



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 695 34 044 T2 2005.12.29**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 799 311 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **695 34 044.1**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US95/06260**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **95 923 661.3**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 96/006169**

(86) PCT-Anmeldetag: **06.06.1995**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **29.02.1996**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **08.10.1997**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **02.03.2005**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **29.12.2005**

(51) Int Cl.7: **C12N 15/19**

**C12N 15/63, C12N 5/10, C12N 1/15,
C12N 1/21, C07K 14/52, A61K 38/19,
A61K 35/00, G01N 33/50**

(30) Unionspriorität:
294251 23.08.1994 US

(73) Patentinhaber:
Human Genome Sciences, Inc., Rockville, Md., US

(74) Vertreter:
Vossius & Partner, 81675 München

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

(72) Erfinder:
**LI, Haodong, Gaithersburg, US; ADAMS, Mark D.,
North Potomac, US**

(54) Bezeichnung: **MENSCHLICHES BETA-9 CHEMOKIN**

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

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

Beschreibung

[0001] Diese Erfindung betrifft neu identifizierte Polynucleotide, Polypeptide, die von solchen Polynucleotiden codiert werden, den Gebrauch solcher Polynucleotide und Polypeptide wie auch die Herstellung solcher Polynucleotide und Polypeptide. Die Polypeptide der vorliegenden Erfindung sind insbesondere menschliche Beta-9 Chemokine, manchmal im Folgenden als „Ck β -9“ bezeichnet. Die Erfindung betrifft außerdem die Hemmung der Aktivität solcher Polypeptide.

[0002] Chemokine, die auch als interkrine Cytokine bezeichnet werden, sind eine Unterfamilie der strukturell und funktionell verwandten Cytokine. Diese Moleküle haben eine Größe von 8–10 kD. Im Allgemeinen weisen Chemokine eine Homologie von 20% bis 75% auf der Aminosäureebene auf, und werden durch vier konservative Cysteinreste charakterisiert, die zwei Disulfidbrücken bilden. Basierend auf der Einteilung der ersten beiden Cysteinreste werden Chemokine in zwei Unterfamilien, alpha und beta, unterteilt. In der alpha-Unterfamilie sind die ersten beiden Cysteine durch eine Aminosäure getrennt und werden deshalb als „C-X-C“-Unterfamilie bezeichnet. In der beta-Unterfamilie liegen die zwei Cysteine in benachbarter Position und werden deshalb als „C-C“-Unterfamilie bezeichnet. Bisher wurden mindestens acht verschiedene Mitglieder dieser Familie in Menschen identifiziert.

[0003] Die interkrinen Cytokine weisen eine breite Vielfalt an Funktionen auf. Ein Hauptmerkmal ist ihre Fähigkeit, chemotaktische Migration von verschiedenen Zelltypen auszulösen, einschließlich der Monocyten, der neutrophilen Granulocyten, der T-Lymphocyten, der Basophilen und der Fibroblasten. Viele Chemokine haben eine entzündungsfördernde Aktivität und sind an zahlreichen Schritten während einer Entzündungsreaktion beteiligt. Diese Aktivitäten beinhalten die Stimulierung der Histamin-Freisetzung, die Freisetzung lysosomaler Enzyme und Leukotriene, das Ansteigen der Adhärenz von Ziel-Immunzellen an Endothelzellen, die erhöhte Bindung von Komplementproteinen, die induzierte Expression von Granulocyten-Adhäsions-Molekülen und Komplement-Rezeptoren und den plötzlichen starken O₂-Verbrauch ("respiratory burst"). Zusätzlich zu ihrer Beteiligung bei Entzündungen wurde gezeigt, dass bestimmte Chemokine andere Aktivitäten aufweisen. Das Macrophagen-Entzündungsprotein 1 (MIP-1), zum Beispiel, ist in der Lage, die Proliferation von hämatopoetischen Stammzellen zu unterdrücken, der Plättchen-Faktor-4 (PF-4) ist ein starker Hemmstoff des Wachstums von Endothelzellen, Interleukin-3 (IL-3) fördert die Proliferation von Keratinocyten, und GRO ist ein autokriner Wachstumsfaktor für Melanomzellen.

[0004] Angesichts der verschiedenen biologischen Aktivitäten, ist es nicht überraschend, dass Chemokine in eine Vielzahl von physiologischen und Krankheitszuständen verwickelt sind, einschließlich dem Lymphocytenverkehr, der Wundheilung, der hämatopoetischen Regulation und von immunologischen Störungen wie Allergien, Asthma und Arthritis.

[0005] Die Mitglieder des „C-C“-Zweiges üben ihre Effekte auf die folgenden Zellen aus: Eosinophile, die Parasiten zerstören, um parasitische Infektionen abzuschwächen, und die chronische Entzündungen der Atemwege des Atmungssystems auslösen; Macrophagen, die die Tumorbildung in Vertebraten unterdrücken, und Basophile, die Histamine freisetzen, die eine Rolle bei allergischen Entzündungen spielen. Dennoch üben die Mitglieder eines Zweiges Effekte auf Zellen aus, die normalerweise auf den anderen Zweig der Chemokine reagieren, so dass den Mitgliedern der Zweige deshalb keine genaue Rolle zugewiesen werden kann.

[0006] Während die Mitglieder des C-C-Zweiges überwiegend auf einkernige Zellen und die Mitglieder des C-X-C-Zweiges überwiegend auf neutrophile Granulocyten wirken, kann einem Chemokin eine gesonderte chemoattraktive Eigenschaft basierend auf diesem Leitfaden nicht zugeordnet werden. Einige Chemokine der einen Familie zeigen die Eigenschaften der anderen.

[0007] Das Polypeptid der vorliegenden Erfindung wurde aufgrund der Homologie in der Aminosäuresequenz mutmaßlich als Ck β -9 identifiziert.

[0008] In Übereinstimmung mit einem Aspekt der vorliegenden Erfindung werden sowohl neue Polypeptide als auch biologisch aktive und diagnostisch oder therapeutisch nützliche Fragmente, die C-C-Chemokin-Aktivität haben, bereitgestellt. Das Polypeptid der vorliegenden Erfindung ist menschlicher Herkunft.

[0009] In Übereinstimmung mit einem anderen Aspekt der vorliegenden Erfindung werden isolierte Nucleinsäuremoleküle, die das Polypeptid der vorliegenden Erfindung codieren, bereitgestellt, einschließlich mRNAs, DNAs, cDNAs, genomischer DNAs wie auch biologisch aktive und diagnostisch oder therapeutisch nützliche Fragmente davon.

[0010] In Übereinstimmung mit noch einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung wird ein Verfahren zur Herstellung solcher Polypeptide mittels rekombinanter Techniken bereitgestellt, umfassend die Züchtung von rekombinanten prokaryontischen und/oder eukaryontischen Wirtszellen, die eine Nucleinsäuresequenz beinhalten, die ein Polypeptid der vorliegenden Erfindung codiert, unter Bedingungen, die die Expression des Proteins fördern, und die nachfolgende Gewinnung des Proteins.

[0011] In Übereinstimmung mit noch einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung wird ein Verfahren zum Gebrauch solcher Polypeptide oder Nucleinsäuren, die diese Polypeptide codieren, für therapeutische Zwecke bereitgestellt, wie zum Beispiel, um feste Tumore, chronische Infektionen, Autoimmunkrankheiten, Psoriasis, Asthma, und Allergien zu behandeln, die Blutbildung zu regulieren und die Wundheilung zu fördern.

[0012] In Übereinstimmung mit noch einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung werden Antikörper gegen solche Polypeptide bereitgestellt.

[0013] In Übereinstimmung mit noch einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung werden Antagonisten zu solchen Polypeptiden bereitgestellt, die benutzt werden können, um die Aktivität solcher Polypeptide, zum Beispiel bei der Behandlung von Autoimmunkrankheiten, chronisch entzündlichen Krankheiten, Histamin vermittelten allergischen Reaktionen, Asthma, Arthritis, dem Prostaglandinunabhängigen Fieber, Knochenmarksdefekten, Silikose, Sarkoidose, dem hypereosinophilen Syndrom und der Lungenentzündung, zu hemmen.

[0014] In Übereinstimmung mit noch einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung werden auch Nucleinsäuresonden, die Nucleinsäuremoleküle mit einer ausreichenden Länge beinhalten, um spezifisch mit einer Nucleinsäuresequenz der vorliegenden Erfindung zu hybridisieren, bereitgestellt.

[0015] In Übereinstimmung mit noch einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung werden diagnostische Tests bereitgestellt, um Krankheiten nachzuweisen, die mit der Expression von Polypeptiden und Mutationen in den Nucleinsäuresequenzen, die solche Polypeptide codieren, in Zusammenhang stehen.

[0016] In Übereinstimmung mit noch einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung wird ein Verfahren bereitgestellt, um solche Polypeptide oder Polynucleotide, die diese Polypeptide codieren, für in-vitro Zwecke zu benutzen, die die wissenschaftliche Forschung, die Synthese von DNA und die Herstellung von DNA-Vektoren betreffen.

[0017] Diese und andere Aspekte der vorliegenden Erfindung sollten den Fachleuten aus den hier dargebotenen Lehren bekannt sein.

[0018] Die folgenden Abbildungen erklären die Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung und beabsichtigen nicht, den Umfang der Erfindung, wie er in den Ansprüchen umfasst ist, zu begrenzen.

[0019] [Fig. 1](#) zeigt die cDNA-Sequenz und die entsprechende abgeleitete Aminosäuresequenz von Ck β -9. Die 23 Aminosäuren am Anfang bilden die Leitsequenz, so dass das mutmaßliche reife Polypeptid 111 Aminosäuren beinhaltet. Es wird die Standard-Ein-Buchstaben-Abkürzung für Aminosäuren benutzt.

[0020] [Fig. 2](#) zeigt die Aminosäure-Sequenz-Homologie zwischen Ck β -9 und dem reifen Peptid des Eotaxins (unten).

[0021] In Übereinstimmung mit einem Aspekt der vorliegenden Erfindung werden isolierte Nucleinsäuren (Polynucleotide) bereitgestellt, die die reifen Polypeptide, die die abgeleiteten Aminosäure-Sequenzen von [Fig. 1](#) (SEQ ID Nr. 2) aufweisen, oder das reife Polypeptid codieren, das von den cDNA-Clonen, die als ATCC-Hinterlegung Nr. 75803 am 7. Juni, 1994 hinterlegt wurden, codiert wird.

[0022] Das Polynucleotid, das Ck β -9 codiert, wurde in einer cDNA-Genbank entdeckt, die aus einem menschlichen Lymphknoten der Brust abgeleitet wurde. Ck β -9 ist strukturell mit der Chemokin-Familie verwandt. Es besitzt einen offenen Leserahmen, der ein Protein mit 134 Aminosäureresten codiert, von denen ungefähr die ersten 23 Aminosäurereste die mutmaßliche Leadersequenz sind, so dass das reife Protein 111 Aminosäuren umfasst. Das Protein zeigt den höchsten Grad der Homologie zu Eotaxin mit 32% Identität und 69% Ähnlichkeit über eine Ausdehnung von 75 Aminosäureresten. Es ist auch wichtig, dass die vier räumlich konservativen Cysteine-Reste der Chemokine in den Polypeptiden der vorliegenden Erfindung gefunden werden.

[0023] Die Polynucleotide der vorliegenden Erfindung können in Form von RNA oder in Form von DNA, wobei

DNA cDNA, genomische DNA und synthetische DNA beinhaltet, vorkommen. Die DNA kann als Doppelstrang oder als Einzelstrang vorliegen, und wenn sie als Einzelstrang vorliegt, kann es sich um den Codierungsstrang oder den Nicht-Codierungsstrang (Antisense) handeln. Die Codierungs-Sequenz, die das reife Polypeptid codiert, kann mit der Codierungs-Sequenz, die in [Fig. 1](#) (SEQ ID Nr. 1) gezeigt wird, oder mit der der hinterlegten Clone identisch sein, oder es kann sich um eine unterschiedliche Codierungs-Sequenz handeln, die als ein Ergebnis der Redundanz oder der Degeneration des genetischen Codes das gleiche reife Polypeptid wie die DNA in [Fig. 1](#) (SEQ ID Nr. 1) oder die hinterlegte cDNA codiert.

[0024] Es werden die Polynucleotide, die die reifen Polypeptide der [Fig. 1](#) (SEQ ID Nr. 2) oder die reifen Polypeptide codieren, die von der hinterlegten cDNA codiert werden, eingeschlossen: nur die Codierungs-Sequenz für das reife Polypeptid; die Codierungs-Sequenz für das reife Polypeptid und weitere Codierungs-Sequenzen, wie die Leader- oder die sekretorische Sequenz oder eine Proprotein-Sequenz; die Codierungs-Sequenz für das reife Polypeptid (und wahlweise eine weitere Codierungs-Sequenz) und eine Nicht-Codierungs-Sequenz wie Introns oder eine Nicht-Codierungs-Sequenz 5' und/oder 3' der Codierungs-Sequenz der reifen Polypeptide.

[0025] So umfasst der Ausdruck „Polynucleotide codierend ein Polypeptid“ ein Polynucleotid, das nur die Codierungs-Sequenz des Polypeptides beinhaltet, wie auch ein Polynucleotid, das eine weitere Codierungs- und/oder eine Nicht-Codierungs-Sequenz einschließt.

[0026] Die vorliegende Erfindung betrifft weiterhin Varianten der vorstehend beschriebenen Polynucleotide, die Fragmente der Polypeptide, die die hergeleitete Aminosäuresequenz der [Fig. 1](#) (SEQ ID Nr. 2) besitzen, oder des Polypeptids codieren, das von der cDNA der hinterlegten Clone codiert wird. Die Variante der Polynucleotide kann eine natürlich auftretende Allel-Variante der Polynucleotide oder eine nicht-natürlich auftretende Variante der Polynucleotide sein.

[0027] Deshalb umfasst die vorliegende Erfindung Polynucleotide, die die gleichen, reifen Polypeptide, wie sie in [Fig. 1](#) (SEQ ID Nr. 2) dargestellt sind, oder die gleichen reifen Polypeptide codieren, die von der cDNA der hinterlegten Clone codiert werden, wie auch Varianten solcher Polynucleotide, wobei die Varianten Fragmente der Polypeptide der [Fig. 1](#) (SEQ ID Nr. 2) oder der Polypeptide codieren, die von der cDNA der hinterlegten Clone codiert werden. Solche Nucleotid-Varianten beinhalten Deletions-, Substitutions-, Additions- oder Insertions-Varianten. Wie vorstehend angezeigt, können die Polynucleotide eine Codierungs-Sequenz besitzen, die eine natürlich auftretende Allelvariante der Codierungs-Sequenz, wie sie [Fig. 1](#) (SEQ ID Nr. 2) gezeigt wird, oder der Codierungs-Sequenz der hinterlegten Clone ist. Wie in dem Fachgebiet bekannt ist, ist eine allelische Variante eine wechselnde Form einer Polynucleotid-Sequenz, die eine Substitution, Deletion oder Addition von einem oder mehreren Nucleotiden aufweisen kann, die die Funktion des codierten Polypeptides nicht wesentlich ändern.

[0028] Die vorliegende Erfindung umfasst auch Polynucleotide, deren Codierungs-Sequenz der reifen Polypeptide im gleichen Leserahmen mit einer Polynucleotid-Sequenz verknüpft sein kann, die bei der Expression und Sekretion von Polypeptiden aus einer Wirtszelle hilft zum Beispiel eine Leadersequenz, die als eine sekretorische Sequenz der Kontrolle des Transportes von Polypeptiden aus der Zelle dient. Das Polypeptid, das eine Leadersequenz hat, ist ein Präprotein und die Leadersequenz kann von der Wirtszelle abgespalten werden, um die reife Form des Polypeptids zu bilden. Die Polynucleotide können auch ein Proprotein, das aus dem reifen Protein plus zusätzlichen 5'-Aminosäureresten besteht, codieren. Ein reifes Protein, das eine Prosequenz hat, ist ein Proprotein und ist eine inaktive Form des Proteins. Sobald die Prosequenz abgespalten wird, bleibt ein aktives, reifes Protein übrig.

[0029] Deshalb können zum Beispiel die Polynucleotide der vorliegenden Erfindung das reife Protein oder ein Protein, das eine Prosequenz hat, oder ein Protein, das beides, eine Prosequenz und eine Präsequenz (Leadersequenz) hat, codieren.

[0030] Die Polynucleotide der vorliegenden Erfindung können die Codierungs-Sequenz auch im Rahmen mit einer Markersequenz verknüpft haben, was die Reinigung der Polypeptide der vorliegenden Erfindung ermöglicht. Die Marker-Sequenz kann im Fall eines bakteriellen Wirtes ein Hexa-Histidin-Anhang sein, der durch einen pQE-9-Vektor bereitgestellt wird, um für die Reinigung der reifen Polypeptide, die mit dem Marker verbunden sind, zu sorgen, oder die Marker-Sequenz kann ein Hämagglutinin (HA)-Anhang sein, wenn ein Säuger-Wirt, z.B. COS-7-Zellen, benutzt wird. Der HA-Anhang stimmt mit einem Epitop, das aus dem Influenza-Hämagglutinin-Protein stammt, überein (Wilson, I., et al., Cell, 37: 767 (1984)).

[0031] Der Begriff „Gen“ meint das Segment der DNA, das an der Herstellung einer Polypeptidkette beteiligt ist; er umfasst Regionen, die der Codierungs-Region (Leader- und Trailer-) vorangehen und folgen, wie auch intervenierende Sequenzen (Introns) zwischen einzelnen codierenden Segmenten (Exons).

[0032] Die Fragmente mit der ganzen Länge des Gens der vorliegenden Erfindung können als eine Hybridisierungssonde für eine cDNA-Genbank benutzt werden, um eine cDNA mit vollständiger Länge zu isolieren und um anderen cDNAs, die eine hohe Ähnlichkeit in der Sequenz zu dem Gen oder eine ähnliche biologische Aktivität haben, zu isolieren. Sonden dieses Typs haben vorzugsweise wenigstens 30 Basen und können, zum Beispiel, 50 oder mehr Basen enthalten. Die Sonde kann auch benutzt werden, um einen cDNA-Clon zu identifizieren, der mit einem Transkript der ganzen Länge und einem genomischen Clon oder Clonen übereinstimmt, die das vollständige Gen, einschließlich der regulatorischen und Promotorregionen, Exons und Introns beinhalten. Ein Beispiel einer Durchsuchung umfasst die Isolation der Codierungs-Region des Gens, indem eine bekannte DNA-Sequenz benutzt wird, um eine Oligonucleotidsonde zu synthetisieren. Markierte Oligonucleotide, die eine übereinstimmende Sequenz zu der des Gens der vorliegenden Erfindung haben, werden benutzt, um eine menschliche cDNA-, genomische DNA- oder mRNA-Genbank zu durchmustern, um zu bestimmen, mit welchen Mitgliedern der Genbank die Sonde hybridisiert.

[0033] Die vorliegende Erfindung betrifft weiterhin Polynucleotide, die mit den vorstehend beschriebenen Sequenzen hybridisieren, wenn wenigstens 90% und stärker bevorzugt wenigstens 95% Identität zwischen den Sequenzen bestehen. Die vorliegende Erfindung betrifft besonders Polynucleotide, die unter stringenten Bedingungen mit den vorstehend beschriebenen Polynucleotiden hybridisieren. Wie bisher benutzt, bedeutet der Ausdruck „stringente Bedingungen“, dass die Hybridisierung nur stattfindet, wenn wenigstens 95% und vorzugsweise wenigstens 97% Identität zwischen den Sequenzen bestehen. Die Polynucleotide, die mit den vorstehend beschriebenen Polynucleotiden in einer bevorzugten Ausführungsform hybridisieren, codieren Polypeptide, die im Wesentlichen die gleiche biologische Funktion oder Aktivität wie das reife Polypeptid beinhalten, das von den cDNAs der [Fig. 1](#) (SEQ ID Nr. 1) oder der (den) hinterlegten cDNA(s) codiert wird.

[0034] Alternativ dazu kann das Polynucleotid wenigstens 20 Basen haben, vorzugsweise 30 Basen und stärker bevorzugt wenigstens 50 Basen, die mit einem Polynucleotid der vorliegenden Erfindung hybridisieren, und es weist eine Identität dazu auf, wie vorstehend beschrieben wurde, und behält die Aktivität bei oder auch nicht. Solche Polynucleotide können zum Beispiel als Sonden für das Polynucleotid der SEQ ID Nr. 1 eingesetzt werden, zum Beispiel zur Gewinnung des Polynucleotides, oder als diagnostische Sonde oder als PCR-Primer.

[0035] So betrifft die vorliegende Erfindung Polynucleotide, die wenigstens 90% und stärker bevorzugt wenigstens 95% Identität mit einem Polynucleotid aufweisen, das das Polypeptid der SEQ ID Nr. 2 codiert, wie auch Fragmente, wobei die Fragmente wenigstens 30 Basen und vorzugsweise wenigstens 50 Basen besitzen, und Polypeptide, die von solchen Polynucleotiden codiert werden.

[0036] Die nachstehend bezeichnete(n) Hinterlegung(en) wird unter den Bedingungen des Budapestervertrages über die Internationale Anerkennung der Hinterlegung von Mikroorganismen zum Zweck von Patentverfahren erhalten. Diese Hinterlegungen werden lediglich als Annehmlichkeit für Fachleute bereitgestellt und sind kein Zugeständnis, dass eine Hinterlegung unter 35 U.S.C. §112 erforderlich ist. Die Sequenz der Polynucleotide, die in den hinterlegten Materialien enthalten sind, wie auch die Aminosäuresequenz der Polypeptide, die davon codiert wird, sind im Falle eines jeden Konfliktes mit einer Beschreibung der Sequenzen hierin maßgeblich. Eine Lizenz kann erforderlich sein, um die hinterlegten Materialien herzustellen, zu benutzen oder zu verkaufen und es wird hiermit keine solche Lizenz gewährt.

[0037] Die vorliegende Erfindung betrifft weiterhin Chemokin-Polypeptide, die die hergeleitete Aminosäuresequenz der [Fig. 1](#) (SEQ ID Nr. 2) haben oder die die Aminosäuresequenz besitzen, die von der hinterlegten cDNA codiert wird, wie auch Fragmente, Analoge und Derivate dieser Polypeptide.

[0038] Die Begriffe „Fragmente“, „Derivate“, und „Analoge“ bedeuten, wenn sie sich auf die Polypeptide der [Fig. 1](#) (SEQ ID Nr. 2) beziehen oder von der hinterlegten cDNA codiert werden, Polypeptide, die die gleiche wesentliche biologische Funktion oder Aktivität wie solche Polypeptide bewahren. Deshalb beinhaltet ein Analog ein Proprotein, das durch Abspaltung des Proproteinanteils aktiviert werden kann, um ein aktives reifes Polypeptid zu erhalten.

[0039] Die Chemokin-Polypeptide der vorliegenden Erfindung können rekombinante Polypeptide, natürliche Polypeptide oder synthetische Polypeptide, vorzugsweise aber rekombinante Polypeptide sein.

[0040] Das Fragment, das Derivat oder das Analog der Polypeptide der [Fig. 1](#) (SEQ ID Nr. 2) oder das, das von der hinterlegten cDNA codiert wird, kann (i) eines sein, in dem ein oder mehrere Aminosäurereste mit einem konservativen oder nicht-konservativen Aminosäurerest (vorzugsweise einem konservativen Aminosäurerest) substituiert sind und ein solcher substituiertes Aminosäurerest kann oder kann nicht vom genetischen Code codiert werden, oder (ii) eines sein, in dem ein oder mehrere Aminosäurereste eine Substituentengruppe beinhalten, oder (iii) eines sein, in dem das reife Polypeptid mit einer anderen Verbindung verknüpft ist, wie einer Verbindung, die die Halbwertszeit des Polypeptides erhöht (zum Beispiel Polyethylenglykol), oder (iv) eines sein, in dem die zusätzlichen Aminosäuren mit einem reifen Polypeptid verbunden sind, wie einer Leader- oder sekretorischen Sequenz oder einer Sequenz, die zur Reinigung des reifen Polypeptides oder der Proproteinsequenz gebraucht wird. Solche Fragmente, Derivate und Analoge werden als im Kenntnisstand der Fachleute aufgrund der hier beschriebenen Lehren eingeschlossen betrachtet.

[0041] Die Polypeptide und Polynucleotide der vorliegenden Erfindung werden vorzugsweise in einer isolierten Form bereitgestellt und sind vorzugsweise bis zur Homogenität gereinigt.

[0042] Der Begriff „isoliert“ bedeutet, dass das Material aus seiner ursprünglichen Umgebung entfernt wird (zum Beispiel die natürliche Umgebung, wenn es natürlich vorkommt). Ein natürlich vorkommendes Polynucleotid oder Polypeptid, das in einem lebenden Tier vorkommt, ist zum Beispiel nicht isoliert, aber das gleiche Polynucleotid oder Polypeptid, das von einigen oder allen coexistierenden Substanzen im natürlichen System abgetrennt ist, ist isoliert. Solche Polynucleotide können Teil eines Vektors sein und/oder solche Polynucleotide oder Polypeptide können Teil einer Zusammensetzung sein und dennoch isoliert sein, weil ein solcher Vektor oder eine solche Zusammensetzung kein Teil seiner natürlichen Umwelt ist.

[0043] Die Polypeptide der vorliegenden Erfindung beinhalten das Polypeptid mit der SEQ ID Nr. 2 (im Besonderen das reife Polypeptid) wie auch Polypeptide; die wenigstens 70% Ähnlichkeit (vorzugsweise wenigstens 70% Identität) mit dem Polypeptid der SEQ ID Nr. 2 haben und stärker bevorzugt wenigstens 90% Ähnlichkeit (stärker bevorzugt wenigstens 90% Identität) mit dem Polypeptid mit der SEQ ID Nr. 2 haben und noch stärker bevorzugt wenigstens 95% Ähnlichkeit (noch stärker bevorzugt wenigstens 95% Identität) mit dem Polypeptid der SEQ ID Nr. 2 haben, und auch Teile solcher Polypeptide mit einem solchen Anteil der Polypeptide, der im Allgemeinen wenigstens 30 Aminosäuren und stärker bevorzugt wenigstens 50 Aminosäuren beinhaltet.

[0044] Wie im Fachgebiet bekannt ist, wird die „Ähnlichkeit“ zwischen zwei Polypeptiden bestimmt, indem man die Aminosäuresequenz und die konservativen Aminosäuresubstituenten eines Polypeptides mit der Sequenz eines zweiten Polypeptides vergleicht.

[0045] Fragmente oder Teile der Polypeptide der vorliegenden Erfindung können zur Herstellung von entsprechenden Polypeptiden von vollständiger Länge mit Hilfe der Peptidsynthese verwendet werden; dazu können die Fragmente als Zwischenglieder zur Produktion von Polypeptiden von vollständiger Länge gebraucht werden. Fragmente oder Teile der Polynucleotide der vorliegenden Erfindung können benutzt werden, um die Polynucleotide von vollständiger Länge der vorliegenden Erfindung herzustellen.

[0046] Die vorliegende Erfindung betrifft auch Vektoren, die die Polynucleotide der vorliegenden Erfindung beinhalten, sowie Wirtszellen, die gentechnisch mit Vektoren der Erfindung verändert wurden, und die Produktion von Polypeptiden der Erfindung mit rekombinanten Techniken.

[0047] Wirtszellen sind gentechnisch mit den Vektoren dieser Erfindung verändert (transduziert oder transformiert oder transfiziert), die zum Beispiel ein Clonierungsvektor oder ein Expressionsvektor sein können. Der Vektor kann zum Beispiel in Form eines Plasmides, eines viralen Teilchens, eines Phagen etc. vorliegen. Die gentechnisch veränderte Wirtszelle kann in konventionellen Nährmedien kultiviert werden, die in geeignetem Maß für die Aktivierung von Promotoren, der Selektion von Transformanten oder der Amplifizierung der Ck β -9Gene verändert wurden. Die Kulturbedingungen wie Temperatur, pH-Wert und andere sind solche, die schon vorher bei den Wirtszellen, die für die Expression selektiert wurden, benutzt wurden und werden dem normalen Fachmann offensichtlich sein.

[0048] Die Polynucleotide der vorliegenden Erfindung können zur Produktion von Polypeptiden mit rekombinanten Techniken eingesetzt werden. Deshalb können die Polynucleotide zum Beispiel in einer Vielfalt von Expressions-Vektoren zur Expression eines Polypeptides eingesetzt werden. Solche Vektoren beinhalten chromosomale, nicht-chromosomale und synthetische DNA-Sequenzen, zum Beispiel Derivate von SV40, bakterielle Plasmide, Phagen-DNA, Baculovirus, Hefepiasmide, Vektoren, die aus Kombinationen von Plasmiden und

Phagen-DNA stammen, virale DNA wie Vaccinia, Adenovirus, Geflügelpockenvirus und Pseudorabies. Jedoch kann auch irgendein anderer Vektor benutzt werden, so lange er im Wirt replizierbar und lebensfähig ist.

[0049] Die geeignete DNA-Sequenz kann in den Vektor mit einer Vielzahl an Methoden inseriert werden. Im Allgemeinen wird die DNA-Sequenz in eine geeignete Restriktionsendonuclease-Stelle(n) mit Verfahren, die im Fachgebiet bekannt sind, inseriert. Solche und andere Verfahren werden als im Kenntnisstand von Fachleuten eingeschlossen betrachtet.

[0050] Die DNA-Sequenz im Expressions-Vektor ist funktionell mit (einer) geeigneten Expressions-Kontroll-Sequenz(en) (Promotor) verbunden, um die mRNA-Synthese zu lenken. Als bezeichnende Beispiele für solche Promotoren werden hier genannt: LTR oder SV40-Promotor, E. coli-lac oder -trp, der Phage lambda P_L-Promotor und andere Promotoren, die dafür bekannt sind, die Expression von Genen in prokaryontischen oder eukaryontischen Zellen oder deren Viren zu kontrollieren. Der Expressions-Vektor beinhaltet auch eine Ribosomen-Bindungsstelle für den Translations-Beginn und einen Transkriptions-Terminator. Der Vektor kann auch geeignete Sequenzen zur Steigerung der Expression beinhalten.

[0051] Weiterhin beinhalten die Expressionsvektoren vorzugsweise ein oder mehrere selektierbare Marker-gene, um ein phänotypisches Merkmal für die Selektion der transformierten Wirtszellen bereitzustellen, wie die Dihydrofolat-Reduktase oder die Neomycin-Resistenz für eukaryontische Zellkulturen oder die Tetracyclin- oder die Ampicillin-Resistenz in E. coli.

[0052] Der Vektor, der eine geeignete DNA-Sequenz, wie vorstehend beschrieben, wie auch einen geeigneten Promotor oder eine geeignete Kontrollsequenz enthält, kann dazu eingesetzt werden, einen geeigneten Wirt zu transformieren, damit der Wirt das Protein exprimieren kann.

[0053] Als bezeichnende Beispiele für geeignete Wirte werden genannt: Bakterienzellen wie E. coli, Streptomyces, Salmonella typhimurium, Pilz-Zellen wie Hefe, Insektenzellen wie Drosophila S2 und Spodoptera Sf9, Tier-Zellen wie CHO, COS oder Bowes-Melanom; Adenoviren; Pflanzenzellen etc. Die Selektion eines geeigneten Wirtes wird als im Kenntnisstand von Fachleuten aufgrund der Lehren hierin eingeschlossen betrachtet.

[0054] Die vorliegende Erfindung beinhaltet im Besonderen auch recombinante Konstrukte, die eine oder mehrere der vorstehend ausführlich beschriebenen Sequenzen enthalten. Die Konstrukte umfassen einen Vektor wie ein Plasmid oder einen viralen Vektor, in den eine Sequenz der Erfindung in Vorwärts- oder rückwärtiger Orientierung inseriert wurde. In einem bevorzugten Aspekt dieser Ausführung umfasst das Konstrukt weiterhin regulatorische Sequenzen wie zum Beispiel einen Promotor, der funktionell mit der Sequenz verbunden ist. Große Zahlen geeigneter Vektoren sind dem Fachmann bekannt und käuflich zu erwerben. Die folgenden Vektoren werden als Beispiele bereitgestellt: Bakterien: pQE70, pQE60, pQE-9 (Quiagen), pBS, pD10, Phagescript, psiX174, pBluescript SK, pBSKS, pNH8A, pNH16a, pNH18A, pNH46A (Stratagene), ptrc99a, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5 (Pharmacia). Eukaryonten: pWLNEO, pSV2CAT, pOG-44, pXT1, pSG (Stratagene), pSVK3, pBPV, pMSG, pSVL (Pharmacia). Jedoch kann jedes andere Plasmid oder jeder andere Vektor benutzt werden, solange er replizierbar und lebensfähig im Wirt ist.

[0055] Promotor-Regionen können aus jedem gewünschten Gen mit CAT(Chloramphenicol Transferase)-Vektoren oder anderen Vektoren mit selektierbaren Markern selektiert werden. Zwei geeignete Vektoren sind pKK232-8 und pCM7. Speziell benannte bakterielle Promotoren beinhalten lacI, lacZ, T3, T7, gpt, lambda P_R, P_L und trp. Eukaryontische Promotoren beinhalten den sehr frühen CMV-Promotor, HSV-Thymidinkinase-Promotor, frühen und späten SV40-Promotor, LTRs aus Retroviren und Maus-Metallothionein-I-Promotor. Die Selektion des geeigneten Vektors und Promotors ist im Kenntnisstand des Fachmanns.

[0056] In einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung Wirtszellen, die die vorstehend beschriebenen Konstrukte enthalten. Die Wirtszellen können eine höhere eukaryontische Zelle wie eine Säugerzelle sein oder eine niedrigere eukaryontische Zelle wie eine Hefezelle oder die Wirtszelle kann eine prokaryontische Zelle wie eine Bakterienzelle sein. Die Einführung des Konstruktes in die Wirtszelle kann durch eine Calciumphosphat-Transfektion, eine DEAE-Dextran vermittelte Transfektion oder Elektroporation ausgeführt werden (Davis, L., Dibner, M., Battey, I., Basic Methods in Molecular Biology, (1986)).

[0057] Die Konstrukte in den Wirtszellen können in der üblichen Weise benutzt werden, um das Genprodukt, das von der rekombinanten Sequenz codiert wird, herzustellen. Alternativ dazu können die Polypeptide der Erfindung synthetisch mit den üblichen Peptidsynthesegeräten hergestellt werden.

[0058] Reife Proteine können in Säugerzellen, Hefe, Bakterien oder anderen Zellen unter der Kontrolle geeigneter Promotoren exprimiert werden. Zellfreie Translations-Systeme können genauso benutzt werden, um solche Proteine herzustellen, indem man RNAs, die von den DNA-Konstrukten der vorliegenden Erfindung abgeleitet werden, benutzt. Geeignete Clonierungs- und Expressionsvektoren zum Gebrauch in prokaryontischen und eukaryontischen Wirten werden von Sambrook, et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, zweite Ausgabe, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) beschrieben.

[0059] Die Transkription der DNA in höheren Eukaryonten, die die Polypeptide der vorliegenden Erfindung codiert, wird durch Einbringen einer Enhancer-Sequenz in den Vektor erhöht. Enhancer sind cis-agierende Elemente der DNA, normalerweise mit etwa 10 bis 300 bp, die auf einen Promotor wirken, um dessen Transkription zu erhöhen. Beispiele beinhalten den SV 40-Enhancer auf der späten Seite des Replikationsursprungs bei bp 100 bis 270, einen Cytomegalievirus-Enhancer für den frühen Promotor, den Polyoma-Enhancer auf der späten Seite des Replikationsursprungs und den Adenovirus-Enhancer.

[0060] Die rekombinanten Expressions-Vektoren schließen generell die Replikationsursprünge und selektierbaren Marker, die eine Transformation der Wirtszelle erlauben, mit ein, zum Beispiel, das Ampicillin-Resistenzgen von *E. coli* und das *S. cerevisiae*-TRP1-Gen, und einen Promotor, der aus einem stark exprimierten Gen kommt, um die Transkription einer stromabwärts gelegenen strukturellen Sequenz zu steuern. Solche Promotoren können aus Operons, die glycolytische Enzyme wie die 3-Phosphoglyceratkinase (PGK), den α -Faktor, die saure Phosphatase oder Hitzschock-Proteine und andere codieren, hergeleitet werden. Die heterologe strukturelle Sequenz ist in einer geeigneten Phase mit den Translationsinitiations- und den Terminationssequenzen zusammengesetzt, und vorzugsweise mit einer Leader-Sequenz, die fähig ist, die Sekretion der translatierten Proteine in den periplasmatischen Raum oder das extrazelluläre Medium zu steuern. Die heterologe Sequenz kann wahlweise ein Fusions-Protein codieren, das ein N-terminales Identifikations-Peptid codiert, das gewünschte Eigenschaften wie zum Beispiel die Stabilisierung oder die einfache Reinigung der exprimierten rekombinanten Produkte ermöglicht.

[0061] Gebräuchliche Expressions-Vektoren zum Einsatz in Bakterien werden durch Einfügen einer strukturellen DNA-Sequenz, die ein gewünschtes Protein codiert, zusammen mit geeigneten Translationsinitiations- und Terminationssignalen in einer funktionellen Lese-Phase mit einem funktionellen Promotor konstruiert. Der Vektor umfasst einen oder mehrere phänotypisch selektierbaren Marker und einen Replikationsursprung, um den Erhalt des Vektors sicherzustellen und, wenn gewünscht, die Amplifikation im Wirt zu ermöglichen. Für die Transformation geeignete prokaryontische Wirte beinhalten *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium* und verschiedene Arten der Gattungen *Pseudomonas*, *Streptomyces* und *Staphylococcus*, obwohl andere wahlweise auch eingesetzt werden können.

[0062] Als ein repräsentatives, aber nicht begrenzendes Beispiel können geeignete Expressions-Vektoren zum Gebrauch in Bakterien einen selektierbaren Marker und einen bakteriellen Replikationsursprung umfassen, die von käuflich zu erwerbenden Plasmiden, die genetische Elemente des gut bekannten Clonierungs-Vektors pBR322 (ATCC 37017) enthalten, stammen. Solche käuflich zu erwerbende Vektoren beinhalten zum Beispiel pKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden) und pGEM1 (Promega Biotec, Madison, WI, USA). Diese pBR322-"Rückgrat"-Abschnitte werden mit einem geeigneten Promotor und der strukturellen Sequenz, die exprimiert werden soll, kombiniert.

[0063] Nach Transformation eines geeigneten Wirtsstammes und Züchten des Wirtsstammes bis zu einer geeigneten Zell-Dichte wird der ausgewählte Promotor mit geeigneten Mitteln (zum Beispiel einem Temperatur-Wechsel oder chemischer Induktion) induziert und die Zellen werden für eine zusätzliche Zeitspanne kultiviert.

[0064] Die Zellen werden typischerweise durch Zentrifugation geerntet, mit physikalischen oder chemischen Mitteln zerstört und der erhaltene rohe Extrakt wird zur weiteren Aufreinigung zurückbehalten.

[0065] Mikrobielle Zellen, die zur Expression von Proteinen genutzt werden, können mit jeder passenden Methode, einschließlich dem Gefrieren-Auftau-Wechsel, Ultraschall, der mechanischen Zerstörung oder dem Einsatz von Agenzien, die Zellen lysieren, zerstört werden. Diese Methoden sind dem Fachmann wohl bekannt.

[0066] Verschiedene Kultur-Systeme von Säugerzellen können auch zur Expression rekombinanter Proteine genutzt werden. Beispiele von Säugerexpressions-Systemen beinhalten die COS-7-Linien der Affenieren-Fibroblasten, die von Gluzman, *Cell*, 23: 175 (1981) beschrieben wurden, und andere Zelllinien, die in der Lage sind, einen kompatiblen Vektor zu exprimieren, zum Beispiel die C127-, 3T3-, CHO-, HeLa- und BHK-Zelllinien.

Säugerexpressions-Vektoren umfassen einen Replikationsursprung, einen geeigneten Promotor und Enhancer und auch jede nötige Ribosomen-Bindungs-Stelle, Polyadenylierungs-Stellen, Spleißdonor- und Akzeptorstellen, transkriptionale Terminations-Sequenzen und flankierende nicht-transkribierte 5'-Sequenzen. Die DNA-Sequenzen, die von den Spleiß- und Polyadenylierungsstellen von SV40 stammen, können benutzt werden, um die benötigten nicht-transkribierten genetischen Elemente bereitzustellen.

[0067] Die Ck β -9 Polypeptide können aus den rekombinanten Zellkulturen mit Methoden wie der Ammoniumsulfat- oder der Ethanol-Fällung, der sauren Extraktion, der Anionen- oder Kationenaustauschchromatografie, der Phosphocellulosechromatografie, der hydrophoben Interaktions-Chromatografie, der Affinitätschromatografie, der Hydroxylapatitchromatografie und der Lektinchromatografie erhalten und gereinigt werden. Schritte zur Neufaltung der Proteine können, falls nötig, benutzt werden, um die Konfiguration des reifen Proteins zu vervollständigen. Zum Schluss kann die Hochleistungsflüssigkeits-Chromatografie (HPLC) benutzt werden, um die letzten Reinigungsschritte auszuführen.

[0068] Die Polypeptide der vorliegenden Erfindung können ein natürlich gereinigtes Produkt oder ein Produkt aus chemischen synthetischen Verfahren sein oder mit rekombinanten Techniken aus prokaryontischen oder eukaryontischen Wirten (zum Beispiel von Bakterien-, Hefe-, höheren Pflanzen-, Insekten- und Säugerzellen in Kultur) produziert werden. Abhängig von dem Wirt, der in dem rekombinanten Herstellungsverfahren benutzt wird, können die Polypeptide der vorliegenden Erfindung glycosyliert oder nicht glycosyliert sein. Die Polypeptide der Erfindung können auch einen Methionin-Aminosäurerest am Anfang besitzen.

[0069] Die Ck β -9-Polypeptide können benutzt werden, um die Kolonienbildung der Knochenmarksstammzellen als zusätzliche schützende Behandlung während einer Krebs-Chemotherapie und für Leukämie zu hemmen.

[0070] Die Chemokin-Polypeptide können auch benutzt werden, um die Vermehrung von epidermalen Keratinocyten zu hemmen, um Psoriasis zu behandeln, die durch eine übermäßige Kerationocytenvermehrung charakterisiert ist.

[0071] Die Chemokin-Polypeptide können auch benutzt werden, um feste Tumore zu behandeln, indem die Invasion und Aktivierung von Wirts-Verteidigungszellen, zum Beispiel cytotoxischen T-Zellen und Macrophagen, stimuliert werden. Sie können auch benutzt werden, um die Wirtsabwehr gegen resistente chronische Infektionen, zum Beispiel Mycobakterien-Infektionen, über die Anziehungskraft und Aktivierung von microbiziden Leukocyten zu fördern.

[0072] Die Chemokin Polypeptide können auch benutzt werden, um Autoimmunkrankheiten und lymphocytische Leukämien zu behandeln, indem die Vermehrung von T-Zellen durch die Biosynthese von IL2- gehemmt wird.

[0073] Ck β -9 kann auch zur Wundheilung eingesetzt werden, sowohl durch die Inangsetzung der Fremdkörperbereinigung als auch die Rekrutierung von entzündungsförderndem Bindegewebe und auch über seine Kontrolle einer übermäßigen TGF β vermittelten Fibrose. In der gleichen Art und Weise kann Ck β -9 auch genutzt werden, um andere fibrotische Fehlfunktionen wie Leberzirrhose, Osteoarthritis und Lungenfibrose zu behandeln.

[0074] Die Chemokin-Polypeptide erhöhen auch die Präsenz von Eosinophilen, die eine bestimmte Funktion bei der Abtötung von Parasitenlarven haben, die in Gewebe einwandern, wie bei Schistosomiasis, Trichinose und Ascariasis.

[0075] Sie können auch dazu benutzt werden, die Blutbildung zu regulieren, indem die Aktivierung und die Differenzierung der verschiedenen blutbildenden Progenitor-Zellen, zum Beispiel die Freisetzung reifer Leukocyten aus dem Knochenmark nach einer Chemotherapie, reguliert wird.

[0076] Die Polynucleotide und Polypeptide, die von solchen Polynucleotiden codiert werden, können auch für in vitro-Zwecke, die die wissenschaftliche Forschung, die Synthese von DNA und die Herstellung von DNA-Vektoren betreffen, und für die Herstellung von Therapeutika und Diagnostika zur Behandlung von menschlichen Krankheiten eingesetzt werden.

[0077] Die Fragmente der Ck β -9-Gene vollständiger Länge können als eine Hybridisierungssonde für eine cDNA-Genbank zur Isolation des Gens vollständiger Länge und zur Isolation anderer Gene, die eine hohe Ähn-

lichkeit mit der Sequenz des Gens oder eine ähnliche biologische Aktivität aufweisen, benutzt werden. Sonden dieses Typs können zum Beispiel zwischen 20 und 2000 Basenpaare aufweisen. Vorzugsweise jedoch haben die Sonden zwischen 30 und 50 Basenpaare. Die Sonde kann auch benutzt werden, um cDNA-Clone, die einem Transkript vollständiger Länge entsprechen, und einen genomischen Clon oder genomische Clone, die die vollständigen Gene einschließlich der regulatorischen und Promotor-Regionen, Exons und Introns beinhalten, zu identifizieren. Ein Beispiel einer Durchmusterung umfasst die Isolation der Codierungsregion des Gens, indem die bekannte DNA-Sequenz zur Synthese einer Oligonucleotidsonde verwendet wird. Markierte Oligonucleotide, die eine übereinstimmende Sequenz mit den Genen der vorliegenden Erfindung haben, werden benutzt, um eine menschliche cDNA-, genomische DNA- oder mRNA-Genbank zu durchmustern, um zu bestimmen, welche Mitglieder der Genbank mit der Sonde hybridisieren.

[0078] Diese Erfindung betrifft auch den Gebrauch des CK β -9-Gens als Teil eines diagnostischen Tests zur Bestimmung von Krankheiten oder der Anfälligkeit für Krankheiten, die auf der Gegenwart von Mutationen in der Ck β -9-Nucleinsäuresequenz zurückzuführen sind. Solche Krankheiten stehen mit der Unter-Expression der Chemokin-Polypeptide, zum Beispiel bei Tumoren und Krebs in Zusammenhang.

[0079] Individuen, die Mutationen im Ck β -9-Gen tragen, können auf DNA-Ebene mit einer Vielzahl von Techniken bestimmt werden. Nucleinsäuren zur Diagnose können von Patientenzellen, zum Beispiel aus Blut, Urin, Speichel, Gewebebiopsie und Autopsiematerial erhalten werden. Die genomische DNA kann direkt zum Nachweis genutzt werden oder kann vor der Analyse enzymatisch, indem die PCR (Saiki et al., *Nature*, 324: 163–166 (1986)) genutzt wird, vermehrt werden. RNA oder cDNA können auch für denselben Zweck benutzt werden. Zum Beispiel können PCR-Primer, die mit der Nucleinsäure, die das Ck β -9-Gen codiert, übereinstimmt, genutzt werden, um Ck β -9-Mutationen zu identifizieren und zu analysieren. Zum Beispiel können Deletionen und Insertionen über die Änderung der Größe des amplifizierten Produktes im Vergleich zu dem normalen Genotyp bestimmt werden. Punktmutationen können über eine Hybridisierung der vermehrten DNA mit einer radioaktiv markierten Ck β -9-RNA oder alternativ dazu, mit radioaktiv markierten CK β -9-antisense-DNA-Sequenzen identifiziert werden. Perfekt passende Sequenzen können von fehlerhaften Duplexmolekülen über einen Verdau mit RNAse A oder den Änderungen in der Schmelztemperatur unterschieden werden.

[0080] Genetisches Testen, das auf Unterschieden in der DNA-Sequenz beruht, kann über die Bestimmung der Änderung der elektrophoretischen Beweglichkeit der DNA-Fragmente in Gelen mit oder ohne denaturierende Agenzien durchgeführt werden. Kleine Deletionen und Insertionen in der Sequenz können mittels Gelelektrophorese mit hoher Auflösung sichtbar gemacht werden. DNA-Fragmente mit verschiedenen Sequenzen können mit denaturierenden Formamid-Gradienten-Gelen unterschieden werden, in denen sich die verschiedenen DNA-Fragmente in dem Gel an verschiedenen Positionen in Übereinstimmung mit ihren spezifischen Schmelztemperaturen oder Partial-Schmelztemperaturen, langsamer fortbewegen werden (vgl. zum Beispiel Myers et al., *Science*, 230: 1242 (1985)).

[0081] Änderungen in der Sequenz an spezifischen Stellen können mit den Nuclease-Protektions-Tests wie RNAse und S1-Protektion oder der chemischen Spaltungsmethode aufgedeckt werden (zum Beispiel, Cotton et al., *PNAS*, USA, 85: 4397–4401 (1985)).

[0082] Deshalb kann die Bestimmung einer spezifischen DNA-Sequenz mit Methoden wie Hybridisierung, RNAse-Protektion, chemischer Spaltung, direkter DNA-Sequenzierung oder dem Gebrauch von Restriktionsenzymen (zum Beispiel Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP)) und Southern-Blott-Verfahren der genomischen DNA erreicht werden.

[0083] Zusätzlich zu den üblicheren Methoden der Gelelektrophorese und DNA-Sequenzierung können Mutationen auch mit der in situ-Analyse bestimmt werden.

[0084] Die vorliegende Erfindung betrifft auch einen diagnostischen Test zur Bestimmung von geänderten Mengen von Ck β -9-Proteinen in verschiedenen Geweben, da eine Über-Expression der Proteine verglichen mit einer normalen Kontroll-Gewebeprobe die Gegenwart einer Krankheit oder Anfälligkeit für eine Krankheit, zum Beispiel einem Tumor, zeigen kann. Tests, die benutzt werden, um Ck β -9-Protein-Mengen in einer Probe von einem Wirt zu bestimmen, sind dem Fachmann wohl bekannt und beinhalten Radioimmunotests, kompetitive Bindungstests, die Western-Blot-Analyse, ELISA-Tests und den „Sandwich“-Tests. Ein ELISA-Test (Coligan, et al., *Current Protocols in Immunology*, 1 (2), Kapitel 6, (1991)) umfasst zuerst die Herstellung eines Antikörpers, der zu dem Ck β -9-Antigen spezifisch ist, vorzugsweise eines monoklonalen Antikörpers. Zusätzlich dazu kann ein Reporter-Antikörper gegen den monoklonalen Antikörper hergestellt werden. An den Reporter-Antikörper wird ein detektierbares Reagenz wie Radioaktivität, Fluoreszenz oder in diesem Beispiel ein

Meerrettich-Peroxidase-Enzym angehängt. Dem Wirt wird eine Probe entnommen und auf einer festen Unterlage, zum Beispiel einer Polystyrolschale, die die Proteine aus der Probe bindet, inkubiert. Alle freien Proteinbindungsstellen auf der Schale werden dann durch Inkubation mit einem nicht-spezifischen Protein wie Rinderserumalbumin abgedeckt. Als nächstes wird der monoclonale Antikörper in der Schale inkubiert; in dieser Zeit binden die monoclonalen Antikörper an jedes Ck β -9-Protein, das an der Polystyrolschale haftet. Alle ungebundenen monoclonalen Antikörper werden mit Puffer ausgewaschen. Der Reporter-Antikörper, der mit der Meerrettich-Peroxidase verbunden ist, wird nun in die Schale gegeben und bindet an jeden monoclonalen Antikörper, der mit dem Ck β -9 verbunden ist. Ungebundene Reporter-Antikörper werden dann ausgewaschen. Dann werden Peroxidase-Substrate in die Schale gegeben und die Menge an gebildeter Farbe in einer vorgegebenen Zeit ist eine Maß für die Menge an Ck β -9-Protein, die in einem vorgegebenen Volumen einer Patientenprobe vorhanden ist, wenn sie mit einer Standard-Kurve verglichen wird.

[0085] Ein Konkurrenz-Test kann benutzt werden, in dem die Antikörper, die zu Ck β -9 spezifisch sind, an einen festen Träger angeheftet werden und markiertes Ck β -9 und die Probe, die von einem Wirt stammt, über den feste Träger gegeben werden, und der Gehalt an Markierung, der zum Beispiel mit der Flüssigkeitsszintillationschromatografie bestimmt wird, kann mit der Menge an Ck β -9 in der Probe korreliert werden.

[0086] Ein „Sandwich“-Test ist so ähnlich wie ein ELISA-Test. In einem „Sandwich“-Test wird Ck β -9 über einen festen Träger geschickt und bindet an Antikörper, die an dem festen Träger angelagert sind. Ein zweiter Antikörper wird dann an das Ck β -9 gebunden. Ein dritter Antikörper, der markiert und spezifisch zu dem zweiten Antikörper ist, wird dann über den festen Träger gegeben und bindet an den zweiten Antikörper und der Gehalt kann dann quantifiziert werden.

[0087] Diese Erfindung stellt eine Methode zur Identifikation des Rezeptors von Ck β -9-Polypeptiden bereit. Das Gen, das den Rezeptor codiert, kann mit zahlreichen Methoden, die dem Fachmann bekannt sind, identifiziert werden, zum Beispiel dem Liganden-Panning und der FACS-Sortierung (Coligan, et al., Current Protocols in Immun. 1 (2), Kapitel 5 (1991)). Vorzugsweise wird das Expressions-Clonieren ausgeführt, wobei polyadenylierte RNA aus einer Zelle, auf die Polypeptide reagiert, hergestellt wird und eine cDNA-Genbank, die aus dieser RNA aufgebaut ist, in Pools unterteilt und benutzt wird, um COS-Zellen oder andere Zellen, die nicht auf die Polypeptide reagieren, zu transfizieren. Transfizierte Zellen, die auf Objektträgern aus Glas gezüchtet werden, werden den markierten Polypeptiden ausgesetzt. Die Polypeptide können mit einer Vielzahl von Mitteln, einschließlich der Iodierung oder dem Einbringen einer Erkennungsstelle für eine ortsspezifische Proteinkinase, markiert werden. Nach der Fixierung und der Inkubation werden die Objektträger einer autoradiographischen Analyse unterworfen. Positive Poole werden identifiziert und Subpoole werden hergestellt und erneut transfiziert, indem sich wiederholende Subpooling- und erneute Durchmusterungsverfahren mit letztendlicher Ernte eines Einzel-Clons, der den möglichen Rezeptor codiert, durchlaufen werden.

[0088] Als ein alternativer Ansatz zur Identifikation eines Rezeptors können die markierten Polypeptide an die Zellmembran oder an Extrakt-Präparationen, die das Rezeptormolekül exprimieren, über Photoaffinität, gebunden werden. Quervernetztes gebundenes Material wird mittels PAGE-Analyse aufgelöst und einem Röntgenfilm ausgesetzt. Der markierte Komplex, der den Rezeptor für die Polypeptide enthält, kann herausgeschnitten werden und in Peptid-Fragmente aufgetrennt werden und einer Protein-Mikro-Sequenzierung unterworfen werden. Die Aminosäuresequenz, die von der Mikro-Sequenzierung erhalten wird, kann benutzt werden, um einen Satz von degenerierten Oligonucleotidsonden herzustellen, mit denen eine cDNA-Genbank durchsucht wird, um die Gene, die die vermeintlichen Rezeptoren codieren, zu identifizieren.

[0089] Diese Erfindung stellt auch eine Methode zum Durchmustern von Komponenten bereit, um Agonisten und Antagonisten der Ck β -9-Polypeptide der vorliegenden Erfindung zu identifizieren. Ein Agonist ist eine Komponente, die eine ähnliche biologische Funktion wie die Polypeptide hat, während ein Antagonist solche Funktionen blockiert. Chemotaxis kann untersucht werden, indem die Zellen, die durch jedes der Polypeptide der vorliegenden Erfindung chemisch angezogen werden oben auf den Filter, mit Poren von genügend großem Durchmesser, um die Zellen einzulassen (etwa 5 μ m), platziert werden. Lösungen mit möglichen Agonisten werden auf den Boden der Kammer mit einem geeigneten Kontroll-Medium in dem oberen Kompartiment gegeben und so wird ein Konzentrationsgradient der Agonisten gemessen, indem die Zellen, die in oder durch die poröse Membran im Laufe der Zeit wandern, gezählt werden.

[0090] Wenn Antagonisten untersucht werden, werden die Polypeptide der vorliegenden Erfindung in die untere Kammer gegeben und der mögliche Antagonist wird hinzugegeben, um zu bestimmen, ob die Chemotaxis der Zellen verhindert wird.

[0091] Alternativ dazu kann eine Säugerzell- oder Membranpräparation, die die Rezeptoren der Polypeptide exprimiert, mit einem zum Beispiel mit Radioaktivität markierten Ck β -9-Polypeptid in Gegenwart der Verbindung inkubiert werden. Die Fähigkeit der Verbindung, diese Interaktion zu blockieren, kann dann gemessen werden. Wenn auf diese Weise Agonisten untersucht werden, fehlen die Chemokine und die Fähigkeit des Agonisten seinerseits, mit dem Rezeptor zu interagieren, kann gemessen werden.

[0092] Beispiele möglicher Ck β -9 Antagonisten beinhalten Antikörper. Ein anderes Beispiel eines möglichen Antagonisten ist eine negativ dominante Mutante der Polypeptide. Negativ dominante Mutanten sind Polypeptide, die an den Rezeptor des Wild-Typ-Polypeptids binden, die aber keine biologische Aktivität besitzen.

[0093] Antisense-Konstrukte, die mittels Antisense-Technologien hergestellt werden, sind auch mögliche Antagonisten. Antisense-Technologien können benutzt werden, um die Genexpression über die Triple-Helix-Bildung oder Antisense-DNA oder -RNA zu kontrollieren, beides Methoden, die darauf basieren, dass ein Polynucleotid an DNA oder RNA bindet. Zum Beispiel können 5'-Codierungsabschnitte der Polynucleotid-Sequenz, die das reife Polypeptid der vorliegenden Erfindung codiert, genutzt werden, um ein Antisense-RNA-Oligonucleotid von etwa 10 bis 40 Basenpaaren Länge herzustellen. Ein DNA-Oligonucleotid wird hergestellt, um zu einer Region auf dem Gen komplementär zu sein, das an der Transkription beteiligt ist (Triple-Helix, vgl. Lee et al., Nucl. Acids Res., 6: 3073 (1979); Cooney et al., Science, 241: 456 (1988) und Dervan et al., Science, 251: 1360 (1991)); dabei werden die Transkription und die Produktion der Chemokin-Polypeptide verhindert. Das Antisense-RNA-Oligonucleotid hybridisiert mit der mRNA in vivo und blockiert die Translation der mRNA-Moleküle zu Polypeptiden (Antisense-Okano, J. Neurochem. 56: 560 (1991); Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression, CRC Press, Boca Raton, FL (1988)). Die vorstehend beschriebenen Oligonucleotide können auch an Zellen verabreicht werden, so dass die Antisense-RNA oder DNA in vivo exprimiert werden kann, um die Produktion von Ck β -9 zu hemmen.

[0094] Die Antagonisten können genutzt werden, um die Chemotaxis und die Aktivierung von Makrophagen und deren Vorläufern und von neutrophilen Granulocyten, Basophilen, B-Lymphocyten und einigen T-Zell-Untergruppen, zum Beispiel aktivierte und cytotoxische CD-8-T-Zellen und natürliche Killerzellen, in Autoimmun- und chronisch entzündlichen und infektiösen Krankheiten zu hemmen. Beispiele für Autoimmunkrankheiten beinhalten rheumatoide Arthritis, multiple Sklerose und Insulin-abhängigen Diabetes. Einige infektiöse Krankheiten beinhalten Silikose, Sarkoidose, idiopathische Lungenfibrose, wobei die Rekrutierung und Aktivierung von einkernigen Phagocyten verhindert wird, das idiopathische hyper-eosinophile Syndrom wobei die Produktion und Migration von Eosinophilen verhindert werden, und endotoxischen Schock wobei die Migration von Makrophagen und deren Produktion von Chemokin-Polypeptiden der vorliegenden Erfindung verhindert werden.

[0095] Die Antagonisten können auch benutzt werden, um Artherosklerose zu behandeln, indem die Monocyten-Infiltration in die Arterienwand verhindert wird.

[0096] Die Antagonisten können auch benutzt werden, um Histamin vermittelte allergische Reaktionen und immunologische Störungen zu behandeln; die allergische Reaktionen vom Spättyp, die chronische Urtikaria und die atopische Dermatitis beinhalten, wobei die Chemokin induzierten Mastzellen und die Degranulation der Basophilen und die Freisetzung von Histaminen verhindert werden. Die IgE vermittelten allergischen Reaktionen wie allergisches Asthma, Rhinitis und Ekzeme können auch behandelt werden.

[0097] Die Antagonisten können auch eingesetzt werden, um chronische und akute Entzündungen zu behandeln, indem die Anziehung der Monocyten zu einem Wundbereich verhindert wird. Sie können auch benutzt werden, um die normalen Macrophagen-Populationen der Lunge zu regulieren, da die akuten und chronischen entzündlichen Lungenkrankheiten mit Sequestrierung von einkernigen Phagocyten in der Lunge verbunden sind.

[0098] Die Antagonisten können auch dazu benutzt werden, rheumatoide Arthritis zu behandeln, indem die Anziehung von Monocyten zu der Synovialflüssigkeit in den Gelenken der Patienten verhindert wird. Das Einfließen und die Aktivierung der Monocyten spielen in der Pathogenese sowohl der degenerativen als auch der entzündlichen Arthropathien eine signifikante Rolle.

[0099] Die Antagonisten können benutzt werden, um in die schädlichen Kaskaden, die hauptsächlich dem IL-1 und dem TNF zugeschrieben werden, einzugreifen, was die Biosynthese anderer Entzündungs-Cytokine hemmt. Auf diese Weise können Antagonisten eingesetzt werden, um Entzündungen zu verhindern. Die Antagonisten können auch dazu eingesetzt werden, das Prostaglandin-unabhängige Fieber, das von Chemokinen

induziert wird, zu hemmen.

[0100] Die Antagonisten können auch dazu eingesetzt werden, Fälle von Knochenmarksstörungen zu behandeln, zum Beispiel die aplastische Anämie und das myelodysplastische Syndrom.

[0101] Die Antagonisten können auch dazu benutzt werden, Asthma und Allergien zu behandeln, indem die Akkumulation von Eosinophilen in der Lunge verhindert wird. Die Antagonisten können auch dazu eingesetzt werden, die Basalmembran-Fibrose zu behandeln, die ein hervorstechendes Merkmal der asthmatischen Lunge ist.

[0102] Die Antagonisten können auch in einer Zusammensetzung mit einem pharmazeutisch geeigneten Träger, zum Beispiel wie nachfolgend beschrieben, eingesetzt werden.

[0103] Die Ck β -9-Polypeptide und Agonisten und Antagonisten können in Kombination mit geeigneten pharmazeutischen Trägern eingesetzt werden. Solche Zusammensetzungen umfassen eine therapeutisch effektive Menge der Polypeptide und einen pharmazeutisch verträglichen Träger oder Excipient. Solch ein Träger beinhaltet, ist aber nicht darauf beschränkt, Salzlösung, gepufferte Salzlösung, Dextrose, Wasser, Glycerin, Ethanol und Kombinationen davon. Die Formulierung sollte der Art der Anwendung angepasst sein.

[0104] Die Erfindung stellt auch eine Arzneimittelpackung oder einen Kit bereit, die der einen oder mehrere Behälter umfasst, die mit einem oder mehreren der Inhaltsstoffe der Arzneimittel der Erfindung gefüllt sind. Einhergehend mit (einem) solchen Behälter(n) kann eine Mitteilung in der Form sein, wie sie von der Regierungsbehörde, die die Herstellung, den Gebrauch oder den Verkauf von pharmazeutischen oder biologischen Produkten regelt, vorgeschrieben ist; eine solche Mitteilung spiegelt die Genehmigung für die Herstellung, den Gebrauch oder den Verkauf zur Verabreichung an den Menschen durch die Behörde wider. Außerdem können die Polypeptide und die Agonisten und die Antagonisten in Verbindung mit anderen therapeutischen Verbindungen benutzt werden.

[0105] Die Arzneimittel können in einer geeigneten Form wie dem topischen, intravenösen, intraperitonealen, intramuskulären, intratumorösen, subcutanen, intranasalen oder intradermalen Wege verabreicht werden. Die Arzneimittel werden in Mengen, die für die Behandlung und/oder für die Prophylaxe der spezifischen Indikationen effektiv sind, eingesetzt. Im Allgemeinen werden die Polypeptide in Mengen von wenigstens etwa 10 μ g/kg Körpergewicht eingesetzt und in den meisten Fällen werden sie in Mengen nicht über etwa 8 mg/kg Körpergewicht pro Tag eingesetzt. In den meisten Fällen liegt die Dosierung bei etwa 10 μ g/kg bis zu etwa 1 mg/kg Körpergewicht täglich unter Berücksichtigung der Wege der Verabreichung, Symptome etc.

[0106] Die Ck β -9-Polypeptide und Agonisten oder Antagonisten, die Polypeptide sind, können in Übereinstimmung mit der vorliegenden Erfindung zur Expression solcher Polypeptide in vivo, was häufig als „Gentherapie“ bezeichnet wird, eingesetzt werden.

[0107] Deshalb werden zum Beispiel Zellen eines Patienten mit einem Polynucleotid (DNA oder RNA), das ein Polypeptid codiert, ex vivo verändert; die manipulierten Zellen werden dann einem Patienten, der mit dem Polypeptid behandelt werden soll, verabreicht. Solche Methoden sind im Fachgebiet wohl bekannt. Es werden zum Beispiel Zellen mit den im Fachgebiet bekannten Verfahren verändert, wobei retrovirale Partikel benutzt werden, die RNA enthalten, die ein Polypeptid der vorliegenden Erfindung codiert.

[0108] In ähnlicher Weise können Zellen mit zum Beispiel Verfahren, die im Fachgebiet bekannt sind, in vivo für die Expression eines Polypeptides verändert werden. Wie im Fachgebiet bekannt, kann eine Produktionszelle zur Herstellung von einem retroviralen Partikel, der RNA enthält, die das Polypeptid der vorliegenden Erfindung codiert, einem Patienten zur Manipulation von Zellen in vivo und Expression des Polypeptids in vivo verabreicht werden. Diese und andere Methoden zur Verabreichung eines Polypeptids der vorliegenden Erfindung mit solchen Methoden sollten dem Fachmann von der Lehre der vorliegenden Erfindung offenbar sein. Ein Expressions-Vehikel zur Veränderung von Zellen kann zum Beispiel etwas anderes als ein Retrovirus sein, zum Beispiel ein Adenovirus, das benutzt werden kann, um Zellen in vivo nach der Kombination mit einem geeigneten Abgabevehikel zu manipulieren.

[0109] Die Sequenzen der vorliegenden Erfindung sind auch wertvoll zur Identifikation von Chromosomen. Die Sequenz ist spezifisch gegen eine bestimmte Stelle auf einem individuellen menschlichen Chromosom ausgerichtet und kann mit dieser hybridisieren. Weiterhin gibt es ein aktuelles Bedürfnis, bestimmte Stellen eines Chromosoms zu identifizieren. Es sind zur Zeit nur wenige Reagenzien, die Chromosomen markieren und

auf der Basis von aktuellen Sequenzdaten (Wiederholungspolymorphismus) zur Markierung von chromosomalen Stellen eingesetzt werden, verfügbar. Die Kartierung von DNAs auf Chromosomen in Übereinstimmung mit der vorliegenden Erfindung ist ein wichtiger erster Schritt, solche Sequenzen mit Genen, die mit einer Krankheit zusammenhängen, in Beziehung zu setzen.

[0110] Kürzlich wurden Sequenzen auf Chromosomen kartiert, indem PCR-Primer (vorzugsweise 15–25 bp) aus cDNA hergestellt wurden. Die Computer gestützte Analyse der nicht translatierten 3'-Region wird benutzt, um Primer schnell zu selektieren, die sich über nicht mehr als ein Exon in der genomischen DNA erstrecken, was so den Amplifikations-Prozeß verkomplizieren würde. Diese Primer werden dann benutzt, um mit der PCR somatische Zellhybride zu durchmustern, die individuelle menschliche Chromosomen beinhalten. Nur solche Hybride, die die menschlichen Gene, die mit dem Primer übereinstimmen, beinhalten, ergeben ein amplifiziertes Fragment.

[0111] Die PCR-Kartierung von somatischen Zellhybriden ist ein schnelles Verfahren, um bestimmte DNA einem bestimmten Chromosom zuzuweisen. Wenn die vorliegende Erfindung mit den gleichen Oligonucleotid-Primern benutzt wird, kann eine Sublokalisierung in einer analogen Art und Weise mit Fragmentgruppen von spezifischen Chromosomen oder Pools großer genomischer Clone erreicht werden. Andere Kartierungsstrategien, die in ähnlicher Weise benutzt werden können, um Chromosomen zu kartieren, beinhalten die in situ-Hybridisierung, eine vorherige Durchmusterung mit markierten durchflußsortierten Chromosomen und eine Vorselektion über die Hybridisierung, um Chromosomen-spezifische cDNA-Genbanken zu konstruieren.

[0112] Um eine genaue chromosomale Lokalisierung in einem Schritt bereit zu stellen, kann die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) von cDNA-Clonen an einer Metaphase-Chromosomenausbreitung benutzt werden. Diese Technik kann mit cDNA, die so kurz wie 50 bis 60 bp ist, durchgeführt werden. Für einen Überblick über diese Technik, vgl. Verma et al., Human Chromosomes: a Manual of Basic Techniques, Pergamon Press, New York (1988).

[0113] Ist eine Sequenz einmal auf einem genauen chromosomalen Locus kartiert, kann die physikalische Position der Sequenz auf dem Chromosom mit den Daten der genetischen Karte korreliert werden. Solche Daten sind, zum Beispiel in V. McKusick, Mendelian Inheritance in Man (online verfügbar von Johns Hopkins University Welch Medical Library) erhältlich. Die Beziehung zwischen Genen und Krankheiten, die auf derselben chromosomalen Region kartiert werden, werden dann mit der Kopplungsanalyse (gemeinsame Vererbung von physikalisch benachbarten Genen) identifiziert.

[0114] Als nächstes ist es nötig, die Unterschiede in der cDNA oder der genomischen Sequenz zwischen betroffenen und nicht-betroffenen Individuen zu bestimmen. Wenn eine Mutation in einigen oder allen betroffenen Individuen, aber nicht in einem normalen Individuum beobachtet wird, dann ist die Mutation wahrscheinlich das verursachende Agens der Krankheit.

[0115] Mit der gegenwärtigen Auflösung von physikalischer Kartierung und genetischen Kartierungstechniken kann eine cDNA, die in einer chromosomalen Region genau lokalisiert wurde und mit der Krankheit assoziiert ist, eines von 50 bis 500 möglichen ursächlichen Genen sein. (Dies setzt eine Auflösung von 1 Megabase Kartierung und einem Gen pro 20 kb voraus).

[0116] Die Polypeptide, ihre Fragmente und andere Derivate oder Analoge davon oder Zellen, die diese exprimieren, können als Immunogene eingesetzt werden, um Antikörper dagegen zu produzieren. Diese Antikörper können, zum Beispiel, polyclonale oder monoclonale Antikörper sein. Die vorliegende Erfindung beinhaltet auch chimäre, Einzelstrang- und humanisierte Antikörper wie auch Fab-Fragmente oder die Produkte einer Fab-Expressions-Genbank. Es können verschiedene Verfahren, die im Fachgebiet bekannt sind, zur Produktion von solchen Antikörpern und Fragmenten eingesetzt werden.

[0117] Antikörper, die gegen ein Polypeptid, das mit einer Sequenz der vorliegenden Erfindung übereinstimmt, hergestellt werden, können erhalten werden, indem das Polypeptid direkt in ein Tier injiziert wird oder indem das Polypeptid einem Tier, vorzugsweise einem nicht-menschlichen, verabreicht wird. Die so erhaltenen Antikörper binden dann ihrerseits die Polypeptide. In dieser Art kann auch eine Sequenz, die nur ein Fragment der Polypeptide codiert, benutzt werden, Antikörper herzustellen, die das ganze native Polypeptid binden. Solche Antikörper können dann dazu benutzt werden, Polypeptide aus dem Gewebe zu isolieren, das diese Polypeptide exprimiert.

[0118] Zur Herstellung von monoclonale Antikörpern kann jede Technik verwendet werden, die Antikörper zur

Verfügung stellt, die von einer kontinuierlichen Zelllinienkultur hergestellt werden. Beispiele beinhalten die Hybridom-Technik (Köhler und Milstein, 1975, *Nature*, 256: 495–497), die Triom-Technik, die menschliche B-Zellen-Hybridom-Technik (Kozbor et al., 1983, *Immunology Today* 4: 72) und die EBV-Hybridom-Technik, um menschliche monoclonale Antikörper herzustellen (Cole et al., 1985, in *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., Seite: 77–96).

[0119] Techniken, die zur Produktion von Einzelketten-Antikörpern (US-Patent 4,946,778) beschrieben werden, können angepasst werden, um Einzelketten-Antikörper gegen immunogene Polypeptid-Produkte dieser Erfindung herzustellen. Es können auch transgene Mäuse benutzt werden, um humanisierte Antikörper gegen die immunogenen Polypeptid-Produkte dieser Erfindung zu exprimieren.

[0120] Die vorliegende Erfindung wird weiterhin mit Bezug auf die folgenden Beispiele beschrieben. Dennoch soll verstanden werden, dass die vorliegende Erfindung nicht auf solche Beispiele begrenzt ist. Alle Teile und Mengen sind, sofern es nicht anderweitig beschrieben wird, auf das Gewicht bezogen.

[0121] Um das Verständnis der folgenden Beispiele zu erleichtern, werden bestimmte häufiger erscheinende Methoden und/oder Begriffe erläutert.

[0122] „Plasmide“ werden mit dem Kleinbuchstaben p bezeichnet, dem Großbuchstaben und/oder Zahlen voranstellen und/oder folgen. Die Start-Plasmide hierin sind auch käuflich zu erwerben und öffentlich auf freier Basis zugänglich oder können aus zugänglichen Plasmiden im Einklang mit publizierten Verfahren konstruiert werden. Außerdem sind ähnliche Plasmide wie die beschriebenen im Fachgebiet bekannt und dem Fachmann offenbar.

[0123] Der „Verdau“ von DNA bezieht sich auf die katalytische Spaltung der DNA mit einem Restriktionsenzym, das nur an einer bestimmten Sequenz in der DNA agiert. Die verschiedenen Restriktionsenzyme, die hier benutzt werden, sind käuflich zu erwerben und ihre Reaktionsbedingungen, Kofaktoren und andere Anforderungen werden so benutzt, wie es dem Fachmann bekannt ist. Zu analytischen Zwecken werden typischerweise 1 µg des Plasmids oder des DNA-Fragmentes mit etwa 2 Einheiten Enzym in etwa 20 µl Pufferlösung angesetzt. Für den Zweck der Isolierung von DNA-Fragmenten zur Plasmid-Konstruktion werden typischerweise 5 bis 50 µg DNA mit 20 bis 250 Einheiten Enzym in einem größeren Volumen verdaut. Geeignete Puffer und Substratmengen für besondere Restriktionsenzyme werden vom Hersteller angegeben. Es werden gewöhnlich Inkubationszeiten von etwa 1 h bei 37°C benutzt, aber sie können auch in Übereinstimmung mit den Anweisungen des Lieferanten variieren. Nach dem Verdau wird der Reaktionsansatz direkt einer Elektrophorese in einem Polyacrylamidgel unterzogen, um die gewünschten Fragmente zu isolieren.

[0124] Eine Auftrennung der gespalteten Fragmente nach Größe wird ausgeführt, indem ein 8 prozentiges Polyacrylamidgel, wie es von Goeddel, D. et al., *Nucleic Acid Res.*, 8: 4057 (1980) beschrieben wurde, benutzt wird.

[0125] „Oligonucleotide“ bezieht sich sowohl auf Einzelstrang-Polydesoxynucleotide als auch auf zwei komplementäre Polydesoxynucleotidstränge, die chemisch synthetisiert werden können. Solche synthetisch hergestellten Oligonucleotide haben kein 5'-Phosphat und werden sich deswegen nicht mit anderen Oligonucleotiden verbinden, ohne dass ein Phosphat von einem ATP in der Gegenwart einer Kinase angehängt wird. Ein synthetisches Oligonucleotid wird sich mit einem Fragment verbinden, das nicht dephosphoryliert ist.

[0126] „Ligierung“ bezieht sich auf den Prozess, bei dem Phosphodiesterbindungen zwischen zwei doppelsträngigen Nucleinsäure-Fragmenten gebildet werden (Maniatis, T., et al., Id. S. 146). Soweit nicht anderweitig vorgesehen, wird die Ligierung durchgeführt, indem die bekannten Puffer und Bedingungen mit 10 Einheiten der T4-DNA-Ligase („Ligase“) auf 0,5 µg, von etwa äquimolaren Mengen der DNA-Fragmente, die verbunden werden sollen, genutzt werden.

[0127] Soweit es nicht anderweitig ausgeführt wird, wird die Transformation wie in der Methode von Graham, F. und Van der Eb, A., *Virology*, 52: 456–457 (1973) beschrieben, ausgeführt.

Beispiel 1

Bakterielle Expression und Reinigung von Ckβ-9

[0128] Die DNA-Sequenz, die Ckβ-9, ATCC # 75803 codiert, wird zuerst amplifiziert, indem PCR-Oligonucle-

otid-Primer, die den 5'- und 3'-Endsequenzen der prozessierten Ck β -9-Gene entsprechen (minus der mutmaßlichen Signal-Peptid-Sequenz), benutzt werden. Weitere Nucleotide, die Ck β -9 entsprechen, werden an die 5'- bzw. den 3'-Endsequenzen angefügt. Der 5'-Oligonucleotidprimer hat die Sequenz 5'CCC GCATGCGTGATGGAGGGGCTCAG3' (SEQ ID Nr. 3) und beinhaltet eine SphI-Restriktionsschnittstelle (fett gedruckt), auf die 17 Nucleotide der Ck β -9 Codierungssequenz (unterstrichen) folgen und die am zweiten Nucleotid der Sequenz, die das reife Protein codiert, startet.

[0129] Das ATG-Codon ist in die SphI-Stelle eingeschlossen. In dem nächsten Codon, das dem ATG folgt, stammt die erste Base von der SphI-Stelle und die verbleibenden zwei Basen stimmen mit der zweiten und dritten Base des ersten Codons (Rest S₂₄) des mutmaßlichen reifen Proteins überein. Als eine Konsequenz wird die erste Base in diesem Codon von A zu C, verglichen mit der Originalsequenz, geändert, was in einer S zu R-Substitution in dem rekombinanten Protein führt. Die 3'-Sequenz 5'AAAGGATCCTGGCCCTTTAGGGGTCTGTGA3' (SEQ ID Nr. 4) beinhaltet komplementäre Sequenzen zur BamHI-Stelle (fett gedruckt), auf die 21 Nucleotide Gen-spezifischer Sequenzen folgen, die dem Terminationscodon vorangehen. Die Restriktionsenzym-Stelle stimmt mit der Restriktionsenzymstelle auf dem bakteriellen Expressions-Vektor pQE-70 (Quiagen, Inc. Chatsworth, CA) überein. pQE-70 codiert eine antibiotische Resistenz (Amp.), einen bakteriellen Replikationsursprung (ori), einen IPTG-regulierbaren Promotor-Operator (P/O), eine Ribosomen-Bindungsstelle (RBS), einen 6-His-Marker und Restriktionsenzymstellen. pQE-70 wird dann mit SphI und BamHI verdaut. Die amplifizierten Sequenzen werden in pQE-9 ligiert und im Rahmen mit der Sequenz, die den Histidinmarker und die RBS codiert, eingefügt. Das Ligierungsgemisch wird dann benutzt, um den E. coli-Stamm M15/rep4 (Quiagen, Inc.) mit der Methode, die von Sambrook, J. et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Laboratory Press, (1989), beschrieben wird, zu transformieren. M15/rep4 beinhaltet zahlreiche Kopien des Plasmids pREP4, das den lacI-Repressor exprimiert und auch eine Kanamycin-Resistenz (Kan^r) trägt. Transformanten werden durch ihre Fähigkeit, auf LB-Platten zu wachsen, identifiziert und Ampicillin/Kanamycin-resistente Kolonien werden selektiert. Die Plasmid-DNA wird isoliert und mit der Restriktionsanalyse bestätigt. Clone, die die gewünschten Konstrukte enthalten, werden über Nacht (O/N) in einer flüssigen Kultur in LB-Medium, dem sowohl Amp (100 μ g/ml) als auch Kan (25 μ g/ml) hinzugegeben werden, angezogen. Die O/N-Kultur wird benutzt, um eine große Kultur in einem Verhältnis 1:100 bis 1:250 anzupflanzen. Die Zellen werden bis zu einer optischen Dichte von 600 (O. D.⁶⁰⁰) von 0,4 bis 0,6 angezogen. IPTG („Isopropyl- β -D-thiogalacto-pyranosid“) wird dann bis zu einer Endkonzentration von 1 mM hinzugefügt. IPTG induziert, indem es den lacI-Repressor inaktiviert, wodurch der P/O freigelegt wird, was zur Erhöhung der Genexpression führt. Die Zellen werden weitere 3 bis 4 Stunden angezogen. Die Zellen werden dann mittels Zentrifugation geerntet. Das Pellet der Zellen wird in einem chaotropen Mittel gelöst: 6 molar Guanidin-HCl pH 5,0. Nach der Klärung wird solubilisiertes Ck β -9 aus dieser Lösung mittels Chromatografie auf einer Nickel-Chelat-Säule unter Bedingungen gereinigt, die eine feste Bindung durch Proteine, die den 6-His-Marker beinhalten, erlauben (Hochuli, E. et al., J. Chromatography 411: 177–184 (1984)). Ck β -9 (> 98% rein) wird von der Säule mit 6 M Guanidin-HCl eluiert. Die Protein-Renaturierung aus GnHCl kann mit verschiedenen Verfahren ausgeführt werden (Jaenicke, R., und Rudolph, R., Protein Structure- A Practical Approach, IRL Press, New York (1990)). Anfangs wird eine schrittweise Dialyse benutzt, um das GnHCl heraus zu lösen. Alternativ dazu kann das gereinigte Protein aus der Ni-Chelat Säule an eine zweite Säule gebunden werden, über die ein absteigender linearer GnHCl-Gradient läuft. Dem Protein wird erlaubt, zu renaturieren, während es an die Säule gebunden ist, und es wird anschließend mit einem Puffer, der 250 mM Imidazol, 150 mM NaCl, 25 mM Tris-HCl, pH 7,5 und 10% Glycerin enthält, eluiert. Am Schluss wird das gelöste Protein gegen den Aufbewahrungspuffer dialysiert, der 5 mM Ammoniumbicarbonat enthält.

Beispiel 2

Expression von rekombinantem Ck β -9 in COS-Zellen

[0130] Die Expression des Plasmides Ck β -9 HA ist abgeleitet von dem Vektor pcDNA1/Amp (Invitrogen), der enthält: 1) einen SV 40-Replikationsursprung, 2) ein Ampicillin-Resistenzgen, 3) einen E. coli-Replikationsursprung, 4) einen CMV-Promotor, dem eine Polylinker-Region, ein SV40-Intron und eine Polyadenylationsstelle folgen. Ein DNA-Fragment, das den vollständigen Ck β -9-Vorläufer und einen HA-Marker codiert, der mit seinem 3'-Ende im Rahmen fusioniert ist, wird in die Polylinker-Region des Vektors cloniert, deshalb wird die Expression des rekombinanten Proteins von dem CMV-Promotor gesteuert. Der HA-Marker stimmt mit einem Epitop überein, das aus dem Influenza-Hämagglutinin-Protein stammt, wie kürzlich beschrieben wurde (I. Wilson, N. Niman, R. Heighten, A. Cherenson, M. Connolly, und R. Lerner, 1984, Cell 37, 767)). Das Einbringen des HA-Markers in das Zielprotein erlaubt eine einfache Bestimmung des rekombinanten Proteins mit einem Antikörper, der das HA-Epitop erkennt.

[0131] Die Plasmid-Konstruktions-Strategie wird wie folgt beschrieben:

Die DNA-Sequenz, die das Ck β -9, ATTC# 75803, codiert, wird konstruiert, indem zwei PCR-Primer benutzt werden: der 5'-Primer 5'AAAGGATCCAGACATGGCTCAGTCACT3' (SEQ ID Nr. 5) beinhaltet eine BamHI-Stelle, die von 18 Nucleotiden der Ck β -9-Codierungssequenz gefolgt wird, die vom Initiationscodon startet: die 3'-Sequenz 5'CGCTCTAGATCAAGCGTAGTCTGGGACGTCGTATGGGTATGGCCCTTTAGGG GTCTG3' (SEQ ID Nr. 6) beinhaltet komplementäre Sequenzen zu einer XbaI-Stelle, einem Translations-Stopp-Codon, einem HA-Marker und den letzten 18 Nucleotide der Ck β -9-Codierungssequenz (das Stopp-Codon nicht eingeschlossen). Deshalb beinhaltet das PCR-Produkt eine BamHI-Stelle, eine Ck β -9-Codierungssequenz, die von einem HA-Marker, der im Rahmen fusioniert ist, gefolgt wird, ein Translations-Terminations-Stopp-Codon neben dem HA-Marker und eine XbaI-Stelle. Das PCR amplifizierte DNA-Fragment und der Vektor, pcDNA1/AMP, werden mit BamHI und XbaI-Restriktionsenzymen verdaut und ligiert. Das Ligierungsgemisch wird in den E. coli-Stamm SURE (Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA) transformiert und die transformierte Kultur wird auf Platten, die ein Ampicillin-Medium enthalten, ausplattiert und resistente Kolonien werden selektiert. Die Plasmid-DNA wird aus den Transformanten isoliert und mit der Restriktionsanalyse auf die Präsenz des korrekten Fragmentes untersucht. Für die Expression des rekombinanten Ck β -9 werden COS-Zellen mit dem Expressions-Vektor mittels der DEAE-DEXTRAN-Methode transfiziert (J. Sambrook, E. Fritsch, T. Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Laboratory Press (1989)). Die Expression des Ck β -9 HA-Proteins wird über die Radiomarkierungs- und Immunpräzipitationsmethode bestimmt (E. Harlow, D. Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1988)). Die Zellen werden für acht Stunden mit ³⁵S-Cystein zwei Tage nach der Transfektion markiert. Das Kultur-Medium wird dann gewonnen und die Zellen werden mit einem Detergenz (RIPA-Puffer (150 mM NaCl, 1% NP-40, 0,1% SDS, 1% NP-40, 0,5% DOC, 50 mM Tris, pH 7,5) (Wilson, I. et al., *Id.* 37: 767 (1984)) lysiert. Beides, Zellysat und Kulturmedium, wird mit einem NA-spezifischen monoclonalen Antikörper ausgefällt. Die ausgefällten Proteine werden mittels SDS-PAGE analysiert.

Beispiel 3

Expression mittels Genterapie

[0132] Fibroblasten werden von einem Individuum mittels Hautbiopsie erhalten. Das erhaltene Gewebe wird in ein Gewebe-Kultur-Medium gebracht und in kleine Teile aufgeteilt. Kleine Stücke des Gewebes werden auf die feuchte Oberfläche eines Gewebe-Kultur-Kolbens gelegt; es werden ungefähr zehn Stücke in jeden Kolben gelegt. Der Kolben wird mit dem Oberteil nach unten gedreht, gut verschlossen und über Nacht bei Raumtemperatur belassen. Nach 24 Stunden bei Raumtemperatur wird der Kolben umgedreht und die Gewebestücke bleiben am Boden des Kolbens angehaftet und frisches Medium (zum Beispiel Ham-F12-Medium mit 10% FBS, Penicillin und Streptomycin) wird hinzu gegeben. Dies wird dann bei 37°C für ungefähr eine Woche inkubiert. Zu diesem Zeitpunkt wird frisches Medium hinzugegeben und anschließend alle paar Tage gewechselt. Nach weiteren zwei Wochen in Kultur taucht eine einzellige Schicht von Fibroblasten auf. Die einzellige Schicht wird trypsinisiert und in größere Kolben überführt.

[0133] pMV-7 (Kirschmeier, P. T., et al., *DNA*, 7: 219–25 (1988)) ist umgeben von den langen terminalen Wiederholungen des murinen Moloney-Sarcoma-Virus und wird mit EcoRI und HindIII verdaut und anschließend mit intestinaler Phosphatase vom Kalb behandelt. Der lineare Vektor wird auf einem Agarosegel fraktioniert und gereinigt, wobei Glasperlen benutzt werden.

[0134] Die cDNA, die das Polypeptid der vorliegenden Erfindung codiert, wird vermehrt, indem PCR-Primer benutzt werden, die den 5'- bzw. 3'-Endsequenzen entsprechen. Der 5'-Primer enthält eine EcoRI-Stelle und der 3'-Primer beinhaltet weiterhin eine HindIII-Stelle. Gleiche Mengen des linearen Rückgrates des murinen Moloney-Sarcoma-Virus und das amplifizierte EcoRI- und HindIII-Fragment werden in Gegenwart einer T4-DNA-Ligase zusammen gegeben. Die erhaltene Mischung wird unter den Bedingungen, die für eine Ligierung der zwei Fragmente geeignet sind, gehalten. Die Ligierungsmischung wird benutzt, um die Bakterien HB101 zu transformieren, die dann auf Agar, der Kanamycin enthält, ausplattiert werden, um festzustellen, dass der Vektor das Gen von Interesse richtig inseriert hat.

[0135] Die amphotropen pA317- oder GP+am12-Verpackungszellen werden in Gewebekultur bis zu einer konfluenten Dichte in Dulbecco modifiziertem Eagle-Medium (DMEM) mit 10% Kälberserum (CS), Penicillin und Streptomycin angezogen. Der MSV-Vektor, der das Gen enthält, wird anschließend zu dem Medium gegeben und die Verpackungszellen werden mit dem Vektor transduziert. Die Verpackungszellen stellen jetzt infektiöse virale Partikel, die das Gen enthalten, her (die Verpackungszellen werden im Folgenden als Produktionszellen bezeichnet). Es wird frisches Medium zu den transduzierten Produktionszellen gegeben und an-

schließlich wird das Medium von einer 10 cm-Platte mit konfluenten Produktionszellen geerntet. Das verbrauchte Medium, das die infektiösen viralen Partikel enthält, wird durch einen Millipore-Filter filtriert, um abgelöste Produktionszellen zu entfernen und diese Medien werden dann benutzt, um die Fibroblastenzellen zu infizieren. Das Medium wird aus der Platte mit unkonfluenten Fibroblasten entfernt und schnell mit dem Medium von den Produktionszellen ersetzt. Dieses Medium wird entfernt und gegen frisches Medium ausgetauscht. Wenn der Titer des Virus hoch ist, werden praktisch alle Fibroblasten infiziert und es ist keine Selektion nötig. Ist der Titer sehr niedrig, dann ist es nötig, einen retroviralen Vektor zu benutzen, der einen selektierbaren Marker wie neo oder his enthält. Die manipulierten Fibroblasten werden dann in den Wirt injiziert, entweder allein oder nachdem sie bis zur Konfluenz auf Cytodex 3-Microträgerperlen angezogen wurden. Die Fibroblasten produzieren jetzt das Protein-Produkt.

Sequenzprotokoll

(1) Allgemeine Information

(i) Anmelder: Li, et al.

(ii) Titel der Erfindung: Menschliches Beta-9-Chemokin

(iii) Zahl der Sequenzen: 6

(iv) Korrespondenzadresse:

(A) Adressat: Carella, Byrne, Bain, Gilfillan, Cecchi, Stewart & Olstein

(B) Straße: 6 Becker Farm Road

(C) Stadt: Roseland

(D) Bundesstaat: New Jersey

(E) Land: USA

(F) PLZ: 07068

(v) Computerlesbare Form:

(A) Art des Mediums: 3,5 Zoll-Diskette

(B) Computer: IBM PS/2

(C) Betriebssystem: MS-DOS

(D) Software: Word Perfect 5.1

(vi) Daten zur vorliegenden Anmeldung:

(A) Anmeldenummer:

(B) Anmeldedatum: gleichzeitig

(C) Klassifizierung:

(vii) Daten zur früheren Anmeldung:

(A) Anmeldenummer:

(B) Anmeldedatum:

(viii) Informationen zum Anwalt/Vertreter:

(A) Name: Ferraro, Gregory D.

(B) Registrierungsnummer: 36,134

(C) Referenz-/Aktenummer: 325800-434

(ix) Informationen zur Fernmeldeverbindung:

(A) Telefon: 201-994-1700

(B) Telefax: 201-994-1744

(2) Informationen zur Sequenz ID NR. 1:

(i) Sequenzmerkmale:

(A) Länge: 405 Basenpaare

(B) Typ: Nucleinsäure

(C) Strangaufbau: Einzelstrang

(D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: cDNA

(xi) Sequenzbeschreibung SEQ ID Nr. 1:

```

ATGGGCTCAGT CACTGGCTCT GAGCCTCCTT ATCCTGGTTC TGGCCTTTGG CATCCCCAGG    60
ACCCAAGGCA GTGATGGAGG GGCTCAGGAC TGTTGCCTCA AGTACAGCCA AAGGAAGATT    120
CCCGCCAAGG TTGTCCGCAG CTACCGGAAG CAGGAACCAA GCTTAGGCTG CTCCATCCCA    180
GCTATCCTGT TCTTGCCCCG CAAGCGCTCT CAGGCAGAGC TATGTGCAGA CCCAAAGGAG    240
CTCTGGGTGC AGCAGCTGAT GCAGCATCTG GACAAGACAC CATCCCCACA GAAACCAGCC    300
CAGGGCTGCA GGAAGGACAG GGGGGCCTCC AAGACTGGCA AGAAAGGAAA GGGCTCCAAA    360
GGCTGCAAGA GGACTGAGCG GTCACAGACC CCTAAAGGGC CATAG                               405

```

(3) Informationen zur SEQ ID Nr. 2:

(i) Sequenzmerkmale:

(A) Länge: 134 Aminosäuren

(B) Typ: Aminosäure

(C) Strangaufbau:

(D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: Protein

(xi) Sequenzbeschreibung SEQ ID Nr. 2

```

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

```

(2) Informationen zur SEQ ID Nr.: 3

- (i) Sequenzmerkmale:
 - (A) Länge: 26 Basenpaare
 - (B) Typ: Nucleinsäure
 - (C) Strangaufbau: Einzelstrang
 - (D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: Oligonucleotid

(xi) Sequenzbeschreibung SEQ ID Nr. 3:

CCCGCATGCG TGATGGAGGG GCTCAG

(2) Informationen zur SEQ ID Nr. 4:

- (i) Sequenzmerkmale:
 - (A) Länge: 30 Basenpaare
 - (B) Typ: Nucleinsäure
 - (C) Strangaufbau: Einzelstrang
 - (D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: Oligonucleotid

(xi) Sequenzbeschreibung SEQ ID Nr. 4:

AAAGGATCCT GGCCCTTTAG GGGTCTGTGA

(2) Informationen zur Sequenz ID Nr. 5:

- (i) Sequenzmerkmale:
 - (A) Länge: 27 Basenpaare
 - (B) Typ: Nucleinsäure
 - (C) Strangaufbau: Einzelstrang
 - (D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: Oligonucleotid

(xi) Sequenzbeschreibung SEQ ID Nr. 5:

AAAGGATCCA GACATGGCTC AGTCACT

(2) Informationen zur Sequenz ID NR. 6:

- (i) Sequenzmerkmale:
 - (A) Länge: 56 Basenpaare
 - (B) Typ: Nucleinsäure
 - (C) Strangaufbau: Einzelstrang
 - (D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: Oligonucleotid

(xi) Sequenzbeschreibung SEQ ID Nr. 6:

CGCTCTAGAT CAAGCGTAGT CTGGGACGTCG TATGGGTATG GCCCTTTAGG GGTCTG

Patentansprüche

1. Polynucleotid ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus
 - (a) Polynucleotiden, die das Polypeptid umfassend Aminosäuren -23 bis 111, wie in SEQ ID Nr. 2 dargestellt, codieren;
 - (b) Polynucleotiden, die das Polypeptid umfassend Aminosäuren 1 bis 111, wie in SEQ ID Nr. 2 dargestellt, codieren;
 - (c) Polynucleotiden, die die Nucleotidsequenz, wie in SEQ ID Nr. 1 dargestellt, von Nucleotid 1 bis 405 umfassen;
 - (d) Polynucleotiden, die die Nucleotidsequenz, wie in SEQ ID Nr. 1 dargestellt, von Nucleotid 70 bis 405 umfassen;
 - (e) Polynucleotiden, die das Polypeptid codieren, das die Aminosäuresequenz von zumindest der reifen Form des Polypeptids hat, das von der cDNA, die in ATCC 75803 enthalten ist, codiert wird;
 - (f) Polynucleotiden, die die codierende Sequenz der cDNA haben, die in ATCC 75803 enthalten ist und zumindest die reife Form des Polypeptids codiert;
 - (g) Polynucleotiden, die ein Fragment von mindestens 30 Aminosäuren eines Polypeptids codieren, das von einem Polynucleotid gemäß (a) bis (f) codiert wird;
 - (h) Polynucleotiden, deren komplementärer Strang mit einem Polynucleotid wie in (a) bis (g) definiert hybridisiert und zu mindestens 90% identisch ist mit einem Polynucleotid wie in (a) bis (g) definiert und die ein Polypeptid codieren, das C-C-Chemokinaktivität hat;
 - (i) Polynucleotiden, die ein Fragment eines Polypeptids codieren, das von einem Polynucleotid gemäß (a) bis (f) codiert wird, wobei das Fragment C-C-Chemokinaktivität behält; oder der komplementäre Strang eines solchen Polynucleotids.
2. Polynucleotid nach Anspruch 1, das DNA ist.
3. Vektor enthaltend das Polynucleotid nach Anspruch 1 oder 2.
4. Vektor nach Anspruch 3, in dem das Polynucleotid mit Expressionskontrollsequenzen funktionell verbunden ist, die Expression in prokaryontischen oder eukaryontischen Wirtszellen erlauben.
5. Wirtszelle, die mit dem Polynucleotid nach Anspruch 1 oder 2 oder mit dem Vektor nach Anspruch 3 oder 4 genetisch manipuliert ist.
6. Verfahren zur Herstellung eines Polypeptids, das C-C-Chemokinaktivität hat, umfassend: Züchten der Wirtszellen nach Anspruch 5 und Gewinnen des Polypeptids, das vom Polynucleotid codiert wird, aus der Kultur.
7. Verfahren zur Herstellung von Zellen, die in der Lage sind, ein Polypeptid zu exprimieren, das C-C-Chemokinaktivität hat, umfassend das genetische Manipulieren von Zellen mit dem Vektor nach Anspruch 3 oder 4.
8. Polypeptid, das die von einem Polynucleotid nach Anspruch 1 oder 2 codierte Aminosäuresequenz hat oder mit dem Verfahren nach Anspruch 6 erhältlich ist.
9. Antikörper gegen das Polypeptid nach Anspruch 8.
10. Antagonist/Inhibitor gegen das Polypeptid nach Anspruch 8, wobei der Antagonist/Inhibitor ein Antikörper nach Anspruch 9 oder ein Antisensekonstrukt ist.
11. Nucleinsäuremolekül, das spezifisch mit einem Polynucleotid nach Anspruch 1 oder 2 hybridisiert.

12. Arzneimittel umfassend das Polynucleotid nach Anspruch 1 oder 2, das Polypeptid nach Anspruch 8, den Antikörper nach Anspruch 9 oder 19, oder den Antagonist/Inhibitor nach Anspruch 10, und gegebenenfalls einen pharmazeutisch verträglichen Träger.

13. Diagnostische Zusammensetzung umfassend das Polynucleotid nach Anspruch 1 oder 2 oder das Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 11.

14. Verwendung des Polypeptids nach Anspruch 8 für die Herstellung eines Arzneimittels für die schützende Behandlung während der Chemotherapie von Krebs, und für Leukämie, für die Behandlung von Psoriasis, soliden Tumoren, Autoimmunkrankheiten, lymphatischer Leukämie, fibrotischen Krankheiten, Wundheilung, für die Abwehr resistenter chronischer Infektionen, zum Abtöten von Larven von Parasiten, oder für die Regulation der Blutbildung.

15. Verwendung des Polynucleotids nach Anspruch 1 oder 2 für die Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Psoriasis, soliden Tumoren, Autoimmunkrankheiten, chronischen Infektionen, Asthma, Allergie, um Wundheilung zu fördern, oder für die Regulation der Blutbildung.

16. Verwendung des Antikörpers nach Anspruch 9 oder 19 oder des Antagonisten/Inhibitors nach Anspruch 10 für die Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von rheumatoider Arthritis, Autoimmunkrankheiten, chronischen und akuten entzündlichen und infektiösen Krankheiten.

17. In vitro-Verfahren zum Diagnostizieren, ob eine Krankheit mit einer Mutation im Polynucleotid nach Anspruch 1 oder 2 oder im Polypeptid nach Anspruch 8 in Zusammenhang steht, wobei das Verfahren umfasst:
(a) Feststellen der Unterschiede in den Sequenzen des Polynucleotids nach Anspruch 1 oder 2 oder des Polypeptids nach Anspruch 8 zwischen Individuen, die eine Krankheit haben oder nicht haben; und
(b) Feststellen einer Mutation als Verursacher der Krankheit, wobei die Mutation in Individuen, die eine Krankheit haben, beobachtet wird, nicht jedoch in Individuen, die keine Krankheit haben.

18. In vitro-Verfahren zur Analyse der Anwesenheit des Polypeptids nach Anspruch 8, umfassend:
(a) Inkontaktbringen einer Probe mit dem Antikörper nach Anspruch 9 unter Bedingungen, die das Binden des Antikörpers an das Polypeptid erlauben; und
(b) Nachweis des so gebundenen Antikörpers und dadurch Feststellen der Anwesenheit des Polypeptids nach Anspruch 8.

19. Antikörper nach Anspruch 9, der polyclonal, monoclonal, chimär, ein Einzelkettenantikörper, ein menschlicher monoclonaler Antikörper, ein humanisierter Antikörper oder ein Fab-Fragment ist.

Es folgen 2 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

FIG. 1

ATGGCTCAGTCACGTGGCTCTGAGCCTCCTTATCCTGGTTCTGCCCTTGGCCATCCCCCAGG
M A Q S L A L S L L I L V L A F G I P R

ACCCAAAGGCAGTGATGGAGGGGCTCAGGACTGTGCCCTCAAGTACAGCCAAAGGAAGATT
T Q G S D G G A Q D C C L K Y S Q R K I

CCCGCCAAAGGTTGTCCCGCAGCTACCGGAAGCAGGAACCAAGCTTAGGCTGCTCCATCCCA
P A K V V R S Y R K Q E P S L G C S I P

GCTATCCTGTTCTTGCCCCGAAGCGCTCTCAGGCAGAGCTATGTGCAGACCCCAAGGAG
A I L F L P R K R S Q A E L C A D P K E

CTCTGGGTGCAGCAGCTGATGCAGCATCTGGACAAGACACCATCCCCACAGAAACCAGCC
L W V Q Q L M Q H L D K T P S P Q K P A

CAGGCTGCAGGAAGGACAGGGGGCCCTCCAAGACTGGCAAGAAAGGAAAGGGCTCCA
Q G C R K K D R G A S K T G K K G K G S K

GGCTGCAAGAGGACTGASCGGTCCACAGACCCCTAAAGGGCCATAG
G C K R T E R S Q T P K G P

