(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 600 20 970 T2** 2006.05.11

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 1 196 188 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **600 20 970.9**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US00/19640**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **00 947 514.6**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 01/007074**
(86) PCT-Anmeldetag: **19.07.2000**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **01.02.2001**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **17.04.2002**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **22.06.2005**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **11.05.2006**

(51) Int Cl.[8]: ***A61K 38/18*** (2006.01)
A61P 3/00 (2006.01)
C07K 16/22 (2006.01)
C07K 14/475 (2006.01)

(30) Unionspriorität:
144743 P **21.07.1999** **US**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:
Amgen Inc., Thousand Oaks, Calif., US

(72) Erfinder:
YAN, Hai, Thousand Oaks, US

(74) Vertreter:
BOEHMERT & BOEHMERT, 80336 München

(54) Bezeichnung: **MONOKLONALER ANTIKÖRPER MIT SELEKTIVER BINDUNG AN VGF UND VERWENDUNG ZUR BEHANDLUNG VON VGF-ERKRANKUNGEN**

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

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

Beschreibung

Bereich der Erfindung

[0001] Dieser Erfindung betrifft neue VGF-Polypeptide und selektive Bindungsmittel. Die Erfindung betrifft auch Wirtszellen und Verfahren für die Herstellung von VGF-Polypeptiden. Die Erfindung betrifft des weiteren pharmazeutische VGF-Zusammensetzungen für die Behandlung, Linderung und/oder die Vorbeugung von/gegen Erkrankungen, Zuständen und Störungen, die mit VGF-Polypeptiden in Verbindung stehen.

Hintergrund der Erfindung

[0002] VGF ist ein sekretiertes Polypeptid, das in Neuronen und endokrinen Zellen gefunden wird. Canu et al., 1997, Genomics, 45:443–46. VGF wird im Hypothalamus gefunden und wird im Gehirn durch elektrische Aktivität, durch Verletzung und den Tagesrhythmus reguliert. Für den Hypothalamus ist gezeigt worden, daß er eine wichtige Rolle bei der Regulation der Nahrungsaufnahme und der Energieabgabe spielt und für eine Verletzung des Hypothalamus ist gezeigt worden, daß sie sowohl den Appetit als auch das Körpergewicht beeinflußt. Schwartz et al., 1995, Am. J. Physiol., 269:949–57. Für VGF ist auch gefunden worden, daß es eine Rolle im Metabolismus spielt.

[0003] Die Nukleotid- und Aminosäuresequenzen von menschlichem und von Ratten-VGF sind bekannt und zeigen eine hohe Homologie zueinander. Canu et al., supra. Das VGF-Gen, das ursprünglich als ein 2,7 kb cDNA-Fragment identifiziert wurde, wird in Unterpopulation von Neuronen und endokrinen Zellen in vitro durch Neurotrophinen transkribiert.

[0004] Fettleibigkeit und Anorexie sind Störungen der Energiehomeostase, die sich aus dem Ungleichgewicht zwischen der Energieaufnahme und dem Verbrauch ergeben. Es gibt einen Bedarf für Medikamente für die wirksame Behandlung dieser Zustände. Es gibt auch ein Bedürfnis für Medikamente für die Behandlung der Cachexie, der Sterilität, hypermetabolischer Zustände, der Hyperaktivität, der Hypoaktivität, der Hyperinsulinproduktion und verwandter Bedingungen und Störungen.

Zusammenfassung der Erfindung

[0005] Die vorliegende Erfindung stellt einen monoklonalen Antikörper oder ein Fragment davon zur Verfügung, der spezifisch an die Aminosäuresequenz aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID Nr.: 1, SEQ ID Nr.: 2, SEQ ID Nr.: 3, SEQ ID Nr.: 4, SEQ ID Nr.: 5, SEQ ID Nr.: 6, SEQ ID Nr.: 7, SEQ ID Nr.: 8, SEQ ID Nr.: 9 oder SEQ ID Nr.: 10. Ein bevorzugtes isoliertes Polypeptid ist das der SEQ ID Nr.: 2.

[0006] Hierin wird ein isoliertes Polypeptid beschrieben, umfassend ein Fragment der Aminosäuresequenz wie in einer der SEQ ID Nr.: 1, SEQ ID Nr.: 2, SEQ ID Nr.: 3, SEQ ID Nr.: 4, SEQ ID Nr.: 5, SEQ ID Nr.: 6, SEQ ID Nr.: 7, SEQ ID Nr.: 8, SEQ ID Nr.: 9 oder SEQ ID Nr.: 10 dargestellt, wobei das Fragment eine Aktivität des Polypeptids wie in den SEQ ID Nr.: 1, SEQ ID Nr.: 2, SEQ ID Nr.: 4, SEQ ID Nr.: 5, SEQ ID Nr.: 6, SEQ ID Nr.: 7, SEQ ID Nr.: 8, SEQ ID Nr.: 9 oder SEQ ID Nr.: 10 dargestellt, aufweist. Ein bevorzugtes isoliertes Polypeptid enthält ein Fragment dieser Aminosäuresequenz wie in der SEQ ID Nr.: 2 dargestellt, wobei das Fragment eine Aktivität des Polypeptids wie in der SEQ ID Nr.: 2 dargestellt, aufweist.

[0007] Es wird auch ein isoliertes Polypeptid beschrieben, das eine Aminosäuresequenz, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus:

(a) die Aminosäuresequenz wie in einer beliebigen der SEQ ID Nr.: 1, SEQ ID Nr.: 2, SEQ ID Nr.: 3, SEQ ID Nr.: 4, SEQ ID Nr.: 5, SEQ ID Nr.: 6, SEQ ID Nr.: 7, SEQ ID Nr.: 8, SEQ ID Nr.: 9 oder SEQ ID Nr.: 10 dargestellt, mit mindestens einer konservativen Aminosäurensubstitution und wobei das Polypeptid eine Aktivität des Polypeptids wie in einer beliebigen der SEQ ID Nr.: 1, SEQ ID Nr.: 2, SEQ I>D Nr.: 3, SEQ ID Nr.: 4, SEQ ID Nr.: 5, SEQ ID Nr.: 6, SEQ ID Nr.: 7, SEQ ID Nr.: 8, SEQ ID Nr.: 9 oder SEQ ID Nr.: 10 dargestellt, aufweist;

(b) die Aminosäuresequenz wie in einer beliebigen der SEQ ID Nr.: 1, SEQ ID Nr.: 2, SEQ ID Nr.: 3, SEQ ID Nr.: 4, SEQ ID Nr.: 5, SEQ ID Nr.: 6, SEQ ID Nr.: 7, SEQ 11 Nr.: 8, SEQ ID Nr.: 9 oder SEQ ID Nr.: 10 dargestellt, mit mindestens einer Aminosäureeinfügung und wobei das Polypeptid eine Aktivität des Polypeptids wie in einer beliebigen der SEQ ID Nr.: 1, SEQ ID Nr.: 2, SEQ ID Nr.: 3, SEQ ID Nr.: 4, SEQ ID Nr.: 5, SEQ ID Nr.: 6, SEQ ID Nr.: 7, SEQ ID Nr.: 8, SEQ ID Nr.: 9 oder SEQ ID Nr.: 10 dargestellt, aufweist;

(c) die Aminosäuresequenz wie in einer beliebigen der SEQ ID Nr.: 1, SEQ ID Nr.: 2, SEQ ID Nr.: 3, SEQ ID Nr.: 4, SEQ ID Nr.: 5, SEQ ID Nr.: 6, SEQ ID Nr.: 7, SEQ ID Nr.: 8, SEQ ID Nr.: 9 oder SEQ ID Nr.: 10

dargestellt, mit mindestens einer Aminosäuredeletion und wobei das Polypeptid eine Aktivität des Polypeptids wie in einer beliebigen der SEQ ID Nr.: 1, SEQ ID Nr.: 2, SEQ ID Nr.: 3, SEQ ID Nr.: 4, SEQ ID Nr.: 5, SEQ ID Nr.: 6, SEQ ID Nr.: 7, SEQ ID Nr.: 8, SEQ ID Nr.: 9 oder SEQ ID Nr.: 10 dargestellt, aufweist;
(d) die Aminosäuresequenz wie in einer beliebigen der SEQ ID Nr.: 1, SEQ ID Nr.: 2, SEQ ID Nr.: 3, SEQ ID Nr.: 4, SEQ ID Nr.: 5, SEQ ID Nr.: 6, SEQ ID Nr.: 7, SEQ ID Nr.: 8, SEQ ID Nr.: 9 oder SEQ ID Nr.: 10 dargestellt, das eine C- und/oder N-terminate Verkürzung aufweist und wobei das Polypeptid eine Aktivität des Polypeptids wie in einer beliebigen der SEQ ID Nr.: 1, SEQ ID Nr.: 2, SEQ ID Nr.: 3, SEQ ID Nr.: 4, SEQ ID Nr.: 5, SEQ ID Nr.: 6, SEQ ID Nr.: 7, SEQ ID Nr.: 8, SEQ ID Nr.: 9 oder SEQ ID Nr.: 10 dargestellt, aufweist; und
(e) die Aminosäuresequenz wie in einer beliebigen der SEQ ID Nr.: 1, SEQ ID Nr.: 2, SEQ ID Nr.: 3, SEQ ID Nr.: 4, SEQ ID Nr.: 5, SEQ ID Nr.: 6, SEQ ID Nr.: 7, SEQ ID Nr.: 8, SEQ ID Nr.: 9 oder SEQ ID Nr.: 10 dargestellt, mit mindestens einer Modifikation, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Aminosäuresubstitutionen, Aminosäureinsertionen, Aminosäuredeletionen, Carboxy-terminate Verkürzung und Amino-terminale Verkürzung und wobei das Polypeptid die Aktivität des Polypeptids in einer beliebigen der SEQ ID Nr.: 1, SEQ ID Nr.: 2, SEQ ID Nr.: 3, SEQ ID Nr.: 4, SEQ ID Nr.: 5, SEQ ID Nr.: 6, SEQ ID Nr.: 7, SEQ ID Nr.: 8, SEQ ID Nr.: 9 oder SEQ ID Nr.: 10 dargestellt, aufweist.

[0008] Es werden auch Fusionspolypeptide zur Verfügung gestellt, die mindestens ein beschriebenes Polypeptid an eine heterologe Aminosäuresequenz fusioniert umfassen.

[0009] Die vorliegende Erfindung stellt monoklonale Antikörper zur Verfügung, die dazu in der Lage sind, spezifisch an eine Aminosäuresequenz wie in einer beliebigen der SEQ ID Nr.: 1, SEQ ID Nr.: 2, SEQ ID Nr.: 3, SEQ ID Nr.: 4, SEQ ID Nr.: 5, SEQ ID Nr.: 6, SEQ ID Nr.: 7, SEQ ID Nr.: 8, SEQ ID Nr.: 9 oder SEQ ID Nr.: 10 dargestellt, zu binden.

[0010] Die monoklonalen Antikörper der Erfindung können gegebenenfalls an eine nachweisbare Markierung gebunden sein.

[0011] Diese monoklonalen Antikörper sind dazu in der Lage, der biologischen VGF-Aktivität entgegen zu wirken.

[0012] Ein bevorzugter monoklonaler Antikörper oder Fragment davon ist dazu in der Lage, spezifisch die Aminosäuresequenz wie in der SEQ ID Nr.: 2 dargestellt oder ein Fragment davon zu binden.

[0013] Die vorliegende Erfindung stellt auch pharmazeutische Zusammensetzungen zur Verfügung, die die monoklonale Antikörper der Erfindung umfassen, und ein oder mehrere pharmazeutisch annehmbare Formulierungsmittel, sind durch die Erfindung auch umfaßt. Das Formulierungsmittel kann ein geeigneter Träger, Adjuvants, Löslichkeitsförderer, Stabilisator und Antioxidanz sein. Der monoklonale Antikörper kann kovalent mit einem wasserlöslichen Polymer modifiziert sein, wie Polyethylenglycol und Dextran. Die pharmazeutischen Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung werden verwendet, um therapeutisch wirksame Mengen der monoklonalen Antikörper der vorliegenden Erfindung zur Verfügung zu stellen. Die vorliegende Erfindung stellt auch Verfahren für die Herstellung von Medikamenten für die Behandlung von Erkrankungen, Zuständen oder Störungen, die mit VGF in Verbindung stehen zur Verfügung.

[0014] Die vorliegende Erfindung stellt des weiteren die Verwendung monoklonaler Antikörper, wie oben definiert, für die Herstellung eines Medikaments für die Behandlung, die Vorbeugung oder die Linderung einer Erkrankung eines Zustands oder eine Störung, die mit VGF in Verbindung steht, zur Verfügung. Die Erkrankungen, Zustände und Störungen, die mit VGF in Verbindung stehen, umfassen die Fettleibigkeit, die Sterilität, die Cachexie, Eßstörungen, der mit AIDS in Verbindung stehende Komplex, hypermetabolische Zustände, die Hyperaktivität, die Hypoaktivität und die Hyperinsulinherstellung. Die mit VGF in Verbindung stehenden Eßstörungen umfassen Bulimie und Anorexie nervosa. Es wird erkannt werden, daß die vorliegende Erfindung auch die Verwendung monoklonaler Antikörper der Erfindung für die Herstellung eines Medikaments für die Behandlung, die Vorbeugung oder die Linderung einer Erkrankung, eines Zustandes oder einer Störung, die mit VGF in Verbindung steht, zur Verfügung stellt.

[0015] Es wird auch die Verwendung der monoklonalen Antikörper der Erfindung für die Bestimmung der Gegenwart oder der Menge der Expression eines VGF-Polypeptids in einer Körperflüssigkeit und die Diagnose einer Erkrankung, eines Zustands oder einer Störung, die mit VGF in Verbindung steht, oder die Anfälligkeit für eine Erkrankung, einen Zustand oder eine Störung, die mit VGF in Verbindung steht, beruhend auf der Gegenwart oder der Menge der Expression des VGF-Polypeptids in der Körperflüssigkeit zur Verfügung gestellt. In

einer bevorzugten Ausführungsform ist das Tier ein Säugetier. In einer noch bevorzugteren Ausführungsform ist das Tier ein Mensch.

[0016] Diese und andere Ziele der Erfindung werden unter Berücksichtigung der Beschreibung als Ganzes offensichtlich werden.

Kurze Beschreibung der Abbildungen

[0017] Fig. 1 verdeutlicht das Körpergewicht von VGF-Knockout-Mäusen nach der Verabreichung von VGF-1a (SEQ ID Nr.: 2). Die Verabreichung von VGF-1a wurde nach 5 Tagen beendet (wie durch den Pfeil angedeutet);

[0018] Fig. 2 verdeutlicht die Antikörpertitermengen eines Kaninchens, das mit VGF-1 injiziert wurde (SEQ ID Nr.: 3);

[0019] Fig. 3 verdeutlicht die Antikörpertitermengen eines Kaninchens, das mit VGF-2 injiziert wurde (SEQ ID Nr.: 4).

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

[0020] Die hierin verwendeten Abschnittsüberschriften dienen nur Ordnungszwecken und sollen nicht als beschränkend für den hierin beschriebenen Gegenstand interpretiert werden.

Definitionen

[0021] Der Begriff „VGF-Polypeptid" bezeichnet ein Polypeptid, das jede der in Tabelle 1 dargestellten Aminosäuresequenzen und hierin beschriebene verwandte Polypeptide enthält. Verwandte Polypeptide umfassen VGF-Polypeptidfragmente, Orthologe, Varianten und Derivate, die mindestens ein Charakteristikum einer beliebigen der VGF-Polypeptide aufweist, die in SEQ ID Nr.: 1, SEQ ID Nr.: 2, SEQ ID Nr.: 3, SEQ ID Nr.: 4, SEQ ID Nr.: 5, SEQ ID Nr.: 6, SEQ ID Nr.: 7, SEQ ID Nr.: 8, SEQ ID Nr.: 9 oder SEQ ID Nr.: 10 dargestellt sind. Die VGF-Polypeptide können reife Polypeptide, wie hierin definiert sein und können, abhängig von dem Verfahren, mit dem sie hergestellt werden, einen Amino-terminalen Methioninrest aufweisen oder nicht aufweisen.

Tabelle 1

VGF-Polypeptide

VGF-Polypeptid	Aminosäuresequenz (SEQ ID)
VGF-1	AQEEADAEERRLQEQEELENYIEHVLLHRP (SEQ ID Nr.: 1)
VGF 1a	AQEEADAEE (SEQ ID Nr.: 2)
VGF 1b	LQEQEELENYIEHVLLHRP (SEQ ID Nr.: 3)
VGF 2	LEGSFLGGSEAGERLLQQGLAQVEA (SEQ ID Nr.: 4)

VGF 3	SQEEAPGH (SEQ ID Nr.: 5)
VGF 4	HFHHALPPARHHPDLEAQA (SEQ ID Nr.: 6)
VGF 5	QAEATRQAAAQEERLADLASDLLLQYLLQGGARQRDLGGRGLQE TQQERENEREEEAEQE (SEQ ID Nr.: 7)
VGF 6	GGGEDEVGEEDEEAAEAEAEAEEAERARQNALLFAEEEDGEAGA ED (SEQ ID Nr.: 8)
VGF 7	DAEGTEEGGEEDDDDEEMDPQTIDSLIELSTKLHLPADDVVSSII EEVEE (SEQ ID Nr.: 9)
VGF 8	NAPPEPVPPPRAAPAPTHVRSPQPPPPAPARDELPDWNEVLPPW DREEDEVFPPGPYHPFPNYIRPRTLQPPASS (SEQ ID Nr.: 10)

[0022] Der Begriff „VGF-Polypeptidfragment" bezeichnet ein Polypeptid, das eine Verkürzung am Amino-Terminus und/oder eine Verkürzung am Carboxy-Terminus eines der VGF-Polypeptide aufweist, die in SEQ ID Nr.: 1, SEQ ID Nr.: 2, SEQ ID Nr.: 3, SEQ ID Nr.: 4, SEQ ID Nr.: 5, SEQ ID Nr.: 6, SEQ ID Nr.: 7, SEQ ID Nr.: 8, SEQ ID Nr.: 9 oder SEQ ID Nr.: 10 dargestellt sind. Der Begriff „VGF-Polypeptidfragmente" bezeichnet auch Amino-terminale und/oder Carboxy-terminale Verkürzung der VGF-Polypeptidorthologe, -varianten oder -derivate. Die VGF-Polypeptidfragmente können aus alternativer RNA-Spaltung oder von in vivo Proteaseaktivität entstehen. Solche VGF-Polypeptidfragmente können gegebenenfalls einen Amino-terminalen Methioninrest umfassen. Es wird erkannt werden, daß solche Fragmente verwendet werden können, um beispielsweise Antikörper gegen VGF-Polypeptide zu erzeugen.

[0023] Der Begriff „VGF-Polypeptidortholog" bezeichnet ein Polypeptid aus einer anderen Spezies, das zu einem beliebigen der VGF-Polypeptide, wie in den SEQ ID Nr.: 1, SEQ ID Nr.: 2, SEQ ID Nr.: 3, SEQ ID Nr.: 4, SEQ ID Nr.: 5, SEQ ID Nr.: 6, SEQ ID Nr.: 7, SEQ ID Nr.: 8, SEQ ID Nr.: 9 oder SEQ ID Nr.: 10 dargestellt, korrespondiert. Beispielsweise werden Mäuse und menschliche VGF-Polypeptide als Orthologe zueinander angesehen.

[0024] Der Begriff „VGF-Polypeptidvarianten" bezeichnet VGF-Polypeptide, die Aminosäuresequenzen aufweisen, die eine oder mehrere Aminosäuresequenzsubstitutionen (konservative, nicht-konservative oder Kombinationen davon), Deletion (wie interne Deletion und/oder VGF-Polypeptidfragmente) und/oder Additionen (wie interne Additionen und/oder VGF-Fusionspolypeptide) im Vergleich zu einem beliebigen der VGF-Polypeptide, die in SEQ ID Nr.: 1, SEQ ID Nr.: 2, SEQ m Nr.: 3, SEQ ID Nr.: 4, SEQ ID Nr.: 5, SEQ ID Nr.: 6, SEQ ID Nr.: 7, SEQ ID Nr.: 8, SEQ ID Nr.: 9 oder SEQ ID Nr.: 10 dargestellt sind, aufweisen. Varianten können natürlich vorkommen (z.B. VGF-Poylpeptidallelvarianten oder VGF-Polypeptidorthologe) oder können künstlich hergestellt sein.

[0025] Der Begriff „VGF-Polypeptidderivate" bezeichnet beliebige VGF-Polypeptide, wie in den SEQ ID Nr.: 1, SEQ ID Nr.: 2, SEQ ID Nr.: 3, SEQ ID Nr.: 4, SEQ ID Nr.: 5, SEQ ID Nr.: 6, SEQ ID Nr.: 7, SEQ ID Nr.: 8, SEQ ID Nr.: 9 oder SEQ ID Nr.: 10 dargestellt oder VGF-Polypeptidfragmente, -orthologe oder -varianten, wie hierin definiert, die chemisch modifiziert worden sind. Chemische Modifikationen können beispielsweise die kovalente Koppelung eines oder mehrerer Polymeren, die wasserlösliche Polymere, N-verknüpfte oder O-verknüpfte Kohlenhydrate, Zucker und Phosphate umfassen aber nicht darauf beschränkt sind, sein. Die VGF-Polypeptidderivate werden in einer Weise modifiziert, die von natürlich vorkommenden VGF-Polypeptid verschieden ist, entweder in der Art oder dem Ort der an das Polypeptid angefügten Moleküle. Die VGF-Polypeptidderivate umfassen des weiteren VGF-Polypeptide, die eine Deletion von einer oder mehreren chemischen Gruppen aufweisen, die natürlicherweise an ein VGF-Polypeptid angefügt sind.

[0026] Der Begriff „reifes VGF-Polypeptid" bezeichnet ein VGF-Polypeptid, dem eine Führungssequenz fehlt. Ein reifes VGF-Polypeptid kann auch andere Modifikationen, wie proteolytische Verarbeitung des Amino-Terminus (mit oder ohne Führungssequenz) und/oder des Carboxy-Terminus, Abspaltung kleinerer Polypeptide von einem größeren Vorläufer, N-verknüpfte und/oder O-verknüpfte Glykosylierung und ähnliches umfassen.

[0027] Der Begriff „VGF-Fusionspolypeptid" bezeichnet eine Fusion von einer oder mehreren Aminosäuren (wie heterologe Peptide oder Polypeptide) am Amino- oder Carboxy-Terminus eines VGF-Polypeptids, -frag-

ments, -orthologs, -variante oder -derivats.

[0028] Der Begriff „biologisch aktive VGF-Polypeptide" bezeichnet VGF-Polypeptide, die mindestens eine Aktivität aufweisen, die charakteristisch für ein Polypeptid ist, das eine Aminosäuresequenz, wie in den SEQ ID Nr.: 1, SEQ ID Nr.: 2, SEQ ID Nr.: 3, SEQ ID Nr.: 4, SEQ ID Nr.: 5, SEQ 11 Nr.: 6, SEQ I>D Nr.: 7, SEQ ID Nr.: 8, SEQ ID Nr.: 9 oder SEQ ID Nr.: 10 dargestellt, aufweist. Zusätzlich kann ein VGF-Polypeptid als ein Immunogen aktiv sein, das bedeutet, daß das VGF-Polypeptid mindestens ein Epitop enthält, gegen das Antikörper erzeugt werden können.

[0029] Der Begriff „isoliertes Polypeptid" bezeichnet ein Polypeptid der vorliegenden Erfindung, das (1) von mindestens etwa 50% der Polynucleotide, Lipide, Kohlenhydrate oder anderen Materialien, mit den es natürlicherweise zusammen gefunden wird, wenn es aus der Ursprungszelle isoliert wird, getrennt ist, (2) nicht (durch kovalente oder nicht-kovalente Wechselwirkung) mit einem oder einem Teil der Polypeptide verbunden ist, mit dem das „isolierte Polypeptid" in der Natur verknüpft ist, (3) operativ (durch kovalente oder nicht-kovalente Wechselwirkung) mit einem Polypeptid verknüpft ist, mit dem es nicht in der Natur verknüpft ist oder (4) nicht in der Natur vorkommt. Vorzugsweise ist das isolierte Polypeptid im wesentlichen frei von allen anderen kontaminierenden Polypeptiden oder anderen Kontaminanten, die in der natürlichen Umgebung gefunden werden, die seine therapeutische, diagnostische, vorbeugende oder Nutzung für die Forschung beeinträchtigen würden.

[0030] Der Begriff „Vektor" wird verwendet, um jedes Molekül zu bezeichnen (z.B. Nukleinsäure, Plasmid oder Virus), das verwendet wird, um kodierende Informationen in eine Wirtszelle zu übertragen.

[0031] Der Begriff „Expressionsvektor" bezeichnet einen Vektor, der für die Transformation einer Wirtszelle geeignet ist und Nukleinsäuresequenzen enthält, die die Expression von eingefügten heterologen Nukleinsäuresequenzen steuern und/oder kontrollieren. Die Expression umfaßt, ist aber nicht eingeschränkt auf Vorgänge, wie die Transkription, die Translation und das RNA-Spalten, wenn Introns vorhanden sind.

[0032] Der Begriff „Wirtszelle" wird verwendet, um eine Zelle zu bezeichnen, die transformiert worden ist oder dazu in der Lage ist, mit einer Nukleinsäuresequenz transformiert zu werden und dann das ausgewählte interessierende Gen zu exprimieren. Der Begriff umfaßt die Nachkommen dieser Elternzelle unabhängig davon, ob der Nachkomme in der Morphologie oder in der genetischen Zusammensetzung zu dem ursprünglichen Elternteil identisch ist, so lange das ausgewählte Gen vorhanden ist.

[0033] Der Begriff „Identität" bezeichnet, wie im Stand der Technik bekannt, den Zusammenhang zwischen Sequenzen zweier oder mehrerer Polypeptidmoleküle oder zweier oder mehrerer Nukleinsäuremoleküle, wie durch den Vergleich der Sequenzen, bestimmt. Im Stand der Technik bedeutet „Identität" auch den Grad der Sequenzverwandtschaft zwischen zwei Polypeptid- bzw. Nukleinsäuremolekülen, wie durch ein Abgleich zwischen Ketten von zwei oder mehreren Nukleotid- oder zwei oder mehr Aminosäuresequenzen bestimmt. Die „Identität" mißt den Prozentsatz der identischen Übereinstimmungen zwischen der kleineren der zwei oder mehreren Sequenzen mit einer Anordnung die Lücken zuläßt (wenn vorhanden) bezeichnet durch das jeweilige mathematische Modell oder Computerprogramm (d.h. die „Algorithmen").

[0034] Der Begriff „Ähnlichkeit" ist ein verwandtes Konzept, im Gegensatz zu „Identität" bezeichnet „Ähnlichkeit" aber den Grad der Verwandtschaft, der sowohl identische Übereinstimmung als auch konservativ ersetzte Übereinstimmungen umfaßt. Wenn Polypeptidsequenzen, beispielsweise 10/20 identische Aminosäuren aufweisen und der Rest alles nicht-konservative Ersetzungen sind, dann würde sowohl der Prozentsatz der Identität als auch der Ähnlichkeit 50% betragen. Wenn es in demselben Beispiel fünf weitere Positionen gibt, bei denen konservative Substitutionen vorliegen, dann bliebe der Prozentsatz der Identität 50%, aber der Prozentsatz der Ähnlichkeit wäre 75% (15/29). Daher wird in Fällen, bei denen konservative Ersetzungen vorliegen der Prozentsatz der Ähnlichkeit zwischen zwei Polypeptiden größer sein als der Prozentsatz der Identität zwischen diesen zwei Polypeptiden.

[0035] Der Begriff „Nukleinsäuresequenz" oder „Nukleinsäuremoleküle" bezeichnet eine DNA- oder RNA-Sequenz. Der Begriff umfaßt Moleküle, die aus einem beliebigen der bekannten Basenanaloge der DNA und RNA gebildet sind, wie, aber nicht eingeschränkt auf 4-Acetylcytosin, 8-Hydroxy-N6-methyladenosin, Aziridinyl-cytosin, Pseudoisocytosin, 5-(Carboxyhydroxymethyl)uracil, 5-Fluoruracil, 5-Bromuracil, 5-Carboxymethylaminomethyl-2-thiouracil, 5-Carboxy-methylaminomethyluracil, Dihydrouracil, Inosin, N6-iso-Pentenyladenin, 1-Methyladenin, 1-Methylpseudouracil, 1-Methylguanin, 1-Methylinosin, 2,2-Dimethyl-guanin, 2-Methyladenin, 2-Methylguanin, 3-Methylcytosin, 5-Methylcytosin, N6-Methyladenin, 7-Methylguanin, 5-Methylaminomethylu-

racil, 5-Methoxyamino-methyl-2-thiouracil, beta-D-Mannosyqueosin, 5'-Methoxycarbonyl-methyluracil, 5-Methoxyuracil, 2-Methylthio-N6-isopentenyladenin, Uracil-5-oxyessigsäuremethylester, Uracil-5-oxyessigsäure, Oxybutoxosin, Pseudouracil, Queosin, 2-Thiocytosin, 5-Methyl-2-thiouracil, 2-Thiouracil, 4-Thiouracil, 5-Methyluracil, N-Uracil-5-oxyessigsäuremethylester, Uracil-5-oxyessigsäure, Pseudouracil, Queosin, 2-Thiocytosin und 2,6-Diaminopurin.

[0036] Der Begriff „natürlich vorkommend" oder „nativ", wenn im Zusammenhang mit biologischen Materialien, wie Nukleinsäuremolekülen, Polypeptiden, Wirtszellen und ähnlichen, verwendet, bezeichnen Materialien, die in der Natur gefunden werden und die nicht durch die Menschen verändert werden. Gleichermaßen bezeichnen „nicht natürlich vorkommend" oder „nicht nativ", wie hierin verwendet, ein Material, das nicht in der Natur gefunden wird oder das durch die Menschen strukturell modifiziert oder synthetisiert worden ist.

[0037] Der Begriff „wirksam verknüpft" wird hierin verwendet, um eine Anordnung von angrenzenden Sequenzen zu bezeichnen, wobei die angrenzenden Sequenzen, die so beschrieben werden, angeordnet oder zusammengesetzt sind, so daß sie ihre übliche Funktion erfüllen. Somit kann eine flankierende Sequenz, die wirksam mit einer kodierenden Sequenz verknüpft ist, dazu in der Lage sein, die Replikation, die Transkription und/oder die Translation der kodierenden Sequenz zu bewirken. Beispielsweise ist eine kodierende Sequenz operativ mit einem Promotor verknüpft, wenn der Promotor dazu in der Lage ist, die Transkription dieser kodierenden Sequenz zu steuern. Eine flankierende Sequenz muß nicht mit der kodierenden Sequenz zusammenhängen, so lange sie richtig funktioniert. So können beispielsweise dazwischen liegende, untranslatierte, aber transkribierte Sequenzen zwischen einer Promotorsequenz und der kodierenden Sequenz vorhanden sein und die Promotorsequenz kann immer noch als mit der kodierenden Sequenz „wirksam verknüpft" angesehen werden.

[0038] Die Begriffe „wirksame Menge" und „therapeutisch wirksame Mengen" bezeichnen jeder die Menge des VGF-Polypeptids, das verwendet wird, um eine beobachtbare Menge einer oder mehrere biologischer Wirkungen der hierin beschriebenen VGF-Polypeptide zu unterstützen.

[0039] Der Begriff „pharmazeutisch annehmbarer Träger" oder „physiologisch annehmbarer Träger", wie hierin verwendet, bezeichnet ein oder mehrere Formulierungsmaterialien, die für das Erreichen oder Verbessern der Verabreichung des VGF-Polypeptids oder VGF-selektiver Bindungsmittel als pharmazeutische Zusammensetzung geeignet sind.

[0040] Der Begriff „selektives Bindungsmittel" bezeichnet ein Molekül oder Moleküle, die eine Spezifität für ein VGF-Polypeptid aufweisen. Wie hierin verwendet, bezeichnen die Begriffe „spezifisch" und „Spezifität" die Fähigkeit des selektiven Bindungsmittels an VGF-Polypeptide zu binden und an nicht-VGF-Poylpeptide zu binden. Es wird jedoch erkannt werden, daß selektive Bindungsmittel auch an VGF-Orthologe binden können.

[0041] Der Begriff „Transduktion" wird hierin verwendet, um den Transfer von Genen aus einem Bakterium in ein anderes, üblicherweise durch ein Phagen zu bezeichnen. „Transduktion" bezeichnet auch den Erwerb und den Transfer prokaryotischer zellulärer Sequenzen durch Retroviren.

[0042] Der Begriff „Transfektion" wird verwendet, um die Aufnahme fremder oder exogener DNA durch eine Zelle zu bezeichnen und eine Zelle ist „transfiziert" worden, wenn die exogenen DNA in das Innere der Zellmembran eingeführt worden ist. Eine Anzahl von Transfektionsverfahren sind gut im Stand der Technik bekannt und werden hierin offenbart. Siehe z.B., Graham et al., 1973, Virology 52:456; Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratories, 1989); Davis et al., Basic Methods in Molecular Biology (Elsevier, 1986); und Chu et al., 1981, Gene 13:197. Diese Verfahren können verwendet werden, um eine oder mehrere exogene DNA-Einheiten in geeignete Wirtszellen einzuführen.

[0043] Der Begriff „Transformation", wie hierin verwendet, bezeichnet eine Änderung in den genetischen Charakteristika einer Zelle und eine Zelle ist transformiert worden, wenn sie dahingehend modifiziert worden ist, daß sie neue DNA enthält. Beispielsweise ist eine Zelle transformiert, wenn sie im Vergleich zu ihrem natürlichen Zustand genetisch modifiziert vorliegt. Nach der Transkription oder Transduktion kann die transformierende DNA durch das physikalische Einfügen in das Chromosom der Zelle mit der der Zelle rekombinieren, kann transient als ein episomales Element ohne daß sie repliziert wird, erhalten bleiben oder kann unabhängig als ein Plasmid replizieren. Eine Zelle wird dann als stabil transformiert angesehen, wenn die DNA mit der Teilung der Zelle repliziert wird.

[0044] Konservative Veränderungen der Aminosäuresequenz eines VGF-Polypeptids wird ein Polypeptid erzeugen, das funktionale und chemische Eigenschaften aufweist, die denen des VGF-Polypeptids ähnlich sind. Im Gegensatz dazu können wesentliche Veränderungen in den funktionalen und/oder chemischen Eigenschaften der VGF-Polypeptide durch die Auswahl von Substutionen in der Aminosäuresequenz des VGF-Polypeptids erhalten werden, die sich wesentlich in ihrer Wirkung auf den Erhalt (a) der Struktur des molekularen Rückgrats in dem Bereich der Substitution, beispielsweise als Faltblatt oder als helikale Konformation, (b) der Ladung oder der Hydrophobizität des Moleküls an der Zielstelle oder (c) dem Volumen der Seitenkette unterscheiden.

[0045] Beispielsweise kann eine „konservative Aminosäuresubstitution" eine Substitution eines nativen Aminosäurerests mit einem nicht-nativen Rest beinhalten, so daß es nur einen geringen oder keinen Effekt auf die Polarität oder die Ladung des Aminosäurerests dieser Position gibt. Des weiteren kann jeder native Rest in dem Polypeptid auch durch Alanin substituiert werden, wie es vorher für die „Alaninscannmutagenese" beschrieben worden ist.

[0046] Konservative Aminosäuresubstitution umfassen auch nicht-natürlich vorkommende Aminosäurereste, die typischerweise durch chemische Peptidsynthese statt durch Synthese in biologischen Systemen eingeführt werden. Diese umfassen Peptidomimetics und andere umgekehrte oder invertierte Formen der Aminosäurereste.

[0047] Natürlich vorkommende Reste können beruhend auf übereinstimmenden Eigenschaften der Seitenketten in Klassen unterteilt werden:

1) hydrophobisch: Norleucin, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
2) neutral hydrophil: Cys, Ser, Thr;
3) sauer: Asp, Glu;
4) Basisch: Asn, Gln, His, Lys, Arg;
5) Reste, die die Kettenorientierung beeinflussen: Gly, Pro; und
6) Aromatisch: Trp, Tyr, Phe.

[0048] Beispielsweise können nicht-konservative Substitutionen den Austausch eines Mitglieds einer dieser Klassen gegen ein Mitglied aus einer anderen Klasse beinhalten. Solche ersetzten Reste können im Bereich des VGF-Polypeptids, die zu anderen VGF-Polypeptidorthologen homolog sind, oder in nicht-homologe Bereiche des Moleküls eingeführt werden.

[0049] Wenn solche Änderungen durchgeführt werden, kann eine hydrophatische Indizierung der Aminosäuren berücksichtigt werden. Jeder Aminosäure ist auf Grundlage dieser Hydrophobizität und ihrer Ladungseigenschaften ein hydrophatischer Index zugewiesen. Die hydrophatischen Indizes sind: Isoleucin (+4,5); Valin (+4,2); Leucin (+3,8); Phenylalanin (+2,8); Cystein/Cystin (+2,5); Methionin (+1,9); Alanin (+1,8); Glycin (–0,4); Threonin (–0,7); Serin (–0,8); Tryptophan (–0,9); Tyrosin (–1,3); Prolin (–1,6); Histidin (–3,2); Glutamat (–3,5); Glutamin (–3,5); Aspartat (–3,5); Aspargin (–3,5); Lysin (–3,9); und Arginin (–4,5).

[0050] Die Wichtigkeit des hydrophatischen Aminosäureindex beim Übertragen der biologischen Wechselwirkungsfunktion auf ein Protein ist im Stand der Technik allgemein verstanden (Kyte et al., 1982, J. Mol. Biol. 157:105–31). Es ist bekannt, daß bestimmte Aminosäuren gegen andere Aminosäuren ersetzt werden können, die einen ähnlichen hydrophatischen Index oder Wert aufweisen und es kann immer noch dieselbe biologische Aktivität erhalten werden kann. Beim Durchführen von Änderungen beruhend auf dem hydrophatischen Index ist der Ersatz von Aminosäuren, deren hydrophatische Indizes innerhalb von ± 2 liegt, bevorzugt, wobei die innerhalb von ± 1 liegen besonders bevorzugt sind und die innerhalb von ± 0,5 noch mehr besonders bevorzugt sind.

[0051] Es wird auch im Stand der Technik verstanden, daß die Substitution ähnlicher Aminosäuren wirksam auf Grundlage der Hydrophilizität gemacht werden kann, insbesondere wenn das biologisch funktionelle äquivalente Protein oder Peptid, das dadurch erzeugt wird, für die Verwendung in den immunologischen Ausführungsformen, wie im vorliegenden Fall, beabsichtigt ist. Die größte lokale durchschnittliche Hydrophilizität eines Proteins, die durch die Hydrophilizität seiner angrenzenden Aminosäuren bestimmt wird, korreliert mit seiner Immunogenität und Antigenität, d.h. mit einer biologischen Eigenschaft des Proteins.

[0052] Die vorliegenden Hydrophilizitätswerte sind diesen Aminosäureresten zugeordnet worden: Arginin

(+3,0); Lysin (+3,0); Aspartat (+3,0 ± 1); Glutamat (+3,0 ± 1); Serin (+0,3); Aspargin (+0,2); Glutamin (+0,2); Glycin (0); Threonin (–0,4); Prolin (–0,5 ± 1); Alanin (–0,5); Histidin (–0,5); Cystein (–0,1); Methionin (–1,3); Valin (–1,5); Leucin (–1,8); Isoleucin (–1,8); Tyrosin (–2,3); Phenylalanin (–2,5); und Tryptophan (–3,4). Bei der Durchführung von Änderungen beruhend auf ähnlicher Hydrophilizitätswerte ist die Substitution von Aminosäuren, deren Hydrophilizitätswerte innerhalb von ± 2 liegen, bevorzugt die, die innerhalb von ± 1 liegen besonders bevorzugt und die, die innerhalb von ± 0,5 liegen noch mehr besonders bevorzugt sind. Man kann auf Grundlage der Hydrophilizität auch Epitope aus primären Aminosäurensequenzen bestimmen. Diese Regionen werden auch als „epitopische Kernregionen" bezeichnet.

[0053] Gewünschte Aminosäuresubstitutionen (ob konservative oder nicht-konservative) können durch den Fachmann zum Zeitpunkt, an dem solche Substitutionen gewünscht sind, bestimmt werden. Beispielsweise können Aminosäuresubstitutionen verwendet werden, um wichtige Reste des VGF-Polypeptids zu identifizieren oder um die Affinität der hierin beschriebenen VGF-Polypeptide zu erhöhen oder zu verringern. Beispielhafte Aminosäuresubstitutionen sind in der Tabelle II dargestellt.

Tabelle II

Aminosäuresubstitutionen

Originalreste	Beispielhafte Substitutionen	Bevorzugte Substitutionen
Ala	Val, Leu, Ile	Val
Arg	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn	Gln	Gln
Asp	Glu	Glu
Cys	Ser, Ala	Ser
Gln	Asn	Asn
Glu	Asp	Asp
Gly	Pro, Ala	Ala
His	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala Phe, Norleucin	Leu
Leu	Norleucin, Ile Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys	Arg, 1,4-Diamino-buttersäure, Gln, Asn	Arg
Met	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe	Leu, Val, Ile, Ala Tyr	Leu

Pro	Ala	Gly
Ser	Thr, Ala, Cys	Thr
Thr	Ser	Ser
Trp	Tyr, Phe	Tyr
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, Norleucin	Leu

[0054] Der Fachmann wird dazu in der Lage sein, geeignete VGF-Polypeptidvarianten unter Verwendung gut bekannter Verfahren zu bestimmen. Für die Identifizierung geeigneter Bereiche des Moleküls, die geändert werden ohne die biologische Aktivität zu zerstören, kann auf Bereiche abgezielt werden von denen vermutet wird, daß sie für die Aktivität nicht wichtig sind. Beispielsweise kann der Fachmann, wenn ähnliche Polypeptide mit einer ähnlichen Aktivität von derselben Spezies oder aus anderen Spezies bekannt sind, die Aminosäuresequenz des VGF-Polypeptids mit solch ähnlichen Polypeptiden vergleichen. Mit einem solchen Vergleich kann man Reste und Teile des Moleküls identifizieren, die zwischen ähnlichen Polypeptiden konserviert sind. Es wird erkannt werden, daß es für Änderungen in Bereichen des VGF-Moleküls, die im Vergleich zu solch ähnlichen Polypeptiden nicht konserviert sind, weniger wahrscheinlich ist, daß sie die biologische Aktivität und/oder Struktur eines VGF-Polypeptids nachteilig beeinflussen. Der Fachmann wird auch wissen, daß man selbst in relativ konservierten Bereichen chemisch ähnliche Aminosäuren für die natürlich vorkommenden Reste ersetzen kann, während man die Aktivität bewahrt (konservative Aminosäurerestsubstitutionen). Daher können selbst Bereiche, die für die biologische Aktivität oder für die Struktur wichtig sein können, konservativen Aminosäuresubstitutionen unterzogen werden ohne die biologische Aktivität zu zerstören oder ohne die Polypeptidstruktur nachteilig zu beeinflussen.

[0055] Zusätzlich kann der Fachmann Strukturfunktionsuntersuchungen, die Reste der ähnlichen Polypeptiden identifizieren, die für die Aktivität der Struktur wichtig sind, durchsehen. Im Hinblick auf einen solchen Vergleich kann man die Wichtigkeit von Aminosäureresten in einem VGF-Polypeptid vorhersagen, die zu Aminosäureresten korrespondiert, die für die Aktivität oder die Struktur in ähnlichen Polypeptiden wichtig sind. Der Fachmann kann sich für chemisch ähnliche Aminosäuresubstitutionen für solche vorhergesagten wichtigen Aminosäurereste der VGF-Polypeptide entscheiden.

[0056] Der Fachmann kann auch die dreidimensionale Struktur und die Aminosäuresequenz im Verhältnis zu der Struktur in ähnlichen Polypeptiden analysieren. Im Hinblick auf solche Informationen kann der Fachmann die Abgleichung der Aminosäurereste des VGF-Polypeptids im Hinblick auf seine dreidimensionale Struktur voraussagen. Der Fachmann kann sich dafür entscheiden keine radikalen Änderungen der Aminosäurereste durchzuführen, für die vorhergesagt wird, daß sie auf der Oberfläche des Proteins liegen, da solche Reste an wichtigen Wechselwirkungen mit anderen Molekülen beteiligt sein können. Darüber hinaus kann der Fachmann Testvarianten erzeugen, die eine einzelne Aminosäuresubstitution an jedem Aminosäurerest enthalten. Diese Varianten können unter Verwendung dem Fachmann bekannter Aktivitätstestverfahren durchsucht werden. Solche Varianten könnten verwendet werden, um Informationen über geeignete Varianten zu erhalten. Beispielsweise würden, wenn man beobachtet, daß eine Änderung eines bestimmten Aminosäurerestes in einer zerstörten, unerwünscht verringerten oder unangemessenen Aktivität führt, Varianten mit einer solchen Änderung vermeiden. In anderen Worten, beruhend auf den aus solchen Routineexperimenten erhaltenen Informationen könnte der Fachmann ohne weitere die Aminosäuren bestimmen, bei denen weitere Substitutionen entweder allein oder in Kombination mit anderen Mutationen vermieden werden sollten.

[0057] Eine Reihe wissenschaftlicher Publikationen hat sich der Vorhersage der Sekundärstruktur gewidmet. Siehe Moult, 1996, Curr. Opin. Biotechnol. 7:422–27; Chou et al., 1974, Biochemistry 13:222–45; Chou et al., 1974, Biochemistry 113:211–22; Chou et al., 1978, Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol. 47:45–48; Chou et al., 1978, Ann. Rev. Biochem. 47:251-276; und Chou et al., 1979, Biophys. J. 26:367–84. Darüber hinaus sind gegenwärtig Computerprogramme erhältlich, die bei der Vorhersage der Sekundärstruktur behilflich sind. Ein Verfahren für die Vorhersage der Sekundärstruktur beruht auf der Homologiemodellierung. Beispielsweise haben zwei Polypeptide oder Proteine, die eine Sequenzidentität von 30% oder größer oder eine Ähnlichkeit von 40% oder größer aufweisen, häufig ähnliche strukturelle Topologien. Das aktuelle Wachstum der Proteinstrukturdatenbank (PDB) hat eine verbesserte Vorhersagbarkeit der Sekundärstruktur zur Verfügung gestellt, die die Anzahl der möglichen Faltungen innerhalb der Struktur des Polypeptids oder Proteins umfaßt. Siehe Holm

et al., 1999, Nucleic Acids Res. 27:244–47. Es ist vorgeschlagen worden, daß es in einem gegebenen Polypeptid oder Protein eine begrenzte Anzahl von Faltungen gibt und daß, sobald die kritische Anzahl der Strukturen gelöst worden ist, die strukturelle Vorhersage dramatisch genauer werden wird (Brenner et al., 1997, Curr. Opin. Struct. Biol. 7:369–76).

[0058] Zusätzliche Verfahren für das Vorhersagen von Sekundärstruktur umfassen das „Einfädeln" (Jones, 1997, Curr. Opin. Struct. Biol. 7:377–87; Sippl. et al., 1996, Structure 4:15-19), die „Profilanalyse" (Bowie et al., 1991, Science, 253:164–70; Gribskov et al., 1990, Methods Enzymol. 183:146–59; Gribskov et al., 1987, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 84:4355–58) und die „evolutionäre Verknüpfung" (siehe Holm et al., supra, und Brenner et al., supra).

[0059] Die bevorzugten VGF-Polypeptidvarianten umfassen Glykosylierungsvarianten, wobei die Zahl und/oder die Sorte der Glykosylierungsstellen im Vergleich zu der Aminosäuresequenz der VGF-Polypeptide der vorliegenden Erfindung verändert worden sind. In einer Ausführungsform umfassen die VGF-Polypeptidvarianten eine größere oder geringere Anzahl N-verknüpfter Glykosylierungsstellen als die Aminosäuresequenz der VGF-Polypeptide der vorliegenden Erfindung. Eine N-verknüpfte Glykosylierungsstelle ist durch die Sequenz: Asn-X-Ser oder durch Asn-X-Thr charakterisiert, wobei der Aminosäurerest der als X bezeichnet wird jeder Aminosäurerest mit Ausnahme von Prolin sein kann. Die Substitution von Aminosäureresten, um diese Sequenz zu erzeugen, stellt eine mögliche neue Stelle für das Hinzufügen einer N-verknüpften Kohlenhydratkette dar. Alternativ werden Substitutionen, die diese Sequenz beseitigen, eine bestehende N-verknüpfte Kohlenstoffkette entfernen. Es wird auch eine Umordnung der N-verknüpften Kohlenstoffketten zur Verfügung gestellt, bei der eine oder mehrere N-verknüpfte Glykosylierungsstellen (typischerweise die, die natürlicherweise vorkommen) entfernt werden und eine oder mehrere N-verknüpfte Stellen erzeugt werden. Zusätzlich umfassen bevorzugte VGF-Varianten Cysteinvarianten, wobei eine oder mehrere Cysteinreste entfernt oder durch einen anderen Aminosäure ersetzt sein (z.B. Serin) im Vergleich zur Aminosäuresequenz der VGF-Polypeptide der vorliegenden Erfindung. Die Cysteinvarianten sind nützlich, wenn VGF-Polypeptide wie nach der Isolierung der unlöslichen Einschlußkörper, wieder in eine biologisch aktive Konformation, gefaltet werden müssen. Die Cysteinvarianten haben im allgemeinen weniger Cysteinreste als das native Protein und weisen typischerweise eine gerade Anzahl auf, um Wechselwirkungen zwischen ungepaarten Cysteinen zu minimieren.

[0060] Zusätzlich können die VGF-Polypeptide mit einem homologen Polypeptid fusioniert sein, um ein Homodimer zu bilden oder mit einem heterologen Polypeptid, um ein Heterodimer zu bilden. Die heterologen Peptide und Polypeptide umfassen, sind aber nicht eingeschränkt auf ein Epitop, um den Nachweis und/oder die Isolierung des VGF-Fusionspolypeptids zu erlauben; ein Transmembranrezeptorprotein oder einen Teil davon, wie eine extrazelluläre Domäne oder eine Transmembran- und intrazelluläre Domäne; einen Liganden oder einen Teil davon, der an ein Transmembranrezeptorprotein bindet; ein Enzym oder ein Teil davon, das/der katalytisch aktiv ist; ein Poylpeptid oder Peptid, das die Oligomerisierung fördert, wie eine Leucinreißverschlußdomäne; ein Polypeptid oder Peptid, das die Stabilität erhöht, wie eine Immunglobulin-konstante Region; und ein Polypeptid, das eine therapeutische Aktivität aufweist, die anders ist als die, der VGF-Polypeptide der vorliegenden Erfindung.

[0061] Fusionen können entweder am Amino-Terminus oder am Carboxy-Terminus eines VGF-Polypeptids gemacht werden. Die Fusionen können direkt ohne Linker oder Adaptermoleküle sein oder können durch ein Linker oder Adaptermolekül erfolgen. Ein Linker oder Adaptermolekül an ein oder mehrere Aminosäurereste, typischerweise von etwa 20 bis etwa 50 Aminosäurereste aufweisen. Ein Linker oder Adaptermolekül kann auch mit einer Spaltungsstelle für eine DNA-Restriktionsendonuclease oder für eine -protease entworfen werden, um die Trennung der fusionierten Reste zu erlauben. Es wird erkannt werden, daß die Fusionspolypeptide, sobald sie konstruiert sind, gemäß dem hierin beschriebenen Verfahren derivatisiert werden können.

[0062] In einer weiteren Ausführungsform wird ein VGF-Polypeptid an eine oder mehrere Domänen eine Fc-Region menschlichen IgGs fusioniert. Die Antikörper umfassen zwei funktionell unabhängige Teile, eine variable Domäne, die als „Fab" bekannt ist, die Antigen bindet und eine konstante Domäne, die als „Fc" bekannt ist, die an Effektorfunktionen, wie der Komplementaktivierung und dem Angriff durch phagocytotische Zellen beteiligt ist. Ein Fc weist eine lange Serumhalbwertszeit auf, während ein Fab kurzlebig ist. Capon et al., 1989, Nature 337:525–31. Wenn zusammen mit einem therapeutischen Protein konstruiert, kann eine Fc-Domäne eine längere Halbwertszeit zur Verfügung stellen oder solche Funktionen, wie die Fc-Rezeptorverbindung, Protein-A-Bindung, Komplementfixierung und vielleicht sogar plazentalen Transfer aufnehmen. Id. Tabelle III faßt die Verwendung bestimmter im Stand der Technik bekannter Fc-Fusionen zusammen.

Tabelle III

Fc-Fusion mit therapeutischen Proteinen

Form des Fc	Fusionspartner	Therapeutische Möglichkeiten	Zitat
IgGl	N-Terminus des CD30-L	Hodgkin's Erkrankung; anaplastisches Lymphom; T-Zelleukämie	U.S.-Patent Nr. 5,480,981
Mäuse-Fcγ2a	IL-10	anti-inflammatorisch; Transplantatabstoßung	Zheng *et al.*, 1995, *J. Immunol.* 154:5590-600
IgGl	TNF-Rezeptor	septischer Schock	Fisher *et al.*, 1996, *N. Engl. J. Med.* 334:1697-1702; Van Zee *et al.*, 1996, *J. Immunol.* 156:2221-30
IgG, IgA, IgM oder IgE (die erste Domäne ausschließend)	TNF-Rezeptor	Entzündung, Autoimmunerkrankungen	U.S.-Patent Nr. 5,808,029
IgGl	CD4-Rezeptor	AIDS	Capon *et al.*, 1989, *Nature* 337:525-31
IgGl, IgG3	N-Terminus des IL-2	Antikrebs, antiviral	Harvill *et al.*, 1995, *Immunotech.* 1:95-105
IgGl	C-Terminus des OPG	Osteoarthritis; Knochendichte	WO 97/23614
IgGl	N-Terminus des Leptins	Anti-Fettleibigkeit	PCT/US 97/23183, Anmeldetag 11. Dezember 1997
Menschliches IgCγl	CTLA-4	Autoimmunerkrankungen	Linsley, 1991, *J. Exp. Med.*, 174:561-69

[0063] In einem Beispiel kann eine menschliche IgG-Schanier-, CH2- und CH3-Region an entweder dem Amino-Terminus oder Carboxy-Terminus der VGF-Polypeptide unter Verwendung von dem Fachmann bekannten Verfahren fusioniert werden. Das sich ergebende VGF-Fusionspolypeptid kann unter Verwendung einer Protein-A-Affinitätssäule gereinigt werden. Für die Peptide und Proteine, die an eine Fc-Region fusioniert sind, ist gefunden worden, daß sie in vivo eine wesentlich verlängerte Halbwertszeit als das unfusionierte Gegenstück aufweisen. Eine Fusion an eine Fc-Region erlaubt auch die Dimerisierung/Multimerisierung des Fusionspolypeptids. Die Fc-Region kann auch eine natürlich vorkommende Fc-Region sein oder kann verändert werden, um bestimmte Eigenschaften, wie die therapeutischen Eigenschaften, die Zirkulationszeit oder die verringerte Aggregation zu verbessern.

[0064] Die Identität oder Ähnlichkeit verwandter Polypeptide kann ohne weiteres durch bekannte Verfahren berechnet werden. Solche Verfahren umfassen, sind aber nicht eingeschränkt auf die, die in Computational Molecular Biology (A.M. Lesk, Her., Oxford University Press 1988); Biocumputing: Informatics and Genome Projects (D.W. Smith, Her., Academic Press 1993); Computer Analysis of Sequence Data (Teil 1, A.M. Griffin und H.G. Griffin, Heraus., Humana Press 1994); G. von Heinle, Sequence Analysis in Molecular Biology (Academic Press 1987); Sequence Analysis Primer (M. Gribskov und J. Devereux, Heraus., M. Stockton Press 1991); und Carillo et al., 1988, SIAM J. Applied Math., 48:1073, beschrieben werden.

[0065] Bevorzugte Verfahren für die Bestimmung der Identität und/oder Ähnlichkeit sind entworfen worden, um die größte Übereinstimmung zwischen den getesteten Sequenzen zu ergeben. Verfahren, um die Identität und Ähnlichkeit zu bestimmen, sind in öffentlich erhältlichen Computerprogrammen beschrieben. Bevorzugte Computerprogrammvefahren, um die Identität und Ähnlichkeit zwischen zwei Sequenzen zu beschreiben, umfassen, sind aber nicht eingeschränkt auf das GCG-Programmpaket, umfassend GAP (Devereux et al., 1984, Nucleic Acids Res. 12:387; Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI), BLASTP und FASTA (Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol. 215:403–10). Das BLASTX-Programm ist öffentlich vom National Center for Biotechnology Information (NCBI) und anderen Quellen (Altschul et al., BLAST Manual (NCB NLM NIH, Bethesda, MD); Altschul et al., 1990, supra) erhältlich. Der gut bekannte Smith Waterman Algorithmus kann auch verwendet werden, um die Identität zu bestimmen.

[0066] Bestimmte Anordnungsschemata für das Anordnen von zwei Aminosäuresequenzen können zur Übereinstimmung einer kurzen Region von zwei Sequenzen führen und diese kleine angeordnete Region kann eine sehr hohe Sequenzidentität aufweisen, obwohl es keinen beachtenswerten Zusammenhang zwischen den zwei Sequenzen voller Längen gibt. Dementsprechend wird in einer bevorzugten Ausführungsform das ausgewählte Anordnungsverfahren (GAP-Programm) zu einer Anordnung führen, die sich über mindestens 50 zusammenhängende Aminosäuren des beanspruchten Polypeptids erstreckt.

[0067] Beispielsweise sind, unter Verwendung des Computeralgorithmus GAP (Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI), zwei Polypeptide, für die der Prozentsatz der Sequenzidentität bestimmt werden soll, für die optimale Übereinstimmung der jeweiligen Aminosäuren angeordnet (die „übereinstimmende Spanne", wie durch den Algorithmus bestimmt). Eine Strafe für eine Lückenöffnung (die als das 3X der Durchschnittsdiagonale berechnet wird; die „Durchschnittsdiagonale" ist der Durchschnitt der Diagonale des Vergleichs der verwendeten Matrix; die „Diagonale" ist der Wert oder die Zahl, die jeder perfekten Aminosäurenübereinstimmung durch die Vergleichsmatrix zugeordnet wird) und eine Strafe für eine Lückenverlängerung (die üblicherweise das 0,1X der Strafe für die Lückenöffnung ist), sowie eine Vergleichsmatrix, wie PAM 250 oder BLOSUM 62 werden im Zusammenhang mit dem Algorithmus verwendet. Eine Standardvergleichsmatrix wird auch durch den Algorithmus verwendet (siehe Dayhoff et al., 5 Atlas of Protein Sequence and Structure (Supp. 3 1978)(PAM 250 Vergleichsmatrix); Henikoff et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci USA 89:10915–19 (BLOSUM 62 Vergleichsmatrix)).

[0068] Die bevorzugten Parameter für den Polypeptidsequenzvergleich umfassen die folgenden:
Algorithmus: Needleman und Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48:443–53;
Vergleichsmatrix: BLOSUM 62 (Henikoff et al., supra);
Strafe für die Lücke: 12
Strafe für die Lückenlänge: 4
Schwellenwert der Gleichheit: 0

[0069] Das GAP-Programm ist mit den obigen Parametern nützlich. Die zuvor erwähnten Parameter sind die Standardparameter für Polypeptidvergleiche (zusammen mit keiner Strafe für Lücken am Ende) unter Verwendung des GAP-Algorithmus.

[0070] Andere beispielhafte Algorithmen, Strafen für Lückenöffnung, Strafen für Lückenverlängerung, Vergleichsmatrizes und Schwellenwerte für Ähnlichkeit können verwendet werden, umfassend die, die in dem Programmhandbuch, Wisconsin Package, Version 9, September 1997, dargestellt sind. Die jeweils zu machenden Auswahlen werden dem Fachmann offensichtlich sein und werden von dem spezifisch durchzuführenden Vergleich abhängen, wie Protein-zu-Protein, Protein-zu-DNA; und gegebenenfalls davon, ob der Vergleich zwischen gegebenen Sequenzpaaren (in welchem Fall GAP oder BestFit im allgemeinen bevorzugt werden) oder zwischen einer Sequenz und einer großen Datenbank von Sequenzen stattfindet (in welchem Fall FASTA oder BLASTA bevorzugt sind).

Nukleinsäuremoleküle

[0071] Die Nukleinsäuremoleküle, die für ein Polypeptid kodieren, das die Aminosäuresequenz eines VGF-Polypeptids umfaßt, kann über eine Vielzahl von Wegen, umfassend ohne Beschränkung die chemische Synthese, cDNA oder genomische Bibliotheksdurchsuchung, Expressionsbibliotheksdurchsuchung und/oder PCR-Vervielfältigung von cDNA erhalten werden.

[0072] Die hierin verwendeten rekombinanten DNA-Verfahren sind im allgemeinen die, die in Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) und Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., Heraus., Green Publishers Inc. und Wiley and Sons 1994) dargestellt werden.

[0073] Die Nukleinsäuremoleküle, die für die Aminosäuresequenz der VGF-Polypeptide kodieren, können durch Expressionsklonierung identifiziert werden, daß den Nachweis positiver Klone, beruhend auf einer Eigenschaft des exprimierten Proteins verwendet. Typischerweise werden Nukleinsäurebibliotheken durch die Bindung eines Antikörpers oder eines anderen Bindungspartners (z.B. eines Rezeptors oder Liganden) der klonierten Proteine, die exprimiert werden und auf der Oberfläche einer Wirtszelle präsentiert werden, durchsucht. Die Antikörper oder der Bindungspartner wird mit einer nachweisbaren Markierung modifiziert, um die Zellen zu identifizieren, die den gewünschten Klon exprimieren.

[0074] Rekombinante Expressionstechniken, die in Übereinstimmung mit der unten offenbarten Beschreibung durchgeführt werden, können befolgt werden, um diese Polynukleotide zu erzeugen und die kodierten Polypeptide zu exprimieren. Beispielsweise kann ein Fachmann durch das Einfügen einer Nukleinsäuresequenz, die für die Aminosäuresequenz eines VGF-Polypeptids kodiert, in einen geeigneten Vektor ohne weiteres große Mengen der gewünschten Nukleotidsequenz erzeugen. Die Sequenzen können dann verwendet werden, um Nachweissonden oder Vervielfältigungsprimer zu erzeugen. Alternativ kann ein Polynukleotid, das für die Aminosäuresequenz eines VGF-Polypeptids kodiert, in einen Expressionsvektor eingefügt werden. Durch Einführen des Expressionsvektors in einen geeigneten Wirt kann das kodierte VGF-Polypeptid in großen Mengenhergestellt werden.

[0075] Ein weiteres Verfahren zum Erhalt einer geeigneten Nukleinsäuresequenz ist die Polymerasekettenreaktion (PCR = „polymerase chain reaction"). In diesem Verfahren wird die cDNA aus Poly(A)+RNA oder Gesamt-RNA unter Verwendung des Enzymsreversetranskriptase hergestellt. Zwei Primer, typischerweise komplementär zu zwei getrennten Regionen der cDNA, die für die Aminosäuresequenz eines VGF-Polypeptids kodiert, werden dann zu der cDNA zusammen mit einer Polymerase, wie einer Taq-Polymerase, hinzugefügt und die Polymerase vervielfältigt die cDNA-Region zwischen den zwei Primern.

[0076] Ein anderes Mittel für die Zubereitung eines Nukleinsäuremoleküls, das für die Aminosäuresequenz eines VGF-Polypeptids kodiert, ist die chemische Synthese unter Verwendung von Verfahren, die dem Fachmann wohl bekannt sind, wie die, die durch Engels et al., 1989, Angew. Chem. Intl. Ed. 28:716–34, beschrieben werden. Diese Verfahren umfassen unter anderem die Phosphotriester-, Phosphoramidit- und H-Phosphonatverfahren für die Nukleinsäuresynthese. Ein bevorzugtes Verfahren für eine solche chemische Synthese ist die Polymer-unterstützte Synthese unter Verwendung von üblicher Phosphoramiditchemie. Typischerweise wird die DNA, die für die Aminosäuresequenz eines VGF-Polypeptids kodiert, eine Länge von mehreren 100 Nukleotiden aufweisen. Nukleinsäuren, die größer als etwa 100 Nukleotide sind, können unter Verwendung dieser Verfahren als mehrere Fragmente synthetisiert werden. Die Fragmente können dann zusammen ligiert werden, um eine Nukleotidsequenz eines VGF-Gens voller Länge zu bilden. Üblicherweise wird das DNA-Fragment, das für den Amino-Terminus des Polypeptids kodiert, ein ATG aufweisen, das für einen Methioninrest kodiert. Dieses Methionin kann in der reifen Form des VGF-Polypeptids abhängig davon, ob das Polypeptid, das in der Wirtszelle hergestellt wird, dafür entworfen wurde aus der Zelle sekretiert zu werden, vorhanden sein oder nicht vorhanden sein. Andere Verfahren, die dem Fachmann bekannt sind, können gleichermaßen verwendet werden.

[0077] In bestimmten Ausführungsformen enthalten Nukleinsäurevarianten Codons, die für die optimale Expression eines VGF-Polypeptids in einer gegebenen Wirtszelle verändert sind. Die bestimmten Codonveränderungen werden von dem VGF-Polypeptid der für die Expression ausgewählten Wirtszelle abhängen. Solche „Codonoptimierung" kann durch eine Vielzahl von Verfahren durchgeführt werden, beispielsweise durch die Auswahl von Codons, die für die Verwendung von hoch exprimierten Genen in einer gegebenen Wirtszelle bevorzugt sind. Computeralgorithmen, die Codonhäufigkeitstabellen, wie „Eco_high.Cod.", für die Codonpreferenz hoch expimierter bakterieller Gene enthalten, können verwendet werden und werden durch das University

of Wisconsin Package Version 9.0 (Genetics Computer Group, Madison, WI) zur Verfügung gestellt. Andere nützliche Codonfrequenztabellen umfassen „Celegans_high.cod", „Celegans_low.cod", „Drosophila_high.cod", Human_high.cod", „Maize_high.cod" und „Yeast_high.cod".

[0078] In einigen Fällen kann es wünschenswert sein Nukleinsäuremoleküle, die für VGF-Polypeptidvarianten kodieren, herzustellen. Nukleinsäuremoleküle, die für Varianten kodieren, können unter Verwendung von ortsgerichteter Mutagenese, PCR-Vervielfältigung oder anderen geeigneten Verfahren, bei denen der (die) Primer die gewünschte Punktmutationen aufweisen, hergestellt werden (siehe Sambrook et al., supra, und Ausubel et al., supra, für Beschreibungen von Mutagenesetechniken). Die chemische Synthese unter Verwendung der durch Engels et al., supra beschriebenen Verfahren kann auch verwendet werden, um solche Varianten herzustellen. Andere Verfahren, die dem Fachmann bekannt sind, können gleichermaßen verwendet werden.

Vektoren und Wirtszellen

[0079] Ein Nukleinsäuremolekül, das für die Aminosäuresequenz eines VGF-Polypeptids kodiert, wird unter Verwendung von Standardligationsverfahren in einen geeigneten Expressionsvektor eingeführt. Der Vektor wird typischerweise ausgewählt, um in der jeweils verwendeten Wirtszelle funktional zu sein (d.h. der Vektor ist mit der Wirtszellmaschinerie kompatibel, so daß die Amplifikation des Gens und/oder die Expression des Gens auftreten kann). Ein Nukleinsäuremolekül, das für die Aminosäuresequenz eines VGF-Polypeptids kodiert, kann in prokaryotischen, Hefe-, Insekten- (Baculovirussystem) und/oder eukaryotischen Wirtszellen amplifiziert/exprimiert werden. Die Auswahl der Wirtszelle wird zum Teil davon abhängen, ob das VGF-Polypeptid post-translational modifiziert sein soll (z.B. glykosyliert und/oder phosphoryliert). Wenn dies so ist, sind Hefen, Insekten oder Säugetierwirtszellen bevorzugt. Für einen Überblick über Expressionvektoren siehe Meth. Enz., Bd. 185 (D.V. Goeddel, Heraus., Academic Press 1990.

[0080] Typischerweise werden die Expressionsvektoren, die in einer der Wirtszellen verwendet werden, Sequenzen für den Plasmiderhalt und für die Klonierung und Expression exogener Nukleotidsequenzen enthalten. Solche Sequenzen, die hierin gemeinsam als „flankierende Sequenzen" bezeichnet werden, werden in bestimmten Ausführungsformen typischerweise ein oder mehrere der folgenden Nukleotidsequenzen enthalten: einen Promotor, einen oder mehrere Enhancersequenzen, ein Replikationsursprung, eine transkriptionelle Terminierungssequenz, eine vollständige Intronsequenz, die eine Donor- und eine Acceptorsplicestelle enthält, eine Sequenz, die für eine Führungssequenz für die Polypeptidsekretion kodiert, eine Ribosomenbindungsstelle, eine Polyadenylierungssequenz, eine Polylinkerregion für das Einführen der Nukleinsäure, die für das zu exprimierende Polypeptid kodiert, und ein selektierbares Markierungselement. Jede dieser Sequenzen wird unten diskutiert.

[0081] Gegebenenfalls kann der Vektor eine „Markierungs"-kodierende Sequenz enthalten, d.h. ein Oligonukleotidmolekül, das am 5' oder 3'-Ende der VGF-Polypeptid-kodierenden Sequenz angeordnet ist; die Oligonukleotidsequenz für polyHis kodiert (wie ein hexaHis) oder eine andere „Markierung", wie FLAG, HA (Hämaglutinin Influenzavirus) oder myc, für das es kommerziell erhältliche Antikörper gibt. Diese Markierung wird typischerweise während der Expression des Polypeptids an das Polypeptid fusioniert und kann als ein Mittel für die Affinitätsreinigung des VGF-Polypeptids von der Wirtszelle dienen. Die Affinitätsreinigung kann beispielsweise durch Säulenchromatographie unter Verwendung von Antikörpern gegen die Markierung als Affinitätsmatrix erreicht werden. Jedenfalls kann die Markierung anschließend von dem gereinigten VGF-Polypeptid durch verschiedene Mittel, wie durch die Verwendung von Peptidasen für die Spaltung entfernt werden.

[0082] Flankierende Sequenzen können homolog (d.h. von derselben Spezies und/oder Stamm wie die Wirtszelle), heterolog (d.h. von einer Spezies, die eine andere ist als die Wirtszellspezies oder der Stamm), hybrid (d.h. eine Kombination von flankierenden Sequenzen aus mehr als einer Quelle) oder synthetisch sein oder die flankierenden Sequenzen können native Sequenzen sein, die normalerweise dabei wirken, die VGF-Polypeptidexpression zu regulieren. Als solche kann die Quelle der flankierenden Sequenz jeder prokaryotischer oder eukaryotischer Organismus, jeder Wirbeltier- oder wirbelloser Organismus oder jede Pflanze sein unter der Voraussetzung, daß die flankierende Sequenz in der Wirtszellmaschinerie funktionell ist und durch sie aktiviert werden kann.

[0083] Nützliche flankierende Sequenzen können durch jedes mehrerer Verfahren, die im Stand der Technik gut bekannt sind, erhalten werden. Typischerweise werden flankierende Sequenzen, die hierin nützlich sind – anders als die VGF-genflankierenden Sequenzen – vorher durch Kartierung und/oder durch Restriktionsendonukleaseverdau identifiziert worden sein und können somit von der richtigen Gewebequelle unter Verwendung geeigneter Restriktionsendonukleasen isoliert werden. In einigen Fällen kann die vollständige Nukleotidse-

quenz einer flankierenden Sequenz bekannt sein. Hier kann die flankierende Sequenz unter Verwendung der hierin für die Nukleinsäuresynthese oder -klonierung beschriebenen Verfahren synthetisiert werden.

[0084] Wo die gesamte oder nur ein Teil der flankierenden Sequenz bekannt ist, kann sie unter Verwendung von PCR und/oder durch das Durchsuchen einer genomischen Bibliothek mit einem geeigneten Oligonukleotid und/oder einem flankierenden Sequenzfragment vom selben oder einer anderen Spezies erhalten werden. Wo die flankierende Sequenz nicht bekannt ist, kann ein Fragment der DNA, die eine flankierende Sequenz enthält, aus einem größeren DNA-Stück isoliert werden, das beispielsweise eine kodierende Sequenz oder sogar ein anderes Gen oder Gene enthalten kann. Die Isolierung kann durch Restriktionsendonukleaseverdau erreicht werden, um das richtige DNA-Fragment zu erzeugen, gefolgt von der Isolierung unter Verwendung von Agarosegelreinigung, Qiagen®-Säulenchromatographie (Chatsworth, CA) oder anderen dem Fachmann bekannten Verfahren. Die Auswahl geeigneter Enzyme, um dieses Ziel zu erreichen, wird dem Fachmann ohne weiteres ersichtlich sein.

[0085] Ein Replikationsursprung ist typischerweise ein Teil der kommerziell gekauften prokaryotischen Expressionsvektoren und der Ursprung hilft bei der Vervielfältigung des Vektors in der Wirtszelle. Die Vervielfältigung des Vektors bis zu einer bestimmten Kopienzahl kann in einigen Fällen für die optimale Expression eines VGF-Polypeptids wichtig sein. Wenn der Vektor der Wahl keinen Replikationsursprung enthält, kann einer, beruhend auf einer bekannten Sequenz, chemisch synthetisiert werden und in den Vektor ligiert werden. Beispielsweise ist der Replikationsursprung aus dem Plasmid pBR322 (New England Biolabs, Beverly, MA) für die meisten gram-negativen Bakterien geeignet und verschiedene Ursprünge (z.B. SV40, Polyoma, Adenovirus, vesikulärer Stomatitusvirus (VSV) oder Papillomaviren, wie HPV oder BPV) sind für Klonierungsvektoren in Säugetierzellen nützlich. Im allgemeinen wird der Replikationsursprungsbestandteil nicht benötigt (beispielsweise wird der SV40-Ursprung häufig nur verwendet, da er den frühen Promotor enthält).

[0086] Eine Transkriptionsterminierungssequenz ist typischerweise 3' vom Ende einer Polypeptid-kodierenden Region angeordnet und dient der Transkriptionsterminierung. Üblicherweise ist eine Transkriptionsterminierungssequenz in prokaryotischen Zellen ein G-C-reiches Fragment, gefolgt von einer poly-T-Sequenz. Während die Sequenz aus einer Bibliothek leicht kloniert werden kann oder sogar kommerziell als ein Teil eines Vektors gekauft werden kann, kann sie auch ohne weiteres unter Verwendung von Verfahren für die Nukleinsäuresynthese, wie den hierin beschriebenen, synthetisiert werden.

[0087] Ein selektierbares Markierungsgenelement kodiert für ein Protein, das für das Überleben und Wachstum einer Wirtszelle, die in einem selektiven Kulturmedium wachsen gelassen wird, notwendig ist. Typische Selektionsmarkergene kodieren für Proteine, die (a) eine Resistenz gegenüber Antibiotika oder anderen Toxinen vermitteln, z.B. Ampicillin, Tetracyclin oder Kanamycin für prokaryotische Wirtszellen; (b) die auxotrophe Mängel der Zelle komplementieren; oder (c) kritische Nährstoffe, die nicht aus dem komplexen Medium erhältlich sind, zur Verfügung stellen. Bevorzugte selektierbare Macker sind das Kanamycinresistenzgen, das Ampicillinresistenzgen und das Tetracyclinresistenzgen. Ein Neomycinresistenzgen kann auch für die Selektion in prokaryotischen und eukaryotischen Wirtszellen verwendet werden.

[0088] Andere Selektionsgene können verwendet werden, um das Gen, das exprimiert wird, zu vervielfältigen. Die Vervielfältigung ist der Prozeß, bei dem Gene, die für die Produktion eines Proteins für das Wachstum kritisch sind, stärker benötigt werden, innerhalb des Chromosoms aufeinanderfolgender Generationen rekombinanter Zellen tandemartig wiederholt werden. Beispiele geeigneter selektierbarer Marker für Säugetierzellen umfassen die Dihydrofolatreductase (DHFR) und die Thymidinkinase. Die Säugetierzelltransformanten werden unter Selektionsdruck gesetzt, wobei nur die Transformanten in einzigartiger Weise dazu angepaßt sind, aufgrund des in dem Vektor vorhandenen Selektionsgens zu überleben. Der Selektionsdruck wird durch das Kultivieren der transformierten Zellen unter Bedingungen auferlegt, in denen die Konzentration des Selektionsmittels im Medium nacheinander gewechselt wird, was zur Vervielfältigung sowohl des Selektionsgens als auch der DNA führt, die für das VGF-Polypeptid kodiert. Als Ergebnis werden von der vervielfältigten DNA erhöhte Mengen des VGF-Polypeptids synthetisiert.

[0089] Eine Ribosomenbindungsstelle ist üblicherweise für die Translationsinitiation der mRNA notwendig und ist durch eine Shine-Dalgarno-Sequenz (Prokaryoten) oder eine Kozak-Sequenz (Eukaryoten) gekennzeichnet. Das Element ist typischerweise 3' zum Promotor und 5' zu der kodierenden Sequenz eines zu exprimierenden VGF-Polypeptids angeordnet. Die Shine-Dalgarno-Sequenz ist veränderlich, ist aber typischerweise ein Polypurin (d.h. hat einen hohen A-G-Gehalt). Viele Shine-Dalgarno-Sequenzen sind identifiziert worden, von denen jede ohne weiteres und unter Verwendung der hierin dargestellten Verfahren synthetisiert werden kann und in einem prokaryotischen Vektor verwendet werden kann.

[0090] Eine Führungs- oder Signalsequenz kann verwendet werden, um ein VGF-Poylpeptid aus der Wirtszelle herauszuleiten. Typischerweise ist eine Nukleotidsequenz, die für eine Signalsequenz kodiert, in der kodierenden Region eines VGF-Nukleinsäuremoleküls oder unmittelbar am 5'-Ende einer VGF-Polypeptid-kodierenden Region angeordnet. Viele Signalsequenzen sind identifiziert worden und jede dieser, die in der gewählten Wirtszelle funktionell ist, kann im Zusammenhang mit einem VGF-Nukleinsäuremolekül verwendet werden. Somit kann eine Signalsequenz homolog (natürlich vorkommend) oder heterolog zu dem VGF-Nukleinsäuremolekül sein. Zusätzlich kann eine Signalsequenz unter Verwendung der hierin beschriebenen Verfahren chemisch synthetisiert werden. In den meisten Fällen wird die Sekretion eines VGF-Polypeptids aus der Wirtszelle über die Gegenwart eines Signalpeptids zur Entfernung des Signalpeptids aus dem sekretierten VGF-Polypeptid führen. Die Signalsequenz kann ein Teil des Vektors sein oder sie kann ein Teil des VGF-Nukleinsäuremoleküls sein, das in den Vektor eingeführt wird.

[0091] Eine Nukleinsäuresequenz, die für eine native VGF-Polypeptidsignalsequenz kodiert, kann in einer VGF-Polypeptid-kodierenden Region verbunden werden oder eine Nukleotidsequenz, die für eine heterologe Signalsequenz kodiert, kann mit einer VGF-Polypeptid-kodierenden Region verbunden werden. Die ausgewählte heterologe Signalsequenz sollte eine sein, die durch die Wirtszelle erkannt und prozessiert wird, d.h. durch eine Signalpeptidase gespalten wird. Für prokaryotische Wirtszellen, die die native VGF-Polypeptidsignalsequenz nicht erkennen und bearbeiten, wird die Signalsequenz durch eine prokaryotische Signalsequenz ersetzt, beispielsweise ausgewählt aus der Gruppe der alkalischen Phosphatase, Penicillinase oder des hitzestabilen Enterotoxin-II-Leaders. Für Hefesekretion kann die native VGF-Polypeptidsignalsequenz durch die Hefeinvertase-, Alphafaktor- oder die saure Phosphataseführungssequenzen ersetzt werden. In Säugetierzellen ist die Expression der nativen Signalsequenz ausreichend, obwohl andere Säugetiersignalsequenzen geeignet sein können.

[0092] In einigen Fällen, wie z.B. wenn Glykosylierung in einem eukaryotischen Wirtszellexpressionssystem gewünscht wird, kann man die verschiedenen Vorsequenzen verändern, um die Glykosylierung oder die Ausbeute zu verbessern. Beispielsweise kann man die Peptidasespaltungsstelle eines bestimmten Signalpeptids verändern oder Pro-Sequenzen hinzufügen, die auch die Glykosylierung beeinflussen. Das endgültige Proteinprodukt kann an der –1 Position (relativ zur ersten Aminosäure des reifen Proteins) ein oder mehrere weitere Aminosäuren incident exprimiert haben, die nicht vollständig entfernt worden sind. Beispielsweise kann das endgültige Proteinprodukt eine oder zwei Aminosäurereste, die in der Peptidasespaltungsstelle gefunden werden, an seinem Aminoterminus befestigt, aufweisen. Alternativ kann die Verwendung einiger Spaltungsstellen zu einer leicht verkürzten Form des gewünschten VGF-Polypeptids führen, wenn das Enzym an einer solchen Stellte innerhalb des reifen Polypeptids schneidet.

[0093] In vielen Fällen ist die Transkription des Nukleinsäuremoleküls durch die Gegenwart von einem oder mehreren Introns im Vektor erhöht; dies ist insbesondere dann der Fall, wenn ein Polypeptid in einer eukaryotischen Wirtszelle, insbesondere einer Säugetierwirtszelle hergestellt wird. Die verwendeten Introns können natürlich innerhalb des VGF-Gens auftreten, insbesondere wenn das Gen in seiner genomischen Sequenz voller Länge oder ein Fragment davon verwendet wird. Wenn das Intron nicht natürlich innerhalb des Gens auftritt (wie für die meisten cDNAs) kann das Intron aus einer anderen Quelle erhalten werden. Die Position des Introns im Hinblick auf die flankierenden Sequenzen und das VGF-Gen ist im allgemeinen wichtig, da das Intron transkribiert werden muß, um wirksam zu sein. Somit ist, wenn ein VGF-cDNA-Molekül transkribiert wird, die bevorzugte Position für das Intron 3' zur Transkriptionsstartstelle und 5' zur poly-A-Transkriptionsterminierungssequenz. Vorzugsweise wird das Intron oder die Introns auf einer Seite oder der anderen (d.h. 5' oder 3') der cDNA angeordnet sein, so daß sie nicht die kodierende Sequenz unterbricht. Jedes Intron von jeder Quelle, umfassend virale, prokaryotische oder eukaryotische (Pflanze oder Tier) Organismen, kann verwendet werden unter der Voraussetzung, daß es mit der Wirtszelle in die es eingeführt wird, kompatibel ist. Hiervon sind auch synthetische Introns umfaßt. Gegebenenfalls kann mehr als ein Intron in dem Vektor verwendet werden.

[0094] Expressions- und Klonierungsvektoren werden typischerweise einen Promotor enthalten, der durch den Wirtsorganismus erkannt wird und der wirksam mit dem Molekül, das für das VGF-Polypeptid kodiert, verknüpft ist. Die Promotoren sind nicht transkribierte Sequenzen, die stromaufwärts (d.h. 5') zum Startcodon des strukturellen Gens (im allgemeinen innerhalb etwa 100 bis 1000 bp) angeordnet sind, die die Transkription des strukturellen Gens kontrollieren. Promotoren werden üblicherweise in einer von zwei Klassen zusammengefaßt: induzierbare Promotoren und konstitutive Promotoren. Induzierbare Promotoren initiieren erhöhte Mengen der Transkription einer DNA, die unter ihrer Kontrolle steht, in Antwort auf eine Änderung der Kulturbedingungen, wie der Gegenwart oder Abwesenheit eines Nährstoffes oder einer Änderung der Temperatur. Konstitutive Promotoren auf der anderen Seite initiieren die kontinuierliche Genproduktproduktion; das bedeutet es gibt eine geringe oder keine Kontrolle über die Genexpression. Eine große Anzahl der Promotoren, die durch

eine Vielzahl von möglichen Wirtszellen erkannt werden, sind gut bekannt. Ein geeigneter Promotor wird operativ mit der DNA, die für das VGF-Polypeptid kodiert, durch die Entfernung des Promotors aus der DNA-Quelle durch Restriktionsenzymverdau und das Einführen der gewünschten Promotorsequenz in den Vektor verknüpft. Die native VGF-Promotorsequenz kann verwendet werden, um die Vervielfältigung und/oder Expression eines VGF-Nukleinsäuremoleküls zu steuern. Ein heterologer Promotor ist jedoch bevorzugt, wenn er eine größere Transkription und höhere Ausbeuten des exprimierten Proteins im Vergleich zum nativen Promotor erlaubt und wenn er mit dem Wirtszellsystem, das für die Verwendung ausgewählt wurde, kompatibel ist.

[0095] Geeignete Promotoren für die Verwendung mit prokaryotischen Wirten umfassen die beta-Lactamase- und Lactosepromotorsystemen; die alkalische Phosphatase; das Tryptophanpromotorsystem (trp); und hybride Promotoren, wie den tac-Promotor. Andere bekannte bakterielle Promotoren sind auch geeignet. Diese Sequenzen sind publiziert worden, wodurch ein Fachmann dazu in die Lage versetzt wird, sie unter Verwendung von Linkern oder Adaptern wie erforderlich, um geeignete Restriktionsstellen zur Verfügung zu stellen, an die gewünschte DNA-Sequenz zu ligieren.

[0096] Geeignete Promotoren für die Verwendung mit Hefewirten sind im Stand der Technik auch gut bekannt. Hefeenhancer werden vorteilhafterweise mit Hefepromotoren verwendet. Geeignete Promotoren für die Verwendung in Säugetierwirtszellen sind bekannt und umfassen, sind aber nicht eingeschränkt auf die, die aus dem Genom von Viren, wie dem Polyomavirus, dem Vogelpockenvirus, dem Adenovirus (wie dem Adenovirus 2), dem Rinderpapillomavirus, dem Geflügelsarcomavirus, dem Cytomegalovirus, den Retroviren, dem Hepatitis-B-Virus und insbesondere dem Affenvirus 40 (SV40 = „Simian Virus 40") erhalten werden. Andere geeignete Säugetierpromotoren umfassen heterologe Säugetierpromotoren, beispielsweise die Hitzschockpromotoren und den Actinpromotor.

[0097] Zusätzlich umfassen Promotoren, die bei der Kontrolle der VGF-Genexpression interessant sein können, sind aber nicht beschränkt auf die SV40 frühe Promotorregion (Bernoist und Chambon, 1981, Nature 290:304–10); den CMV-Promotor; den Promotor, der in dem 3' langen terminalen Repeat des Rous sarcoma-Virus enthalten ist (Yamamoto, et al., 1980, Cell 22:787–97); den Herpesthymidinkinasepromotor (Wagner et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1444–45); den regulatorischen Sequenzen des Metallothioningens (Brinster et al., 1982, Nature 296:39–42); prokaryotische Expressionsvektoren, wie den beta-Lactamasepromotor (Villa-Kamaroff et al., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75:3727–31); oder den tac-Promotor (DeBoer et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:21–25). Die folgenden tierischen transkriptionellen Kontrollregionen, die eine Gewebespezifität zeigen und die in transgenen Tieren verwendet worden sind sind auch interessant: die Elastase-I-Genkontrollregion, die in pankreatischen Azinysezellen aktiv ist (Swift et al., 1984, Cell 38:639–46; Ornitz et al., 1986, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50:399–409 (1986); MacDonald, 1987, Hepatology 7:425–515); die Insulingenkontrollregion, die in pankreatischen beta-Zellen aktiv ist (Hanahan, 1985, Nature 315:115–22); die Immunglobulingenkontrollregion, die in lymphoiden Zellen aktiv ist (Grosschedl et al., 1984, Cell 38:647–58; Adames et al., 1985, Nature 318:533–38; Alexander et al., 1987, Mol. Cell. Biol., 7:1436–44); die Mäusebrusttumorviruskontrollregion („mouse mammary tumor virus control region"), die in testikulären, Brust-, Lymphoid- und Mastzellen aktiv ist (Leder et al., 1986, Cell 45:485–95); die Albumingenkontrollregion, die in der Leber aktiv ist (Pinkert et al., 1987, Genes and Devel. 1:268–76); die alpha-feto-Proteingenkontrollregion, die in der Leber aktiv ist (Krumlauf et al., 1985, Mol. Cell. Biol., 5:1639–48; Hammer et al., 1987, Science 235:53–58); die alpha-1-Antitrypsingenkontrollregion, die in der Leber aktiv ist (Kelsey et al., 1987, Genes and Devel. 1:161–71); die beta-Globingenkontrollregion, die in myeloiden Zellen aktiv ist (Mogram et al., 1985, Nature 315:338–40; Kollias et al., 1986, Cell 46:89–94); die Myelin-basische Proteingenkontrollregion, die in oligodendrocytischen Zellen im Gehirn aktiv ist (Readhead et al., 1987, Cell 48:703–12); die Myosin-leichte-Ketten-2-Genkontrollregion, die in Skelettmuskel aktiv ist (Sani, 1985, Nature 314:283–86); und die Gonadotropin freisetzende Hormongenkontrollregion („gonadotropic releasing hormone gene control region"), die im Hypothalamus aktiv ist (Mason et al., 1986, Science 234:1372–78).

[0098] Eine Enhancersequenz kann in den Vektor eingeführt werden, um die Transkription einer DNA, die für ein VGF-Polypeptid kodiert, in höheren Eukaryoten zu erhöhen. Enhancer sind cis-wirkende Elemente der DNA, die üblicherweise eine Länge von 10–30 bp haben, die auf den Promotor wirken, um die Transkription zu erhöhen. Enhancer sind relativ orientierungs- und ortsunabhängig. Sie sind 5' und 3' zur Transkriptionseinheit gefunden worden. Mehrere Enhancersequenzen, die aus Säugetiergenen erhältlich sind, sind bekannt (z.B. Globin, Elastase, Albumin, alpha-feto-Protein und Insulin). Typischerweise wird jedoch ein Enhancer aus einem Virus verwendet werden. Der SV40-Enhancer, der Cytomegalovirus-frühe-Promotor-Enhancer, der Polyomaenhancer und der Adenovirusenhancer sind beispielhafte verstärkende Elemente für die Aktivierung eukaryotischer Promotoren. Während ein Enhancer in einen Vektor an einer Position 5' und 3' zum VGF-Nukleinsäuremolekül eingefügt werden kann, wird er typischerweise an einer Stelle 5' vom Promotor angeordnet.

[0099] Die Expressionsvektoren können aus einem Ausgangsvektor, wie einem kommerziell erhältlichen Vektor konstruiert werden. Solche Vektoren können alle gewünschten flankierenden Sequenzen enthalten oder nicht enthalten. Wenn ein oder mehrere der hierin beschriebenen Sequenzen nicht bereits im Vektor vorhanden sind, können sie individuell erhalten werden und in den Vektor ligiert werden. Verfahren für den Erhalt jeder der flankierenden Sequenzen sind dem Fachmann gut bekannt.

[0100] Bevorzugte Vektoren sind die, die mit bakteriellen, Insekten- und Säugetierwirtszellen kompatibel sind. Solche Vektoren umfassen unter anderem pCRII, pCR3 und pcDNA3.1 (In-vitrogen, San Diego, CA), pBSII (Stratagene, La Jolla, CA), pET15 (Novagen, Madison, WI), pGEX (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ), PEGFP-N2 (Clontech Palo Alto, CA), pETL (BlueBacII, Invitrogen), pDSR-alpha (PCT Pub. Nr. WO 90/14363) und pFasBacDual (Bibco-BRL, Grand Island, NY).

[0101] Zusätzliche geeignete Vektoren umfassen, sind aber nicht eingeschränkt auf Cosmide, Plasmide oder modifizierte Viren, aber es wird erkannt werden, daß das Vektorsystem mit der gewählten Wirtszelle kompatibel sein muß. Solche Vektoren umfassen, sind aber nicht eingeschränkt auf Plasmide, wie Bluescript®-Plasmidderivate (ein auf ColE1-beruhendes Phagemid hoher Kopienzahl, Stratagene Cloning System, La Jolla, CA), PCR-Klonierungsplasmide, die für die Klonierung Taq-vervielfältigte PCR-Produkte entworfen wurden (z.B. TOPO® TA Cloning® Kit, PCR2.1® Plasmidderivate, Invitrogen, Carlsbad, CA), und Säugetier-, Hefe- oder Virusvektoren, wie ein Baculovirusexpressionssystem (pBacPAK-Plasmidderivate, Clontech, Palo Alto, CA).

[0102] Nachdem der Vektor konstruiert worden ist und ein Nukleinsäuremolekül, das für ein VGF-Polypeptid kodiert, in die richtige Stelle des Vektors eingeführt worden ist, kann der vollständige Vektor in eine geeignete Wirtszelle für die Vervielfältigung und/oder Polypeptidexpression eingeführt werden. Die Transformation eines Expressionsvektors für ein VGF-Polypeptid in eine ausgewählte Wirtszelle kann durch gut bekannte Verfahren, umfassend Verfahren, wie Transfektion, Infektion, Kalziumchlorid, Elektroporation, Mikroinjektion, Lipofektion, DEAE-Dextranverfahren oder andere bekannte Verfahren erreicht werden. Das ausgewählte Verfahren wird zum Teil eine Funktion des Typs der verwendeten Wirtszelle sein. Diese Verfahren und andere geeignete Verfahren sind dem Fachmann wohl bekannt und sind beispielsweise in Sambrook et al., supra. dargestellt.

[0103] Die Wirtszellen können prokaryotische Wirtszellen (wie E. coli) oder eukaryotische Wirtszellen (wie eine Hefe-, Insekten- oder Wirbeltierzelle) sein. Die Wirtszelle synthetisiert ein VGF-Polypeptid, wenn sie unter geeigneten Bedingungen kultiviert wird, das anschließend aus dem Kulturmedium (wenn die Wirtszelle es in das Medium sekretiert) oder direkt aus der Wirtszelle, das es produziert (wenn es nicht sekretiert wird), gewonnen werden kann. Die Auswahl einer geeigneten Wirtszelle wird von mehreren Faktoren, wie den gewünschten Expressionsmengen, den Polypeptidmodifikationen, die für die Aktivität wünschenswert oder notwendig sind (wie Glykosylierung oder Phosphorylierung) und der Einfachheit der Faltung in ein biologisch aktives Molekül abhängen.

[0104] Eine Anzahl geeigneter Wirtszellen sind im Stand der Technik bekannt und viele sind von der American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, erhältlich. Beispiele umfassen, sind aber nicht eingeschränkt auf Säugetierwirtszellen, wie chinesische Hamsterovarialzellen (CHO), CHO DHFR(-)-Zellen (Urlaub et al., 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:4216–20), menschliche embryonale Nierenzellen 293 (HEK = „human embryonic kidney") oder 293T-Zellen oder 3T3-Zellen. Die Auswahl geeigneter Säugetierwirtszellen und Verfahren für die Transformation, Kultivierung, Vervielfältigung, Durchsuchung, Produktherstellung und Reinigung sind im Stand der Technik bekannt. Andere geeignete Säugetierzellinien sind die Affen-COS-1- und COS-7-Zellinien und die CV-1-Zellinie. Weitere beispielhafte Säugetierwirtszellen umfassen Primatenzellinien und Nagetierzellinien, die transformierte Zellinien umfassen. Normale diploide Zellen, Zellstämme, die durch die in vitro-Kultivierung von Primärgewebe abgeleitet sind, sowie primäre Explantate sind auch geeignet. Die Kandidatenzellen können gentypisch defizient für das Selektionsgen sein oder können ein dominant wirkendes Selektionsgen enthalten. Andere geeignete Säugetierwirtszellen umfassen, sind aber nicht eingeschränkt auf Mäuseneuroblastomzellen N2A, HeLa, Mäuse-L-929-Zellen, 3T3-Linien, die von Schweizer, Balb-c oder NIH-Mäusen abgeleitet sind, BHK oder HaK-Hamsterzellinien. Jede dieser Zellinien ist dem Fachmann in der Technik der Proteinexpression bekannt und sind für ihn erhältlich.

[0105] Gleichermaßen nützliche geeignete Wirtszellen sind bakterielle Zellen. Beispielsweise sind verschiedene E. coli-Stämme (z.B. HB101, DH5α, DH10 und MC1061) als Wirtszellen im Bereich der Biotechnologie gut bekannt. Verschiedene Stämme des B. subtilis, Pseudomonas spp., andere Bacillus spp., Streptomyces spp. und ähnliche können auch in diesem Verfahren eingesetzt werden.

[0106] Viele Hefezellstämme sind dem Fachmann bekannt und auch als Wirtszellen für die Expression des

VGF-Polypeptids verfügbar. Bevorzugte Hefewirtszellen umfassen beispielsweise Saccharomyces cerivisae und Pichia pastoris.

[0107] Zusätzlich können, wenn gewünscht, Insektenzellsysteme für die Expression der VGF-Polypeptide verwendet werden. Solche Systeme sind beispielsweise in Kitts et al., 1993, Biotechniques, 14:810–17; Lucklow, 1993, Curr. Opin. Biotechnol. 4:564–72 und Lucklow et al, 1993, J. Virol., 67:4566–79, beschrieben. Bevorzugte Insektenzellen sind Sf-9 und Hi5 (Invitrogen).

[0108] Man kann auch transgene Tiere verwenden, um glykosylierte VGF-Polypeptide zu exprimieren. Beispielsweise kann man ein transgenes Milch erzeugendes Tier (beipielsweise eine Kuh oder eine Ziege) verwenden und die vorliegenden glykosylierten Polypeptide in der Tiermilch erhalten. Man kann auch Pflanzen verwenden, um VGF-Polypeptide zu erzeugen, im allgemeinen wird sich jedoch die Glykosylierung, die in Pflanzen auftritt, von der unterscheiden, die in Säugetierzellen erzeugt wird und kann zu glykosylierten Produkten führen, die nicht für die menschliche therapeutische Verwendung geeignet sind.

Polypeptidherstellung

[0109] Wirtszellen, die ein VGF-Polypeptidexpressionsvektor umfassen, können unter Verwendung von Standardmedien, die dem Fachmann gut bekannt sind, kultiviert werden. Die Medien werden üblicherweise alle Nährstoffe, die für das Wachstum und das Überleben der Zellen notwendig sind, enthalten. Geeignete Medien für die Kultivierung von E. coli-Zellen umfassen beispielsweise Luria Broth (LB) und/oder Terrific Broth (TB). Geeignete Medien für die Kultivierung eukaryotischer Zellen umfassen Roswell Park Memorial Institute Medium 1640 (RPMI 1640), minimales essentielles Medium (MEM) und/oder Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), die alle durch Serum- und/oder Wachstumsfaktoren, wie durch die jeweils kultivierte besondere Zellinie gefordert, ergänzt werden können. Ein geeignetes Medium für Insektenkulturen ist Grace's Medium wie erforderlich durch Yeastolat, Lactalbuminhydrolysat und/oder fötales Kälberserum ergänzt.

[0110] Typischerweise wird ein Antibiotikum oder eine andere Verbindung, die für das selektive Wachstum nur der transformierten Zellen nützlich ist, als ein Zusatzstoff zu dem Medium hinzugefügt. Die zu verwendende Verbindung wird durch das selektierbare Markerelement, das auf dem Plasmid vorhanden ist, mit dem die Wirtszelle transformiert wurde, bestimmt. Beispielsweise wird die Verbindung, die zu dem Kulturmedium hinzugefügt wird, wenn der selektierbare Marker eine Kanamycinresistenz ist, Kanamycin sein. Andere Verbindungen für das selektive Wachstum umfassen Ampicillin, Tetracyclin und Neomycin.

[0111] Die Menge des durch die Wirtszelle hergestellten VGF-Polypeptids kann unter Verwendung von im Stand der Technik bekannten Standardverfahren bewertet werden. Solche Verfahren umfassen ohne Einschränkung die Westernblotanalyse, die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese, die nicht-denaturierende Gelelektrophorese, die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC = „High Performance Liquid Chromatography"), die Abtrennung, die Immunpräzipitation und/oder Aktivitätstests, wie DNA-Bindungsgelverschiebungsanalysen.

[0112] Wenn ein VGF-Polypeptid entworfen wurde, um aus der Wirtszelle sekretiert zu werden, kann der Großteil des Polypeptids in dem Zellkulturmedium gefunden werden. Wenn jedoch das VGF-Polypeptid nicht von der Wirtszelle sekretiert wird, wird es in dem Cytoplasma und/oder dem Kern (für eukaryotische Wirtszellen} oder in dem Cytosol (für gram-negative Bakterienwirtszellen) vorhanden sein.

[0113] Für ein VGF-Polypeptid, das im Wirtszellcytoplasma und/oder -kern (für eukaryotisch Wirtszellen) oder im Cytosol (für bakterielle Wirtszellen} angesiedelt ist, kann das intrazelluläre Material (umfassend Einschlußkörper für gram-negative Bakterien) aus der Wirtszelle unter Verwendung eines beliebigen dem Fachmann bekannten Standardverfahrens extrahiert werden. Beispielsweise kann die Wirtszelle durch eine französische Presse, Homogenisierung und/oder Sonifizierung, gefolgt von Zentrifugation lysiert werden, um den Inhalt des Periplasmas/Cytoplasmas freizusetzen.

[0114] Wenn ein VGF-Polypeptid im Cytosol Einschlußkörper gebildet hat, können die Einschlußkörper häufig an die innere und/oder äußere Zellmembran binden und werden daher in erster Linie nach der Zentrifugation im Niederschlagsmaterial gefunden. Das Niederschlagsmaterial kann dann mit extremen pHs oder mit einem chaotropen Mittel, wie einem Detergenz, Guanidin, Guanidinderivaten, Harnstoff oder Harnstoffderivaten in der Gegenwart eines Reduzierungsmittels, wie Dithiothreitol bei alkalischem pH oder tris-Carboxyethylphosphin bei saurem pH behandelt werden, um die Einschlußkörper freizusetzen, auseinander zu brechen und löslich zu machen. Das löslich gemachte VGF-Polypeptid kann dann unter Verwendung von Gelelektrophorese,

Immunpräzipitation oder ähnlichem analysiert werden. Wenn es gewünscht wird das VGF-Polypeptid zu isolieren, kann die Isolierung unter Verwendung von Standardverfahren, wie hierin und in Marston et al., 1990, Meth. Enz., 182:264–75, beschrieben, erreicht werden.

[0115] In einigen Fällen kann das VGF-Polypeptid nach der Isolation nicht biologisch aktiv sein. Verschiedene Verfahren für die „Rückfaltung" oder die Umwandlung des Polypeptids zu seiner Tertiärstruktur und zum Erzeugen von Disulfidverknüpfungen können verwendet werden, um die biologische Aktivität wiederherzustellen. Solche Verfahren umfassen das Aussetzen des flüssig gemachten Polypeptids gegenüber einem pH, der üblicherweise über 7 liegt und in der Gegenwart einer bestimmten Konzentration eines Chaotrops. Die Auswahl eines Chaotrops ist den Möglichkeiten, die für die Auflösung der Einschlußkörper verwendet wurden, sehr ähnlich, aber üblicherweise weist das verwendete Chaotrop eine niedriger Konzentration auf und ist nicht notwendigerweise dasselbe Chaotrop, das für die Auflösung verwendet wurde. In den meisten Fällen wird die Rückfaltungs-/Oxidierungslösung auch ein Reduzierungsmittel oder ein Reduzierungsmittel zuzüglich seiner oxidierten Form in einem spezifischen Verhältnis enthalten, um ein bestimmtes Redoxpotential zu erzeugen, das es erlaubt, daß Disulfidaustausch bei der Bildung der Cysteinbrücken des Proteins erfolgt. Einige der üblicherweise verwendeten Redoxpaare umfassen Cystein/Cystamin, Glutathion(GSH)/Dithiobis GSH, Kupferchlorid, Dithiothreitol(DTT)/Dithian DTT und 2-2-Mercaptoethanol(bME)/Dithio-b(ME). In vielen Fällen kann ein Kolösungsmittel verwendet werden oder kann erforderlich sein, um die Wirksamkeit der Rückfaltung zu erhöhen und die üblicheren Mittel, die zu diesem Zweck verwendet werden, umfassen Glycerol, Polyethylenglycol verschiedener Molekulargewichte, Arginin und ähnliche.

[0116] Wenn Einschlußkörper auf die Expression des VGF-Polypeptids hin, nicht in signifikanter Menge gebildet werden, dann wird das Polypeptid nach der Zentrifugation des Zellhomogenats in erster Linie in dem Überstand gefunden werden. Das Polypeptid kann dann aus dem Überstand unter Verwendung von Verfahren, wie den hierin beschriebenen, isoliert werden.

[0117] Die Reinigung des VGF-Polypeptids aus der Lösung kann unter Verwendung einer Vielzahl von Verfahren erreicht werden. Wenn das Polypeptid synthetisiert worden ist, so daß es entweder an seinem Carboxy- oder Amino-Terminus eine Markierung, wie ein Hexahistidin(VGF-Polypeptid/hexaHis) oder ein anderes kleines Peptid, wie ein FLAG (Eastman Kodak Co., New Haven, CT) oder myc (Invitrogen, Carlsbad, CA) enthält, kann es in einem Einschrittverfahren durch das Überführen der Lösung über eine Affinitätssäule gereinigt werden, wobei die Säulenmatrix eine hohe Affinität für die Markierung aufweist.

[0118] Beispielsweise bindet Polyhistidin mit großer Affinität und Spezifität an Nickel. Somit kann eine Nickelaffinitätssäule (wie die Qiagen®-Nickelsäulen) für die Reinigung von VGF-Polypeptid/polyHis verwendet werden. Siehe z.B. Current Protocols in Molecular Biology § 10.11.8 (Ausubel et al., Heraus., Green Publishers Inc. und Wiley and Sons 1993).

[0119] Zusätzlich können die VGF-Polypeptide durch die Verwendung eines monoklonalen Antikörpers gereinigt werden, der dazu in der Lage ist, spezifisch ein VGF-Polypeptid zu erkennen und zu binden.

[0120] In Situationen, bei denen es bevorzugt ist, ein VGF-Polypeptid teilweise oder vollständig zu reinigen, so daß es teilweise oder vollständig frei von Verunreinigung ist, können dem Fachmann bekannte Standardverfahren verwendet werden. Solche Verfahren umfassen ohne Beschränkung Auftrennung durch Elektrophorese, gefolgt durch Elektroelution, verschiedene Sorten der Chromatographie (Affinität, Immunaffinität, Molekularsieb und Innenaustausch), HPLC und die präparative isoelektrische Fokussierung („Isoprime" – Maschine/Technik, Hoefer Scientific, San Francisco, CA). In einigen Fällen können zwei oder mehr Reinigungsverfahren kombiniert werden, um eine erhöhte Reinheit zu erreichen.

[0121] Die VGF-Polypeptide können auch durch chemische Syntheseverfahren (wie die Festphasenpeptidsynthese) unter Verwendung von im Stand der Technik bekannten Verfahren, wie durch Merrifield et al., 1963, J. Am. Chem. Soc. 85:2149; Houghten et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:5132; und Stewart und Young, Solid Phase Peptide Synthesis (Pierce Chemical Co. 1984) dargestellt, hergestellt werden. Solche Polypeptide können mit oder ohne Methionin am Endterminus synthetisiert werden. Chemisch synthetisierte VGF-Polypeptide können unter Verwendung von Verfahren, die in diesen Referenzen dargestellt sind, oxidiert werden, um die Disulfidbrücken zu bilden. Für die chemisch synthetisierten VGF-Polypeptide wird erwartet, daß sie vergleichbare biologische Eigenschaften, wie die korrespondierenden VGF-Polypeptide aufweisen, die rekombinant hergestellt wurden oder die aus natürlichen Quellen gereinigt wurden und daß sie austauschbar mit einem rekombinanten oder natürlichen VGF-Polypeptid verwendet werden können.

[0122] Ein weiterer Weg zum Erhalt von VGF-Polypeptid ist über die Reinigung aus biologischen Proben, wie Gewebequellen und/oder Flüssigkeiten, in denen VGF-Polypeptid auf natürliche Weise gefunden wird. Solch eine Reinigung kann unter Verwendung von Verfahren für die Proteinreinigung, wie hierin beschrieben, durchgeführt werden. Die Gegenwart des VGF-Polypeptids während der Reinigung kann beispielsweise unter Verwendung eines Antikörpers, der gegen das rekombinant hergestelltes VGF-Polypeptid oder ein Peptidfragment davon hergestellt wurde, überwacht werden.

[0123] Eine Anzahl weiterer Verfahren für die Herstellung von Polypeptiden ist im Stand der Technik bekannt und diese Verfahren können verwendet werden, um Polypeptide herzustellen, die eine Spezifität für VGF-Polypeptide aufweisen. Siehe z.B. Roberts et al., 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:12297–303, die die Produktion von Fusionsproteinen zwischen einer mRNA und einem kodierten Peptid beschreiben. Siehe auch Roberts, 1999, Curr. Opin. Chem. Biol. 3:268–73.

[0124] Die U.S. Patente Nr. 5,763,192; 5,814,476 und 5,817,483 beschreiben Verfahren für die Erzeugung von Peptiden oder Polypeptiden. Diese werden durch das Erzeugen stochastischer Gene oder Fragmenten davon und das Einführen dieser Gene in die Wirtszelle erzeugt, die ein oder mehrere Proteine produzieren, die durch die stochastischen Gene kodiert werden. Die Wirtszellen werden dann durchsucht, um die Klone zu identifizieren, die die Peptide oder Polypeptide, die die gewünschte Aktivität aufweisen, produzieren.

[0125] Ein anderes Verfahren für die Herstellung von Peptiden oder Polypeptiden wird in der PCT/US98/20094 (WO 99/15650), das durch Athersys, Inc. eingereicht wurde, beschrieben. Als „Zufallsaktivierung der Genexpression für die Genentdeckung" bekannt (RAGE-GD = „Random Activation of Gene Expression for Gene Discovery") beinhaltet der Prozeß der Aktivierung endogener Genexpression oder Überexpression eines Gens durch in situ Rekombinationsverfahren. Beispielsweise wird die Expression eines endogenen Gens durch die Integration einer regulatorischen Sequenz in die Zielzelle, die dazu in der Lage ist, die Expression von Genen durch nicht-homologe oder unzulässige Rekombination zu aktivieren, aktiviert oder erhöht. Die Ziel-DNA wird zuerst gegenüber einer Bestrahlung ausgesetzt und ein genetischer Promotor wird eingeführt. Der Promotor findet schließlich einen Bruch am Anfang eines Gens auf, wo er die Transkription des Gens initiiert. Dies führt zur Expression des gewünschten Peptids oder Polypeptids.

[0126] Es wird erkannt werden, daß diese Verfahren auch verwendet werden können, um umfassende IL-17 ähnliche Proteinexpressionsbibliotheken zu erzeugen, die anschließend für die Hochdurchsatz phenotypische Durchsuchung in einer Vielzahl von Testverfahren, wie in biochemischen Testverfahren, zelluläre Testverfahren und Gesamtorganismustestverfahren (z.B. Pflanze, Maus, etc.) verwendet werden können.

Synthese

[0127] Es wird durch den Fachmann erkannt werden, daß die VGF-Polypeptidmoleküle, die hierin beschrieben werden, durch rekombinante oder andere Mittel hergestellt werden können.

Selektiv bindende Mittel

[0128] Der Begriff „selektiv bindendes Mittel" bezeichnet ein Molekül, das für ein oder mehrere VGF-Polypeptide eine Spezifität aufweist. Geeignete selektiv bindende Mittel umfassen, sind aber nicht eingeschränkt auf Antikörper und Derivate davon, Polypeptide und kleine Moleküle. Geeignete selektiv bindende Mittel werden unter Verwendung von im Stand der Technik bekannten Verfahren hergestellt. Ein beispielhaftes VGF-Polypeptid selektiv bindendes Mittel der vorliegenden Erfindung ist dazu in der Lage, einen bestimmten Teil des VGF-Polypeptids zu binden, wodurch die Bindung des Polypeptids an ein VGF-Polypeptidrezeptor behindert wird.

[0129] Der Begriff „Antigen" bezeichnet ein Molekül oder einen Teil eines Moleküls, das dazu in der Lage ist, durch ein selektives Bindungsmittel gebunden zu werden und zusätzlich dazu in der Lage ist, in einem Tier verwendet zu werden, um einen Antikörper zu erzeugen, der dazu in der Lage ist, an ein Epitop dieses Antigens zu binden. Ein Antigen kann ein oder mehrere Epitope aufweisen.

[0130] Der Begriff „Epitop" bezeichnet den Teil eines Moleküls, das dazu in der Lage ist, durch ein selektiv bindendes Mittel erkannt und dadurch an einer oder mehreren Antigenbindungsregionen des bindenden Mittels gebunden zu werden. Epitope bestehen üblicherweise aus chemisch aktiven Oberflächenanordnungen von Molekülen, wie Aminosäuren- oder Zuckerseitenketten, die spezifische dreidimensionale Strukturcharakteristika sowie spezifische Ladungscharakteristika aufweisen. Der Begriff „inhibierendes Epitop" und „neutrali-

sierendes Epitop" bezeichnet einen Epitop, das, wenn es an ein selektiv bindende Mittel gebunden ist zu einem Verlust der biologischen Aktivität des Moleküls, das das Epitop enthält, in vivo, in vitro oder in situ, bevorzugterweise in vivo führt, umfassend Bindung der VGF-Polypeptide an den VGF-Polypeptidrezeptor.

[0131] Wie hierin verwendet, bezeichnet der Begriff „Antigenbindungsregion" den Teil des selektiv bindenden Mittels, der die Aminosäuresequenzen enthält, die mit einem Antigen wechselwirken und dem bindenden Mittel seine Spezifität und Affinität für das Antigen verleihen. Vorzugsweise wird die Antigenbindungsregion einen Mäuseursprung aufweisen. In anderen Ausführungsformen kann die Antigenbindungsregion von anderen Tierspezies insbesondere von Nagetieren, wie Kaninchen, Ratten oder Hamstern, abgeleitet sein. Beispielsweise ist die Antigenbindungsregion des selektiv bindenden Mittels der vorliegenden Erfindung vorzugsweise von einem nicht-menschlichen Antikörper, der für das menschliche VGF-Polypeptid spezifisch ist, abgeleitet. Solche bevorzugten Quellen für die DNA, die für einen solchen nicht-menschlichen Antikörper kodiert, umfassen Zellinien, die Antikörper herstellen, sowie Hybridzellinien, die üblicherweise als Hybridome bekannt sind.

[0132] Selektiv bindende Mittel, wie Antikörper und Antikörperfragmente, die an VGF-Polypeptide binden, liegen im Umfang der vorliegenden Erfindung. Die Antikörper können polyklonal sein, umfassend monospezifische polyklonale; monoklonale; rekombinante; Chimäre; humanisierte, wie CDR-aufgepfropfte; menschliche; einzelkettige und/oder bispezifische; sowie Fragmente; Varianten oder Derivate davon. Die Antikörperfragmente umfassen die Teile des Antikörpers, die an das Epitop auf den VGF-Polypeptid binden. Beispiele solcher Fragmente umfassen Fab- und F(ab')-Fragmente, die durch enzymatische Spaltung von Antikörpern voller Länge erzeugt wurden. Andere Fragmente der bindenden Mittel umfassen die, die durch rekombinante DNA-Verfahren erzeugt werden, wie die Expression rekombinanter Plasmide, die Nukleinsäuresequenzen enthalten, die für variabel Antikörperregion kodieren.

[0133] Die polyklonalen Antikörper sind heterogene Populationen von Antikörpermolekülen, die aus dem Serum von Tieren abgeleitet sind, die mit einem Antigen immunisiert wurden. Ein Antigen ist ein Molekül oder ein Teil eines Moleküls, das dazu in der Lage ist durch einen Antikörper gebunden zu werden, das weiterhin dazu in der Lage ist, das Tier dazu anzuregen Antikörper herzustellen, die dazu in der Lage sind an ein Epitop dieses Antigens zu binden. Ein Antigen kann ein oder mehrere Epitope aufweisen. Für die spezifische Region, auf die sich oben bezogen wird, ist beabsichtigt, daß sie andeutet, daß das Antigen in einer hoch selektiven Weise mit seinem korrespondierenden Antikörper und nicht mit der Vielzahl anderer Antikörper reagieren wird, die durch andere Antigene hervorgerufen werden können.

[0134] Polyklonale Antikörper, die gegen ein VGF-Polypeptid gerichtet sind, werden üblicherweise in Tieren (z.B. Kaninchen oder Mäusen) durch mehrfache subkutane oder intraperitoneale Injektionen des VGF-Polypeptids und eines Adjuvants erzeugt. Es kann nützlich sein, daß VGF-Polypeptid an ein Trägerprotein, das in der zu immunisierenden Spezies immunogen ist, wie Schlüssellochnapfschnecken-Hämocyanin, Serum, Albumin, Rinderthyroglobulin oder Sojabohnentrypsininhibitor zu konjugieren. Auch werden aggregierende Mittel, wie Aluminum verwendet, um die Immunantwort zu verstärken. Nach der Immunisierung wird den Tieren Blut entnommen und das Serum wird auf den anti-VGF-Antikörpertiter hin untersucht.

[0135] Die monoklonalen Antikörper enthalten eine im wesentlichen homogene Population der für die Antigene spezifischen Antikörper, wobei die Population im wesentlichen ähnliche Epitopbindungsstellen enthält. Solche Antikörper können aus jeder Immunglobulinklasse gehören, umfassend IgG, IgM, IgE, IgA, GILD und jede Subklasse davon. Ein Hybridomerzeugender monoklonaler Antikörper der vorliegenden Erfindung kann in vitro, in situ, oder in vivo kultiviert werden. Die Erzeugung von hohen Titern in vivo oder in situ ist ein bevorzugtes Verfahren der Herstellung.

[0136] Monoklonale Antikörper, die gegen VGF-Polypeptide gerichtet sind, werden unter Verwendung jedes Verfahrens hergestellt, das die Herstellung von Antikörpermolekülen durch beständige Zellinien in Kultur zur Verfügung stellt. Beispiele geeigneter Verfahren für die Herstellung monoklonaler Antikörper umfassen die Hybridomverfahren von Kohler et al., 1975, Nature 256:495–97 und das menschliche B-Zellhybridomverfahren (Kozbor, 1984, J. Immunol. 133:3001; Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications 51–63; Marcel Dekker, Inc., 1987). Durch die Erfindung werden auch Hybridomzellinien zur Verfügung gestellt, die monoklonale Antikörper, die mit VGF-Polypeptiden reaktiv sind, herstellen.

[0137] Bevorzugte Anti-VGF selektiv bindende Mittel umfassen monoklonale Antikörper, die in vivo die Bindung an menschliches VGF-Polypeptid oder an einen Antikörper, der im wesentlichen dieselbe spezifische Bindungscharakteristika aufweist, kompetitiv behindern sowie Fragmente und Regionen davon. Bevorzugte Verfahren für die Bestimmung der Spezifität und Affinität des monoklonalen Antikörpers durch kompetitive In-

hibition können in Harlow und Lane, Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratories, 1989); Current Protocols in Immunology (Colligan et al., Heraus., Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience, 1993); und Muller, 1988, Meth. Enzymol. 92:589–601 gefunden werden.

[0138] Die monoklonalen Antikörper der Erfindung können für die Verwendung als Therapeutika modifiziert werden. Eine Ausführungsform ist ein „chimärer" Antikörper, in dem ein Teil der schwer (H) und/oder leichten (L) Kette mit einer korrespondierenden Sequenz in einem Antikörper, der von einer bestimmten Spezies abgeleitet ist oder zu einer bestimmten Antikörperklasse oder -subklasse gehört, identisch oder dazu homolog ist, während der Rest der Kette(en) zu einer korrespondierenden Sequenz in Antikörpern, die von einer anderen Spezies abgeleitet sind oder zu einer anderen Antikörperklasse oder -unterklasse gehören, identisch oder dazu homolog ist (sind). Auch umfaßt sind Fragmente, wie Antikörper, so lange sie die gewünschte biologische Aktivität zeigen. Siehe U.S. Patent Nr. 4,816,567; Morrison et al.,1985, Proc. Natl. Acad. Sci. 81:6851–55.

[0139] Chimäre Antikörper und Verfahren für ihre Herstellung sind im Stand der Technik bekannt. Siehe Cabilly et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3273–77; Morrison et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851–55; Boulianne et al., 1984, Nature 312:643–46; Neuberger et al., 1985, Nature 314:268–70; Liu et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3439–43; und Harlow und Lane, supra.

[0140] Wie hierin verwendet, umfaßt der Begriff „chimärer Antikörper" monovalente, divalente oder polyvalente Immunglobuline. Ein monovalenter chimärer Antikörper ist ein Dimer (HL), der aus einer chimären H-Kette gebildet ist, die durch Disulfidbrücken mit einer chimären L-Kette verbunden ist. Ein divalenter chimerer Antikörper ist ein Tetramer (H_2L_2), das durch zwei HL-Dimere gebildet wird, die durch mindestens eine Disulfidbrücke verbunden sind. Ein polyvalenter chimerer Antikörper kann beispielsweise auch durch die Verwendung einer C_H-Region hergestellt werden, die sich aggregiert (z.B von einer IgM H-Kette oder μ-Kette).

[0141] Die chimären Antikörper der vorliegenden Erfindung können einzelne H- und/oder L-Immunglobulinketten umfassen. Eine bevorzugte chimäre H-Kette umfaßt eine Antigen-Bindungsregion, die von einer H-Kette eines nicht-menschlichen Antikörpers, der für das VGF-Poylpeptid spezifisch ist, abgeleitet ist, welche mit mindestens einem Teil einer menschlichen H-Kette-C-Region (C_H), wie CH_1 oder CH_2 verknüpft ist. Eine bevorzugte chimäre L-Kette umfaßt eine Antigen-Bindungsregion, die von der L-Kette eines nicht-menschlichen Antikörpers, der für das VGF-Polypeptid spezifisch ist, abgeleitet ist, welche mit mindestens einem Teil einer menschlichen L-Kette-C-Region (C_L) verknüpft ist.

[0142] Selektiv bindende Mittel, die chimäre H-Ketten und L-Ketten derselben oder verschiedener variabler Regionsbindungsspezifität haben, können auch durch die geeignete Bindung der einzelnen Polypeptidketten gemäß den im Stand der Technik bekannten Verfahren hergestellt werden. Siehe z.B. Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., Heraus., Green Publishers Inc. und Wiley and Sons 1994) und Harlow et al., supra. Unter Verwendung dieses Ansatzes werden Wirtszellen, die chimäre H-Ketten exprimieren (oder ihre Derivate) von Wirtszellen, die chimäre L-Ketten (oder ihre Derivate) exprimieren, getrennt kultiviert und die Immunglobulinketten werden getrennt wieder gewonnen und dann verbunden. Alternativ können die Wirtszellen co-kultiviert werden und es wird den Ketten erlaubt spontan im Kulturmedium zu assoziieren, gefolgt von der Gewinnung des zusammen gesetzten Immunglobulins.

[0143] Die Erfindung stellt auch monoklonale Antikörper, Fragmente, Regionen oder Derivate davon zur Verfügung, wobei der Begriff die Proteine umfaßt, die durch verkürzte oder modifizierte Gene kodiert werden, um molekulare Spezies zu ergeben, die Immunglobulinfragmenten funktionell entsprechen. Die Modifikationen umfassen, sind aber nicht eingeschränkt auf das Hinzufügen genetischer Sequenzen, die für cytotoxische Proteine kodieren, wie Pflanzen und bakterielle Toxine. Die Fragmente und Derivate können durch jede der Wirtszellen dieser Erfindung hergestellt werden. Alternativ können Antikörper-VGF-monoklonale Antikörperfragmente und Regionen davon an cytotoxische Proteine oder Verbindungen in vitro gebunden werden, um cytotoxische Anti-VGF-Antikörper zur Verfügung zu stellen, die selektiv Zellen töten würden, die VGF-Polypeptidrezeptoren aufweisen.

[0144] Geeignete Fragmente umfassen, sind aber nicht beschränkt auf Fab, Fab', $F(ab')_2$ und Fv. Diesen Fragmenten fehlt das Fc-Fragment des intakten Antikörpers, sie werden schneller aus dem Blutkreislauf entfernt und weisen eine geringere nicht-spezifische Gewebebindung als eine intakte Antikörper auf. Siehe Wahl et al., 1983, J. Nucl. Med. 24:316-258. Diese Fragmente werden aus intakten Antikörpern unter Verfahren, die im Stand der Technik gut bekannt sind, beispielsweise durch proteolytische Spaltung mit Enzymen, wie Papain (um Fab-Fragmente zu erzeugen) oder Pepsin (um $F(ab')_2$-Fragmente zu erzeugen) hergestellt. Die Identifizierung dieser Antigen-Bindungsregionen und/oder Epitope, die durch die monoklonalen Antikörper der vorlie-

genden Erfindung erkannt werden, stellt die Information zur Verfügung, die notwendig ist, um weitere monoklonale Antikörper mit ähnlichen Bindungscharakteristika und therapeutischer und diagnostischer Nützlichkeit zur Verfügung zu stellen, die den Ausführungsformen dieser Erfindung gleichen.

[0145] In einer weiteren Ausführungsform ist der monoklonale Antikörper der Erfindung ein „humanisierter" Antikörper. Verfahren für die Humanisierung nicht-menschlicher Antikörper sind im Stand der Technik wohl bekannt. Siehe U.S. Patent Nr. 5,585,089 und 5,693,762. Im allgemeinen weist ein humanisierter Antikörper ein oder mehrere Aminosäurereste auf, der (die) in sie aus einer anderen Quelle, die nicht menschlich ist, eingefügt wurde(n). Die Humanisierung kann beispielsweise durch die Verwendung von im Stand der Technik beschriebenen Verfahren durchgeführt werden (Jones et al., 1986, Nature 321:522–25; Riechmann et al., 1998, Nature 332:323-27; Verhoeyen et al., 1988, Science 239:1534–36), durch den Ersatz mindestens eines Teils einer Nagetierkomplemetaritäts-bestimmenden Region (CDR = „complementary-determining region") für die korrespondierende Region des menschlichen Antikörpers.

[0146] Verfahren für die Erzeugung rekombinanter DNA-Versionen der Antigen-Bindungsregionen von Antikörpermolekülen (d.h. Fab- oder variable Regionfragmente), die die Erzeugung monoklonaler Antikörper umgehen, werden vom Umfang der vorliegenden Erfindung eingeschlossen. Bei diesen Techniken werden Antikörper-spezifische Boten-RNA-Moleküle aus Immunsystemzellen, die aus einem immunisierten Tier entnommen sind, extrahiert und in cDNA transkribiert. Die cDNA wird dann in ein bakterielles Expressionssystem kloniert. Ein Beispiel eines solchen Verfahrens, das für die Ausführung der vorliegenden Erfindung geeignet ist, verwendet ein Bakteriophagenlambdavektorsystem, das eine Führungssequenz aufweist, die dazu führt, daß das exprimierte Fab-Protein in den periplasmatischen Raum wandert (zwischen die Bakterienzellmembran und die Zellwand) oder sekretiert wird. Man kann rasch eine große Anzahl funktioneller Fab-Fragmente erzeugen und diese auf die durchsuchen, die an das Antigen binden. Solche VGF-bindenden Moleküle (Fab-Fragmente mit einer Spezifität für VGF-Polypeptide) werden spezifisch vom Begriff „Antikörper", wie hierin verwendet, umfaßt.

[0147] Auch im Umfang der Erfindung sind Techniken, die für die Erzeugung chimärer Antikörper durch das Zusammensplicen der Gene aus einem Mäuseantikörpermolekül einer geeigneten Antikörperspezifität mit Genen aus einem Menschenantikörpermolekül einer geeigneten biologischen Aktivität (wie der Fähigkeit menschliches Komplement zu aktivieren und ADCC zu vermitteln) entwickelt worden sind. Morrison et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851–55; Neuberger et al., 1984, Nature, 312:604–08. Selektiv bindende Mittel, wie Antikörper, die durch dieses Verfahren hergestellt werden, liegen im Umfang der Erfindung.

[0148] Es wird erkannt werden, daß die Erfindung nicht auf Mäuse- oder Ratten-monoklonale Antikörper beschränkt ist, tatsächlich können menschliche Antikörper verwendet werden. Solche Antikörper können durch die Verwendung menschlicher Hybridome erhalten werden. Voll-menschliche Antikörper, die an VGF-Polypeptide binden, sind daher von der Erfindung umfaßt. Solche Antikörper werden durch die Immunisierung transgener Tiere (z.B. Mäusen), die dazu in der Lage sind, ein Repertoire humaner Antikörper in Abwesenheit endogener Immunglobulinherstellung herzustellen, mit einem VGF-Antigen (gegebenenfalls an einen Träger konjugiert), hergestellt. Siehe z.B. Jakobovits et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:2551–55; Jakobovits et al., 1993, Nature 362:255–58; Bruggemann et al., 1993, Year in Immuno. 7:33–40.

[0149] Ein antiidiotypischer (anti-Id) Antikörper ist ein Antikörper, der einzelne Determinanten, die im allgemeinen mit der Antigenbindungsstelle eines Antikörpers assoziiert sind, erkennt. Ein Anti-Id-Antikörper kann durch die Immunisierung eines Tiers derselben Spezies und des genetischen Typs (z.B. eines Mäusestamms) als Quelle des monoklonalen Antikörpers mit dem monoklonalen Antikörper, gegen den ein Anti-Id hergestellt wird, hergestellt werden. Das immunisierte Tier wird die idiotypischen Determinanten des immunisierenden Antikörpers erkennen und darauf durch die Erzeugung eines Antikörpers für diese idiotypischen Determinanten reagieren (dem Anti-Id-Antikörper). Siehe z.B. U.S. Patent Nr. 4,699,880. Der Anti-Id-Antikörper kann auch als „Immunogen" verwendet werden, um eine Immunantwort in noch einem anderen Tier hervorzurufen, wodurch sogenannte Anti-anti-Id-Antikörper hergestellt werden. Die Anti-anti-Ids können zu dem ursprünglichen monoklonalen Antikörper epitopisch identisch sein, der den Anti-Id induzierte. Somit ist es möglich durch die Verwendung von Antikörpern zu idiotypischen Determinanten eines monoklonalen Antikörpers andere Klone zu identifizieren, die Antikörper identischer Spezifität exprimieren.

[0150] Auch beschrieben sind menschliche Antikörper, die VGF-Peptide binden. Unter Verwendung transgener Tiere (z.B. Mäusen), die dazu in der Lage sind, ein Repertoire menschlicher Antikörper in Abwesenheit einer endogenen Immunglobulinproduktion herzustellen, werden solche Antikörper durch Immunisierung mit einem VGF-Polypeptidantigen (d.h. die mindestens sechs zusammenhängende Aminosäuren aufweisen), gege-

benenfalls an einen Träger gekoppelt, hergestellt. Siehe z.B. Jakobovits et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. 90:2551–55; Jakobovits et al., 1993, Nature 362:255–58; Bruggermann et al., 1993, Year in Immuno. 7:33. In einem Verfahren werden solche transgenen Tiere durch die Ausschaltung der endogenen Loci, die für die schweren und leichten Immunglobulinketten darin kodieren und durch das Einfügen von Loci, die für die menschlichen schweren und leichten Kettenproteine kodieren, in das Genom davon, hergestellt. Teilweise veränderte Tiere, das bedeutet, die die weniger als einen vollen Satz der Veränderung aufweisen werden dann gekreuzt, um ein Tier zu erhalten, das alle gewünschten Immunsystemveränderungen aufweist. Wenn ein Immunogen verabreicht wird, erzeugen diese transgenen Tiere Antikörper mit menschlicher (statt z.B. Mäuse) Aminosäuresequenzen, umfassend die variablen Regionen, die für diese Antigene immunspezifisch sind. Siehe PCT-Anmeldenr. PCT/US96/05928 und PCT/US93/06926. Weitere Verfahren werden in dem U.S. Patent Nr. 5,545,807, der PCT-Anmeldenr. PCT/US91/245 und der PCT/GB89/01207 und in den EP-Publikationen Nr. 546073 B1 und 546073 A1. beschrieben. Menschliche Antikörper können auch durch Expression rekombinanter DNA in Wirtszellen oder durch Expression in Hybridomzellen, wie hierin beschrieben, hergestellt werden.

[0151] In einer alternative Ausführungsform können menschliche Antikörper auch aus Phagendisplaybibliotheken hergestellt werden (Hoogenboom et al., 1991, J. Mol. Biol. 227:381; Marks et al., 1991, J. Mol. Biol. 222:581). Diese Prozesse ahmen die Immunselektion durch die Präsentation von Antikörperrepertoires auf der Oberfläche filamentöser Bakteriophagen und die anschließende Selektion von Phagen durch die Bindung an ein gewähltes Antigen nach. Ein solches Verfahren wird in der PCT-Anmeldenr. PCT/US98/17364 beschrieben, das die Isolierung hochaffiner und funktionell agonistischer Antikörper für MPL- und msk-Rezeptoren unter Verwendung eines solchen Ansatzes beschreibt.

[0152] Chimäre, CDR-aufgepfropfte und humanisierte Antikörper werden üblicherweise durch rekombinante Verfahren hergestellt. Nukleinsäuren, die für die Antikörper kodieren, werden in Wirtszellen eingeführt und unter Verwendung von Materialien und Verfahren, die hierin beschrieben werden und im Stand der Technik bekannt sind, exprimiert. In einer bevorzugten Ausführungsform werden die Antikörper in Säugetierwirtszellen, wie in CHO-Zellen hergestellt. Monoklonale (z.B. menschliche) Antikörper können durch die Expression rekombinanter DNA in Wirtszellen oder durch Expression in Hybridomzellen, wie hierin beschrieben, hergestellt werden.

[0153] Die monoklonalen Anti-VGF-Antikörper dieser Erfindung können in jedem bekannten Testverfahren, wie in kompetitiven Bindungstestverfahren, direkten und indirekten Sandwichtestverfahren und Immunpräzipitationstestverfahren (Sola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques 147–158 (CRC Press, Inc., 1987)) für den Nachweis und die Quantifizierung von VGF-Polypeptiden verwendet werden. Die Antikörper werden an VGF-Polypeptide mit einer Affinität binden, die für das verwendete Testverfahren angemessen ist.

[0154] Für diagnostische Anwendungen können anti-VGF-Antikörper in bestimmten Ausführungsformen mit einem nachweisbaren Rest markiert werden. Der nachweisbare Rest kann jeder sein, der dazu in der Lage ist, entweder direkt oder indirekt ein nachweisbares Signal zu erzeugen. Beispielsweise kann ein nachweisbarer Rest ein Radioisotop, wie ^{3}H, ^{14}C, ^{32}P, ^{35}S, ^{125}I, ^{99}Tc, ^{111}In oder ^{67}Ga; eine fluoreszente oder chemilumineszente Verbindung, wie Fluoresceinisothiocyanat, Rhodamin oder Luciferin; oder ein Enzym, wie alkalische Phosphatase, β-Galactosidase oder Meerrettichperoxidase (Bayer, et al., 1990, Meth. Enz. 184:138–63) sein.

[0155] Kompetitive Bindungstestverfahren beruhen auf der Fähigkeit eines markierten Standards (z.B. eines VGF-Polypeptids oder eines immunologisch reaktiven Teils davon) mit dem Analyten, der Restprobe (einem VGF-Polypeptid), um die Bindung an eine beschränkte Menge eines Anti-VGF-Antikörpers zu kompetieren. Die Menge des VGF-Polypeptids in der Testprobe ist zur Menge des Standards, umgekehrt proportional. Um die Bestimmung der Menge des Standards, der gebunden wird, zu ermöglichen, werden die Antikörper üblicherweise vor oder nach der Kompetition unlöslich gemacht, so daß der Standard und der Analyt, die an die Antikörper gebunden sind, bequem von dem Standard und dem Analyten, die ungebunden verbleiben, abgetrennt werden kann.

[0156] Testverfahren des Sandwich-Typs beinhalten üblicherweise die Verwendung von zwei Antikörpern, wobei jeder dazu in der Lage ist, an einen anderen immunogenen Teil oder ein Epitop des Proteins, das nachgewiesen und/oder quantifiziert werden soll, zu binden. In einem Sandwichtestverfahren wird der Analyt der Testprobe üblicherweise durch einen ersten Antikörper gebunden, der auf einem festen Träger immobilisiert wird und danach bindet ein zweiter Antikörper an den Analyten, wodurch ein unlöslicher dreiteiliger Komplex gebildet wird. Siehe z.B. U.S. Patent Nr. 4,376,110. Der zweite Antikörper kann selbst mit einem nachweisbaren Rest markiert sein (direkte Sandwichtests) oder kann unter Verwendung eines Anti-Immunglobulinantikörpers gemessen werden, der mit einem nachweisbaren Rest markiert ist (indirekte Sandwichtests). Beispiels-

weise ist eine Sorte des Sandwichtests ein Enzym-gekoppelter Immunosorbenttest (ELISA = „enzyme-linked immunosorbent assay"), in welchem Fall der nachweisbare Rest ein Enzym ist.

[0157] Die monoklonalen anti-VGF-Antikörper sind auch für die in vivo-Bildgebung nützlich. Ein mit einem nachweisbaren Rest markierter Antikörper kann an ein Tier verabreicht werden, vorzugsweise in dem Blutstrom und die Gegenwart und der Ort des markierten Antikörpers kann im Wirt getestet werden. Der Antikörper kann mit jedem Rest markiert sein, der in einem Tier nachweisbar ist, sei es durch magnetische Kernresonanz, Radiologie oder andere im Stand der Technik bekannte Nachweismittel.

[0158] Die monoklonalen Antikörper der Erfindung können als Therapeutika verwendet werden. Diese therapeutischen Mittel sind im allgemeinen Agonisten oder Antagonisten, indem sie jeweils entweder mindestens eine der biologischen Aktivitäten des VGF-Polypeptids verstärken oder verringern. In einer Ausführungsform sind die antagonistischen Antikörper der Erfindung Antikörper oder bindende Fragmente davon, die dazu in der Lage sind spezifisch an ein VGF-Polypeptid zu binden und die dazu in der Lage sind, die funktionelle Aktivität eines VGF-Polypeptids in vivo oder in vitro zu inhibieren oder zu eliminieren. In bevorzugten Ausführungsformen wird das selektiv bindende Mittel, z.B. ein antagonistischer Antikörper, die funktionelle Aktivität eines VGF-Polypeptids um mindestens etwa 50% und vorzugsweise um mindestens etwa 80% inhibieren. In einer anderen Ausführungsform kann das selektiv bindende Mittel ein Anti-VGF-Polypeptidantikörper sein, der dazu in der Lage ist, mit einem VGF-Polypeptidbindungspartner (einem Liganden oder einem Rezeptor) wechselzuwirken, wodurch er die Aktivität des VGF-Polypeptids in vitro oder in vivo inhibiert. Selektiv bindende Mittel, umfassend agonistische und antagonistische Anti-VGF-Polypeptidantikörper werden durch im Stand der Technik gut bekannte Testverfahren identifiziert.

[0159] Die Erfindung betrifft auch Kits, umfassend VGF-selektive monoklonale Antikörper und andere für den Nachweis von VGF-Polypeptidmengen in biologischen Proben nützliche Reagenzien. Solche Reagenzien können einen nachweisbaren Marker, Blockierungsserum, positive und negative Kontrollproben und Nachweisreagenzien umfassen.

Chemische Derivate

[0160] Chemisch modifizierte Derivate der VGF-Polypeptide können durch den Fachmann, auf Grundlage der hier zur Verfügung gestellten Offenbarung, hergestellt werden. Die VGF-Polypeptidderivate werden in einer Weise modifiziert, die entweder in der Sorte oder dem Ort der Moleküle, die natürlicherweise an dem Polypeptid befestigt sind, verschieden ist. Die Derivate können Moleküle umfassen, die durch Deletion von einer oder mehreren natürlicherweise befestigten chemischen Gruppen gebildet werden. Die VGF-Polypeptide können durch die kovalente Befestigung von einem oder mehreren Polymeren modifiziert werden. Beispielsweise ist das ausgewählte Polymer typischerweise wasserlöslich, so daß das Protein an dem es befestigt ist, nicht in einer wäßrigen Umgebung, wie in einer physiologischen Umgebung, präzipitiert. Vom Umfang geeigneter Polymere ist ein Gemisch aus Polymeren umfaßt. Vorzugsweise wird für die therapeutische Verwendung der Endproduktzubereitung das Polymer pharmazeutisch annehmbar sein. Jedes der Polymere kann jedes Molekulargewicht aufweisen und kann verzweigt oder unverzweigt sein. Jedes der Polymere hat ein durchschnittliches Molekulargewicht zwischen etwa 2 kDa bis etwa 100 kDa (der Begriff „etwa" deutet darauf hin, daß in Zubereitungen eines wasserlöslichen Polymers einige Moleküle mehr, einige weniger als das angegeben Molekulargewicht wiegen). Das durchschnittliche Molekulargewicht jedes Polymers ist vorzugsweise zwischen etwa 5 kDa und etwa 50 kDa, noch bevorzugter zwischen etwa 12 kDa und etwa 40 kDa und am meisten bevorzugt zwischen etwa 20 kDa und etwa 35 kDa.

[0161] Geeignete wasserlösliche Polymere oder Gemische davon umfassen, sind aber nicht beschränkt auf N-verknüpfte oder O-verknüpfte Kohlenhydrate, Zucker, Phosphate, Polyethylenglycol (PEG) (umfassend die Formen des PEG, die dazu verwendet worden sind, um Proteine zu derivatisieren, umfassend Mono-(C_1-C_{10})-, Alkoxy- oder Aryloxypolyethylenglycol). Monomethoxypolyethylenglycol, Dextran (wie Dextran niederen Molekulargewichts von beispielsweise etwa 6 kD), Zellulose oder andere auf Kohlenhydrat beruhende Polymere, Poly-(N-vinylpyrrolidon)polyethylenglycol, Propylenglycolhomopolymere, Polypropylenoxid/Ethylenoxidcopolymere, polyoxyethylierte Polyole (z.B. Glycerol) und Polyvinylalkohol. Durch die vorliegende Erfindung auch umfaßt sind bifunktionale Quervernetzungsmoleküle, die verwendet werden können, um kovalent befestigte VGF-Polypeptidmultimere herzustellen.

[0162] Im allgemeinen kann eine chemische Derivatisierung unter jeder geeigneten Bedingung durchgeführt werden, die verwendet wird, um ein Protein mit einem aktivierten Polymermolekül zu reagieren. Verfahren für die Herstellung chemischer Derivate von Polypeptiden werden im allgemeinen die Schritte: (a) Reagieren des

Polypeptids mit dem aktivierten Polymermolekül (wie einem Reaktivester oder einem Aldehydderivat des Polymermoleküls) unter Bedingungen, bei denen VGF-Polypeptid an einem oder an mehreren Polymermolekülen befestigt wird und (b) die Gewinnung der Reaktionsprodukte umfassen. Die optimalen Reaktionsbedingungen werden, beruhend auf bekannten Parametern und dem gewünschten Ergebnis, bestimmt. Je größer beispielsweise das Verhältnis der Polymermoleküle zu Protein desto größer ist der Prozentsatz der befestigten Polymermoleküle. In einer Ausführungsform kann das VGF-Polypeptidderivat einen einzigen Polymermolekülrest am Amino-Terminus befestigt aufweisen. Siehe z.B. U.S. Patent Nr. 5,234,784.

[0163] Die PEG-ylierung eines Polypeptids kann spezifisch unter Verwendung jeder der im Stand der Technik bekannten PEG-ylierungsreaktionen ausgeführt werden. Solche Reaktionen werden beispielsweise in den folgenden Verweisen beschrieben: Francis et al., 1992, Focus on Growth Factors 3:4–10; EP-Veröffentlichungsnr. 154316 und 401384; und U.S. Patent Nr. 4,179,337. Beispielsweise kann die PEG-ylierung über eine Acylierungsreaktion oder einer Alkylierungsreaktion mit einem reaktiven Polyethylengycolmolekül (oder einem analogen reaktiven wasserlöslichen Polymer), wie hierin beschrieben, durchgeführt werden. Für die Acylierungsreaktionen sollte das ausgewählte Polymer eine einzelne reaktive Estergruppe aufweisen. Für die reduktive Alkylierung sollte ein ausgewähltes Polymer eine einzelne reaktive Aldehydgruppe aufweisen. Ein reaktives Aldehyd ist beispielsweise Polyethylenglycolpropionaldehyd, das wasserstabil ist, oder Mono-C_1-C_{10}-Alkoxy- oder Aryloxyderivate davon (siehe U.S. Patent Nr. 5,252,714).

[0164] In einer weiteren Ausführungsform können die VGF-Polypeptide chemisch an Biotin gekoppelt werden. Den Biotin/VGF-Polypeptidmolekülen wird es dann erlaubt an Avidin zu binden, was zu tetravalenten Avidin/Biotin/VGF-Polypeptidmolekülen führt. Die VGF-Polypeptide können auch kovalent an Dinitrophenol (DNP) oder Trinitrophenol (TNP) gekoppelt werden und die sich ergebenden Konjugate können mit Anit-DNA oder Anti-TNP-IgM präzipitiert werden, um decamere Konjugate mit einer Valenzzahl von 10 zu bilden.

[0165] Im allgemeinen umfassen die Bedingungen, die durch die Verabreichung der vorliegenden VGF-Polypeptidderivate gelindert oder moduliert werden können, die, die hierin für VGF-Polypeptide beschrieben werden. Die hierin offenbarten VGF-Polypeptidderivate können weitere Aktivitäten, eine verstärkte oder verringerte biologische Aktivität oder andere Charakteristika, wie eine erhöhte oder eine verringerte Halbwertzeit im Vergleich zu nicht derivatisierten Molekülen, aufweisen.

Testen auf Modulatoren für die VGF-Polypeptidaktivität

[0166] In einigen Situationen kann es wünschenswert sein Moleküle zu identifizieren, die Modulatoren der Aktivität des VGF-Polypeptids sind, d.h. Agonisten oder Antagonisten. Natürliche oder synthetische Moleküle, die das VGF-Polypeptid modulieren können unter Verwendung eines oder mehrerer Testverfahren, wie die hierin beschriebenen, identifiziert werden. Solche Moleküle können entweder in einer ex vivo-Weise oder in einer in vivo-Weise durch Injektion oder durch orale Verabreichung, Implantatvorrichtungen oder ähnliches verabreicht werden.

[0167] Ein „Testmolekül" bezeichnet ein Molekül, das im Hinblick auf seine Fähigkeit, die Aktivität des VGF-Polypeptids zu modulieren (d.h. erhöhen oder verringern), untersucht wird. Am üblichsten ist es, daß ein Testmolekül direkt mit einem VGF-Polypeptid interagieren wird. Es wird jedoch auch erwogen, daß ein Testmolekül die VGF-Polypeptidaktivität indirekt, wie durch die Beeinflussung der VGF-Genexpression oder durch Bindung an einen VGF-Polypeptidbindungspartner (z.B. einem Rezeptor oder einem Liganden) modulieren kann. In einer Ausführungsform wird ein Testmolekül an ein VGF-Polypeptid mit einer Affinitätskonstante von mindestens etwa 10^{-6} M, vorzugsweise etwa 10^{-8} M, noch bevorzugter etwa 10^{-9} M und am meisten bevorzugt 10^{-10} M binden.

[0168] Ein VGF-Polypeptidagonist oder -antagonist kann ein Protein, Peptid, Kohlenhydrat, Lipid oder ein Molekül niederen Molekulargewichts sein, das mit dem VGF-Polypeptid interagiert, um seine Aktivität zu regulieren. Moleküle, die das VGF-Polypeptid regulieren, umfassen Nukleinsäuren, die zu Nukleinsäuren, die für ein VGF-Polypeptid kodieren, komplementär sind oder die zu Nukleinsäuresequenzen komplementär sind, die die Expression eines VGF-Polypeptids steuern oder kontrollieren und die als Antisenseregulatoren der Expression wirken.

[0169] Sobald ein Testmolekül, das mit einem VGF-Polypeptid interagiert, identifiziert worden ist, kann das Molekül weiter auf seinen Fähigkeit hin untersucht werden, die VGF-Polypeptidaktivität zu erhöhen oder zu verringern. Die Messung der Interaktion eines Testmoleküls mit einem VGF-Polypeptid kann auf mehrere Weisen ausgeführt werden, umfassend auf einer Zelle beruhende Bindungstestverfahren, Membranbindungstest-

verfahren, Lösungsphasentestverfahren und Immuntestverfahren und im allgemeinen wird ein Testmolekül mit einem VGF-Polypeptid für einen bestimmten Zeitraum inkubiert und die VGF-Peptidaktivität wird durch ein oder mehrere Testverfahren für das Messen der biologischen Aktivität bestimmt.

[0170] Die Wechselwirkung der Testmoleküle mit VGF-Polypeptiden kann auch direkt unter Verwendung polyklonaler oder monoklonaler Antikörper in einem Immuntestverfahren untersucht werden. Alternativ können modifizierte Formen der VGF-Polypeptide, die Epitopmarkierungen, wie hierin beschrieben, enthalten, in Lösungen und Immunassays verwendet werden.

[0171] Im Falle, daß die VGF-Polypeptide eine biologische Aktivität durch eine Wechselwirkung mit einem Bindungspartner zeigen (z.B. einem Rezeptor oder einem Liganden), können eine Vielzahl von in vitro-Testverfahren verwendet werden, um die Bindung des VGF-Polypeptids an den entsprechenden Bindungspartner (wie ein selektives Bindungsmittel, ein Rezeptor oder einen Liganden) zu messen. Diese Tests können verwendet werden, um Moleküle auf ihre Fähigkeit hin zu durchsuchen, die Rate und/oder den Umfang der Bindung eines VGF-Polypeptids an seinen Bindungspartner zu erhöhen oder zu verringern. In einem Test wird ein VGF-Polypeptid in den Vertiefungen einer Mikrotiterplatte immobilisiert. Radioaktiv markierter VGF-Polypeptidbindungspartner (beispielsweise ein iodinierter VGF-Polypeptidbindungspartner) und ein Testmolekül können dann entweder einer nach dem anderen (in beiderlei Reihenfolgen) oder gleichzeitig zu den Vertiefungen hinzugefügt werden. Nach der Inkubation kann die Vertiefung gewaschen werden und die Radioaktivität unter Verwendung eines Szintillationszählers gezählt werden, um den Umfang mit dem der Bindungspartner an das VGF-Polypeptid gebunden hat, zu bestimmen. Typischerweise wird ein Molekül über ein Konzentrationsbereich getestet werden und eine Serie von Kontrollvertiefungen, den ein oder mehrere Elemente der Testverfahren fehlen, kann für die Genauigkeit der Bewertung der Ergebnisse verwendet werden. Eine Alternative zu diesem Verfahren beinhaltet die Umkehrung der „Positionen" der Proteine, d.h. die Immobilisierung des VGF-Polypeptidbindungspartners in den Mikrotiterplattenvertiefungen, inkubieren mit dem Testmolekül und radioaktiv markiertem VGF-Polypeptid und bestimmen des Grads der VGF-Polypeptidbindung. Siehe z.B. Current Protocols in Molecular Biology, Kapitel 18 (Ausubel et al., Heraus., Green Publishers Inc. und Wiley and Sons 1995).

[0172] Als eine Alternative zur Radiomarkierung kann ein VGF-Polypeptid oder sein Bindungspartner an Biotin konjugiert werden und die Gegenwart biotinylierten Proteins kann durch die Verwendung von Streptavidin, das mit einem Enzym verknüpft ist, wie Meerrettichperoxidase (HRP = „horse radish peroxidase") oder alkalischer Phosphatase (AP), die kolormetrisch nachgewiesen werden können, oder durch Fluoreszenzmarkierung des Streptavidins nachgewiesen werden. Ein Antikörper, der gegen ein VGF-Polypeptid oder gegen ein VGF-Polypeptidbindungspartner gerichtet ist und der an Biotin konjugierte ist, kann auch zum Zwecke des Nachweises nach der Inkubation des Komplexes mit Enzym-gekoppelten Streptavidin gekoppelt an AP oder HRP verwendet werden.

[0173] Ein VGF-Polypeptid oder ein VGF-Polypeptidbindungspartner kann auch durch die Befestigung an Agaroseperlen, Akrylperlen oder anderen Sorten solcher inerten Festphasensubstrate immobilisiert werden. Der Substratproteinkomplex kann in eine Lösung eingebracht werden, die das komplementäre Protein und die Testverbindung enthält. Nach der Inkubation können die Perlen durch Zentrifugation präzipitiert werden und die Menge der Bindung zwischen einem VGF-Polypeptid und seinem Bindungspartner kann unter Verwendung der hierin beschriebenen Verfahren bewertet werden. Alternativ kann der Substratproteinkomplex in eine Säule mit dem Testmolekül und dem komplementären Protein, das durch die Säule fließt, immobilisiert werden. Die Bildung eines Komplexes zwischen einem VGF-Polypeptid und seinem Bindungspartner kann dann unter Verwendung jeder der hierin beschriebenen Verfahren (z.B. Radiomarkierung oder Antikörperbindung) bewertet werden.

[0174] Ein weiteres in vitro-Testverfahren, das für den Nachweis eines Testmoleküls, das die Bildung eines Komplexes zwischen einem VGF-Polypeptidbindungsprotein und einem VGF-Polypeptidbindungspartner erhöht oder verringert, nützlich ist, ist ein Oberflächenplasmonresonanzdetektorsystem, wie das BIAcore-Testsystem (Pharmacia, Piscataway, NJ). Das BIAcore-System wird wie durch den Hersteller vorgeschrieben, verwendet. Dieses Testverfahren beinhaltet die kovalente Bindung von entweder dem VGF-Polypeptid oder einem VGF-Polypeptidbindungspartner an einen Dextran-beschichteten Sensorchip, der in dem Detektor angeordnet ist. Die Testverbindung und das andere komplementäre Protein kann dann entweder gleichzeitig oder nacheinander in die Kammer, die den Sensorchip enthält, injiziert werden. Die Menge des komplementären Proteins, die bindet, kann aufgrund der Änderung der molekularen Masse, die mit der Dextran-beschichteten Seite des Sensorchips physisch assoziiert ist, bewertet werden, wodurch die Änderung der molekularen Masse durch das Selektionssystem nachgewiesen wird. In einigen Fällen kann es wünschenswert sein, zwei oder mehrere

Testverbindungen zusammen auf ihre Fähigkeit hin zu untersuchen, die Bildung eines Komplexes zwischen einem VGF-Polypeptid und einem VGF-Polypeptidbindungspartner zu erhöhen oder zu verringern. In diesen Fällen können die hierin offenbarten Testverfahren ohne weiteres durch das Hinzufügen solcher weiteren Testverbindungen) entweder gleichzeitig mit oder anschließend an die erste Testverbindung modifiziert werden. Die verbleibenden Schritte in den Testverfahren sind, wie hierin dargestellt.

[0175] In vitro-Testverfahren, wie die hierin beschriebenen, können vorteilhafterweise verwendet werden, um große Zahlen von Verbindungen auf eine Wirkung auf die Bildung des Komplexes zwischen einem VGF-Polypeptid und VGF-Polypeptidbindungspartner hin zu durchsuchen. Die Testverfahren können automatisiert werden, um Verbindungen zu durchsuchen, die in Phagenpräsentations-, synthetischen Peptid- und chemischen Synthesebibliotheken erzeugt wurden.

[0176] Verbindungen, die die Bildung eines Komplexes zwischen einem VGF-Polypeptid und einem VGF-Polypeptidbindungspartner erhöhen oder verringern, können auch in der Zellkultur unter Verwendung von Zellen und Zellinien, die entweder VGF-Polypeptid oder einen VGF-Polypeptidbindungspartner exprimieren, durchsucht werden. Die Zellen und Zellinien können von einem Säugetier erhalten werden, werden allerdings bevorzugt von einer menschlichen oder aus einer anderen Primaten-, Hunde- oder Nagetierquelle sein. Die Bindung des VGF-Polypeptids an Zellen, die VGF-Polypeptidbindungspartner an der Oberfläche exprimieren, wird in der Gegenwart oder Abwesenheit der Testmoleküle bewertet und der Umfang der Bindung kann beispielsweise durch Flußcytometrie unter Verwendung eines biotinylierten Antikörpers gegen einen VGF-Polypeptidbindungspartner bestimmt werden. Die Zellkulturtestverfahren können vorteilhafterweise verwendet werden, um Bindungen weiter zu bewerten, die in dem hierin beschriebenen Proteinbindungstestverfahren positive Ergebnisse zeigen.

[0177] Zellkulturen können auch verwendet werden, um auf die Auswirkungen eines Arzneistoffkandidaten/in zu suchen. Beispielsweise können Arnzeistoffkandidaten die Expression des VGF-Gens verringern oder erhöhen. In bestimmten Ausführungsformen kann die Menge des VGF-Polypeptids oder eines VGF-Polypeptidfragments, das hergestellt wird, nach dem Aussetzen der Zellkultur gegenüber dem Arzneistoffkandidaten gemessen werden. In bestimmten Ausführungsformen kann man die tatsächliche Auswirkung des Arzneistoffkandidaten auf die Zellkultur nachweisen. Beispielsweise kann die Überexpression eines bestimmten Gens eine bestimmte Auswirkung auf die Zellkultur haben. In solchen Fällen kann man die Fähigkeit eines Arzneistoffkandidaten die Expression der Gene zu verringern oder zu erhöhen oder seine Fähigkeit eine besondere Wirkung auf die Zellkultur zu verhindern oder zu inhibiern, bewerten. In anderen Beispielen kann die Herstellung eines besonderen metabolischen Produkts, wie ein Fragment eines Polypeptids zu einer Erkrankung oder einem pathologischen Zustand führen oder damit in Verbindung stehen. In solchen Fällen kann man die Fähigkeit eines Arzneistoffkandidaten die Erzeugung eines solchen metabolischen Produkts in einer Zellkultur zu verringern, testen.

Internalisierende Protein

[0178] Die tat-Proteinsequenz (aus HIV) kann verwendet werden, um Proteine in einer Zelle zu internalisieren. Siehe z.B. Falwell et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:664–68. Beispielsweise ist für eine 11 Aminosäuresequenz (Y-G-R-K-K-R-R-Q-R-R-R; SEQ ID Nr.: 11) des HIV-tat-Proteins (die als die „Proteintransduktionsdomäne" oder TAT PDT bezeichnet wurde) beschrieben, daß es den Transport über die cytoplasmatische Membran und die nukleäre Membran in der Zelle vermittelt. Siehe Schwarze et al., 1999, Science 285:1569–72; und Nagahara et al., 1998, Nat. Med. 4:1449–52. In diesen Verfahren werden FITC-Konstrukte (FITC-markiertes G-G-G-G-Y-G-R-K-K-R-R-Q-R-R-R; SEQ ID Nr.: 12), das die Gewebe nach intraperitoneal Verabreichung durchringt, zubereitet und die Bindung solcher Konstrukte an Zellen wird durch Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierungsanalyse (FACS = „fluorescence-activated cell sorting") nachgewiesen. Zellen, die mit einem tat-β-gal-Fusionsprotein behandelt werden, zeigen eine β-gal-Aktivität. Nach der Injektion kann die Expression eines solchen Konstrukts in einer Vielzahl von Geweben, umfassend die Leber, die Niere, die Lunge, das Herz und Gehirngewebe, nachgewiesen werden. Es wird angenommen, daß solche Konstrukte einen bestimmten Grad der Entfaltung unterzogen werden, um in die Zelle einzudringen und daher nach dem Eintritt in die Zelle einer Rückfaltung bedürfen.

[0179] Es wird daher erkannt werden, daß die tat-Proteinsequenz verwendet werden kann, um ein gewünschtes Polypeptid in eine Zelle aufzunehmen. Beispielsweise kann unter Verwendung der tat-Proteinsequenz ein VGF-Antagonist (wie ein Anti-VGF-selektives Bindungsmittel, ein kleines Molekül, ein löslicher Rezeptor oder ein Antisenseoligonukleotid) intrazellulär verabreicht werden, um die Aktivität eines VGF-Moleküls zu inhibieren. Wie hierin verwendet, bezeichnet der Begriff „VGF-Molekül" sowohl VGF-Nukleinsäuremoleküle und

VGF-Polypeptide, wie hierin definiert. Wenn gewünscht, kann das VGF-Protein selbst auch intern unter Verwendung dieser Verfahren verabreicht werden. Siehe auch Straus, 1999, Science 285:1466–67.

Therapeutische Verwendungen

[0180] Die monoklonalen Antikörper der vorliegenden Erfindung können verwendet werden, um ein Medikament für die Behandlung, Linderung oder Vorbeugung einer Anzahl akuter und chronischer Erkrankungen oder Zustände, umfassend die hierin genannten herzustellen.

[0181] VGF-verwandte Erkrankungen, Zustände und Störungen umfassen Fettleibigkeit, Sterilität, Cachexie, Eßstörung, den AIDS-verwandten Komplex, hypermetabolische Zustände, Hyperaktivität, Hypoaktivität und die Hyperinsulinproduktion.

[0182] Andere Erkrankungen, die durch unerwünschte Mengen von VGF-Polypeptiden ausgelöst oder vermittelt werden, sind vom Umfang dieser Erfindung umfaßt. Unerwünschte Mengen umfassen übermäßige Mengen der VGF-Polypeptide und subnormale Mengen der VGF-Polypeptide.

VGF-Polypeptidzusammensetzungen und die Verabreichung

[0183] Therapeutische Zusammensetzungen liegen im Umfang der vorliegenden Erfindung. Solche pharmazeutischen Zusammensetzungen können eine therapeutisch wirksame Menge eines monoklonalen Antikörpers der Erfindung in Mischungen mit einem pharmazeutisch oder physiologisch annehmbaren Formulierungsmittel, das aufgrund seiner Eignung für die Verabreichungsweise ausgewählt wurde, umfassen.

[0184] Annehmbare Formulierungsmaterialien sind bei den verwendeten Dosierungen und Konzentrationen vorzugsweise nicht für die Empfänger toxisch.

[0185] Die pharmazeutische Zusammensetzung kann Formulierungsmaterialien für die Modifikation, den Erhalt oder die Konservierung vom beispielsweise dem pH, der Osmolarität, der Viskosität, der Klarheit, der Farbe, der Isotonizität, des Geruchs, der Sterilität, der Stabilität, der Lösungs- oder Freisetzungsrate, der Adsorption oder der Penetration der Zusammensetzung enthalten. Geeignete Formulierungsmaterialien umfassen, sind aber nicht eingeschränkt auf Aminosäuren (wie Glycin, Glutamin, Aspargin, Arginin oder Lysin), antimikrobielle Mittel, Antioxidanzien (wie Askorbinsäure, Natriumsulfid oder Natriumhydrogensulfid), Puffer (wie Borat, Bicarbonat, Tris-HCl, Zitrate, Phosphate oder andere organische Säuren), Füllstoffe (wie Mannitol oder Glycin), Gelatisierungsmittel (wie Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA = „ethylenediamine tetraacetic acid")), Komplexierungsmittel (wie Koffein, Poylvinylpyrrolidon, beta-Cyclodextrin oder Hydroxypropyl-beta-cyclodextrin), Füllstoffe, Monosaccharide, Disaccharide und andere Kohlenhydrate (wie Glucose, Mannose oder Dextrine), Proteine (wie Serumalbumin, Gelatine oder Immunglobuline), Farbstoffe, Geschmacks- und Verdünnungsmittel, Emulgatoren, hydrophile Polymere (wie Polyvinylpyrrolidon), Polypeptide niederen Molekulargewichts, salzbildende Gegenion (wie Natrium), Konservierungsmittel (wie Benzalkoniumchlorid, Benzoesäure, Salicylsäure, Thimerosal, Phenethylalkohol, Methylparaben, Propylparaben, Chlorhexidin, Sorbinsäure oder Wasserstoffperoxid), Lösungsmittel (wie Glycerin, Propylenglycol oder Polyethylenglycol), Zuckeralkohole (wie Mannitol oder Sorbitol), Suspendierungsmittel, oberflächenaktive Substanzen oder Benetzungsmittel (wie Plurone; PEG; Sorbitanester; Polysorbate, wie Polysorbat 20 oder Polysorbat 80; Triton; Tromethamin; Lecithin; Cholesterol oder Tyloxapal), Stabilitäts-fördernde Mittel (wie Sucrose oder Sorbitol), Tonizitäts-fördernde Mittel (wie Alkalimetalhalide – vorzugsweise Natrium oder Kaliumchlorid oder Mannitolsorbitol), Verabreichungsvehikel, Verdünnungsmittel, Excipienten und/oder pharmazeutische Adjuvantien. Siehe Remington's Pharmaceutical Sciences (18. Ausgabe, A.R. Gennaro, Heraus. Mack Publishing Company 1990).

[0186] Die optimale pharmazeutische Zusammensetzung wird durch den Fachmann abhängig von den beabsichtigten Verabreichungsweg, dem Verabreichungsformat und der gewünschten Dosierung bestimmt werden. Siehe z.B. Remington's Pharmaceutical Sciences, supra. Solche Zusammensetzungen können den physikalischen Zustand, die Stabilität, die in vivo-Freisetzungsrate und die Rate der in vivo Entfernung des VGF-Moleküls beeinflussen.

[0187] Das primäre Vehikel oder der Carrier in einer pharmazeutischen Zusammensetzung kann entweder wäßriger oder nicht-wäßriger Natur sein. Beispielsweise kann ein geeignetes Vehikel oder ein Träger für die Injektion Wasser, physiologische Kochsalzlösung oder künstliche Cerebrospinalflüssigkeit sein, möglicherweise mit anderen Materialien ergänzt, die in Zusammensetzungen für die parenterale Verabreichung üblich sind. Neutrale gepufferte Salzlösung oder mit Serum gemischte Salzlösung sind weitere beispielhafte Vehikel. An-

dere beispielhafte pharmazeutische Zusammensetzungen umfassen Tris-Puffer mit einem pH von etwa 7,0–8,5 oder Acetatpuffer mit einem pH von etwa 4,0–5,5, die des weiteren Sorbitol oder einen geeigneten Ersatz enthalten können. In einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung können VGF-Polypeptidzusammensetzungen für die Lagerung durch das Mischen ausgewählten Zusammensetzung, die den gewünschten Reinheitsgrad aufweist, mit optionalen Formulierungsmitteln (Remington's Pharmaceutical Sciences, supra) in der Form eines lyophilisierten Kuchens oder einer wäßrigen Lösung zubereitet werden. Des weiteren kann das VGF-Polypeptidprodukt als ein Lyophilisat unter Verwendung geeigneter Exzipienten, wie Sucrose, formuliert werden.

[0188] Die pharmazeutischen Zusammensetzungen der Erfindung können für die parenterale Verabreichung ausgewählt werden. Alternativ können die Zusammensetzungen für die Inhalation oder für die Verabreichung durch den Verdauungstrakt wie oral ausgewählt werden. Die Zubereitung solcher pharmazeutisch annehmbaren Zusammensetzungen liegt im Können des Fachmanns.

[0189] Die Formulierungsbestandteile sind in Konzentrationen vorhanden, die für den Verabreichungsort annehmbar sind. Beispielsweise werden Puffer verwendet, um die Zusammensetzung bei einem physiologischen pH oder einem leicht niedrigeren pH zu halten, typischerweise mit einem pH-Bereich von etwa 5 bis etwa 8.

[0190] Wenn die parenterale Verabreichung erwogen wird, können die therapeutischen Zusammensetzungen für die Verwendung in dieser Erfindung in der Form einer Pyrogen-freien parenteral annehmbaren, wäßrigen Lösung, die das gewünschte VGF-Molekül in einem pharmazeutisch annehmbaren Vehikel enthält, vorliegen. Ein besonders geeignetes Vehikel für die parenterale Injektion ist steriles, destilliertes Wasser, in dem ein VGF-Molekül als eine sterile isotonische Lösung angemessen konserviert, formuliert wird. Noch eine weitere Zubereitung kann die Formulierung des gewünschten Moleküls mit einem Mittel, wie injizierbaren Mikrospheren, bioerodierbaren Partikeln, polymeren Verbindungen (wie Polymilchsäure oder Polyglycolsäure), Perlen oder Liposomen beinhalten, die die kontrollierte oder andauernde Freisetzung des Produkts zur Verfügung stellen, die dann über eine Depotinjektion verabreicht werden können. Hyaluronsäure kann auch verwendet werden und dies kann die Wirkung der Förderung eines anhaltenden Verbleibs im Blutkreislauf haben. Andere geeignete Mittel für die Einführung des gewünschten Moleküls umfassen implantierbare Arzneistoffverabreichungsvorrichtungen.

[0191] Es wird auch erwogen, daß bestimmte Formulierungen oral verabreicht werden können. Die VGF-Polypeptide, die in dieser Weise verabreicht werden, können mit oder ohne die Träger, die üblicherweise bei der Zusammensetzung fester Dosierungsformen, wie Tabletten und Kapseln, verwendet werden. Beispielsweise kann eine Kapsel entworfen werden, um den aktiven Teil der Formulierung an dem Punkt im Gastrointestinaltrakt freizusetzen an dem die Bioverfügbarkeit maximiert und der präsystemische Abbau minimiert ist. Weitere Mittel können aufgenommen werden, um die Absorption des VGF-Polypeptids zu ermöglichen. Verdünnungsmittel, Geschmacksstoffe, niedrig schmelzende Wachse, Pflanzenöle, Gleitmittel, Suspendierungsmittel, Tabletten, Zerfallstoffe und Bindungsmittel können auch verwendet werden.

[0192] Eine wirksame Menge der VGF-Polypeptide in einem Gemisch mit nicht toxischen Exipienten, die für die Herstellung von Tabletten geeignet sind, wird beschrieben. Durch das Auflösen der Tabletten in sterilen Wasser oder in anderen geeigneten Vehikeln können Lösung in Einheitsdosenform zubereitet werden. Geeignete Exipienten umfassen, sind aber nicht eingeschränkt auf inerte Verdünnungsmittel wie Calciumcarbonat, Natriumcarbonat oder -bicarbonat, Lactose oder Calciumphosphat; oder Bindungsmittel wie Stärke, Gelatine oder Acacia; oder Gleitmittel wie Magnesiumstearat, Sterarinsäure oder Talk.

[0193] Zusätzliche VGF-Polypeptid-pharmazeutische Zusammensetzungen werden für den Fachmann offensichtlich sein, die Formulierungen, die VGF-Polypeptide in Dauer- oder kontrollierten Freisetzungformulierungen beinhalten, umfassen. Die Techniken für die Formulierung einer Vielzahl anderer Dauer- oder kontrollierter Freisetzungsmittel wie Liposomenträgern, bioerodierbaren Mikropartikeln oder porösen Perlen und Depotinjektion sind dem Fachmann auch bekannt. Siehe z.B. PCT/CTS93/00829, die die kontrollierte Freisetzung poröser polymerer Mikropartikel für die Verabreichung pharmazeutischer Zusammensetzungen beschreibt.

[0194] Weitere Beispiele von Dauerfreisetzungszubereitungen umfassen semi-permeable Polymermatrizes, geformte Artikel, z.B. Filme oder Mikrokapseln. Dauerfreisetzungsmatrizes können Polyester, Hydrogele, Polylactide (U.S.-Patent Nr. 3,773,919 und EP Pub. Nr. 058481), Copolymere der L-Glutaminsäure (Ethyl-L-Glutamat (Sidman et al., 1983, Biopolymers 22:547–56), Poly(2-hydroxyethyl-methacrylat) (Langer et al., 1981, J. Biomed. Mater Res. 15:167–277 und Langer, 1982, Chem. Tech. 12:98–105), Ethylenvinylacetat (Langer et al., supra) oder Poly-D-(-)-3-hydroxybuttersäure (EP Pub. Nr. 133988) sein. Dauerfreisetzungszusammensetzun-

gen können auch Liposom umfassen, die durch mehrere im Stand der Technik bekannte Verfahren hergestellt werden können. Siehe z.B. Eppstein et. al, 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688–92; und EP Pub. Nr. 036676, 088046 und 143949.

[0195] Die VGF-pharmazeutische Zusammensetzung, die fü die in vivo-Verabreichung verwendet werden soll, muß üblicherweise steril sein. Dies kann durch Filtration durch Sterilfiltrationsmembranen erreicht werden. Wenn die Zusammensetzung lyophilisiert ist, kann die Sterilisierung unter Verwendung dieses Verfahrens entweder vor oder nach der Lyophilisierung und Rekonstitution durchgeführt werden. Die Zusammensetzung für die parenterale Verabreichung kann in lyophilisierter Form oder als Lösung aufbewahrt werden. Zusätzlich werden parenterale Zusammensetzungen im allgemeinen in einen Container eingebracht, der einen sterilen Zugang aufweist, beispielsweise einen intravenösen Lösungsbeutel oder Gefäß, der (das) einen durch eine Injektionsnadel durchstechbaren Stopfen aufweist.

[0196] Sobald die pharmazeutische Zusammensetzung formuliert worden ist, kann sie in sterilen Gefäßen als Lösung, Suspension, Gel, Emulsion, Feststoff oder als dehydriertes oder lyophilisiertes Pulver aufbewahrt werden. Solche Formulierungen können entweder in einer verbrauchsfertigen Form oder in einer Form (z.B. lyophilisiert) die vor der Verabreichung einer Rekonstitution bedarf, gelagert werden.

[0197] Kits für die Herstellung einer Einzeldosenverabreichungseinheit werden beschrieben. Diese Kits können jedes sowohl einen ersten Behälter, der ein getrocknetes Protein enthält, und einen zweiten Container, der eine wässerige Formulierung enthält, enthalten. Kits die einzel- und mehrkammrige Spritzen (z.B. Flüssigkeitsspritzen und getrocknete Spritzen) enthalten, werden auch beschrieben.

[0198] Die wirksame Menge einer pharmazeutischen VGF-Zusammensetzung, die therapeutisch eingesetzt werden soll, wird beispielsweise von dem therapeutischen Zusammenhang und den Zielen abhängen. Ein Fachmann wird erkennen, daß die geeignete Dosierungsmengen für die Behandlung somit zum Teil von den verabreichten Molekül, der Indikation für die das VGF-Molekül verwendet wird, dem Verabreichungsweg und der Größe (Körpergewicht, Körperoberfläche oder Organgröße) und dem Zustand (dem Alter und dem allgemeinen Gesundheitszustand) des Patienten abhängig, variieren wird. Dementsprechend kann der Kliniker die Dosierung titrieren und den Verabreichungsweg modifizieren, um die optimale therapeutische Wirkung zu erhalten. Eine typische Dosierung kann abhängig von den oben erwähnten Faktoren von etwa 0,1 µg/kg bis zu etwa 100 mg/kg reichen. In anderen Ausführungsformen kann die Dosierung von 0,1 µg/kg bis zu etwa 100 mg/kg; oder 1 µg/kg bis zu etwa 100 mg/kg oder 5µg/kg bis zu etwa 100 mg/kg reichen.

[0199] Die Häufigkeit der Dosierung wird von den pharmakologischen Parametern des VGF-Moleküls in der verwendeten Formulierung abhängen. Typischerweise wird ein Kliniker die Zusammensetzung verabreichen bis eine Dosierung erreicht wird, die die gewünschte Wirkung erzielt. Die Zusammensetzung kann daher als eine einzelne Dosierung als zwei oder mehr Dosierungen (die die selbe Menge des gewünschten Moleküls enthalten oder nicht enthalten können) über einen Zeitraum oder als eine beständige Infusion über eine implantierbare Vorrichtung oder einen Katheter verabreicht. Die weitere Abstimmung der geeigneten Dosierung wird routinemäßig vom Fachmann durchgeführt und liegt im Rahmen der üblicherweise von ihnen durchgeführten Aufgaben. Die angemessenen Dosierungen können durch die Verwendung geeigneter Dosierungsanwortdaten bestätigt werden.

[0200] Der Verabreichungsweg der pharmazeutischen Zusammensetzung steht in Übereinstimmung mit bekannten Verfahren, z.B. oral, durch Injektion über intravenöse intraperitoneal, intracerebrale (intraparenchymale), intracerebroventriculare, intramuskuläre, intraoculare, intraarterielle, intraportale oder intraläsionale Wege; durch beständige Freisetzungssysteme oder durch Implantationsvorrichtungen. Wenn gewünscht können die Zusammensetzungen durch Bolusinjektion oder kontinuierlich durch Infusion oder durch eine implantierbare Vorrichtung verabreicht werden.

[0201] Alternativ oder zusätzlich kann die Zusammensetzung lokal über Implantation einer Membran, eines Schwammes oder eines geeigneten Materials auf dem das gewünschte Molekül absorbiert oder eingekapselt worden ist, verabreicht werden. Wenn eine Implantationsvorrichtung verwendet wird, kann die Vorrichtung in ein geeignetes Gewebe oder in ein Organ implantiert werden und die Verabreichung des gewünschten Moleküls kann über Diffusion, zeitgesteuerte Bolusfreisetzung oder kontinuierliche Verabreichung stattfinden.

[0202] In einigen Fällen kann es wünschenswert sein die pharmazeutischen VGF-Polypeptidzusammensetzungen in einer ex vivo Weise zu verwenden. In solchen Fällen werden Zellen, Gewebe oder Organe, die aus dem Patienten entfernt worden sind, gegenüber einer pharmazeutischen VGF-Polypeptidzusammensetzung

ausgesetzt, wonach die Zellen, Gewebe oder Organe anschließend zurück in den Patienten implantiert werden.

[0203] In anderen Fällen kann ein VGF-Polypeptid durch die Implantation bestimmter Zellen, die genetisch verändert worden sind, verabreicht werden, unter Verwendung von Verfahren wie die hier beschriebenen, um das VGF-Polypeptid herzustellen und zu sekretieren. Solche Zellen können tierische oder menschliche Zellen sein und können autolog, heterolog oder xenogen sein. Gegebenenfalls können die Zellen immortalisiert sein. Um die Chance einer immunologischen Antwort zu verringern können die Zellen eingekapselt sein, um die Infiltration umgebenden Gewebes zu vermeiden. Einkapselungsmaterialien sind typischerweise biokompatible, semipermeable polymere Gefäße oder Membranen, die die Freisetzung des (der) Proteinprodukts(e) erlauben, aber die Zerstörung der Zellen durch das Immunsystem des Patienten oder durch andere schädigende Faktoren aus dem umgebenden Gewebe verhindern.

[0204] Wie hierin diskutiert, kann es wünschenswert sein, isolierte Zellpopulationen (wie Stammzellen, Lymphozyten, rote Blutzellen, Chondrozyten, Neuronen und ähnliche) mit einem oder mehreren VGF-Polypeptiden zu behandeln. Dies kann durch das Aussetzen der isolierten Zellen gegenüber dem Polypeptid direkt, wenn es in einer Form vorliegt, die für die Zellmembran durchgängig ist, erreicht werden.

[0205] Weitere hierin beschriebene Ausführungsformen beziehen sich auf Zellen und Verfahren (z.B. homologe Rekombination und/oder rekombinante Herstellungsverfahren), sowohl für die in vitro Herstellung therapeutischer Polypeptide als auch für die Produktion und Verabreichung therapeutischer Polypeptide durch Gentherapie oder Zelltherapie. Homologe und andere Rekombinationsverfahren können verwendet werden, um eine Zelle zu modifizieren, die ein normalerweise transkriptionell ruhendes VGF-Gen oder ein unterexpremiertes Gen enthalten und dadurch eine Zelle herstellen, die therapeutisch wirksame Mengen der VGF-Polypeptide exprimieren.

[0206] Die homologe Rekombination ist ein Verfahren, das ursprünglich für das Abzielen auf Gene entwickelt worden ist, um Mutationen in transkriptionell aktiven Genen zu induzieren oder zu korrigieren. Kucherlapati, 1989, Prog. in Nucl. Acid Res. & Mol. Biol. 36:301. Das grundlegende Verfahren wurde als ein Verfahren für das Einführen spezifischer Mutationen in spezifische Regionen eines Säugetiergenoms entwickelt (Thomas et al., 1986, Cell 44:419–28; Thomas und Capecchi, 1987, Ce1151:503–12; Doetschman et al. 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:8583–87) oder um spezifische Mutationen innerhalb von defekten Genen zu korrigieren (Doehtsman et al., 1987, Nature 330:576–78). Beispielhafte homologe Rekombinationsverfahren werden in den U.S.-Patent Nr. 5,272,071; EP Pub. Nr. 9193051 und 505500; PCT/US90/07642 und PCT Pub Nr. WO91/09955 beschrieben.

[0207] Durch die homologe Rekombination kann die DNA-Sequenz, die in das Genom eingefügt werden soll, auf eine spezifische Region des intressierenden Gens durch das Anheften dieser an die Ziel-DNA gesteuert werden. Die Ziel-DNA ist eine Nukleotidsequenz, die komplementär (homolog) zu einer Region der genomischen DNA ist. Kleine Stücke der Ziel-DNA, die zu einer spezifischen Region des Genoms komplementär sind, werden während des DNA-Vervielfältigungsprozesses in Kontakt mit dem Elternstrang gebracht. Es ist eine allgemeine Eigenschaft der DNA, die in eine Zelle insertiert worden ist, zu hybridisieren und dadurch mit anderen endogenen DNA-Stücken über gemeinsame homologe Regionen zu rekombinieren. Wenn dieser komplementäre Strang an einem Oligonukleotid befestigt ist, das eine Mutation oder eine andere Sequenz oder ein zusätzliches Nukleotid enthält, wird sie auch in den neu synthetisierten Strang als Ergebnis der Rekombination aufgenommen. Als Ergebnis der Fehlerüberprüfungsfunktion ist es der neuen DNA-Sequenz möglich, als Vorlage zu dienen. Somit wird die übertragene DNA in das Genom aufgenommen.

[0208] An diese Stücke der Ziel-DNA werden DNA-Regionen angeheftet, die mit der Expression des VGF-Polypeptids interagieren oder diese kontrollieren, z.B. flankierende Sequenzen. Beispielsweise werden ein Promotor/Enhancer-Element, ein Suppressor oder ein exogenes transkriptionsmodulatorisches Element in das Genom der beabsichtigten Wirtszelle in einer Nähe und einer Orientierung eingeführt, die ausreichend ist, um die Transkription der DNA, die für das gewünschte VGF-Polypeptid kodiert, zu beeinflussen. Das Kontrollelement kontrolliert einen Teil der im Wirtszellgenom vorhandenen DNA. Somit kann die Expression des gewünschten VGF-Polypeptids nicht durch Transfektion der DNA, die für das VGF-Gen selbst kodiert, sondern vielmehr durch die Verwendung von Ziel-DNA (enthaltend Homologieregionen mit dem interessierenden endogenen Gen) gekoppelt an DNA-regulatorische Segmente, die endogene Gensequenzen mit erkennbarem Signal für die Transkription eines VGF-Gens zur Verfügung stellen, erreicht werden.

[0209] In einem beispielhaften Verfahren wird die Expression eines gewünschten Ziel-Gens in einer Zelle

(d.h. ein gewünschtes endogenes zelluläres Gen) über homologe Rekombination in dem zellulären Genom an einer vorausgewählten Stelle durch die Einfügung der DNA, die mindestens eine regulatorische Sequenz, ein Exon und eines Splice-Donor-Stelle enthält, verändert. Diese Bestandteile werden in die chromosomale (genomische) DNA in einer solchen Weise eingeführt, daß dies in der Wirkung zur Produktion einer neuen Transkriptionseinheit (in der die regulatorische Sequenz, das Exon und die Splice-Donor-Stelle, die in dem DNA Konstrukt vorhanden ist, operativ mit dem Endogen-Gen verknüpft sind) führt. Als Ergebnis der Einführung dieser Bestandteile in die chromosomale DNA wird die Expression des gewünschten endogenen Gens verändert.

[0210] Die veränderte Gen-Expression wie hierin beschrieben umfaßt die Aktivierung (oder das Auslösen der Expression) eines Gens, das normalerweise in der erhaltenen Zelle ruht (nicht exprimiert) sowie die Erhöhung der Expression eines Gens, das nicht in physiologisch bedeutsamen Mengen in der Zelle wie erhalten exprimiert wird. Die Ausführungsformen umfassen des weiteren die Veränderung der Regulierung oder der Induktion, so daß sie von dem Muster der Regulation der Induktion, die in der Zelle, wie sie erhalten wird, verschieden ist und die Verringerung (beinhaltend die Beseitigung) der Expression eines Gens, das in der Zelle wie erhalten exprimiert wird.

[0211] Ein Verfahren, durch das homologe Rekombination verwendet werden kann, um die VGF-Polypeptidproduktion eines endogenen VGF-Gens einer Zelle zu erhöhen oder auszulösen, beinhaltet zuerst die Verwendung homologer Rekombination, um eine rekombinante Sequenz aus einem ortsspezifischen Rekombinationssystem (z.B. Cre/1oxP, FLP/FRT) (Sauer, 1994, Curr. Opin. Biotechnol., 5:521–27; Sauer, 1993, Methods Enzymol, 225:890–900) stromaufwärts (d.h. 5' zu) von der endogenen genomischen VGF-Polypeptid-kodierenden Region der Zelle zu plazieren. Ein Plasmid, das eine Rekombinationsstelle enthält, die homolog zu der Stelle ist, die direkt stromaufwärts von der genomischen VGF-Polypeptidkodierenden Region plaziert wurde, wird in die modifizierte Zelllinie zusammen mit dem geeigneten Rekombinator-Enzym eingeführt. Diese Rekombinase löst die Integration des Plasmids über die Rekombinationsstelle des Plasmids in die Rekombinationsstelle aus, die direkt stromaufwärts der genomischen VGF-Polypeptid-kodierenden Region in der Zelllinie angeordnet ist (Baubonis und Auser, 1993, Nuclic Acids Res. 21:2025–29; O'Gorman et al., 1991, Science 251:1351–55). Alle flankierenden Sequenzen, für die bekannt ist, daß sie die Transkription erhöhen (z.B. Enhancer/Promoter, Intron, translationale Enhance) würden, wenn sie richtig in diesem Plasmid positioniert sind, in einer Weise integrieren, daß sie eine neue oder modifizierte transkriptionelle Einheit erzeugen, was zur de novo oder erhöhter VGF-Polypeptidproduktion von dem endogenen VGF-Gen der Zelle führt.

[0212] Ein weiterer Ansatz für die Erhöhung oder die Auslösung der Expression des VGF-Polypeptids von dem endogenen VGF-Gen einer Zelle beinhaltet die Erhöhung oder das Auslösen der Expression eines Gens oder von Genen (z.B. Transkriptionsfaktoren) und/oder Verringerung der Expression von einem Gen oder Genen (z.B. transkriptionellen Repressoren) in einer Weise, die zur de novo oder erhöhten VGF-Polypeptidproduktion des endogenen VGF-Gens einer Zelle führt. Dieses Verfahren beinhaltet die Einführung eines nicht natürlich vorkommenden Polypeptids (z.B. eines Polypeptids, das eine ortsspezifische DNA-Bindungsdomäne umfaßt, die an eine Transkriptionsfaktordomäne fusioniert ist) in die Zelle, so daß sich eine de novo oder eine erhöhte VGF-Polypeptidproduktion von dem endogenen VGF-Gen der Zelle ergibt.

[0213] Die VGF-Polypeptid-Zelltherapie, z.B. die Implantation von Zellen, die VGF-Polypeptide erzeugen, wird auch beschrieben. Diese Ausführungsform beinhaltet die Implantation von Zellen, die dazu in der Lage sind, eine biologisch aktive Form des VGF-Polypeptids zu synthetisieren und zu sekretieren. Solche VGF-Polypeptid-erzeugenden Zellen können Zellen sein, die natürlicherweise VGF-Polypeptide herstellen, oder können rekombinante Zellen sein, deren Fähigkeit VGF-Polypeptide herzustellen durch Transformation mit einem Gen, das für das gewünschte VGF-Polypeptid kodiert, oder mit einem Gen, das die Expression des VGF-Polypeptids ergänzt, ergänzt worden ist. Solche Modifikationen können mittels eines Vektors, der für die Verabreichung des Gens geeignet ist, sowie durch die Förderung seiner Expression und Sekretion erreicht werden. Um eine mögliche immunologisch Reaktion in den Patienten zu verringern, denen ein VGF-Polypeptid verabreicht wird, wie sie durch die Verabreichung eines Polypeptids einer fremden Spezies auftreten kann, ist es bevorzugt, daß die natürliche Zelle, die das VGF-Polypeptid produziert, menschlichen Ursprungs ist und ein menschliches VGF-Polypeptid produziert. Gleichermaßen ist es bevorzugt, daß die rekombinanten Zellen, die das VGF-Polypeptid erzeugen, mit einem Expressionsvektor transformiert sind, der ein Gen enthält, das für ein menschliches VGF-Polypeptid kodiert.

[0214] Die implantierten Zellen können eingekapselt sein, um die Infiltration von umgebendem Gewebe zu verhindern. Menschliche und nicht menschliche Tierzellen können in den Patienten in biokompatiblen, semipermeablen Polymeren, Behältern oder Membranen, die die Freisetzung des VGF-Polypeptids erlauben, aber die die Zerstörung der Zellen durch das Immunsystem des Patienten oder durch andere nachteilige Faktoren

aus dem umgebenden Gewebe behindern, implantiert werden. Alternativ können die eigenen Zellen des Patienten ex vivo transformiert werden, um VGF-Polypeptide zu erzeugen, die direkt in den Patienten ohne eine solche Einkapselung implantiert werden können.

[0215] Verfahren für die Einkapselung lebender Zellen sind im Stand der Technik bekannt und die Zubereitung eingekapselter Zellen und ihre Implantation im Patienten kann routinemäßig erreicht werden. Beispielsweise beschreiben Baetge et al. (PCT Pub. Nr. WO 95/05452) und PCT/LTS94/09299) Membrankapseln, die genetisch veränderte Zellen für die wirksame Verabreichung biologisch aktiver Moleküle enthalten. Die Kapseln sind biokompatibel und einfach wiedergewinnbar. Die Kapseln kapseln Zellen ein, die mit rekombinanten DNA-Molekülen, die DNA-Sequenzen umfassen, die für biologisch wirksame Moleküle kodieren, welche wirksam mit Promotoren verknüpft sind, die in vivo nicht der Heruntenegulierung nach der Implantation in den Säugetierwirt unterliegen, transfiziert sind. Die Vorrichtungen ermöglichen die Verabreichung von Molekülen aus lebenden Zellen an spezifischen Stellen innerhalb eines Empfängers. Siehe zusätzlich U.S. Patent Nr. 4,892,538; 5,011,472; und 5,106,627. Ein System für die Einkapselung lebender Zellen wird in der PCT Pub. Nr. WO 91/10425 (Aebischer et al.) beschrieben. Siehe auch PCT Pub. Nr. WO 91/10470 (Aebischer et al.); Winn et al., 1991, Exper. Neurol. 113:322–29; Aebischer et al., 1991, Exper. Neurol. 111:269:75 und Tresco et al. 1992, ASAIO 38:17–23.

[0216] Die in vivo und in vitro Gentherapieverabreichung von VGF-Polypeptiden wird auch beschrieben. Ein Beispiel eines Gentherapieverfahrens besteht in der Verwendung einer Nukleinsäure (entweder genomische DNA, cDNA und/oder synthetische DNA), die für ein VGF-Polypeptid kodiert, die operativ mit einem konstitutiven oder einem induzierbaren Promotor verknüpft sein kann, um ein „Gentherapie-DNA-Konstrukt" zu bilden. Der Promotor kann homolog oder heterolog zu dem endogenen VGF-Gen sein unter der Voraussetzung, daß er in der Zelle oder dem Gewebetyp, in den das Konstrukt eingeführt werden wird, aktiv ist.

[0217] Andere Bestandteile des Gentherapie-DNA-Konstrukts können gegebenenfalls DNA-Moleküle enthalten, die für die ortsspezifische Integration entworfen sind (z.B. endogene Sequenzen, die für die homologe Rekombination nützlich sind), gewebespezifische Promotoren, Enhancer oder Silencer, DNA-Moleküle, die dazu in der Lage sind, einen selektiven Vorteil gegenüber den Ursprungszellen zu verleihen, DNA-Moleküle, die als Markierung nützlich sind, um die transformierten Zellen zu identifizieren, negative Selektionssysteme, zellspezifische Bindungsmittel (wie beispielsweise für die Abzielung auf Zellen), zellspezifische Internalisierungsfaktoren, Transkriptionsfaktoren, die die Expression von einem Vektor verstärken, und Faktoren, die die Vektorherstellung ermöglichen.

[0218] Ein Gentherapie-DNA-Konstrukt kann dann unter Verwendung viraler oder nicht viraler Vektoren in die Zellen eingeführt werden (entweder ex vivo oder in vivo). Andere Mittel für das Einführen des Gentherapie-DNA-Konstrukts sind virale Vektormittel, wie hierin beschrieben. Bestimmte Vektoren wie retrovirale Vektoren werden das DNA-Konstrukt an die chromosomale DNA der Zellen liefern und das Gen kann in die chromosomale DNA integrieren. Andere Vektoren werden als Episome wirken und das Gentherapie-DNA-Konstrukt wird im Zytoplasma verbleiben.

[0219] In noch anderen Ausführungsformen können regulatorische Elemente für die kontrollierte Expression des VGF-Gens in der Zielzelle umfaßt werden. Solche Elemente werden in Antwort auf einen geeigneten Effektor angeschaltet. In dieser Weise kann ein therapeutisches Polypeptid, wenn gewünscht, exprimiert werden. Ein übliches Kontrollmittel beinhaltet die Verwendung Dimerisierer mit einer kleinen Molekülgröße oder von Rapalogen, um primäre Proteine zu dimerisieren, die eine Bindungsdomäne für eine kleines Molekül enthalten und eine Domäne, die dazu in der Lage ist, einen biologischen Vorgang zu initiieren, wie ein DNA-Bindungsprotein oder ein transkriptionelles Aktivierungsprotein (siehe PCT Pub. Nr. WO 96/41865, WO 97/31898 und WO 97/31899). Die Dimerisierung von Proteinen kann verwendet werden, um die Transkription des Transgens zu initiieren.

[0220] Eine alternative Regulationstechnologie verwendet ein Verfahren für die Aufbewahrung von Proteinen, die von dem interessierenden Protein exprimiert werden, innerhalb der Zelle als ein Aggregat oder ein Cluster. Das interessierende Gen wird als ein Fusionsprotein exprimiert, das eine konditionale Zusammenlagerungsdomäne enthält, die zum Zurückhalten des aggregierten Proteins im endoplasmatischen Reticulum führt. Die gelagerten Proteine sind stabil und innerhalb der Zelle inaktiv. Die Proteine können jedoch durch die Verabreichung eines Arzneistoffs (z.B. eines niedermolekularen Liganden), der die bedingte Aggregationsdomäne entfernt und dadurch spezifisch die Aggregate oder Cluster auseinanderbricht, freigesetzt werden, so daß die Proteine aus der Zelle sekretiert werden können. Siehe Aridor et al., 2000, Science 287:816–17 und Rivera et al. 2000, Science 287:826–30.

[0221] Andere geeignete Kontrollmittel oder Genschalter umfassen, sind aber nicht eingeschränkt auf die hierin beschriebenen Systeme. Mifepriston (RU486) wird als ein Progesteronantagonist verwendet. Die Bindung einer modifizierten Progesteronrezeptorligandenbindungsdomäne gegen den Progesteronantagonisten aktiviert die Transkription durch die Bildung eines Dimers zweier Transkriptionsfaktoren, die dann in den Kern gelangen, um die DNA zu binden. Die Ligandenbindungsdomäne wird modifiziert, um die Fähigkeit des Rezeptors zu entfernen, an den natürlichen Liganden zu binden. Das modifizierte Steroidhormonrezeptorsystem wird weiter in dem US-Patent Nr. 5,364,791 und PCT Pub. Nr. WO 96/40911 und WO 97/10337 beschrieben.

[0222] Noch ein weiteres Kontrollsystem verwendet Ecdyson (ein Steroidhormon der Fruchtfliege), das an den Ecdysonrezeptor (einen zytoplasmatischen Rezeptors) bindet und ihn aktiviert. Der Rezeptor wandert dann in den Kern, um an ein spezifisches DNA-Antwortelement (den Promoter des auf Ecdyson antwortenden Gens) zu binden. Der Ecdysonrezeptor umfaßt eine Transaktivierungsdomäne, eine DNA-Bindungsdomäne und eine Ligandenbindungsdomäne, um die Transkription zu initiieren. Das Ecdysonsystem wird weiter in dem U.S.-Patent Nr. 5,514,578 und den PCT Pub. Nr. WO 97/38117, WO 96/37609 und WO 93/03162 beschrieben.

[0223] Weitere Kontrollmittel verwenden einen positiven Tetrazyklin-kontrollierbaren Transaktivator. Dieses System beinhaltet eine mutierte Tet-Repressorprotein-DNA-Bindungsdomäne (mutiertes Tet R-4 Aminosäureänderungen, die zu einem umgekehrt Tetrazyklin-regulierten Transaktivator Protein führten, d.h. es bindet an ein Tet-Operator in Gegenwart von Tetrazyklin) verknüpft mit einem Polypeptid, das die Transkription aktiviert. Solche Systeme werden in dem U.S.-Patent Nr. 5,464,758, 5,650,298 und 5,654,168 beschrieben.

[0224] Weitere Expresssionskontrollsysteme und Nukleinsäurekonstrukte sind in den U.S.-Patenten Nr. 5,741,679 und 5,834,186 von Innovir Laboratories Inc. beschrieben.

[0225] Die in vivo-Therapie kann durch das Einführen eines Nukleinsäuremoleküls, das für ein VGF-Polypeptid kodiert, in Zellen über die lokale Injektion oder durch andere geeignete virale oder nicht virale Verabreichungsvektoren erreicht werden. Hefti, 1994, Neurobiology 25:1418–35. Beispielsweise kann ein Nukleinsäuremolekül, das für ein VGF-Polypeptid kodiert, in einem adeno-assoziierten Virusvektor (AAV) für die Verabreichung an Zielzellen enthalten sein (siehe z.B. Johnson, PCT Pub. Nr. WO 95/34670; PCT Anm. Nr. PCT/LTS95/07178). Das rekombinante AAV-Genom enthält typischerweise AAV-umgekehrte terminale Wiederholungen, die eine DNA-Sequenz, die für ein VGF-Polypeptid kodiert, flankieren, welche wirksam mit einem funktionellen Promoter und Polyadenylierungssequenzen verknüpft sind.

[0226] Geeignete alternative virale Vektoren umfassen, sind jedoch nicht eingeschränkt auf, Retrovirus-, Adenovirus-, Herpes simplex-, Lentivirus,- Hepatitis Virus-, Parvovirus-, Papovavirus-, Pockenvirus-, Alphavirus-, Coronavirus-, Rhabdovirus-, Paramyoxovirus- und Papilloma Virus-Vektoren. Das U.S.-Patent Nr. 5,672,344 beschreibt ein in vivo viral vermitteltes Gensystem, das einen rekombinanten neurotrophen HSV-1-Vektor beinhaltet. Das U.S.-Patent Nr. 5,399,346 stellt Beispiele für ein Verfahren zur Verfügung, um einem Patienten therapeutisches Protein durch die Verabreichung menschlicher Zellen, die in vitro behandelt worden sind, um ein DNA-Segment, das für ein therapeutisches Protein kodiert, einzufügen, zur Verfügung zu stellen. Weitere Verfahren und Materialien für die Ausführung der Gentherapieverfahren werden in den U.S.-Patent Nr. 5,631,236 (umfassend adenovirale Vektoren), 5,672,510 (umfassend retrovirale Vektoren), 5,635,399 (umfassend retrovirale Vektoren, die Zytokine exprimieren) beschrieben.

[0227] Nicht virale Verabreichungsverfahren umfassen, sind aber nicht eingeschränkt auf Liposom-vermittelten Transfer, nackte DNA-Verabreichung (direkte Injektion), Rezeptor-vermittelten Transfer (Liganden-DNA-Komplex), Elektroporation, Kalziumphosphatpräzipitation, und Mikropartikelbeschuß (z.B. Genkanone). Die Gentherapiematerialien und -verfahren können auch induzierbare Promotoren, gewebespezifische Enhancer-Promotoren, DNA-Sequenzen, die für die ortspezifische Integration entworfen wurde, DNA-Sequenzen, die dazu in der Lage sind, einen selektiven Vorteil gegenüber den Ausgangszellen zur Verfügung zu stellen, Markierungen, um transformierte Zellen zu identifizieren, negative Selektionssysteme und Expressionskontrollsysteme (Sicherheitsmaßnahmen), zellspezifische Bindungsmittel (für die Zellabzielung), zellspezifische Internalisierungsfaktoren und Transkriptionsfaktoren, um die Expression durch einen Vektor zu verstärken, sowie Verfahren für die Vektorherstellung umfassen. Solche weiteren Verfahren und Materialien für die Ausführung der Gentherapieverfahren werden in den U.S. Patent Nr. 4,970,154 (umfassend Elektroporationsverfahren), 5,679,559 (das ein Lipoprotein-enthaltendes System für die Genverabreichung beschreibt), 5,676,954 (umfassend liposomale Träger), 5,593,875 (das Verfahren für die Kalziumphosphattransfektion beschreibt) und 4,945,050 (das ein Verfahren beschreibt, bei dem biologisch aktive Partikel mit einer Geschwindigkeit auf Zellen vorwärts getrieben werden, so daß die Partikel die Oberfläche der Zellen durchdringen und in das innere der Zellen aufgenommen werden) und PCT Pub. Nr. WO 96/40958 (umfassend Kernliganden).

[0228] Es wird auch erwogen, daß die VGF-Gentherapie oder Zelltherapie des weiteren die Verabreichung eines oder mehrerer zusätzlicher Polypeptide in derselben oder einer anderen Zelle(n) umfaßt. Solche Zellen können in den Patienten separat eingeführt werden oder die Zellen können in einer einzelnen implantierbaren Vorrichtung wie der oben beschriebenen Einschließungsmembran enthalten sein, oder die Zellen können separat mittels virale Vektoren modifiziert sein.

[0229] Ein Mittel, um die endogene VGF-Polypeptidexpression in einer Zelle über die Gentherapie zu erhöhen, besteht darin, ein oder mehrere Enhancer-Elemente in den VGF-Polypeptidpromotor einzuführen, wobei die Enhancer-Elemente dazu dienen können, die transkriptionelle Aktivität des VGF-Gens zu erhöhen. Die verwendeten Enhancer-Elemente werden beruhend auf dem Gewebe, in dem man wünscht, das Gen zu aktivieren, ausgewählt werden – es werden Enhancer-Elemente ausgewählt werden, von denen bekannt ist, daß sie im dem Gewebe Promotoraktivierung vermitteln. Beispielsweise kann, wenn ein Gen, das für ein VGF-Polypeptid kodiert, in einer T-Zelle „angeschaltet" werden soll, das lck-Promotor-Enhancer-Element verwendet werden. Hier kann der funktionelle Teil des transkriptionellen Elements, der hinzugefügt werden soll, in ein DNA-Fragment, das den VGF-Polypeptidpromotor (und gegebenenfalls in einen Vektor und/oder 5' und/oder 3' flankierende Sequenzen) eingeführt wurde, unter Verwendung von standard Klonierungsverfahren eingeführt werden. Dieses Konstrukt, das als „homologes Rekombinationskonstrukt" bekannt ist, kann dann in die gewünschten Zellen entweder ex vivo oder in vivo eingeführt werden.

[0230] Die Gentherapie kann auch verwendet werden, um die VGF-Polypeptidexpression durch die Modifizierung der Nukleotidsequenz eines endogenen Promotors zu verringern. Solche Modifikation wird typischerweise über homologe Rekombinationsverfahren erreicht. Beispielsweise kann ein DNA-Molekül, das alles oder einen Teil der Promotors des für die Inaktivierung ausgesuchten VGF-Gens enthält, verändert werden, um Teile des Promotors, der die Transkription reguliert, zu entfernen und/oder zu ersetzen. Beispielsweise kann die TA-TA-Box und/oder die Bindungsstelle des Transkriptionsaktivators des Promotors unter Verwendung von üblichen molekularbiologischen Verfahren deletiert werden; solche Deletionen können die Promotoraktivität inhibieren, wodurch die Transkription des korrespondierenden VGF-Gens unterdrückt wird. Die Deletion der TA-TA-Box oder der Transkriptionsaktivatorbindungsstelle in dem Promotor kann durch das Erzeugen eines DNA-Konstrukts, das den gesamten oder den relevanten Teil des VGF-Polypeptid-Promotors (von derselben oder einer verwandten Spezies wie das VGF-Gen, das reguliert werden soll umfaßt, indem ein oder mehrere der TATA-Box und/oder transkriptionellen Aktivatorbindungsstellennukleotide durch Substitution, Deletion und/oder Insertion einer oder mehrerer Nukleotide mutiert sind, erreicht werden. Als Ergebnis hat die TATA-Box und/oder die Aktivatorbindungsstelle eine verringerte Aktivität oder wird vollständig inaktiv gemacht. Dieses Konstrukt, das üblicherweise auch mindestens etwa 500 Basen einer DNA enthält, die zu dem nativen (endogenen) 5'- und 3'-DNA-Sequenzen, die an das Promotorsegment angrenzen, das modifiziert worden ist, können in geeignete Zellen (entweder ex vivo oder in vivo) entweder direkt oder über einen viralen Vektor, wie hierin beschrieben, eingeführt werden. Typischerweise wird die Integration des Konstrukts in die genomische DNA der Zellen über homologe Rekombination stattfinden, wobei die 5'- und 3'-DNA-Sequenzen in dem Promotorkonstrukt dabei helfen können, die modifizierte Promotorregion über Hybridisierung mit der endogenen chromosomalen DNA zu integrieren.

Verwendungen der VGF-Polypeptide

[0231] Die VGF-Polypeptide können (gleichzeitig oder aufeinanderfolgend) in Kombination mit einem oder mehreren Zytokinen, Wachstumsfaktoren, Antibiotika, antiinflammatorischen Mitteln und/oder chemotherapeutischen Mitteln, wie es für den Zustand, der behandelt wird angemessen ist, verwendet werden.

[0232] Andere Verfahren können auch verwendet werden, wenn es wünschenswert ist, die Aktivität von einem oder mehreren VGF-Polypeptiden zu inhibieren. Eine solche Inhibition kann durch Nukleinsäuremoleküle bewirkt werden, die zu Expressionskontrollsequenzen (Tripelhelixbildung) oder zu VGF-mRNA komplementär sind und hybridisieren. Beispielsweise können anti-Sense-DNA- oder RNA-Moleküle, die eine Sequenz aufweisen, die zumindest zu einem Teil eines VGF-Gens komplementär ist, in die Zelle eingeführt werden. Anti-Sense-Sonden können durch erhältliche Verfahren unter Verwendung der hierin offenbarten Sequenz des VGF-Gens entworfen werden. Typischerweise wird jedes solche anti-Sense-Molekül komplementär zur Startstelle (5' Ende) jedes ausgewählten VGF-Gens sein. Wenn das anti-Sense-Molekül dann mit der korrespondierenden VGF-mRNA hybridisiert, wird die Translation dieser mRNA verhindert oder verringert. Die anti-Sense-Inhibitoren stellen Informationen zur Verfügung, die mit der Verringerung oder der Abwesenheit eines VGF-Polypeptids in einer Zelle oder einem Organismus in Verbindung stehen.

[0233] Alternativ kann die Gentherapie eingesetzt werden, um einen dominant negativen Inhibitor einer oder

mehrerer VGF-Polypeptide zu erzeugen. In dieser Situation wird die DNA, die für ein mutiertes Polypeptid jedes ausgewählten VGF-Polypeptids kodiert, vorbereitet werden und in die Zellen eines Patienten unter Verwendung von entweder viralen oder nicht viralen Verfahren, wie hierin beschrieben, eingeführt werden. Jede solche Mutante wird typischerweise entworfen, um mit dem endogenen Polypeptid in seiner biologischen Rolle im Wettbewerb zu stehen.

[0234] Zusätzlich kann ein VGF-Polypeptid, ob es biologisch aktiv ist oder nicht, als ein Immunogen verwendet werden, das bedeutet, das Polypeptid enthält mindestens ein Epitop, gegen das Antikörper herangezogen werden können. Selektiv bindende Mittel, die an ein VGF-Polypeptid (wie hierin beschrieben) binden, können für in vivo und in vitro diagnostische Zwecke verwendet werden, umfassend, aber nicht einschränkend auf Verbindungen in markierter Form, um die Gegenwart eines VGF-Polypeptids in einer Körperflüssigkeit oder einer Zellprobe nachzuweisen. Die Antikörper können auch verwendet werden, um ein Medikament für die Vorbeugung oder Behandlung einer Anzahl von Erkrankungen und Störungen umfassend die hierin wiedergegebenen, herzustellen. Die Antikörper können an ein VGF-Polypeptid binden, um mindestens eine Aktivitätscharakteristik eines VGF-Polypeptids zu verringern oder zu blockieren oder können an ein Polypeptid binden, um mindestens eine Aktivitätscharakteristik eines VGF-Polypeptids (umfassend durch die Erhöhung der Pharmakokinetik des VGF-Polypeptids) zu erhöhen.

[0235] Die hierin beschriebenen VGF-Polypeptide können verwendet werden, um VGF-Polypeptidrezeptoren unter Verwendung einer Expressionsklonierungsstrategie zu klonieren. Ein radioaktiv markiertes (125-Jod) VGF-Polypeptid oder ein Affinitäts-/Aktivitätsmarkiertes VGF-Polypeptid (wie eine Fc-Fusion oder eine alkalische Phosphatasefusion) kann in Bindungstests verwendet werden, um eine Zellsorte oder eine Zelllinie oder Gewebe zu identifizieren, die VGF-Polypeptidrezeptoren exprimieren.

[0236] RNA, die aus solchen Zellen oder Geweben isoliert wird, kann in cDNA umgewandelt werden, in einen Säugetierexpressionsvektor kloniert werden und in Säugetierzellen (wie COS oder 293-Zellen) transfiziert werden, um eine Expressionsbibliothek zu erzeugen. Ein radioaktiv markiertes oder markiertes VGF-Polypeptid kann dann als Affinitätsligand verwendet werden, um aus dieser Bibliothek die Untergruppe der Zellen zu identifizieren und zu isolieren, die VGF-Polypeptidrezeptoren auf ihrer Oberfläche exprimieren. Die DNA kann dann aus diesen Zellen isoliert werden und in Säugetierzellen transfiziert werden, um eine sekundäre Expressionsbibliothek zu erzeugen, in der der Teil der Zellen, die VGF-Polypeptidrezeptoren exprimieren, um ein Vielfaches höher ist als in der einfachen Bibliothek. Dieser Anreicherungsprozeß kann iterativ wiederholt werden, bis ein einzelner rekombinanter Klon, der ein VGF-Polypeptidrezeptor enthält, isoliert wird. Die Isolierung des VGF-Polypeptidrezeptors ist für die Identifizierung und Entwicklung neuer Agonisten und Antagonisten des VGF-Polypeptidsignalwegs nützlich. Solche Agonisten und Antagonisten umfassen lösliche VGF-Polypeptidrezeptoren, Anti-VGF-Polypeptidrezeptoren, Antikörper, kleine Moleküle oder anti-Sense-Oligonukleotide und sie können verwendet werden, um ein Medikament für die Behandlung oder die Vorbeugung einer oder mehrerer der hierin beschriebenen Erkrankungen oder Störungen herzustellen.

[0237] Es ist beabsichtigt, daß die folgenden Beispiele lediglich der Erörterung dienen und sie sollen nicht in irgendeiner Weise als für den Umfang der Erfindung beschränkend interpretiert werden.

Beispiel 1: Herstellung von Anti-VGF-Polypeptid-Antikörpern

[0238] Antikörper gegen VGF-Polypeptide wurden durch die Injektion von Kaninchen mit VGF-Polypeptiden, die durch die Amgen Boulder Peptide Technology-Gruppe unter Verwendung von Standard-Peptidsynthese-protokollen synthetisiert wurden, hergestellt. Nach der Peptidsynthese wurden VGF-Polypeptide aus verschiedenen Chargen zusammengenommen und lyophilisiert. Der Peptidgehalt dieses VGF-Polypeptids wurde durch Hydrolyse mit HCl bestimmt.

[0239] Um polyklonale Anti-VGF-Polypeptidantikörper aus VGF-Polypeptiden (VGF-1); SEQ ID Nr. 1 oder VGF-2; SEQ ID Nr. 4; Tabelle 1), denen Cysteinreste fehlen, herzustellen, wurden 5 mg eines VGF-Polypeptids und 0,5 ml Imject® EDC Conjugation Buffer (Pierce, Rockford, IL) in ein 2 ml Gefäß überführt und das Gemisch wurde gevortext. Ein 20 mg Gefäß von Imject® Schlüsselloch-Napfschnecken Hämocyanin (Pierce) wurde in 2 ml sterilisiertem Wasser verdünnt und 0,5 ml dieser Lösung wurde zu der VGF-Polypeptidlösung hinzugefügt. Nach dem Hinzufügen des Schlüsselloch-Napfschnecken Hämocyanins wurden 0,1 ml EDC (10 mg EDC (Pierce)) in 1 ml sterilisiertem Wasser zu den VGF-Polypeptiden hinzugefügt und diese Lösung wurde bei Raumtemperatur für mindestens zwei Stunden inkubiert.

[0240] Nach der Inkubation wurde konjugiertes VGF-Polypeptid in einen Spectra/Por 6-Dialyseschlauch

(Sprectrum Laboratories, Ranch Dominguez, CA), der ein Molekulargewichtausschlußbereich von 1000 aufweist, überführt und in 2 L PBS über Nacht bei 4°C dialysiert, um EDTA aus der Probe zu entfernen, das ein bekanntes Antikoagulants ist. Die dialysierte, konjugierte VGF-Polypeptidlösung wurde in ein konisches 15 ml Röhrchen überführt und PBS wurde hinzugefügt, um das Volumen der Lösung auf 4 ml zu bringen. Teilmengen von 1 ml wurden jeweils in 2 ml Röhrchen mit Schraubverschluß überführt. Jede Teilmenge wurde mit einer 2 ml Glasspritze aufgezogen und wurde dann mit 1 ml Titermax® Research Adjuvant (CytRx, Norcross, Georgia) aufgezogen.

[0241] Die Spritze wurde mit einer Mischnadel der Größe 18 verbunden und die Lösung wurde bis zur Emulgation gemischt. Das Gemisch wurde dann in 2 ml Spritzen für die intramuskuläre Injektion in Kaninchen überführt. Die Kaninchen wurden mit 0,1 ml der VGF-Polypeptid-Adjuvantslösung an zwei Injektionsstellen injiziert und die Kaninchen wurden vier und sechs Wochen danach geboosted. Den Kaninchen wurde zum Test Blut entnommen (wobei ungefähr 5 ml entfernt wurden), gefolgt von einem zweiten Boost und dann wurde erneut nach zwei Wochen Testblut entnommen. Wenn die Blutentnahmen zur Herstellung als annehmbar erachtet wurden, wurden die Kaninchen erneut zwei Wochen nach diesem Boost einmal die Woche für sechs Wochen (wobei ungefähr 40 ml entnommen wurden) bluten gelassen. Die Fig. 1 und Fig. 2 stellen die Antikörpertiterkurven der mit entweder VGF-1 oder VGF-2 injizierten Kaninchen dar.

[0242] Um polyklonale Anti-VGF-Polypeptidantikörper aus VGF-Polypeptiden zu erzeugen, die Cysteinreste enthielten, wurden 5 mg eines VGF-Polypeptids und 0,5 ml von Imject® Maleimide Conjugation Buffer (Pierce) in ein 2 ml Gefäß überführt und das Gemisch wurde gevortext. Ein 20 mg Gefäß von Imject® Schlüsselloch-Napfschnecken Hämocyanin (Pierce) wurde in 2 ml sterilisiertem Wasser verdünnt und 0,5 ml dieser Lösung wurde zu der VGF-Polypeptidlösung hinzugefügt. Nach dem Hinzufügen des Schlüsselloch-Napfschnecken Hämocyanins wurde die VGF-Polypeptidlösung für mindestens zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

[0243] Nach dem Inkubation wurde konjugiertes VGF-Polypeptid in einem Spectra/Por 6-Dialyseschlauch überführt und in 2 L PBS über Nacht bei 4°C dialysiert, um EDTA aus der Probe zu entfernen. Die dialysierte, konjugierte VGF-Polypeptidlösung wurde in ein konisches 15 ml Röhrchen überführt und PBS wurde hinzugefügt, um das Volumen der Lösung auf 4 ml zu bringen. Teilmengen von 1 ml wurden jeweils in 2 ml-Röhrchen mit Schraubverschluß überführt. Jede Teilmenge wurde in eine 2 ml Glasspritze aufgezogen und dann wurde 1 ml Titermax® Research Adjuvant (CytRx) aufgezogen.

[0244] Die Spritze wurde mit einer Mischnadel der Größe 18 verbunden und die Lösung wurde bis zur Emulgation gemischt. Das Gemisch wurde dann in 2 ml Spritzen für die intramuskuläre Injektion in Kaninchen überführt. Die Kaninchen wurden mit 0,1 ml der VGF-Polypeptid-Adjuvantslösung an zwei Injektionsstellen injiziert und die Kaninchen wurden vier und sechs Wochen danach geboosted. Den Kaninchen wurde zum Test Blut entnommen (wobei ungefähr 5 ml entfernt wurden), gefolgt von einem zweiten Boost und dann wurde erneut nach zwei Wochen Testblut entnommen. Wenn die Blutentnahmen zur Herstellung als annehmbar erachtet wurden, wurden die Kaninchen erneut zwei Wochen nach diesem Boost einmal die Woche für sechs Wochen (wobei ungefähr 40 ml entnommen wurden) bluten gelassen.

Beispiel 2: Die biologische Aktivität des VGF-Polypeptids in Knockoutmäusen

[0245] Die biologische Aktivität der VGF-Polypeptide in Knockoutmäusen wurde unter Verwendung von VGF-Polypeptiden, die durch die Amgen Boulder Peptide Technology Gruppe unter Verwendung von Standardpeptidsyntheseprotokollen hergestellt wurden, analysiert. Nach der Peptidsynthese wurden VGF-Polypeptide aus verschiedenen Chargen zusammengefaßt und lyophilisiert. Der Peptidgehalt für jedes VGF-Polypeptid wurde durch Hydrolyse mit HCl bestimmt.

[0246] VGF-Gen-Knockoutmäuse wurden von Steve Salton von der Mt. Sinai School of Medicine, New York, NY erhalten. Vor der Verabreichung des VGF-Polypeptids wurden die Knockoutmäuse unter LD 12:12-Bedingungen (d.h. zwölf Stunden Licht und zwölf Stunden Dunkelheit) untergebracht. 24 Stunden vor der VGF-Polypeptidinjektion wurden die Knockoutmäuse einzeln eingesperrt und in ein Übergangsunterbringungsraum gebracht, wo die Mäuse für den Rest des Experiments unter LD 12:12-Bedingungen gehalten wurden.

[0247] Das VGF-Polypeptid wurde den Knockoutmäusen zweimal täglich (um 9:00 und 18:00) durch intraperitoneale Injektion von 2 mg VGF-1a (SEQ ID Nr. 2, Tabelle 1) verabreicht. Vor der Injektion wurde das VGF-1a Polypeptid auf 16% in einem CSF-Lösungspuffer (126,6 mM NaCl, 2,6 mM KCl, 2,0 mM $MgCl_2$ und 1,4 mM $CaCl_2$, 10 mM $NaPO_4$, pH 7,4) verdünnt. Den Knockoutmäusen wurde das VGF-1a-Polypeptid für fünf Tage

verabreicht und das Körpergewicht jeder Maus wurde täglich gemessen. Das Körpergewicht der behandelten Mäuse wurde täglich für drei Tage nach dem Entzug des VGF-1a-Polypeptids gemessen.

[0248] Die Fig. 3 stellt das Körpergewicht der VGF-Knockoutmäuse nach der Verabreichung von VGF-1a dar. Drei der vier behandelten Mäuse gewannen 10–15% Körpergewicht dazu. Aus diesem Experiment war es nicht möglich zu bestimmen, ob der Anstieg des Gewichts ein Ergebnis der erhöhten Aufnahme von Nahrung oder von Wasser war.

Beispiel 3: VGF-Polypeptid-Fc-Fusionsproteine

[0249] Die VGF-Polypeptide wurden als Fusionsproteine mit einer menschlichen Imunglobulin IgG schweren Kette Fc-Region an ihrem Carboxy- oder Aminoende exprimiert. Unter Verwendung geeigneter PCR-Primer und von Standard-PCR-Vervielfältigungsverfahren wurden VGF-Polypeptid-Fc-Fusionskonstrukte durch im-Leseraster-Fusion einer DNA-Sequenz, die für die Fc-Region menschlichen IgG-1 mit der die für das VGF-1 (SEQ II) Nr. 1), VGF-1b (SEQ ID Nr. 3) oder FBF-2 (SEQ ID No. 4) Polypeptid kodiert, hergestellt.

[0250] Die VGF-Polypeptid-Fc-Fusionsprodukte, die durch PCR erzeugt wurde, wurden mit den Restriktionsendonucleasen Nde I und Bam HI in den Vektor pAMG21 ligiert und dann in kompetente E. coli Stamm 259 Zellen unter Verwendung von Standardverfahren transformiert. Klone wurden auf ihre Fähigkeit hin durchsucht ein rekombinantes Proteinprodukt herzustellen und derart die Genfusion, die die richtige Nukleotidseugenz aufweist zu besitzen.

[0251] Bakterielle Kulturen, die das Fc-Fusionskonstrukt im E. coli Stamm GM221 enthalten wurden bei 37°C in Luria Broth-Medium enthaltend 50 mg/ml Kanamycin wachsen gelassen. Die Induktion der Genproduktexpression von luxPR-Promotor wird durch das Hinzufügen des synthetischen autoinduzierers N-(3-Oxohexanoly)-DL-homoserinlacton zu dem Kulturmedium bis zu einer Endkonzentration von 20 ng/ml erreicht. Die Kulturen wurden bei 37°C für weitere drei Stunden inkubiert. Nach dieser Inkubation wurden alle Zellkulturen durch mikroskopische Untersuchung auf die Gegenwart von Einschlußkörpern hin untersucht und dann durch Zentrifugation gesammelt. Die Zellniederschläge wurden durch Resuspension in Laemmli-Probenpuffer, der 10% β-Mercaptoethanol enthielt, direkt lysiert und durch SDS-PAGE analysiert.

[0252] Die VGF-Polypeptid-Fc-Fusionsproteine werden zuerst durch das Zerstören der Zellen in Wasser unter Hochdruckhomogenisierung (d.h. zwei Durchleitungen bei 14.000 PSI gereinigt. Die Einschlußkörper werden durch Zentrifugation bei 4.200 RPM in J-6B für eine Stunde geerntet und die Einschlußkörper werden in 6 M Guanidin, 50 mM Tris, 8 mM DTT, pH 8,7 für eine Stunde mit einem Verhältnis von 1/10 löslich gemacht. Das löslich gemachte Gemisch wird dann in 2 M Harnstoff, 50 mM Tris, 160 mM Arginin, 3 mM Cystein, pH 5,8 20-fach verdünnt. Das Gemisch wird über Nacht im Kalten gerührt, etwa 10-fach durch Ultrafiltration konzentriert und dann 3-fach mit 10 mM Tris, 1,5 M Harnstoff, pH 9 verdünnt. Der pH dieses Gemisches wird dann mit Essigsäure auf pH 5 angepaßt. Das Präzipitat wird durch Zentrifugation entfernt und der Überstand wird auf eine SP-Sepharose Fast Flow Säule, die mit 20 mM NaAc, 100 mM NaCl, pH 5 equilibriert wurde, beladen (10 mg/ml Proteinbeladung; Raumtemperatur). Das Protein wird von der Säule unter der Verwendung eines Gradienten von 20 Säulenvolumina im selben Puffer, der von 100 mM NaCl bis 500 mM NaCl reicht, eluiert. Die zusammengefaßte Menge der Säule wird 3-fach verdünnt und auf eine SP-Sepharose-HP-Säule in 20 mM NaAc, 150 mM NaCl, pH 5 (10 mg/ml Proteinbeladung; Raumtemperatur) geladen. Das Protein wird unter Verwendung eines Gradienten mit 20 Säulenvolumina in demselben Puffer, der von 150 mM NaCl bis 400 mM NaCl reicht, eluiert. Der Scheitelpunkt wird zusammengefaßt und filtriert.

[0253] Die VGF-Polypeptid-Fc-Fusionsproteinaktivität wird unter Verwendung von hierin beschriebenen oder dem Fachmann bekannten Verfahren bewertet.

Beispiel 4: Expression des Mäuse-VGF-Polypeptids in transgenen Mäusen

[0254] Um die biologische Aktivität des VGF-Polypeptids zu bewerten, wurde ein Konstrukt, das für das Mäuse-VGF-Polypeptid unter der Kontrolle des Synapsinpromotors kodiert unter Verwendung von Standardvorschriften hergestellt. Für die Verabreichung des Konstrukts wird erwartet, daß es pathologische Änderungen auslöst, die im Hinblick auf die Funktion des VGF-Polypeptids informativ sind. Gleichermaßen wurde ein Konstrukt, das das VGF-Polypeptid voller Länge unter der Kontrolle des beta-Aktinpromotors enthält unter Verwendung von Standardprotokollen hergestellt. Für die Verabreichung dieses Konstrukts wird erwartet, daß es zu ubiquitärer Expression führt.

[0255] Um diese Konstrukte zu erzeugen, wurde die PCR verwendet um Vorlagen-DNA-Sequenzen, die für das Mäuse-VGF-Polypeptid kodieren, unter Verwendung von Primern, die zu den 5' und 3' Enden der gewünschten Sequenz korrespondieren und die Restriktionsenzym stellen beinhalten, um die Insertion des vervielfältigten Produkts in einen Explosionsvektor zu erlauben, vervielfältigt. Nach der Vervielfältigung wurden die PCR-Produkte über ein Gel gereinigt, mit dem entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut und in einen Expressionsvektor unter Verwendung von üblichen rekombinanten DNA-Verfahren legiert. Siehe Graham et al., 1997, Nature Genetics, 17:272–74 und Ray et al., 1991, Genes Dev. 5:2265–73.

[0256] Nach der Ligation wurden die Reaktionsgemische verwendet, um einen E. coli Wirtsstamm durch Elektroporation zu transformieren und die Transformanten wurden auf Arzneistoffresistenz hin ausgewählt. Die Plasmid-DNA aus ausgewählten Kolonien wurde isoliert und der DNA-Sequenzierung unterzogen, um die Gegenwart eines geeigneten Inserts und die Abwesenheit von Mutationen zu bestätigen. Die VGF-Polypeptid-Expressionsvektoren wurden über zwei Runden der CsCl-Dichte-Gradienten-Zentrifugation gereinigt, mit einem geeignetem Restriktionsenzym gespalten und das linearisierte Fragment, das das Mäuse-VGF-Polypeptid-Transgen enthielt, wurde durch Elektrophorese gereinigt. Das gereinigte Fragment wurde in 5 mM Tris, pH 7,4, und 0,2 mM EDTA mit einer Konzentration von 2 µm/mL resuspendiert.

[0257] Einzel-Zell Embryonen aus BDF1 × BDF1 verpaarten Mäusen wurden wie beschrieben injiziert (PCT Pub. No. WO 97/23614). Die Embryonen wurden über Nacht in einem CO_2 Inkubator inkubiert und 15–20 zwei-Zell Embryonen wurden in die Eileiter von Scheinschwangeren weiblichen CD1-Mäusen überführt. Die Nachkommen, die aus der Einnistung der Mikroinjizierten Embryos erhalten wurden, wurden durch PCR-Vervielfältigung des integrierten Transgens in den genomischen DNA-Proben wie folgt durchsucht. Ohrabschnitte wurden in 20 µL Ohrpuffer (20 mM Tris, pH 8,0, 10 mM EDTA, 0,5% SDS und 500 mg/mL Proteinase K) bei 55°C über Nacht verdaut. Die Proben wurden dann mit 200 µL TE verdünnt und 2 µL jeder Ohrprobe wurde in einer PCR-Reaktion unter Verwendung geeigneter Primer verwendet.

[0258] Transgene Ursprungstiere wurden identifiziert und verwendet um die F1-Mäuse zu erzeugen. Um dies zu tun wurde ein Teil der Milz, der Leber und des Gesamtgehirns aus F1-Mäusen entfernt und die gesamte zelluläre RNA wurde aus der Milz unter Verwendung des Total RNA Extraction Kits (Qiagen) isoliert und die Transgen-Expression wurde durch RT-PCR bestimmt. Die aus Milzen gewonnene RNA wurde in cDNA unter Verwendung von SuperScript™ Preamplification System (Gibco-BRL) wie folgt umgewandelt. Ein geeigneter Primer der in der Expressions-Vektorfrequenz und 3' zu der VGF-Polypeptid-Transgensequenz angeordnet war, wurde verwendet, um die cDNA Synthese von den transgenen Transkripten zu primen. Zehn mg Gesamt-RNA, die aus Leber-, Gehirn- und Milzgewebe des transgenen Gründers und aus Kontrollen wurde mit einem 1 mM Primer für 10 Minuten bei 70°C inkubiert und auf Eis gegeben. Die Reaktion wurde dann mit 10 mM Tris-HCl, pH 8,3, 50 mM KCl, 2,5 mM $MgCl_2$, 10 mM jedes dNTP, 0,1 mM DTT, und 200 U SuperScript II reverse Transkriptase ergänzt. Nach der Inkubation für 50 Minuten bei 42°C wurde die Reaktion durch das Erhitzen für 15 Minuten auf 72°C gestoppt und mit 2U RNase H für 20 Minuten bei 37°C verdaut. Proben wurden dann durch PCR unter Verwendung von Primern, die für das Mäuse-VGF-Polypeptid spezifisch waren, vervielfältigt.

[0259] Die Mitglieder des Wurfes der transgenen positiven F1-Mäuse werden dann verkreuzt, um homozygote F2-Mäuse zu erzeugen. Das Expressions-Niveau der VGF-mRNA in den F2-Mäusen wird wie hierin beschrieben bestimmt.

Beispiel 5: Biologische Aktivität des Mäuse-VGF-Polypeptids in F2-transgenen Mäusen

[0260] Vor der Euthanasie wurden die in Beispiel 4 erhaltenen F2-transgenen Tiere gewogen, durch Isofluran anesthäsiert und Blut durch Herzpunktur entnommen. Die Proben werden dann einer Hämatologie und einer Serum-chemischen Analyse unterzogen. Eine Radiographie wird nach der terminalen Ausblutung durchgeführt. Nach grober Sektion werden die visceralen Hauptorgane einer Gewichtsanalyse unterzogen.

[0261] Nach grober Sektion werden Gewebe (d.h. Leber, Milz, Bauchspeicheldrüse, Magen, der gesamte Gastro-Intestinal-Trakt, die Niere, die Fortpflanzungsorgane, die Haut und die Brustdrüsen, Knochen, Gehirn, Herz, Lunge, Thymus, Luftröhre, Speiseröhre, Schilddrüse, die Nebennieren, die Harnblase, die Lymphknoten und Skelett Muskeln) entfernt und in 10%-gepuffertes Zn-Formalin für die histologische Untersuchung fixiert. Nach der Fixierung wurden die Gewebe in Paraffinblöcken verarbeitet und es wurden 3 mm-Schnitte erhalten. Alle Schnitte wurden mit Hematoxylin und Exosin gefärbt und dann einer histologischen Analyse unterzogen.

[0262] Die Milz, der Lymphknoten und der Peyerscher Lymphfollikelhaufen von sowohl den transgenen als

auch den Kontrollmäusen wurden einer immunhistologischen Analyse mit B-Zell und T-Zell spezifischen Antikörpern wie folgt unterzogen. Die Formalin-fixierten Paraffineingebetteten Schnitte wurden deparaffiniert und in deionisiertem Wasser hydriert. Die Schnitte wurden mit 3% Wasserstoffperoxid gequenched, mit Protein Block (Lipshaw, Pittsburgh, PA) blockiert und in einem monoclonalen Ratten anti-Maus B220 und CD3 (Harlan, Indianapolis, IN) inkubiert. Die Antikörperbindung wird durch biotinylierte Kaninchen anti-Ratten Immunglobuline und Peroxidase konjugiertes Streptavidin (BioGenex, San Ramon, CA) mit DAB als Chromogen (BioTek, Santa Barbara, CA) nachgewiesen. Die Schnitte werden mit Hematoxylen gegengefärbt.

[0263] Nach der Nekropsy werden MLN und Schnitte der Milz und des Thymus aus transgenen Tieren und Kontrollwürfen entfernt. Einzel-Zell-Suspensionen werden durch vorsichtiges Malen der Gewebe mit dem flachen Ende einer Spritze gegen den Boden eines 100 mm-Nylon-Zellsiebs (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) zubereitet. Die Zellen werden zweimal gewaschen, gezählt und ungefähr 1×10^6 Zellen von jedem Gewebe werden dann für 10 Minuten mit 0,5 µg CD16/32(FcγIII/II) Fc-Block in einem 20 µL Volumen inkubiert. Die Proben wurden dann für 30 Minuten bei 2–8°C in einem 100 µL Volumen PBS (dem Ca^+ und Mg^+ fehlt), 0,1 % Rinderserum Albumin und 0.01 % Natriumazid mit 0,5 µg Antikörper eines FITC- oder PE-konjugierten monoklonalen Antikörpers gegen CD90.2 (Thy-1.2), CD45R (B220), CD11b(Mac-1), Gr-1, CD4 oder CD8 (PharMingen, San Diego, CA) gefärbt. Nach der Antikörperbindung wurden die Zellen gewaschen und dann durch Flußzytometrie auf einem FACScan (Becton Dickinson) analysiert.

[0264] Während die vorliegende Erfindung im Zusammenhang der bevorzugten Ausführungsformen beschrieben worden ist, ist es verstanden, daß dem Fachmann Variation und Modifikation einfallen werden. Es ist daher beabsichtigt, daß die angefügten Ansprüche alle solchen äquivalenten Variationen, die unter den Umfang der Erfindung, wie beansprucht fallen, umfassen.

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Yan, Hai

<120> VGF-Selektive Bindungsmittel und Verfahren zur Behandlung von mit VGF-in Beziehung stehenden Erkrankungen

<130> 00-423-A

<140>
<141>

<150> 60/144,743
<151> 1999-07-21

<160> 10

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1
<211> 30
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<400> 1
Ala Gln Glu Glu Ala Asp Ala Glu Glu Arg Arg Leu Gln Glu Gln Glu
1 5 10 15

Glu Leu Glu Asn Tyr Ile Glu His Val Leu Leu His Arg Pro
20 25 30

<210> 2
<211> 9
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<400> 2
Ala Gln Glu Glu Ala Asp Ala Glu Glu
1 5

<210> 3
<211> 19
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<400> 3
Leu Gln Glu Gln Glu Glu Leu Glu Asn Tyr Ile Glu His Val Leu Leu
1 5 10 15

His Arg Pro

<210> 4
<211> 25
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<400> 4

```
Leu Glu Gly Ser Phe Leu Gly Gly Ser Glu Ala Gly Glu Arg Leu Leu
  1               5                  10                  15

Gln Gln Gly Leu Ala Gln Val Glu Ala
             20                  25


<210> 5
<211> 8
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<400> 5
Ser Gln Glu Glu Ala Pro Gly His
  1               5


<210> 6
<211> 19
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<400> 6
His Phe His His Ala Leu Pro Pro Ala Arg His His Pro Asp Leu Glu
  1               5                  10                  15

Ala Gln Ala



<210> 7
<211> 60
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<400> 7
Gln Ala Glu Ala Thr Arg Gln Ala Ala Ala Gln Glu Glu Arg Leu Ala
  1               5                  10                  15

Asp Leu Ala Ser Asp Leu Leu Leu Gln Tyr Leu Leu Gln Gly Gly Ala
             20                  25                  30

Arg Gln Arg Asp Leu Gly Gly Arg Gly Leu Gln Glu Thr Gln Gln Glu
         35                  40                  45

Arg Glu Asn Glu Arg Glu Glu Glu Ala Glu Gln Glu
     50                  55                  60


<210> 8
<211> 46
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<400> 8
Gly Gly Gly Glu Asp Glu Val Gly Glu Glu Asp Glu Glu Ala Ala Glu
  1               5                  10                  15

Ala Glu Ala Glu Ala Glu Glu Ala Glu Arg Ala Arg Gln Asn Ala Leu
             20                  25                  30
```

```
Leu Phe Ala Glu Glu Glu Asp Gly Glu Ala Gly Ala Glu Asp
          35                  40                  45


<210> 9
<211> 49
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<400> 9
Asp Ala Glu Gly Thr Glu Glu Gly Gly Glu Glu Asp Asp Asp Asp Glu
  1               5                  10                  15

Glu Met Asp Pro Gln Thr Ile Asp Ser Leu Ile Glu Leu Ser Thr Lys
             20                  25                  30

Leu His Leu Pro Ala Asp Asp Val Val Ser Ile Ile Glu Glu Val Glu
          35                  40                  45

Glu



<210> 10
<211> 75
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<400> 10
Asn Ala Pro Pro Glu Pro Val Pro Pro Pro Arg Ala Ala Pro Ala Pro
  1               5                  10                  15

Thr His Val Arg Ser Pro Gln Pro Pro Pro Pro Ala Pro Ala Arg Asp
             20                  25                  30

Glu Leu Pro Asp Trp Asn Glu Val Leu Pro Pro Trp Asp Arg Glu Glu
          35                  40                  45

Asp Glu Val Phe Pro Pro Gly Pro Tyr His Pro Phe Pro Asn Tyr Ile
      50                  55                  60

Arg Pro Arg Thr Leu Gln Pro Pro Ala Ser Ser
 65                  70                  75
```

Patentansprüche

1. Monoklonaler Antikörper oder Fragment davon, der spezifisch an eine Aminosäuresequenz ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 und SEQ ID NO: 10 oder eine natürlich vorkommende Variante davon bindet.

2. Monoklonaler Antikörper oder Fragment davon, der spezifisch die in SEQ ID NO: 2 angegebene Aminosäuresequenz bindet.

3. Monoklonaler Antikörper nach Anspruch 1 oder 2, der ein humanisierter Antikörper ist.

4. Monoklonaler Antikörper nach Anspruch 1 oder 2, der ein humaner Antikörper oder Fragment davon ist.

5. Monoklonaler Antikörper nach Anspruch 1 oder 2, der ein chimärer Antikörper oder Fragment davon ist.

6. Monoklonaler Antikörper nach Anspruch 1 oder 2, der ein CDR-graft Antikörper oder Fragment davon ist.

7. Monoklonaler Antikörper nach Anspruch 1 oder 2, der ein anti-idiotypischer Antikörper oder Fragment davon ist.

8. Monoklonaler Antikörper nach Anspruch 1 oder 2, der ein variable Region-Fragment ist.

9. Variable Region-Fragment nach Anspruch 8, das ein Fab- oder ein Fab-Fragment ist.

10. Monoklonaler Antikörper oder Fragment davon, umfassend mindestens eine Komplementarität-bestimmende Region mit einer Spezifität für die Aminosäuresequenz wie angegeben in einer der SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 oder SEQ ID NO: 10.

11. Monoklonaler Antikörper nach Anspruch 1 oder 2, der an eine nachweisbare Markierung gebunden ist.

12. Verwendung eines monoklonalen Antikörpers nach Anspruch 1 oder 2 zur Herstellung eines Medikaments zur Antagonisierung von VGF-Polypeptid biologischer Aktivität.

13. Verwendung eines monoklonalen Antikörpers nach Anspruch 1 oder 2 zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung, Vorbeugung oder Linderung einer mit VGF-Polypeptid zusammenhängenden Erkrankung, Abweichung oder Zustandes.

14. Verwendung eines monoklonalen Antikörpers nach Anspruch 1 oder 2 zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung, Vorbeugung oder Linderung von Fettsucht.

15. Verwendung eines monoklonalen Antikörpers nach Anspruch 1 oder 2 zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung, Vorbeugung oder Linderung von Sterilität, Kachexie, Essstörungen, AIDS-zusammenhängendem Komplex, hypermetabolischen Zuständen, Hyperaktivität, Hypoaktivität oder Hyperinsulinproduktion.

16. Verwendung eines monoklonalen Antikörpers nach Anspruch 1 oder 2 zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung, Vorbeugung oder Linderung von Bulimie oder Anorexia Nervosa.

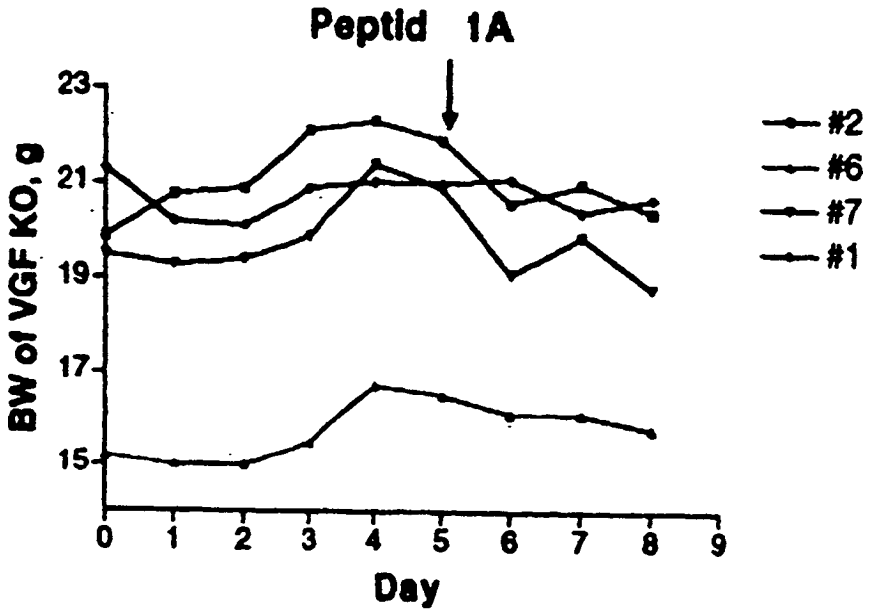
17. Monoklonaler Antikörper, hergestellt durch Immunisieren eines Tieres mit einem Polypeptid umfassend die Aminosäuresequenz wie angegeben in einer der SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 oder SEQ ID NO: 10.

18. Hybridom, das einen Antikörper nach Anspruch 1 oder 2 herstellt.

Es folgen 3 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

Figur 1



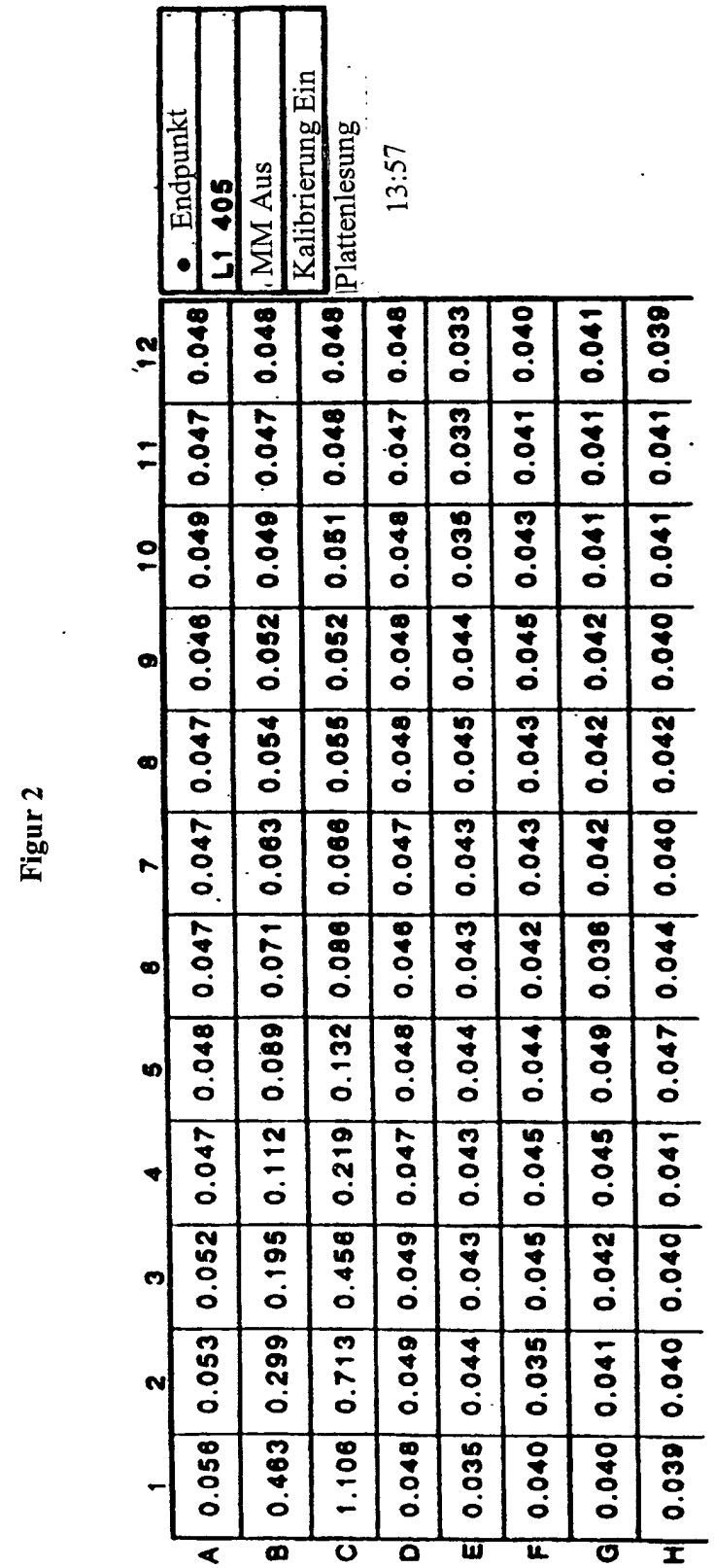
↓ Entzug des Peptids

Peptid 1A – AQEEADAEE – COOH

Dosierung: 4 mg/Tag

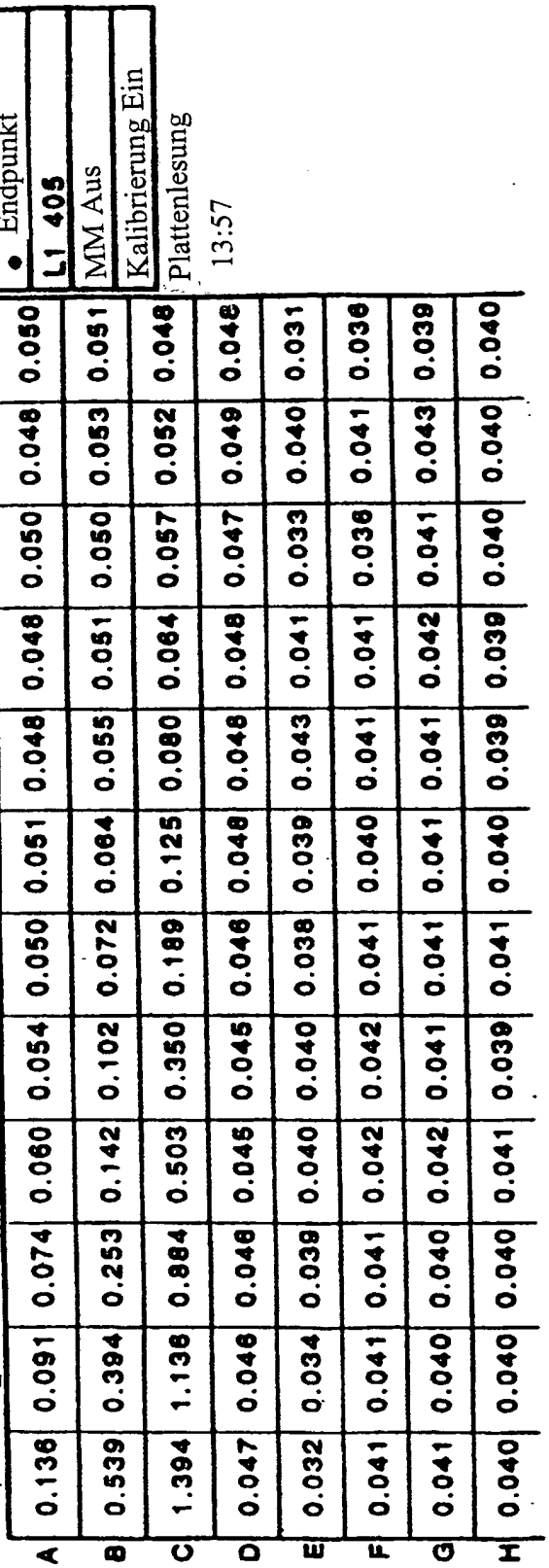
Peptidkonzentration: 16%

Figur 2



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.058	0.053	0.052	0.047	0.048	0.047	0.047	0.047	0.046	0.049	0.047	0.048
B	0.463	0.299	0.195	0.112	0.089	0.071	0.063	0.054	0.052	0.049	0.047	0.048
C	1.106	0.713	0.458	0.219	0.132	0.086	0.066	0.055	0.052	0.051	0.048	0.048
D	0.048	0.049	0.049	0.047	0.048	0.046	0.047	0.048	0.048	0.048	0.047	0.048
E	0.035	0.044	0.043	0.043	0.044	0.043	0.043	0.045	0.044	0.036	0.033	0.033
F	0.040	0.035	0.045	0.045	0.044	0.042	0.043	0.043	0.045	0.043	0.041	0.040
G	0.040	0.041	0.042	0.045	0.049	0.038	0.042	0.042	0.042	0.041	0.041	0.041
H	0.039	0.040	0.040	0.041	0.047	0.044	0.040	0.042	0.040	0.041	0.041	0.039

Figur 3



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.136	0.091	0.074	0.060	0.054	0.050	0.051	0.048	0.048	0.050	0.048	0.050
B	0.539	0.394	0.253	0.142	0.102	0.072	0.064	0.055	0.051	0.050	0.053	0.051
C	1.394	1.138	0.884	0.503	0.350	0.189	0.125	0.080	0.064	0.057	0.052	0.048
D	0.047	0.046	0.046	0.045	0.045	0.046	0.048	0.048	0.048	0.047	0.049	0.046
E	0.032	0.034	0.039	0.040	0.040	0.038	0.039	0.043	0.041	0.033	0.040	0.031
F	0.041	0.041	0.041	0.042	0.042	0.041	0.040	0.041	0.041	0.038	0.041	0.036
G	0.041	0.040	0.040	0.042	0.041	0.041	0.041	0.041	0.042	0.041	0.043	0.039
H	0.040	0.040	0.040	0.041	0.039	0.041	0.040	0.039	0.039	0.040	0.040	0.040