



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 600 17 453 T2** 2005.12.22

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 1 233 023 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **600 17 453.0**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/JP00/08257**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **00 977 879.6**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 01/038392**

(86) PCT-Anmeldetag: **24.11.2000**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **31.05.2001**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **21.08.2002**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **12.01.2005**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **22.12.2005**

(51) Int Cl.⁷: **C07K 14/47**

**C07K 16/18, C12N 15/12, C12N 5/10,
C12P 21/02, A61K 38/16, A61P 19/02,
C12Q 1/68**

(30) Unionspriorität:

33647599 26.11.1999 JP

(73) Patentinhaber:

Takeda Pharmaceutical Co. Ltd., Osaka, JP

(74) Vertreter:

Lederer & Keller, 80538 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

**YOSHIMURA, Koji, Tsukuba-shi, Ibaraki 305-0821,
JP; HIKICHI, Yuichi, Tsukuba-shi, Ibaraki
305-0035, JP; NOGUCHI, Kenichi, Tsukuba-shi,
Ibaraki 305-0051, JP**

(54) Bezeichnung: **TRANSKRIPTIONSFAKTOR UND DESSEN DNA**

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

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

Beschreibung

Gebiet der Erfindung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft einen neuen Transkriptionsfaktor, dessen DNA, einen rekombinanten Vektor, einen Transformanten, ein Verfahren zur Herstellung desselben oder einen Antikörper dagegen oder dessen Verwendung.

Hintergrund und Stand der Technik

[0002] In eukaryotischen Zellen wird die Transkription eines Gens, z.B. das Ausmaß der Transkription, durch Wechselwirkung zwischen Sequenzen (cis-Elementen) auf Chromosomen, wie Promotoren, Enhancern etc. und Transkriptionsfaktoren, die daran binden, reguliert. Ein Promotor ist aus der Kern-(Basis)-Sequenz, die die TA-TA-Box und die Transkriptionsstartstelle aufweist, und der genspezifischen Expressionsregulationsregion aufgebaut. Regulatorische Transkriptionsfaktoren, die an die Expressionsregulationsregion gebunden sind, aktivieren RNA-Polymerase-II-Holoenzyme (Komplexe von RNA-Polymerase II und basalen Transkriptionsfaktoren), um die Gentranskription zu fördern. Die basalen Transkriptionsfaktoren, die an die Kernsequenz gebunden sind, sind an der Transkription vieler Gene beteiligt und nicht spezifisch für Gene.

[0003] Andererseits werden bei regulatorischen Transkriptionsfaktoren, die an die Expressionsregulationsregion gebunden sind, Zellen aktiviert, wenn die Zellen proliferieren oder differenzieren oder auf äußere Reize antworten, wie Hormone, Cytokine etc., so dass die Transkription der gegebenen Gene gefördert wird. Aus diesem Grund werden regulatorische Transkriptionsfaktoren auch genspezifische Transkriptionsfaktoren genannt. Es wird vorhergesagt, dass etwa 30.000 Arten von genspezifischen Transkriptionsfaktoren im Menschen vorhanden sind und es wird erwartet, dass sie zu Wirkstofftargets werden, wie Rezeptoren auf Zelloberflächen (Mol. Med. Today, 358, 1998).

[0004] Menschliches Chondromodulin-I (im Folgenden manchmal abgekürzt als ChM-I) wurde als Faktor zur Förderung der DNA-Synthese von Chondrozyten aus fötalem Epiphysenrinderknorpel gereinigt und geklont von Hiraki et al. (Biochem. Biophys. Res. Commun., 175:371, 1991). Gereinigtes ChM-I förderte die DNA-Synthese von Chondrozyten schwach und die Aktivität wurde in Gegenwart von bFGF potenziert. Es wurde auch gezeigt, dass ChM-I die Proteoglycansynthese fördert. Es zeigte sich klar an der cDNA-Sequenz, dass ChM-I als Vorläufer synthetisiert wurde, der aus 335 Aminosäuren aufgebaut war, und der reife Typ aus den C-terminalen 121 Aminosäuren zusammengesetzt war. Dieses reife ChM-I fiel zusammen mit dem 18-kDa-Glycoprotein, dessen physiologische Funktionen unbekannt sind und das von P.J. Neame et al. (J. Biol. Chem., 265:9628-9633, 1990) aus Knorpel von der Nasenscheidewand des Rinds gereinigt wurde und dessen Teilaminosäuresequenz bestimmt wurde. Es wurde auch durch Northern-Blot-Analyse festgestellt, dass die Expression von Rinder-ChM-I spezifisch für Knorpel war. Anschließend wird berichtet, dass ChM-I eine die Koloniebildung fördernde Aktivität bei Chondrozyten (Biochem. Biophys. Res. Commun., 241:395, 1997), eine Gefäßendothelwachstum hemmende Wirkung (J. Biol. Chem., 272:32419, 1997, FEBS Letters, 415:321, 1997), eine Wachstum fördernde Differenzierung hemmende Wirkung (FEBS Letters, 406:310, 1997) etc besitzt. In Wachstumsplattenknorpel wird ChM-I in der avaskulären proliferierenden Knorpelzone etc. exprimiert. Es wird daher angenommen, dass ChM-I die Knorpelproliferation und Matrixerzeugung fördern kann, die Gefäßinvasion verhindern kann und der Ersatz des Knorpels durch Knochen kontrolliert wird (J. Biol. Chem., 272:32419, 1997). Somit ist ChM-I ein Faktor, um die Differenzierung und Proliferation von Knorpel mit einer antiangiogenen Aktivität zu kontrollieren.

[0005] Während der endochondralen Verknöcherung differenzieren Chondrozyten in dem Wachstumsplattenknorpel weiter in der Reihenfolge von ruhendem Knorpel, proliferierendem Knorpel, hypertrophen Knorpel und dann calcifizierendem Knorpel und, durch Gefäßinvasion, werden Osteoblasten bereitgestellt und diese durch Knochen ersetzt. Weiterhin erscheinen im Verlauf der Heilung einer Knochenfraktur Chondrozyten nach einer entzündlichen Reaktion und der Knochenbruch wird auf ähnlichem Weg wiederhergestellt. Somit ist die Differenzierung und Proliferation von Chondrozyten eindeutig wichtig für das Verfahren der heilenden Osteopathie oder Chondropathie.

[0006] Suzuki et al. klärten die Sequenz des menschlichen ChM-I-Gens auf und beschrieben die Anwendung von menschlichem ChM-I-Protein für Wirkstoffe zur Behandlung von Knochenbrüchen, verschiedenen mit dem Knorpel verbundenen Krankheiten, Tumoren, einschließlich Krebs etc., da Human-ChM-I-Protein eine den Knorpel proliferierende Wirkung und eine Gefäßendothelzellwachstum hemmende Wirkung besitzt (Japanische Offenlegungsschrift Nr. 7-138295). Die kontrollierte Expression des ChM-I-Gens bleibt jedoch unklar und

wurde bisher nicht geklärt.

[0007] Regulatorische Transkriptionsfaktoren regulieren die Aktivität, Expression und Stabilität und ermöglichen es, neue Pharmazeutika zu entwickeln, die nützlich sind zur Verhütung und Behandlung verschiedener Krankheiten, die mit der Aktivität, Expression und Stabilität, verbunden sind, z.B. Gelenkskrankheiten, wie Arthritis deformans, chronischer Gelenkrheumatismus etc., Osteopathie, wie Knochenbruch etc. und Krebs etc. Es war daher wünschenswert im Stand der Technik, einen neuen regulatorischen Transkriptionsfaktor zu finden und eine Methode zur Herstellung desselben in großem Maßstab zu entwickeln.

Offenbarung der Erfindung

[0008] Um die vorhergehenden Probleme zu lösen, haben die vorliegenden Erfinder intensive Studien unternommen und als Ergebnis einen neuen regulatorischen Transkriptionsfaktor gefunden, der an den Promotor des ChM-I-Gens gebunden ist. Auf Basis dieser Erkenntnisse haben die Erfinder weitere Untersuchungen unternommen und die vorliegende Erfindung dadurch vervollständigt.

[0009] Damit liefert die vorliegende Erfindung die folgenden Merkmale.

- (1) Ein Polypeptid, das die Aminosäuresequenz aufweist, die in SEQ ID Nr. 5 dargestellt wird oder eine Aminosäuresequenz mit mindestens 95% Homologie zu der Aminosäuresequenz, die in SEQ ID Nr. 5 dargestellt ist, oder dessen Salz, das an den Promotor des Chondromodulin-I-Gens binden kann, die Transkription des Chondromodulin-I-Gens fördern kann oder die Expression des Typ-II-Collagengens fördern kann.
- (2) Ein Polypeptid, das eine Aminosäuresequenz enthält ausgewählt aus 1) einer Aminosäuresequenz, wie in SEQ ID Nr. 5 dargestellt, bei der 1 bis 5 Aminosäuren deletiert sind; 2) einer Aminosäuresequenz, wie in SEQ ID Nr. 5 dargestellt, der 1 bis 5 Aminosäuren zugefügt sind; 3) einer Aminosäuresequenz, wie in SEQ ID Nr. 5 dargestellt, in die 1 bis 5 Aminosäuren insertiert sind; 4) einer Aminosäuresequenz, wie in SEQ ID Nr. 5 dargestellt, in der 1 bis 5 Aminosäuren durch andere Aminosäuren ersetzt sind und 5) einer Aminosäuresequenz, die eine Kombination der obigen Aminosäuresequenzen aufweist, oder ein Salz davon, das an den Promotor des Chondromodulin-I-Gens binden kann, die Transkription des Chondromodulin-I-Gens fördern kann oder die Expression des Typ-II-Collagengens fördern kann.
- (3) Das Polypeptid oder dessen Salz gemäß (1), wobei die Aminosäuresequenz mit mindestens 95% Homologie zu der Aminosäuresequenz, die in SEQ ID Nr. 5 dargestellt ist, die Aminosäuresequenz ist, die in SEQ ID Nr. 19 dargestellt ist.
- (4) Das Polypeptid oder dessen Salz gemäß (1) oder (2), das die Aminosäuresequenz enthält, die in SEQ ID Nr. 4 gezeigt wird oder eine Aminosäuresequenz mit mindestens 95% Homologie zu der Aminosäuresequenz, die in SEQ ID Nr. 4 dargestellt ist.
- (5) Das Polypeptid oder dessen Salz gemäß (4), wobei die Aminosäuresequenz mit mindestens 95% Homologie zu der Aminosäuresequenz, die in SEQ ID Nr. 4 dargestellt ist, die Aminosäuresequenz ist, die in SEQ ID Nr. 7 dargestellt wird.
- (6) Ein Polypeptid enthaltend eine Aminosäuresequenz, die in SEQ ID Nr. 5, SEQ ID Nr. 4, SEQ ID Nr. 19 oder SEQ ID Nr. 7 dargestellt ist, die an den Promotor des Chondromodulin-I-Gens binden kann, die Transkription des Chondromodulin-I-Gens fördern kann oder die Expression des Typ-II-Collagengens fördern kann.
- (7) Eine DNA, die eine DNA enthält, die eine Basensequenz trägt, die das Polypeptid gemäß (1) oder (2) codiert.
- (8) Ein rekombinanter Faktor, der die DNA gemäß (7) enthält.
- (9) Ein Transformant, der mit dem rekombinanten Vektor gemäß (8) transformiert ist.
- (10) Ein Verfahren zur Herstellung des Polypeptids oder dessen Salzes gemäß (1) oder (2), das beinhaltet, dass der Transformant gemäß (9) gezüchtet wird, um das Polypeptid gemäß (1) oder (2) herzustellen.
- (11) Ein Antikörper gegen das Polypeptid oder dessen Salz gemäß (1) oder (2).
- (12) Ein diagnostisches Mittel mit dem Antikörper gemäß (11).
- (13) Ein Verfahren, um Verbindungen oder deren Salze zu screenen, die die Aktivität des Polypeptids oder dessen Salzes gemäß (1) oder (2) fördern oder hemmen, das beinhaltet, dass das Polypeptid oder dessen Salz gemäß (1) oder (2), die DNA gemäß (7) oder der Transformant gemäß (9) verwendet wird, wobei die Aktivität des Polypeptids oder dessen Salzes gemäß (1) oder (2) die Fähigkeit ist, an den Promotor des Chondromodulin-I-Gens zu binden, die Transkription des Chondromodulin-I-Gens zu fördern oder die Expression des Typ-II-Collagengens zu fördern.
- (14) Ein Kit zum Screenen von Verbindungen oder Salzen, die die Aktivität des Polypeptids oder dessen Salzes gemäß (1) oder (2) fördern oder hemmen, enthaltend das Polypeptid oder dessen Salz gemäß (1) oder (2), die DNA gemäß (7) oder den Transformanten gemäß (9), wobei die Aktivität des Polypeptids oder dessen Salzes gemäß (1) oder (2) die Fähigkeit ist, an den Promotor des Chondromodulin-I-Gens zu bin-

den, die Transkription des Chondromodulin-I-Gens zu fördern oder die Expression von Typ-II-Collagenen zu fördern.

(15) Ein Verfahren zum Screenen von Verbindungen oder ihren Salzen, die die Expression einer DNA, die das Polypeptid gemäß (1) oder (2) codiert, fördern oder hemmen, das beinhaltet, dass eine Zelle gezüchtet wird, die das Polypeptid oder dessen Salz gemäß (1) oder (2) erzeugen kann in Gegenwart einer Testverbindung und die Menge an mRNA, die das Polypeptid gemäß (1) oder (2) codiert, untersucht wird, unter Verwendung einer DNA, die das Polypeptid gemäß (1) oder (2) codiert oder der komplementären DNA dazu oder einer Teil-DNA davon.

Kurzbeschreibung der Zeichnungen

[0010] [Fig. 1](#) zeigt die Basensequenz des Human-ChM-I-Promotors, wobei die oberen und unteren Spalten die Sequenz bezeichnen, die in Beispiel 1 erhalten wurde bzw. die Sequenz, die in der Japanischen Offenlegungsschrift Nr. 7-138295 beschrieben wurde.

[0011] [Fig. 2](#) zeigt eine schematische Ansicht von Plasmid pTB2075.

[0012] [Fig. 3](#) zeigt die DNA-Sequenz und die Aminosäuresequenz des vom Menschen stammenden regulatorischen Transkriptionsfaktors.

[0013] [Fig. 4](#) zeigt die DNA-Sequenz und Aminosäuresequenz des von aus der Maus stammenden regulatorischen Transkriptionsfaktors.

[0014] [Fig. 5](#) zeigt einen Vergleich der Aminosäuresequenz zwischen vom Menschen stammenden regulatorischen Transkriptionsfaktor und von der Maus stammenden regulatorischen Transkriptionsfaktor.

Beste Ausführungsform der Erfindung

[0015] Die erfindungsgemäßen Polypeptide, die die in SEQ ID Nr. 5 gezeigte Aminosäuresequenz enthalten (im Folgenden manchmal als Humanpolypeptide oder menschliche Polypeptide bezeichnet), die Polypeptide, die die Aminosäuresequenz enthalten, die in SEQ ID Nr. 19 gezeigt ist (im Folgenden werden manchmal auch als Mauspolypeptide bezeichnet) und die Polypeptide, die im Wesentlichen die gleiche Aminosäuresequenz enthalten, wie in den menschlichen Polypeptiden (im Folgenden humanartige Polypeptide, mausartige Polypeptide und Polypeptide, die im Wesentlichen die gleichen Aminosäuresequenzen enthalten, wie in dem menschlichen Polypeptid manchmal insgesamt als die Polypeptide der vorliegenden Erfindung bezeichnet), können irgendwelche Polypeptide sein, die aus irgendwelchen Zellen von Menschen und anderen warmblütigen Tieren stammen (z.B. Meerschweinchen, Ratte, Maus, Huhn, Kaninchen, Schwein, Schaf, Rind, Affe etc.), z.B. eine Leberzelle, ein Splenozyt, eine Nervenzelle, Gliazelle, β -Zelle aus der Pankreas, Knochenmarkszelle, Mesangialzelle, Langerhans-Zelle, Epidermiszelle, Epithelzelle, Endothelzelle, Fibroblast, Fibrozyt, Myozyt, Fettzelle, Immunzelle (z.B. Makrophage, T-Zelle, B-Zelle, natürliche Killerzelle, Mastzelle, Neutrophil, Basophil, Eosinophil, Monozyt), Megakaryozyten, Synovialzelle, Chondrozyt, Knochenzelle, Osteoblast, Osteoklast, Brustdrüsenzelle oder interstitielle Zelle etc. oder die entsprechenden Vorläuferzellen, Stammzellen, Krebszellen etc. oder irgendwelche Gewebe, wo solche Zellen vorhanden sind, wie Gehirn oder irgendwelche Gehirnregionen (z.B. Geruchskolben, Nucleus amygdalae, Basalganglion, Hippocampus, Thalamus, Hypothalamus, Hirnrinde, Medula oblongata, Kleinhirn), Rückenmark, Hypophyse, Magen, Pankreas, Niere, Leber, Gonaden, Schilddrüse, Gallenblase, Knochenmark, Nebenniere, Haut, Muskel, Lunge, Gastrointestinaltrakt (z.B. Dickdarm und Dünndarm), Blutgefäße, Herz, Thymus, Milz, Unterkieferdrüse, peripheres Blut, Prostata, Hoden, Eierstock, Plazenta, Gebärmutter, Knochen, Knorpel, Gelenk, Skelettmuskel etc.; die Polypeptide können auch rekombinante Polypeptide oder synthetische Polypeptide sein.

[0016] Die Aminosäuresequenz, die im Wesentlichen die gleiche Aminosäuresequenz aufweist, wie die in SEQ ID Nr. 5 dargestellte Aminosäuresequenz schließt eine Aminosäuresequenz ein mit mindestens etwa 95% Homologie zu der Aminosäuresequenz, die in SEQ ID Nr. 5 dargestellt ist.

[0017] Spezifische Beispiele für die im Wesentlichen gleiche Aminosäuresequenz, wie die in SEQ ID Nr. 5 dargestellte Aminosäuresequenz schließen eine Aminosäuresequenz ein, wie sie z.B. in SEQ ID Nr. 19 dargestellt ist und dgl.

[0018] Spezifische Beispiele für das Polypeptid, das die gleiche Aminosäuresequenz oder im Wesentlichen die gleiche Aminosäuresequenz hat wie die Aminosäuresequenz, die in SEQ ID Nr. 5 gezeigt ist, schließen

Polypeptide ein, die die gleiche oder im Wesentlichen die gleiche Aminosäuresequenz enthalten, wie die Aminosäuresequenz, die z.B. in SEQ ID Nr. 4 dargestellt wird und dgl.

[0019] Die Aminosäuresequenz, die im Wesentlichen die gleiche Aminosäuresequenz hat, wie die Aminosäuresequenz, die in SEQ ID Nr. 4 dargestellt ist, schließt eine Aminosäuresequenz ein mit mindestens etwa 50% Homologie, bevorzugt mindestens etwa 60% Homologie, bevorzugter mindestens etwa 70% Homologie, noch bevorzugter mindestens etwa 80% Homologie, weiterhin noch mehr bevorzugt mindestens etwa 90% Homologie und am meisten bevorzugt mindestens etwa 95% Homologie mit der Aminosäuresequenz, die in SEQ ID Nr. 4 dargestellt ist.

[0020] Spezifische Beispiele für im Wesentlichen die gleiche Aminosäuresequenz, wie die Aminosäuresequenz, die in SEQ ID Nr. 4 gezeigt ist, schließen eine Aminosäuresequenz ein, die z.B. in SEQ ID Nr. 7 gezeigt ist und dgl.

[0021] Bevorzugte Beispiele des Polypeptids, das im Wesentlichen die gleiche Aminosäuresequenz hat, wie die Aminosäuresequenz, die in SEQ ID Nr. 4 dargestellt ist, schließen ein Polypeptid ein mit im Wesentlichen der gleichen Aminosäuresequenz, wie die Aminosäuresequenz, die z.B. in SEQ ID Nr. 4 dargestellt ist und mit einer Aktivität, die im Wesentlichen äquivalent zu der der in SEQ ID Nr. 4 dargestellten Aminosäuresequenz ist. Spezifische Beispiele solcher Polypeptide schließen ein Polypeptid ein mit der in SEQ ID Nr. 7 gezeigten Aminosäuresequenz und dgl.

[0022] Bevorzugte Beispiele des Polypeptids, das im Wesentlichen die gleiche Aminosäuresequenz hat, wie die Aminosäuresequenz, die in SEQ ID Nr. 5 dargestellt ist, schließen ein Polypeptid ein mit im Wesentlichen der gleichen Aminosäuresequenz, wie der Aminosäuresequenz, die z.B. in SEQ ID Nr. 5 dargestellt ist und mit einer Aktivität, die im Wesentlichen äquivalent zu der Aktivität der in SEQ ID Nr. 5 dargestellten Aminosäuresequenz ist. Spezifische Beispiele solcher Polypeptide schließen ein Polypeptid mit der in SEQ ID Nr. 19 gezeigten Aminosäuresequenz ein und dgl.

[0023] Die im Wesentlichen äquivalente Aktivität bezieht sich z.B. auf Aktivitäten als regulatorische Transkriptionsfaktoren etc. Im Wesentlichen äquivalent soll hier bedeuten, dass die Art dieser Aktivitäten qualitativ äquivalent ist. Es ist daher bevorzugt, dass diese Aktivitäten, wie die Bindung an den ChM-I-Genpromotor, die Transkriptionsregulation etc. in ihrer Stärke äquivalent sind (z.B. etwa 0,1- bis etwa 100-fach, bevorzugt etwa 0,5- bis etwa 10-fach, bevorzugter etwa 0,5- bis etwa 2-fach) und sogar Unterschiede in der Art, wie der Stärke dieser Aktivitäten und dem Molekulargewicht des Polypeptids, sind zulässig.

[0024] Genauer schließen die Polypeptide, die im Wesentlichen die gleiche Aminosäuresequenz, wie die in SEQ ID Nr. 4 gezeigte Aminosäuresequenz enthalten, die so genannten Muteine ein, wie Polypeptide, die 1) eine Aminosäuresequenz enthalten, die in SEQ ID Nr. 4 dargestellt wird, von der eine oder mindestens zwei (bevorzugt ungefähr 1 bis 30, bevorzugter ungefähr 1 bis 10 und am meisten bevorzugt mehrere (1 bis 5)) Aminosäuren deletiert sind; 2) eine Aminosäuresequenz, wie in SEQ ID Nr. 4 dargestellt, bei der eine oder mindestens zwei (bevorzugt annähernd 1 bis 30, bevorzugter ungefähr 1 bis 10 und am meisten bevorzugt mehrere (1 bis 5)) Aminosäuren zugefügt sind; 3) eine Aminosäuresequenz, wie in SEQ ID Nr. 4 dargestellt, in die ein oder mindestens zwei (bevorzugt ungefähr 1 bis 30, bevorzugter ungefähr 1 bis 10 und am meisten bevorzugt mehrere (1 bis 5)) Aminosäuren inseriert sind, 4) eine Aminosäuresequenz, wie in SEQ ID Nr. 4 dargestellt, bei der eine oder mindestens zwei (bevorzugt ungefähr 1 bis 30, bevorzugter ungefähr 1 bis 10 und am meisten bevorzugt mehrere (1 bis 5)) Aminosäuren durch andere Aminosäuren substituiert sind und 5) ein Mutein, ein Polypeptid, das eine Kombination der obigen Aminosäuresequenzen aufweist.

[0025] Die Polypeptide, die im Wesentlichen die gleiche Aminosäuresequenz enthalten, wie die in SEQ ID Nr. 5 gezeigte Aminosäuresequenz schließen so genannte Muteine ein, wie Polypeptide, die 1) eine Aminosäuresequenz enthalten, wie in SEQ ID Nr. 5 gezeigt, von der 1 bis 5 Aminosäuren deletiert sind; 2) eine Aminosäuresequenz, wie in SEQ ID Nr. 5 gezeigt, der 1 bis 5 Aminosäuren zugefügt sind; 3) eine Aminosäuresequenz, wie in SEQ ID Nr. 5 gezeigt, in die 1 bis 5 Aminosäuren inseriert sind, 4) eine Aminosäuresequenz, wie in SEQ ID Nr. 5 dargestellt, in der 1 bis 5 Aminosäuren durch andere Aminosäuren substituiert sind und 5) ein Mutein, ein Polypeptid, das eine Kombination der obigen Aminosäuresequenzen aufweist.

[0026] Wenn eine Aminosäuresequenz inseriert, deletiert oder substituiert ist, wie oben beschrieben, sind die Positionen einer solchen Insertion, Deletion oder Substitution nicht besonders beschränkt, schließen aber insbesondere 1) andere Positionen als die Aminosäuresequenzen, die den in SEQ ID Nr. 4 und SEQ ID Nr. 7 dargestellten Aminosäuresequenzen gemeinsam sind; 2) andere Positionen als die Aminosäuresequenzen, die

den in SEQ ID Nr. 4 bzw. SEQ ID Nr. 5 dargestellten Aminosäuresequenzen gemein sind und dgl. ein.

[0027] In der gesamten Beschreibung werden die Polypeptide gemäß dem üblichen Weg zur Beschreibung von Polypeptiden dargestellt, d.h. der N-Terminus (Amino-Ende) links und der C-Terminus (Carboxylende) rechts. Bei den Polypeptiden der vorliegenden Erfindung einschließlich des Polypeptids, das die in SEQ ID Nr. 5 gezeigte Aminosäuresequenz enthält, ist der C-Terminus gewöhnlich in Form einer Carboxylgruppe (-COOH) oder eines Carboxylats (-COO⁻), kann aber in Form eines Amids (-CONH₂) oder eines Esters (-COOR) sein.

[0028] Beispiele der Estergruppe, die durch R gezeigt werden, schließen eine C₁-C₆-Alkylgruppe, wie Methyl, Ethyl, n-Propyl, Isopropyl, n-Butyl etc.; eine C₃-C₈-Cycloalkylgruppe, wie Cyclopentyl, Cyclohexyl etc.; eine C₆-C₁₂-Arylgruppe, wie Phenyl, α-Naphthyl etc.; eine C₇-C₁₄-Aralkylgruppe, wie eine Phenyl-C₁-C₂-Alkylgruppe, z.B. Benzyl, Phenethyl etc.; eine α-Naphthyl-C₁-C₂-Alkylgruppe, wie α-Naphthylmethyl etc. und dgl. ein. Außerdem kann Pivaloyloxymethyl oder dgl., das häufig als Ester für die orale Verabreichung verwendet wird, hier auch verwendet werden.

[0029] Wenn das Polypeptid der vorliegenden Erfindung eine Carboxylgruppe (oder ein Carboxylat) an einer anderen Position als dem C-Terminus enthält, kann es amidiert oder verestert sein und ein solches Amid oder ein solcher Ester ist auch bei den Polypeptiden der vorliegenden Erfindung eingeschlossen. Die Estergruppe kann die gleiche Gruppe sein, wie oben im Hinblick auf das C-Ende beschrieben.

[0030] Weiterhin schließen Beispiele des erfindungsgemäßen Polypeptids Varianten der obigen Polypeptide ein, bei denen die Aminogruppe am N-Terminus (z.B. Methioninrest) des Polypeptids mit einer Schutzgruppe geschützt ist (z.B. eine C₁-C₆-Acylgruppe, wie C₁-C₆-Alkanoylgruppe, z.B. Formylgruppe, Acetylgruppe etc.); solche, bei denen der N-terminale Bereich in vivo abgespalten wird und die so gebildete Glutamygruppe pyroglutaminisiert ist; solche, bei denen ein Substituent (z.B. -OH, -SH, Aminogruppe, Imidazolgruppe, Indolgruppe, Guanidinogruppe etc.) an der Seitenkette einer Aminosäure im Molekül mit einer geeigneten Schutzgruppe geschützt ist (z.B. einer C₁-C₆-Acylgruppe, wie C₁-C₆-Alkanoylgruppe, z.B. Formylgruppe, Acetylgruppe etc.), oder konjugierte Proteine, wie Glycoproteine mit Zuckerketten.

[0031] Die Polypeptide der vorliegenden Erfindung oder Salze davon können in Form von Salzen mit physiologisch annehmbaren Säuren (z.B. anorganischen Säuren oder organischen Säuren) oder Basen (z.B. Alkalimetallsalze) bevorzugt in Form von physiologisch annehmbaren Säureadditionssalzen verwendet werden. Beispiele für solche Salze sind Salze mit anorganischen Säuren (z.B. Salzsäure, Phosphorsäure, Bromwasserstoffsäure, Schwefelsäure), Salze mit organischen Säuren (z.B. Essigsäure, Ameisensäure, Propionsäure, Fumarsäure, Maleinsäure, Bernsteinsäure, Weinsäure, Citronensäure, Äpfelsäure, Oxalsäure, Benzoesäure, Methansulfonsäure, Benzolsulfonsäure) und dgl.

[0032] Das Polypeptid oder die Salze davon können aus Zellen oder Geweben von Menschen oder anderen Warmblütern mit allgemein bekannten Methoden zur Reinigung eines Polypeptids (Proteins) hergestellt werden oder können hergestellt werden, indem ein Transformant, der eine DNA enthält, die das Polypeptid codiert, gezüchtet wird, was später beschrieben wird. Sie können auch hergestellt werden durch Modifikationen der im Folgenden beschriebenen Peptidsynthese.

[0033] Wenn die Polypeptide oder Salze aus menschlichen oder Säugetiergeweben oder Zellen hergestellt werden, werden menschliche oder Säugetiergewebe oder Zellen homogenisiert, dann mit einer Säure oder dgl. extrahiert und der Extrakt wird isoliert und gereinigt durch eine Kombination von Chromatographietechniken, wie Reverse-Phase-Chromatographie, Ionenaustauschchromatographie und dgl.

[0034] Um das erfindungsgemäße Polypeptid, dessen Salze oder Amide zu synthetisieren, können im Handel erhältliche Harze, die für die Polypeptid-(Protein)-Synthese verwendet werden, angewendet werden. Beispiele für solche Harze schließen Chlormethylharz, Hydroxymethylharz, Benzhydrylaminharz, Aminomethylharz, 4-Benzyloxybenzylalkoholharz, 4-Methylbenzylhydrylaminharz, PAM-Harz, 4-Hydroxymethylmethylphenylacetamidomethylharz, Polyacrylamidharz, 4-(2',4'-Dimethoxyphenylhydroxymethyl)phenoxyharz, 4-(2',4'-Dimethoxyphenyl-Fmoc-aminoethyl)phenoxyharz etc. ein. Unter Verwendung dieser Harze werden Aminosäuren, in denen α-Aminogruppen und funktionelle Gruppen an den Seitenketten in geeigneter Weise geschützt sind, auf dem Harz in der Reihenfolge der Sequenz des jeweiligen Polypeptids gemäß verschiedenen Kondensationsmethoden, die allgemein im Stand der Technik bekannt sind, kondensiert. Am Ende der Reaktion wird das Polypeptid von dem Harz abgeschnitten und gleichzeitig werden Schutzgruppen entfernt. Dann wird eine intramolekulare Disulfidbindungen bildende Reaktion in einer hoch verdünnten Lösung durchgeführt, um das jeweilige Polypeptid oder Amid davon zu erhalten.

[0035] Für die Kondensation der oben beschriebenen geschützten Aminosäuren kann eine Vielzahl von aktivierenden Reagenzien für die Polypeptidsynthese verwendet werden, aber Carbodiimide werden besonders bevorzugt angewendet. Beispiele für solche Carbodiimide schließen DCC, N,N'-Diisopropylcarbodiimid, N-Ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid etc. ein. Zur Aktivierung durch diese Reagenzien werden die geschützten Aminosäuren in Kombination mit einem Racemisierungsinhibitor (z.B. HOBt, HOObt) direkt dem Harz zugegeben oder die geschützten Aminosäuren werden vorher in Form von symmetrischen Säureanhydriden, HOBt-Estern oder HOObt-Estern aktiviert und anschließend werden die so aktivierten geschützten Aminosäuren dem Harz zugefügt.

[0036] Lösungsmittel, die zur Verwendung zur Aktivierung der geschützten Aminosäuren oder zum Kondensieren mit dem Harz geeignet sind, können aus Lösungsmitteln ausgewählt werden, die als verwendbar für Polypeptid-(Protein)-Kondensationsreaktionen bekannt sind. Beispiele für solche Lösungsmittel sind Säureamide, wie N,N-Dimethylformamid, N,N-Dimethylacetamid, N-Methylpyrrolidon etc.; halogenierte Kohlenwasserstoffe, wie Methylenchlorid, Chloroform etc.; Alkohole, wie Trifluorethanol etc.; Sulfoxide, wie Dimethylsulfoxid etc.; Ether, wie Pyridin, Dioxan, Tetrahydrofuran etc.; Nitrile, wie Acetonitril, Propionitril etc.; Ester, wie Methylacetat, Ethylacetat etc. und geeignete Mischungen dieser Lösungsmittel. Die Reaktionstemperatur wird in geeigneter Weise ausgewählt aus dem Bereich, von dem bekannt ist, dass er für Polypeptid-(Protein)-Bindungsreaktionen anwendbar ist und wird gewöhnlich ausgewählt aus einem Bereich von ungefähr 20 bis 50°C. Die aktivierten Aminosäurederivate werden allgemein in einem Überschuss von 1,5- bis 4-fach verwendet. Die Kondensation wird überwacht unter Verwendung der Ninhydrinreaktion; wenn die Kondensation ungenügend ist, kann die Kondensation vervollständigt werden, indem die Kondensationsreaktion wiederholt wird ohne Entfernung der Schutzgruppen. Wenn die Kondensation immer noch unzureichend ist sogar nach Wiederholen der Reaktion, werden nicht umgesetzte Aminosäuren mit Essigsäureanhydrid oder Acetylimidazol acetyliert, um mögliche negative Wirkungen auf die nachfolgende Reaktion zu vermeiden.

[0037] Beispiele für Schutzgruppen, die verwendet werden, um die Ausgangsaminogruppen zu schützen, schließen Z, Boc, t-Pentyloxycarbonyl, Isobornyloxycarbonyl, 4-Methoxybenzyloxycarbonyl, Cl-Z, Br-Z, Adamantyloxycarbonyl, Trifluoracetyl, Phthaloyl, Formyl, 2-Nitrophenylsulfenyl, Diphenylphosphinothioyl, Fmoc etc. ein.

[0038] Eine Carboxylgruppe kann z.B. durch Alkylveresterung (in Form von linearen, verzweigten oder cyclischen Alkylestern des Alkylanteils, wie Methyl, Ethyl, Propyl, Butyl, t-Butyl, Cyclopentyl, Cyclohexyl, Cycloheptyl, Cyclooctyl, 2-Adamantyl etc.), Aralkylveresterung (z.B. Veresterung in Form von Benzylester, 4-Nitrobenzylester, 4-Methoxybenzylester, 4-Chlorbenzylester, Benzhydrylester etc.), Phenacylveresterung, Benzyloxycarbonylhydrazidierung, t-Butoxycarbonylhydrazidierung, Tritylhydrazidierung oder dgl. geschützt werden.

[0039] Die Hydroxylgruppe von Serin kann z.B. durch Veresterung oder Veretherung geschützt werden. Beispiele für Gruppen, die in geeigneter Weise für die Veresterung verwendet werden können, schließen eine Niedrig-C₁-C₆-Alkanoylgruppe, wie eine Acetylgruppe, eine Aroylgruppe, wie eine Benzylgruppe, und eine Gruppe, die von Kohlensäure stammt, wie Benzyloxycarbonylgruppe und Ethoxycarbonylgruppe ein. Beispiele für eine Gruppe, die in geeigneter Weise für die Veretherung verwendet werden kann, schließen eine Benzylgruppe, Tetrahydropyranylgruppe, t-Butylgruppe etc. ein.

[0040] Beispiele für Gruppen, um die phenolische Hydroxylgruppe von Tyrosin zu schützen, schließen Bzl, Cl₂-Bzl, 2-Nitrobenzyl, Br-Z, t-Butyl etc. ein.

[0041] Beispiele für Gruppen, die verwendet werden, um den Imidazolteil von Histidin zu schützen, schließen Tos, 4-Methoxy-2,3,6-trimethylbenzolsulfonyl, DNP, Benzyloxymethyl, Bum, Boc, Trt, Fmoc etc. ein.

[0042] Beispiele für die aktivierten Carboxylgruppen in den Ausgangsaminosäuren schließen die entsprechenden Säureanhydride, Azide, aktivierten Ester (Ester mit Alkoholen (z.B. Pentachlorphenol, 2,4,5-Trichlorphenol, 2,4-Dinitrophenol, Cyanomethylalkohol, p-Nitrophenol, HONB, N-Hydroxysuccinimid, N-Hydroxyphthalimid, HOBt)) ein. Als aktivierte Aminosäuren, in denen die Aminogruppen im Ausgangsmaterial aktiviert sind, werden die entsprechenden Phosphoramide angewendet.

[0043] Um die Schutzgruppen zu eliminieren (abzuspalten), werden eine katalytische Reduktion unter Wasserstoffgasfluss in Gegenwart eines Katalysators, wie Pd/Schwarz oder Pd/Ruß; eine Säurebehandlung mit wasserfreiem Fluorwasserstoff, Methansulfonsäure, Trifluormethansulfonsäure oder Trifluoressigsäure, oder einer Mischungslösung dieser Säuren; eine Behandlung mit einer Base, wie Diisopropylethylamin, Triethylamin, Piperidin oder Piperazin und eine Reduktion mit Natrium in flüssigem Ammoniak angewendet. Die Elimi-

nierung der Schutzgruppe durch Säurebehandlung, wie oben beschrieben, wird im Allgemeinen bei einer Temperatur von ungefähr -20 bis 40°C durchgeführt. Bei der Säurebehandlung ist es wirksam, einen Kationenfänger, wie Anisol, Phenol, Thioanisol, m-Kresol, p-Kresol, Dimethylsulfid, 1,4-Butandithiol oder 1,2-Ethandithiol zuzugeben. Weiterhin wird die 2,4-Dinitrophenylgruppe, die als Schutzgruppe für das Imidazol des Histidins bekannt ist, durch Behandlung mit Thiophenol entfernt. Die Formylgruppe, die als Schutzgruppe für das Indol von Tryptophan verwendet wird, wird durch die vorher erwähnte Säurebehandlung in Gegenwart von 1,2-Ethandithiol oder 1,4-Butandithiol verwendet, ebenso wie eine durch eine Behandlung mit Alkali, wie verdünnter Natriumhydroxidlösung und verdünntem Ammoniak entfernt.

[0044] Der Schutz funktioneller Gruppen, die nicht an der Reaktion der Ausgangsmaterialien, Schutzgruppen, Eliminierung der Schutzgruppen und Aktivierung funktioneller Gruppen, die an der Reaktion beteiligt sind, beteiligt sein sollten, kann in geeigneter Weise aus allgemein bekannten Gruppen und allgemein bekannten Mitteln ausgewählt werden.

[0045] Bei einer weiteren Methode, um Amide des Polypeptids zu erhalten, wird z.B. die α -Carboxylgruppe der carboxyterminalen Aminosäure zuerst durch Amidierung geschützt; die Peptid-(Polypeptid)-Kette wird dann von der Seite der Aminogruppe zu einer gewünschten Länge verlängert. Danach werden ein Polypeptid, bei dem nur die Schutzgruppe der N-terminalen α -Aminogruppe in der Peptidkette eliminiert wurde und ein Polypeptid, bei dem nur die Schutzgruppe der C-terminalen Carboxylgruppe eliminiert wurde, hergestellt. Die zwei Polypeptide werden in einer Mischung der oben beschriebenen Lösungsmittel kondensiert. Die Details der Kondensationsreaktion sind die gleichen, wie oben beschrieben. Nachdem das geschützte Polypeptid, das durch Kondensation erhalten wurde, gereinigt wurde, werden alle Schutzgruppen mit der oben beschriebenen Methode eliminiert, was das gewünschte rohe Polypeptid ergibt. Dieses rohe Polypeptid wird mit verschiedenen bekannten Reinigungsmitteln gereinigt. Die Lyophilisierung des Hauptanteils ergibt das Amid des gewünschten Polypeptids oder dessen Amid.

[0046] Um das veresterte Polypeptid herzustellen, wird z.B. die α -Carboxylgruppe der carboxyterminalen Aminosäure mit einem gewünschten Alkohol kondensiert, um den Aminosäureester herzustellen, woran sich ein Verfahren anschließt ähnlich dem zur Herstellung des amidierten Polypeptids oben, was das gewünschte veresterte Polypeptid ergibt.

[0047] Das Polypeptid oder die Salze der vorliegenden Erfindung können hergestellt werden mit allgemein bekannten Methoden für die Peptidsynthese. Für die Methoden zur Peptidsynthese können z.B. entweder Festphasensynthese oder Flüssigphasensynthese verwendet werden. D.h., das Teilpeptid oder die Aminosäuren, die das Teilpeptid der vorliegenden Erfindung aufbauen können, werden mit dem verbleibenden Teil kondensiert. Wenn das Produkt Schutzgruppen enthält, werden diese Schutzgruppen entfernt, so dass das gewünschte Peptid hergestellt werden kann. Allgemein bekannte Methoden zur Kondensation und Eliminierung der Schutzgruppen werden unten in 1) bis 5) beschrieben.

- 1) M. Bodanszky & M.A. Ondetti: Peptide Synthesis, Interscience Publishers, New York (1966)
- 2) Schroeder & Luecke: The Peptide, Academic Press, New York (1965)
- 3) Nobuo Izumiya et al.: Peptide Gosei-no-Kiso to Jikken (Basics and experiments of peptide synthesis), veröffentlicht von Maruzen Co. (1975)
- 4) Haruaki Yajima & Shunpei Sakakibara: Seikagaku Jikken Koza (Biochemical Experiment) 1, Tanpakushitsu no Kagaku (Chemistry of Proteins) IV, 205 (1977)
- 5) Haruaki Yajima Herausgeber: Zoku Iyakuhi no Kaihatsu (A sequel to Development of Pharmaceuticals), Bd. 14, Peptide Synthesis, veröffentlicht von Hirokawa Shoten

[0048] Nach Abschluss der Reaktion kann das Produkt durch eine Kombination üblicher Reinigungsmethoden, wie Lösungsmittelextraktion, Destillation, Säulenchromatographie, Flüssigchromatographie und Umkristallisation gereinigt und isoliert werden, was das Polypeptid der vorliegenden Erfindung ergibt. Wenn das mit den obigen Methoden erhaltene Polypeptid in freier Form ist, kann das Polypeptid in ein geeignetes Salz mit allgemein bekannten Methoden umgewandelt werden; wenn das Polypeptid in einer Salzform erhalten wird, kann es in eine freie Form oder in eine andere Salzform mit allgemein bekannten Methoden umgewandelt werden.

[0049] Die DNA, die das Polypeptid der vorliegenden Erfindung codiert, kann irgendeine DNA sein, solange sie die Basensequenz enthält, die das Polypeptid der vorliegenden Erfindung, wie oben beschrieben, codiert. Eine solche DNA kann eine genomische DNA, cDNA, die aus den oben beschriebenen Zellen oder Geweben stammt, und synthetische DNA sein.

[0050] Der für die Bibliothek zu verwendende Vektor kann irgendein Bakteriophage, Plasmid, Cosmid, Phagemid und dgl. sein. Außerdem kann die DNA direkt durch reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (im Folgenden abgekürzt als RT-PCR) mit der Gesamt-RNA oder der aus den oben beschriebenen Zellen oder Geweben erhaltenen mRNA-Fraktion amplifiziert werden.

[0051] Spezifisch kann die das Polypeptid der vorliegenden Erfindung codierende DNA z.B. eine DNA sein, die die Basensequenz enthält, die in SEQ ID Nr. 18 dargestellt ist, oder irgendeine DNA mit einer Basensequenz, die mit der Basensequenz, die in SEQ ID Nr. 18 dargestellt ist, unter hoch stringenten Bedingungen hybridisierbar ist, mit einer DNA, die ein Polypeptid codiert, das Aktivitäten aufweist, die im Wesentlichen äquivalent denen des Polypeptids der vorliegenden Erfindung sind (z.B. Immunogenizität etc.) und die ein Polypeptid codiert, das Aktivitäten hat, die im Wesentlichen denen des erfindungsgemäßen Polypeptids äquivalent sind.

[0052] Spezifische Beispiele der DNA, die die Basensequenz enthält, die in SEQ ID Nr. 18 dargestellt wird, sind eine DNA, die die Basensequenz enthält, die in SEQ ID Nr. 3 dargestellt ist und dgl.

[0053] Spezifische Beispiele für die DNA, die mit der Basensequenz, die in SEQ ID Nr. 18 dargestellt ist, unter hoch stringenten Bedingungen hybridisierbar ist, schließen eine DNA ein mit mindestens etwa 60% Homologie, bevorzugt mindestens etwa 70% und am meisten bevorzugt mindestens etwa 80% Homologie mit der in SEQ ID Nr. 18 dargestellten Basensequenz.

[0054] Spezifisch schließt die DNA, die mit einer DNA mit der in SEQ ID Nr. 18 dargestellten Basensequenz unter hoch stringenten Bedingungen hybridisierbar ist, eine DNA ein, die die Basensequenz enthält, die in SEQ ID Nr. 18 dargestellt ist, oder eine DNA mit einer Basensequenz, die mit der Basensequenz, die in SEQ ID Nr. 18 dargestellt ist, unter hoch stringenten Bedingungen hybridisierbar ist, mit einer DNA, die ein Polypeptid codiert, das Aktivitäten aufweist, die im Wesentlichen äquivalent denen des erfindungsgemäßen Peptids sind (z.B. eine transkriptionsregulierende Aktivität, Bindung an den ChM-I-Gen-Promotor etc.) und ein Polypeptid codiert, das Aktivitäten aufweist, die im Wesentlichen denen des erfindungsgemäßen Polypeptids äquivalent sind (z.B. DNA, die die Basensequenz enthält, die in SEQ ID Nr. 3, SEQ ID Nr. 6 oder SEQ ID Nr. 20 dargestellt ist).

[0055] Die Hybridisierung kann mit allgemein bekannten Methoden oder einer Modifikation davon durchgeführt werden, z.B. gemäß der Methode, die in Molecular Cloning, 2. Auflage (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) beschrieben wird. Eine im Handel erhältliche Bibliothek kann auch verwendet werden nach den Anleitungen des Herstellers im beigefügten Handbuch. Die Hybridisierung kann bevorzugt unter hoch stringenten Bedingungen durchgeführt werden.

[0056] Die hoch stringenten Bedingungen, die hier verwendet werden, sind z.B. solche mit einer Natriumkonzentration von etwa 19 mM bis etwa 40 mM, bevorzugt etwa 19 mM bis etwa 20 mM bei einer Temperatur von etwa 50 bis etwa 70°C, bevorzugt etwa 60 bis etwa 65°C.

[0057] Genauer kann als DNA, die das Polypeptid mit der in SEQ ID Nr. 4 dargestellten Aminosäuresequenz codiert, DNA angewendet werden mit der Basensequenz mit den Basen 1 bis 1212 in der in SEQ ID Nr. 3 dargestellten Basensequenz etc.; DNA mit der Basensequenz, die in SEQ ID Nr. 18 dargestellt ist, kann als DNA verwendet werden, die das Polypeptid der vorliegenden Erfindung codiert mit der Aminosäuresequenz, die in SEQ ID Nr. 5 dargestellt ist; eine DNA mit der Basensequenz, die in SEQ ID Nr. 18 dargestellt ist, kann als DNA angewendet werden, die das Polypeptid mit der Aminosäuresequenz, die in SEQ ID Nr. 5 dargestellt ist, codiert; eine DNA mit den Basen 364 bis 1887 der Basensequenz, die in SEQ ID Nr. 6 dargestellt ist, kann als DNA verwendet werden, die das Polypeptid der vorliegenden Erfindung codiert mit der Aminosäuresequenz, die in SEQ ID Nr. 7 dargestellt ist, und als DNA, die das Polypeptid der vorliegenden Erfindung mit der in SEQ ID Nr. 19 dargestellten Aminosäuresequenz codiert, kann eine DNA angewendet werden mit der Basensequenz, die in SEQ ID Nr. 20 dargestellt ist und dgl.

[0058] Für die Klonierung der DNA, die das Polypeptid der vorliegenden Erfindung vollständig codiert, kann die DNA entweder mit der allgemein bekannten PCR unter Verwendung synthetischer DNA-Primer, die einen Teil der Basensequenz einer DNA, die das erfindungsgemäße Polypeptid codiert, amplifiziert werden oder die in einem geeigneten Vektor insertierte DNA kann durch Hybridisierung mit einem markierten DNA-Fragment oder synthetischer DNA, die einen Teil oder die gesamte Region des erfindungsgemäßen Polypeptids codiert, selektiert werden. Die Hybridisierung kann z.B. gemäß der in Molecular Cloning, 2. Auflage (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) beschriebenen Methode, durchgeführt werden. Die Hybridi-

sierung kann auch unter Verwendung einer im Handel erhältlichen Bibliothek gemäß dem in den beigefügten Anleitungen beschriebenen Protokoll durchgeführt werden.

[0059] Die Umwandlung der Basensequenz der DNA kann bewirkt werden mit allgemein bekannten Methoden, wie der ODA-LA-PCR-Methode, der Gapped-Duplex-Methode oder der Kunkel-Methode oder einer Modifikation unter Verwendung eines allgemein bekannten Kits, der als MutanTM-Super Express KM oder MutanTM-K erhältlich ist (beide von Takara Shuzo Co., Ltd.) Die klonierte DNA, die das Polypeptid codiert, kann so, wie sie ist, verwendet werden abhängig von ihrem Zweck oder, falls erwünscht, nach Verdau mit einem Restriktionsenzym oder nach Addition eines Linkers. Die DNA kann ATG als Translationsstartcodon am 5'-Ende enthalten und TAA, TGA oder TAG als Translationsterminationscodon am 3'-Ende. Diese Translationsstart- und Terminationscodons können auch zugefügt werden unter Verwendung eines geeigneten synthetischen DNA-Adapters.

[0060] Der Expressionsvektor des Polypeptids der vorliegenden Erfindung kann z.B. hergestellt werden, indem (a) das gewünschte DNA-Fragment aus der DNA, die das erfindungsgemäße Polypeptid codiert, ausgeschnitten wird, (b) und dann das DNA-Fragment mit einem geeigneten Expressionsvektor stromabwärts eines Promotors in den Vektor ligiert wird.

[0061] Beispiele für den Vektor schließen Plasmide ein, die aus E. coli stammen (z.B. pBR322, pBR325, pUC12, pUC13), Plasmide, die aus Bacillus subtilis stammen (z.B. pUB110, pTP5, pC194), Plasmide, die aus Hefe stammen (z.B. pSH19, pSH15), Bakteriophagen, wie λ -Phage etc., Tierviren, wie Retrovirus, Vaccinia-Virus, Baculo-Virus etc. ebenso wie pA1 bis 11, pXT1, pRc/CMV, pRc/RSV, pcDNAI/Neo etc.

[0062] Der in der vorliegenden Erfindung verwendete Promotor kann irgendein Promotor sein, solange er gut zu dem für die Genexpression zu verwendenden Wirt passt. In dem Fall, in dem Tierzellen als Wirt verwendet werden, schließen Beispiele des Promotors SR α -Promotor, SV40-Promotor, LTR-Promotor, CMV-Promotor, HSV-TK-Promotor, β -Actin etc. ein.

[0063] Von diesen werden CMV-(Cytomegalovirus)-Promotor oder SR α -Promotor bevorzugt verwendet. Wenn als Wirt Bakterien der Gattung Escherichia verwendet werden, schließen bevorzugte Beispiele des Promotors trp-Promotor, lac-Promotor, recA-Promotor, λ P_L-Promotor, lpp-Promotor, T7-Promotor etc. ein. In dem Fall, in dem Bakterien der Gattung Bacillus als Wirt verwendet werden, sind bevorzugte Beispiele des Promotors SPO1-Promotor, SPO2-Promotor, penP-Promotor etc. Wenn Hefe als Wirt verwendet wird, sind bevorzugte Beispiele des Promotors PHO5-Promotor, PGK-Promotor, GAP-Promotor, ADH-Promotor etc. Wenn Insektenzellen als Wirt verwendet werden, schließen bevorzugte Beispiele des Promotors Polyhedrin-Promotor, P10-Promotor etc. ein.

[0064] Zusätzlich zu den vorhergehenden Beispielen kann der Expressionsvektor weiterhin gegebenenfalls einen Enhancer, ein Spleiß-Signal, ein Poly-A-Additionssignal, einen Selektionsmarker, einen SV40-Replikationsursprung (im Folgenden manchmal abgekürzt als SV40ori) etc. enthalten. Beispiele für den Selektionsmarker schließen Dihydrofolatreduktase-(im Folgenden manchmal abgekürzt als dhfr)-Gen [Methotrexat(MTX)-Resistenz], Ampicillinresistenzgen (im Folgenden manchmal als Amp^r abgekürzt), Neomycinresistenzgen (im Folgenden manchmal abgekürzt als Neo^r, Geneticinresistenz) etc. ein. Insbesondere dann, wenn das dhfr-Gen als Selektionsmarker verwendet wird, können durch Verwendung von dhfr-Gen-defizienten Zellen vom Chinesischen Hamster Rekombinanten auf thymindefreien Medien selektiert werden.

[0065] Falls notwendig, wird eine Signalsequenz, die zu dem Wirt passt, dem N-Terminus des Polypeptids der vorliegenden Erfindung zugefügt. Beispiele für die Signalsequenz, die verwendet werden kann, sind PhoA-Signalsequenz, OmpA-Signalsequenz etc., falls Bakterien der Gattung Escherichia als Wirt verwendet werden; α -Amylasesignalsequenz, Subtilisinsignalsequenz etc., falls Bakterien der Gattung Bacillus als Wirt verwendet werden; MF α -Signalsequenz, SUC2-Signalsequenz etc., falls Hefe als Wirt verwendet wird und Insulinsignalsequenz, α -Interferonsignalsequenz, Antikörpermolekülsignalsequenz etc., falls Tierzellen als Wirt verwendet werden.

[0066] Unter Verwendung des so konstruierten Vektors, der die das Polypeptid der vorliegenden Erfindung codierende DNA aufweist, können Transformanten hergestellt werden.

[0067] Als Wirt können z.B. Bakterien, die zur Gattung Escherichia gehören, Bakterien, die zur Gattung Bacillus gehören, Hefen, Insektenzellen, Insekten, Tierzellen und dgl. verwendet werden.

[0068] Spezifische Beispiele für Bakterien, die zur Gattung *Escherichia* gehören, schließen *Escherichia coli* K12 DH1 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 60, 160 (1968)], JM103 [Nucleic Acids Research, 9, 309 (1981)], JA221 [Journal of Molecular Biology, 120, 517 (1978)], HB101 [Journal of Molecular Biology, 41, 459 (1969)], C600 [Genetics, 39, 440 (1954)] etc. ein.

[0069] Beispiele für Bakterien, die zur Gattung *Bacillus* gehören, schließen *Bacillus subtilis* MI114 [(Gene, 24, 255 (1983)), 207-21 [Journal of Biochemistry, 95, 87 (1984)]] etc. ein.

[0070] Beispiele für Hefen schließen *Saccharomyces Cerevisiae* AH22, AH22R⁻, NA87-11A, DKD-5D, 20B-12, *Schizosaccharomyces pombe* NCYC1913, NCYC2036, *Pichia pastoris* KM71 etc. ein.

[0071] Beispiele für Insektenzellen schließen für den Virus AcNPV, *Spodoptera-frugiperda*-Zellen (Sf-Zellen), MG1-Zellen, die vom mittleren Intestinum von *Trichoplusia ni* stammen, High FiveTM-Zellen, die aus Eiern von *Trichoplusia ni* stammen, Zellen, die aus *Mamestra brassicae* stammen, Zellen, die aus *Estigmene acrea* stammen, etc. ein und für den Virus BmNPV werden *Bombyx mori*-N-Zellen (BmN-Zelle) etc. verwendet. Beispiele für die Sf-Zelle, die verwendet werden kann, sind Sf9-Zelle (ATCC CRL1711) und Sf21-Zelle (beide Zellen werden von J.L. Vaughn et al., In Vivo, 13, 213-217 (1977)) beschrieben.

[0072] Als Insekten können z.B. Larven von *Bombyx mori* verwendet werden [Maeda et al., Nature, 315, 592 (1985)].

[0073] Beispiele für Tierzellen schließen die Affenzelle COS-7, Vero, die Chinesische-Hamsterzelle CHO (im Folgenden als CHO-Zelle bezeichnet), dhfr-gendefiziente Chinesische-Hamsterzellen CHO (im Folgenden einfach als CHO(dhfr⁻)-Zellen bezeichnet), Maus-L-Zellen, Maus-AtT-20, Mausmyelomzellen, Ratten-GH3, Human-FL-Zellen etc. ein.

[0074] Bakterien, die zur Gattung *Escherichia* gehören, können z.B. mit der in Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2110 (1972), Gene 17, 107 (1982) etc. beschriebenen Methode transformiert werden.

[0075] Bakterien, die zur Gattung *Bacillus* gehören, können z.B. mit der in Molecular & General Genetics, 168, 111 (1979) beschriebenen Methode etc. transformiert werden.

[0076] Hefen können z.B. mit der in Methods in Enzymology, 194, 182-187 (1991), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929 (1978) etc. beschriebenen Methode transformiert werden.

[0077] Insektenzellen oder Insekten können z.B. gemäß der in Bio/Technology, 6, 47-55 (1988) etc. beschriebenen Methode transformiert werden.

[0078] Tierzellen können z.B. mit der in Saibo Kogaku (Cell Engineering), Extraausgabe 8, Shin Saibo Kogaku Jikken Protocol (New Cell Engineering Experimental Protocol), 263-267 (1995), veröffentlicht von Shujunsha, oder Virology, 52, 456 (1973) beschriebenen Methode transformiert werden.

[0079] Somit kann der Transformant, der mit dem Expressionsvektor transformiert ist, der die DNA enthält, die das Polypeptid codiert, erhalten werden.

[0080] Wenn der Wirt Bakterienzellen sind, die zur Gattung *Escherichia* oder zur Gattung *Bacillus* gehören, können die Transformanten in geeigneter Weise in einem flüssigen Medium kultiviert werden, das Materialien enthält, die für das Wachstum des Transformanten erforderlich sind, wie Kohlenstoffquellen, Stickstoffquellen, anorganische Materialien etc. Beispiele für Kohlenstoffquellen schließen Glucose, Dextrin, lösliche Stärke, Saccharose etc. ein. Beispiele für Stickstoffquellen schließen anorganische oder organische Materialien, wie Ammoniumsalze, Nitratsalze, Maiseinweichwasser, Pepton, Casein, Fleischextrakt, Sojakuchen, Kartoffelextrakt etc. ein. Beispiele für anorganische Materialien sind Calciumchlorid, Natriumdihydrogenphosphat, Magnesiumchlorid etc. Außerdem können zusätzlich Hefe, Vitamine wachstumsfördernde Faktoren etc. dem Medium zugefügt werden. Bevorzugt wird der pH-Wert des Mediums auf etwa 5 bis etwa 8 eingestellt.

[0081] Ein bevorzugtes Beispiel des Mediums für das Kultivieren von Bakterien, die zur Gattung *Escherichia* gehören, ist M9-Medium, das mit Glucose und Casaminoäuren ergänzt ist [Miller, Journal of Experiments in Molecular Genetics, 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1972]. Falls notwendig, kann eine Chemikalie, wie 3 β -Indolylacrylsäure dem Medium zugefügt werden, wodurch der Promotor wirksam aktiviert wird.

[0082] Wenn die Bakterien, die zur Gattung *Escherichia* gehören, als Wirt verwendet werden, wird der Transformant gewöhnlich bei etwa 15 bis etwa 43°C etwa 3 bis etwa 24 Stunden lang kultiviert. Falls notwendig und erwünscht, kann die Kultur belüftet oder bewegt werden.

[0083] Wenn die Bakterien, die zur Gattung *Bacillus* gehören, als Wirt verwendet werden, wird der Transformant im Allgemeinen bei etwa 30 bis etwa 40°C etwa 6 bis etwa 24 Stunden lang kultiviert. Falls notwendig, kann die Kultur belüftet oder bewegt werden.

[0084] Wenn Hefe als Wirt verwendet wird, wird der Transformant z.B. in Burkholder's Minimalmedium [K.L. Bostian et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 4505 (1980)] oder in SD-Medium, das mit 0,5% Casamino-säuren ergänzt ist [G.A. Bitter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 5330 (1984)] kultiviert. Bevorzugt wird der pH-Wert des Mediums auf etwa 5 bis etwa 8 eingestellt. Allgemein wird der Transformant bei etwa 20 bis etwa 35°C etwa 24 bis etwa 72 Stunden lang kultiviert. Falls notwendig und erwünscht, kann die Kultur belüftet oder bewegt werden.

[0085] Wenn Insektenzellen oder Insekten als Wirt verwendet werden, wird der Transformant z.B. in Grace-Insektenmedium (T.C.C. Grace, Nature, 195, 788 (1962)), dem ein geeignetes Additiv, wie immobilisiertes 10% Rinderserum zugefügt wurde, kultiviert. Bevorzugt wird der pH-Wert des Mediums auf etwa 6,2 bis etwa 6,4 eingestellt. Normalerweise wird der Transformant bei etwa 27°C etwa 3 Tage bis etwa 5 Tage lang kultiviert und falls notwendig, kann die Kultur belüftet oder bewegt werden.

[0086] Wenn Tierzellen als Wirt verwendet werden, wird der Transformant z.B. in MEM-Medium, das etwa 5 bis etwa 20% fötales Rinderserum enthält [Science, 122, 501 (1952)], DMEM-Medium [Virology, 8, 396 (1959)], RPMI-1640-Medium [The Journal of the American Medical Association, 199, 519 (1967)], 199-Medium [Proceeding of the Society for the Biological Medicine, 73, 1 (1950)] etc. kultiviert. Bevorzugt wird der pH-Wert des Mediums auf etwa 6 bis etwa 8 eingestellt. Der Transformant wird gewöhnlich bei etwa 30 bis etwa 40°C etwa 15 bis etwa 60 Stunden lang kultiviert und, falls notwendig, kann die Kultur belüftet oder bewegt werden.

[0087] Wie oben beschrieben, kann das Polypeptid der vorliegenden Erfindung in der Zellmembran des Transformanten etc. erzeugt werden.

[0088] Das erfindungsgemäße Polypeptid kann von der oben beschriebenen Kultur mit den folgenden Verfahren abgetrennt und gereinigt werden.

[0089] Wenn das Polypeptid der vorliegenden Erfindung aus der Kultur oder den Zellen extrahiert wird, wird nach der Kultivierung der Transformant oder die Zelle mit einer allgemein bekannten Methode gesammelt und in einem geeigneten Puffer suspendiert. Der Transformant oder die Zelle wird dann mit allgemein bekannten Methoden, wie Ultraschall, einer Behandlung mit Lysozym und/oder Einfrier-Auftau-Zyklen und anschließende Zentrifugation, Filtration etc. aufgerissen. Der rohe Extrakt des Polypeptids oder des Teilpeptids der vorliegenden Erfindung kann so erhalten werden. Der für die Verfahren verwendete Puffer kann einen Proteinmodifikator, wie Harnstoff oder Guanidinhydrochlorid, oder ein Tensid, wie Triton X-100™ etc. enthalten. Wenn das Polypeptid oder Teilpeptid der vorliegenden Erfindung in die Kulturbrühe ausgeschieden wird, kann nach Abschluss der Kultivierung der Überstand von dem Transformanten oder der Zelle mit einer allgemein bekannten Methode abgetrennt werden, um den Überstand zu sammeln.

[0090] Der Überstand oder das in dem Extrakt enthaltene Polypeptid, das so erhalten wird, kann gereinigt werden, indem in geeigneter Weise die allgemein bekannten Methoden für die Abtrennung und Reinigung kombiniert werden. Solche allgemein bekannten Methoden zur Abtrennung und Reinigung schließen eine Methode unter Verwendung einer Differenz in der Löslichkeit, wie Aussalzen, Lösungsmittelausfällung etc.; eine Methode, bei der hauptsächlich der Unterschied im Molekulargewicht ausgenutzt wird, wie Dialyse, Ultrafiltration, Gelfiltration, SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese etc.; eine Methode, bei der der Unterschied in der elektrischen Ladung ausgenutzt wird, wie Ionenaustauschchromatographie etc.; eine Methode, bei der der Unterschied in der spezifischen Affinität ausgenutzt wird, wie Affinitätschromatographie etc.; eine Methode, bei der der Unterschied in der Hydrophobizität ausgenutzt wird, wie Reverse-Phase-Hochleistungsflüssigchromatographie etc.; eine Methode, bei der der Unterschied im isoelektrischen Punkt ausgenutzt wird, wie isoelektrofokussierende Elektrophorese und dgl. ein.

[0091] Wenn das so erhaltene Polypeptid in freier Form ist, kann es in das Salz mit allgemein bekannten Methoden oder Modifikationen davon umgewandelt werden. Wenn andererseits das Polypeptid in Form eines Salzes erhalten wird, kann es in die freie Form oder in die Form eines anderen Salzes umgewandelt werden mit

allgemein bekannten Methoden oder Modifikationen davon.

[0092] Das von dem Rekombinanten erzeugte Polypeptid kann vor oder nach der Reinigung mit einem geeigneten Protein modifizierenden Enzym oder einer Proteinase behandelt werden, so dass das Polypeptid in geeigneter Weise modifiziert werden kann, um einen Teil des Polypeptids zu entfernen. Beispiele dieser Enzyme schließen Trypsin, Chymotrypsin, Arginylendopeptidase, Proteinkinase, Glycosidase und dgl. ein.

[0093] Die Aktivität des so erzeugten Polypeptids der vorliegenden Erfindung oder von Salzen davon kann mit einem Enzymimmunoassay unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers, mit Western-Blot-Analyse etc. bestimmt werden.

[0094] Antikörper für das Polypeptid der vorliegenden Erfindung oder Salze davon können irgendwelche polyklonalen Antikörper und monoklonalen Antikörper sein, solange sie fähig sind, das Polypeptid der vorliegenden Erfindung oder Salze davon zu erkennen.

[0095] Die Antikörper für das erfindungsgemäße Polypeptid oder Salze davon können mit allgemein bekannten Methoden zur Herstellung von Antikörpern oder Antiseren hergestellt werden unter Verwendung des Polypeptids der vorliegenden Erfindung als Antigene.

Herstellung von monoklonalen Antikörpern

(a) Herstellung von monoklonale Antikörper produzierenden Zellen

[0096] Das Polypeptid der vorliegenden Erfindung oder ein Salz davon wird warmblütigen Tieren entweder allein oder zusammen mit Trägern oder Verdünnungsmitteln an der Stelle verabreicht, wo die Produktion von Antikörper möglich ist durch die Verabreichung. Um die Antikörperproduktivität bei Verabreichung zu potenzieren, kann komplettes Freund's Adjuvans oder inkomplettes Freund's Adjuvans verabreicht werden. Die Verabreichung wird gewöhnlich einmal alle 2 bis 6 Wochen und zwei- bis zehnmal insgesamt durchgeführt. Beispiele für anwendbare warmblütige Tiere sind Affen, Kaninchen, Hunde, Meerschweinchen, Mäuse, Ratten, Schafe, Ziegen und Hühner, wobei die Verwendung von Mäusen und Ratten bevorzugt ist.

[0097] Bei der Herstellung von monoklonale Antikörper produzierenden Zellen wird ein warmblütiges Tier, z.B. eine Maus, die mit einem Antigen immunisiert wurde, wobei der Antikörpertiter festgestellt wird, ausgewählt, dann werden Milz oder Lymphknoten 2 bis 5 Tage nach der letzten Immunisierung gesammelt und darin enthaltene Antikörper produzierende Zellen werden mit Myelomzellen von homozygoten oder heterozygoten Tieren fusioniert, was monoklonale Antikörper erzeugende Hybridoma ergibt. Die Messung des Antikörpertiters in Antiseren kann z.B. ausgeführt werden, indem ein markiertes Polypeptid, das später beschrieben wird, mit dem Antiserum umgesetzt wird und anschließend die Bindungsaktivität des Markierungsmittels, das an den Antikörper gebunden ist, getestet wird. Die Fusion kann z.B. mit der bekannten Methode von Koehler und Milstein [Nature, 256, 495 (1975)] durchgeführt werden. Beispiele für den Fusionspromotor sind Polyethylenglycol (PEG), Sendai-Virus etc., wovon PEG bevorzugt angewendet wird.

[0098] Beispiele für Myelomzellen sind solche, die von warmblütigen Tieren gesammelt werden, wie NS-1, P3U1, SB2/0, AP-1 etc. P3U1 wird besonders bevorzugt angewendet. Ein bevorzugtes Verhältnis der Zahl der Antikörper produzierenden Zellen, die verwendet werden (Milzzellen) zu der Zahl der Myelomzellen liegt in einem Bereich von ungefähr 1:1 bis 20:1. Wenn PEG (bevorzugt PEG 1000 bis PEG 6000) in einer Konzentration von ungefähr 10 bis 80% zugefügt wird und anschließend bei 20 bis 40°C gezüchtet wird, bevorzugt 1 bis 10 Minuten lang bei 30 bis 37°C, kann eine effiziente Zellfusion durchgeführt werden.

[0099] Verschiedene Methoden können für das Screenen von monoklonale Antikörper erzeugenden Hybridomas verwendet werden. Beispiele für solche Methoden schließen eine Methode ein, die beinhaltet, dass der Überstand der Hybridoma einer Festphase (z.B. Mikroplatte), an der das Polypeptid als Antigen direkt oder zusammen mit einem Träger adsorbiert ist, zugegeben wird, Antiimmunglobulin-Antikörper (wenn Mauszellen für die Zellfusion verwendet werden, wird Antimaus-Immunglobulin-Antikörper verwendet), die mit einer radioaktiven Substanz oder einem Enzym oder Protein A markiert sind, zugegeben werden und monoklonale Antikörper, die an die Festphase gebunden sind, nachgewiesen werden, und eine Methode, die beinhaltet, dass der Überstand von Hybridoma einer Festphase zugegeben wird, an der Antiimmunglobulin-Antikörper oder Protein A adsorbiert ist, das Polypeptid, das mit einer radioaktiven Substanz oder einem Enzym markiert ist, zugegeben wird und monoklonaler Antikörper, der an die Festphase gebunden ist, nachgewiesen wird.

[0100] Der monoklonale Antikörper kann nach allgemein bekannten Methoden oder Modifikationen davon ausgewählt werden. Im Allgemeinen kann die Selektion in einem Medium für Tierzellen bewirkt werden, das mit HAT (Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin) ergänzt ist. Jede Selektion und jedes Wachstumsmedium kann angewendet werden, solange die Hybridoma darin wachsen können. Z.B. kann RPMI-1640-Medium, das 1 bis 20%, bevorzugt 10 bis 20% fötales Rinderserum enthält, GIT-Medium (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), das 1 bis 10% fötales Rinderserum enthält, serumfreies Medium zur Kultivierung von Hybridoma (SFM-101, Nissui Seiyaku Co., Ltd.) und dgl. für die Selektion und als Wachstumsmedium verwendet werden. Die Kultivierung wird im Allgemeinen bei 20 bis 40°C, bevorzugt 37°C etwa 5 Tage bis etwa 3 Wochen lang, bevorzugt 1 bis 2 Wochen lang durchgeführt, normalerweise in 5% CO₂. Der Antikörpertiter des Kulturüberstands eines Hybridoma kann bestimmt werden, wie bei dem Test auf Antikörpertiter in Antiseren, wie oben beschrieben.

(b) Reinigung der monoklonalen Antikörper

[0101] Abtrennung und Reinigung eines monoklonalen Antikörpers kann ausgeführt werden mit allgemein bekannten Methoden, z.B. Abtrennung und Reinigung von Immunglobulinen [z.B. Aussalzen, Alkoholfällung, Ausfällung am isoelektrischen Punkt, Elektrophorese, Adsorption und Desorption mit Ionenaustauschern (z.B. DEAE), Ultrazentrifugation, Gelfiltration oder einer spezifischen Reinigungsmethode, die beinhaltet, dass nur ein Antikörper mit einem aktivierten Adsorbens, wie einer Antigen bindenden Festphase, Protein A oder Protein G gesammelt wird und die Bindung dissoziiert wird, um den Antikörper zu erhalten].

Herstellung von polyklonalen Antikörpern

[0102] Die polyklonalen Antikörper der vorliegenden Erfindung können mit allgemein bekannten Methoden oder mit Modifikationen davon hergestellt werden. Z.B. wird ein warmblütiges Tier mit einem Immunogen (Polypeptidantigen) an sich oder einem Komplex aus Immunogen und einem Trägerprotein immunisiert und ein warmblütiges Tier wird mit dem Komplex auf gleiche Weise immunisiert, wie oben für die Herstellung von monoklonalen Antikörpern beschrieben. Das Produkt, das den Antikörper für das Polypeptid der vorliegenden Erfindung enthält, wird aus dem immunisierten Tier gesammelt und anschließend der Antikörper abgetrennt und gereinigt.

[0103] In dem Komplex aus Immunogen und Trägerprotein, der verwendet wird, um das warmblütige Tier zu immunisieren, kann die Art des Trägerproteins und das Mischverhältnis von Träger zu Hapten irgendeine Art und irgendein Verhältnis sein, solange der Antikörper wirksam gegen das Hapten erzeugt wird, mit dem immunisiert wurde durch Vernetzen mit dem Träger. Z.B. wird Rinderserumalbumin, Rinderthroglobulin oder Hämocyanin an das Hapten gekuppelt in einem Gewichtsverhältnis von Träger zu Hapten von ungefähr 0,1 bis 20, bevorzugt etwa 1 bis etwa 5.

[0104] Eine Mehrzahl von Kondensationsmitteln kann für das Kuppeln von Träger an Hapten verwendet werden. Glutaraldehyd, Carbodiimid, mit Maleimid aktivierter Ester und aktivierte Esterreagenzien, die eine Thiogruppe oder Dithiopyridylgruppe enthalten, werden für die Kupplung verwendet.

[0105] Das Kondensationsprodukt wird an Warmblüter entweder allein oder zusammen mit Trägern oder Verdünnungsmitteln an der Stelle verabreicht, die den Antikörper bei Verabreichung produzieren kann. Um die Antikörperproduktivität bei Verabreichung zu potenzieren, kann komplettes Freund's Adjuvans oder inkomplettes Freund's Adjuvans verabreicht werden. Die Verabreichung erfolgt gewöhnlich alle 2 bis 6 Wochen und insgesamt 3 bis 10 mal.

[0106] Der polyklonale Antikörper kann aus Blut, Ascites etc. gewonnen werden, bevorzugt aus dem Blut warmblütiger Tiere, die mit der oben beschriebenen Methode immunisiert wurden.

[0107] Der Titer an polyklonalen Antikörpern im Antiserum kann mit dem gleichen Verfahren, wie dem zur Bestimmung von Serum Antikörpertiter, das oben beschrieben wurde, getestet werden. Die Abtrennung und Reinigung der polyklonalen Antikörper kann erfolgen wie bei der Methode zur Abtrennung und Reinigung von Immunglobulinen, die durchgeführt wird wie bei der Abtrennung und Reinigung von monoklonalen Antikörpern, die oben beschrieben wurde.

[0108] Die Antisense-DNA mit einer komplementären und im wesentlichen komplementären Basensequenz zu der DNA, die das Polypeptid der vorliegenden Erfindung codiert (im Folgenden manchmal als DNA der vorliegenden Erfindung bezeichnet) kann irgendeine Antisense-DNA sein, solange sie eine Basensequenz be-

sitzt, die komplementär oder im wesentlichen komplementär ist zu der DNA der vorliegenden Erfindung und die Expression der DNA unterdrücken kann.

[0109] Die Basensequenz, die im Wesentlichen komplementär zur DNA der vorliegenden Erfindung ist, kann z.B. eine Basensequenz sein mit mindestens etwa 70% Homologie, bevorzugt mindestens etwa 80% Homologie, bevorzugter mindestens etwa 90% Homologie und am meisten bevorzugt mindestens etwa 95% Homologie zu der Basensequenz voller Länge oder Teilbasensequenz der Basensequenz, die komplementär zu der DNA der vorliegenden Erfindung ist (d.h. der komplementäre Strang zu der DNA der vorliegenden Erfindung). Insbesondere ist bei der gesamten Basensequenz des komplementären Strangs der DNA der vorliegenden Erfindung eine Antisense-DNA mit mindestens etwa 70% Homologie, bevorzugt mindestens etwa 80% Homologie, bevorzugter mindestens etwa 90% Homologie und am meisten bevorzugt mindestens etwa 95% Homologie zu dem komplementären Strang der Basensequenz, die den N-terminalen Bereich des Polypeptids der vorliegenden Erfindung codiert, bevorzugt. Diese Antisense-DNAs können synthetisiert werden unter Verwendung von wohl bekannten DNA-Syntheseautomaten etc.

[0110] Im Folgenden wird der Nutzen des Polypeptids der vorliegenden Erfindung oder von Salzen davon (im Folgenden manchmal als Polypeptid der vorliegenden Erfindung bezeichnet); der DNA, die das Polypeptid der vorliegenden Erfindung codiert (im Folgenden manchmal als DNA der vorliegenden Erfindung bezeichnet), des Transformanten, der mit einem rekombinanten Vektor transformiert ist, der die DNA enthält, die das Polypeptid der vorliegenden Erfindung codiert (im Folgenden manchmal als Transformant der vorliegenden Erfindung bezeichnet), der Antikörper für das Polypeptid der vorliegenden Erfindung oder Salze davon (im Folgenden manchmal als Antikörper der vorliegenden Erfindung bezeichnet) und der Antisense-DNA beschrieben.

(1) Therapeutisches/prophylaktisches Mittel für Krankheiten, mit denen das Polypeptid der vorliegenden Erfindung verbunden ist

[0111] Das Polypeptid der vorliegenden Erfindung bindet an Promotoren des ChM-I-Gens, um die Transkription des Gens zu fördern und die Expression von Typ-II-Collagenen oder des Gens für Collagen vom Typ II zu fördern. Somit ist es wahrscheinlich, dass irgendeine Anomalität oder irgendein Mangel in der DNA, die das Polypeptid der vorliegenden Erfindung codiert, eine Vielzahl von Krankheiten verursachen kann, wie chronische Rheumatoidarthritis bzw. Polyarthrit, Arthrosis deformans, Osteoporose, Knochenbrüche, Krebs etc.

[0112] Daher kann das Polypeptid der vorliegenden Erfindung als Pharmazeutikum für die Behandlung/Verhütung verschiedener Krankheiten verwendet werden, z.B. von chronischer Polyarthrit oder Rheumatoidarthritis, Arthrosis deformans, Osteoporose, Knochenbrüchen, Krebs etc.

[0113] Wenn ein Patient einen verminderten Pegel des Polypeptids der vorliegenden Erfindung in vivo hat, oder dieses ihm fehlt, kann die DNA der vorliegenden Erfindung die Rolle des Polypeptids der vorliegenden Erfindung in ausreichender oder richtiger Weise für den Patienten spielen, indem (a) die DNA der vorliegenden Erfindung dem Patienten verabreicht wird, um das Polypeptid der vorliegenden Erfindung in vivo zu exprimieren, (b) indem die DNA der vorliegenden Erfindung in eine Zelle inseriert wird, das Polypeptid der vorliegenden Erfindung exprimiert wird und dann die Zelle in den Patienten transplantiert wird oder (c) indem das Polypeptid der vorliegenden Erfindung dem Patienten verabreicht wird etc.

[0114] Wenn die DNA der vorliegenden Erfindung als prophylaktisches/therapeutisches Mittel, wie oben beschrieben, verwendet wird, wird die DNA per se direkt dem Menschen oder anderen Warmblütern verabreicht; alternativ wird die DNA in einen geeigneten Vektor, z.B. einen Retrovirusvektor, Adenovirusvektor, adenovirusassoziierten Virusvektor etc. inseriert und dann dem Menschen oder anderen Warmblütern in üblicher Weise verabreicht. Die DNA der vorliegenden Erfindung kann auch als nackte DNA verabreicht werden oder mit Adjuvantien, um die Aufnahme zu fördern, mithilfe einer Genpistole oder durch einen Katheter, z.B. einen Katheter mit einem Hydrogel.

[0115] Wenn das Polypeptid der vorliegenden Erfindung als oben erwähntes therapeutisches/prophylaktisches Mittel verwendet wird, wird das Polypeptid vorteilhafterweise mit einem Reinigungsgrad von mindestens 90%, bevorzugt mindestens 95%, bevorzugter mindestens 98% und am meisten bevorzugt mindestens 99% verwendet.

[0116] Das Polypeptid der vorliegenden Erfindung kann oral verwendet werden, z.B. in Form von Tabletten, die, falls notwendig und erwünscht, mit Zucker beschichtet sein können, in Form von Kapseln, Elixieren, Mikrokapseln etc., oder parenteral in Form von injizierbaren Präparaten, wie einer sterilen Lösung und einer Sus-

pension in Wasser oder mit einer anderen pharmazeutisch annehmbaren Flüssigkeit. Diese Präparate können hergestellt werden, indem das Polypeptid der vorliegenden Erfindung mit einem physiologisch annehmbaren bekannten Träger, einem Aromatisierungsmittel, einem Trägermittel, einem Vehikel, einem antiseptischen Mittel, einem Stabilisator, einem Bindemittel etc. vermischt wird in einer Einheitsdosierungsform, die in allgemein akzeptierter Art und Weise erforderlich ist, die angewendet wird, um pharmazeutische Präparate herzustellen. Der aktive Inhaltsstoff in dem Präparat wird in einer solchen Dosis eingestellt, dass eine geeignete Dosis erhalten wird in einem spezifisch angegebenen Bereich.

[0117] Additive, die mit Tabletten, Kapseln etc. mischbar sind, schließen Bindemittel, wie Gelatine, Maisstärke, Traganth und Gummi arabicum, Trägermittel, wie kristalline Cellulose, Quellmittel, wie Maisstärke, Gelatine und Alginsäure, Gleitmittel, wie Magnesiumstearat, einen Süßstoff, wie Saccharose, Lactose und Saccharin, und Aromatisierungsmittel, wie Pfefferminz, Akamonoöl und Kirscharoma ein. Wenn die Einheitsdosierung in Form von Kapseln ist, können flüssige Träger, wie Öle und Fette zusammen mit den oben beschriebenen Additiven verwendet werden. Eine sterile Zusammensetzung zur Injektion kann in üblicher Weise formuliert werden, um pharmazeutische Zusammensetzungen herzustellen, z.B. indem die aktiven Inhaltsstoffe in einem Vehikel, wie Wasser zur Injektion mit einem natürlich vorkommenden pflanzlichen Öl, wie Sesamöl und Kokosnussöl etc. gelöst oder suspendiert werden, um die pharmazeutische Zusammensetzung herzustellen.

[0118] Beispiele für ein wässriges Medium zur Injektion schließen physiologische Kochsalzlösung und eine isotonische Lösung, die Glucose und andere Hilfsmittel enthält (z.B. D-Sorbit, D-Mannit, Natriumchlorid etc.) und können in Kombination mit einem geeigneten Auflösungshilfsstoff, wie Alkohol (z.B. Ethanol oder dgl.), einem Polyalkohol (z.B. Propylenglycol, Polyethylenglycol etc.), einem nichtionischen Tensid (z.B. Polysorbat 80™ HCO-50 etc.) etc. verwendet werden. Beispiele für das ölige Medium schließen Sesamöl und Sojaöl ein, die auch in Kombination mit einem Auflösungshilfsmittel, wie Benzylbenzoat und Benzylalkohol verwendet werden können. Das prophylaktische/therapeutische Mittel, das oben beschrieben wurde, kann weiterhin mit einem Puffer (z.B. Phosphatpuffer, Natriumacetatpuffer etc.), einem Beruhigungsmittel (z.B. Benzalkoniumchlorid, Procainhydrochlorid etc.), einem Stabilisator (z.B. Humanserumalbumin, Polyethylenglycol etc.), einem Konservierungsmittel (z.B. Benzylalkohol, Phenol etc.), einem Antioxidans etc. formuliert werden. Die so hergestellte Flüssigkeit zur Injektion wird normalerweise in eine geeignete Ampulle gefüllt.

[0119] Der Vektor, in den die DNA der vorliegenden Erfindung inseriert wurde, kann auch zu pharmazeutischen Präparaten verarbeitet werden, mit den oben beschriebenen Prozeduren. Solche Präparate werden allgemein parenteral verwendet.

[0120] Da das so erhaltene pharmazeutische Präparat sicher und wenig toxisch ist, kann das Präparat an Menschen oder andere warmblütige Tiere verabreicht werden (z.B. Ratte, Maus, Meerschweinchen, Kaninchen, Huhn, Schaf, Schwein, Rind, Pferd, Katze, Hund, Affe, Schimpanse etc.).

[0121] Die Dosis des erfindungsgemäßen Polypeptids variiert abhängig von der Zielkrankheit, der Person, der es verabreicht wird, dem Verabreichungsweg etc.; z.B. ist für die orale Verabreichung für die Behandlung von chronischer Polyarthrit die Dosis normalerweise etwa 0,1 mg bis etwa 100 mg, bevorzugt etwa 1,0 bis etwa 50 mg und bevorzugter etwa 1,0 bis etwa 20 mg/Tag für einen Erwachsenen (mit ca. 60 kg Körpergewicht). Bei der parenteralen Verabreichung variiert die einzelne Dosis abhängig von dem Patienten, dem sie verabreicht wird, der Zielkrankheit etc., aber für die Behandlung von chronischer Polyarthrit ist es vorteilhaft, das Polypeptid der vorliegenden Erfindung intravenös in einer täglichen Dosis von etwa 0,01 bis etwa 30 mg, bevorzugt etwa 0,1 bis etwa 20 mg und bevorzugter etwa 0,1 bis etwa 10 mg für einen Erwachsenen (mit 60 kg Körpergewicht) zu verabreichen. Für andere Tierarten kann die entsprechende Dosis, umgewandelt pro 60 kg Körpergewicht, verabreicht werden.

(2) Screening von Verbindungen, die Kandidaten für Wirkstoffe gegen Krankheiten sind

[0122] Da das erfindungsgemäße Polypeptid die Aktivität besitzt, die Transkription von ChM-I-Gen zu fördern und die Aktivität besitzt, die Expression von Typ-II-Collagenen zu fördern, kann eine Verbindung oder ein Salz davon, das die Aktivitäten (z.B. die Bindungsaktivität an den ChM-I-Genpromotor, die Transkriptionsaktivität des ChM-I-Gens, die Aktivität zur Förderung der Expression von Typ-II-Collagenen etc.) des Polypeptids der vorliegenden Erfindung fördert als Wirkstoff zur Behandlung/Verhütung von Krankheiten verwendet werden, wie chronischer Polyarthrit, Arthrosis deformans, Osteoporose, Knochenbruch, Krebs etc.

[0123] Andererseits kann eine Verbindung oder ein Salz davon, das die Aktivitäten des erfindungsgemäßen Polypeptids hemmt, als therapeutisches/prophylaktisches Mittel für Bandscheibenvorfall, Ischiassyndrom, ek-

topische Chondrogenese etc. verwendet werden.

[0124] Daher ist das Polypeptid der vorliegenden Erfindung nützlich als Reagenz, um Verbindungen oder Salze zu screenen, die die Aktivitäten des erfindungsgemäßen Polypeptids fördern oder hemmen.

[0125] Das bedeutet, die vorliegende Erfindung liefert:

- 1) Ein Verfahren zum Screenen von Verbindungen oder ihren Salzen, die die Aktivitäten des erfindungsgemäßen Polypeptids fördern (im Folgenden manchmal einfach als Promotor bezeichnet) oder von Verbindungen oder ihren Salzen, die die Aktivitäten des erfindungsgemäßen Polypeptids hemmen (im Folgenden manchmal einfach als Inhibitor bezeichnet), das dadurch gekennzeichnet ist, dass das Polypeptid der vorliegenden Erfindung verwendet wird. Genauer liefert die vorliegende Erfindung:
- 2) Ein Verfahren zum Screenen des Förderungsmittels oder des Inhibitors, das beinhaltet, dass verglichen wird:
 - i) der Fall, in dem eine DNA, die das cis-Element des ChM-I-Genpromotors enthält, in Kontakt gebracht wird mit dem erfindungsgemäßen Polypeptid und
 - ii) der Fall, bei dem eine DNA, die das cis-Element des ChM-I-Genpromotors enthält, und eine Testverbindung in Kontakt gebracht werden mit dem erfindungsgemäßen Polypeptid.

[0126] Spezifisch ist die oben beschriebene Screeningmethode dadurch gekennzeichnet, dass Mengen des erfindungsgemäßen Polypeptids, die an den ChM-I-Genpromotor gebunden sind in den Fällen (i) und (ii) verglichen werden.

[0127] Die DNA, die das cis-Element des ChM-I-Genpromotors enthält, wird bevorzugt in ihrer markierten Form verwendet unter Verwendung z.B. eines Radioisotops, eines Pigments etc. Beispiele für Radioisotopen, die verwendet werden, sind ^{32}P , ^3H etc. und Beispiele für das Pigment sind fluoreszierende Pigmente, wie Fluorescein, FAM (hergestellt von PE Biosystems), JOE (hergestellt von PE Biosystems), TAMRA (hergestellt von PE Biosystems), ROX (hergestellt von PE Biosystems), Cy5 (hergestellt von Amersham), Cys (hergestellt von Amersham) etc. Beispiele für DNA, die das cis-Element des ChM-I-Genpromotors enthält, schließen einzelsträngige oder doppelsträngige DNA ein, die die Sequenz enthält, die aufgebaut ist aus mindestens 6 aufeinander folgenden Basen (bevorzugt 6 bis 20, bevorzugter 8 bis 20 und am meisten bevorzugt 10 bis 20) in der gleichen oder im Wesentlichen gleichen Basensequenz, wie die Basensequenz, die in SEQ ID Nr. 17 gezeigt ist. Die DNA kann mit einer allgemein bekannten chemischen Synthesemethode hergestellt werden.

[0128] Beispiele für im Wesentlichen dieselbe Basensequenz wie die in SEQ ID Nr. 17 gezeigte Basensequenz sind Basensequenzen, in denen ungefähr 1 bis 3 Basen in der in SEQ ID Nr. 17 gezeigten Basensequenz durch andere Basen ersetzt sind. Spezifische Beispiele schließen die Basensequenz ein, die in SEQ ID Nr. 21 gezeigt ist (Japanische Offenlegungsschrift Anmeldung Nr. 7-138295) und dgl.

[0129] Die Menge des erfindungsgemäßen Polypeptids zu der DNA, die das cis-Element des ChM-I-Genpromotors enthält, kann quantitativ bestimmt werden, indem die DNA, die das cis-Element des ChM-I-Genpromotors enthält, gemessen wird, die an das Polypeptid der vorliegenden Erfindung gebunden ist, im Hinblick z.B. auf die Aktivität der markierten DNA. Die Messung kann gemäß einer allgemein bekannten Methode erfolgen, z.B. der Gelverschiebungssassaymethode (SHIN IDENSHI KOGAKU HANDBUCH (New Genetic Engineering Handbook), 3. revidierte Version, herausgegeben von Masami Muramatsu et al., veröffentlicht von Yodosha Publishing Co., S. 150, 1999).

[0130] Beispiele für Testverbindungen sind ein Peptid, ein Protein, eine Nichtpeptidverbindung, eine synthetische Verbindung, ein Fermentationsprodukt, ein Zellextrakt, ein Pflanzenextrakt, ein Tiergewebeextrakt und dgl. Diese Verbindungen können neue Verbindungen oder allgemein bekannte Verbindungen sein.

[0131] Die vorliegende Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zum Screenen des Förderungsmittels oder des Inhibitors, das dadurch gekennzeichnet ist, dass die DNA der vorliegenden Erfindung oder die DNA der vorliegenden Erfindung verwendet wird. Spezifisch liefert die vorliegende Erfindung eine Methode oder ein Verfahren zum Screenen des Förderungsmittels oder des Inhibitors, das beinhaltet, dass die DNA der vorliegenden Erfindung und Hefe (z.B. *Saccharomyces cerevisiae*), die mit einer DNA transformiert ist, die mit einem Reportergen stromabwärts des cis-Elements des ChM-I-Genpromotors ligiert ist, in Gegenwart oder Abwesenheit einer Testverbindung gezüchtet wird, nachgewiesen wird und die Expression des Reportergens verglichen wird.

[0132] Als Reportergen kann z.B. ein Gen angewendet werden, das die Auxotrophie herstellt, wie HIS3, TRP1, URA3 etc., ein chemisches Resistenzgen, wie Aureobasidin etc., ein Farbmarkergen, wie lacZ (β -Ga-

lactosidasegen) etc.

[0133] Die Verbindung oder ihre Salze, die die Aktivitäten des erfindungsgemäßen Polypeptids fördern oder hemmen, können gescreent werden, z.B. indem Hefe mit einer Auxotrophie für Histidin mit der DNA der vorliegenden Erfindung transformiert wird und die DNA mit HIS3-Gen als Reportergen stromabwärts des cis-Elements des ChM-I-Genpromotors ligiert wird, der entstehende Transformant in einem histidinfreien Medium in Gegenwart einer Testverbindung gezüchtet wird und das Wachstum (beschleunigte oder gehemmte Proliferation) des Transformanten gemessen wird. Die Testverbindung, die das Wachstum des Transformanten fördert, kann ausgewählt werden als Verbindung, die die Aktivitäten des Polypeptids der vorliegenden Erfindung fördern kann. In gleicher Weise kann die Testverbindung, die das Wachstum des Transformanten hemmt, ausgewählt werden als die Verbindung, die die Aktivitäten des erfindungsgemäßen Polypeptids hemmen kann.

[0134] Die Verbindung oder ihre Salze, die die Aktivitäten des erfindungsgemäßen Polypeptids fördern oder hemmen, können auch gescreent werden, indem Hefe mit der DNA der vorliegenden Erfindung transformiert wird und die DNA mit Aureobasidin-A-Resistenzgen als Reportergen stromabwärts des cis-Elements des ChM-I-Genpromotors ligiert wird, der entstehende Transformant in einem Medium gezüchtet wird, das die Testverbindung und Aureobasidin A enthält und das Wachstum (beschleunigte oder gehemmte Proliferation) des Transformanten gemessen wird. Die Testverbindung, die das Wachstum des Transformanten fördert, kann ausgewählt werden als die Verbindung, die die Aktivitäten des Polypeptids der vorliegenden Erfindung fördern kann. In gleicher Weise kann die Testverbindung, die das Wachstum des Transformanten hemmt, ausgewählt werden als die Verbindung, die die Aktivitäten des erfindungsgemäßen Polypeptids hemmen kann.

[0135] Weiterhin können Verbindungen oder Salze, die die Aktivitäten des erfindungsgemäßen Polypeptids fördern oder hemmen, gescreent werden, indem Hefe mit der DNA der vorliegenden Erfindung transformiert wird und die DNA mit β -Galactosidasegen (lacZ) als Reportergen stromabwärts des cis-Elements des ChM-I-Genpromotors ligiert wird, der entstehende Transformant in Gegenwart einer Testverbindung und eines Substratreagenzes von β -Galactosidase, wie 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -galactopyranosid (X-Gal) gezüchtet wird und der Anfärbungsgrad des Transformanten gemessen wird. Wenn sich der Transformant in Gegenwart der Testverbindung tiefer blau färbt als in Abwesenheit der Testverbindung, kann die Testverbindung ausgewählt werden als die Verbindung, die die Aktivitäten des erfindungsgemäßen Polypeptids fördern kann. Umgekehrt kann dann, wenn der Transformant heller blau gefärbt oder überhaupt nicht gefärbt ist, die Verbindung ausgewählt werden als die Verbindung, die die Aktivitäten des erfindungsgemäßen Polypeptids hemmen kann.

[0136] Weiterhin wird die Menge des Reportergenprodukts (z.B. mRNA, Protein) mit einer allgemein bekannten Methode gemessen, wobei eine Testverbindung, die die Menge des Reportergenproduktes erhöht, ausgewählt werden kann als die Verbindung, die die Aktivitäten der vorliegenden Erfindung hemmen kann.

[0137] Beispiele für das cis-Element des ChM-I-Genpromotors, die in der oben beschriebenen Screeningmethode verwendet werden, schließen DNA ein, die die Sequenz enthält, die aus mindestens 6 aufeinander folgenden Basen (bevorzugt 6 bis 20, bevorzugter 8 bis 20 und am meisten bevorzugt 10 bis 20) in der gleichen oder im Wesentlichen gleichen Basensequenz wie in der in SEQ ID Nr. 17 gezeigten Basensequenz aufgebaut ist. Beispiele für im Wesentlichen die gleiche Basensequenz wie die in SEQ ID Nr. 17 gezeigte Basensequenz sind Basensequenzen, in denen ungefähr 1 bis 3 Basen in der in SEQ ID Nr. 17 gezeigten Basensequenz durch andere Basen ersetzt sind. Spezifische Beispiele schließen die in SEQ ID Nr. 21 gezeigte Basensequenz ein (Japanische Offenlegungsschrift Anmeldung Nr. 7-138295) und dgl.

[0138] Während es keine spezielle Beschränkung in Bezug auf die Anzahl der Basen zwischen dem ChM-I-Genpromotor und dem Translationsstartcodon des Reportergens gibt, das stromabwärts des ChM-I-Genpromotors ligiert ist, ist die Anzahl der Basen im Allgemeinen 0 bis 100 Basen, bevorzugt 10 bis 50 Basen und bevorzugter 10 bis 30 Basen.

[0139] Der Transformant kann in gleicher Weise gezüchtet werden, wie der oben beschriebene Transformant gezüchtet wird.

[0140] Der Kit zum Screenen gemäß der vorliegenden Erfindung enthält das Polypeptid der vorliegenden Erfindung, die DNA der vorliegenden Erfindung oder den Transformanten der vorliegenden Erfindung. Bevorzugt enthält der Kit zum Screenen der vorliegenden Erfindung das Polypeptid der vorliegenden Erfindung, die DNA der vorliegenden Erfindung oder den Transformanten der vorliegenden Erfindung und die DNA, die das cis-Element des ChM-I-Genpromotors enthält. In dem Fall, in dem der Transformant der vorliegenden Erfindung verwendet wird, wird ein Transformant, der mit der DNA der vorliegenden Erfindung transformiert ist und DNA, die

das cis-Element des ChM-I-Genpromotors enthält, angewendet.

[0141] Weiterhin liefert die vorliegende Erfindung:

- 1) Ein Verfahren zum Screenen von Verbindungen oder ihren Salzen, die die Expression der DNA, die das Polypeptid der vorliegenden Erfindung codiert, fördern oder hemmen, das dadurch gekennzeichnet ist, dass eine Zelle gezüchtet wird, die das erfindungsgemäße Polypeptid in Gegenwart einer Testverbindung erzeugen kann und die Menge an mRNA, die das Polypeptid der vorliegenden Erfindung codiert, gemessen wird. Genauer liefert die vorliegende Erfindung:
- 2) Ein Verfahren zum Screenen von Verbindungen oder ihren Salzen, die die Expression der DNA fördern oder hemmen, die das erfindungsgemäße Polypeptid codiert, das dadurch gekennzeichnet ist, dass Folgendes verglichen wird:
 - (i) die exprimierte Menge an mRNA, die das erfindungsgemäße Polypeptid codiert, wenn eine Zelle, die das erfindungsgemäße Polypeptid erzeugen kann, gezüchtet wird und
 - (ii) die exprimierte Menge an mRNA, die das erfindungsgemäße Polypeptid codiert, wenn eine Zelle, die das erfindungsgemäße Polypeptid erzeugen kann, in Gegenwart einer Testverbindung gezüchtet wird.

[0142] Beispiele für die Zelle, die das erfindungsgemäße Polypeptid erzeugen kann, sind der Transformant der vorliegenden Erfindung, wie oben beschrieben, allgemein bekannte Zellen von warmblütigen Tieren, die ChM-I erzeugen können und dgl. Als Zellen von warmblütigen Tieren, die ChM-I erzeugen können, gibt es z.B. Tierzellen, die ChM-I in Gegenwart eines Expressionsinduktors, wie Insulin etc. erzeugen können, genauer Maus-ATDC5-Zellen etc.

[0143] Die Zelle, die das erfindungsgemäße Polypeptid erzeugen kann, kann in gleicher Weise gezüchtet werden, wie bei der Kultivierung des Transformanten der vorliegenden Erfindung, die oben beschrieben wurde. Wenn Tierzellen, die ChM-I, bei Kontakt mit einem Expressionsinduktor erzeugen können, eingesetzt werden, können die Tierzellen in Gegenwart oder Abwesenheit des Expressionsinduktors gezüchtet werden.

[0144] Die Menge an mRNA, die das erfindungsgemäße Polypeptid codiert, kann bestimmt werden, indem RNA, die aus Zellen mit einer allgemein bekannten Methode extrahiert wurde, in Kontakt gebracht wird mit der DNA der vorliegenden Erfindung oder der komplementären DNA und die Menge an mRNA gemessen wird, die an die DNA der vorliegenden Erfindung oder die komplementäre DNA gebunden ist. Indem die DNA der vorliegenden Erfindung oder die komplementäre DNA z.B. mit einem Radioisotop, einem Pigment etc. markiert wird, kann die Menge an mRNA, die das erfindungsgemäße Polypeptid codiert, die an die DNA der vorliegenden Erfindung oder die komplementäre DNA gebunden ist, leicht bestimmt werden. Beispiele für das Radioisotop und das Pigment, die verwendet werden, sind die gleichen, wie sie für die Markierung der DNA verwendet werden, die das cis-Element des ChM-I-Genpromotors enthält, wie oben beschrieben.

[0145] Die Menge an mRNA, die das erfindungsgemäße Polypeptid codiert, kann auch bestimmt werden, indem RNA, die aus Zellen extrahiert wurde, unter Verwendung einer reversen Transkriptase in cDNA umgewandelt wird und die Menge an cDNA, die durch PCR amplifiziert wird, gemessen wird unter Verwendung der DNA der vorliegenden Erfindung oder der komplementären DNA oder einer Teil-DNA als Primer.

[0146] Als zu der erfindungsgemäßen DNA komplementäre DNA, die verwendet wird, um die Menge an mRNA zu bestimmen, die das erfindungsgemäße Polypeptid codiert, gibt es eine DNA (unterer Strang) mit einer komplementären Sequenz zu der DNA (oberer Strang) der vorliegenden Erfindung. Beispiele für die Teil-DNA der erfindungsgemäßen DNA sind Basensequenzen, die aus ungefähr 10 bis 2.200, bevorzugt ungefähr 10 bis 300 und bevorzugter ungefähr 10 bis 30 aufeinander folgenden Basen der Basensequenz der DNA der vorliegenden Erfindung aufgebaut sind. Beispiele für die Teil-DNA der zu der DNA der vorliegenden Erfindung komplementären DNA sind DNAs, die Sequenzen enthalten, die komplementär zu der Teil-DNA der DNA der vorliegenden Erfindung sind, die oben beschrieben wurde. Besonders bevorzugte Beispiele der für die PCR verwendeten Primer sind DNA-Stränge mit der Basensequenz, die in SEQ ID Nr. 8 dargestellt ist und DNA mit der Basensequenz, die in SEQ ID Nr. 9 dargestellt ist.

[0147] Die Testverbindung, die die Menge an mRNA erhöht, die das Polypeptid der vorliegenden Erfindung codiert, kann ausgewählt werden als die Verbindung, die die Expression der erfindungsgemäßen DNA fördern kann. In gleicher Weise kann die Testverbindung, die die Menge an mRNA verringert, die das erfindungsgemäße Polypeptid codiert, ausgewählt werden als die Verbindung, die die Expression der DNA der vorliegenden Erfindung hemmen kann.

[0148] Die Verbindung oder ihr Salz, die unter Verwendung der Screeningmethode oder unter Verwendung

des Screening-Kits der vorliegenden Erfindung erhältlich ist, ist die Verbindung, die ausgewählt wird aus den Testverbindungen, wie oben beschrieben, z.B. Peptiden, Proteinen, Nichtpeptidverbindungen, synthetischen Verbindungen, Fermentationsprodukten, Zellextrakten, Pflanzenextrakten, Tiergewebeextrakten, Blutplasma etc., und die Verbindung, die die Aktivitäten (z.B. die Bindungsaktivität des ChM-I-Genpromotors, die ChM-I-Gentranskriptionsaktivität, die Aktivität, die Expression von Typ-II-Collagengen zu fördern etc.) des erfindungsgemäßen Polypeptids oder die Expression der DNA der vorliegenden Erfindung fördert oder hemmt.

[0149] Als Salze der Verbindung können die gleichen Salze angewendet werden, wie die oben beschriebenen des erfindungsgemäßen Polypeptids.

[0150] Die Verbindung, die die Aktivitäten (z.B. die Bindungsaktivität des ChM-I-Genpromotors, die ChM-I-Gentranskriptionsaktivität, die Aktivität, die Expression von Typ-II-Collagengen zu fördern etc.) des erfindungsgemäßen Polypeptids oder die Expression der DNA der vorliegenden Erfindung fördert, ist verfügbar als Pharmazeutikum für die Behandlung/Verhütung von Krankheiten, z.B. chronischer Polyarthrit, Arthrosis deformans, Osteoporose, Knochenbruch, Krebs etc.

[0151] Andererseits kann die Verbindung, die die Aktivitäten des erfindungsgemäßen Polypeptids oder die Expression der DNA der vorliegenden Erfindung hemmt, nützlich sein als Pharmazeutikum für die Behandlung/Verhütung von Krankheiten, z.B. Bandscheibenvorfall, Ischiassyndrom, ektopische Chondrogenese etc.

[0152] Wenn die Verbindung, die durch die Screeningmethode oder den Screening-Kit der vorliegenden Erfindung erhältlich ist, als therapeutisches/prophylaktisches Mittel, wie oben beschrieben, verwendet wird, kann ein übliches Mittel angewendet werden, um das pharmazeutische Präparat herzustellen. Z.B. kann die Verbindung zu Tabletten, Kapseln, Elixieren, Mikrokapseln, sterilen Lösungen, Suspensionen etc. auf gleiche Weise verarbeitet werden, wie die Pharmazeutika, die das erfindungsgemäße Polypeptid enthalten, wie oben beschrieben.

[0153] Da das so erhaltene pharmazeutische Präparat sicher und wenig toxisch ist, kann es an Menschen oder warmblütige Tiere (z.B. Maus, Ratte, Kaninchen, Schaf, Schwein, Rind, Pferd, Huhn, Katze, Hund, Affe, Schimpanse etc.) verabreicht werden.

[0154] Die Dosis der Verbindung oder der Salze davon variiert abhängig von der Aktivität, der Zielkrankheit, dem zu behandelnden Patienten, dem Verabreichungsweg etc.; wenn z.B. die Verbindung, die die Aktivitäten des Polypeptids der vorliegenden Erfindung oder die Expression der DNA der vorliegenden Erfindung fördert, oral verabreicht wird, um chronische Polyarthrit zu behandeln, ist die Dosis normalerweise etwa 0,1 bis etwa 100 mg, bevorzugt etwa 1,0 bis etwa 50 mg, bevorzugter etwa 1,0 bis etwa 20 mg/Tag für einen Erwachsenen (mit 60 kg Körpergewicht). Bei der parenteralen Verabreichung variiert die einzelne Dosis abhängig von dem zu behandelnden Patienten, der Zielkrankheit etc., aber wenn die Verbindung, die die Aktivitäten des erfindungsgemäßen Polypeptids oder die Expression der erfindungsgemäßen DNA fördert, parenteral an einen Erwachsenen (mit 60 kg Körpergewicht) verabreicht wird, um chronische Polyarthrit zu behandeln, ist es vorteilhaft, die Verbindung intravenös in einer täglichen Dosis von etwa 0,01 bis etwa 30 mg, bevorzugt etwa 0,1 bis etwa 20 mg, bevorzugter etwa 0,1 bis etwa 10 mg zu verabreichen. Für andere Tierarten kann die entsprechende Dosis, umgewandelt bezogen auf 60 kg Körpergewicht, verabreicht werden.

[0155] Wenn andererseits die Verbindung, die die Aktivitäten des erfindungsgemäßen Polypeptids oder die Expression der DNA der vorliegenden Erfindung hemmt, oral verabreicht wird, um Bandscheibenvorfall zu behandeln, ist die Dosis normalerweise etwa 0,1 bis etwa 100 mg, bevorzugt etwa 1,0 bis etwa 50 mg, bevorzugter etwa 1,0 bis etwa 20 mg/Tag für einen Erwachsenen (mit 60 kg Körpergewicht). Bei der parenteralen Verabreichung variiert die einzelne Dosis abhängig von dem zu behandelnden Patienten, der Zielkrankheit etc., aber wenn die Verbindung, die die Aktivitäten des erfindungsgemäßen Polypeptids oder die Expression der erfindungsgemäßen DNA fördert, parenteral an einen Erwachsenen (mit 60 kg Körpergewicht) verabreicht wird, um Bandscheibenvorfall zu behandeln, ist es vorteilhaft, die Verbindung intravenös in einer täglichen Dosis von etwa 0,01 bis etwa 30 mg, bevorzugt etwa 0,1 bis etwa 20 mg, bevorzugter etwa 0,1 bis etwa 10 mg zu verabreichen. Für andere Tierarten kann die entsprechende Dosis, umgewandelt bezogen auf 60 kg Körpergewicht, verabreicht werden.

[0156] Das erfindungsgemäße Polypeptid fördert auch die Transkription eines Gens mit dem cis-Element, das die gleiche oder im Wesentlichen die gleiche Basensequenz wie die in SEQ ID Nr. 17 dargestellte Basensequenz aufweist, da das Polypeptid spezifisch an das cis-Element bindet, das die gleiche oder im Wesentlichen gleiche Basensequenz enthält, wie die in SEQ ID Nr. 17 dargestellte Basensequenz. Daher kann zusätzlich zu

dem ChM-I-Gen das erfindungsgemäße Polypeptid, die erfindungsgemäße DNA oder der erfindungsgemäße Transformant verwendet werden, um eine Verbindung zu screenen, die die Transkription anderer Gene, die die gleiche oder im Wesentlichen die gleiche Basensequenz enthalten, wie die in SEQ ID Nr. 17 dargestellte Basensequenz, fördern oder hemmen.

(3) Quantitative Bestimmung des Polypeptids der vorliegenden Erfindung oder von Salzen davon:

[0157] Der Antikörper für das Polypeptid der vorliegenden Erfindung kann spezifisch das erfindungsgemäße Polypeptid erkennen und kann daher für die quantitative Bestimmung des erfindungsgemäßen Polypeptids in einer Testprobenflüssigkeit verwendet werden, insbesondere für eine quantitative Auswertung mit Sandwich-Immunoassay.

[0158] Das bedeutet, die vorliegende Erfindung liefert:

- (i) Ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung des erfindungsgemäßen Polypeptids in einer Testprobenflüssigkeit, das beinhaltet, dass der Antikörper der vorliegenden Erfindung, eine Testprobenflüssigkeit und das markierte Polypeptid der vorliegenden Erfindung kompetitiv reagieren und der Anteil an markiertem Polypeptid der vorliegenden Erfindung, das an einen Antikörper gebunden ist, gemessen wird und
- (ii) ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung des erfindungsgemäßen Polypeptids in einer Testprobenflüssigkeit, das beinhaltet, dass die Testprobenflüssigkeit gleichzeitig oder kontinuierlich mit dem erfindungsgemäßen Antikörper, der an einem Träger immobilisiert ist, und einer markierten Form eines anderen Antikörpers der vorliegenden Erfindung umgesetzt wird und dann die Aktivität des Markierungsmittels an dem unlöslichen Träger gemessen wird.

[0159] Bei dem Verfahren (ii) zur quantitativen Bestimmung, wie oben beschrieben, ist es bevorzugt, dass ein Antikörper den N-terminalen Bereich des erfindungsgemäßen Polypeptids erkennen kann, während ein anderer Antikörper den C-terminalen Bereich des erfindungsgemäßen Polypeptids erkennen kann.

[0160] Der monoklonale Antikörper für das erfindungsgemäße Polypeptid (im Folgenden manchmal als monoklonaler Antikörper der vorliegenden Erfindung bezeichnet) kann verwendet werden, um das erfindungsgemäße Polypeptid nachzuweisen. Außerdem kann das erfindungsgemäße Polypeptid mithilfe von Gewebefärbung etc. ebenso nachgewiesen werden. Für diese Zwecke kann das Antikörpermolekül selbst verwendet werden, oder es können auch $F(ab')_2$ -, Fab'- oder Fab-Fraktionen des Antikörpermoleküls verwendet werden.

[0161] Es besteht keine spezielle Beschränkung für das Testverfahren unter Verwendung des Antikörpers für das erfindungsgemäße Polypeptid; jede Methode kann verwendet werden, falls sie mit einer Methode verbunden ist, bei der die Menge an Antikörper, Antigen oder Antikörper-Antigen-Komplex mit chemischen oder physikalischen Mitteln nachgewiesen werden kann, abhängig von oder entsprechend der Menge an Antigen (z.B. der Menge an Protein) in einer Testprobenflüssigkeit, die untersucht werden soll, und dann berechnet werden kann unter Verwendung einer Standardkurve, die erstellt wird mit einer Standardlösung, die eine bekannte Menge an Antigen enthält. Vorteilhafterweise werden z.B. Nephrometrie, kompetitive Verfahren, immunometrische Verfahren und Sandwich-Verfahren verwendet; im Hinblick auf Empfindlichkeit und Spezifität ist die Sandwich-Methode, die später beschrieben wird, besonders bevorzugt.

[0162] Beispiele für das in dem Testverfahren verwendete Markierungsmittel unter Verwendung der markierenden Substanz sind Radioisotope, Enzyme, fluoreszierende Substanzen und lumineszierende Substanzen etc. Beispiele für das Radioisotop sind $[^{125}\text{I}]$, $[^{131}\text{I}]$, $[^3\text{H}]$, $[^{14}\text{C}]$ etc. Bevorzugte Beispiele des Enzyms sind solche, die stabil sind und eine hohe spezifische Aktivität haben, was β -Galactosidase, β -Glucosidase, alkalische Phosphatase, Peroxidase, Malatdehydrogenase etc. einschließt. Beispiele für die fluoreszierende Substanz sind Fluorescamin, Fluoresceinisothiocyanat etc. Beispiele für die lumineszierende Substanz sind Luminol, ein Luminolderivat, Luciferin, Lucigenin etc. Weiterhin kann das Biotin-Avidin-System auch verwendet werden, um einen Antikörper oder ein Antigen an ein Markierungsmittel zu binden.

[0163] Bei der Immobilisierung von Antigenen oder Antikörpern kann physikalische Adsorption verwendet werden. Alternativ kann eine chemische Bindung, die üblicherweise für die Immobilisierung von Proteinen oder Enzymen verwendet wird, ebenso angewendet werden. Beispiele für den Träger schließen unlösliche Polysaccharide, wie Agarose, Dextran und Cellulose; synthetische Harze, wie Polystyrol, Polyacrylamid und Silicon; Glas etc. ein.

[0164] Bei der Sandwich-Methode wird eine Testprobenflüssigkeit mit einem immobilisierten monoklonalen Antikörper der vorliegenden Erfindung umgesetzt (erste Reaktion), dann mit einem weiteren markierten mono-

klonalen Antikörper der vorliegenden Erfindung umgesetzt (zweite Reaktion) und die Aktivität des Markierungsmittels auf den unlöslichen Träger festgestellt, wodurch die Menge des erfindungsgemäßen Polypeptids in der Testprobenflüssigkeit quantitativ ausgewertet werden kann. Die erste und zweite Reaktion können in umgekehrter Reihenfolge durchgeführt werden, gleichzeitig oder aufeinander folgend mit einem Zeitintervall. Die Art des Markierungsmittels und die Methode zur Immobilisierung können die gleichen sein, wie oben beschrieben. Bei dem Immunoassay mit der Sandwich-Methode ist es nicht immer notwendig, dass der für den markierten Antikörper verwendete Antikörper und der für die Festphase verwendete Antikörper von einer Art oder einem Typ sind, sondern eine Mischung von zwei oder mehr Antikörpern kann auch dazu verwendet werden, die Messempfindlichkeit etc. zu verbessern.

[0165] Bei der Methode bzw. dem Verfahren zur Bestimmung des erfindungsgemäßen Polypeptids mit der Sandwich-Methode gemäß der vorliegenden Erfindung sind bevorzugte monoklonale Antikörper der vorliegenden Erfindung, die für die erste und zweite Reaktion verwendet werden, Antikörper, deren Bindungsstellen für das erfindungsgemäße Polypeptid voneinander verschieden sind. Somit sind die in der ersten und zweiten Reaktion verwendeten Antikörper solche, bei denen der in der zweiten Reaktion verwendete Antikörper den C-terminalen Bereich des erfindungsgemäßen Polypeptids erkennt, der Antikörper, der eine andere Stelle als den C-terminalen Bereich erkennt, z.B. den N-terminalen Bereich erkennt, wird bevorzugt in der ersten Reaktion verwendet.

[0166] Der erfindungsgemäße monoklonale Antikörper kann in einem anderen Testsystem als der Sandwich-Methode verwendet werden, z.B. einer kompetitiven Methode, einer immunometrischen Methode und für die Nephrometrie.

[0167] Bei der kompetitiven Methode werden ein Antigen in einer Testprobenflüssigkeit und ein markiertes Antigen konkurrierend mit einem Antikörper reagieren gelassen und dann nicht umgesetztes markiertes Antigen (F) und markiertes Antigen, das an den Antikörper gebunden ist (B) getrennt (d.h. B/F-Trennung) und die markierte Menge entweder von B oder F gemessen, um die Menge des Antigens in der Testprobenflüssigkeit zu bestimmen. Bei den Reaktionen für eine solche Methode gibt es eine Flüssigphasenmethode, bei der ein löslicher Antikörper als Antikörper verwendet wird und die B/F-Trennung durch Polyethylenglycol bewirkt wird, während ein zweiter Antikörper für den Antikörper verwendet wird, und eine Festphasenmethode, bei der ein immobilisierter Antikörper als erster Antikörper verwendet wird oder ein löslicher Antikörper als erster Antikörper verwendet wird, während ein immobilisierter Antikörper als zweiter Antikörper verwendet wird.

[0168] Bei der immunometrischen Methode werden ein Antigen in einer Testprobenflüssigkeit und ein immobilisiertes Antigen konkurrierend mit einer gegebenen Menge eines markierten Antikörpers reagieren gelassen und anschließend die Festphase von der flüssigen Phase getrennt; oder ein Antigen in einer Testprobenflüssigkeit und eine überschüssige Menge eines markierten Antikörpers werden umgesetzt, dann ein immobilisiertes Antigen zugegeben, um einen nicht umgesetzten markierten Antikörper an die Festphase zu binden und die Festphase wird von der flüssigen Phase getrennt. Danach wird die markierte Menge in irgendeiner der Phasen gemessen, um die Antigenmenge in der Testprobenflüssigkeit zu bestimmen.

[0169] Bei der Nephrometrie wird die Menge an unlöslichem Sediment, das als Ergebnis der Antigen-Antikörper-Reaktion in einem Gel oder in einer Lösung erzeugt wird, gemessen. Sogar wenn die Menge an Antigen in einer Testprobenflüssigkeit klein ist und nur eine kleine Menge an Sediment erhalten wird, kann Lasernephrometrie unter Verwendung von Laserbeugung geeigneterweise verwendet werden.

[0170] Bei Anwendung irgendeines dieser Immunoassays für das Testverfahren der vorliegenden Erfindung sind irgendwelche speziellen Bedingungen oder Arbeitsschritte nicht erforderlich. Das Testsystem für das erfindungsgemäße Polypeptid kann zusätzlich zu Bedingungen oder Arbeitsschritten, die üblicherweise verwendet werden, für jede der Methoden zugeschnitten werden, wobei technische Überlegungen eines Fachmanns auf diesem Gebiet in Betracht gezogen werden. Für die Details solcher üblichen technischen Mittel wird auf verschiedene Übersichtsartikel, Referenzbücher etc. verwiesen.

[0171] Für die Details kann Bezug genommen werden z.B. auf Hiroshi Irie (Herausgeber): "Radioimmunoassay" (veröffentlicht von Kodansha, 1974); Hiroshi Irie (Herausgeber): "Radioimmunoassay; Second Series" (veröffentlicht von Kodansha, 1979); Eiji Ishikawa et al. (Herausgeber): "Enzyme Immunoassay" (veröffentlicht von Igaku Shoin, 1978); Eiji Ishikawa et al. (Herausgeber): "Enzyme Immunoassay" (2. Auflage) (veröffentlicht von Igaku Shoin, 1982); Eiji Ishikawa et al. (Herausgeber): "Enzyme Immunoassay" (3. Auflage) (veröffentlicht von Igaku Shoin, 1987); "Methods in Enzymology", Bd. 70 (Immunochemical Techniques (Teil A)); siehe dort, Bd. 73 (Immunochemical Techniques (Teil B)); siehe dort, Bd. 74 (Immunochemical Techniques (Teil C)); siehe

dort, Bd. 84 (Immunochemical Techniques (Teil D: Selected Immunoassays)); siehe dort, Bd. 92 (Immunochemical Techniques (Teil E: Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods)); siehe dort, Bd. 121 (Immunochemical Techniques (Teil I: Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies)) (veröffentlicht von Academic Press) etc.

[0172] Wie oben beschrieben kann das erfindungsgemäße Polypeptid quantitativ mit hoher Empfindlichkeit bestimmt werden unter Verwendung des erfindungsgemäßen Antikörpers.

[0173] Indem der Anteil des Polypeptids der vorliegenden Erfindung unter Verwendung des erfindungsgemäßen Antikörpers quantitativ ausgewertet wird, kann 1) wenn ein verringerter Anteil an Polypeptid der vorliegenden Erfindung nachgewiesen wird, weiterhin diagnostiziert werden, dass Krankheiten, wie chronische Polyarthrit, Arthrosis deformans, Osteoporose, Knochenbruch, Krebs etc. beteiligt sind oder dass es höchstwahrscheinlich ist, dass jemand in der Zukunft unter dieser Krankheit leidet und 2) wenn ein erhöhter Anteil des erfindungsgemäßen Polypeptids nachgewiesen wird, diagnostiziert werden, dass Krankheiten, wie Bandscheibenvorfall, Ischiassyndrom, ektopische Chondrogenese etc. beteiligt sein könnten, oder dass es höchstwahrscheinlich ist, dass diese Krankheiten in der Zukunft auftreten.

[0174] Der erfindungsgemäße Antikörper kann auch angewendet werden zum Nachweis des erfindungsgemäßen Polypeptids, das in einer Testprobenflüssigkeit, wie einer Körperflüssigkeit, einem Gewebe etc. vorhanden sein kann. Der Antikörper kann auch zur Herstellung einer Antikörpersäule zur Reinigung des erfindungsgemäßen Polypeptids, zum Nachweis des erfindungsgemäßen Polypeptids in den Fraktionen bei der Reinigung und zur Analyse des Verhaltens des erfindungsgemäßen Polypeptids in den zu untersuchenden Zellen verwendet werden.

(4) Gendiagnostisches Mittel

[0175] Unter Verwendung der erfindungsgemäßen DNA, z.B. als Sonde kann eine Anomalität (Genanomalität) der DNA oder mRNA, die das erfindungsgemäße Polypeptid codiert, bei Menschen oder anderen warmblütigen Tieren (z.B. Ratte, Maus, Meerschweinchen, Kaninchen, Huhn, Schaf, Schwein, Rind, Pferd, Katze, Hund, Affe, Schimpanse etc.) nachgewiesen werden. Daher ist die DNA der vorliegenden Erfindung nützlich als ein gendiagnostisches Mittel für eine Schädigung der DNA oder mRNA, eine Mutation oder verminderte Expression oder erhöhte Expression oder Überexpression der DNA oder mRNA.

[0176] Die oben beschriebene Gendiagnose unter Verwendung der erfindungsgemäßen DNA kann z.B. mit dem wohl bekannten Northern-Hybridisierungsassay oder dem PCR-SSCP-Assay (Genomics, 5, 874-879 (1989); Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 86, 2766-2770 (1989)) durchgeführt werden.

[0177] Wenn die verminderte Expression z.B. mit Northern-Hybridisierung nachgewiesen wird, kann diagnostiziert werden, dass höchstwahrscheinlich Krankheiten, wie chronische Polyarthrit, Arthrosis deformans, Osteoporose, Knochenbruch, Krebs etc. vorliegen.

[0178] Wenn andererseits Überexpression mit Northern-Hybridisierung nachgewiesen wird, kann auch diagnostiziert werden, dass höchstwahrscheinlich z.B. Bandscheibenvorfall, Ischiassyndrom, ektopische Chondrogenese etc. vorliegt.

[0179] Wenn eine Mutation der DNA mit PCR-SSCP nachgewiesen wurde, kann diagnostiziert werden, dass höchstwahrscheinlich Krankheiten, z.B. Bandscheibenvorfall, Ischiassyndrom, ektopische Chondrogenese oder chronische Polyarthrit, Arthrosis deformans, Osteoporose, Knochenbruch, Krebs etc. auftreten werden.

(5) Pharmazeutika, die Antisense-DNA enthalten

[0180] Antisense-DNA, die an die erfindungsgemäße DNA komplementär bindet und die Expression der DNA hemmt, kann die Funktionen des erfindungsgemäßen Polypeptids oder der DNA der vorliegenden Erfindung in vivo unterdrücken und kann als Mittel zur Behandlung/Verhütung von Krankheiten verwendet werden, z.B. Bandscheibenvorfall, Ischiassyndrom, ektopische Chondrogenese etc.

[0181] Für den Fall, dass die oben beschriebene Antisense-DNA als therapeutisches/prophylaktisches Mittel, wie oben beschrieben, verwendet wird, kann die Antisense-DNA in gleicher Weise als therapeutisches/prophylaktisches Mittel für verschiedene Krankheiten angewendet werden, die die oben beschriebene DNA der vor-

liegenden Erfindung enthalten.

[0182] Wenn z.B. die Antisense-DNA verwendet wird, wird die Antisense-DNA allein verabreicht oder die Antisense-DNA wird in einen geeigneten Vektor, wie einen Retrovirus-Vektor, Adenovirus-Vektor, adenovirusassoziierten Virusvektor etc. inseriert und anschließend in üblicher Weise behandelt. Die Antisense-DNA kann, so wie sie ist, verabreicht werden oder kann in eine Dosierungsform mit einem physiologisch annehmbaren Träger eingearbeitet werden, um ihre Aufnahme zu erhöhen und mit einer Genpistole oder über einen Katheter, wie einen Katheter mit einem Hydrogel, verabreicht werden. Zusätzlich kann die Antisense-DNA auch als Oligonucleotidsonde zur Diagnose verwendet werden, um die Gegenwart der erfindungsgemäßen DNA in Geweben oder Zellen und Zustände ihrer Expression zu untersuchen.

(6) Pharmazeutika, die den erfindungsgemäßen Antikörper enthalten

[0183] Der Antikörper der vorliegenden Erfindung, der die Wirkung besitzt, die Aktivitäten des erfindungsgemäßen Polypeptids zu neutralisieren, kann als Wirkstoff zur Behandlung/Verhütung von Krankheiten, z.B. Bandscheibenvorfall, Ischiassyndrom, ektopische Chondrogenese etc. verwendet werden.

[0184] Das therapeutische/prophylaktische Mittel, das den erfindungsgemäßen Antikörper enthält, wie oben beschrieben, kann oral oder parenteral an Menschen oder Säugetiere (z.B. Ratte, Kaninchen, Schaf, Schwein, Rind, Katze, Hund, Affe etc.) als flüssiges Präparat in der ursprünglichen Form oder als pharmazeutische Zusammensetzung in einer geeigneten Wirkstoffform verabreicht werden. Die Dosis variiert abhängig von den Patienten, an die verabreicht wird, der Zielkrankheit, den Bedingungen, dem Verabreichungsweg etc.; wenn z.B. der erfindungsgemäße Antikörper für die Behandlung/Verhütung von Bandscheibenvorfall verwendet wird, wird er intravenös an einen Erwachsenen normalerweise in einer einzelnen Dosis von etwa 0,01 mg bis etwa 20 mg/kg Körpergewicht, bevorzugt etwa 1,0 bis etwa 10 mg/kg Körpergewicht und bevorzugter etwa 0,1 bis etwa 5 mg/Tag einmal bis etwa fünfmal am Tag, bevorzugt einmal bis etwa dreimal verabreicht. Bei der parenteralen Verabreichung auf anderen Wegen und bei der oralen Verabreichung kann eine Dosis ähnlich der oben angegebenen verabreicht werden. Wenn der Zustand ernst ist, kann die Dosis abhängig von dem Zustand erhöht werden.

[0185] Der erfindungsgemäße Antikörper kann allein oder als geeignete pharmazeutische Zusammensetzung verabreicht werden. Die pharmazeutische Zusammensetzung, die zur oben beschriebenen Verabreichung verwendet wird, enthält einen pharmakologisch annehmbaren Träger mit den vorher erwähnten Verbindungen oder Salzen davon, ein Verdünnungsmittel oder einen Hilfsstoff. Eine solche Zusammensetzung wird in dem Präparat, das für die orale oder parenterale Verabreichung geeignet ist, bereitgestellt.

[0186] D.h., Beispiele der Zusammensetzung für die orale Verabreichung schließen feste oder flüssige Präparate, spezifisch Tabletten (einschließlich Dragees und filmbeschichtete Tabletten), Pillen, Körnchen, pulverige Präparate, Kapseln (einschließlich Weichkapseln), Sirup, Emulsionen, Suspensionen etc. ein. Eine solche Zusammensetzung wird hergestellt mit allgemein bekannten Methoden und enthält ein Vehikel, ein Verdünnungsmittel oder einen Träger, die üblicherweise auf dem Gebiet der pharmazeutischen Präparate verwendet werden. Beispiele für den Vehikel oder Träger für Tabletten sind Lactose, Stärke, Saccharose, Magnesiumstearat etc.

[0187] Beispiele für die Zusammensetzung für die parenterale Verabreichung, die verwendet werden kann, sind Injektionen, Zäpfchen etc. und die Injektionen schließen die Form von intravenösen, subcutanen, transcutanen, intramuskulären und Infusionsinjektionen ein. Solche Injektionen werden mit allgemein bekannten Methoden hergestellt, z.B. indem der vorher erwähnte Antikörper oder ein Salz in einem sterilen wässrigen oder ölig flüssigen Medium gelöst, suspendiert oder emulgiert wird. Für das wässrige Medium zur Injektion werden z.B. physiologische Kochsalzlösung und isotonische Lösungen, die Glucose und andere Adjuvantien enthalten, verwendet. Geeignete Auflösungshilfsmittel, z.B. Alkohol (z.B. Ethanol), Polyalkohol [z.B. Propylenglycol, Polyethylenglycol], nichtionische Tenside (z.B. Polysorbat 80TM, HC-50 (Polyoxyethylen-(50 Mol)-Addukt von hydriertem Rizinusöl)] können in Kombination verwendet werden. Für die ölige Lösung werden z.B. Sesamöl, Sojaöl und dgl. verwendet werden und Auflösungshilfsmittel, wie Benzylbenzoat und Benzylalkohol können in Kombination verwendet werden. Die so hergestellte Flüssigkeit zur Injektion wird normalerweise in eine geeignete Ampulle gefüllt. Das für die rektale Verabreichung verwendete Zäpfchen wird hergestellt, indem der vorher erwähnte Antikörper oder ein Salz mit üblichen Zäpfchengrundstoffen vermischt wird.

[0188] Die oben beschriebene orale oder parenterale pharmazeutische Zusammensetzung wird vorteilhafterweise in einer Einheitsdosierungsform hergestellt, die für die Dosis des aktiven Inhaltsstoffs geeignet ist. Bei-

spiele für solche Einheitsdosierungsformen schließen Tabletten, Pillen, Kapseln, Injektionen (Ampullen), Zäpfchen etc. ein. Es ist bevorzugt, dass der oben beschriebene Antikörper allgemein in einer Dosis von 5 bis 500 mg pro Einheitsdosierungsform, 5 bis 100 mg insbesondere für Injektionen und 10 bis 250 mg für andere Präparate enthalten ist.

[0189] Diese oben beschriebene Zusammensetzung kann weiterhin andere aktive Komponenten enthalten, wenn nicht die Formulierung mit dem Antikörper negative Wechselwirkungen verursacht.

(7) DNA-transgenes Tier

[0190] Die vorliegende Erfindung liefert ein nicht menschliches Säugetier, das die DNA trägt, die das erfindungsgemäße Polypeptid codiert, die exogen (im Folgenden als erfindungsgemäße exogene DNA oder exogene DNA der vorliegenden Erfindung bezeichnet) oder mutierte DNA (manchmal einfach als exogene Mutanten-DNA oder mutierte DNA der vorliegenden Erfindung bezeichnet) ist.

[0191] Somit liefert die vorliegende Erfindung:

- (i) ein nicht menschliches Säugetier, das die exogene DNA oder Mutanten-DNA trägt;
- (ii) das Säugetier gemäß (i), wobei das nicht menschliche Säugetier ein Nagetier ist;
- (iii) das Säugetier gemäß (ii), wobei das Nagetier eine Maus oder eine Ratte ist und
- (iv) einen rekombinanten Vektor, der die exogene DNA der vorliegenden Erfindung oder die Mutanten-DNA trägt und in einem Säugetier exprimiert werden kann.

[0192] Das nicht menschliche Säugetier, das die exogene DNA der vorliegenden Erfindung oder die Mutanten-DNA trägt (im Folgenden einfach als DNA-transgenes Tier der vorliegenden Erfindung bezeichnet) kann erzeugt werden, indem eine gewünschte DNA in ein nicht befruchtetes Ei, befruchtetes Ei, Spermatozoon, eine Keimzelle, die eine unentwickelte Keimzelle davon enthält oder dgl. transfiziert wird, bevorzugt im embryogenen Zustand der Entwicklung eines nicht menschlichen Säugers (bevorzugter im Einzelzellstadium oder dem Stadium der befruchteten Zelle und allgemein vor der 8-Zellphase) mit Standardmitteln, wie der Calciumphosphatmethode, der elektrischen Pulsmethode, der Lipofektionsmethode, der Agglutinierungsmethode, der Mikroinjektionsmethode, der Teilchenpistolenmethode, der DEAE-Dextranmethode etc. Es ist auch möglich, die exogene DNA der vorliegenden Erfindung in eine somatische Zelle, ein lebendes Organ, eine Gewebezelle oder dgl. mit DNA-Transfektionsmethoden zu transfizieren und den Transformanten für Zellkultur, Gewebekultur etc. zu verwenden. Diese Zellen können außerdem mit der oben erwähnten Keimzelle mit einer allgemein bekannten Zellfusionsmethode fusioniert werden, um das transgene Tier der vorliegenden Erfindung zu erzeugen.

[0193] Beispiele für das nicht menschliche Säugetier, das verwendet werden kann, schließen Rind, Schwein, Schaf, Ziege, Kaninchen, Hunde, Katzen, Meerschweinchen, Hamster, Ratten, Mäuse und dgl. ein. Generell bevorzugt sind Nagetiere, insbesondere Mäuse (z.B. C57B1/6-Stamm, DBA2-Stamm etc. für eine reine Linie und für eine Kreuzlinie B6C3F₁-Stamm, BDF₁-Stamm, B6D2F₁-Stamm, BALB/c-Stamm, ICR-Stamm etc.) oder Ratten (Wistar, SD etc.), da sie eine relative kurze Ontogenese und einen kurzen Lebenszyklus haben aus der Sicht, dass Modelltiere für menschliche Krankheiten erzeugt werden.

[0194] Bei einem rekombinanten Vektor, der in Säugetieren exprimiert werden kann, schließen "Säugetiere" bzw. "Säuger" zusätzlich zu den vorher erwähnten nicht menschlichen Säugern Menschen etc. ein.

[0195] Die exogene DNA der vorliegenden Erfindung bezieht sich auf die DNA der vorliegenden Erfindung, sobald sie aus Säugetieren isoliert und extrahiert wurde, nicht auf die DNA der vorliegenden Erfindung, die inhärent in den nicht menschlichen Säugetieren enthalten ist.

[0196] Die Mutanten-DNA bzw. mutierte DNA der vorliegenden Erfindung schließt Mutanten ein, die durch Variation (z.B. Mutation etc.) in der Basensequenz der ursprünglichen DNA der vorliegenden Erfindung entstehen, spezifisch DNAs, die durch Basenaddition, Deletion, Substitution durch andere Basen etc. entstehen und schließt weiterhin anomale DNA ein.

[0197] Die anomale DNA soll die DNA bedeuten, die das anomale Polypeptid der vorliegenden Erfindung exprimiert und beispielhaft dafür ist eine DNA, die ein Protein exprimiert, das die Funktionen des normalen erfindungsgemäßen Polypeptids unterdrücken kann.

[0198] Die exogene DNA der vorliegenden Erfindung kann eine sein, die von einem Säugetier der gleichen

Art stammt oder von einer anderen Art als das Zieltier. Bei der Transfektion der DNA der vorliegenden Erfindung ist es allgemein vorteilhaft, die DNA als DNA-Konstrukt zu verwenden, bei dem die DNA stromabwärts eines Promotors ligiert ist, der die DNA in dem Zieltier exprimieren kann. Im Fall der Transfektion der Human-DNA der vorliegenden Erfindung kann z.B. ein DNA-transgenes Säugetier, das die DNA der vorliegenden Erfindung in hohem Ausmaß exprimiert, hergestellt werden, indem ein DNA-Konstrukt (z.B. Vektor etc.), das mit der menschlichen DNA der vorliegenden Erfindung, stromabwärts verschiedener Promotoren ligiert ist, die fähig sind, die DNA, die von verschiedenen Säugetieren stammt, zu exprimieren (z.B. Kaninchen, Hunde, Katzen, Meerschweinchen, Hamster, Ratten, Mäuse etc.), die die DNA der vorliegenden Erfindung tragen, die äußerst homolog zu der Human-DNA ist, in ein befruchtetes Ei des nicht-menschlichen Zieltiers mikroinjiziert wird.

[0199] Als Expressionsvektoren für das erfindungsgemäße Polypeptid gibt es von *Escherichia coli* stammende Plasmide, von *Bacillus subtilis* stammende Plasmide, von Hefe stammende Plasmide, Bakteriophagen, wie λ -Phage, Retroviren, wie Moloney-Leukämievirus etc. und Tierviren, wie Vacciniavirus, Baculovirus etc. Von diesen Viren werden von *Escherichia coli* stammende Plasmide, von *Bacillus subtilis* stammende Plasmide, oder von Hefe stammende Plasmide bevorzugt verwendet.

[0200] Beispiele für diese Promotoren zur Regulation der DNA-Expression schließen ein 1) Promotoren für DNA, die aus Viren stammt (z.B. Simianvirus, Cytomegalovirus, Moloney-Leukämievirus, JC-Virus, Brustkrebsvirus, Poliovirus etc.) und 2) Promotoren, die aus verschiedenen Säugetieren stammen (Mensch, Kaninchen, Hund, Katze, Meerschweinchen, Hamster, Ratte, Maus etc.), z.B. Promotoren für Albumin, Insulin II, Uroplakin II, Elastase, Erythropoietin, Endothelin, Muskelkreatinkinase, gliafibrilläres saures Protein (glial fibrillary acidic protein), Glutathion-S-Transferase, von Thrombozyten gebildeter Wachstumsfaktor β , Keratine K1, K10 und K14, Collagentypen I und II, von cyclischem AMP abhängige Proteinkinase β I-Untereinheit, Dysmorphin, tartratresistente alkalische Phosphatase, atrialer natriuretischer Faktor, Endothelrezeptor-Tyrosinkinase (allgemein abgekürzt als Tie2), Natrium-Kalium-Adenosintriphosphorylase (Na,K-ATPase), leichte Kette des Neurofilaments, Metallothioneine I und IIA, Metalloproteinase-I-Gewebeinhibitor, MHC Klasse 1-Antigen (H-2L), H-ras, Renin, Dopamin- β -Hydroxylase, Schilddrüsenperoxidase (TPO), Polypeptidkettenverlängerungsfaktor 1 α (EF-1 α), β -Actin, α - und β -Myosinschwerketten, Myosinleichtketten 1 und 2, basisches Myelinprotein, Thyroglobuline, Thy-1, Immunglobuline, variable Region der H-Kette (VNP), Serumamyloidkomponente P, Myoglobin, Troponin C, α -Actin von glatten Muskeln, Präproenzephalin A, Vasopressin etc. Von diesen sind Cytomegaloviruspromotoren, Humanpolypeptidverlängerungsfaktor-1 α -(EF-1 α)-Promotoren, β -Actinpromotoren aus Mensch und Huhn etc., die im gesamten Körper stark exprimiert werden können, bevorzugt.

[0201] Es ist bevorzugt, dass die oben beschriebenen Vektoren eine Sequenz aufweisen, um die Transkription der gewünschten Messenger-RNA in dem DNA-transgenen Tier zu beenden (allgemein als Terminator bezeichnet); z.B. eine Sequenz aus jeder DNA, die aus Viren und verschiedenen Säugetieren stammt. Der SV40-Terminator des Simianvirus etc. wird bevorzugt verwendet.

[0202] Um die Expression der gewünschten exogenen DNA auf einen höheren Grad zu erhöhen, kann zusätzlich das Spleiß-Signal und die Enhancer-Region jeder DNA, ein Teil des Introns einer eukaryotischen DNA am 5'-Ende stromaufwärts der Promotorregion ligiert werden oder zwischen Promotorregion und Translationsregion oder stromabwärts am 3'-Ende des Translationsbereichs, abhängig vom Zweck.

[0203] Der Translationsbereich für das normale Polypeptid der vorliegenden Erfindung kann erhalten werden unter Verwendung der gesamten genomischen DNA oder eines Teils daraus aus Leber, Niere, Schilddrüsenzellen oder von Fibroblasten aus Menschen oder verschiedenen Säugetieren (z.B. Kaninchen, Hunde, Katzen, Meerschweinchen, Hamster, Ratten, Mäuse etc.) oder von verschiedenen kommerziell verfügbaren genomischen DNA-Banken oder unter Verwendung von komplementärer DNA, die mit allgemein bekannten Methoden aus RNA von Leber, Niere, Schilddrüsenzellen oder Fibroblasten als Ausgangsmaterial hergestellt wurde, als Ausgangsmaterial. Auch exogene anomale DNA kann erhalten werden unter Verwendung komplementärer DNA, die mit allgemein bekannten Methoden aus RNA, die aus Humanfibroblasten stammt, als Ausgangsmaterial hergestellt wird. Alternativ kann der Translationsbereich für einen Translationsbereich eines normalen Polypeptids, das aus den oben beschriebenen Zellen oder Geweben erhalten wurde durch Punktmutagenese variiert werden.

[0204] Der Translationsbereich kann mit üblicher DNA-Gentechnik erstellt werden, wobei die DNA stromabwärts des vorher erwähnten Promotors und, falls erwünscht, stromaufwärts der Translationsterminationsstelle ligiert wird, als ein DNA-Konstrukt, das in einem transgenen Tier exprimiert werden kann.

[0205] Die exogene DNA der vorliegenden Erfindung wird in ein Ei auf der Stufe der befruchteten Eizelle in solcher Weise transfiziert, dass die DNA sicher in allen Keimzellen und somatischen Zellen des Zielsäugetiers vorhanden ist. Die Tatsache, dass die exogene DNA der vorliegenden Erfindung in den Keimzellen des Tieres vorhanden ist, das durch DNA-Transfektion hergestellt wurde, bedeutet, dass alle Nachkommen des hergestellten Tiers die exogene DNA der vorliegenden Erfindung in allen Keimzellen und somatischen Zellen behalten werden. Die Nachkommen des Tiers, das die exogene DNA der vorliegenden Erfindung beherbergt, haben auch die exogene DNA in allen Keimzellen und somatischen Zellen davon.

[0206] Das nicht menschliche Tier, in das die normale exogene DNA der vorliegenden Erfindung transfiziert wurde, kann als DNA tragendes Tier in normaler Aufzuchtumgebung mehrere Passagen durchlaufen, wodurch bestätigt wird, dass die exogene DNA stabil erhalten bleibt durch Paarbildung.

[0207] Bei der Transfektion der exogenen DNA der vorliegenden Erfindung in ein Ei auf der Stufe der befruchteten Eizelle wird die DNA zurückgehalten, um in allen Keimzellen und somatischen Zellen im Überschuss zu sein. Die Tatsache, dass die exogene DNA der vorliegenden Erfindung in den Keimzellen des vorbereiteten Tiers nach Transfektion im Überschuss vorhanden ist, bedeutet, dass die exogene DNA der vorliegenden Erfindung übermäßig in allen Keimzellen und somatischen Zellen vorhanden ist. Die Nachkommen des Tiers, das die exogene DNA der vorliegenden Erfindung beherbergt, haben die DNA der vorliegenden Erfindung in allen Keimzellen und somatischen Zellen im Überschuss.

[0208] Indem ein homozygotes Tier mit der transfizierten DNA in beiden homologen Chromosomen erhalten wird und ein männliches Tier und ein weibliches Tier gepaart werden, können alle Nachkommen Passagen durchlaufen, um die DNA zu behalten.

[0209] In einem nicht menschlichen Säugetier, das die normale DNA der vorliegenden Erfindung trägt, wird die normale DNA der vorliegenden Erfindung in einem hohen Ausmaß exprimiert und kann schließlich die Überfunktion des Polypeptids der vorliegenden Erfindung entwickeln, indem die Funktionen der endogenen normalen DNA gefördert werden. Daher kann das Tier als pathologisches Modelltier für eine solche Krankheit verwendet werden. Spezifisch wird es unter Verwendung des normalen DNA-transgenen Tiers der vorliegenden Erfindung möglich, die Überfunktion des Polypeptids der vorliegenden Erfindung zu beleuchten und den pathologischen Mechanismus der mit dem Protein der vorliegenden Erfindung verbundenen Krankheit zu klären und zu bestimmen, wie die Krankheit zu behandeln ist.

[0210] Da ein Säugetier, das mit der exogenen normalen DNA der vorliegenden Erfindung transfiziert ist, zunehmend Symptome des freigesetzten Polypeptids zeigt, kann das Tier weiterhin zum Screenen von therapeutischen Mitteln für die Krankheit, die mit dem erfindungsgemäßen Polypeptid verbunden ist, verwendet werden.

[0211] Andererseits kann ein nicht-menschlicher Säuger mit der exogenen anomalen DNA der vorliegenden Erfindung unter normalen Brutbedingungen als DNA-tragendes Tier subkultiviert werden, indem bestätigt wird, dass die exogene DNA über Kreuzung stabil erhalten bleibt. Außerdem kann die vorliegende exogene DNA als Ausgangsmaterial verwendet werden, indem DNA in das oben beschriebene Plasmid inseriert wird. Das DNA-Konstrukt mit einem Promotor kann hergestellt werden unter Verwendung üblicher Gentechnikverfahren. Die Transfektion der anomalen DNA der vorliegenden Erfindung auf der Stufe der befruchteten Eizelle dient dazu, dass diese in allen Keimzellen und somatischen Zellen der Säugetiere, die ihr unterzogen werden, vorhanden ist. Die Tatsache, dass die anomale DNA der vorliegenden Erfindung in den Keimzellen des Tiers nach DNA-Transfektion vorhanden ist, bedeutet, dass alle Nachkommen des behandelten Tiers die anomale DNA der vorliegenden Erfindung in allen Keimzellen und somatischen Zellen aufweisen. Solche Nachkommen, denen die exogene DNA der vorliegenden Erfindung übertragen wurde, enthalten die anomale DNA der vorliegenden Erfindung in allen Keimzellen und somatischen Zellen. Ein homozygotes Tier mit der eingeführten DNA auf beiden homologen Chromosomen kann erworben werden und dann können durch Paarbildung dieser männlichen und weiblichen Tiere alle Nachkommen so gezogen werden, dass sie die DNA haben.

[0212] Da der nicht menschliche Säuger mit der anomalen DNA der vorliegenden Erfindung die anomale DNA der vorliegenden Erfindung in einem hohen Grad exprimiert, kann dies bei dem Tier eine Adaptionsunvermögen der funktionsinaktiven Art („function inactive type inadaptability“) des erfindungsgemäßen Polypeptids verursachen, indem die Funktionen der endogenen normalen DNA gehemmt werden und kann als Tiermodell für die Krankheit verwendet werden. Z.B. ist es unter Verwendung eines mit anomaler DNA transfizierten Tiers der vorliegenden Erfindung möglich, den Mechanismus der Nichtanpassbarkeit aufgrund einer inaktiven Funktion des Polypeptids der vorliegenden Erfindung zu beleuchten und eine Methode zur Behandlung dieser Krankheit zu untersuchen.

[02113] Genauer wird erwartet, dass das transgene Tier der vorliegenden Erfindung, das die anomale DNA der vorliegenden Erfindung in einem hohen Ausmaß exprimiert, als Versuchsmodell dient, um den Mechanismus der funktionellen Hemmung (dominanter negativer Effekt) eines normalen Polypeptids durch das anomale Polypeptid der vorliegenden Erfindung bei einem Adaptionsunvermögen der funktionsinaktiven Art des Polypeptids der vorliegenden Erfindung zu beleuchten.

[02114] Ein Säugetier, das die anomale exogene DNA der vorliegenden Erfindung trägt, sollte auch zum Screenen eines Wirkstoffkandidaten für die Behandlung des Adaptionsunvermögens der funktionsinaktiven Art des Polypeptids der vorliegenden Erfindung dienen können, da das Polypeptid der vorliegenden Erfindung in einem solchen Tier in freier Form ansteigt.

[02115] Weitere mögliche Anwendungen von zwei Arten der transgenen Tiere, die oben beschrieben wurden, schließen ein:

- 1) Verwendung als Zellquelle für Gewebekultur;
- 2) Aufklärung des Zusammenhangs mit einem Polypeptid, das spezifisch exprimiert oder aktiviert wird durch das erfindungsgemäße Polypeptid durch direkte Analyse von DNA oder RNA in Gewebe des DNA-transgenen Tiers der vorliegenden Erfindung oder durch Analyse des Polypeptidgewebes, das durch die DNA exprimiert wird;
- 3) Erforschung der Funktion von Zellen, die aus Geweben stammen, die gewöhnlich nur mit Schwierigkeit kultiviert werden können, unter Verwendung von Zellen aus Gewebe, die die DNA tragen, die mit Standardgewebekulturtechnik gezüchtet wurden;
- 4) Screenen nach einem Wirkstoff, der die Funktionen von Zellen verbessert unter Verwendung der oben in 3) beschriebenen Zellen und
- 5) Isolierung und Reinigung der variierenden Polypeptide der vorliegenden Erfindung und Herstellung von Antikörpern dafür.

[02116] Weiterhin können klinische Zustände einer Krankheit, die mit dem erfindungsgemäßen Polypeptid verbunden sind, einschließlich des Adaptionsunvermögens der funktionsinaktiven Art an das Polypeptid der vorliegenden Erfindung bestimmt werden unter Verwendung des DNA-transgenen Tiers der vorliegenden Erfindung. Pathologische Erkenntnisse an jedem Organ bei einem Krankheitsmodell, das mit dem Polypeptid der vorliegenden Erfindung verbunden ist, können auch in größerem Detail erhalten werden, was zur Entwicklung einer neuen Methode zur Behandlung führt und ebenso zur Erforschung und Therapie irgendwelcher sekundären Krankheiten, die mit dieser Krankheit verbunden sind.

[02117] Es ist auch möglich, eine freie mit DNA transfizierte Zelle zu erhalten, indem jedes Organ aus dem DNA-transgenen Tier der vorliegenden Erfindung entnommen wird, das Organ zerkleinert wird und mit einer Proteinase, wie Trypsin etc. aufgearbeitet wird und anschließend die Linie von zu züchtenden oder gezüchteten Zellen etabliert wird. Weiterhin kann das DNA-transgene Tier der vorliegenden Erfindung zur Identifikation von Zellen dienen, die das Polypeptid der vorliegenden Erfindung erzeugen können und für Untersuchungen zum Zusammenhang mit Apoptose, Differenzierung oder Vermehrung oder zum Mechanismus der Signaltransduktion bei diesen Eigenschaften, um jegliche Anormalität zu untersuchen. Somit kann das DNA-transgene Tier der vorliegenden Erfindung ein effektives Forschungsmaterial für das erfindungsgemäße Polypeptid und zur Erhellung von dessen Funktion und Wirkung liefern.

[02118] Um Pharmazeutika zur Behandlung von Krankheiten zu entwickeln, die mit dem erfindungsgemäßen Polypeptid verbunden sind, einschließlich des Adaptionsunvermögens der funktionsinaktiven Art des erfindungsgemäßen Polypeptids unter Verwendung des DNA-transgenen Tiers der vorliegenden Erfindung kann eine wirksame und schnelle Screening-Methode bereitgestellt werden unter Verwendung der Methode zur Untersuchung und der Methode zur quantitativen Bestimmung etc., wie oben beschrieben. Es ist auch möglich, eine Methode zur DNA-Therapie zur Behandlung von Krankheiten, die mit dem erfindungsgemäßen Polypeptid verbunden sind, zu untersuchen und zu entwickeln unter Verwendung des DNA-transgenen Tiers der vorliegenden Erfindung oder eines Vektors, der die exogene DNA der vorliegenden Erfindung exprimieren kann.

(8) Knockout-Tier

[02119] Die vorliegende Erfindung liefert embryonische Stammzellen eines nicht menschlichen Säugetiers, die die DNA der vorliegenden Erfindung inaktiviert tragen und ein nicht menschliches Säugetier, das defizient ist im Hinblick auf die Expression der DNA der vorliegenden Erfindung.

[02200] Somit liefert die vorliegende Erfindung:

- (i) eine nicht menschliche embryonische Stammzelle, bei der die DNA der vorliegenden Erfindung inaktiviert ist;
- (ii) die embryonische Stammzelle gemäß (i), wobei die DNA inaktiviert ist, indem ein Reportergen eingeführt wurde (z.B. β -Galactosidasegen, das aus *Escherichia coli* stammt);
- (iii) die embryonische Stammzelle gemäß (i), die resistent ist gegen Neomycin;
- (iv) die embryonische Stammzelle gemäß (i), wobei das nicht menschliche Säugetier ein Nagetier ist;
- (v) eine embryonische Stammzelle gemäß (iv), wobei das Nagetier eine Maus ist;
- (vi) ein nicht menschliches Säugetier, das defizient ist in Bezug auf die Expression der DNA der vorliegenden Erfindung, wobei die DNA der vorliegenden Erfindung inaktiviert ist;
- (vii) das nicht menschliche Säugetier gemäß (v), wobei die DNA inaktiviert ist durch Insertion eines Reportergens (z.B. β -Galactosidase, die aus *Escherichia coli* stammt) und wobei das Reportergen unter der Kontrolle eines Promotors für die DNA der vorliegenden Erfindung exprimiert werden kann;
- (viii) das nicht menschliche Säugetier gemäß (vi), das ein Nagetier ist;
- (ix) das nicht menschliche Säugetier gemäß (viii), wobei das Nagetier eine Maus ist und
- (x) ein Verfahren zum Screenen einer Verbindung oder eines Salzes, die/das die Promotoraktivität der erfindungsgemäßen DNA fördert oder hemmt, das beinhaltet, dass eine Testverbindung dem Säugetier von (vii) verabreicht wird und die Expression des Reportergens nachgewiesen wird.

[0221] Die embryonische Stammzelle aus einem nicht menschlichen Säugetier, bei der die DNA der vorliegenden Erfindung inaktiviert ist, bezieht sich auf eine embryonische Stammzelle aus einem nicht menschlichen Säugetier, die die Fähigkeit des nicht menschlichen Säugetiers, die DNA zu exprimieren, unterdrückt, indem die DNA der vorliegenden Erfindung künstlich mutiert wird oder bei der die DNA im Wesentlichen keine Fähigkeit hat, das erfindungsgemäße Polypeptid zu exprimieren (im Folgenden manchmal als Knockout-DNA der vorliegenden Erfindung bezeichnet), indem die Aktivitäten des erfindungsgemäßen Polypeptids, das durch die DNA codiert wird, im Wesentlichen inaktiviert werden (im Folgenden kurz als ES-Zelle bezeichnet).

[0222] Als nicht menschlicher Säuger werden die gleichen Beispiele, wie oben beschrieben, angeführt. Techniken, um die DNA der vorliegenden Erfindung künstlich zu mutieren, schließen die Deletion eines Teils oder der gesamten DNA-Sequenz und Insertion oder Substitution durch andere DNA durch Gentechnik ein. Durch diese Variationen kann die Knockout-DNA der vorliegenden Erfindung hergestellt werden, z.B. indem der Leserahmen eines Codons verschoben wird oder indem die Funktion eines Promotors oder Exons gestört wird.

[0223] Spezifisch kann die embryonische Stammzelle eines nicht menschlichen Säugers, in der die DNA der vorliegenden Erfindung inaktiviert ist (im Folgenden nur als ES-Zelle, bei der die DNA der vorliegenden Erfindung inaktiviert ist oder Knockout-ES-Zelle der vorliegenden Erfindung bezeichnet) erhalten werden, indem z.B. die DNA der vorliegenden Erfindung, die das gewünschte nicht menschliche Säugetier besitzt, isoliert wird, ein DNA-Fragment mit einer DNA-Sequenz, die konstruiert wurde, indem ein Wirkstoffresistenzgen, wie ein Neomycinresistenzgen oder ein Hygromycinresistenzgen, oder ein Reportergen, wie lacZ (β -Galactosidasegen) oder cat (Chloramphenicol-Acetyltransferase-Gen) etc. in die Exonstelle integriert wurde, inseriert wird wodurch die Funktionen des Exons abgeschaltet werden, oder indem in ein Chromosom des jeweiligen Tiers z.B. durch homologe Rekombination in das Intron zwischen den Exons eine DNA-Sequenz integriert wird, die die Gentranskription beendet (z.B. polyA-Additionssignal etc.), so dass die Synthese der vollständigen Messenger-RNA gehemmt wird und schließlich das Gen zerstört wird (im Folgenden einfach als Zielvektor bezeichnet). Die so erhaltenen ES-Zellen werden einer Southern-Hybridisierungsanalyse mit einer DNA-Sequenz auf der DNA der vorliegenden Erfindung oder nahe der DNA der vorliegenden Erfindung als Sonde oder einer PCR-Analyse mit einer DNA-Sequenz auf dem Zielvektor und einer weiteren DNA-Sequenz nahe der DNA-Sequenz der vorliegenden Erfindung unterzogen, die nicht in dem Zielvektor enthalten ist, als Primer, um die Knockout-ES-Zelle der vorliegenden Erfindung auszuwählen.

[0224] Die Stamm-ES-Zellen können, um die DNA der vorliegenden Erfindung durch homologe Rekombination zu inaktivieren etc. von einem Stamm sein, der bereits etabliert ist, wie oben beschrieben, oder können ursprünglich etabliert werden gemäß einer Modifikation des bekannten Verfahrens von Evans und Kaufman oben. Im Fall von Maus-ES-Zellen ist es z.B. derzeit übliche Praxis, ES-Zellen des Stamms 129 zu verwenden. Da ihr immunologischer Hintergrund unklar ist, können C57BL/6-Mäuse oder die BDF₁-Mäuse (F₁-Hybrid zwischen C57BL/6 und DBA/2), worin die geringe Eiverfügbarkeit pro C57BL/6 in der C57BL/6-Maus verbessert wurde durch Kreuzung mit DBA/2, bevorzugt verwendet werden, statt eine reine Linie von ES-Zellen zu erhalten mit einem klaren immunologischen genetischen Hintergrund oder für andere Zwecke. Die BDF₁-Mäuse sind vorteilhaft, da dann, wenn ein pathologisches Modell für eine Maus erzeugt wird unter Verwendung von ES-Zellen, die daraus erhalten wurden, der genetische Hintergrund, verändert werden kann zu dem der C57BL/6-Maus, indem mit der C57BL/6-Maus rückgekreuzt wird, da dieser Hintergrund der von der

C57BL/6-Maus ist, was ebenso vorteilhaft ist, da die Eiverfügbarkeit pro Tier hoch ist und die Eier robust sind.

[0225] Bei der Etablierung von ES-Zellen werden üblicherweise Blastozysten 3,5 Tage nach der Befruchtung verwendet. Bei der vorliegenden Erfindung werden Embryos bevorzugt im 8-Zellstadium gesammelt nach Züchtung bis zum Blastozystenstadium werden die Embryos effizient verwendet, um eine große Anzahl von Embryos in frühem Stadium zu erhalten.

[0226] Obwohl die verwendeten ES-Zellen von beiderlei Geschlecht sein können, sind männliche ES-Zellen im Allgemeinen geeigneter zur Erzeugung einer Keimzelllinienchimäre und daher bevorzugt. Es ist wünschenswert, das Geschlecht sobald wie möglich zu bestimmen, um mühselige Kulturzeit zu sparen.

[0227] Verfahren zur Feststellung des Geschlechts der ES-Zelle schließen die Methode ein, bei der ein Gen in dem geschlechtsbestimmenden Bereich des Y-Chromosoms mit dem PCR-Verfahren amplifiziert wird und nachgewiesen wird. Wenn diese Methode verwendet wird, ist eine Kolonie von ES-Zellen (etwa 50 Zellen) ausreichend für die Analyse der Geschlechtsbestimmung, deren Karyotypanalyse, z.B. G-Banding-Methode, etwa 10^6 Zellen erfordert; die erste Selektion von ES-Zellen in frühem Kulturzustand kann daher auf der Geschlechtsbestimmung basieren und männliche Zellen können früh ausgewählt werden, was eine erhebliche Menge an Zeit in dem frühen Stadium der Kultur spart.

[0228] Die zweite Selektion kann z.B. erreicht werden durch die Bestätigung der Anzahl der Chromosomen durch G-Banding-Methode. Es ist im Allgemeinen wünschenswert, dass die Chromosomenzahl der erhaltenen ES-Zellen 100% der normalen Zahl ist. Wenn es jedoch schwierig ist, die Zellen mit der normalen Anzahl von Chromosomen zu erhalten aufgrund der physikalischen Operation etc. bei der Zelletablierung, ist es wünschenswert, dass die ES-Zelle wiederum mit einer normalen Zelle geklont wird (z.B. in Mauszellen mit einer Anzahl von Chromosomen von $2n = 40$) nachdem das Gen der ES-Zellen outgeknockt wurde.

[0229] Obwohl die so erhaltene embryonische Stammzelllinie ein sehr hohes Wachstumspotenzial zeigt, muss sie mit großer Sorgfalt subkultiviert werden, da sie dazu neigt, ihre ontogenische Fähigkeit zu verlieren. Die embryonische Stammzelllinie wird z.B. bei etwa 37°C in einem Kohlendioxidinkubator (bevorzugt etwa 5% Kohlendioxid und etwa 95% Luft oder etwa 5% Sauerstoff, etwa 5% Kohlendioxid und 90% Luft) in Gegenwart von LIF (1 bis 10.000 U/ml) auf geeigneten Feederzellen, wie STO-Fibroblasten, die mit einer Trypsin/EDTA-Lösung behandelt wurden (normalerweise etwa 0,001 bis etwa 0,5% Trypsin/etwa 0,1 bis etwa 5 mM EDTA, bevorzugt etwa 0,1% Trypsin/1 mM EDTA) zum Zeitpunkt der Subkultivierung kultiviert, um getrennte einzelne Zellen zu erhalten, die dann auf frisch vorbereitete Feederzellen ausgesät werden. Diese Passage wird normalerweise alle 1 bis 3 Tage durchgeführt; es ist wünschenswert, dass Zellen, die bei der Passage beobachtet wurden und Zellen, von denen gefunden wurde, dass sie in Kultur morphologisch anormal sind, falls vorhanden, entsorgt werden.

[0230] Indem zugelassen wird, dass die ES-Zellen eine hohe Dichte in Monolayers erreichen oder Zellaggregate in Suspension unter geeigneten Bedingungen bilden, ist es möglich, dass sie spontan differenzieren zu verschiedenen Zellarten, z.B. Parietal- und Visceralmuskeln, Herzmuskel oder dgl. (M.J. Evans und M.H. Kaufman, Nature, 292, 154, 1981; G.R. Martin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 7634, 1981; T.C. Doetschman et al., Journal of Embryology Experimental Morphology, 87, 27, 1985). Die Zellen, die defizient sind in Bezug auf die Expression der DNA der vorliegenden Erfindung, die aus den differenzierten ES-Zellen der vorliegenden Erfindung erhältlich sind, sind nützlich, um die Funktionen des erfindungsgemäßen Polypeptids zytologisch oder molekularbiologisch zu untersuchen.

[0231] Das nicht menschliche Säugetier, das defizient ist in Bezug auf die Expression der erfindungsgemäßen DNA, kann von normalen Tieren unterschieden werden, indem die Menge an mRNA in dem jeweiligen Tier gemessen wird mit einer allgemein bekannten Methode und indirekt der Expressionsgrad verglichen wird.

[0232] Als nicht menschliches Säugetier treffen die oben genannten Beispiele zu.

[0233] Im Hinblick auf das nicht menschliche Säugetier, das defizient ist im Hinblick auf die Expression der DNA der vorliegenden Erfindung, kann die DNA der vorliegenden Erfindung ausgeschaltet werden, indem ein Zielvektor, der wie oben beschrieben hergestellt wurde, in embryonische Stammzellen von nicht menschlichen Säugetieren oder Oozyten davon transfiziert wird und eine homologe Rekombination durchgeführt wird, bei der eine Zielvektor-DNA-Sequenz, worin die DNA der vorliegenden Erfindung durch Transfektion inaktiviert ist, durch die DNA der vorliegenden Erfindung ersetzt wird auf einem Chromosom einer embryonischen Stammzelle eines nicht menschlichen Säugetiers oder eines Embryos davon.

[0234] Die Knockout-Zellen mit der zerstörten erfindungsgemäßen DNA können durch Southern-Hybridisierungsanalyse mit einem DNA-Fragment auf oder nahe der DNA der vorliegenden Erfindung als Sonde oder durch PCR-Analyse unter Verwendung einer DNA-Sequenz auf dem Zielvektor und einer weiteren DNA-Sequenz, die nicht in dem Zielvektor enthalten ist, als Primer identifiziert werden. Wenn embryonische Stammzellen von nicht menschlichen Säugetieren verwendet werden, wird eine Zelllinie, worin die DNA der vorliegenden Erfindung inaktiviert ist durch homologe Rekombination, geklont; die entstehende Klonzelllinie wird z.B. in einen nicht menschlichen Säugetierembryo oder eine Blastozyste injiziert in einem geeigneten Stadium, wie dem 8-Zellstadium. Die entstehenden chimären Embryos werden in den Uterus des pseudoträchtigen nicht menschlichen Tiers transplantiert. Das entstehende Tier ist ein chimäres Tier, das sowohl aus Zellen mit dem normalen Locus der DNA der vorliegenden Erfindung als auch solchen mit einem künstlich mutierten Locus der DNA der vorliegenden Erfindung aufgebaut ist.

[0235] Wenn einige Keimzellen des chimären Tiers einen mutierten Locus auf der DNA der vorliegenden Erfindung haben, kann ein einzelnes Tier, bei dem das gesamte Gewebe aus Zellen mit einem mutierten Locus der DNA der vorliegenden Erfindung aufgebaut ist, aus einer Reihe von Nachkommen ausgewählt werden, die erhalten wurden, indem ein chimäres Tier mit einem normalen Tier gekreuzt wurde, z.B. durch Feststellung der Fellfarbe etc. Die einzelnen so erhaltenen Tiere sind normalerweise defizient bei der heterozygoten Expression des erfindungsgemäßen Peptids. Die einzelnen Tiere, die defizient sind im Hinblick auf die homozygote Expression des erfindungsgemäßen Polypeptids können aus Nachkommen der Kreuzung zwischen den Heterozygoten erhalten werden.

[0236] Wenn ein Oozyt oder eine Eizelle verwendet wird, kann eine DNA-Lösung injiziert werden, z.B. in den Pränucleus durch Mikroinjektion, wodurch ein transgenes nicht menschliches Säugetier mit einem Zielvektor, der in ein Chromosom eingeführt wurde, erhalten wird. Aus solchen transgenen nicht menschlichen Säugetieren können solche mit einer Mutation am Ort der DNA der vorliegenden Erfindung erhalten werden durch Selektion basierend auf homologer Rekombination.

[0237] Wie oben beschrieben, können einzelne Tiere, bei denen die DNA der vorliegenden Erfindung ausgeschaltet wurde, eine Subkultivierung unter üblichen Aufzuchtbedingungen zulassen, nachdem die erhaltenen einzelnen Tiere durch ihre Kreuzung sich als Knockout-Tiere erwiesen haben.

[0238] Weiterhin kann das Genitalsystem mit üblichen Methoden erhalten und aufrechterhalten werden. Durch Kreuzung von männlichen und weiblichen Tieren, die jeweils inaktivierte DNA aufweisen, können somit homozygote Tiere mit der inaktivierten DNA in beiden Loci erhalten werden. Die so erhaltenen Homozygoten können so aufgezogen werden, dass ein normales Tier und zwei oder mehr Homozygoten aus einem Muttertier erzeugt werden, um effizient solche Homozygoten zu erhalten. Indem männliche und weibliche Heterozygoten gekreuzt werden, werden Homozygoten und Heterozygoten mit der inaktivierten DNA fortgepflanzt und subkultiviert.

[0239] Die embryonische Stammzelle aus nicht menschlichem Säugetier, bei der die DNA der vorliegenden Erfindung inaktiviert ist, ist sehr nützlich, um ein nicht menschliches Säugetier herzustellen, das defizient ist im Hinblick auf die Expression der erfindungsgemäßen DNA.

[0240] Da dem nicht menschliche Säugetier, bei dem die DNA der vorliegenden Erfindung inaktiviert ist, verschiedene biologische Aktivitäten fehlen, die von dem Polypeptid der vorliegenden Erfindung stammen, kann ein solches Tier ein Krankheitsmodell sein für eine Krankheit, von der angenommen wird, dass sie durch inaktivierte biologische Aktivitäten des erfindungsgemäßen Polypeptids entsteht und bietet somit eine wirksame Studie, um die Ursachen und die Therapie für diese Krankheiten zu untersuchen.

(8a) Methode zum Screenen von Verbindungen mit therapeutischen/prophylaktischen Wirkungen für Krankheiten die durch Defizienz, Schäden etc. der DNA der vorliegenden Erfindung verursacht werden

[0241] Das nicht menschliche Säugetier, das defizient ist im Hinblick auf die Expression der DNA der vorliegenden Erfindung kann angewendet werden zum Screenen von Verbindungen mit therapeutischen/prophylaktischen Wirkungen für Krankheiten (chronische Polyarthris, Arthrosis deformans, Osteoporose, Bruch, Krebs etc.), die durch Defizienz, Schäden etc. der DNA der vorliegenden Erfindung verursacht werden.

[0242] Das bedeutet, die vorliegende Erfindung liefert ein Verfahren oder eine Methode zum Screenen einer Verbindung mit therapeutischen/prophylaktischen Wirkungen für Krankheiten, die durch Defizienz, Schäden etc. der DNA der vorliegenden Erfindung verursacht werden, das beinhaltet, dass eine Testverbindung dem

nicht menschlichen Säugetier, das defizient ist im Hinblick auf die Expression der DNA der vorliegenden Erfindung, verabreicht wird und eine Veränderung, die bei dem Tier auftritt, beobachtet und gemessen wird.

[0243] Als nicht menschliches Säugetier, das defizient ist im Hinblick auf die Expression der erfindungsgemäßen DNA, das für die Screening-Methode angewendet werden kann, treffen dieselben Beispiele, wie oben angegeben, zu.

[0244] Beispiele für Testverbindungen schließen Peptide, Proteine, Nichtpeptidverbindungen, synthetische Verbindungen, Fermentationsprodukte, Zellextrakte, pflanzliche Extrakte, Tiergewebeextrakte, Blutplasma und dgl. ein und diese Verbindungen können neue Verbindungen oder allgemein bekannte Verbindungen sein.

[0245] Spezifisch wird das nicht menschliche Säugetier, das defizient ist im Hinblick auf die Expression der DNA der vorliegenden Erfindung mit einer Testverbindung behandelt, ein Vergleich mit einem intakten Tier zur Kontrolle gemacht und eine Veränderung in jedem Organ, Gewebe, Krankheitszustand etc. des Tiers wird als Index verwendet, um die therapeutischen/prophylaktischen Wirkungen der Testverbindung festzustellen.

[0246] Zur Behandlung eines zu testenden Tiers mit einer Testverbindung wird z.B. eine orale Verabreichung, intravenöse Injektion etc. angewendet und die Behandlung wird geeigneterweise ausgewählt abhängig von dem Zustand des Testtieres, den Eigenschaften der Testverbindung etc. Weiterhin kann eine Menge einer zu verabreichenden Testverbindung ausgewählt werden abhängig von dem Verabreichungsweg, der Art der Testverbindung und dgl.

[0247] Im Fall des Screenens einer Verbindung mit einer therapeutischen/prophylaktischen Wirkung auf Krankheiten, wie chronische Polyarthrit, Arthrosis deformans, Osteoporose, Knochenbruch, Krebs etc. wird z.B. das nicht menschliche Säugetier, das defizient ist im Hinblick auf die Expression der DNA der vorliegenden Erfindung einer Zuckerbelastungsbehandlung unterzogen, eine Testverbindung wird verabreicht vor oder nach der Zuckerbelastungsbehandlung und Blutzuckerpegel, Körpergewichtsveränderung etc. des Tiers wird im Verlauf der Zeit gemessen.

[0248] Bei der obigen Screeningmethode kann die Testverbindung, wenn sie einem Tier, das getestet werden soll, gegeben wird und gefunden wird, dass sie den Blutzuckerpegel des Tiers auf mindestens etwa 10%, bevorzugt mindestens etwa 30% und bevorzugter mindestens etwa 50% senkt, ausgewählt werden als eine Verbindung mit einer therapeutischen und prophylaktischen Wirkung für die obigen Krankheiten.

[0249] Die unter Verwendung der obigen Screeningmethode erhaltene Verbindung ist eine Verbindung ausgewählt aus den oben beschriebenen Testverbindungen und zeigt eine therapeutische/prophylaktische Wirkung für die Krankheiten (chronische Polyarthrit, Arthrosis deformans, Osteoporose, Knochenbruch, Krebs etc.), die durch Mängel, Schäden etc. des Polypeptids der vorliegenden Erfindung verursacht werden. Daher kann die Verbindung als ein sicherer und wenig toxischer Wirkstoff für die Behandlung und Verhütung dieser Krankheiten verwendet werden. Weiterhin können Verbindungen, die von einer solchen Verbindung abgeleitet sind, die durch das obige Screening erhalten wurde, in gleicher Weise angewendet werden.

[0250] Die durch das obige Screening erhaltene Verbindung kann in Form von Salzen mit physiologisch annehmbaren Säuren (z.B. anorganischen Säuren oder organischen Säuren) oder Basen (z.B. Alkalisalzen) bevorzugt in Form von physiologisch annehmbaren Säureadditionssalzen verwendet werden. Beispiele für solche Salze sind Salze mit anorganischen Säuren (z.B. Salzsäure, Phosphorsäure, Bromwasserstoffsäure, Schwefelsäure), Salze mit organischen Säuren (z.B. Essigsäure, Ameisensäure, Propionsäure, Fumarsäure, Maleinsäure, Bernsteinsäure, Weinsäure, Citronensäure, Äpfelsäure, Oxasäure, Benzoessäure, Methansulfonsäure, Benzolsulfonsäure) und dgl.

[0251] Ein pharmazeutisches Mittel, das die durch die obige Screeningmethode erhaltene Verbindung oder Salze davon enthält, kann auf gleiche Weise hergestellt werden, wie bei dem Verfahren zur Herstellung der Zusammensetzung, das das erfindungsgemäße Polypeptid enthält, wie oben beschrieben.

[0252] Da die so erhaltene pharmazeutische Zusammensetzung sicher und wenig toxisch ist, kann sie an Menschen und andere Säugetiere (z.B. Ratte, Maus, Meerschweinchen, Kaninchen, Schaf, Schwein, Rind, Pferd, Katze, Hund, Affe etc.) verabreicht werden.

[0253] Obwohl die Menge der Verbindung oder ihres Salzes, die verabreicht werden soll, variiert abhängig von der jeweiligen Krankheit, dem zu behandelnden Patienten, dem Verabreichungsweg etc., wird die Verbin-

zung dann, wenn sie oral verabreicht wird, zur Behandlung der chronischen Polyarthrit im Allgemeinen an einen Erwachsenen (mit 60 kg Körpergewicht) in einer Dosis von etwa 0,1 mg/Tag bis etwa 100 mg/Tag, bevorzugt etwa 1,0 mg/Tag bis etwa 50 mg/Tag, bevorzugter etwa 1,0 mg bis etwa 20 mg verabreicht. Für die parenterale Verabreichung variiert eine einzelne Dosis der Verbindung abhängig von dem Patienten, an den sie verabreicht wird, der Zielkrankheit etc., aber wenn die Verbindung an einen Erwachsenen (mit 60 kg Körpergewicht) in Form eines injizierbaren Präparates für chronische Polyarthrit verabreicht wird, ist es im Allgemeinen vorteilhaft, die Verbindung intravenös in einer Dosis von etwa 0,01 mg/Tag bis etwa 30 mg/Tag, bevorzugt etwa 0,1 mg/Tag bis etwa 20 mg/Tag, bevorzugter etwa 0,1 mg/Tag bis etwa 10 mg/Tag zu verabreichen, obwohl die Einzeldosis variiert abhängig von dem jeweiligen Patienten, der jeweiligen Krankheit etc. Wie bei anderen Tieren kann die Zusammensetzung in der obigen Menge verabreicht werden, die entsprechend dem Körpergewicht von 60 kg umgewandelt wird.

(8b) Methode zum Screenen einer Verbindung, die die Aktivitäten eines Promotors der DNA der vorliegenden Erfindung fördert oder hemmt

[0254] Die vorliegende Erfindung liefert ein Verfahren zum Screenen einer Verbindung oder eines Salzes davon, die/das die Aktivitäten eines Promotors für die DNA der vorliegenden Erfindung fördert oder hemmt, das beinhaltet, dass eine Testverbindung an ein nicht menschliches Säugetier, das defizient ist in Bezug auf die Expression der DNA der vorliegenden Erfindung, verabreicht wird und die Expression des Reportergens nachgewiesen wird.

[0255] Bei der oben beschriebenen Screeningmethode wird das nicht menschliche Säugetier, das defizient ist im Hinblick auf die Expression der DNA der vorliegenden Erfindung ausgewählt aus dem vorher erwähnten nicht menschlichen Säugetier, das defizient ist im Hinblick auf die Expression der DNA der vorliegenden Erfindung, als ein Tier, bei dem die DNA der vorliegenden Erfindung inaktiviert ist, durch Einfügung eines Reportergens und das Reportergen unter der Kontrolle eines Promotors der DNA der vorliegenden Erfindung exprimiert werden kann.

[0256] Die gleichen Beispiele für die Testverbindungen treffen auf spezifische Verbindungen, die für das Screening verwendet werden, zu.

[0257] Als Reportergen treffen die gleichen spezifischen Beispiele, wie oben beschrieben, zu und β -Galactosidase (lacZ), das Gen für lösliche alkalische Phosphatase, Luciferasegen und dgl. werden bevorzugt angewendet.

[0258] Da ein Reportergen unter der Kontrolle eines Promotors der DNA der vorliegenden Erfindung bei dem nicht menschlichen Säugetier, das defizient ist im Hinblick auf die Expression der DNA der vorliegenden Erfindung, vorhanden ist, wobei die DNA der vorliegenden Erfindung durch das Reportergen ersetzt ist, kann die Aktivität des Promotors nachgewiesen werden, indem die Expression einer Substanz, die durch das Reportergen codiert wird, verfolgt wird.

[0259] Wenn ein Teil der DNA-Region, die das Polypeptid der vorliegenden Erfindung codiert, z.B. durch ein β -Galactosidasegen (lacZ), das aus *Escherichia coli* stammt, substituiert ist, wird β -Galactosidase in einem Gewebe exprimiert, wo das erfindungsgemäße Polypeptid ursprünglich exprimiert werden sollte anstatt des Polypeptids der vorliegenden Erfindung. Somit kann der Zustand der Expression des Polypeptids der vorliegenden Erfindung leicht in vivo an einem Tier beobachtet werden, indem mit einem Reagenz gefärbt wird, z.B. 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -galactopyranosid (X-gal), das ein Substrat für β -Galactosidase ist. Spezifisch wird eine Maus, die defizient ist in Bezug auf das Polypeptid der vorliegenden Erfindung oder ein Gewebeabschnitt mit Glutaraldehyd etc. fixiert. Nach dem Waschen mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) wird das System mit einer färbenden Lösung, die X-gal enthält, bei Raumtemperatur oder etwa 37°C ungefähr 30 Minuten bis 1 Stunde umgesetzt. Nachdem die β -Galactosidasereaktion beendet ist durch Waschen des Gewebepreparats mit 1 mM EDTA/PBS-Lösung wird die gebildete Farbe beobachtet. Alternativ kann mRNA, die lacZ codiert, in üblicher Weise nachgewiesen werden.

[0260] Die unter Verwendung der obigen Screeningmethode erhaltene Verbindung oder die Salze davon sind Verbindungen, die aus Testverbindungen, wie oben beschrieben, ausgewählt wurden und die Promotoraktivität der DNA der vorliegenden Erfindung fördern oder hemmen.

[0261] Die mit der obigen Screeningmethode erhaltene Verbindung kann in Form von Salzen mit physiologisch annehmbaren Säuren (z.B. anorganischen Säuren oder organischen Säuren) oder Basen (z.B. Alkalisal-

zen) verwendet werden, bevorzugt in Form von physiologisch annehmbaren Säureadditionssalzen. Beispiele für solche Salze sind Salze mit anorganischen Säuren (z.B. Salzsäure, Phosphorsäure, Bromwasserstoffsäure, Schwefelsäure), Salze mit organischen Säuren (z.B. Essigsäure, Ameisensäure, Propionsäure, Fumarsäure, Maleinsäure, Bernsteinsäure, Weinsäure, Citronensäure, Äpfelsäure, Oxalsäure, Benzoesäure, Methansulfonsäure, Benzolsulfonsäure) und dgl.

[0262] Da die Verbindungen oder Salze davon, die die Promotor-Aktivität der DNA der vorliegenden Erfindung fördern, die Expression des erfindungsgemäßen Polypeptids fördern können oder die Funktionen des Polypeptids fördern können, sind sie nützlich als sichere und wenig toxische Pharmazeutika zur Behandlung/Verhütung von Krankheiten wie chronische Polyarthrit, Arthrosis deformans, Osteoporose, Knochenbruch, Krebs etc.

[0263] Andererseits können die Verbindungen oder Salze davon, die die Promotor-Aktivität der DNA der vorliegenden Erfindung hemmen, die Expression des erfindungsgemäßen Polypeptids hemmen oder können die Funktionen des Polypeptids hemmen und sind daher nützlich als sichere und wenig toxische Pharmazeutika zur Behandlung/Verhütung von Krankheiten, wie Bandscheibenvorfall, Osphyalgie, ektopische Chondrogenese etc.

[0264] Außerdem kann eine Verbindung, die aus den durch Screening erhaltenen Verbindungen abgeleitet wurde, in gleicher Weise angewendet werden.

[0265] Ein pharmazeutisches Mittel, das die Verbindungen oder Salze davon enthält, die durch die obige Screeningmethode erhalten wurden, kann in gleicher Weise hergestellt werden, wie bei der Methode zur Herstellung des pharmazeutischen Mittels, das das erfindungsgemäße Polypeptid enthält, wie oben beschrieben.

[0266] Da das so erhaltene pharmazeutische Präparat sicher und wenig toxisch ist, kann es an Menschen oder andere Säugetiere (z.B. Ratte, Maus, Meerschweinchen, Kaninchen, Schaf, Schwein, Rind, Pferd, Katze, Hund, Affe etc.) verabreicht werden.

[0267] Die Dosis der Verbindung oder der Salze davon variiert abhängig von der Zielkrankheit, dem zu behandelnden Patienten, dem Verabreichungsweg etc.; wenn z.B. die Verbindung, die die Promotoraktivität der erfindungsgemäßen DNA fördert, oral verabreicht wird zu dem Zweck, chronische Polyarthrit zu behandeln, ist die Dosis normalerweise etwa 0,1 bis etwa 100 mg, bevorzugt etwa 1,0 bis etwa 50 mg, bevorzugter etwa 1,0 bis etwa 20 mg/Tag für einen Erwachsenen (mit 60 kg Körpergewicht). Bei der parenteralen Verabreichung variiert eine Einzeldosis der Verbindung abhängig von den zu behandelnden Patienten, der Zielkrankheit etc., aber wenn die Verbindung, die die Promotoraktivität der erfindungsgemäßen DNA fördert, in Form eines injizierbaren Präparats verabreicht wird, zu dem Zweck, chronische Polyarthrit zu behandeln, ist es vorteilhaft, die Verbindung intravenös in einer Einzeldosis von etwa 0,01 bis etwa 30 mg/Tag, bevorzugt etwa 0,1 bis etwa 20 mg/Tag, bevorzugter etwa 0,1 bis etwa 10 mg/Tag für einen Erwachsenen (mit 60 kg Körpergewicht) zu verabreichen. Für andere Tierarten kann die entsprechende Dosis, umgewandelt bezogen auf 60 kg Körpergewicht, angewendet werden.

[0268] Wenn andererseits die Verbindung, die die Promotoraktivität der DNA der vorliegenden Erfindung hemmt, oral verabreicht wird, zu dem Zweck, einen Bandscheibenvorfall zu behandeln, ist die Dosis normalerweise etwa 0,1 bis etwa 100 mg, bevorzugt etwa 1,0 bis etwa 50 mg, bevorzugter etwa 1,0 bis etwa 20 mg/Tag für einen Erwachsenen (mit 60 kg Körpergewicht). Bei der parenteralen Verabreichung variiert eine Einzeldosis der Verbindung abhängig von dem zu behandelnden Patienten, der Zielkrankheit etc., aber wenn die Verbindung, die die Promotoraktivität der erfindungsgemäßen DNA hemmt, in Form eines injizierbaren Präparats verabreicht wird zu dem Zweck, einen Bandscheibenvorfall zu behandeln, ist es vorteilhaft, die Verbindung intravenös in einer Einzeldosis von etwa 0,01 bis etwa 30 mg/Tag, bevorzugt etwa 0,1 bis etwa 20 mg/Tag, bevorzugter etwa 0,1 bis etwa 10 mg/Tag für einen Erwachsenen (mit 60 kg Körpergewicht) zu verabreichen. Für andere Tierarten kann die entsprechende Dosis, umgewandelt bezogen auf 60 kg Körpergewicht, verabreicht werden.

[0269] Wie oben angegeben, ist der nicht menschliche Säuger, der defizient ist in Bezug auf die Expression der DNA der vorliegenden Erfindung extrem nützlich zum Screenen von Verbindungen oder Salzen, die die Aktivität eines Promotors für die DNA der vorliegenden Erfindung fördern oder hemmen und kann in großem Ausmaß zu der Erhellung der Ursachen für verschiedene Krankheiten beitragen, von denen angenommen wird, dass eine Defizienz der Expression der DNA der vorliegenden Erfindung vorliegt und zur Entwicklung eines prophylaktischen/therapeutischen Mittels für diese Krankheiten.

[0270] Weiterhin kann ein so genanntes transgenes Tier (Tier mit transferiertem Gen) hergestellt werden, indem DNA, die die Promotorregion des erfindungsgemäßen Proteins enthält verwendet wird, Gene stromabwärts ligiert werden, die verschiedene Proteine codieren, und diese in den Oozyten eines Tiers injiziert wird. Es ist dann möglich, das Protein darin spezifisch zu synthetisieren und seine Aktivität in vivo zu untersuchen. Wenn ein geeignetes Reportergen mit der Promotorstelle oben ligiert wird und eine Zelllinie, die das Gen exprimiert, etabliert wird, kann das entstehende System als Überwachungssystem für eine Verbindung mit niedrigem Molekulargewicht verwendet werden mit der Wirkung, die in vivo gezeigte Produktivität des Polypeptids der vorliegenden Erfindung per se zu fördern oder zu hemmen.

[0271] In der Beschreibung und den Zeichnungen sind die Codes für die Basen und Aminosäuren gemäß den Regeln, die von IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature festgelegt werden oder gemäß den allgemeinen Bezeichnungen im Stand der Technik angegeben, wovon Beispiele unten gezeigt sind. Für Aminosäuren, die ein optisches Isomer haben können, gilt die L-Form, wenn nicht anders angegeben.

| | |
|-------|--------------------------------------|
| DNA: | Desoxyribonucleinsäure |
| cDNA: | komplementäre Desoxyribonucleinsäure |
| A: | Adenin |
| T: | Thymin |
| G: | Guanin |
| C: | Cytosin |
| RNA: | Ribonucleinsäure |
| mRNA: | Messenger-Ribonucleinsäure |
| dATP: | Desoxyadenosintriphosphat |
| dTTP: | Desoxythymidintriphosphat |
| dGTP: | Desoxyguanosintriphosphat |
| dCTP: | Desoxycytidintriphosphat |
| ATP: | Adenosintriphosphat |
| EDTA: | Ethylendiamintetraessigsäure |
| SDS: | Natriumdodecylsulfat |
| Gly: | Glycin |
| Ala: | Alanin |
| Val: | Valin |
| Leu: | Leucin |
| Ile: | Isoleucin |
| Ser: | Serin |
| Thr: | Threonin |
| Cys: | Cystein |
| Met: | Methionin |
| Glu: | Glutaminsäure |
| Asp: | Asparaginsäure |
| Lys: | Lysin |
| Arg: | Arginin |
| His: | Histidin |
| Phe: | Phenylalanin |
| Tyr: | Tyrosin |
| Trp: | Tryptophan |
| Pro: | Prolin |
| Asn: | Asparagin |
| Gln: | Glutamin |
| pGlu: | Pyroglutaminsäure |

[0272] Auch die Substituenten, Schutzgruppen und Reagenzien, die häufig verwendet werden, sind in dieser Beschreibung mit den unten genannten Abkürzungen dargestellt.

| | |
|----------------------|--|
| Me: | Methylgruppe |
| Et: | Ethylgruppe |
| Bu: | Butylgruppe |
| Ph: | Phenylgruppe |
| TC: | Thiazolidin-4(R)-carboxamidgruppe |
| Tos: | p-Toluolsulfonyl |
| CHO: | Formyl |
| Bzl: | Benzyl |
| Cl ₂ Bzl: | 2,6-Dichlorbenzyl |
| Bom: | Benzyloxymethyl |
| Z: | Benzyloxycarbonyl |
| Cl-Z: | 2-Chlorbenzyloxycarbonyl |
| Br-Z: | 2-Brombenzyloxycarbonyl |
| Boc: | t-Butoxycarbonyl |
| DNP: | Dinitrophenol |
| Trt: | Trityl |
| Bom: | t-Butoxymethyl |
| Fmoc: | N-9-Fluorenylmethoxycarbonyl |
| HOBt: | 1-Hydroxybenzotriazol |
| HOObt: | 3,4-Dihydro-3-hydroxy-4-oxo-1,2,3-benzotriazin |
| HONB : | 1-Hydroxy-5-norbornen-2,3-dicarboxyimid |
| DCC: | N,N'-Dichlorhexylcarbodiimid |

[0273] Die Sequenzidentifizierungsnummern in dem Sequenzprotokoll der Beschreibung zeigen die folgenden Sequenzen.

[SEQ ID Nr. 1]: Diese zeigt die Basensequenz der synthetischen DNA (oberer Strang) des cis-Elements, das in Beispiel 1 verwendet wird.

[SEQ ID Nr. 2]: Diese zeigt die Basensequenz der synthetischen DNA (unterer Strang) des cis-Elements, das in Beispiel 1 verwendet wird.

[SEQ ID Nr. 3]: Diese zeigt die Basensequenz des vom Menschen stammenden regulatorischen Transkriptionsfaktorgens.

[SEQ ID Nr. 4]: Diese zeigt die Aminosäuresequenz des vom Menschen stammenden regulatorischen Transkriptionsfaktors.

[SEQ ID Nr. 5]: Diese zeigt die Aminosäuresequenz der C-terminalen 90 Aminosäurereste des vom Menschen stammenden regulatorischen Transkriptionsfaktors.

[SEQ ID Nr. 6]: Diese zeigt die Basensequenz des von der Maus stammenden regulatorischen Transkriptionsfaktorgens.

[SEQ ID Nr. 7]: Diese zeigt die Aminosäuresequenz des von der Maus stammenden regulatorischen Transkriptionsfaktors.

[SEQ ID Nr. 8]: Diese zeigt die Basensequenz des in Beispiel 2 verwendeten Primers.

[SEQ ID Nr. 9]: Diese zeigt die Basensequenz des in Beispiel 2 verwendeten Primers.

[SEQ ID Nr. 10]: Diese zeigt die Basensequenz des in Beispiel 2 verwendeten Primers.

[SEQ ID Nr. 11]: Diese zeigt die Basensequenz des in Beispiel 2 verwendeten Primers.

[SEQ ID Nr. 12]: Diese zeigt die Basensequenz des in Beispiel 3 verwendeten Primers.

[SEQ ID Nr. 13]: Diese zeigt die Basensequenz des in Beispiel 3 verwendeten Primers.

[SEQ ID Nr. 14]: Diese zeigt die Basensequenz des Human-ChM-I-Promotors.

[SEQ ID Nr. 15]: Diese zeigt die Basensequenz des in Beispiel 1 verwendeten Primers.

[SEQ ID Nr. 16]: Diese zeigt die Basensequenz des in Beispiel 1 verwendeten Primers.

[SEQ ID Nr. 17]: Diese zeigt das cis-Element des Human-ChM-I-Genpromotors.

[SEQ ID Nr. 18]: Diese zeigt die Basensequenz der DNA, die das Polypeptid mit der Aminosäuresequenz, die in SEQ ID Nr. 5 gezeigt ist, codiert.

[SEQ ID Nr. 19]: Diese zeigt die Aminosäuresequenz der C-terminalen 90 Aminosäurereste des von der Maus stammenden regulatorischen Transkriptionsfaktors.

[SEQ ID Nr. 20]: Diese zeigt die Basensequenz der DNA, die das Polypeptid mit der in SEQ ID Nr. 19 dargestellten Aminosäuresequenz codiert.

[SEQ ID Nr. 21]: Diese zeigt das cis-Element des Human-ChM-I-Genpromotors.

[SEQ ID Nr. 22]: Diese zeigt die Basensequenz des in Beispiel 4 verwendeten Primers.

[SEQ ID Nr. 23]: Diese zeigt die Basensequenz des in Beispiel 4 verwendeten Primers.

[SEQ ID Nr. 24]: Diese zeigt die Basensequenz des in Beispiel 5 verwendeten Primers.

[SEQ ID Nr. 25]: Diese zeigt die Basensequenz des in Beispiel 5 verwendeten Primers.

[SEQ ID Nr. 26]: Diese zeigt die Basensequenz des in Beispiel 6 verwendeten Primers.

[SEQ ID Nr. 27]: Diese zeigt die Basensequenz des in Beispiel 6 verwendeten Primers.

[0274] Escherichia coli TOP10/pTB2074, die den Vektor pTB2074 tragen, der in Beispiel 2 erhalten wurde, wie später beschrieben, wurde beim Ministerium für Internationalen Handel und Industrie, Agency of Industrial Science and Technology, National Institute of Bioscience and Human Technology (NIBH) in 1-1-3, Higashi, Tsukuba-shi, Ibaraki, Japan, mit der Hinterlegungsnummer FERM BP-6886 am 22. September 1999 und beim Institute for Fermentation, Osaka (IFO) in 2-17-85, Juso Honcho, Yodogawaku, Osaka-shi, Osaka, Japan, mit der Hinterlegungsnummer IFO 16299 am 21. Juli 1999 hinterlegt.

[0275] Escherichia coli JM109/pTB2075, der das Plasmid pTB2075 trägt, das in Beispiel 1, wie später beschrieben, erhalten wurde, wurde beim Ministerium für Internationalen Handel und Industrie, Agency of Industrial Science and Technology, National Institute of Bioscience and Human Technology (NIBH) in 1-1-3, Higashi, Tsukuba-shi, Ibaraki, Japan, mit der Hinterlegungsnummer FERM BP-6887 am 22. September 1999 und beim Institute for Fermentation, Osaka (IFO) in 2-17-85, Juso Honcho, Yodogawaku, Osaka-shi, Osaka, Japan, mit der Hinterlegungsnummer IFO 16300 am 21. Juli 1999 hinterlegt.

[0276] Im Folgenden wird die vorliegende Erfindung spezifisch unter Bezugnahme auf Beispiele beschrieben, die aber nicht den Schutzbereich der Erfindung beschränken sollen. Die Genmanipulationsverfahren und unter Verwendung von Escherichia coli wurden nach den in Molecular Cloning beschriebenen Methoden durchgeführt.

Beispiel 1

Klonierung des aus menschlichem Knorpel stammenden Gens für den regulatorischen Transkriptionsfaktor, das an den Promotor des menschlichen ChM-I-Gens bindet

[0277] Unter Verwendung von Primern (SEQ ID Nr. 15 und SEQ ID Nr. 16), die entwickelt wurden basierend auf der Gensequenz für Human-ChM-I-Genom, die in der Japanischen Offenlegungsschrift der Anmeldung Nr. 7-138295 beschrieben wurde und unter Anwendung von Human Genome Walker Kit (Clontech) wurde der Human-ChM-I-Promotor gemäß dem im Kit beschriebenen Verfahren gewonnen. Ein Teil der Basensequenz wurde bestimmt (SEQ ID Nr. 16) und als Ergebnis zeigte sich, dass sich die Basensequenz in einer Base von der Sequenz unterschied, die in der Japanischen Offenlegungsschrift der Anmeldung Nr. 7-138295 beschrieben wurde. Die DNA der Basensequenz GCTGGAAGGGGTGGGGACCG (SEQ ID Nr. 17), die diese andere Base enthält, wurde als cis-Element ausgewählt. Im Folgenden wurde der Versuch ausgeführt gemäß dem Manual und Handbuch für den Benutzer, das dem Matchmaker One-Hybrid System (Clontech, Inc.) beigelegt war, wenn nicht anders angegeben.

[0278] Eine DNA mit der Basensequenz (SEQ ID Nr. 1), die drei Wiederholungen der Basensequenz enthielt, die gezeigt sind als GCTGGAAGGGGTGGGGACCG (SEQ ID Nr. 17) und eine DNA, die die komplementäre Sequenz (SEQ ID Nr. 2) zu der in SEQ ID Nr. 1 gezeigten Sequenz enthielt, wurde synthetisiert und hybridisiert. Die erhaltene doppelsträngige DNA wurde in die EcoRI-XbaI-Stelle von Plasmid pHISi inseriert, das dem Matchmaker One-Hybrid System (Clontech, Inc.) beigelegt war, um das Reporterplasmid pHISi-56 für das Hefe One-Hybrid-Verfahren zu erzeugen. pHISi-56 wurde in Hefe (Saccharomyces Cerevisiae) YM4271-Stamm, der dem Matchmaker One-Hybrid System (Clontech, Inc.) beigelegt war, transfiziert, um die His³-Transformante (YM4271::pHISi-56) zu erhalten. Die Proliferation von YM4271::pHISi-56 wurde jedoch sogar in Gegenwart von 60 mM 3-Aminotriazol nicht vollständig unterdrückt.

[0279] Demzufolge wurde das Reporterplasmid verbessert, um pTB2075 ([Fig. 2](#)) zu konstruieren. pTB2075 wird (1) mit dem EcoRI-BamHI-Fragment (1,4-kb-Fragment, das die GCTGGAAGGGGTGGGGACCG-Sequenz dreimal wiederholt und das HIS3-Gen enthält) von pHISi-56 in die EcoRI-BamHI-Stelle von pBR22 inseriert und (2) mit dem SphI-PvuII-Fragment (1,0-kb-Fragment, das das TRP1-Gen enthält), das von geblutetem pBD-GAL4-Cam (Stratagene, Inc.) stammt, in die geblutete SphI-PvuII-Stelle von pBR322 inseriert.

[0280] Plasmid pTB2075 wurde mit XhoI gespalten und anschließend in den Hefestamm YM4271 transfiziert. Auf diese Weise wurde der Transformant Trp1⁺ (YM4271::pTB2075) erhalten. Die Humanchondrozyten Matchmaker-cDNA-Bibliothek (Clontech, Inc.) wurde in YM4271::pTB2075 eingeführt und Hefe, die den Phänotyp His⁺ und Leu⁺ zeigte, wurde selektiert. Nachdem Plasmid-DNA aus der Hefe gewonnen worden war, wurde die gewonnene Plasmid-DNA wiederum in YM4271::pTB2075 transfiziert, wodurch der Phänotyp His⁺ und Leu⁺ in vier Klonen bestätigt werden konnte. Die Basensequenz der Plasmid-DNA in jedem Klon wurde bestimmt. Als

Ergebnis wurde festgestellt, dass sie aus einem Gen stammte, obwohl die Länge der insertierten Fragmente verschieden war. In diesen DNAs war die Basensequenz der längsten DNA, die in SEQ ID Nr. 3 dargestellte und die Aminosäuresequenz des Proteins, das von der DNA codiert wird, die in SEQ ID Nr. 4 dargestellte ([Fig. 3](#)). Die DNA, die in SEQ ID Nr. 3 dargestellt ist, war ein Teilgen, dem der Genteil fehlte, der den N-terminalen Bereich codiert.

[0281] In den Plasmid-DNAs der vier erhaltenen Klone wurde YM4271::pTB2075 mit Plasmid (pHT56-H6) transfiziert, dem die kürzeste DNA (SEQ ID Nr. 18) insertiert war, um gegebenenfalls 10 Transformanten auszuwählen, die den Phänotyp Leu⁺ zeigten. Diese Transformanten zeigten alle den Phänotyp His3⁺.

[0282] Basierend auf dem Vorhergehenden, wurde festgestellt, dass das Protein mit der in SEQ ID Nr. 4 dargestellten Aminosäuresequenz, an die DNA mit der Basensequenz band, die dargestellt wird als GCTGG-AAGGGGTGGGGACCG (SEQ ID Nr. 17), die das cis-Element ist, das verwendet wurde; es wurde auch festgestellt, dass die c-terminalen 90 Aminosäuren (SEQ ID Nr. 5) den Bereich bilden können, der für die Bindung notwendig ist.

[0283] Basierend auf dem Vorhergehenden können Inhibitoren der regulatorischen Transkriptionsfaktoren etc. überwacht werden, indem Verbindungen ausgewählt werden, die keine Wachstumshemmung (Antipilzwirkung) in einem Medium zeigen, dem Histidin zugefügt ist, und Wachstumshemmung in einem histidinfreien Medium zeigen unter Verwendung von mit pHT56-H6-transfizierter Hefe YM4271::pTB2075-Stamm.

Beispiel 2

Bereitstellung einer von der Maus stammenden cDNA voller Länge und Konstruktion eines Tierzellexpressionsvektors

[0284] Zwei Primer (SEQ ID Nr. 8 und SEQ ID Nr. 9) wurden entwickelt basierend auf SEQ ID Nr. 4. Unter Verwendung dieser Primer wurde eine PCR auf einer Fetal Mouse Library Master DNA Plate (OriGene Technologies, Inc., Charge #004) gemäß dem Protokoll durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen, dass das Maus-Homolog des regulatorischen Transkriptionsfaktorgens, das in Beispiel 1 erhalten wurde, in Napf 4F enthalten war. Gemäß dem Protokoll wurde eine Subplatte (Fetal Mouse Library Plate 4F Charge #001) erhalten, um die Gegenwart des von der Maus stammenden regulatorischen Transkriptionsfaktorgens in Napf 7A der Unterplatte zu bestätigen. Die Sequenzierung der DNA, die in Napf 7A enthalten war, erfolgte gemäß der 5'-RACE-Methode bzw. der 3'-RACE-Methode. Als Ergebnis wurde gefunden, dass das von der Maus stammende regulatorische Transkriptionsfaktorgen voller Länge in Napf 7A enthalten war.

[0285] Basierend auf der erhaltenen Sequenzinformation wurden zwei Primer (SEQ ID Nr. 10 und SEQ ID Nr. 11) entwickelt. Die PCR wurde in Napf 7A der Subplatte durchgeführt und das entstehende amplifizierte Fragment wurde in PCRII kloniert (Invitrogen). Die Bestimmung der Basensequenz zeigte, dass die DNA mit der in SEQ ID Nr. 6 dargestellten Basensequenz ein Protein (SEQ ID Nr. 7) codierte, das aus 508 Aminosäureresten aufgebaut war ([Fig. 4](#)). Ein Vergleich eines Teilproteins des vom Menschen stammenden regulatorischen Transkriptionsfaktors mit der Aminosäuresequenz, die in SEQ ID Nr. 7 gezeigt ist, mit der Aminosäuresequenz des von der Maus stammenden regulatorischen Transkriptionsfaktors mit der Aminosäuresequenz, die in SEQ ID Nr. 4 dargestellt ist, zeigte 88% Homologie.

[0286] Als nächstes wurde ein Plasmid mit der Basensequenz, die das Protein codiert, das aus 508 Aminosäureresten aufgebaut ist, mit den Restriktionsenzymen HindIII und NotI verdaut. Das entstehende Fragment mit etwa 2.300 by wurde in pcDNA3.1(+) (Invitrogen) ligiert, das auf gleiche Weise mit den Restriktionsenzymen verdaut worden war. Vektor pTB2074, in den die Protein codierende Region dieses Gens stromabwärts des CMV-Promotors von pcDNA3.1(+) ligiert wurde, wurde zur Expression in Tierzellen gewonnen.

Beispiel 3

Detektion von mRNA in dem Gen durch PCR

[0287] Chondromodulin-I (ChM-I) wird exprimiert, indem Maus-ATDCS-Zellen in Gegenwart von Insulin gezüchtet werden (Int. J. Dev. Biol., 43:39, 1999). Gemäß diesem Bericht wurden ATDCS-Zellen gezüchtet und die Zellen wurden in dem Zeitraum gewonnen, in dem angenommen wurde, dass ChM-I exprimiert wird. Die gesamte RNA wurde extrahiert unter Verwendung von RNeasy (Qiagen). Als nächstes wurde nach der DNaseI-Behandlung unter Verwendung des Message Clean Kit (GenHunter) diese DNA einer reversen Transkrip-

tion unterzogen gemäß dem Protokoll des RNA-PCR-Kits (Takara Shuzo Co., Ltd.), um cDNA zu gewinnen. Die PCR wurde durchgeführt unter Verwendung dieser cDNA als Matrize. Wenn zwei Primer (SEQ ID Nr. 12 und SEQ ID Nr. 13), die basierend auf der cDNA-Sequenz von Maus-ChM-I entwickelt worden waren (Int. J. Dev. Biol., 43:39, 1999, Genbank Hinterlegungsnummer U43509) verwendet wurden, wurde die Bande (201 bp) des ChM-I-Gens durch Agarosegelelektrophorese nachgewiesen. In gleicher Weise wurde, wenn ein Primer mit der in SEQ ID Nr. 8 dargestellten Basensequenz und ein Primer mit der in SEQ ID Nr. 9 dargestellten Basensequenz verwendet wurden, die Expression (567 bp) des Gens mit der in SEQ ID Nr. 6 dargestellten Basensequenz nachgewiesen. Es wurde somit bestätigt, dass die beiden innerhalb des gleichen Zeitraums exprimiert wurden.

[0288] Unter Verwendung des Maus Multiple Tissue cDNA Panel I (CLONTECH) wurde eine weitere Analyse durchgeführt im Hinblick auf Organe, in denen das Gen mit der in SEQ ID Nr. 6 dargestellten Basensequenz exprimiert wurde. Unter Verwendung des Primers mit der in SEQ ID Nr. 8 dargestellten Basensequenz und des Primers mit der in SEQ ID Nr. 9 dargestellten Basensequenz wurde eine PCR (28 Zyklen) durchgeführt gemäß dem beigefügten Protokoll. Es wurde eine starke Expression von mRNA in Leber und Herz festgestellt und eine zweite starke Expression von mRNA wurde im Skelettmuskel an den Tagen 11, 15 und 17 des Fötus festgestellt.

[0289] Die Verwendung von Primern, die entwickelt wurden basierend auf der DNA-Sequenz des Gens für den regulatorischen Transkriptionsfaktor ermöglicht es, die Expression (mRNA) des Gens für den regulatorischen Transkriptionsfaktor nachzuweisen, die verwendet werden kann, um Pharmazeutika zu untersuchen, wie Expressionspromotoren oder Expressionsinhibitoren des Gens für den regulatorischen Transkriptionsfaktor.

Beispiel 4

Die Wirkung der Mausfibroblastzelllinie C3H/10T1/2 auf die Knorpeldifferenzierung durch pTB2074-Transfektion

[0290] Die Mausfibroblastenzelllinie C3H/10T1/2, Klon 8 (ATCC Hinterlegungsnummer CCL-226), wurde in DMEM (GIBCO), das 10% FBS enthielt, gezüchtet. Etwa 150.000 Zellen/Napf wurden in eine 24-Napfplatte geimpft. Am folgenden Tag wurde eine Mischung von pTB2074 oder pcDNA3.1(+) (Invitrogen), die in Beispiel 2 erhalten wurde, und Fugene6 (Boehringer) den Zellen zur Transfektion zugefügt. Am Tag 2 nach der Transfektion wurde die RNA extrahiert unter Verwendung des RNeasy Mini Kits (Qiagen) und dann einer DNase-Prozessierung unterzogen unter Verwendung des Message Clean Kit (GenHunter), der als RNA-Probe verwendet wurde.

[0291] Unter Verwendung der RNA-Probe als Matrize wurden Primer (SEQ ID Nr. 22 und SEQ ID Nr. 23) hergestellt basierend auf der Sequenz von Maus-Typ-II-B-Collagenen (Col2a1). Unter Verwendung der Primer und des RT-PCR-Kits (Takara Shuzo Co., Ltd.) wurde eine RT-PCR durchgeführt. Nach Agarosegelelektrophorese wurde ein Vergleich der jeweiligen Banden unter Verwendung von Gel Image (Genomic Solutions) gemacht.

[0292] Die Ergebnisse zeigten, dass die Expression von Col2a1, das ein Knorpeldifferenzierungsmarker ist, wenn die C3H/10T1/2, Klon-8-Zelllinie, mit pTB2074 transfiziert wurde, auf das etwa 2,5-fache anstieg im Vergleich zu dem Fall, wenn die C3H/10T1/2, Klon-8-Zelllinie mit pcDNA3.1(+) transfiziert wurde.

Beispiel 5

Wirkung von menschlichen dedifferenzierten Chondrozyten auf die Knorpeldifferenzierung durch pTB2074-Transfektion

[0293] Menschliche normale Chondrozyten (erworben von Toyobo) wurden auf einer Zellkulturschale (Falcon) unter Verwendung von Chondrozytenwachstumsmedium, das mit dem Humannormalchondrozyten-Kulturkit geliefert wurde, gezüchtet. Die Chondrozyten waren aufgrund der Schalenkultivierung auf einer Schale dedifferenziert, was dazu führte, dass der Chondrozytenmarker Typ-II-Collagenen nicht exprimiert wurde (dedifferenzierte Chondrozyten). Die Chondrozyten wurden in eine 24-Napf-Platte mit etwa 150.000 Zellen pro Napf geimpft. Am folgenden Tag wurde die Transfektion bewirkt, indem eine Mischung von Vektor pTB2074 oder pcDNA3.1(+) (Invitrogen), der in Beispiel 2 erhalten wurde, und Fugene6 (Boehringer) zugegeben wurden. Nachdem eine RNA-Probe erhalten worden war auf gleiche Weise, wie bei dem in Beispiel 4 beschriebenen.

nen Verfahren, wurde eine RT-PCR durchgeführt unter Verwendung der Primer (SEQ ID Nr. 24 und SEQ ID Nr. 25), die basierend auf Human-Typ-II-Collagengen (COL2A1) entwickelt worden waren.

[0294] Die Ergebnisse zeigten, dass dann, wenn pcDNA3.1(+) in menschliche normale Chondrozyten transfiziert wurde, überhaupt keine Expression von COL2A1 festgestellt wurde, wohingegen die Expression von COL2A1 beobachtet wurde, wenn pTB2074 in menschliche normale Chondrozyten transfiziert wurde.

Beispiel 6

Wirkung von Kaninchenchondrozyten auf Knorpelmatrixproduktion durch pTB2074-Transfektion

[0295] Gelenksknorpel, die von Kaninchen gewonnen wurden (Japanisches weißes Kaninchen, männlich, 30 Tage alt) wurden fein vermahlen, zweimal mit 0,1% EDTA 20 Minuten lang gewaschen und einmal mit 1,25% Trypsin 60 Minuten lang gewaschen. Die Knorpelmatrix wurde mit 0,2% Collagenase verdaut, um Gelenkchondrozyten zu gewinnen. Die Chondrozyten wurden in eine mit Collagen beschichtete 24-Napf-Platte (Falcon) mit etwa 100.000 Zellen pro Napf geimpft und anschließend in α -MEM (GIBCO), das 10% FBS enthielt, 5 Tage lang gezüchtet. Anschließend wurde das Medium ausgetauscht. Am folgenden Tag wurde die Transfektion bewirkt, indem eine Mischung von Vektor pTB2074 oder pcDNA3.1(+) (Invitrogen), der in Beispiel 2 erhalten worden war, und Eugene6 (Boehringer) zugegeben wurde. Nachdem eine RNA-Probe erhalten worden war auf gleiche Weise, wie in dem in Beispiel 4 beschriebenen Verfahren, wurde die RT-PCR durchgeführt unter Verwendung der Primer (SEQ ID Nr. 26 und SEQ ID Nr. 27), die basierend auf Kaninchen-Typ-II-Collagengen entwickelt worden waren (Biochimica et Biophysica Acta, Bd. 1350, Seiten 253–258 (1997); Col2a1).

[0296] Die Ergebnisse zeigten, dass dann, wenn pTB2074 in die oben beschriebenen Kaninchenchondrozyten transfiziert wurde, die Expression von Col2a1 ungefähr um das 2-fache anstieg verglichen mit dem Fall, in dem pcDNA3.1(+) den oben beschriebenen Kaninchenchondrozyten transfiziert wurde.

[0297] 10 ng/ml IL-1 β (Genzyme) wurden während des oben beschriebenen Mediumaustausches zugegeben, die Transfektion und Gewinnung der RNA-Probe wurden auf gleiche Weise durchgeführt wie bei dem oben beschriebenen Verfahren und die Expression von Kaninchen-Typ-II-Collagengen (Col2a1) wurde verglichen unter Verwendung von RT-PCR.

[0298] Die Ergebnisse zeigten, dass dann, wenn pcDNA3.1(+) in Kaninchenchondrozyten, wie oben beschrieben, transfiziert wurde, keine Expression von Col2a1 festgestellt wurde, wohingegen die Expression von Col2a1 festgestellt wurde, wenn pTB2074 in die oben beschriebenen Kaninchenchondrozyten transfiziert wurde.

Industrielle Anwendbarkeit

[0299] Das erfindungsgemäße Polypeptid besitzt die Aktivität der spezifischen Bindung an das cis-Element des ChM-I-Genpromotors, um die Transkription des ChM-I-Gens zu fördern. Somit ist das Polypeptid der vorliegenden Erfindung oder die DNA der vorliegenden Erfindung nützlich als prophylaktisches/therapeutisches Mittel für Krankheiten, z.B. chronische Polyarthrit, Arthrosis deformans, Osteoporose, Knochenbruch, Krebs etc.

[0300] Das erfindungsgemäße Polypeptid, die DNA der vorliegenden Erfindung oder der Transformant der vorliegenden Erfindung können auch verwendet werden zum Screenen von Verbindungen oder Salzen davon, die die Aktivitäten des erfindungsgemäßen Polypeptids fördern oder hemmen.

[0301] Die Erfindungen oder Salze davon, die die Aktivitäten des erfindungsgemäßen Polypeptids oder die Expression der erfindungsgemäßen DNA fördern, sind nützlich als prophylaktische/therapeutische Mittel für Krankheiten, z.B. chronische Polyarthrit, Arthrosis deformans, Osteoporose, Knochenbruch, Krebs etc.

[0302] Die Verbindungen oder Salze davon, die die Aktivitäten des erfindungsgemäßen Polypeptids oder die Expression der erfindungsgemäßen DNA hemmen, sind nützlich als prophylaktische/therapeutische Mittel für Krankheiten, z.B. Bandscheibenvorfall, Ischiassyndrom, ektopische Chondrogenese etc.

<110> Takeda Chemical Industries, Ltd.

<120> Neuer Transkriptionsfaktor und DNA davon

<130> 2673W00P

<150> JP 11-336475

<151> 1999-11-26

<160> 27

<210> 1

<211> 66

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> cis-Element des Humanchondromodulin-I-Gens, oberer Strang

<400> 1

AATTCGCTGG AAGGGGTGGG GACCGGCTGG AAGGGGTGGG GACCGGCTGG AAGGGGTGGG 60

GACCGT 66

<210> 2

<211> 66

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> cis-Element des Humanchondromodulin-I-Gens, unterer Strang

<400> 2

CTAGACGGTC CCCACCCCTT CCAGCCGGTC CCCACCCCTT CCAGCCGGTC CCCACCCCTT 60

CCAGCG 66

<210> 3

<211> 1669

<212> DNA

<213> Mensch

<400> 3

GACCAGAAGC TGCAGGTCTG CTGCAGGGTG GAGGAGGTGT GGCTGGCAA ACTGCAGGGC 60
 CCCTGTCCCC AGGCACCACC CCTGGAGCCC GGAGCCCAGG CCCTGGCCTA CAGGCCCCGTC 120
 TCCAGGAACA TCGATGTCCC AAAGAGGAAG TCGGACGCAG TGGAAATGGA TGAGATGATG 180
 GCGGCCATGG TGCTGACGTC CCTGTCCTGC AGCCCTGTTG TACAGAGTCC TCCCGGGACC 240
 GAGGCCAACT TCTCTGCTTC CCGTGCGGCC TCGGACCCAT GGAAGGAGAG TGGTGACATC 300
 TCGGACAGCG GCAGCAGCAC TACCAGCGGT CACTGGAGTG GGAGCAGTGG TGTCTCCACC 360
 CCCTCGCCCC CCCACCCCCA GGCCAGCCCC AAGTATTTGG GGGATGCTTT TGGTTCTCCC 420
 CAAACTGATC ATGGCTTTGA GACCGATCCT GACCCTTTCC TGCTGGACGA ACCAGCTCCA 480
 CGAAAAAGAA AGAACTCTGT GAAGGTGATG TACAAGTGCC TGTGGCCAAA CTGTGGCAAA 540
 GTTCTGCGCT CCATTGTGGG CATCAAACGA CACGTCAAAG CCCTCCATCT GGGGGACACA 600
 GTGGAATCTG ATCAGTTCAA GCGGGAGGAG GATTCTACT ACACAGAGGT GCAGCTGAAG 660
 GAGGAATCTG CTGCTGCTGC TGCTGCTGCT GCCGCAGGCA CCCCAGTCCC TGGGACTCCC 720
 ACCTCCGAGC CAGCTCCCAC CCCCAGCATG ACTGGCCTGC CTCTGTCTGC TCTTCCACCA 780
 CCTCTGCACA AAGCCCAGTC CTCCGGCCCA GAACATCCTG GCGCGGAGTC CTCCCTGCCC 840
 TCAGGGGGCTC TCAGCAAGTC AGCTCCTGGG TCCTTCTGGC ACATTCAGGC AGATCATGCA 900
 TACCAGGCTC TGCCATCCTT CCAGATCCCA GTCTCACCAC ACATCTACAC CAGTGTCAGC 960

TGGGCTGCTG CCCCTCCGC CGCCTGCTCT CTCTCTCCGG TCCGGAGCCG GTCGCTAAGC 1020
 TTCAGCGAGC CCCAGCAGCC AGCACCTGCG ATGAAATCTC ATCTGATCGT CACTTCTCCA 1080
 CCCCAGGGCCC AGAGTGGTGC CAGGAAAGCC CGAGGGGAGG CTAAGAAGTG CCGCAAGGTG 1140
 TATGGCATCG AGCACCGGGA CCAGTGGTGC ACGGCCTGCC GGTGGAAGAA GGCCTGCCAG 1200
 CGCTTTCTGG ACTGAGCTGT GCTGCAGGTT CTACTCTGTT CCTGGCCCTG CCGGCAGCCA 1260
 CTGACAAGAG GCCAGTGTGT CACCAGCCCT CAGCAGAAAC CGAAAGAGAA AGAACGGAAA 1320
 CACGGAGTTT GGGCTCTGTT GGCTAAGGTG TAACACTTAA AGCAATTTTC TCCCATTGTG 1380
 CGAACATTTT ATTTTTTAAA AAAAAGAAAC AAAAATATTT TTCCCCTAA AATAGGAGAG 1440
 AGCCAAAAC GACCAAGGCT ATTCAGCAGT GAACCAGTGA CCAAAGAATT AATTACCCTC 1500
 CGTTTCCCAC ATCCCCACTC TCTAGGGGAT TAGCTTGTGC GTGTCAAAAG AAGGAACAGC 1560
 TCGTTCGCT TCCTGCTGAG TCGGTGAATT CTTTGCTTTC TAAACTCTTC CAGAAAGGAC 1620
 TGTGAGCAAG ATGAATTTAC TTTTCTTAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA 1669

<210> 4

<211> 404

<212> PRT

<213> Mensch

<400> 4

Asp Gln Lys Leu Gln Val Cys Cys Arg Val Glu Glu Val Trp Leu Ala

5

10

15

Lys Leu Gln Gly Pro Cys Pro Gln Ala Pro Pro Leu Glu Pro Gly Ala

20

25

30

Gln Ala Leu Ala Tyr Arg Pro Val Ser Arg Asn Ile Asp Val Pro Lys

35

40

45

Arg Lys Ser Asp Ala Val Glu Met Asp Glu Met Met Ala Ala Met Val

50

55

60

Leu Thr Ser Leu Ser Cys Ser Pro Val Val Gln Ser Pro Pro Gly Thr

65

70

75

80

Glu Ala Asn Phe Ser Ala Ser Arg Ala Ala Cys Asp Pro Trp Lys Glu

85

90

95

Ser Gly Asp Ile Ser Asp Ser Gly Ser Ser Thr Thr Ser Gly His Trp

100

105

110

Ser Gly Ser Ser Gly Val Ser Thr Pro Ser Pro Pro His Pro Gln Ala

115

120

125

Ser Pro Lys Tyr Leu Gly Asp Ala Phe Gly Ser Pro Gln Thr Asp His

130

135

140

Gly Phe Glu Thr Asp Pro Asp Pro Phe Leu Leu Asp Glu Pro Ala Pro

145

150

155

160

Arg Lys Arg Lys Asn Ser Val Lys Val Met Tyr Lys Cys Leu Trp Pro

165

170

175

Asn Cys Gly Lys Val Leu Arg Ser Ile Val Gly Ile Lys Arg His Val

180

185

190

Lys Ala Leu His Leu Gly Asp Thr Val Asp Ser Asp Gln Phe Lys Arg

195

200

205

Glu Glu Asp Phe Tyr Tyr Thr Glu Val Gln Leu Lys Glu Glu Ser Ala

210

215

220

Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Thr Pro Val Pro Gly Thr Pro

225 230 235 240

Thr Ser Glu Pro Ala Pro Thr Pro Ser Met Thr Gly Leu Pro Leu Ser

245 250 255

Ala Leu Pro Pro Pro Leu His Lys Ala Gln Ser Ser Gly Pro Glu His

260 265 270

Pro Gly Pro Glu Ser Ser Leu Pro Ser Gly Ala Leu Ser Lys Ser Ala

275 280 285

Pro Gly Ser Phe Trp His Ile Gln Ala Asp His Ala Tyr Gln Ala Leu

290 295 300

Pro Ser Phe Gln Ile Pro Val Ser Pro His Ile Tyr Thr Ser Val Ser

305 310 315 320

Trp Ala Ala Ala Pro Ser Ala Ala Cys Ser Leu Ser Pro Val Arg Ser

325 330 335

Arg Ser Leu Ser Phe Ser Glu Pro Gln Gln Pro Ala Pro Ala Met Lys

340 345 350

Ser His Leu Ile Val Thr Ser Pro Pro Arg Ala Gln Ser Gly Ala Arg

355 360 365

Lys Ala Arg Gly Glu Ala Lys Lys Cys Arg Lys Val Tyr Gly Ile Glu

370 375 380

His Arg Asp Gln Trp Cys Thr Ala Cys Arg Trp Lys Lys Ala Cys Gln

385 390 395 400

Arg Phe Leu Asp

404

<210> 5

<211> 90

<212> PRT

<213> Mensch

<400> 5

Ile Tyr Thr Ser Val Ser Trp Ala Ala Ala Pro Ser Ala Ala Cys Ser

5

10

15

Leu Ser Pro Val Arg Ser Arg Ser Leu Ser Phe Ser Glu Pro Gln Gln

20

25

30

Pro Ala Pro Ala Met Lys Ser His Leu Ile Val Thr Ser Pro Pro Arg

35

40

45

Ala Gln Ser Gly Ala Arg Lys Ala Arg Gly Glu Ala Lys Lys Cys Arg

50

55

60

Lys Val Tyr Gly Ile Glu His Arg Asp Gln Trp Cys Thr Ala Cys Arg

65

70

75

80

Trp Lys Lys Ala Cys Gln Arg Phe Leu Asp

85

90

<210> 6

<211> 2246

<212> DNA

<213> Maus

<400> 6

TGGGTCTTTG GGGAGGCAGG TTCCCAAGTG AGTTTATTTA CCTTGAGTTG ATCGATATTT 60

GTTACATGTC CTCCTAGGAA CAGGGATTAT TATTTCTGTA AAAAGAAAAG ATAGAGCAGG 120
 CCATGGCGGC CCAACAGGTA AAGCAGCTCG CCACCAAACC ACCAAACCTG ATGTCCTGAC 180
 TTTGATCCTT GCTGTCTACA TGGTGAAAGA GAGAGCTGAG TCCTGCAGGC TCTTCTCTGA 240
 CTGTCACGAA TGTGCCATGG CATAACACA CAGAAAAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGACAG 300
 ACAGACAGAC ACTGACTGAC TGA CTGCCCCT TTTGTCTCA GCAGGCGGAG CAGAGTATCC 360
 AGCATGCTGT CCCGACGCCT TGGTAAGCGC TCCCTCTTGG GAGCCCGGGT GTTGGGACCT 420
 AGTGCCGCTG AAGTACCATC AGGGGCCACC CTGCCTCTGG AGCCACAGAT AGAAGTGCCG 480
 GAAGGAGCCA TGTCCCTGTC CCCACTCACC TCTAAGGACC CTGTGTGCCA GGAGCAGCCC 540
 AAGGAGCTCC TCAAAGCTCT GGGAACTCA GGCCACCCAC AGGTGGCCTT TCAGCCTGGA 600
 CAGAAGGTCT GTGTGTGGTA TGGAGGTCAG GAGTGCAAGG GCCTGGTGGA GCAGCACAGC 660
 TGGGCCGAGG ACAAGGTGAC CGTCCGGCTG CTGGACCAGA AGTTACAGAT TCGCTGTAAA 720
 GTGGAAGAGG TGTGGCTGGC GGAGCTGCAG GGTAGCGCAT CCCACGTGCC AGCCTTGAGG 780
 CCCGGAGCCC AGGTGCCAGC CTACAGACCG GTGTCTAGGA ACATCGACGT CCCGAAGAGG 840
 AAGTCGGATG CGGTGGAGAT GGACGAGATG ATGGCCGCCA TGGTGCTGAC GTCTCTGTCT 900
 TGCAGTCCCG TTGTGCAGAG TCCTCCTGGG GCTGAGCCCA TCTTCTCTGT TTCCCGTGCA 960
 GCCTGCGGTG ACCCGTGGA GGAGAGCGGT GATGTTTCAG ACAGCGGCAG CAGCGGGCAC 1020
 TGGAGCGGGA GCAGTGGCAG CTCTACCCCC TCGCCGCCCC ATCCGCAGGC CAGCCCCAAG 1080
 TACCTGGGGG ATGCCTTTGG GTCTCCCCAA ACTGATCATG GCTTTGAGAC TGATCCTGAC 1140
 CCTTTCCTGT TAGACGAACC AGCCCCACGA AAGAGGAGGA ACTCCGTGAA GGTGATGTAC 1200
 AAGTGCCTGT GGGCCAGCTG TGGCAAAGTT CTCCGTTCAA TTGTGGGCAT CAAACGACAC 1260
 GTCAAAGCCC TCCACCTGGG GGACACTGTT GACTCTGATC AGTTCAAGCG GGAGGAAGAC 1320
 TTTTACTACA CAGAGATGCA GATGAAAGAG GAATCTGCTC AGGCTGTGGC TGCTCCCCCT 1380
 GCCCCTGGGA CACCTATGGG CGAGCCAGCG TCCACCTCCA GGGTGACCAG CCCGTCCCTT 1440

GCTGCTCTTT CATTGCCTCC AGCCAAGGTC CAGTCATCTG GCCCAGAACA CCCTGGCCTG 1500
 GAGTCTTCTC TGCCCTCAGT TGCACTCAGC AAGTCAGCTC CTGGCTCTTT CTGGCACATT 1560
 CAGGCTGACC ATGCATATCA GGCTCTGCCA TCCTTCCAGA TCCCTGTTTC CCCCCACATC 1620
 TATACCAGCA TCAGCTGGGC TGCTGCCCCT ACCACCACCT CCTCCCTCTC TCCGGTCCGA 1680
 AGCCGCTCTC TCAGCTTCAG CGAGCCCCAG CAGCCGCCAC CTACAGTGAA GTCTCACCTG 1740
 ATTGTCACCT CCCCACCCCG TGCTCAGAGC AGCACCAGGA AAGCCCGTGG AGAGGCCAAG 1800
 AAGTGCCGTA AGGTGTACGG CATCGAGCAC CGGGACCAGT GGTGCACAGC CTGCCGGTGG 1860
 AAGAAGGCCT GCCAGCGCTT CCTGGACTGA GCCTGCCTCA CTAGCCCCGC TTCTCACCTT 1920
 GCCTGGCAGC CGGGAAGCCT CCAGGCCTGC AGCCATCAGC AGAACACAGG GAGATGATGT 1980
 GCGGTGGATG TGGGCAGCTG GGGCTCCATT GGCTAAGATA GAACACTTAA AAACACTTTT 2040
 CTCCCCCTTG TTGGGAGTGC TTTATTTTTT AAAAGCAAAC CTAAATGAAA CTATTTTTCC 2100
 CCTTAAATA GGAGAGAGCC AAAATTGACC AAGGGTATTC TGCAGCGAAC CGGAGACCAA 2160
 AGAGTTACCC CTACCCCTAC CCCATTCCAC CCTCTCTGGG ACTACATATG CATCAAGAGT 2220
 AGGACAGGAT GCTGCCTTGC CTGGTT 2246

<210> 7

<211> 508

<212> PRT

<213> Maus

<400> 7

Met Leu Ser Arg Arg Leu Gly Lys Arg Ser Leu Leu Gly Ala Arg Val

5

10

15

Leu Gly Pro Ser Ala Ala Glu Val Pro Ser Gly Ala Thr Leu Pro Leu

20

25

30

Glu Pro Gln Ile Glu Val Pro Glu Gly Ala Met Ser Leu Ser Pro Leu

35

40

45

Thr Ser Lys Asp Pro Val Cys Gln Glu Gln Pro Lys Glu Leu Leu Lys

50

55

60

Ala Leu Gly Thr Ser Gly His Pro Gln Val Ala Phe Gln Pro Gly Gln

65

70

75

80

Lys Val Cys Val Trp Tyr Gly Gly Gln Glu Cys Lys Gly Leu Val Glu

85

90

95

Gln His Ser Trp Ala Glu Asp Lys Val Thr Val Arg Leu Leu Asp Gln

100

105

110

Lys Leu Gln Ile Arg Cys Lys Val Glu Glu Val Trp Leu Ala Glu Leu

115

120

125

Gln Gly Ser Ala Ser His Val Pro Ala Leu Glu Pro Gly Ala Gln Val

130

135

140

Pro Ala Tyr Arg Pro Val Ser Arg Asn Ile Asp Val Pro Lys Arg Lys

145

150

155

160

Ser Asp Ala Val Glu Met Asp Glu Met Met Ala Ala Met Val Leu Thr

165

170

175

Ser Leu Ser Cys Ser Pro Val Val Gln Ser Pro Pro Gly Ala Glu Pro

180

185

190

Ile Phe Ser Val Ser Arg Ala Ala Cys Gly Asp Pro Trp Lys Glu Ser

195

200

205

Gly Asp Val Ser Asp Ser Gly Ser Ser Gly His Trp Ser Gly Ser Ser

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

Ala Asp His Ala Tyr Gln Ala Leu Pro Ser Phe Gln Ile Pro Val Ser

405

410

415

Pro His Ile Tyr Thr Ser Ile Ser Trp Ala Ala Ala Pro Thr Thr Thr

420

425

430

Ser Ser Leu Ser Pro Val Arg Ser Arg Ser Leu Ser Phe Ser Glu Pro

435

440

445

Gln Gln Pro Pro Pro Thr Val Lys Ser His Leu Ile Val Thr Ser Pro

450

455

460

Pro Arg Ala Gln Ser Ser Thr Arg Lys Ala Arg Gly Glu Ala Lys Lys

465

470

475

480

Cys Arg Lys Val Tyr Gly Ile Glu His Arg Asp Gln Trp Cys Thr Ala

485

490

495

Cys Arg Trp Lys Lys Ala Cys Gln Arg Phe Leu Asp

500

505

508

<210> 8

<211> 24

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Primer

<400> 8

AGACGAACCA GCCCCACGAA AGAG 24

<210> 9

<211> 24

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Primer

<400> 9

GGCGGCTGCT GGGGCTCGCT GAAG 24

<210> 10

<211> 23

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Primer

<400> 10

TGGGTCTTTG GGGAGGCAGG TTC 23

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Primer

<400> 11

AACCAGGCAA GGCAGCATCC 20

<210> 12

<211> 29

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Primer

<400> 12

CTAAAATCCT TGAAC TCTGT GGCGACCTG 29

<210> 13

<211> 26

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Primer

<400> 13

CTGCGTCGTC TGAACATTGG GTCTGG 26

<210> 14

<211> 163

<212> DNA

<213> Mensch

<220>

<223> Promotor des Chondromodulin-I-Gens

<400> 14

AGGTGAGGCG CTGGAAGGGG TGGGGACCGC TGGGCTGGCC CAGGCCGGAC CGTGCACCGT 60
 GTGTGCGCGC GGC GTTGA AAA TGCCCTGCAC GTCGGGGCAG CGGGACAGAT CCCAGGGTGC 120
 CCAGGGAGTC TCCAAGTGCC TCACTCCTCC CGCCGCAAAC ATG 163

<210> 15

<211> 25

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Primer

<400> 15

GAGTGGGGAG TCGGGCGGGA AACAG 25

<210> 16

<211> 26

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Primer

<400> 16

CAGTCGGGCG TGGAAGTGGG ATGAGC 26

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> Mensch

<220>

<223> cis-Element des Chondromodulin-I-Gens

<400> 17

GCTGGAAGGG GTGGGGACCG 20

<210> 18

<211> 270

<212> DNA

<213> Mensch

<400> 18

| | |
|---|-----|
| ATCTACACCA GTGTCAGCTG GGCTGCTGCC CCCTCCGCCG CCTGCTCTCT CTCTCCGGTC | 60 |
| CGGAGCCGGT CGCTAAGCTT CAGCGAGCCC CAGCAGCCAG CACCTGCGAT GAAATCTCAT | 120 |
| CTGATCGTCA CTTCTCCACC CCGGGCCCAG AGTGGTGCCA GGAAAGCCCG AGGGGAGGCT | 180 |
| AAGAAGTGCC GCAAGGTGTA TGGCATCGAG CACCGGGACC AGTGGTGAC GGCCTGCCGG | 240 |
| TGGAAGAAGG CCTGCCAGCG CTTTCTGGAC | 270 |

<210> 19

<211> 90

<212> PRT

<213> Maus

<400> 19

Ile Tyr Thr Ser Ile Ser Trp Ala Ala Ala Pro Thr Thr Thr Ser Ser

5

10

15

Leu Ser Pro Val Arg Ser Arg Ser Leu Ser Phe Ser Glu Pro Gln Gln

20

25

30

Pro Pro Pro Thr Val Lys Ser His Leu Ile Val Thr Ser Pro Pro Arg

35

40

45

Ala Gln Ser Ser Thr Arg Lys Ala Arg Gly Glu Ala Lys Lys Cys Arg

50

55

60

Lys Val Tyr Gly Ile Glu His Arg Asp Gln Trp Cys Thr Ala Cys Arg

65

70

75

80

Trp Lys Lys Ala Cys Gln Arg Phe Leu Asp

85

90

<210> 20

<211> 270

<212> DNA

<213> Maus

<400> 20

ATCTATACCA GCATCAGCTG GGCTGCTGCC CCTACCACCA CCTCCTCCCT CTCTCCGGTC 60

CGAAGCCGCT CTCTCAGCTT CAGCGAGCCC CAGCAGCCGC CACCTACAGT GAAGTCTCAC 120

CTGATTGTCA CCTCCCCACC CCGTGCTCAG AGCAGCACCA GGAAAGCCCG TGGAGAGGCC 180

AAGAAGTGCC GTAAGGTGTA CGGCATCGAG CACCGGGACC AGTGGTGCAC AGCCTGCCGG 240

TGGAAGAAGG CCTGCCAGCG CTCCTGGAC 270

<210> 21

<211> 20

<212> DNA

<213> Mensch

<220>

<223> cis-Element des Chondromodulin-I-Gens

<400> 21

GCTAGAAGGG GTGGGACCG 20

<210> 22

<211> 21

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> , entwickelter Oligonucleotidprimer, um DNA zu amplifizieren, die Maus-Col2a1 codiert

<400> 22

GCTCATCGCC GCGGTCCTAC G 21

<210> 23

<211> 22

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> entwickelter Oligonucleotidprimer, um DNA zu amplifizieren, die Maus-Col2a1 codiert

<400> 23

CTCGCCAGGT TCGCCAGGAT TG 22

<210> 24

<211> 22

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> entwickelter Oligonukleotidprimer, um DNA zu amplifizieren, die Human-COL2A1 codiert

<400> 24

CCCCGGCACT CCTGGCACTG AT 22

<210> 25

<211> 24

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> entwickelter Oligonukleotidprimer, um DNA zu amplifizieren, die Human-COL2A1 codiert

<400> 25

CTTGGGCACC TCGGGCTCCT TTAG 24

<210> 26

<211> 24

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> entwickelter Oligonukleotidprimer, um DNA zu amplifizieren, die Kaninchen-Col2a1 codiert

<400> 26

GCCACGCTCA AGTCCCTCAA CAAC 24

<210> 27

<211> 24

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> entwickelter Oligonukleotidprimer, um DNA zu amplifizieren, die Kaninchen-Col2A1 codiert

<400> 27

ACAGCAGGCG CAGGAAGGTC ATCT

24

Patentansprüche

1. Polypeptid enthaltend die Aminosäuresequenz von SEQ ID Nr. 5 oder eine Aminosäuresequenz mit mindestens 95% Homologie zu der Aminosäuresequenz von SEQ ID Nr. 5, oder ein Salz davon, das fähig ist, an den Promotor des Chondromodulin-I-Gens zu binden, die Transkription des Chondromodulin-1-Gens zu fördern oder die Expression des Typ-II-Collagengens zu fördern.

2. Polypeptid enthaltend eine Aminosäuresequenz ausgewählt aus 1) einer Aminosäuresequenz, die durch SEQ ID Nr. 5 dargestellt wird, aus der 1 bis 5 Aminosäuren deletiert sind; 2) einer Aminosäuresequenz, die durch SEQ ID Nr. 5 dargestellt wird, der 1 bis 5 Aminosäuren zugefügt sind; 3) einer Aminosäuresequenz, die durch SEQ ID Nr. 5 dargestellt wird, in die 1 bis 5 Aminosäuren inseriert sind; 4) einer Aminosäuresequenz, die durch SEQ ID Nr. 5 dargestellt wird, in der 1 bis 5 Aminosäuren durch andere Aminosäuren ersetzt sind und 5) einer Aminosäuresequenz, die eine Kombination der obigen Aminosäuresequenzen aufweist, oder ein Salz davon, das an den Promotor des Chondromodulin-I-Gens binden kann, die Transkription des Chondromodulin-I-Gens fördern kann oder die Expression des Typ-II-Collagengens fördern kann.

3. Polypeptid oder Salz nach Anspruch 1, wobei die Aminosäuresequenz, die mindestens 95% Homologie mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID Nr. 5 aufweist, die in SEQ ID Nr. 19 dargestellte Aminosäuresequenz ist.

4. Polypeptid oder Salz nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, das die Aminosäuresequenz enthält, die in SEQ ID Nr. 4 dargestellt wird, oder eine Aminosäuresequenz mit mindestens 95% Homologie zu der in SEQ ID Nr. 4 dargestellten Aminosäuresequenz.

5. Polypeptid oder Salz nach Anspruch 4, wobei die Aminosäuresequenz, die mindestens 95% Homologie mit der in SEQ ID Nr. 4 dargestellten Aminosäuresequenz aufweist, die in SEQ ID Nr. 7 dargestellte Aminosäuresequenz ist.

6. Polypeptid enthaltend eine Aminosäuresequenz, wie in SEQ ID Nr. 5, SEQ ID Nr. 4, SEQ ID Nr. 19 oder SEQ ID Nr. 7 dargestellt, die an den Promotor des Chondromodulin-I-Gens binden kann, die Transkription des Chondromodulin-I-Gens fördern kann oder die Expression des Typ-II-Collagengens fördern kann.

7. DNA enthaltend eine DNA, die eine Basensequenz trägt, die das Polypeptid nach Anspruch 1 oder Anspruch 2 codiert.

8. Rekombinanter Vektor, der die DNA gemäß Anspruch 7 enthält.

9. Transformant, der mit dem rekombinanten Vektor gemäß Anspruch 8 transformiert ist.

10. Verfahren zur Herstellung des Polypeptids oder Salzes nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, das beinhaltet, dass der Transformant gemäß Anspruch 9 gezüchtet wird, um das Polypeptid nach Anspruch 1 oder Anspruch 2 zu erzeugen.

11. Antikörper für das Polypeptid oder das Salz nach Anspruch 1 oder Anspruch 2.

12. Diagnostisches Mittel enthaltend den Antikörper nach Anspruch 11.

13. Verfahren zum Screenen einer Verbindung oder eines Salzes, die/das die Aktivität des Polypeptids oder Salzes nach Anspruch 1 oder Anspruch 2 fördert oder hemmt, das beinhaltet, dass das Polypeptid oder

Salz nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, die DNA nach Anspruch 7 oder der Transformant nach Anspruch 9 verwendet wird, wobei die Aktivität des Polypeptids oder Salzes nach Anspruch 1 oder 2 die Fähigkeit ist, an den Promotor des Chondromodulin-I-Gens zu binden, die Transkription des Chondromodulin-I-Gens zu fördern oder die Expression des Typ-II-Collagengens zu fördern.

14. Kit zum Screenen einer Verbindung oder eines Salzes, die/das die Aktivität des Polypeptids oder Salzes nach Anspruch 1 oder Anspruch 2 fördert oder hemmt, enthaltend das Polypeptid oder Salz nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, die DNA nach Anspruch 7 oder den Transformant nach Anspruch 9, wobei die Aktivität des Polypeptids oder Salzes nach Anspruch 1 oder Anspruch 2 die Fähigkeit ist, an den Promotor des Chondromodulin-I-Gens zu binden, die Transkription des Chondromodulin-I-Gens zu fördern oder die Expression des Typ-II-Collagengens zu fördern.

15. Verfahren zum Screenen einer Verbindung oder eines Salzes, die/das die Expression einer DNA, die das Polypeptid nach Anspruch 1 oder Anspruch 2 kodiert, fördert oder hemmt, das beinhaltet, dass eine Zelle, die das Polypeptid oder das Salz nach Anspruch 1 oder Anspruch 2 erzeugen kann, in Gegenwart einer Testverbindung gezüchtet wird und die Menge an mRNA untersucht wird, die das Polypeptid nach Anspruch 1 oder Anspruch 2 codiert, unter Verwendung einer DNA, die das Polypeptid nach Anspruch 1 oder Anspruch 2 codiert, oder der komplementären DNA oder einer Teil-DNA davon.

Es folgen 5 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

FIG.1

| | | |
|---|---|-------|
| A G G T G A G G C C G C T G | G A A G G G G T G G G G A C C G C T G G G C T G G C C | human |
| A G G T G A G G C C G C T A | G A A G G G G T G G G G A C C G C T G G G C T G G C C | human |
| C A G G C G G G A C C G T G C A C C G T G T G T G C G C G G C G T T G A A A | | human |
| C A G G C G G G A C C G T G C A C C G T G T G T G C G C G G C G T T G A A A | | human |
| T G C C C T G C A C G T C G G G G C A G C G G G A C A G A T C C C A G G G T G C | | human |
| T G C C C T G C A C G T C G G G G C A G C G G G A C A G A T C C C A G G G T G C | | human |
| C C A G G G A G T C T C C A A G T G C C T C A C T C C T C C C G C C G C A A A C | | human |
| C C A G G G A G T C T C C A A G T G C C T C A C T C C T C C C G C C G C A A A C | | human |
| A T G | | human |
| A T G | | human |

FIG.2

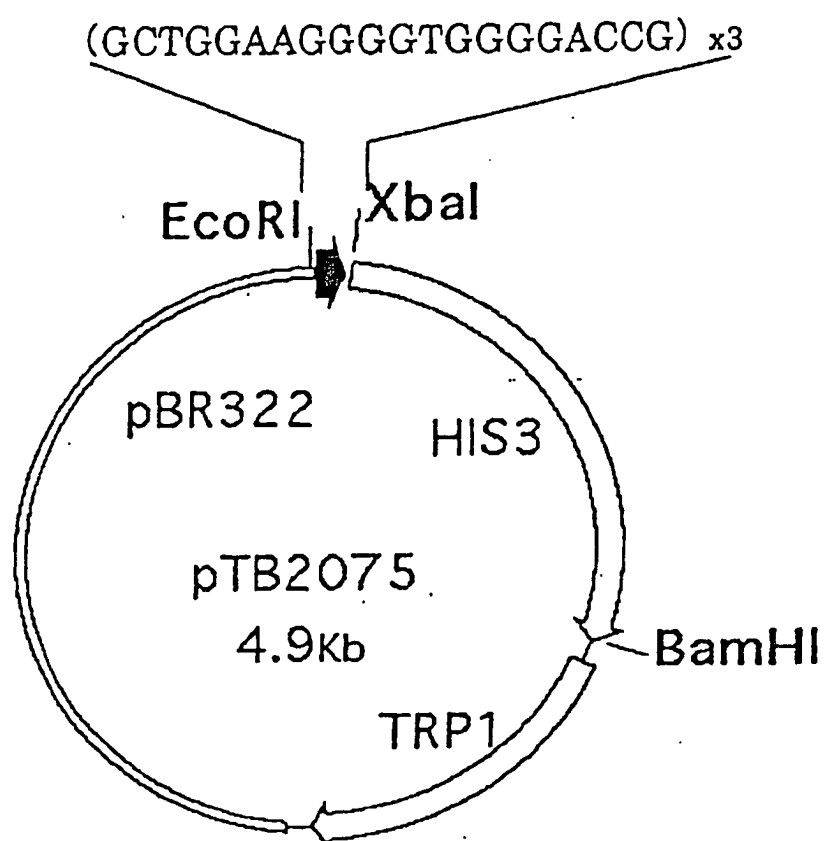


FIG. 3

[illegible]

FIG.4

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
TGGGCTCTTGGGAGCCAGGTTCCCAAGTGAGTTATTTACCTTGAGTTGATCGATATTTGTACATGTCCTCTAGGAACAGGGATTATTATTTCTGTA

110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
AAAAGAAAAGATAGAGCAGGCCATGGCGGCCCAACAGGTAAGAGCAGCTGCCACCAAAACCCTGATGTCCTGACTTTGATCCTTGCTGCTACA

210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
TGGTGAAGAGAGAGAGCTGAGTCTGCGAGGCTCTTCTCTGACTGTCACGAATGTGCCATGCCATACACACACAAAAGAGAGAGAGAGAGAGACAG

310     320     330     340     350     360     370     380     390     400
ACAGACAGACACTGACTGACTGACTGCTCTTTTGTCTCAGCAGCGGAGCAGAGTATCCAGCATGCTGCTCCCGACGCCCTTGGTAAGCCCTCCCTCTTGG
M L S R R L G K R S L L G

410     420     430     440     450     460     470     480     490     500
GAGCCCCGGTGTGGGACCTAGTCCCGTGAAGTACCATCAGGGGCCACCCCTGCCCTCTGGAGCCACAGATAGAAGTCCCGGAAGGAGCCATGTCCTCTGTC
A R V L G P S A A E Y P S C A T L P L E P Q I E Y P E G A H S L S

510     520     530     540     550     560     570     580     590     600
CCCACTCACCTTAAGGACCTGTCTGCCAGGAGCAGCCCAAGGAGCTCCTCAAAGCTTGGGAACCTCAGGCCACCCACAGGTGGCTTTACCCCTGGA
P L T S K O P V C O E O P K E L L K A L G T S G H P O Y A F O P G

610     620     630     640     650     660     670     680     690     700
CAGAAGGCTCTGTGTGTGATGACGTCAGGAGTCCAAGGGCTGGTGGAGCAGCAGCTGGCCCGAGGACAAGCTGACCGTCCCGCTCCCTGGACCCAGA
O K Y C Y W Y G G O E C K G L V E O H S W A E O K V T V R L L D O K

710     720     730     740     750     760     770     780     790     800
AGTTACAGATTCCGTGTAAAGTGAAGAGCTGTGGTGGCCGAGCTGCAGGCTAGCGCATCCACGCTGCCAGCCTTCAGCCCCGAGCCAGGTGCCAGG
L O I R C K Y E E V V L A E L O G S A S H V P A L E P G A O V P A

810     820     830     840     850     860     870     880     890     900
CTACAGACCGCTGTCTAGCAACATCCAGCTCCCAAGAGCAAGTGGATCGCTGGAGATGGACGAGATGATGGCCCGCATGGTGTGACGTCTCTGTCT
Y R P V S R N I D V P K R K S O A V E H O E H M A A H V L T S L S

910     920     930     940     950     960     970     980     990     1000
TGCAGTCCCGCTTGCACAGTCTCTCTGGGCTGAGCCCATCTCTCTGTCTTCCCTGCCAGCCCTCCGCTGACCCGTCGAAGCAGAGCGGTGATCTTTGAG
C S P V Y O S P P G A E P I F S V S R A A C G O P W K E S G D V S O

1010    1020    1030    1040    1050    1060    1070    1080    1090    1100
ACAGCGCCAGCAGCGCCGATCGAGCGGAGCAGTGGCAGCTCTACCCCTCGCCGCCCATCCGAGGCCAGCCCAAGTACCTGGGGGATGCCCTTTGG
S G S S G H W S G S S G S S T P S P P H P O A S P K Y L G O A F G

1110    1120    1130    1140    1150    1160    1170    1180    1190    1200
GTCTCCCAAACTGATCATGGCTTTGAGACTGATCTGACCCCTTCTCTGTAGACCAACCCAGCCCAAGAGAGCAGCACTCCGTGAAGGTGATGTAT
S P O T D H G F E T D P O P F L L D E P A P R K R R H S V K V M Y

1210    1220    1230    1240    1250    1260    1270    1280    1290    1300
AAGTGGCTGTGGCCAGCTGTGGCAAACTTCTCGCTTCAATGTGGCCATCAAACGACAGCTCAAAGCCCTCCACCTGGGGGACACTGTTGACTCTGATC
K C L W P S C G K V L R S I V G I K R H V K A L H L G D T V O S O O

1310    1320    1330    1340    1350    1360    1370    1380    1390    1400
AGTTCAAGCGGGAGCAAGACTTTTACTACACAGAGATGAGATGAAGAGGAATCTGCTCAGGCTGTGGCTGCTCCCTTCCCTGGGGACACCTATGGG
F K R E E D F Y T T E M O H K E E S A O A V A A P P A P G T P M G

1410    1420    1430    1440    1450    1460    1470    1480    1490    1500
CGAGCCAGCTCCACCTCAGGGTGACCAAGCTCCCTGCTGCTCTTTCATTCCTCCAGCCCAAGGTCACAGTATCTGGCCCAAGAACCTTGGCTC
E P A S T S R V T S P S L A A L S L P P A K Y O S S G P E H P G L

1510    1520    1530    1540    1550    1560    1570    1580    1590    1600
GAGTCTCTCTGCCCCAGTTGCACTCAGCAAGTCAGCTCTTCTGGCTCTTCTGGCACATTGAGGTGACCATGCATATCAGGCTCTGCCATCTCTCCAGA
E S S L P S V A L S K S A P G S F W H I O A D H A Y O A L P S F O I

1610    1620    1630    1640    1650    1660    1670    1680    1690    1700
TCCCTGTCTCCCCACATCTATACCAGCATCAGCTGGCTGCTGCCCTTACCACCACTCTCTCTCTCTCCGTCGCAAGCCGCTCTCTCAGCTTCAG
P V S P H I Y T S T S W A A A P T T T S S L S P V R S R S L S F S

1710    1720    1730    1740    1750    1760    1770    1780    1790    1800
CGAGCCCGAGCAGCCGCACTACAGTGAAGTCTCAGCTGATTGTCACTTCCCAACCCCTGCTCAGCAGCAGCAGGAAAGCCGTCGAGAGGCCAAG
E P O O P P P T V K S H L I V T S P P R A D S S T R K A R G E A K

1810    1820    1830    1840    1850    1860    1870    1880    1890    1900
AAGTCCCGTAAGGTGTACGGCATCGAGCAGCGGACCTAGTGTCCACAGCTGCGGTGGAAGAAGGCTGCGAGCGCTTCTGGACTGAGCTGCTTCA
K C R K V Y G I E H R D O W C T A C R W K K A C O R F L D

1910    1920    1930    1940    1950    1960    1970    1980    1990    2000
CTAGCCCCGCTTCTACCTTCCCTGGAGCGGGAAGCCCTCAGGCTGACGCCATCAGCAGAACACAGGGAGATGATGTGGCTGGATGTGGGACGCTG

2010    2020    2030    2040    2050    2060    2070    2080    2090    2100
GGGCTCCATTGGCTAAGATAGAACACTTAAAAACCTTTCTCCCCCTTGTGGGAGTGCTTTATTTTTAAAAAGCAAACTTAAATGAACATATTTTCC

2110    2120    2130    2140    2150    2160    2170    2180    2190    2200
CCTTAAATAGGAGAGAGCCAAATGACCAAGGGTATTCTGAGCGAAGCGGAGACCAAGAGTTACCCCTACCCCTACCCCATTCACCCCTCTCTGGG

2210    2220    2230    2240    2246
ACTACATATGCAATCAAGAGTAGGACAGGATGCTGCCCTTGGCTGGTT

```


FIG.5

```

M L S R R L G K R S L L G A R V L G P S A A E V P S G A T L P L E P Q I E V P E G A M S L S P L T S 50
- - - - - 0
K D P V C Q E Q P K E L L K A L G T S G H P Q V A F Q P G Q K V C V W Y G G Q E C K G L V E Q H S W 100
- - - - - 0
A E D K V T V R L L D Q K L Q I R C K V E E V W L A E L Q G S A S H V P A L E P G A Q V P A Y R P V 150
- - - - - D Q K L Q V C C R V E E V W L A K L O G P C P Q A P P L E P G A Q A L A Y R P V 40
S R N I D V P K R K S D A V E M D E M M A A M V L T S L S C S P V V Q S P P G A E P I F S V S R A A 200
S R N I D V P K R K S D A V E M D E M M A A M V L T S L S C S P V V Q S P P G T E A N F S A S R A A 90
C G D P W K E S G D V S D S G S S - - - G H W S G S S G S S T P S P P H P Q A S P K Y L G D A F G S 247
C - D P W K E S G D I S D S G S S T S G H W S G S S G V S T P S P P H P Q A S P K Y L G D A F G S 139
P Q T D H G F E T D P D P F L L D E P A P R K R R N S V K V M Y K C L W P S C G K V L R S I V G I K 297
P Q T D H G F E T D P D P F L L D E P A P R K R K N S V K V M Y K C L W P N C G K V L R S I V G I K 189
R H V K A L H L G D T V D S D Q F K R E E D F Y Y T E M Q M K E E S A Q A V A A P - - - P A P G T 343
R H V K A L H L G D T V D S D Q F K R E E D F Y Y T E V O L K E E S A A A A A A A A G T P V P G T 239
P M G E P A S T S R V T S P S L A A L S L P P A K V Q S S G P E H P G L E S S L P S V A L S K S A P 393
P T S E P A P T P S M T G L P L S A L P P P L H K A Q S S G P E H P G P E S S L P S G A L S K S A P 289
G S F W H I Q A D H A Y Q A L P S F Q I P V S P H I Y T S I S W A A A P T T T S S L S P V R S R S L 443
G S F W H I Q A D H A Y Q A L P S F O I P V S P H I Y T S V S W A A A P S A A C S L S P V R S R S L 339
S F S E P Q Q P P P T V K S H L I V T S P P P R A Q S S T R K A R G E A K K C R K V Y G I E H R D Q W 493
S F S E P Q Q P P A P A M K S H L I V T S P P P R A Q S G A R K A R G E A K K C R K V Y G I E H R D Q W 389
C T A C R W K K A C Q R F L D
C T A C R W K K A C Q R F L D

```

508
404