Arg Asn Ile Cys
 625 630 635 640

Tyr Asp Ala Phe Val Ser Tyr Ser Glu Arg Asp Ala Tyr Trp Val Glu
 645 650 655

Asn Leu Met Val Gln Glu Leu Glu Asn Phe Asn Pro Pro Phe Lys Leu
 660 665 670

Cys Leu His Lys Arg Asp Phe Ile Pro Gly Lys Trp Ile Ile Asp Asn
 675 680 685

Ile Ile Asp Ser Ile Glu Lys Ser His Lys Thr Val Phe Val Leu Ser
 690 695 700

DE 698 38 888 T2 2008.12.11

Glu Asn Phe Val Lys Ser Glu Trp Cys Lys Tyr Glu Leu Asp Phe Ser
705 710 715 720

His Phe Arg Leu Phe Asp Glu Asn Asn Asp Ala Ala Ile Leu Ile Leu
725 730 735

Leu Glu Pro Ile Glu Lys Lys Ala Ile Pro Gln Arg Phe Cys Lys Leu
740 745 750

Arg Lys Ile Met Asn Thr Lys Thr Tyr Leu Glu Trp Pro Met Asp Glu
755 760 765

Ala Gln Arg Glu Gly Phe Trp Val Asn Leu Arg Ala Ala Ile Lys Ser
770 775 780

<210> 13

<211> 811

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

Met Arg Leu Ile Arg Asn Ile Tyr Ile Phe Cys Ser Ile Val Met Thr
1 5 10 15

Ala Glu Gly Asp Ala Pro Glu Leu Pro Glu Glu Arg Glu Leu Met Thr
20 25 30

Asn Cys Ser Asn Met Ser Leu Arg Lys Val Pro Ala Asp Leu Thr Pro
35 40 45

Ala Thr Thr Thr Leu Asp Leu Ser Tyr Asn Leu Leu Phe Gln Leu Gln
50 55 60

Ser Ser Asp Phe His Ser Val Ser Lys Leu Arg Val Leu Ile Leu Cys
65 70 75 80

His Asn Arg Ile Gln Gln Leu Asp Leu Lys Thr Phe Glu Phe Asn Lys
85 90 95

Glu Leu Arg Tyr Leu Asp Leu Ser Asn Asn Arg Leu Lys Ser Val Thr
100 105 110

Trp Tyr Leu Leu Ala Gly Leu Arg Tyr Leu Asp Leu Ser Phe Asn Asp
115 120 125

DE 698 38 888 T2 2008.12.11

Phe Asp Thr Met Pro Ile Cys Glu Glu Ala Gly Asn Met Ser His Leu
 130 135 140

Glu Ile Leu Gly Leu Ser Gly Ala Lys Ile Gln Lys Ser Asp Phe Gln
 145 150 155 160

Lys Ile Ala His Leu His Leu Asn Thr Val Phe Leu Gly Phe Arg Thr
 165 170 175

Leu Pro His Tyr Glu Glu Gly Ser Leu Pro Ile Leu Asn Thr Thr Lys
 180 185 190

Leu His Ile Val Leu Pro Met Asp Thr Asn Phe Trp Val Leu Leu Arg
 195 200 205

Asp Gly Ile Lys Thr Ser Lys Ile Leu Glu Met Thr Asn Ile Asp Gly
 210 215 220

Lys Ser Gln Phe Val Ser Tyr Glu Met Gln Arg Asn Leu Ser Leu Glu
 225 230 235 240

Asn Ala Lys Thr Ser Val Leu Leu Asn Lys Val Asp Leu Leu Trp
 245 250 255

Asp Asp Leu Phe Leu Ile Leu Gln Phe Val Trp His Thr Ser Val Glu
 260 265 270

His Phe Gln Ile Arg Asn Val Thr Phe Gly Gly Lys Ala Tyr Leu Asp
 275 280 285

His Asn Ser Phe Asp Tyr Ser Asn Thr Val Met Arg Thr Ile Lys Leu
 290 295 300

Glu His Val His Phe Arg Val Phe Tyr Ile Gln Gln Asp Lys Ile Tyr
 305 310 315 320

Leu Leu Leu Thr Lys Met Asp Ile Glu Asn Leu Thr Ile Ser Asn Ala
 325 330 335

Gln Met Pro His Met Leu Phe Pro Asn Tyr Pro Thr Lys Phe Gln Tyr
 340 345 350

Leu Asn Phe Ala Asn Asn Ile Leu Thr Asp Glu Leu Phe Lys Arg Thr
 355 360 365

Ile Gln Leu Pro His Leu Lys Thr Leu Ile Leu Asn Gly Asn Lys Leu
 370 375 380

DE 698 38 888 T2 2008.12.11

Glu Thr Leu Ser Leu Val Ser Cys Phe Ala Asn Asn Thr Pro Leu Glu
385 390 395 400

His Leu Asp Leu Ser Gln Asn Leu Leu Gln His Lys Asn Asp Glu Asn
405 410 415

Cys Ser Trp Pro Glu Thr Val Val Asn Met Asn Leu Ser Tyr Asn Lys
420 425 430

Leu Ser Asp Ser Val Phe Arg Cys Leu Pro Lys Ser Ile Gln Ile Leu
435 440 445

Asp Leu Asn Asn Asn Gln Ile Gln Thr Val Pro Lys Glu Thr Ile His
450 455 460

Leu Met Ala Leu Arg Glu Leu Asn Ile Ala Phe Asn Phe Leu Thr Asp
465 470 475 480

Leu Pro Gly Cys Ser His Phe Ser Arg Leu Ser Val Leu Asn Ile Glu
485 490 495

Met Asn Phe Ile Leu Ser Pro Ser Leu Asp Phe Val Gln Ser Cys Gln
500 505 510

Glu Val Lys Thr Leu Asn Ala Gly Arg Asn Pro Phe Arg Cys Thr Cys
515 520 525

Glu Leu Lys Asn Phe Ile Gln Leu Glu Thr Tyr Ser Glu Val Met Met
530 535 540

Val Gly Trp Ser Asp Ser Tyr Thr Cys Glu Tyr Pro Leu Asn Leu Arg
545 550 555 560

Gly Thr Arg Leu Lys Asp Val His Leu His Glu Leu Ser Cys Asn Thr
565 570 575

Ala Leu Leu Ile Val Thr Ile Val Val Ile Met Leu Val Leu Gly Leu
580 585 590

Ala Val Ala Phe Cys Cys Leu His Phe Asp Leu Pro Trp Tyr Leu Arg
595 600 605

Met Leu Gly Gln Cys Thr Gln Thr Trp His Arg Val Arg Lys Thr Thr
610 615 620

Gln Glu Gln Leu Lys Arg Asn Val Arg Phe His Ala Phe Ile Ser Tyr
625 630 635 640

DE 698 38 888 T2 2008.12.11

Ser Glu His Asp Ser Leu Trp Val Lys Asn Glu Leu Ile Pro Asn Leu
645 650 655
Glu Lys Glu Asp Gly Ser Ile Leu Ile Cys Leu Tyr Glu Ser Tyr Phe
660 665 670
Asp Pro Gly Lys Ser Ile Ser Glu Asn Ile Val Ser Phe Ile Glu Lys
675 680 685
Ser Tyr Lys Ser Ile Phe Val Leu Ser Pro Asn Phe Val Gln Asn Glu
690 695 700
Trp Cys His Tyr Glu Phe Tyr Phe Ala His His Asn Leu Phe His Glu
705 710 715 720
Asn Ser Asp His Ile Ile Leu Ile Leu Leu Glu Pro Ile Pro Phe Tyr
725 730 735
Cys Ile Pro Thr Arg Tyr His Lys Leu Lys Ala Leu Leu Glu Lys Lys
740 745 750
Ala Tyr Leu Glu Trp Pro Lys Asp Arg Arg Lys Cys Gly Leu Phe Trp
755 760 765
Ala Asn Leu Arg Ala Ala Ile Asn Val Asn Val Leu Ala Thr Arg Glu
770 775 780
Met Tyr Glu Leu Gln Thr Phe Thr Glu Leu Asn Glu Glu Ser Arg Gly
785 790 795 800
Ser Thr Ile Ser Leu Met Arg Thr Asp Cys Leu
805 810

<210> 14
<211> 3462
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 14

gaatcatcca cgcacctgca gctctgctga gagagtgcaa gccgtggggg tttttagtc 60
atcttcataca ttcatatgag gaaataagtq gtaaaaatcct tggaaataca atgagactca 120
tcagaaacat ttacatattt tggatgtattt ttatgacagc agagggtgtat gctccagagc 180
tgccagaaga aagggaactq atgaccaact gctccaaacat gtctctaaga aaggttccc 240
cagacttgac cccagccaca acgacactgg atttatccta taacccctt tttcaactcc 300
agagttcaga ttttcattttt gtctccaaac tgagagttt gattctatgc cataacagaa 360
ttcaacagct ggatctaaaa acctttgaat tcaacaagga gttaaagatat ttagatttgt 420

aaatctatac cagatgttgtt aacagtggtt tgggtctggg aggttggatt acagggagca 3360
 tttgatttct atgttgtta tttctataat gtttgaatcg tttagaatga atctgtatcc 3420
 cttttataag tagaaaaaaa ataaagatag tttttacagc ct 3462

<210> 15
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 15
 tccccaccagg tatcataaac tgaaa 24

<210> 16
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 16
 ttatagacaa tctgttctca tcagaga 27

<210> 17
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 17
 aaaaagcata ctggaaatgg cccaaaggata ggtgtaaatg 40

<210> 18
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> künstliche Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetischer Linker

<400> 18
 tcagcggtaa gc 12

<210> 19
 <211> 13
 <212> DNA
 <213> künstliche Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetischer Linker

<400> 19

ggccgcttac cgc

13

<210> 20

<211> 11

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetischer Linker

<400> 20

taagcttaac g

11

<210> 21

<211> 19

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetischer Linker

<400> 21

ggccgctaaa gcttatgca

19

<210> 22

<211> 173

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetischer Marker

<400> 22

```

ggtacaccttct gacatcattg taattttaaag catcggtggat attcccgaaaa aagtttttgg 60
atgccattgg ggatttcctc tttagatctg gcgcggcccc aggtccactt cgcatattaa 120
ggtgacgcgt gtggcctcga acaccgagcg accctgcagc gaccgcgaag ctt .      173

```

<210> 23

<211> 11

<212> PRT

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetischer Marker

<400> 23

Gly Arg Ala Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
 1 5 10

<210> 24

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 24

gcgggaagga ttttggtaa 20

<210> 25

<211> 25

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 25

gatcccaact agacaaagac tggtc 25

<210> 26

<211> 33

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 26

tgagagctgc gataaagtcc taggttccca tat 33

<210> 27

<211> 48

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 27

ggattctaat acgactcact ataggcaaa cctgtccctg tgatgtca 48

<210> 28

<211> 48

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 28

ctatgaaatt aaccctcact aaaggaaacg agggcaattt ccacttag 48

<210> 29

<211> 48

DE 698 38 888 T2 2008.12.11

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 29

ggattctaat acgactcact atagggctgg caataaactg gagacact

48

<210> 30

<211> 48

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 30

ctatgaaatt aaccctcact aaaggattg agttgttctt gggttgtt

48

SEQUENZPROTOKOLL

<110> GENENTECH, INC.

<120> MENSCHLICHE TOLL-HOMOLOGE

<130> SJK/FP6335244

<140> EP 05023238.8

<141> 7.10.1998

<150> PCT/US98/21141

<151> 7.10.1998

<150> 09/105.413

<151> 26.6.1998

<150> 60.090.863

<151> 26.6.1998

<150> 60/083.322

<151> 28.4.1998

<150> 60/065.311

<151> 13.11.1997

<150> 60/062.250

<151> 17.10.1997

<160> 30

<170> FastSEQ für Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 1049

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

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

Leu Tyr Leu Gly Gln Asn Cys Tyr Tyr Arg Asn Pro Cys Tyr Val Ser
 180 185 190
 Tyr Ser Ile Glu Lys Asp Ala Phe Leu Asn Leu Thr Lys Leu Lys Val
 195 200 205
 Leu Ser Leu Lys Asp Asn Asn Val Thr Ala Val Pro Thr Val Leu Pro
 210 215 220
 Ser Thr Leu Thr Glu Leu Tyr Leu Tyr Asn Asn Met Ile Ala Lys Ile
 225 230 235 240
 Gln Glu Asp Asp Phe Asn Asn Leu Asn Gln Leu Gln Ile Leu Asp Leu
 245 250 255
 Ser Gly Asn Cys Pro Arg Cys Tyr Asn Ala Pro Phe Pro Cys Ala Pro
 260 265 270
 Cys Lys Asn Asn Ser Pro Leu Gln Ile Pro Val Asn Ala Phe Asp Ala
 275 280 285
 Leu Thr Glu Leu Lys Val Leu Arg Leu His Ser Asn Ser Leu Gln His
 290 295 300
 Val Pro Pro Arg Trp Phe Lys Asn Ile Asn Lys Leu Gln Glu Leu Asp
 305 310 315 320
 Leu Ser Gln Asn Phe Leu Ala Lys Glu Ile Gly Asp Ala Lys Phe Leu
 325 330 335
 His Phe Leu Pro Ser Leu Ile Gln Leu Asp Leu Ser Phe Asn Phe Glu
 340 345 350
 Leu Gln Val Tyr Arg Ala Ser Met Asn Leu Ser Gln Ala Phe Ser Ser
 355 360 365
 Leu Lys Ser Leu Lys Ile Leu Arg Ile Arg Gly Tyr Val Phe Lys Glu
 370 375 380
 Leu Lys Ser Phe Asn Leu Ser Pro Leu His Asn Leu Gln Asn Leu Glu
 385 390 395 400
 Val Leu Asp Leu Gly Thr Asn Phe Ile Lys Ile Ala Asn Leu Ser Met
 405 410 415
 Phe Lys Gln Phe Lys Arg Leu Lys Val Ile Asp Leu Ser Val Asn Lys
 420 425 430
 Ile Ser Pro Ser Gly Asp Ser Ser Glu Val Gly Phe Cys Ser Asn Ala
 435 440 445
 Arg Thr Ser Val Glu Ser Tyr Glu Pro Gln Val Leu Glu Gln Leu His
 450 455 460
 Tyr Phe Arg Tyr Asp Lys Tyr Ala Arg Ser Cys Arg Phe Lys Asn Lys
 465 470 475 480
 Glu Ala Ser Phe Met Ser Val Asn Glu Ser Cys Tyr Lys Tyr Gly Gln
 485 490 495
 Thr Leu Asp Leu Ser Lys Asn Ser Ile Phe Phe Val Lys Ser Ser Asp
 500 505 510
 Phe Gln His Leu Ser Phe Leu Lys Cys Leu Asn Leu Ser Gly Asn Leu
 515 520 525
 Ile Ser Gln Thr Leu Asn Gly Ser Glu Phe Gln Pro Leu Ala Glu Leu
 530 535 540
 Arg Tyr Leu Asp Phe Ser Asn Asn Arg Leu Asp Leu Leu His Ser Thr
 545 550 555 560
 Ala Phe Glu Glu Leu His Lys Leu Glu Val Leu Asp Ile Ser Ser Asn
 565 570 575
 Ser His Tyr Phe Gln Ser Glu Gly Ile Thr His Met Leu Asn Phe Thr
 580 585 590
 Lys Asn Leu Lys Val Leu Gln Lys Leu Met Met Asn Asp Asn Asp Ile
 595 600 605
 Ser Ser Ser Thr Ser Arg Thr Met Glu Ser Glu Ser Leu Arg Thr Leu
 610 615 620
 Glu Phe Arg Gly Asn His Leu Asp Val Leu Trp Arg Glu Gly Asp Asn
 625 630 635 640
 Arg Tyr Leu Gln Leu Phe Lys Asn Leu Leu Lys Leu Glu Glu Leu Asp
 645 650 655
 Ile Ser Lys Asn Ser Leu Ser Phe Leu Pro Ser Gly Val Phe Asp Gly

660	665	670
Met Pro Pro Asn Leu Lys Asn Leu Ser Leu Ala Lys Asn Gly Leu Lys		
675	680	685
Ser Phe Ser Trp Lys Lys Leu Gln Cys Leu Lys Asn Leu Glu Thr Leu		
690	695	700
Asp Leu Ser His Asn Gln Leu Thr Thr Val Pro Glu Arg Leu Ser Asn		
705	710	715
Cys Ser Arg Ser Leu Lys Asn Leu Ile Leu Lys Asn Asn Gln Ile Arg		
725	730	735
Ser Leu Thr Lys Tyr Phe Leu Gln Asp Ala Phe Gln Leu Arg Tyr Leu		
740	745	750
Asp Leu Ser Ser Asn Lys Ile Gln Met Ile Gln Lys Thr Ser Phe Pro		
755	760	765
Glu Asn Val Leu Asn Asn Leu Lys Met Leu Leu Leu His His Asn Arg		
770	775	780
Phe Leu Cys Thr Cys Asp Ala Val Trp Phe Val Trp Trp Val Asn His		
785	790	795
Thr Glu Val Thr Ile Pro Tyr Leu Ala Thr Asp Val Thr Cys Val Gly		
805	810	815
Pro Gly Ala His Lys Gly Gln Ser Val Ile Ser Leu Asp Leu Tyr Thr		
820	825	830
Cys Glu Leu Asp Leu Thr Asn Leu Ile Leu Phe Ser Leu Ser Ile Ser		
835	840	845
Val Ser Leu Phe Leu Met Val Met Met Thr Ala Ser His Leu Tyr Phe		
850	855	860
Trp Asp Val Trp Tyr Ile Tyr His Phe Cys Lys Ala Lys Ile Lys Gly		
865	870	875
Tyr Gln Arg Leu Ile Ser Pro Asp Cys Cys Tyr Asp Ala Phe Ile Val		
885	890	895
Tyr Asp Thr Lys Asp Pro Ala Val Thr Glu Trp Val Leu Ala Glu Leu		
900	905	910
Val Ala Lys Leu Glu Asp Pro Arg Glu Lys His Phe Asn Leu Cys Leu		
915	920	925
Glu Glu Arg Asp Trp Leu Pro Gly Gln Pro Val Leu Glu Asn Leu Ser		
930	935	940
Gln Ser Ile Gln Leu Ser Lys Lys Thr Val Phe Val Met Thr Asp Lys		
945	950	955
Tyr Ala Lys Thr Glu Asn Phe Lys Ile Ala Phe Tyr Leu Ser His Gln		
965	970	975
Arg Leu Met Asp Glu Lys Val Asp Val Ile Ile Leu Ile Phe Leu Glu		
980	985	990
Lys Pro Phe Gln Lys Ser Lys Phe Leu Gln Leu Arg Lys Arg Leu Cys		
995	1000	1005
Gly Ser Ser Val Leu Glu Trp Pro Thr Asn Pro Gln Ala His Pro Tyr		
1010	1015	1020
Phe Trp Gln Cys Leu Lys Asn Ala Leu Ala Thr Asp Asn His Val Ala		
1025	1030	1035
Tyr Ser Gln Val Phe Lys Glu Thr Val		
1045		

<210> 2

<211> 3283

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

cccatctcaa gctgatcttg gcacctctca tgctctgctc tcttcaacca gacctctaca	60
tccatggaaatggtttggaaagaagactaaaaatggtg ttccaatgt ggacactgaa gagacaaatt	120
tttatccctt ttaacataat ctaatccc aaactccttg gggcttagatg gtttcctaaa	180
actctgccct gtgatgtcac tctggatgtt ccaaagaacc atgtgatcgt ggactgcaca	240
gacaaggatt tgacagaaat tcctggaggt attccccacga acaccacgaa cctcaccctc	300

accattaacc acataaccaga catctcccc ggcgtccccc acagactgga ccatctggta	360
gagatcgatt tcagatgcaa ctgtgtaccc attccactgg ggtcaaaaaaa caacatgtgc	420
atcaagaggc tgcagattaa acccagaagc ttttagtggac tcacttattt aaaatccctt	480
tacctggatg gaaaccagct actagagata ccgcagggcc tcccgccctag cttacagctt	540
ctcagccctg aggccaacaa catctttcc atcagaaaag agaatctaagc agaactggcc	600
aacatagaaa tactctaccc gggccaaaac tgttattatc gaaatccttg ttatgttca	660
tattcaatag agaaagatgc ctccctaaac ttgacaaaagt taaaagtgc ctccctgaaa	720
gataacaatg tcacagccgt ccctactgtt ttgccccatcta cttaacaga actatatctc	780
tacaacaaca tgattgcaaa aatccaagaa gatgattta ataacctcaa ccaattacaa	840
attcttgacc taagtggaaa ttgccccctgt tggtataatg ccccatattcc ttgtgcgcgg	900
tgtaaaaata attctccctt acagatccct gtaaatgcct ttgatgcgc gacagaatta	960
aaagttttac gtctacacag taactctt cagcatgtgc ccccaagatg gtttaagaac	1020
atcaacaaac tccaggaact ggatctgtcc caaaacttct tggccaaaga aattggggat	1080
gctaaatttc tgcattttc cccagccctc atccaaattgg atctgtctt caattttgaa	1140
cttcaggctc atcgtgcacat tatgaatcta tcacaagcat ttcttcaact gaaaagcctg	1200
aaaattctgc ggatcagagg atatgtctt aaagagttga aaagctttaa cctctcgcca	1260
ttacataatc ttcaaaaatct tgaagttctt gatctggca ctaactttat aaaaattgct	1320
aacctcagca tgtttaaaca attaaaaaaga ctgaaaagtca tagatcttc agtgaataaa	1380
atatcacctt caggagattc aagtgaagtt ggcttcgtc caaatgcac aacttctgtt	1440
gaaagttatg aaccccaggt ccttggacaa ttacattatt tcagatatga taagttatgca	1500
aggagttgca gattcaaaaaa caaagaggct tcttcatgt ctgttaatgaa aagctgctac	1560
aagtatggc agaccttggc tctaaatgaaa aatagtatat ttttgcctaa gtcctctgtat	1620
tttcagcatc tttcttcctt caaatgcctg aatctgtcag gaaatctcat tagccaaact	1680
cttaatggca gtgaatttca accttttagca gagctgagat atttggactt ctccaaacac	1740
cggcttgatt tactccatc aacagcattt gaagagcttc acaaacttggc agtttggat	1800
ataagcagta atagccatc tttcaatca gaagggatca ctcatatgc aaactttacc	1860
aagaacctaa aggttctgca gaaactgatg atgaacgaca atgacatctc ttccctccacc	1920
agcaggacca tggagagtgta gtctcttgc actctggat tcagagggaaa tcacttagat	1980
gttttatgga gagaagggtga taacagatac ttacaattat tcaagaatct gctaaaatta	2040
gaggaatttag acatctctaa aaattcccta agtttcttgc cttctggagt ttttgatgg	2100
atgcctccaa atctaaagaa tctcttttgc gccaaaaatg ggctcaaattc ttcagttgg	2160
aagaaactcc agtgtctaa gaacctggaa actttggacc tcagccacaa ccaactgacc	2220
actgtccctg agagattatc caactgttcc agaaggctca agaactgtat tcttaagaat	2280
aatcaaatca ggagtctgac gaagtatccc ctacaagatg cttccctgtt gcgatatctg	2340
gatctcagct caaataaaat ccagatgtc caaaagacca gcttcccaga aatgtcctc	2400
aacaatctga agatgttgc tttgcattcat aatcggtttc tgcacccctg tgatgtgt	2460
tggttgtct ggtgggtttaa ccatacgagg gtgactattc cttacctggc cacagatgt	2520
acttgtgtgg ggccaggagc acacaagggc caaaggtgttgc tctccctggc tctgtacacc	2580
tgtgatgttgc atctgactaa cctgatttgc ttcttactt ccatatctgt atctctctt	2640
ctcatggta tgatgacacg aagtccatc tattttctgg atgtgtggta tatttaccat	2700
ttctgttaagg ccaagataaa ggggtatcag cgtctaatat caccagactg ttgctatgt	2760
gcttttattt tttatgttgc taaagacccca gctgtgaccg agtggggttt ggctgagctg	2820
gtggccaaac tggaaagaccc aagagagaaa cattttattat tttatgttgc gaaagggac	2880
tggttaccag ggcagccagt tctggaaaac ctttcccaga gcatacagct tagaaaaag	2940
acagtgtttt tgatgacacg caagtatgca aagactgaaa attttaaatg agcattttac	3000
ttgtcccatc agaggctcat ggatgaaaaa gttgtatgttgc ttatcttgc atttcttgc	3060
aagcccttc agaagtccaa gttcccttccag ctccggaaaa ggctctgtt gaggctgtc	3120
cttgagtggc caacaaaccc gcaagctcac ccatacttctt ggcagtgttca aaagaacgcc	3180
ctggccacag acaatcatgt ggcctatagt caggtgttca aggaaacggc ctagcccttc	3240
tttgcacaaac acaactgcct agtttaccaa ggagaggctt ggc	3283

<210> 3

<211> 1041

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Met Glu Asn Met Phe Leu Gln Ser Ser Met Leu Thr Cys Ile Phe Leu			
1	5	10	15
L Leu Ile Ser Gly Ser Cys Glu Leu Cys Ala Glu Glu Asn Phe Ser Arg			
20	25	30	

Ser Tyr Pro Cys Asp Glu Lys Lys Gln Asn Asp Ser Val Ile Ala Glu
 35 40 45
 Cys Ser Asn Arg Arg Leu Gln Glu Val Pro Gln Thr Val Gly Lys Tyr
 50 55 60
 Val Thr Glu Leu Asp Leu Ser Asp Asn Phe Ile Thr His Ile Thr Asn
 65 70 75 80
 Glu Ser Phe Gln Gly Leu Gln Asn Leu Thr Lys Ile Asn Leu Asn His
 85 90 95
 Asn Pro Asn Val Gln His Gln Asn Gly Asn Pro Gly Ile Gln Ser Asn
 100 105 110
 Gly Leu Asn Ile Thr Asp Gly Ala Phe Leu Asn Leu Lys Asn Leu Arg
 115 120 125
 Glu Leu Leu Leu Glu Asp Asn Gln Leu Pro Gln Ile Pro Ser Gly Leu
 130 135 140
 Pro Glu Ser Leu Thr Glu Leu Ser Leu Ile Gln Asn Asn Ile Tyr Asn
 145 150 155 160
 Ile Thr Lys Glu Gly Ile Ser Arg Leu Ile Asn Leu Lys Asn Leu Tyr
 165 170 175
 Leu Ala Trp Asn Cys Tyr Phe Asn Lys Val Cys Glu Lys Thr Asn Ile
 180 185 190
 Glu Asp Gly Val Phe Glu Thr Leu Thr Asn Leu Glu Leu Leu Ser Leu
 195 200 205
 Ser Phe Asn Ser Leu Ser His Val Pro Pro Lys Leu Pro Ser Ser Leu
 210 215 220
 Arg Lys Leu Phe Leu Ser Asn Thr Gln Ile Lys Tyr Ile Ser Glu Glu
 225 230 235 240
 Asp Phe Lys Gly Leu Ile Asn Leu Thr Leu Leu Asp Leu Ser Gly Asn
 245 250 255
 Cys Pro Arg Cys Phe Asn Ala Pro Phe Pro Cys Val Pro Cys Asp Gly
 260 265 270
 Gly Ala Ser Ile Asn Ile Asp Arg Phe Ala Phe Gln Asn Leu Thr Gln
 275 280 285
 Leu Arg Tyr Leu Asn Leu Ser Ser Thr Ser Leu Arg Lys Ile Asn Ala
 290 295 300
 Ala Trp Phe Lys Asn Met Pro His Leu Lys Val Leu Asp Leu Glu Phe
 305 310 315 320
 Asn Tyr Leu Val Gly Glu Ile Val Ser Gly Ala Phe Leu Thr Met Leu
 325 330 335
 Pro Arg Leu Glu Ile Leu Asp Leu Ser Phe Asn Tyr Ile Lys Gly Ser
 340 345 350
 Tyr Pro Gln His Ile Asn Ile Ser Arg Asn Phe Ser Lys Leu Leu Ser
 355 360 365
 Leu Arg Ala Leu His Leu Arg Gly Tyr Val Phe Gln Glu Leu Arg Glu
 370 375 380
 Asp Asp Phe Gln Pro Leu Met Gln Leu Pro Asn Leu Ser Thr Ile Asn
 385 390 395 400
 Leu Gly Ile Asn Phe Ile Lys Gln Ile Asp Phe Lys Leu Phe Gln Asn
 405 410 415
 Phe Ser Asn Leu Glu Ile Ile Tyr Leu Ser Glu Asn Arg Ile Ser Pro
 420 425 430
 Leu Val Lys Asp Thr Arg Gln Ser Tyr Ala Asn Ser Ser Ser Phe Gln
 435 440 445
 Arg His Ile Arg Lys Arg Arg Ser Thr Asp Phe Glu Phe Asp Pro His
 450 455 460
 Ser Asn Phe Tyr His Phe Thr Arg Pro Leu Ile Lys Pro Gln Cys Ala
 465 470 475 480
 Ala Tyr Gly Lys Ala Leu Asp Leu Ser Leu Asn Ser Ile Phe Phe Ile
 485 490 495
 Gly Pro Asn Gln Phe Glu Asn Leu Pro Asp Ile Ala Cys Leu Asn Leu
 500 505 510
 Ser Ala Asn Ser Asn Ala Gln Val Leu Ser Gly Thr Glu Phe Ser Ala

515	520	525
Ile Pro His Val Lys Tyr Leu Asp Leu Thr Asn Asn Arg Leu Asp Phe		
530	535	540
Asp Asn Ala Ser Ala Leu Thr Glu Leu Ser Asp Leu Glu Val Leu Asp		
545	550	555
Leu Ser Tyr Asn Ser His Tyr Phe Arg Ile Ala Gly Val Thr His His		560
565	570	575
Leu Glu Phe Ile Gln Asn Phe Thr Asn Leu Lys Val Leu Asn Leu Ser		
580	585	590
His Asn Asn Ile Tyr Thr Leu Thr Asp Lys Tyr Asn Leu Glu Ser Lys		
595	600	605
Ser Leu Val Glu Leu Val Phe Ser Gly Asn Arg Leu Asp Ile Leu Trp		
610	615	620
Asn Asp Asp Asp Asn Arg Tyr Ile Ser Ile Phe Lys Gly Leu Lys Asn		
625	630	635
Leu Thr Arg Leu Asp Leu Ser Leu Asn Arg Leu Lys His Ile Pro Asn		640
645	650	655
Glu Ala Phe Leu Asn Leu Pro Ala Ser Leu Thr Glu Leu His Ile Asn		
660	665	670
Asp Asn Met Leu Lys Phe Phe Asn Trp Thr Leu Leu Gln Gln Phe Pro		
675	680	685
Arg Leu Glu Leu Leu Asp Leu Arg Gly Asn Lys Leu Leu Phe Leu Thr		
690	695	700
Asp Ser Leu Ser Asp Phe Thr Ser Ser Leu Arg Thr Leu Leu Leu Ser		
705	710	715
His Asn Arg Ile Ser His Leu Pro Ser Gly Phe Leu Ser Glu Val Ser		
725	730	735
Ser Leu Lys His Leu Asp Leu Ser Ser Asn Leu Leu Lys Thr Ile Asn		
740	745	750
Lys Ser Ala Leu Glu Thr Lys Thr Thr Lys Leu Ser Met Leu Glu		
755	760	765
Leu His Gly Asn Pro Phe Glu Cys Thr Cys Asp Ile Gly Asp Phe Arg		
770	775	780
Arg Trp Met Asp Glu His Leu Asn Val Lys Ile Pro Arg Leu Val Asp		
785	790	795
Val Ile Cys Ala Ser Pro Gly Asp Gln Arg Gly Lys Ser Ile Val Ser		
805	810	815
Leu Glu Leu Thr Thr Cys Val Ser Asp Val Thr Ala Val Ile Leu Phe		
820	825	830
Phe Phe Thr Phe Phe Ile Thr Thr Met Val Met Leu Ala Ala Leu Ala		
835	840	845
His His Leu Phe Tyr Trp Asp Val Trp Phe Ile Tyr Asn Val Cys Leu		
850	855	860
Ala Lys Val Lys Gly Tyr Arg Ser Leu Ser Thr Ser Gln Thr Phe Tyr		
865	870	875
Asp Ala Tyr Ile Ser Tyr Asp Thr Lys Asp Ala Ser Val Thr Asp Trp		
885	890	895
Val Ile Asn Glu Leu Arg Tyr His Leu Glu Glu Ser Arg Asp Lys Asn		
900	905	910
Val Leu Leu Cys Leu Glu Glu Arg Asp Trp Asp Pro Gly Leu Ala Ile		
915	920	925
Ile Asp Asn Leu Met Gln Ser Ile Asn Gln Ser Lys Lys Thr Val Phe		
930	935	940
Val Leu Thr Lys Lys Tyr Ala Lys Ser Trp Asn Phe Lys Thr Ala Phe		
945	950	955
Tyr Leu Ala Leu Gln Arg Leu Met Asp Glu Asn Met Asp Val Ile Ile		960
965	970	975
Phe Ile Leu Leu Glu Pro Val Leu Gln His Ser Gln Tyr Leu Arg Leu		
980	985	990
Arg Gln Arg Ile Cys Lys Ser Ser Ile Leu Gln Trp Pro Asp Asn Pro		
995	1000	1005

Lys Ala Glu Gly Leu Phe Trp Gln Thr Leu Arg Asn Val Val Leu Thr
 1010 1015 1020
 Glu Asn Asp Ser Arg Tyr Asn Asn Met Tyr Val Asp Ser Ile Lys Gln
 1025 1030 1035 1040
 Tyr

<210> 4
<211> 4199
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 4

gggtaccatt	ctgcgctgct	gcaagttacg	gaataaaaaa	ttagaacaac	agaaacatgg	60
aaaacatgtt	ccttcagtgc	tcaatgctga	cctgcatttt	cctgctaata	tctggttcct	120
gtgagttatg	cgccgaagaa	aattttctta	gaagctatcc	ttgtgatgag	aaaaagcaaa	180
atgactcagt	tattgcagag	tgtagcaatc	gtcgactaca	gaaagttccc	caaacgggtgg	240
gcaaataatgt	gacagaacta	gacctgtctg	ataatttcat	cacacacata	acgaatgaat	300
cattcaagg	gctgaaaat	ctcaactaaa	taaatctaaa	ccacaacccc	aatgtacagc	360
accagaacgg	aaatcccggt	atacaatcaa	atggcttcaa	tatcacagac	ggggcattcc	420
tcaacctaaa	aaacctaagg	gagttactgc	ttgaagacaa	ccagttaccc	caaataccct	480
ctggttgcc	agagtcttg	acagaactta	gtctaattca	aaacaatata	tacaacataa	540
ctaaagaggg	catttcaaga	cttataaact	tgaaaaatct	ctatttggcc	tggaactgct	600
attttaacaa	agtttgcgag	aaaactaaca	tagaagatgg	agtatgtaa	acgctgacaa	660
atttggagtt	gctatcaacta	tctttcaatt	ctcttcaca	cgtgccaccc	aaactgccaa	720
gctccctacg	caaactttt	ctgagcaaca	cccagatcaa	atacattatgt	gaagaagatt	780
tcaagggatt	gataaattta	acattactag	atthaagcgg	gaactgtccg	aggtgcttca	840
atgccccatt	tccatgcgtg	ctttgtatg	gtgggtcttc	aattaatata	gatcgtttg	900
cttttcaaaa	cttgacccaa	cttcgatacc	taaacctctc	tagcacttcc	ctcaggaaga	960
ttaatgctgc	ctggtttaaa	aatatgcctc	atctgaaggt	gctggatctt	gaattcaact	1020
attttagtggg	agaaaatagtc	tctggggcat	tttaacgat	gctgcccgc	ttagaaatac	1080
ttgacttgc	ttttactat	ataaaagggga	gttattccaca	gcatattaat	atttccagaa	1140
acttctctaa	actttgtct	ctacgggcat	tgcatttaag	aggttatgtg	ttccaggaac	1200
tcagagaaga	tgatttccag	cccctgatgc	agcttccaaa	cttatcgact	atcaacttgg	1260
gtattaattt	tattaagcaa	atcgatttca	aactttcca	aaatttctcc	aatctggaaa	1320
ttatattactt	gtcagaaaac	agaatatcac	cgttggtaaa	agatacccg	cagagttatg	1380
caaatagttc	ctctttcaa	cgcatatatcc	ggaaacgacg	ctcaacagat	tttgagtttg	1440
acccacattc	gaacttttat	catttcaccc	gtccttaat	aaagccacaa	tgtgctgctt	1500
atgaaaagc	cttagattta	agcctaaca	gtattttctt	cattggcca	aaccaatttg	1560
aaaatctcc	tgacattgcc	tgtttaaattc	tgtctgaaa	tagcaatgt	caagtgttaa	1620
gtgaaactga	atttcagcc	attcctcatg	tcaaataattt	ggatttgaca	aacaatagac	1680
tagacttga	taatgctagt	gctctactg	aattgtccga	cttggaaagt	ctagatctca	1740
gctataattc	acactatttc	agaatagcag	gcgtAACACA	tcatctagaa	tttattcaaa	1800
atttcacaaaa	tctaaaagtt	ttaaaacttga	gccacaacaa	catttatact	ttaacagata	1860
agtataaccc	ggaaagcaag	tccctggtag	aattagttt	cagtggcaat	cgccttgaca	1920
ttttgtggaa	tgatgtgac	aacaggtata	tctccatttt	caaaggcttc	aagaatctga	1980
cacgtctgg	tttattccctt	aataggctga	agcacatccc	aatgaagca	ttccttaatt	2040
tgcacggcag	tctcactgaa	ctacatataaa	atgataatat	gttAAAGTTT	tttactggaa	2100
cattactcca	gcagttccct	cgtctcgagt	tgcttgactt	acgtggaaac	aaactactct	2160
ttttaactga	tagcctatct	gactttacat	tttcccttcg	gacactgctg	ctgagtctata	2220
acaggatttc	ccacccatccc	tctggctttc	tttctgaagt	cagtagtctg	aagcacctcg	2280
attnaagttc	caatctgcta	aaaacaatca	acaaatccgc	acttggaaact	aagaccacca	2340
ccaaattatc	tatgtggaa	ctacacggaa	accccttga	atgcacctgt	gacattggag	2400
attnccgaag	atggatggat	gaacatctga	atgtcaaaat	tcccagactg	gtagatgtca	2460
tttgtggccag	tcctggggat	caaaggggaa	agagtattgt	gagtctggag	ctaacaactt	2520
gtgtttcaga	tgtcactgca	gtgatattat	ttttcttcac	gttcttatac	accaccatgg	2580
ttatgttggc	tgccctggct	caccatttgt	tttactggaa	ttttgggtt	atatataatg	2640
tgtgttttagc	taaggtaaaa	ggctacaggt	ctcttccac	atcccaact	ttctatgtatg	2700
cttacatttc	ttatgacacc	aaagatgcct	ctgttactga	ctgggtgata	aatgagctgc	2760
gctaccaccc	tgaagagagc	cgagacaaaa	acgttctcct	ttgtctagag	gagagggatt	2820
gggacccggg	attggccatc	atcgacaacc	tcatgcagag	catcaaccaa	agcaagaaaa	2880

cagtatttgt tttaaccaa aaatatgcaa aaagctggaa cttaaaaaca gcttttact	2940
tggcttgcg gaggcta atg gatgagaaca tggatgtat tatatttac ctgctggagc	3000
cagtgttaca gcattctcg tatttgaggc tacggcagcg gatctgtat agctccatcc	3060
tccagtggcc tgacaacccg aaggcagaag gcttgggg gcaaactctg agaaatgtgg	3120
tcttgactga aaatgattca cgtataaca atatgtatgt cgattccatt aagcaatact	3180
aactgacgtt aagtcatgtat ttgcgc cat aataaagatg caaaggaatg acatttctgt	3240
atttagttatc tattgctatg taacaaatta tcccaaaact tagtgggat aaacaacaca	3300
tttgctggcc cacagtttt gagggtcagg agtccaggcc cagcataact gggcctctg	3360
ctcagggtgt ctcagaggct gcaatgtagg tggttaccat agacataggc atcaactgggg	3420
tcacactcat gtgggtttt tctggattca attccctctg ggctattggc caaaggctat	3480
actcatgtaa gccatgcgag cctctccac aaggcagctt gcttcattcag agctagcaaa	3540
aaagagaggt tgcttagcaag atgaagtca aatctttgtt aatcgaatca aaaaagtgt	3600
atctcatcac ttggccata ttctattttt tagaagtaaa ccacaggccc caccagctcc	3660
atgggagtga ccacccctcag ccaggaaaaa cagctgaaga ccaagatggt gagctctgtat	3720
tgcttcagg tggcatcaac tattttccct tgactgtgt cctgggatgg cctgcttatct	3780
tgatgataga ttgtaatat caggaggcag ggatcactgt ggaccatctt agcagttgac	3840
ctaacacatc ttctttcaat tatctaagaa cttttgccac tgtactaat ggtcctaata	3900
ttaagctgtt gtttatattt atcatatatac tatggctaca tggttatattt atgctgtgg	3960
tgcgttcggg tttatttaca gttgctttt caaatattt ctgtaacatt tgacttctaa	4020
ggtttagatg ccatttaaga actgagatgg atagctttt aagcatctt tacttcttac	4080
catttttaa aagtatgcag ctaaattcga agctttggt ctatattgtt aattgccatt	4140
gctgtaaatc tttaaatgaa tgaataaaaaa tgtttcattt tacaaaaaaaaaaaaaaa	4199

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

taaagaccca gctgtgaccg

20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 6

atccatgagc ctctgtatggg

20

<210> 7

<211> 45

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

atttatgtct cgaggaaagg gactggttac cagggcagcc agttc

45

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 8

gccgagacaa aaacgttctc c

21

<210> 9

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 9

catccatgtt ctcattcatt agcc

24

<210> 10

<211> 46

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 10

tcgacaacct catgcagagc atcaacccaaa gcaagaaaaac agtatt

46

<210> 11

<211> 2602

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 11

gttatgccta	gaaaacattt	ctcaagaatt	agaattacga	tatgctgtca	aacacaatga	60
cttatgtaa	cctcttttat	tttaggttg	aagcaactgga	caatgccaca	tactttgtgg	120
atggtgtgg	tcttgggggt	catcatcagc	ctctccaagg	aagaatccctc	caatcaggct	180
tctctgtctt	gtgaccgcaa	tggtatctgc	aaggcagct	caggatcttt	aaactccatt	240
ccctcagggc	tcacagaagc	tgtaaaaagc	cttgacctgt	ccaacaacag	gatcacctac	300
attagcaaca	gtgacctaca	gaggtgtgtg	aaccccccagg	ctctgggtgt	gacatccaat	360
ggaattaaca	caatagagga	agattctttt	tcttcctgg	gcagtcttga	acatttagac	420
ttatcctata	attacttatac	taatttatcg	tcttcctgg	tcaagccccct	ttcttcttta	480
acattcttaa	acttactggg	aaatccttac	aaaacccctag	gggaaacatc	tctttttct	540
catctcacaa	aattgcaaat	cctgagagtg	ggaaatatgg	acacccatc	taagattcaa	600
agaaaagatt	ttgctggact	taccccttct	gaggaacttg	agattgtatgc	ttcagatcta	660
cagagctatg	agccaaaaaag	tttgaagtca	attcagaatg	taagtcatct	gatccatcat	720
atgaagcagc	atattttact	gctggagatt	ttttagatg	ttacaagttc	cgtggatgt	780
ttggaaactgc	gagatactga	tttggacact	ttccattttt	cagaactatc	cactgggtaa	840
acaaattcat	tgattaaaaaa	gtttacattt	agaaatgtga	aaatcaccga	tgaaagttt	900
tttcaggtta	tgaaaactttt	gaatcagatt	tctggattgt	tagaattaga	gtttgatgac	960
tgtaccctta	atggaggttg	taatttaga	gcatctgata	atgacagagt	tatagatcca	1020
ggtaaaagtgg	aaacgttaac	aatccggagg	ctgcataatc	caaggtttta	cttattttat	1080
gatctgagca	ctttatattc	acttacagaa	agagttaaaa	gaatcacagt	agaaaacagt	1140
aaagttttc	tggtcccttg	tttacttca	caacattaa	aatcattaga	atacttggat	1200
ctcagtgaaa	attttagtgg	tgaagaatac	ttgaaaaatt	cagcctgtga	ggatgcctgg	1260
ccctctctac	aaactttaat	tttaaggcaa	aatcatttgg	catcatttgg	aaaaaccgga	1320
gagactttgc	tcactctgaa	aaacttgact	aacattgata	tcaagaaat	tagttttcat	1380
tctatgcctg	aaacttgtca	gtggccagaa	aagatgaaat	atttgaactt	atccagcaca	1440
cgaatacaca	gtgtaacagg	ctgcattccc	aagacactgg	aaattttaga	tgttagcaac	1500
aacaatctca	atttattttc	tttgaatttg	ccgcaactca	aagaacttta	tatttccaga	1560
aataagttga	tgactctacc	agatgcctcc	ctcttaccca	tgttactagt	atgaaaatc	1620
agtaggaatg	caataactac	gtttcttaag	gagcaacttg	actcattca	cacactgaag	1680
actttggaaag	ctgggtggca	taacttcatt	tgctctgtg	aatttccttc	cttcactcag	1740
gaggcagcaag	cactggccaa	agtcttgatt	gattggccag	caaattacct	gtgtgactct	1800
ccatccccatg	tgcgtggcca	gcagggttcag	gatgtccgccc	tctcggtgtc	ggaatgtcac	1860
aggacagcac	tgggtctgg	catgtgtgt	gctctgtcc	tgctgatct	gctcacgggg	1920
gtcctgtgcc	accgtttcca	tggcctgtgg	tatataaaaa	tgtatgtggc	ctggctccag	1980
gccaaaagga	agccccagggaa	agctcccagc	aggaacatct	gctatgtatgc	atttggttct	2040
tacagtggc	gggatccctaa	ctgggtggag	aacctttagg	tccaggagct	ggagaacttc	2100
aatccccctt	tcaagttgtg	tcttcataag	cgggacttca	ttccctggcaa	gtggatcatt	2160
gacaatatac	ttgactccat	tgaaaagagc	cacaaaactg	tctttgtgt	ttctgaaaac	2220
tttgtgaaga	gtgagttgtg	caagtatgaa	ctggacttct	cccattttcg	tcttttgat	2280
gagaacaatg	atgctccat	tctcatttctt	ctggagccca	tttgagaaaaaa	agccattccc	2340
cagcgcttct	gcaagctgctg	gaagataatg	aacaccaaga	cctacccatg	gtggcccatg	2400
gacggaggctc	agcgggaagg	attttgggtt	aatctgagag	ctgcgataaa	gtccttaggtt	2460
cccatatata	agaccagtct	ttgtcttagtt	gggatcttta	tgtcaactagt	tatagttaaag	2520
ttcattcaga	cataattata	taaaaaactac	gtggatgtac	cgtcatttga	ggacttgctt	2580
actaaaacta	caaaaacttca	aa				2602

<210> 12
<211> 784
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 12

Met	Pro	His	Thr	Leu	Trp	Met	Val	Trp	Val	Leu	Gly	Val	Ile	Ile	Ser
1				5					10						15
Leu	Ser	Lys	Glu	Glu	Ser	Ser	Asn	Gln	Ala	Ser	Leu	Ser	Cys	Asp	Arg
				20					25						30
Asn	Gly	Ile	Cys	Lys	Gly	Ser	Ser	Gly	Ser	Leu	Asn	Ser	Ile	Pro	Ser
				35					40						45
Gly	Leu	Thr	Glu	Ala	Val	Lys	Ser	Leu	Asp	Leu	Ser	Asn	Asn	Arg	Ile
				50					55						60
Thr	Tyr	Ile	Ser	Asn	Ser	Asp	Leu	Gln	Arg	Cys	Val	Asn	Leu	Gln	Ala
				65					70						80
Leu	Val	Leu	Thr	Ser	Asn	Gly	Ile	Asn	Thr	Ile	Glu	Glu	Asp	Ser	Phe
				85					90						95
Ser	Ser	Leu	Gly	Ser	Leu	Glu	His	Leu	Asp	Leu	Ser	Tyr	Asn	Tyr	Leu
				100					105						110
Ser	Asn	Leu	Ser	Ser	Ser	Trp	Phe	Lys	Pro	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Phe
				115					120						125
Leu	Asn	Leu	Leu	Gly	Asn	Pro	Tyr	Lys	Thr	Leu	Gly	Glu	Thr	Ser	Leu
				130					135						140
Phe	Ser	His	Leu	Thr	Lys	Leu	Gln	Ile	Leu	Arg	Val	Gly	Asn	Met	Asp
				145					150						160
Thr	Phe	Thr	Lys	Ile	Gln	Arg	Lys	Asp	Phe	Ala	Gly	Leu	Thr	Phe	Leu
				165					170						175
Glu	Glu	Leu	Glu	Ile	Asp	Ala	Ser	Asp	Leu	Gln	Ser	Tyr	Glu	Pro	Lys
				180					185						190
Ser	Leu	Lys	Ser	Ile	Gln	Asn	Val	Ser	His	Leu	Ile	Leu	His	Met	Lys
				195					200						205
Gln	His	Ile	Leu	Leu	Leu	Glu	Ile	Phe	Val	Asp	Val	Thr	Ser	Ser	Val
				210					215						220
Glu	Cys	Leu	Glu	Leu	Arg	Asp	Thr	Asp	Leu	Asp	Thr	Phe	His	Phe	Ser
				225					230						240
Glu	Leu	Ser	Thr	Gly	Glu	Thr	Asn	Ser	Leu	Ile	Lys	Lys	Phe	Thr	Phe
				245					250						255
Arg	Asn	Val	Lys	Ile	Thr	Asp	Glu	Ser	Leu	Phe	Gln	Val	Met	Lys	Leu
				260					265						270
Leu	Asn	Gln	Ile	Ser	Gly	Leu	Leu	Glu	Leu	Glu	Phe	Asp	Asp	Cys	Thr
				275					280						285
Leu	Asn	Gly	Val	Gly	Asn	Phe	Arg	Ala	Ser	Asp	Asn	Asp	Arg	Val	Ile
				290					295						300
Asp	Pro	Gly	Lys	Val	Glu	Thr	Leu	Thr	Ile	Arg	Arg	Leu	His	Ile	Pro
				305					310						320
Arg	Phe	Tyr	Leu	Phe	Tyr	Asp	Leu	Ser	Thr	Leu	Tyr	Ser	Leu	Thr	Glu
				325					330						335
Arg	Val	Lys	Arg	Ile	Thr	Val	Glu	Asn	Ser	Lys	Val	Phe	Leu	Val	Pro
				340					345						350
Cys	Leu	Leu	Ser	Gln	His	Leu	Lys	Ser	Leu	Glu	Tyr	Leu	Asp	Leu	Ser
				355					360						365
Glu	Asn	Leu	Met	Val	Glu	Glu	Tyr	Leu	Lys	Asn	Ser	Ala	Cys	Glu	Asp
				370					375						380
Ala	Trp	Pro	Ser	Leu	Gln	Thr	Leu	Ile	Leu	Arg	Gln	Asn	His	Leu	Ala
				385					390						400
Ser	Leu	Glu	Lys	Thr	Gly	Glu	Thr	Leu	Leu	Thr	Leu	Lys	Asn	Leu	Thr
				405					410						415
Asn	Ile	Asp	Ile	Ser	Lys	Asn	Ser	Phe	His	Ser	Met	Pro	Glu	Thr	Cys
				420					425						430
Gln	Trp	Pro	Glu	Lys	Met	Lys	Tyr	Leu	Asn	Leu	Ser	Ser	Thr	Arg	Ile

435	440	445
His Ser Val Thr Gly Cys Ile Pro Lys Thr Leu Glu Ile Leu Asp Val		
450	455	460
Ser Asn Asn Asn Leu Asn Leu Phe Ser Leu Asn Leu Pro Gln Leu Lys		
465	470	475
Glu Leu Tyr Ile Ser Arg Asn Lys Leu Met Thr Leu Pro Asp Ala Ser		
485	490	495
Leu Leu Pro Met Leu Leu Val Leu Lys Ile Ser Arg Asn Ala Ile Thr		
500	505	510
Thr Phe Ser Lys Glu Gln Leu Asp Ser Phe His Thr Leu Lys Thr Leu		
515	520	525
Glu Ala Gly Gly Asn Asn Phe Ile Cys Ser Cys Glu Phe Leu Ser Phe		
530	535	540
Thr Gln Glu Gln Gln Ala Leu Ala Lys Val Leu Ile Asp Trp Pro Ala		
545	550	555
Asn Tyr Leu Cys Asp Ser Pro Ser His Val Arg Gly Gln Gln Val Gln		
565	570	575
Asp Val Arg Leu Ser Val Ser Glu Cys His Arg Thr Ala Leu Val Ser		
580	585	590
Gly Met Cys Cys Ala Leu Phe Leu Leu Ile Leu Leu Thr Gly Val Leu		
595	600	605
Cys His Arg Phe His Gly Leu Trp Tyr Met Lys Met Met Trp Ala Trp		
610	615	620
Leu Gln Ala Lys Arg Lys Pro Arg Lys Ala Pro Ser Arg Asn Ile Cys		
625	630	635
Tyr Asp Ala Phe Val Ser Tyr Ser Glu Arg Asp Ala Tyr Trp Val Glu		
645	650	655
Asn Leu Met Val Gln Glu Leu Glu Asn Phe Asn Pro Pro Phe Lys Leu		
660	665	670
Cys Leu His Lys Arg Asp Phe Ile Pro Gly Lys Trp Ile Ile Asp Asn		
675	680	685
Ile Ile Asp Ser Ile Glu Lys Ser His Lys Thr Val Phe Val Leu Ser		
690	695	700
Glu Asn Phe Val Lys Ser Glu Trp Cys Lys Tyr Glu Leu Asp Phe Ser		
705	710	715
His Phe Arg Leu Phe Asp Glu Asn Asn Asp Ala Ala Ile Leu Ile Leu		
725	730	735
Leu Glu Pro Ile Glu Lys Lys Ala Ile Pro Gln Arg Phe Cys Lys Leu		
740	745	750
Arg Lys Ile Met Asn Thr Lys Thr Tyr Leu Glu Trp Pro Met Asp Glu		
755	760	765
Ala Gln Arg Glu Gly Phe Trp Val Asn Leu Arg Ala Ala Ile Lys Ser		
770	775	780

<210> 13
<211> 811
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 13

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

85	90	95
Glu Leu Arg Tyr	Leu Asp Leu Ser Asn	Asn Arg Leu Lys Ser Val Thr
100	105	110
Trp Tyr Leu Leu Ala Gly	Leu Arg Tyr Leu Asp Leu Ser Phe	Asn Asp
115	120	125
Phe Asp Thr Met Pro Ile Cys	Glu Glu Ala Gly Asn Met Ser His	Leu
130	135	140
Glu Ile Leu Gly Leu Ser Gly	Ala Lys Ile Gln Lys Ser Asp Phe	Gln
145	150	155
Lys Ile Ala His Leu His	Leu Asn Thr Val Phe Leu Gly Phe	Arg Thr
165	170	175
Leu Pro His Tyr	Glu Glu Gly Ser Leu Pro Ile Leu Asn	Thr Thr Lys
180	185	190
Leu His Ile Val Leu Pro Met	Asp Thr Asn Phe Trp Val	Leu Leu Arg
195	200	205
Asp Gly Ile Lys Thr Ser Lys	Ile Leu Glu Met Thr Asn Ile Asp	Gly
210	215	220
Lys Ser Gln Phe Val Ser	Tyr Glu Met Gln Arg Asn Leu Ser	Leu Glu
225	230	235
Asn Ala Lys Thr Ser Val	Leu Leu Asn Lys Val Asp	Leu Leu Trp
245	250	255
Asp Asp Leu Phe Leu Ile	Leu Gln Phe Val Trp His Thr Ser	Val Glu
260	265	270
His Phe Gln Ile Arg Asn Val	Thr Phe Gly Gly Lys Ala Tyr	Leu Asp
275	280	285
His Asn Ser Phe Asp Tyr Ser	Asn Thr Val Met Arg Thr Ile	Lys Leu
290	295	300
Glu His Val His Phe Arg Val	Phe Tyr Ile Gln Gln Asp Lys Ile	Tyr
305	310	315
Leu Leu Leu Thr Lys Met Asp	Ile Glu Asn Leu Thr Ile Ser	Asn Ala
325	330	335
Gln Met Pro His Met Leu Phe	Pro Asn Tyr Pro Thr Lys Phe	Gln Tyr
340	345	350
Leu Asn Phe Ala Asn Asn	Ile Leu Thr Asp Glu Leu Phe	Lys Arg Thr
355	360	365
Ile Gln Leu Pro His Leu Lys	Thr Leu Ile Leu Asn Gly Asn	Lys Leu
370	375	380
Glu Thr Leu Ser Leu Val Ser	Cys Phe Ala Asn Asn Thr	Pro Leu Glu
385	390	395
His Leu Asp Leu Ser Gln Asn	Leu Leu Gln His Lys Asn Asp	Glu Asn
405	410	415
Cys Ser Trp Pro Glu Thr Val	Val Asn Met Asn Leu Ser	Tyr Asn Lys
420	425	430
Leu Ser Asp Ser Val Phe Arg	Cys Leu Pro Lys Ser Ile Gln	Ile Leu
435	440	445
Asp Leu Asn Asn Asn Gln	Ile Gln Thr Val Pro Lys Glu	Thr Ile His
450	455	460
Leu Met Ala Leu Arg Glu	Leu Asn Ile Ala Phe Asn Phe	Leu Thr Asp
465	470	475
Leu Pro Gly Cys Ser His Phe	Ser Arg Leu Ser Val Leu Asn	Ile Glu
485	490	495
Met Asn Phe Ile Leu Ser Pro	Ser Leu Asp Phe Val Gln	Ser Cys Gln
500	505	510
Glu Val Lys Thr Leu Asn Ala	Gly Arg Asn Pro Phe Arg	Cys Thr Cys
515	520	525
Glu Leu Lys Asn Phe Ile Gln	Leu Glu Thr Tyr Ser Glu Val	Met Met
530	535	540
Val Gly Trp Ser Asp Ser	Tyr Thr Cys Glu Tyr Pro Leu Asn	Leu Arg
545	550	555
Gly Thr Arg Leu Lys Asp Val	His Leu His Glu Leu Ser	Cys Asn Thr
565	570	575

Ala Leu Leu Ile Val Thr Ile Val Val Ile Met Leu Val Leu Gly Leu
 580 585 590
 Ala Val Ala Phe Cys Cys Leu His Phe Asp Leu Pro Trp Tyr Leu Arg
 595 600 605
 Met Leu Gly Gln Cys Thr Gln Thr Trp His Arg Val Arg Lys Thr Thr
 610 615 620
 Gln Glu Gln Leu Lys Arg Asn Val Arg Phe His Ala Phe Ile Ser Tyr
 625 630 635 640
 Ser Glu His Asp Ser Leu Trp Val Lys Asn Glu Leu Ile Pro Asn Leu
 645 650 655
 Glu Lys Glu Asp Gly Ser Ile Leu Ile Cys Leu Tyr Glu Ser Tyr Phe
 660 665 670
 Asp Pro Gly Lys Ser Ile Ser Glu Asn Ile Val Ser Phe Ile Glu Lys
 675 680 685
 Ser Tyr Lys Ser Ile Phe Val Leu Ser Pro Asn Phe Val Gln Asn Glu
 690 695 700
 Trp Cys His Tyr Glu Phe Tyr Phe Ala His His Asn Leu Phe His Glu
 705 710 715 720
 Asn Ser Asp His Ile Ile Leu Ile Leu Glu Pro Ile Pro Phe Tyr
 725 730 735
 Cys Ile Pro Thr Arg Tyr His Lys Leu Lys Ala Leu Leu Glu Lys Lys
 740 745 750
 Ala Tyr Leu Glu Trp Pro Lys Asp Arg Arg Lys Cys Gly Leu Phe Trp
 755 760 765
 Ala Asn Leu Arg Ala Ala Ile Asn Val Asn Val Leu Ala Thr Arg Glu
 770 775 780
 Met Tyr Glu Leu Gln Thr Phe Thr Glu Leu Asn Glu Glu Ser Arg Gly
 785 790 795 800
 Ser Thr Ile Ser Leu Met Arg Thr Asp Cys Leu
 805 810

<210> 14

<211> 3462

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 14

gaatcatcca	cgcacctgca	gctctgctga	gagagtgc当地	gccgtgggg	tttgagctc	60
atctcatca	ttcatatgag	gaaataagtg	gtaaaatcct	tggaaataca	atgagactca	120
tcagaaacat	ttacatattt	tgttagtattt	ttatgacagc	agagggttat	gctccagagc	180
tgccagaaga	aagggaactg	atgaccaact	gctccaaat	gtctctaaga	aaggttcccg	240
cagacttgac	cccagccaca	acgacactgg	atttacccct	taacccctt	tttcaactcc	300
agaggttcaga	ttttcattct	gtctccaaac	tgagagttt	gattctatgc	cataacagaa	360
ttcaacagct	ggatctcaaa	acccttgaat	tcaacaagga	gttaagat	ttagatttgt	420
ctaataacag	actgaagagt	gtaacttgg	atttactggc	aggtctcagg	tattagatc	480
tttcttttaa	tgactttgac	accatgcct	tctgtgagga	agctggcaac	atgtcacacc	540
tggaaatcct	aggtttgagt	ggggcaaaaa	tacaaaatc	agatttccag	aaaattgctc	600
atctgcatt	aaataactgtc	ttcttaggat	tcagaactct	tcctcattat	gaagaaggta	660
gcctgccccat	cttaaacaca	acaaaactgc	acatttttt	accaatggac	acaaaatttct	720
gggttctttt	gcgtgatgga	atcaagactt	caaaaatatt	agaaatgaca	aatatagatg	780
gcaaaaagcca	attttaagt	tatgaaatgc	aacgaaatct	tagtttagaa	aatgctaaga	840
catcggttct	attgcttaat	aaagttgatt	tactctgg	cgaccccttc	cttatcttac	900
aatttggttt	gcatacatca	gtggAACACT	ttcagatccg	aatgtgact	tttgggtggta	960
aggcttatct	tgaccacaat	tcatttgact	actcaaatac	tgtatgaga	actataaaat	1020
tggagcatgt	acatttcaga	gtttaatac	ttcaacagga	taaaatctat	ttgttttga	1080
ccaaaatgga	catagaaaac	ctgacaataat	caaatgcaca	aatgccacac	atgttttcc	1140
cgaatttatcc	tacgaaattc	caatattaa	atttgc当地	taatatctt	acagacgagt	1200
tgtttaaaag	aactatccaa	ctgcctcact	tgaaaactct	catttgaat	ggcaataaac	1260
tggagacact	ttcttttagta	agttgctttg	ctaacaacac	acccttgaa	cacttggatc	1320
tgagtcaaaa	tctattacaa	cataaaaatg	atgaaaattg	ctcatggcca	gaaactgtgg	1380
tcaatatgaa	tctgtcatac	aataaattgt	ctgattctgt	ttcaggtgc	ttgccccaaa	1440

gtattcaaat	acttgaccta	aataataacc	aaatccaaac	tgtacctaaa	gagactattc	1500
atctgatggc	cttacgagaa	ctaaatatgg	catttaattt	tcttaactgat	ctccctggat	1560
gcagtcatt	cagtagactt	tcagttctga	acatgaaat	gaacttcatt	ctcagccccat	1620
ctctggattt	tgttcagagc	tgccaggaag	ttaaaactct	aaatgcggga	agaaaatccat	1680
tccgggtgtac	ctgtgaatta	aaaaatttca	ttcagcttg	aacatattca	gaggtcatga	1740
tggttggatg	gtcagattca	tacacctgt	aataccctt	aaacctaagg	ggaacttaggt	1800
taaaagacgt	tcatctccac	gaatttatott	gcaacacagc	tctgttgatt	gtcaccattg	1860
tggttattat	gctagttctg	gggttggctg	tggccttctg	ctgtctccac	tttgatctgc	1920
cctggtatct	caggatgcta	ggtcaatgca	cacaaacatg	gcacagggtt	aggaaaacaa	1980
cccaagaaca	actcaagaga	aatgtccgat	tccacgcatt	tatttcatac	agtgaacatg	2040
attctctgtg	ggtgaagaat	gaattgatcc	ccaatctaga	gaaggaagat	ggttctatct	2100
tgatttgcct	ttatgaaagc	tactttgacc	ctggcaaaag	cattagtgaa	aatattgtaa	2160
gcttcattga	gaaaagctat	aagtccatct	ttgtttgtc	tcccaacttt	gtccagaatg	2220
agtggtgcca	ttatgaattc	tactttgcc	accacaatct	cttccatgaa	aattctgatc	2280
atataattct	tatcttactg	gaacccatcc	cattctattt	cattcccacc	aggtatcata	2340
aactgaaagc	tctccctggaa	aaaaaaagcat	acttggatg	gcccaggat	aggcgtaaat	2400
gtgggctttt	ctgggcaaacc	cttcgagctg	ctattaatgt	taatgttata	gccaccagag	2460
aaatgtatga	actgcagaca	ttcacagagt	taatgaaga	gtctcgaggt	tctacaatct	2520
ctctgatgag	aacagattgt	ctataaaatc	ccacagtct	tgggaagttt	gggaccacat	2580
acactgttgg	gatgtacatt	gatacaacct	ttatgtatgc	aatttgacaa	tatttattaa	2640
aataaaaaat	ggttatttccc	ttcatatcag	tttctagaag	gatttctaag	aatgtatcct	2700
atagaaacac	tttcacaaagt	ttataaggc	ttatggaaaa	aggtgttcat	cccaggattt	2760
tttataatca	tgaaaaatgt	ggccaggtgc	agtggctcac	tcttgtaatc	ccagcactat	2820
gggaggccaa	ggtgggtgac	ccacgaggc	aagagatgga	gaccatcctg	gccaacatgg	2880
tgaaaccctg	tctctactaa	aaatacaaaa	attagctgg	cgtgttgg	cacgcctgt	2940
gtcccagcta	cttgggaggc	tgaggcagga	gaatcgctt	aaccgggag	gtggcagttt	3000
cagttagctg	agatcgagcc	actgcactcc	agcctggta	cagagcgaga	ctccatctca	3060
aaaaaaaaaa	aaaaaaaaatg	aaaaacatcc	tcatggccac	aaaataaggt		3120
ctaattcaat	aaattataatgt	acattaatgt	aatataat	tacatggccac	aaaaagaat	3180
aaggtagctg	tatatttcct	ggtatggaaa	aaacatatta	atatgttata	aactattagg	3240
ttggtgcaaa	actaattgtg	gttttgcc	ttgaaatggc	attgaaataa	aagtgtaaag	3300
aaatctatac	cagatgttgt	aacagtgg	tgggtctgg	aggttggatt	acagggagca	3360
tttatttct	atgttgtgt	tttctataat	gtttaattt	tttagaatga	atctgtattt	3420
ctttataag	tagaaaaaaa	ataaagatag	tttttacagc	ct		3462

<210> 15

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 15

tcccaccagg tatcataaac tgaa

24

<210> 16

<211> 27

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 16

ttatagacaa tctgttctca tcagaga

27

<210> 17

<211> 40

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 17

aaaaagcata cttggaatgg cccaggata ggtgtaaatg

40

<210> 18

<211> 12

<223> synthetischer Marker

<400> 23

Gly Arg Ala Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
1 5 10

<210> 24

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 24

gcgggaagga ttttggtaa

20

<210> 25

<211> 25

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 25

gatcccaact agacaaagac tggtc

25

<210> 26

<211> 33

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 26

tgagagctgc gataaagtcc taggttccca tat

33

<210> 27

<211> 48

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 27

ggattctaat acgactcaact ataggcAAA ctctgccctg tgatgtca

48

<210> 28

<211> 48

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 28

ctatgaaatt aaccctcaact aaaggAACG agggcaattt ccacttag

48

<210> 29

<211> 48

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 29

ggattctaat acgactcaact ataggcTGG caataaactg gagacact

48

<210> 30

<211> 48

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 30

ctatgaaatt aaccctcaact aaaggGATTG agttgttctt gggttgtt

48

Patentansprüche

1. Isoliertes Nucleinsäuremolekül, umfassend eine Polynukleotidsequenz mit einer Sequenzidentität von zumindest 95% mit

(a) einem DNA-Molekül, das für ein PRO358-Polypeptid mit den Aminosäureresten 20 bis 811 aus **Fig. 8** (Seq.-ID Nr. 13) kodiert, worin das Polypeptid die Fähigkeit aufweist, die Aktivierung von NF-KB zu induzieren, oder dem Komplement des DNA-Moleküls; oder
(b) einem DNA-Molekül, das für dasselbe reife Polypeptid kodiert, das von der menschlichen Toll-Protein-cDNA, die bei der ATCC unter der Hinterlegungsnr. 209431 (DNA47361-1249) zu finden ist, kodiert wird, worin das Polypeptid die Fähigkeit aufweist, die Aktivierung von NF-KB zu induzieren, oder dem Komplement des DNA-Moleküls.

2. Isoliertes Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 1, umfassend DNA mit einer Sequenzidentität von zumindest 95% mit einem DNA-Molekül, das für ein PRO358-Polypeptid mit den Aminosäureresten 1 bis 811 aus **Fig. 8** (Seq.-ID Nr. 13) kodiert, oder dem Komplement des DNA-Moleküls.

3. Isoliertes Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 1, umfassend DNA, die für ein PRO358-Polypeptid mit den Aminosäureresten 1 bis 811 aus **Fig. 8** (Seq.-ID Nr. 13) kodiert.

4. Isoliertes Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 1, umfassend DNA, die für ein PRO358-Polypeptid mit den Aminosäureresten 20 bis 575 aus **Fig. 8** (Seq.-ID Nr. 13) kodiert.

5. Isoliertes Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 1, umfassend DNA, die für ein PRO358-Polypeptid mit den Aminosäureresten 586 bis 811 aus **Fig. 8** (Seq.-ID Nr. 13) kodiert.

6. Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 1, worin die DNA die Nucleotidsequenzen zwischen Nucleotidposition 111 und Nucleotidposition 2544 aus **Fig. 9** (Sequenz aus Seq.-ID Nr. 14) umfasst, oder dessen Komplement.

7. Vektor, umfassend das Nucleinsäuremolekül nach einem der vorangegangenen Ansprüche.

8. Vektor nach Anspruch 7, der operabel an Kontrollsequenzen gebunden ist, die von einer Wirtszelle, die mit dem Vektor transformiert wurde, erkannt werden.

9. Wirtszelle, umfassend den Vektor nach Anspruch 7.

10. Wirtszelle nach Anspruch 9, worin es sich bei der Zelle um eine CHO-Zelle handelt.

11. Wirtszelle nach Anspruch 9, worin es sich bei der Zelle um eine E.-coli-Zelle handelt.

12. Wirtszelle nach Anspruch 9, worin es sich bei der Zelle um eine Hefe-Zelle handelt.

13. Verfahren zur Herstellung eines Toll-Polypeptids, umfassend das Züchten der Wirtszelle nach einem der Ansprüche 9 bis 12 unter Bedingungen, die für die Expression eines Polypeptids geeignet sind, das von einem Nucleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 6 kodiert wird, sowie das Gewinnen des Polypeptids.

14. Isoliertes Polypeptid mit einer Sequenzidentität von zumindest 80% mit der in **Fig. 8** (Seq.-ID Nr. 13) dargelegten Aminosäuresequenz, worin das Polypeptid die Fähigkeit aufweist, die Aktivierung von NF-KB zu induzieren.

15. Polypeptid nach Anspruch 14 mit den Aminosäureresten 20–811 aus **Fig. 8** (Seq.-ID Nr. 13).

16. Polypeptid nach Anspruch 14 mit den Aminosäureresten 20–575 aus **Fig. 8** (Seq.-ID Nr. 13).

17. Polypeptid nach Anspruch 14 mit den Aminosäureresten 596–811 aus **Fig. 8** (Seq.-ID Nr. 13).

18. Polypeptid nach Anspruch 14, worin das Polypeptid von der Nucleotidsequenz zwischen Nucleotidposition 111 und Nucleotidposition 2544 aus **Fig. 9** (Seq.-ID Nr. 14) kodiert wird.

19. Chimäres Molekül, umfassend ein PRO358-Polypeptid nach einem der Ansprüche 14 bis 18, fusioniert an eine heterologe Aminosäuresequenz.

20. Chimäres Molekül nach Anspruch 19, worin es sich bei der heterologen Aminosäuresequenz um eine

Epitop-Markierungssequenz handelt.

21. Chimäres Molekül nach Anspruch 20, worin es sich bei der heterologen Aminosäuresequenz um eine Fc-Region eines Immunglobulins handelt.
22. Antikörper, der spezifisch an das Polypeptid mit der in **Fig. 8** (Seq.-ID Nr. 13) dargestellten Aminosäuresequenz bindet.
23. Antikörper nach Anspruch 22, worin es sich bei dem Antikörper um einen monoklonalen Antikörper handelt.
24. Antikörper nach Anspruch 23, der in der Lage ist, die Erkennung eines gramnegativen oder grampositiven Organismus durch das Polypeptid zu blockieren.
25. Antikörper nach einem der Ansprüche 22 bis 24 zur therapeutischen Verwendung.
26. Verwendung des Antikörpers nach einem der Ansprüche 22 bis 24 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung eines septischen Schocks.
27. Zusammensetzung, umfassend einen Antikörper nach einem der Ansprüche 22 bis 24 in einer Beimischung mit einem pharmazeutisch annehmbaren Träger.

Es folgen 13 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

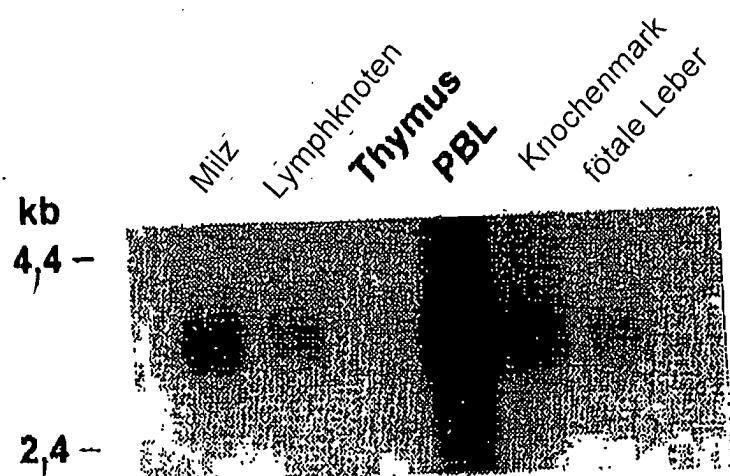


FIG. 1A

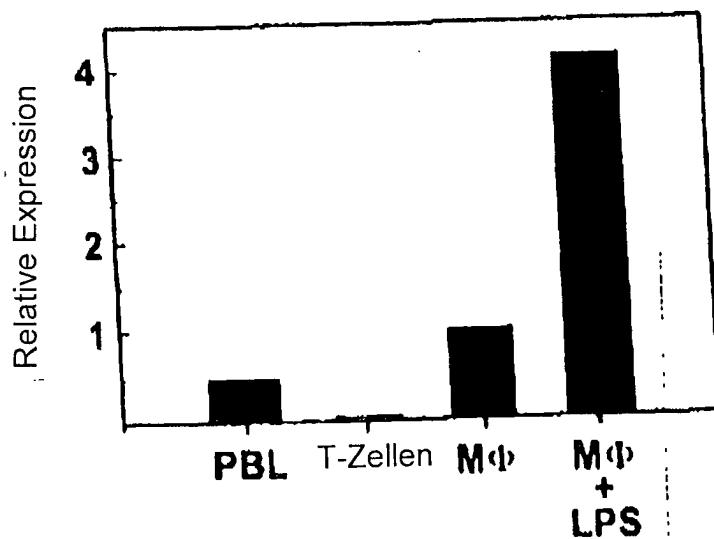


FIG. 1B

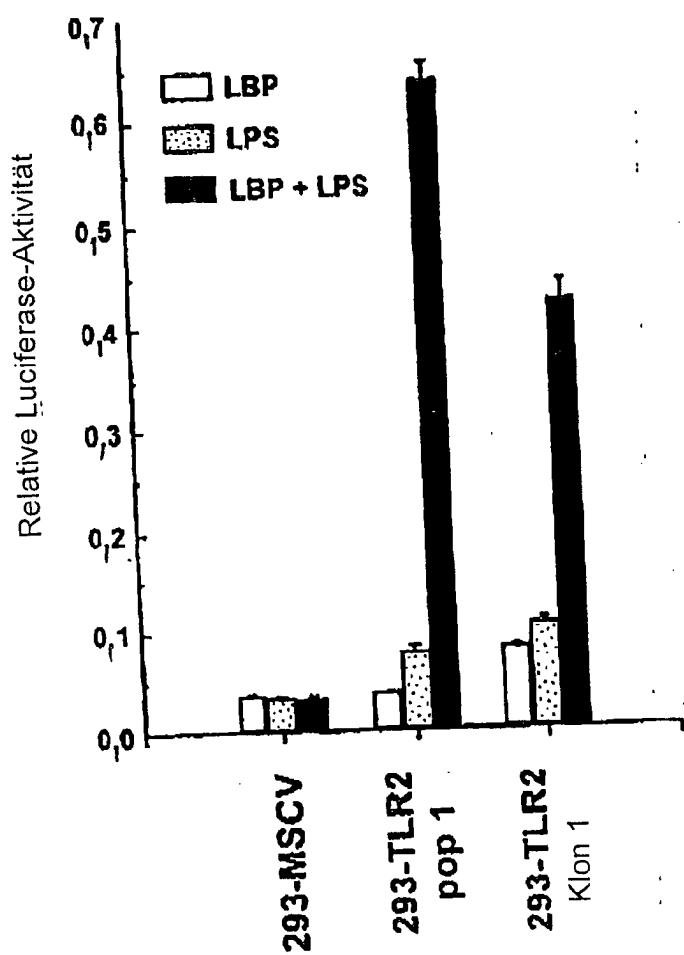


FIG. 2A

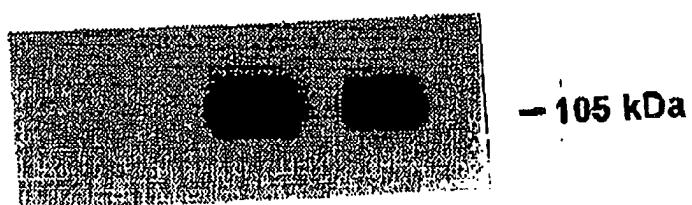


FIG. 2B

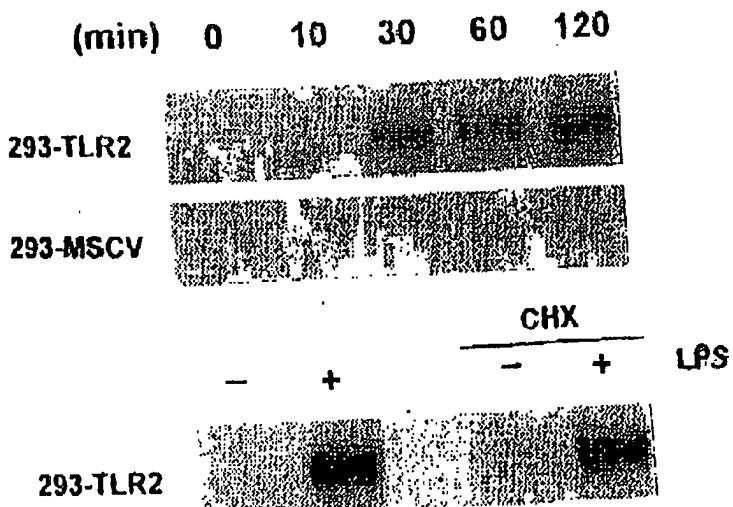


FIG. 2C

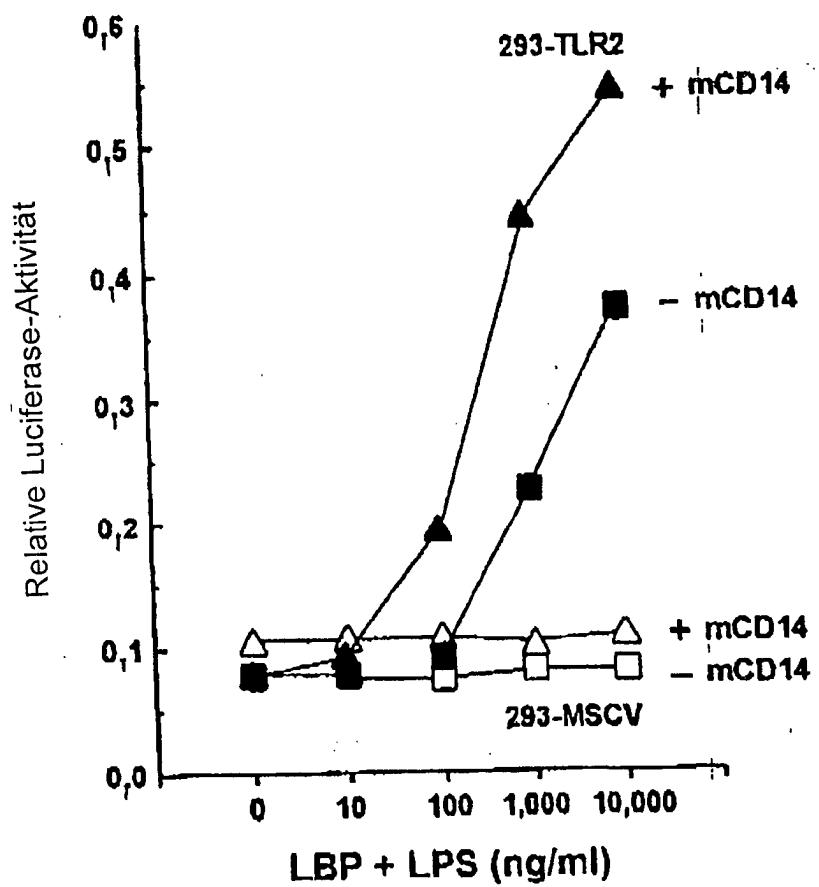


FIG. 2D

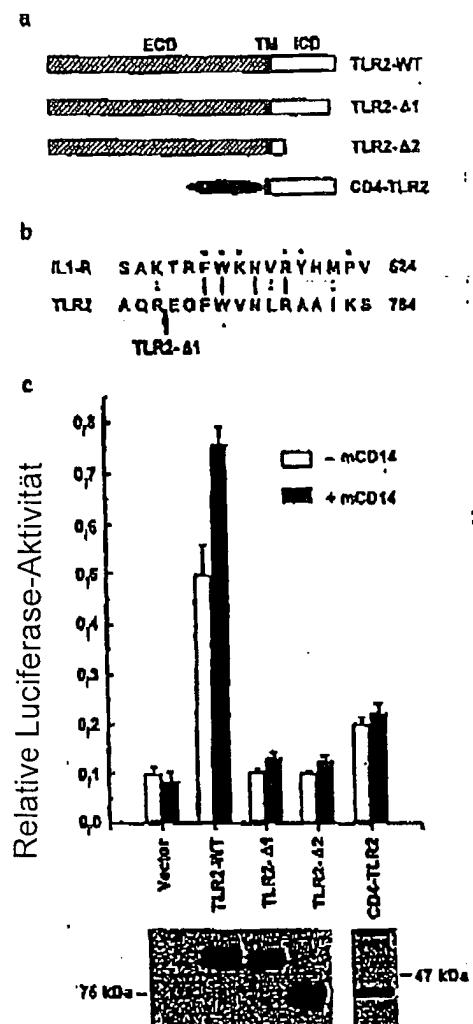


Figure 3

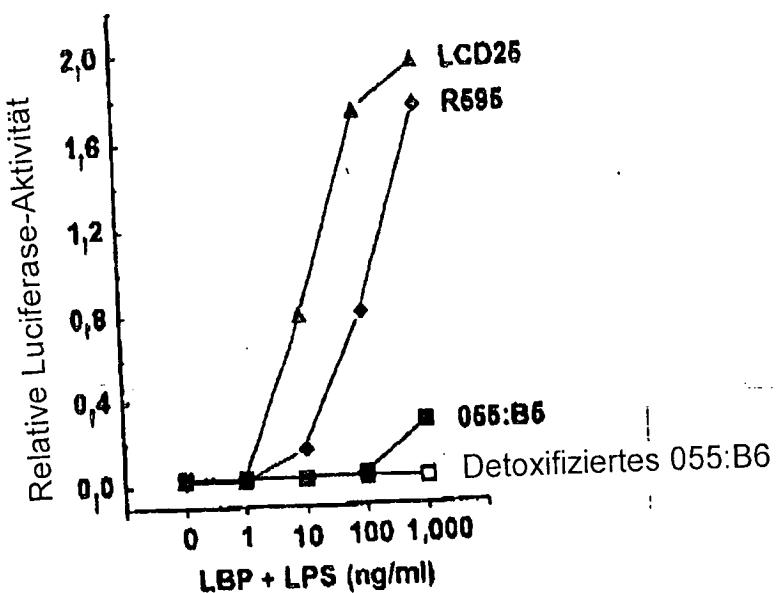


FIG. 4A

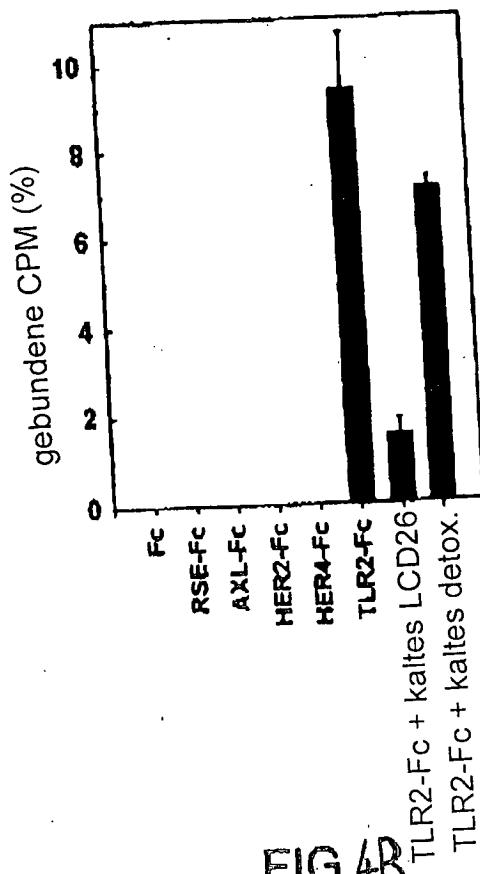
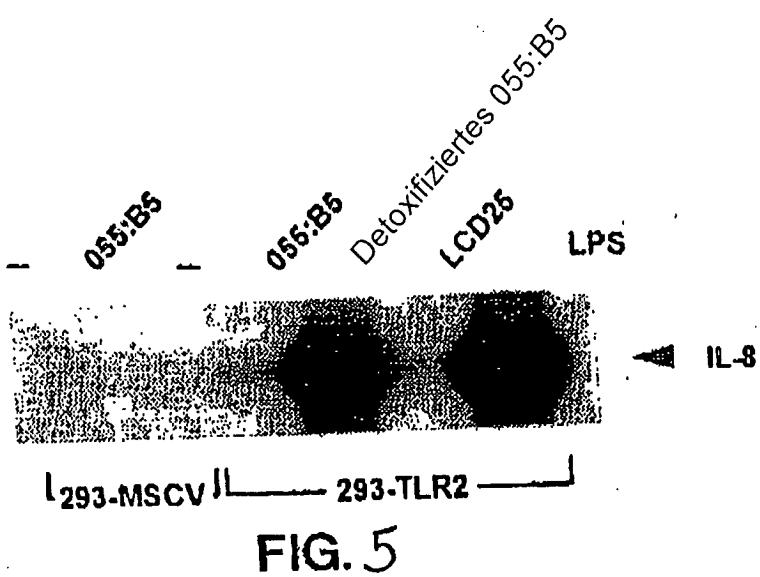


FIG. 4B



GTTATGCCTAGAAAACATTCTCAAGAATTAGAATTACGATATGCTGTCAAACACAATGA
 CTTATTTGAACCTCTTATTGTAGGTTGAAGCACTGGACAATGCCACATACTTGTGG
 ATGGTGTGGGTCTGGGGTCATCATCAGCCTCTCCAAGGAAGAACATCCTCCAATCAGGCT
 TCTCTGTCTGTGACCGCAATGGTATCTGCAAGGGCAGCTCAGGATCTTAAACTCCATT
 CCCTCAGGGCTCACAGAAGCTGTAAAAGCCTGACCTGTCACAAACAGGATCACCTAC
 ATTAGCAACAGTGACCTACAGAGGTGTGAACCTCCAGGCTCTGGTGTGACATCCAAT
 GGAATTAACACAATAGAGGAAGATTCTTTCTTCCCTGGGAGCTGTGAACATTAGAC
 TTATCCTATAATTACTTATCTAATTATCGTCTTCTGGTCAAGCCCCTTCTTCTTAA
 ACATTCTTAAACTTACTGGAAATCCTTACAAAAACCTAGGGAAACATCTCTTTCT
 CATCTCACAAAATTGCAAATCCTGAGAGTGGAAATATGGACACCTTCACTAAGATTCAA
 AGAAAAGATTGCTGGACTTACCTCCTGAGGAACCTGAGATTGATGCTTCAGATCTA
 CAGAGCTATGAGCCAAAAGTTGAAGTCATTAGAATGTAAGTCATCTGATCCTTCAT
 ATGAAGCAGCATATTACTGCTGGAGATTGTAGATGTTACAAGTCCGTGGAATGT
 TTGGAACCTGCGAGATACTGATTGGACACTTCCATTTCAGAACTATCCACTGGTGA
 ACAAAATTCAATTGATTAAAAGTTACATTAGAAATGTGAAACATCACCAGTGAAGATTG
 TTTCAGGTTATGAAACTTTGAATCAGATTCTGGATTGTTAGAATTAGAGTTGATGAC
 TGTACCCCTTAATGGAGTTGTAATTAGAGCATCTGATAATGACAGAGTTAGATCCA
 GGTAAAGTGGAAACGTTAACAAATCCGGAGGCTGCATATTCCAAGGTTTACTTATT
 GATCTGAGCACTTATATTCACTACAGAAAGAGTTAAAGAATCACAGTAGAAAACAGT
 AAAGTTTCTGGTTCTGTTACTTCACAACATTAAAATCATTAGAATTACTGGAT
 CTCAGTGAACATTGATGGTTGAAGAATACTGAAAATTAGCCTGTGAGGATGCCTGG
 CCCTCTCTACAAACTTAATTAAAGCAAAATCATTGGCATCATTGGAAAAACCGGA
 GAGACTTGTCACTGAAAACCTGACTAACATTGATATCAGTAAGAATAGTTTCA
 TCTATGCCTGAAACTGTCAGTGGCCAGAAAAGATGAAATATTGAACTTATCCAGCACA
 CGAATACACAGTGTAAACAGGCTGCATTCCAAGACACTGGAAATTAGATGTTAGCAAC
 AACAACTCAATTATTCTTGAATTGCGCAACTCAAAGAACTTTATATTCCAGA
 AATAAGTTGATGACTCTACCAGATGCCTCCCTCTACCCATGTTACTAGTATTGAAAATC
 AGTAGGAATGCAATAACTACGTTCTAAGGAGCAACTTGACTCATTACACACTGAAG
 ACTTGGAAAGCTGGTGGCAATAACTCATTGCTCTGTGAATTCCCTCCTTCACTCAG
 GAGCAGCAAGCACTGCCAAAGTCTTGATTGATTGCCAGCAAATTACCTGTGACTCT
 CCATCCCAGTGCCTGGCCAGCAGGTTCAAGGATGTCGCCCTCTCGGTGTCGGAATGT
 CACAGGACAGCACTGGTGTCTGGCATGTGCTCTGTTCTGCTGATCCTGCTCACGGGG
 GTCCGTGCCACCGTTCCATGGCCTGTGGTATATGAAAATGATGTCGGCCTGGCTCCAG
 GCCAAAAGGAAGCCCAGGAAAGCTCCAGCAGGAACATCTGCTATGATGCATTGTTCT
 TACAGTGAGCGGGATGCCTACTGGTGGAGAACCTTATGGTCAGGAGCTGGAGAACCT
 AATCCCCCTCAAGTTGTCTTCATAAGCGGGACTTCATTCCCTGCCAGTGGATCATT
 GACAATATCATTGACTCCATTGAAAAGAGCCACAAAAGTCTTGTGCTTCTGAAAAC
 TTTGTGAAGAGTGAGTGGTGCAGTATGAACTGGACTTCTCCATTCCGTCTTTGAT
 GAGAACAAATGATGCTGCCATTCTCATTCTGAGGCCATTGAGAAAAAGCCATTCCC
 CAGCGCTCTGCAAGCTGCCAGGAAAGATAATGAAACACCAAGACACTACCTGGAGTGGCC
 GACGAGGCTCAGCGGGAGGATTGGTAAATCTGAGAGCTGCGATAAAAGTCTTAGGTT
 CCCATATTAAAGACCAAGTCTTGTCTAGTTGGATCTTATGTCACTAGTTAGTTAAG
 TTCATTCAAGACATAATTATATAAAACTACGTGGATGTACCGTCATTGAGGACTTGCTT
 ACTAAAACACAAAACCTTCAAA

FIG. 6

MPHTLWMVWVLGVIISLSKEESSNQASLSCDRNGICKGSSGSINSIPSGLTEAVKSDL
SNNRITYISNSDLQRCVNLQALVLTSNGINTIEEDSFSSLGSLEHLDLSNYLSNLSSS
WFKPLSSLTFINLLGNPYKTLGETSLFSHLTKLQILRVGNMDTFTKIQRKDFAGITFLE
ELEIDASDLQSYPEPKSLKSIQNVSHLILHMKQHILLEIFVDVTSSVECLELRDTDLDT
FHFSSELSTGETNSLIKKFTFRNVKITDESILFQVMKLLNQISGLLELFDDCTLNGVGNF
RASDNDRVIDPGKVETLTIRRLHIPRFYFYDLSTLYSLTERVKRITVENSKVFLVPCL
LSQHLKSLEYLDLSENLMVEEYLKNSACEDAWPSLQTLILRQNHLASLEKTGETLLTLK
NLTNIDISKNSFHSMPETCQWPEKMKYLNLSSTRIHSVTGCIPKTLIEILDVSNNNLNF
SLNLPOLKELYISRNLMLTPDASLLPMLLVLKISRNAITTFSKEQLDSFHTLKTLLEAG
GNNFICSCEELSFTQEQQALAKVLIDWPANYLCDSPSHVRGQQQDVRLSVSECHRTAL
VSGMCCALFLLILLTGVLCHRFGHLWYMKMMWANLQAKRKPRKAPSRSNICYDAFVSYSE
RDAYWVENLMVQELENFNPPFKCLHKRDFIPGKWIIDNIIDSIEKSHKTVFVLSENFV
KSEWCKYELDFSHFRLFDENNDAAIILILLEPIEKKAIPQRFCKLRKIMNTKTYLEWPMD
EAQREGFWVNLRRAAIKS

FIG. 7

Met Arg Leu Ile Arg Asn Ile Tyr Ile Phe Cys Ser Ile Val Met Thr Ala Glu Gly Asp Ala Pro Glu Leu Pro Glu Glu Arg Glu Leu
 10 15 20 25 30
 Met Thr Asn Cys Ser Asn Met Ser Leu Arg Lys Val Pro Ala Asp Leu Thr Pro Ala Thr Thr Thr Leu Asp Leu Ser Tyr Asn Leu Leu
 35 40 45 50 55 60
 Phe Gln Leu Ile Ser Ser Asp Asp Phe His Ser Val Ser Lys Leu Arg Val Leu Ile Leu Cys His Asn Arg Ile Gln Gln Leu Asp Leu Lys
 65 70 75 80 85 90 95
 Thr Phe Glu Phe Asn Lys Glu Leu Arg Tyr Leu Asp Leu Ser Asn Asn Arg Leu Lys Ser Val Thr Trp Tyr Leu Ala Glu Leu Arg
 100 105 110 115 120 125 130
 Gly Ala Lys Ile Gln Lys Ser Asp Phe Gln Lys Ile Ala His Leu His Leu Asn Thr Val Phe Leu Olyphe Arg Thr Leu Pro His Tyr
 135 140 145 150 155 160 165 170 175 180 185 190 195 200 205 210
 Glu Glu Gly Ser Gln Pro Ile Leu Asn Thr The Lys Leu His Ile Val Leu Pro Met Asp Thr Asn Phe Trp Val Leu Arg Asp Gly
 215 220 225 230 235 240 245 250 255 260 265 270 275 280 285 290 295 300
 Ile Lys Thr Ser Lys Ile Leu Glu Met Thr Asn Ile Asp Gly Ser Gln Phe Val Ser Tyr Glu Met Gln Arg Asn Leu Ser Leu Gln
 305 310 315 320 325 330 335 340 345 350 355 360 365 370 375 380 385 390 395
 Thr Ile Lys Leu Glu His Val His Phe Arg Val Phe Tyr Ile Glu Gln Asp Ilys Ile Tyr Leu Leu Leu Thr Lys Met Asp Ilys Glu Asn
 400 405 410 415 420

Figure 8A

Glu Thr Val Val Asn Met Asn Leu Ser Tyr Asn Lys Leu Ser Asp Ser Val Phe Arg Cys Leu Pro Lys Ser Ile Glu Ile Leu Asp Leu
 425 430 435 440 445 450
 Asn Asn Asn Gln Ile Gin Thr Val Pro Lys Glu Thr Ile His Leu Met Ala Leu Arg Glu Leu Asn Ile Ala Phe Asn Phe Leu Thr Asp
 455 460 465 470 475 480
 Leu Pro Gly Cys Ser His Phe Ser Arg Leu Ser Val Asn Ile Glu Met Asn Phe Ile Leu Ser Pro Ser Leu Asp Phe Val Glu Ser
 485 490 495 500 505 510
 Cys Glu Glu Val Lys Thr Leu Asn Ala Gly Arg Asn Pro Phe Arg Cys Thr Cys Glu Leu Lys Asn Phe Ile Glu Thr Tyr Ser
 515 520 525 530 535 540
 Glu Val Met Met Val Gly Trp Ser Asp Ser Tyr Thr Cys Glu Tyr Pro Leu Asn Leu Arg Gly Thr Arg Leu Lys Asp Val His Leu His
 545 550 555 560 565 570
 Glu Leu Ser Cys Asn Thr Ala Leu Leu Ile Val Thr Ile Val Val His Met Leu Val Leu Oly Leu Ala Val Ala Phe Cys Leu Leu His
 575 580 585 590 595 600
 Phe Asp Leu Pro Trp Tyr Leu Arg Met Leu Asp Cys Thr Cys Thr Cys Thr Trp His Arg Val Arg Lys Thr Thr Glu Glu Asn Leu Lys Arg
 610 615 620 625 630 635
 Asn Val Arg Phe His Ala Phe Ile Ser Tyr Ser Glu His Asp Ser Leu Trp Val Lys Asn Glu Leu Ile Pro Asn Leu Glu Lys Glu Asp
 640 645 650 655 660 665
 Lys Ser Ile Phe Val Leu Ser Pro Asn Phe Val Glu Asn Glu Trp Cys His Tyr Glu Phe Tyr Phe Ala His His Asn Leu Phe His Glu
 670 675 680 685 690 695
 Gly Ser Ile Leu Ile Cys Leu Tyr Glu Ser Tyr Phe Asp Pro Gly Lys Ser Ile Ser Glu Asn Ile Val Ser Phe Ile Glu Lys Ser Tyr
 700 705 710 715 720 725
 Asn Ser Asp His Ile Ile Leu Ile Leu Leu Glu Pro Ile Pro Phe Tyr Cys Ile Pro Thr Arg Tyr His Lys Leu Leu Leu Glu
 730 735 740 745 750 755
 Lys Lys Ala Tyr Leu Glu Trp Pro Lys Asp Arg Arg Lys Cys Cys His Arg Ala Ala Ala Ala Asn Val Asn Val Val Leu Leu
 760 765 770 775 780 785
 Ala Thr Arg Glu Met Tyr Glu Leu Glu Leu Glu Leu Asn Glu Glu Ser Arg Gly Ser Thr Ile Ser Leu Met Arg Thr Asp Cys
 790 795 800 805 810

Leu
811

Figure 8B

GATCATCCA CGCACCTGCA CCTCTGCTGA GAGAGTGCRA GCCGTGGGG TTTCAGCTC ATCTTCATCA TTCAATGAG GAATRAGTG GTAAATCCT 100
 <MET 1 trans=1-5, dir=f, res+1>
 TGAAATAACA ATGAGACTCA TCAAGAACAT TTACATATT TGAGTATTG TTATGACAGC AGAGGGTGT GTCCAGAGC TGCCAGAGA AAGGAACTG 200
 ATGACCAACT GCTCCAACT GTCTCTTAAA AGGGTTCCCG CAGACTGAC CCCAGCCACA AGCACACTCG ATTATCCTA TACCTCCCT TTCAACTCC 300
 AGAGTCAGA TTTCATCT GTAGAGTTT GTTCTATGC CATAACAGRA TCAACAGRA TCAACAGRA GGATCTCAA ACCTTTGAAT TCAACAGGA 400
 GTTAAGATAT TTAGATTTGT CTAAATACAG ACTGAGAGT GTAACTGGT ATTAACTGGC AGGTCTCAGG TATTAGATC TTCTTTAA TGACTTGAC 500
 ACCATGCCCA TCTGTGAGGA AGCTGGCAC ATGTCACACC TGAAATCCT AGTTTGAGT GGGCAAAA TACAAATC AGATTTCCAG AAATTCCTC 600
 ATCTGCATCT AAATACTGTC TTCTTAGGAT TCAAGACTCT TCCTCATTT GAAGANGTA GCCTGCCCCAT CTAAACACA AGAAATCTC ACATTTTTT 700
 ACCATGGAC ACAAACTCT GGGTTCTTT GCGTGATGGA ATCAGACTT CAAATATT AGAAATGCA AAATAGATG GAAAAGCCA ATTTGAAAGT 800
 TATGAATGCA ACCAAATCT TAGTTAGAA ATGGCTAGA CATGGCTCT ATTGCTTAAT AAAGTTGATT TACTCTGGG CGACCTTTTC CTATCTTAC 900
 ATTTGTTG GCTACATCA GTGGAACTC TTCAAGTCCG AAATCTGACT TTGGTGGTA AGCCTTATCT TGACCCACAT TCAATTGACT ACTCAATAC 1000
 TGTAAATGAGA ACTATAAAAT TGGAGCATGT ACATTTGAGA GIGTTTACR TTCAACGCA TAAATCTAT TTGCTTTGA CCATATGGG CATGAAAAAC 1100
 CTGACATAT CAAATGCAAA AATGCCACAC ATGGCTTTCC CGRAATTATCC TACGAAATTIC CAATATTAA ATTTGCCAA TAATATCTTA ACAGRCGAGT 1200
 TGTTAAARG AACTATCCAA CTGGCTCTCT TGAATACCT CTTTTGAAAT GGCATATAAAC TGGAGACACT TTCTTASTA AGTTCGTTTG CTAACACAC 1300
 ACCCTGGAA CACTGGATC TGAGTCAAA TCAATTACAA CTTAAATG ATGAAATTG CTCTGCAAA GAAACTGGG TCAATATGAA TCTTCATAC 1400
 AATAAATGTT CTGATTCTGT CTTCGGTGC TTGGCCAAA GTATTCAAT ACTTCACCA AATATGCC AAATCBAAC TGTCACCAA GASACTATTC 1500
 ATCTGATGGC CTTACGAGAA CAAATATTG CATTAAATT TCTAATGAGT GCGTCTTT CASTGAGCTT TCAATTGCA ACATTGAAAT 1600
 GAACCTCACT CTCAGCCCAT CTCTGGATT TTAAACTT AATTCGGGA TGCCAGGAG TCCGGTGTAC CTGTGATTA 1700
 AAAAATTCA TTCAAGCTTGA AACATATTCA GAGGTCAATGA TGGTGGATG GTCAGATCA TACACCTGTG AATACCTTT AAACCTAAGG GGAACCTGGT 1800

FIG. 9A

TAATAGACGT TCATTCAC GAATTCTT GCAACAGC TCTTGATT GTCAACATTG TGTTTATTG GCTAGTCTGA GGTGGGCTG TGGCCCTG 1900
 CTCTCTCAC TTTGATCTGC CCTGGTACTCT CAGGATCTA CAAACATG GGTCAATGCA CACAAACATG AGGAAACCA CCAAGAACCA ACTCAAGAGA 2000
 AATOTCCGAT TCCACGCAATT TATTCTGAT ATTCTCTGTC CGTGAAGAT AGTGCACATC AGTGCACATC ATTCTCTGTC ATTCTCTGTC 2100
 TGATTGCGT TTATGAAAGC TACTTGACC CTGGCAAAAG CATTAGTGA AATATGTA GCTTCATTGA GAAAAGCTAT AGTCCCATCT TTTTTCGTC 2200
 TCCAACTT GTCCAGAATG AGTGGGCCA TTATGAAATT TACTTGCCC ACCAACATCT CTTCATGTA ATTCTGATC ATATAATTCT TATCTACTG 2300
 GAACCCCATC CATTCTATTG CATTCCACC AGGTGATCTA AACTGAAGC TCTCTGAA AAAAAGCAT ACTTGGATG GCCAAGGAT AGGGTAAAT 2400
 CTGGCCATT CTGGCAAAAC CTTCGAGCTG CTATTATGT TAATGTTTA GCCACCAAGG AAATGTTAGA ACTGAGAGA TTCACAGAGT TAATGAGA 2500
 GTCTCAGGT TCTCAATCT CTCGATGAG AACGATTTCT CTA [TA] AATC CTCAGCTCT TGGGAGTGG GGGACCACT ACACGTTGG GATGTACATT 2600
 GTCACACCT TTATGATGCC AATTTGACAA TATTATTTAA AATTAATAAT GGTTATCCC TTCTATCTG TTCTAGAG GATTTCTAG AATGTATCCT 2700
 ATAGAAGACAC CTTCAAGT TTATAAGGGC TTATGGAAA AGGTGTTCTAT CCCAGGTTG TTATATCTA TGAATAATGT GGCCAGGTGC AGTGGCTCAC 2800
 TCTTGATCT CTCAGCTAT GGGGAGCCCA GTGGCTGAC CCACGAGGTCA AAGGATGGA GACCATCTG GCAACATCTG TGAACCCCTG TCTCTACTTA 2900
 AAATACAAA ATTAGCTGG CGTGATGGTG CACGCTGTA GTCCCGCTA CTGGGAGGC TGAATGGGA GATGCGTTG ARCCGGGGG GTCGCGCTTG 3000
 CAGTGAGCTG AGATGGAGCC ACTGGACTTC ACCCTCTGA CAGAGGAGA CTCATCTCA AAAAAGAGA AAAAAGAGA AAAAAGAGA GAAACATCC 3100
 TCATGGCCAC AAAATAGGT CTAATTCTAT ATTATTAATG ACATTATGT AATATTAAT TACATGCCAC TAAATGAAAT AGGTAGCTG TATATTCTCT 3200
 GGTATGGAAA AAACATATAA ATATGTTATA AACTTATGCT TGGGCTGAA ACTAATGCTG CTTGAATGOC ATTGARATAA AAGCTTAAGG 3300
 APATCTATAC CAGATGTAGT AACGTTCTGG AGGTGGATT ACAGGGAGCA TTGTTCTATAAT GTGTTGCTA TTGTTGCTAAT GTGTTGCTAAT 3400
 TTTAGAATGA ATCTGTTATT CTTTATAAG TGAATAAAA ATAAAGATG TTTTACACCT 3462

FIG. 9B