



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 698 29 857 T2 2006.02.02

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 1 009 753 B1

(21) Deutsches Aktenzeichen: 698 29 857.8

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/US98/17296

(96) Europäisches Aktenzeichen: 98 943 278.6

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 99/009049

(86) PCT-Anmeldetag: 21.08.1998

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: 25.02.1999

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 21.06.2000

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: 20.04.2005

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 02.02.2006

(51) Int Cl.⁸: C07H 21/04 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

56453 P 21.08.1997 US

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, CH, DE, FR, GB, IT, LI, LU

(73) Patentinhaber:

Quark Biotech, Inc., Pleasanton, Calif., US

(72) Erfinder:

EINAT, Paz, 74402 Nes Ziona, IL; SKALITER, Rami,
74037 Nes Ziona, IL

(74) Vertreter:

Schwabe, Sandmair, Marx, 81677 München

(54) Bezeichnung: HYPOXIE-REGULIERTE GENE

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

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

Beschreibung**HINTERGRUND DER ERFINDUNG****1. GEBIET DER ERFINDUNG**

[0001] Identifikation von Genen, die bei Hypoxie differenziell exprimiert werden, und Verwendung der Gene und Genprodukte für die Diagnose und den therapeutischen Eingriff.

2. BESCHREIBUNG DES VERWANDTEN STANDES DER TECHNIK

[0002] Das Maß der Gewebeoxygenierung spielt eine wichtige Rolle bei der normalen Entwicklung, ebenso wie bei pathologischen Vorgängen wie Ischämie. Gewebeoxygenierung spielt eine signifikant regulierende Rolle sowohl bei der Apoptose als auch bei der Angiogenese (Bouck et al., 1996; Bunn et al., 1996; Dor et al., 1997; Carmeliet et al., 1998). Apoptose (siehe Duke et al., 1996, zum Überblick) und Wachstumsstopp geschehen, wenn Zellwachstum und -lebensfähigkeit wegen Sauerstoffmangel (Hypoxie) reduziert sind. Angiogenese (das heißt Blutgefäßwachstum, Vaskularisierung) wird stimuliert, wenn hypoxisierte Zellen Faktoren sezernieren, welche die Proliferation und Migration von Endothelzellen in einem Versuch stimulieren, die Sauerstoffhomöostase wieder herzustellen (für einen Überblick siehe Hanahan et al., 1996).

[0003] Ischämische Erkrankungspathologien schließen eine Abnahme in der Blutzufuhr zu einem Körperorgan, Gewebe oder Körperteil ein, die allgemein durch Verengung oder Verschluss der Blutgefäße, wie z. B. bei Retinopathie, akutem Nierenversagen, Myokardinfarkt und Schlaganfall, verursacht wird. Deswegen sind Apoptose und Angiogenese, wenn sie durch ischämische Zustände induziert werden, ebenfalls in diese Krankheitszustände verwickelt. Neoangiogenese wird bei etlichen Formen der Retinopathie und beim Tumorwachstum gesehen. Es wird bemerkt, dass Angiogenese für das Tumorwachstum notwendig ist und dass eine Verzögerung der Angiogenese ein nützliches Werkzeug bei der Kontrolle von Bösartigkeit und Retinopathien sein würde. Ferner würde es nützlich sein, tumorige Zellen dazu zu bringen, Apoptose (das heißt programmierten Zelltod) durchzumachen.

[0004] Diese Prozesse sind jedoch komplexe Kaskaden von Ereignissen, die durch viele verschiedene Gene kontrolliert werden, welche auf die verschiedenen Stressarten, wie Hypoxie, reagieren. Die Expression von unterschiedlichen Genen, die auf Hypoxiestress reagieren, kann nicht nur Apoptose oder Angiogenese, sondern beides auslösen. Bei Krebs wurde beobachtet, dass mit Apoptose und Angiogenese in Beziehung stehende Gene therapeutische Ziele sind. Hypoxie selber spielt jedoch eine kritische Rolle bei der Auswahl von Mutationen, welche zu schwereren tumorigen Phänotypen beitragen (Graeber et al., 1996). Deshalb wird die Identifikation von Kandidatengenen und -genprodukten benötigt, welche therapeutisch nicht nur bei Krebs und Ischämie genutzt werden können und welche entweder Apoptose oder Angiogenese induzieren oder, um die Vorgänge zu verzögern. Es wäre nützlich, Gene zu identifizieren, welche direkte Kausalbeziehungen zwischen einer Erkrankung und ihren damit in Beziehung stehenden Pathologien haben, und ein herauf oder herunter regulierendes (Regulator-)Gen zu identifizieren.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0005] Gemäß der vorliegenden Erfindung werden gereinigte, isolierte und klonierte Nucleinsäuresequenzen bereitgestellt, die auf Hypoxie ansprechende Gene kodieren, welche Sequenzen haben, wie in der Gruppe, umfassend SEQ ID Nr. 1 und SEQ ID Nr. 2, dargelegt, oder eine komplementäre oder Allelvariantensequenz und menschliche Homologa, soweit benötigt, dazu. Die vorliegende Erfindung stellt ferner Proteine bereit, wie durch die in SEQ ID Nr. 1 und SEQ ID Nr. 2 dargelegten Nucleinsäuresequenzen kodiert, wobei die SEQ ID Nrn. 9 und 10 Beispiele der Proteine sind. Die vorliegende Erfindung stellt weiter Antikörper bereit, die gegen die Proteine gerichtet sind, wie sie durch die Nucleinsäuresequenzen kodiert werden, wie sie in SEQ ID Nr. 1 und SEQ ID Nr. 2 dargelegt sind, einschließlich der SEQ ID Nrn. 9 und 10.

[0006] Die vorliegende Erfindung stellt weiter transgene Tiere und Zelllinien bereit, die wenigstens eine exprimierbare Nucleinsäuresequenz, wie in SEQ ID Nr. 1 und SEQ ID Nr. 2 dargelegt, tragen. Die vorliegende Erfindung stellt weiter eukaryotische Knockout-Organismen bereit, in denen wenigstens eine Nucleinsäuresequenz, wie in SEQ ID Nr. 1 und SEQ ID Nr. 2 dargelegt, ausgeknockt sind.

[0007] Ebenfalls wird hierin ein Verfahren zur Regulierung von Angiogenese in einem Patienten beschrieben, der einen Bedarf an einer solchen Behandlung hat, durch Verabreichung einer therapeutisch wirksamen Men-

ge eines Antagonisten eines Proteins, wie es durch die Nucleinsäuresequenz, die in SEQ ID Nr. 2 dargelegt ist, kodiert wird, an einen Patienten. Alternativ stellt die vorliegende Erfindung ein Verfahren bereit, Angiogenese in einem Patienten, der einer solchen Behandlung bedarf, zu regulieren durch Verabreichung einer therapeutisch wirksamen Menge von wenigstens einem Gegensinn-Oligonucleotid gegen die Nucleinsäuresequenz, wie in SEQ ID Nr. 2 dargelegt, oder eines dominant negativen Peptids, das gegen die Sequenz oder ihre Proteine gerichtet ist.

[0008] Die vorliegende Erfindung stellt ferner ein Verfahren bereit, Angiogenese oder Apoptose in einem Patienten zu regulieren, der einer solchen Behandlung bedarf, durch Verabreichen einer therapeutisch wirksamen Menge eines durch SEQ ID Nr. 2 kodierten Proteins oder der Proteinsequenz, wie sie in SEQ ID Nr. 10 dargelegt ist, als aktive Bestandteile in einem pharmazeutisch annehmbaren Träger an einen Patienten.

[0009] Die vorliegende Erfindung stellt ein Verfahren bereit, ein Apoptose regulierendes Gen bereitzustellen, indem direkt einem Patienten, der einer solchen Therapie bedarf, unter Nutzung von Gentherapie ein exprimierbarer Vektor verabreicht wird, der Expressionskontrollsequenzen umfasst, welche an die in SEQ ID Nr. 2 (menschliches Homolog) dargelegten Sequenzen operabel gekoppelt sind.

[0010] Die vorliegende Erfindung stellt ebenfalls ein Verfahren bereit, um ein Angiogenese regulierendes Gen bereitzustellen, unter Nutzung von Gentherapie, indem einem Patienten, der einer solchen Therapie bedarf, direkt ein exprimierbarer Vektor verabreicht wird, der Expressionskontrollsequenzen umfasst, welche an die in SEQ ID Nr. 2 dargelegten Sequenzen operabel gekoppelt sind.

[0011] Die vorliegende Erfindung stellt ein Verfahren zur Regulierung der Antwort auf hypoxische Zustände in einem Patienten bereit, der einer solchen Behandlung bedarf, durch Verabreichen einer therapeutisch wirksamen Menge eines Gegensinn-Oligonucleotids, das gegen die in SEQ ID Nr. 2 dargelegten Sequenzen gerichtet ist, an einen Patienten. Die vorliegende Erfindung stellt weiter ein Verfahren zur Bereitstellung eines Hypoxieregulierungsgens unter Nutzung von Gentherapie bereit, indem einem Patienten, der einer solchen Therapie bedarf, direkt ein exprimierbarer Vektor verabreicht wird, der Expressionskontrollsequenzen umfasst, die operabel an die in SEQ ID Nr. 2 dargelegten Sequenzen gekoppelt sind.

[0012] Die vorliegende Erfindung stellt ebenfalls ein Verfahren zum Diagnostizieren des Vorkommens von Ischämie in einem Patienten bereit, das die Schritte des Analysierens einer Körperflüssigkeit oder Gewebeprobe des Patienten in Bezug auf die Anwesenheit oder das Genprodukt wenigstens eines exprimierten (heraufregulierten) Gens, wie dargelegt in SEQ ID Nr. 2, umfasst, und wo die Ischämie festgestellt wird, falls das heraufregulierte Gen oder Genprodukt bestätigt wird.

BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0013] Andere Vorteile der vorliegenden Erfindung werden leicht geschätzt werden, wenn dieselbe besser verstanden wird durch Bezugnahme auf die folgende detaillierte Beschreibung, wenn sie in Verbindung mit den begleitenden Zeichnungen bedacht wird, worin:

[0014] [Fig. 1](#) ein Computerscan ist, der die In-vitro-Translation von cDNS-Klonen von RTP801 voller Länge (SEQ ID Nr. 1) zeigt. cDNS-Klone werden in vitro unter Verwendung eines gekoppelten Transkriptions-Translations-Kits (Promega) translatiert. Translationsprodukte werden auf Acrylamidgel aufgetrennt und Röntgenfilm ausgesetzt. Zwei Klone, mit Pfeilen markiert, ergaben die erwartete Proteingröße von annähernd 30 KD. Dies bestätigt die Sequenzanalyse des mutmaßlichen Leserasters.

[0015] [Fig. 2](#) ist ein Computerscan, der die Northern-Blot-Analyse von RTP801 (SEQ ID Nr. 1) zeigt. RNS wurde aus Ratten-C6-Gliomzellen extrahiert, die Hypoxie für 0, 4 oder 16 Stunden ausgesetzt waren. PolyA+-selektierte mRNS (2 µg) aus jeder Probe wurde auf denaturierenden Agarosegelen aufgetrennt, auf Nytran-Membranen geblottet und mit der rtp241-Sonde hybridisiert. Eine Bande mit 1,8 Kb wird beobachtet, die eine markante Induktion nach Hypoxie zeigt.

[0016] [Fig. 3](#) ist ein Computerscan, der die Northern-Blot-Analyse von RTP779 (SEQ ID Nr. 2) zeigt. RNS wurde aus Ratten-C6-Gliomzellen extrahiert, die Hypoxie für 0, 4 oder 16 Stunden ausgesetzt waren. PolyA+-selektierte mRNS (2 µg) aus jeder Probe wurde auf denaturierenden Agarosegelen aufgetrennt, auf Nytran-Membranen geblottet und mit der rtp779-Sonde hybridisiert. Eine Bande mit 1,8 Kb wird beobachtet, die eine äußerst differenzielle Expression zeigt.

[0017] [Fig. 4](#) ist ein Computerscan, der die Northern-Blot-Analyse von RTP241 (SEQ ID Nr. 3) zeigt. RNS wurde aus Ratten-C6-Gliomzellen extrahiert, welche Hypoxie für 0, 4 oder 16 Stunden ausgesetzt waren. PolyA+ -selektierte mRNS (2 µg) aus jeder Probe wurde auf denaturierenden Agarosegelen aufgetrennt, auf Nytran-Membranen geblottet und mit der rtp241-Sonde hybridisiert. Zwei Banden mit 1,8 Kb und 4 Kb werden beobachtet; beide zeigen eine gute differenzielle Expression.

[0018] [Fig. 5](#) ist ein Computerscan, der die Northern-Blot-Analyse von RTP359 (SEQ ID Nr. 5) zeigt. RNS wurde aus Ratten-C6-Gliomzellen extrahiert, welche Hypoxie für 0, 4 oder 16 Stunden ausgesetzt waren. PolyA+ -selektierte mRNS (2 µg) aus jeder Probe wurde auf denaturierenden Agarosegelen aufgetrennt, auf Nytran-Membranen geblottet und mit der rtp359-Sonde hybridisiert. Eine Bande mit 4,5 Kb wird beobachtet, die eine gute differenzielle Expression zeigt.

DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0019] Die vorliegende Erfindung identifiziert Kandidatengene und -genprodukte, die therapeutisch und diagnostisch nicht nur bei Hypoxie und Ischämie genutzt werden können und die Apoptose oder Angiogenese regulieren können. Mit Regulieren oder Modulieren oder Kontrollieren wird gemeint, dass der Vorgang entweder bis zu dem Ausmaß induziert oder inhibiert wird, das notwendig ist, eine Änderung in dem Vorgang und dem damit verbundenen Erkrankungszustand in dem Patienten zu bewirken. Ob Induktion oder Inhibition beabsichtigt ist, wird aus dem zu behandelnden Vorgang und der zu behandelnden Erkrankung ersichtlich sein und wird Fachleuten in der Medizin bekannt sein. Die vorliegende Erfindung identifiziert Gene für die Gentherapie, Diagnostika und Therapeutika, die eine direkte Kausalbeziehung zwischen einer Erkrankung und damit in Verbindung stehenden Pathologien und Herauf- oder Herunterregulator- (Responder-)Genen haben. Das heißt, die vorliegende Erfindung wird durch eine physiologische Beziehung zwischen Ursache und Wirkung initiiert.

[0020] Die vorliegende Erfindung stellt gereinigte, isolierte und klonierte Nucleinsäurepolynucleotide (Sequenzen) bereit, die Gene kodieren, welche wenigstens auf hypoxische Zustände durch Heraufregulation der Expression ansprechen und welche Sequenzen haben, wie sie in der Gruppe dargelegt sind, die die SEQ ID Nr. 1, SEQ ID Nr. 2, SEQ ID Nr. 3, SEQ ID Nr. 4 und SEQ ID Nr. 5 und ihre Analoga und Polymorphismen oder eine komplementäre oder Allelvariantensequenz dazu umfassen. Die vorliegende Erfindung stellt ferner SEQ ID Nr. 6 bereit, welche ein bekanntes Gen (Neuroleukin) ist, das ebenfalls auf den hypoxischen Stress anspricht, indem es heraufreguliert wird. SEQ ID Nr. 6 ist die menschliche Sequenz für Neuroleukin und hat über 90% Homologie mit der Rattensequenz. Das menschliche Homolog wird verwendet, wo es geeignet ist. Wegen der hohen Homologie zwischen den Ratten- und Menschsequenzen kann die Rattensequenz ebenfalls für Sonden und Ähnliches verwendet werden, falls notwendig.

[0021] Die vorliegende Erfindung stellt ferner Proteine und ihre Analoga bereit, wie sie durch die Nucleinsäuresequenzen kodiert werden, die in SEQ ID Nr. 1, SEQ ID Nr. 2, SEQ ID Nr. 3, SEQ ID Nr. 4, SEQ ID Nr. 5 dargelegt sind, wobei die SEQ ID Nrn. 7 und 8 ebenso wie die SEQ ID Nrn. 9-11 Beispiele der Proteine sind. Die vorliegende Erfindung stellt ferner ein Verfahren bereit, Angiogenese oder Apoptose in einem Patienten, der einer solchen Behandlung bedarf, zu regulieren durch Verabreichung an einen Patienten einer therapeutisch wirksamen Menge eines Proteins, das durch die SEQ ID Nrn. 2-6 kodiert wird, oder durch die Proteinsequenzen, wie sie in den SEQ ID Nrn. 7-8, 10-11 dargelegt sind, als aktive Bestandteile in einem pharmazeutisch annehmbaren Träger.

[0022] Die Proteine können rekombinant erzeugt werden (siehe allgemein Marshak et al., 1996 "Strategies for Protein Purification and Characterization. A laboratory course manual." CSHL Press) und Analoga können wegen des posttranslationalen Bearbeitens vorhanden sein. Der Begriff Analog, wie er hierin verwendet wird, wird als eine Nucleinsäuresequenz oder als ein Protein definiert, das gewisse Unterschiede in ihren Aminosäure-/Nucleotidsequenzen hat im Vergleich mit der natürlichen Sequenz der SEQ ID Nrn. 1-8. Gewöhnlicherweise wird das Analog allgemein zu wenigstens 70% homolog zu jenem Teil sein, der funktionell relevant ist. In bevorzugteren Ausführungsbeispielen wird die Homologie wenigstens 80% betragen und kann sich 95% Homologie mit der Protein-/Nucleotidsequenz nähern. Die Aminosäure- oder Nucleotidsequenz eines Analogs kann von jener der Primärsequenz differieren, wenn wenigstens ein Rest deletiert, inseriert oder substituiert wird; das Protein- oder Nucleinsäuremolekül bleibt aber funktionell. Unterschiede in der Glykosylierung können Proteinanaloga bereitstellen.

[0023] Funktionell relevant bezieht sich auf die biologische Eigenschaft des Moleküls und bedeutet in diesem Zusammenhang einen In-vivo-Effektor oder eine antigenische Funktion oder Aktivität, die direkt oder indirekt durch ein natürlich vorkommendes Protein oder Nucleinsäuremolekül durchgeführt wird. Effektorfunktionen

schließen ein, sind jedoch nicht beschränkt darauf, dass sie Rezeptorbindung, jegliche enzymatische Aktivität oder enzymmodulierende Aktivität, jegliche Trägerbindungsaktivität, jegliche Hormonaktivität, jede Aktivität bei der Förderung oder Inhibition von Adhäsion von Zellen auf extrazellulärer Matrix oder auf Zelloberflächenmolekülen einschließen, oder auf irgendeine strukturelle Rolle beschränkt sind, ebenso wie, dass sie die Nucleinsäuresequenz aufweisen, welche ein funktionelles Protein kodiert und exprimierbar ist. Die Antigenfunktionen bedeuten im Wesentlichen das Besitzen eines Epitops oder einer Antigenstelle, die in der Lage ist, mit Antikörpern, die gegen ein natürlich vorkommendes Protein hervorgerufen wurden, kreuz zu reagieren. Biologisch aktive Analoga teilen eine Effektorfunktion des nativen Proteins, welches zusätzlich eine Antigenfunktion aufweisen kann, dies jedoch nicht muss.

[0024] Die vorliegende Erfindung stellt weiter Antikörper bereit, die gegen die Proteine gerichtet sind, wie sie durch die Nucleinsäuresequenzen kodiert werden, wie dargelegt in SEQ ID Nr. 1, SEQ ID Nr. 2, SEQ ID Nr. 3, SEQ ID Nr. 4, SEQ ID Nr. 5 und SEQ ID Nr. 6, welche in Immuntests und Ähnlichen verwendet werden können.

[0025] Die Antikörper können entweder monoklonal, polyklonal oder rekombinant sein. Gewöhnlich können die Antikörper gegen das Immunogen oder einen Teil davon, z. B. ein auf der Sequenz basierendes synthetisches Peptid, zubereitet werden oder können rekombinant zubereitet werden durch Klonierungstechniken oder das natürliche Genprodukt und/oder Teile davon können isoliert und als das Immunogen verwendet werden. Immunogene können verwendet werden, um Antikörper durch Standard-Antikörperproduktionstechniken herzustellen, die Fachleuten wohl bekannt sind, wie beschrieben allgemein in Harlow und Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1988, und Borrebaeck, *Antibody Engineering – A Practical Guide*, W. H. Freeman and Co., 1992. Antikörperfragmente können ebenfalls aus den Antikörpern durch Fachleuten bekannten Verfahren zubereitet werden und schließen Fab, F(ab')₂ und Fv ein.

[0026] Um polyklonale Antikörper zu produzieren, wird ein Wirt, wie ein Kaninchen oder eine Ziege, mit dem Immunogen oder Immunogenfragment immunisiert, im Allgemeinen mit einem Adjuvans, und, falls notwendig, an einen Träger gekoppelt; Antikörper gegen das Immunogen werden aus den Seren gesammelt. Ferner kann der polyklonale Antikörper so absorbiert sein, dass er monospezifisch ist. Das heißt, die Seren können gegen verwandte Immunogene absorbiert werden, so dass keine kreuzreaktiven Antikörper in den Seren verbleiben, was sie monospezifisch macht.

[0027] Um monoklonale Antikörper zu produzieren, schließt die Technik Hyperimmunisierung eines geeigneten Donors, im Allgemeinen eine Maus, mit dem Immunogen und Isolierung der die Antikörper produzierenden Milzzellen ein. Diese Zellen werden mit einer Zelle verschmolzen, die Immortalität hat, wie eine Myelomzelle, um ein fusioniertes Zellhybrid bereitzustellen, das Unsterblichkeit hat und das den erforderlichen Antikörper sezerniert. Die Zellen werden dann in der Masse kultiviert und die monoklonalen Antikörper werden aus den Kulturmedien für die Verwendung geerntet.

[0028] Um einen rekombinanten Antikörper zu erzeugen (siehe allgemein Huston et al., 1991; Johnson und Bird, 1991; Mernaugh und Mernaugh, 1995), werden Boten-RNS aus Antikörper erzeugenden B-Lymphozyten von Tieren oder aus Hybridzellen revers transkribiert, um komplementäre DNS (cDNS) zu gewinnen. Antikörper-cDNS, die die volle oder nur eine Teillänge haben kann, wird amplifiziert und in einen Phagen oder ein Plasmid kloniert. Die cDNS kann von einer teilweisen Länge der schweren und leichten Ketten-cDNS sein, getrennt oder verbunden durch einen Linker. Der Antikörper oder das Antikörperfragment wird unter Verwendung eines geeigneten Expressionssystems exprimiert, um einen rekombinanten Antikörper zu gewinnen. Antikörper-cDNS kann ebenfalls durch Screening von einschlägigen Expressionsbibliotheken gewonnen werden.

[0029] Der Antikörper kann an ein festes Trägersubstrat gebunden werden oder kann mit einer detektierbaren Einheit konjugiert werden oder kann sowohl gebunden als auch konjugiert werden, wie es im Stand der Technik wohl bekannt ist (für eine allgemeine Diskussion der Konjugation fluoreszierender oder enzymatischer Einheiten siehe Johnstone & Thorpe, *Immunochemistry in Practice*, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1982). Das Binden von Antikörpern an ein festes Trägersubstrat ist ebenfalls im Stand der Technik wohl bekannt. (Siehe für eine allgemeine Diskussion Harlow & Lane *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Publications, New York, 1988, und Bonebaeck, *Antibody Engineering – A Practical Guide*, W. H. Freeman and Co., 1992.) Die mit der vorliegenden Erfindung gedachten detektierbaren Einheiten können einschließen, sind jedoch nicht beschränkt auf fluoreszierende, metallische, enzymatische und radioaktive Marker, wie Biotin, Gold, Ferritin, alkalische Phosphatase, β-Galactosidase, Peroxidase, Urease, Fluorescein, Rhodamin, Tritium, ¹⁴C und Iodierung.

[0030] Die vorliegende Erfindung stellt weiter transgene Tiere und Zelllinien bereit, die wenigstens eine expri-

mierbare Nucleinsäuresequenz tragen, wie dargelegt in SEQ ID Nr. 1, SEQ ID Nr. 2, SEQ ID Nr. 3, SEQ ID Nr. 4, SEQ ID Nr. 5 und SEQ ID Nr. 6. Mit exprimierbar ist der Einschluss sämtlicher regulatorischer Elemente in der Sequenz gemeint, die notwendig sind für die Expression des Gens, oder indem das Gen in dem Zielgenom so platziert wird, dass es exprimiert wird. Die vorliegende Erfindung stellt weiter eukaryotische Knockout-Organismen bereit, in welchen wenigstens eine der in SEQ ID Nr. 1, SEQ ID Nr. 2, SEQ ID Nr. 3, SEQ ID Nr. 4, SEQ ID Nr. 5 und SEQ ID Nr. 6 dargelegten Nucleinsäuresequenzen ausgeknockt worden ist.

[0031] Diese transgenen und Knockout-Tiere werden unter Verwendung von im Stand der Technik bekannten Standardverfahren konstruiert und wie dargelegt in den US-Patenten 5,487,992, 5,464,764, 5,387,742, 5,360,735, 5,347,075, 5,298,422, 5,288,846, 5,221,778, 5,175,385, 5,175,384, 5,175,383, 4,736,866, ebenso wie von Burke und Olson (1991), Capecchi (1989), Davies et al., (1992), Dickinson et al., (1993), Duff und Lincoln (1995), Huxley et al., (1991), Jakobovits et al., (1993), Lamb et al., (1993), Pearson und Choi (1993), Rothstein (1991), Schedl et al., (1993), Strauss et al., (1993). Weiterhin stellen die Patentanmeldungen WO 94/23049, WO 93/14200, WO 94/06908, WO 94/28123 ebenfalls Information bereit. Es kann genauer jede im Stand der Technik bekannte Technik verwendet werden, um das Transgen exprimierbar in Tiere einzuführen, um die elterliche Tierlinie zu produzieren. Solche Techniken schließen ein, sind jedoch nicht beschränkt auf pronucleäre Mikroinjektion (US-Patent 4,873,191); retrovirusvermittelter Gentransfer in Keimlinien (Van der Putten et al., 1985); Gentargeting in embryonalen Stammzellen (Thompson et al., 1989; Mansour, 1990, und US-Patent 5,614,396); Elektroporation von Embryonen (Lo, 1983); und spermavermittelter Gentransfer (Lavitrano et al., 1989). Für einen Überblick solcher Techniken siehe Gordon (1989).

[0032] Weiterhin kann ein elterlicher Stamm, statt dass er ein direktes menschliches Transgen trägt, das homologe, durch Gentargeting modifiziert endogene Gen haben, so dass es sich dem Transgen annähert. Das bedeutet, dass das endogene Gen "humanisiert" und/oder mutiert worden ist (Reaume et al., 1996). Es sollte festgestellt werden, dass, falls die tierischen und menschlichen Sequenzen im Wesentlichen homolog sind, ein "humanisiertes" Gen nicht erforderlich ist. Das transgene Elterntier kann ebenfalls eine überexprimierte Sequenz tragen, entweder die nicht-mutierte oder eine mutierte Sequenz und humanisiert oder nicht, wie erforderlich. Der Begriff Transgen wird deshalb verwendet, um sich auf sämtliche dieser Möglichkeiten zu beziehen.

[0033] Zusätzlich können Zellen aus dem Abkömmling isoliert werden, welcher ein Transgen von jedem transgenen Elternteil trägt, und die verwendet werden, um primäre Zellkulturen oder Zelllinien zu etablieren, wie es im Stand der Technik bekannt ist.

[0034] Wo geeignet, wird ein Elternstamm homozygot für das Transgen sein. Zusätzlich wird das endogene Nicht-Transgen in dem Genom, das homolog ist mit dem Transgen, nicht expressiv sein. Mit nicht expressiv ist gemeint, dass das endogene Gen nicht exprimiert werden wird und dass diese Nicht-Expression auf die Nachkommen vererbar ist. Zum Beispiel könnte das endogene homologe Gen durch im Stand der Technik bekannte Verfahren "ausgeknockt" werden. Alternativ könnte der elterliche Stamm, der eines der Transgene empfängt, eine Mutation an dem endogenen homologen Gen tragen, was es nicht-exprimiert macht.

[0035] Die vorliegende Erfindung stellt ein Verfahren zur Regulierung von Angiogenese in einem Patienten bereit, der einer solchen Behandlung bedarf, indem einem Patienten eine therapeutisch wirksame Menge eines Antagonisten von wenigstens einem Protein verabreicht wird, wie es durch die Nucleinsäuresequenzen, wie dargelegt in SEQ ID Nr. 1, SEQ ID Nr. 2, SEQ ID Nr. 3, SEQ ID Nr. 4, SEQ ID Nr. 5 und SEQ ID Nr. 6, kodiert wird. Der Antagonist wird dosiert und in einem pharmazeutisch annehmbaren Träger verabreicht, wie hierin unten beschrieben. Der Begriff Antagonist oder Antagonisieren wird in seiner breitesten Bedeutung verwendet. Antagonismus kann jeden Mechanismus oder jede Behandlung einschließen, welche in Inhibition, Inaktivierung, Hemmung oder Reduktion der Genaktivität oder des Genproduktes resultiert. Es sollte festgestellt werden, dass die Inhibition eines Gens oder eines Genprodukts für einen Anstieg in einer korrespondierenden Funktion sorgen kann, welche das Gen oder das Genprodukt reguliert hat. Der antagonisierende Schritt kann das Blockieren zellulärer Rezeptoren für die Genprodukte der SEQ ID Nrn. 1-6 einschließen und kann die Ge-gensinn-Behandlung einschließen, wie sie hierin unten diskutiert wird.

[0036] Die vorliegende Erfindung stellt weiter ein Verfahren zur Regulierung von Angiogenese oder Apoptose in einem Patienten, der einer solchen Behandlung bedarf, durch Verabreichen einer therapeutisch wirksamen Menge eines regulierenden Agens in einem pharmazeutisch annehmbaren Träger an einen Patienten bereit, wobei das Protein ausgewählt wird aus der Gruppe, bestehend aus SEQ ID Nrn. 7-11. Das regulierende Agens wird dosiert und in einem pharmazeutisch annehmbaren Träger zugeführt, wie hierin unten beschrieben. Zum Beispiel kann ein Patient Bedarf daran haben, Apoptose in tumorigenen Zellen zu induzieren oder Angiogenese in Traumasituationen, wo z. B. eine Gliedmaße wieder befestigt werden muss, oder in einem Transplantat,

wo Revaskularisierung erforderlich ist.

[0037] Die vorliegende Erfindung stellt ein Verfahren zur Regulierung von Angiogenese oder Apoptose in einem Patienten, der einer solchen Behandlung bedarf, bereit, durch Verabreichen einer therapeutisch wirksamen Menge an einem Patienten von wenigstens einem Gegensinn-Oligonucleotid oder einem dominant negativen Peptid (entweder als cDNS oder als Peptid; Herskowitz, 1987), das gegen die Nucleinsäuresequenzen, wie dargelegt in den SEQ ID Nr. 1, SEQ ID Nr. 2, SEQ ID Nr. 3, SEQ ID Nr. 4, SEQ ID Nr. 5 und SEQ ID Nr. 6, gerichtet ist. Die vorliegende Erfindung stellt ebenfalls ein Verfahren bereit, die Antwort auf hypoxische Zustände in einem Patienten zu regulieren, der einer solchen Behandlung bedarf, durch Verabreichen einer therapeutisch wirksamen Menge eines Gegensinn-Oligonucleotids an einen Patienten, das gegen wenigstens eine der in der Gruppe dargelegten Sequenzen gerichtet ist, die die SEQ ID Nr. 1, SEQ ID Nr. 2, SEQ ID Nr. 3, SEQ ID Nr. 4, SEQ ID Nr. 5 und SEQ ID Nr. 6 umfasst. Das Gegensinn-Oligonucleotid als der aktive Bestandteil in einer pharmazeutischen Zubereitung wird dosiert und in einem pharmazeutisch annehmbaren Träger zugeführt, wie hierin unten diskutiert.

[0038] Viele Übersichtsartikel deckten die Hauptaspekte der Gegensinn-(AS-(antisense)) Technologie und ihres enormen therapeutischen Potenzials ab (Wright und Anazodo, 1995). Es gibt Übersichtsartikel über die chemischen (Crooke, 1995; Uhlmann et al., 1990), zellulären (Wagner, 1994) und therapeutischen (Hanania et al., 1995; Scanlon et al., 1995; Gewirtz, 1993) Aspekte dieser sich schnell entwickelnden Technologie. Innerhalb einer relativ kurzen Zeit wurde umfassende Information über die In-vitro-Verwendung von AS-Nucleotidsequenzen in kultivierten primären Zellen und Zelllinien, ebenso wie für die In-vivo-Applikation solcher Nucleotidsequenzen für die Unterdrückung spezifischer Vorgänge und für die Änderung von Körperfunktionen in einer vorübergehenden Weise akkumuliert. Weiterhin ist ausreichend Erfahrung nun in vitro und in vivo in Tiermodellen und menschlichen und klinischen Versuchen zugänglich, um die menschliche Wirksamkeit vorherzusagen.

[0039] Die Gegensinnintervention bei der Expression spezifischer Gene kann durch die Verwendung von synthetischen AS-Oligonucleotidsequenzen erreicht werden (für jüngere Berichte siehe Lefebvre-Hellencourt et al., 1995; Agrawal, 1996; Lev-Lehman et al., 1997). AS-Oligonucleotidsequenzen können kurze DNS-Sequenzen sein, typischerweise 15-30 mer, sie können jedoch ebenfalls so klein sein wie 7 mer sein (Wagner et al., 1996), gestaltet, um Ziel-mRNS von Interesse zu komplementieren und eine RNS:AS-Duplex zu bilden. Diese Duplexbildung kann das Verarbeiten, Splicen, den Transport oder die Translation der relevanten mRNS verhindern. Ferner können gewisse AS-Nucleotidsequenzen zelluläre RNase-H-Aktivität auslösen, wenn sie mit ihrer Ziel-mRNS hybridisiert werden, was in mRNS-Abbau resultiert (Calabretta et al., 1996). In jenem Fall wird RNase H den RNS-Bestandteil der Duplex abspalten und kann möglicherweise die AS freisetzen, um weiter mit zusätzlichen Molekülen der Ziel-RNS zu hybridisieren. Eine zusätzliche Wirkweise resultiert aus der Wechselwirkung von AS mit genomicscher DNS, um eine Tripel-Helix zu bilden, welche transkriptionell inaktiv sein kann.

[0040] Das Sequenz-Zielsegment für das Gegensinn-Oligonucleotid wird so ausgewählt, dass die Sequenz geeignete energieverwandte Eigenschaften zeigt, die wichtig sind für die Oligonucleotidduplexbildung mit ihren komplementären Matrizen, und dass sie ein geringes Potenzial für Selbstdimerisierung oder Selbstkomplementierung zeigt (Anazodo et al., 1996). Zum Beispiel kann das Computerprogramm OLIGO (Primer Analysis Software, Version 3.4) verwendet werden, um Gegensinnsequenz-Schmelztemperatur, die Eigenschaften freier Energie zu bestimmen und um das Potenzial der Eigendimerbildung und eigenkomplementärer Eigenschaften zu beurteilen. Das Programm erlaubt die Bestimmung einer qualitativen Abschätzung dieser beiden Parameter (die mögliche Selbstdimerbildung und selbstkomplementär) und stellt eine Anzeige von "kein Potenzial" oder "gewisses Potenzial" oder "im Wesentlichen vollständiges Potenzial" bereit. Unter Verwendung dieses Programmes werden allgemein solche Zielsegmente ausgewählt, die Abschätzungen dahingehend haben, dass sie kein Potenzial in diesen Parametern haben. Es können jedoch Segmente verwendet werden, die "ein gewisses Potenzial" in einer der Kategorien haben. Eine Balance der Parameter wird verwendet bei der Auswahl, wie es im Stand der Technik bekannt ist. Ferner werden die Oligonucleotide ebenfalls, wie erforderlich, selektiert, so dass Analogsubstitution die Funktion nicht wesentlich beeinträchtigt.

[0041] Phosphorthioat-Gegensinn-Oligonucleotide zeigen normalerweise keine signifikante Toxizität bei Konzentrationen, die wirksam sind, und zeigen ausreichende pharmakodynamische Halbwertszeiten in Tieren (Agarwal et al., 1996) und sind nucleaseresistent. Es wurden gegensinn-induzierte Loss-Of-Function-Phänotypen (Phänotypen, bei denen eine Funktion verloren ging), die mit der zellulären Entwicklung in Beziehung stehen, für das saure Glia-Faser-Protein (GFAP), für die Etablierung der Tektumplattenbildung in Hühnchen (Galileo et al., 1991) und für das N-myc-Protein, das verantwortlich ist für die Aufrechterhaltung von zellulärer

Heterogenität in neuroektodermalen Kulturen (Epithelzellen gegen Neuroblastenzellen, welche sich in ihren Koloniebildungseigenschaften, Tumorigenität und Anhaftung unterscheiden) (Rosolen et al., 1980; Whitesell et al., 1991) gezeigt. Gegensinn-Oligonucleotidinhibition des basischen Fibroblastenwachstumsfaktors (bFGF), der mitogene und angiogene Eigenschaften hat, unterdrückte 80% des Wachstums in Gliomzellen (Morrison, 1991) in einer gesättigten und spezifischen Weise. Da sie hydrophob sind, treten Gegensinn-Oligonucleotide gut mit Phospholipidmembranen in Wechselwirkung (Akter et al., 1991). Nach jeder Wechselwirkung mit der zellulären Plasmamembran werden sie aktiv (oder passiv) in lebende Zellen transportiert (Loke et al., 1989), in einem gesättigten Mechanismus, von dem vorhergesagt wird, dass er spezifische Rezeptoren involviert (Yakubov et al., 1989).

[0042] Anstelle einer Gegensinnsequenz, wie sie hierin oben diskutiert wird, können Ribozyme genutzt werden. Dies ist besonders notwendig in Fällen, wo Gegensinntherapie durch stöchiometrische Überlegungen begrenzt wird (Sarver et al., 1990, Gene Regulation and Aids, S. 305-325). Es können dann Ribozyme verwendet werden, welche dieselbe Sequenz zum Ziel nehmen. Ribozyme sind RNS-Moleküle, die eine katalytische RNS-Fähigkeit besitzen (siehe für einen Überblick Cech), welche eine spezifische Stelle in einer Ziel-RNS spalten. Die Anzahl an RNS-Molekülen, die von einem Ribozym gespalten werden, ist größer als jene Zahl, die durch die Stöchiometrie vorhergesagt wird (Hampel and Tritz, 1989; Uhlenbeck, 1987).

[0043] Ribozyme katalysieren die Phosphodiesterbindungsspaltung von RNS. Es wurden etliche strukturelle Ribozymfamilien identifiziert, einschließlich Gruppe-I-Introns, RNase P, das Ribozym des Hepatitis-Delta-Virus, Hammerkopf- (Hammerhead-) Ribozyme und Haarnadelschleifen-(Hairpin-) Ribozym, das ursprünglich aus dem negativen Strang der Satelliten-RNS des Tabakringfleckenvirus (sTRSV) abgeleitet worden ist (Sullivan, 1994; US-Patent Nr. 5,225,347, Spalten 4-5). Die letzten beiden Familien werden aus Viroiden und Virusoiden abgeleitet, bei welchen von dem Ribozym angenommen wird, dass es Monomere von Oligomeren trennt, die während der Rolling-Circle-Replikation geschaffen werden (Symons, 1989 und 1992). Hammerkopf- und Haarnadelschleifen-Ribozymmotive sind am gewöhnlichsten für die Trans-Spaltung von mRNS für die Gentherapie angepasst (Sullivan, 1994). Der in der vorliegenden Verwendung genutzte Ribozymtyp wird ausgewählt, wie es im Stand der Technik bekannt. Haarnadelschleifen-Ribozyme befinden sich nun im klinischen Versuch und sind der bevorzugte Typ. Im Allgemeinen ist das Ribozym 30-100 Nucleotide lang.

[0044] Modifikationen oder Analoga von Nucleotiden können eingeführt werden, um die therapeutischen Eigenschaften der Nucleotide zu verbessern. Verbesserte Eigenschaften schließen eine erhöhte Nucleaseresistenz und/oder erhöhte Fähigkeit ein, Zellmembranen zu durchdringen.

[0045] Nucleaseresistenz, wo erforderlich, wird durch jedes im Stand der Technik bekannte Verfahren bereitgestellt, das nicht mit der biologischen Aktivität der Gegensinn-Oligodesoxynucleotide, cDNA und/oder den Ribozymen in Wechselwirkung tritt, wie für das Verfahren der Verwendung und Zufuhr erforderlich (Iyer et al., 1990; Eckstein, 1985; Spitzer und Eckstein, 1988; Woolf et al., 1990; Shaw et al., 1991). Modifikationen, die an Oligonucleotiden gemacht werden können, um die Nucleaseresistenz zu erhöhen, schließen das Modifizieren des Phosphor- oder Sauerstoffheteroatoms in dem Phosphatrückgrat ein. Diese schließen das Zubereiten von Methylphosphonaten, Phosphorthioaten, Phosphordithioaten und Morpholinoligomeren ein. In einem Ausführungsbeispiel wird dafür gesorgt, indem Phosphorthioatbindungen vorgesehen sind, die die 4-6 Nucleotidbasen des 3'-Endes verknüpfen. Alternativ verknüpfen Phosphorthioatbindungen sämtliche Nucleotidbasen. Andere Modifikationen, die im Stand der Technik bekannt sind, können verwendet werden, wo die biologische Aktivität bewahrt wird, die Stabilität gegen Nucleasen jedoch erhöht wird.

[0046] Die vorliegende Erfindung schließt ebenfalls sämtliche Analoga oder Modifikationen eines Oligonucleotids der Erfindung ein, die nicht wesentlich die Funktion des Oligonucleotids beeinträchtigen. Die Nucleotide können aus natürlich vorkommenden oder synthetisch modifizierten Basen ausgewählt werden. Natürlich vorkommende Basen schließen Adenin, Guanin, Cytosin, Thymin und Uracil ein. Modifizierte Basen der Oligonucleotide schließen Xanthin, Hypoxanthin, 2-Aminoadenin, 6-Methyl-, 2-Propyl- und andere Alkyladenine, 5-Halouracil, 5-Halocytosin, 6-Azacytosin und 6-Azathymin, Pseudouracil, 4-Thiouracil, 8-Haloadenin, 8-Aminoadenin, 8-Thioladenin, 8-Thiolalkyladenine, 8-Hydroxyladenin und andere 8-substituierte Adenine, 8-Haloguanine, 8-Aminoguanin, 8-Thioguanin, 8-Thioalkylguanine, 8-Hydroxylguanin und andere substituierte Guanine, andere Aza- und Desazaadenine, andere Aza- und Desazaguanine, 5-Trifluormethyluracil und 5-Trifluorcytosin ein.

[0047] Zusätzlich können Nucleotidanaloga zubereitet werden, worin die Struktur des Nucleotids fundamental geändert worden ist und die besser geeignet sind als therapeutische oder experimentelle Reagenzien. Ein Beispiel eines Nucleotidanalogs ist eine Peptidnucleinsäure (PNS), worin das Desoxyribose- oder (Ribose-)Phos-

phatrückgrat in der DNS (oder RNS) mit einem Polyamidrückgrat ersetzt worden ist, welches ähnlich ist mit jenem, das in Peptiden zu finden ist. Von PNS-Analoga wurde gezeigt, dass sie gegen Abbau durch Enzyme resistent sind und dass sie in vivo und in vitro verlängerte Lebenszeiten haben. Weiterhin wurde von PNS gezeigt, dass sie stärker an eine komplementäre DNS-Sequenz binden als ein DNS-Molekül. Diese Beobachtung wird dem Fehlen einer geladenen Abstoßung zwischen dem PNS-Strang und dem DNS-Strang zugeschrieben. Andere Modifikationen, die an Oligonucleotiden gemacht werden können, schließen Polymerrückgrate, cyclische Rückgrate oder acyclische Rückgrate ein.

[0048] Die aktiven Bestandteile der pharmazeutischen Zusammensetzung können Oligonucleotide einschließen, die nucleaseresistent sind, was für die Praxis der Erfindung benötigt wird, oder sie können ein Fragment davon einschließen, von dem gezeigt wird, dass es denselben Effekt hat, und das gegen die geeignete(n) Sequenz(en) und/oder Ribozyme gerichtet ist. Kombinationen aktiver Bestandteile, wie in der vorliegenden Erfindung offenbart, können verwendet werden, einschließlich Kombinationen von Gegensinnsequenzen.

[0049] Die Gegensinn-Oligonucleotide (und oder Ribozyme) und cDNS der vorliegenden Erfindung können durch jedes im Stand der Technik für Ribonuclein- oder Desoxyribonucleinnucleotide bekannte Verfahren synthetisiert werden. Zum Beispiel kann ein 380B-DNA-Synthetisiergerät von Applied Biosystems verwendet werden. Wenn Fragmente verwendet werden, können zwei oder mehr solcher Sequenzen für die Verwendung in der vorliegenden Erfindung synthetisiert und miteinander gekoppelt werden.

[0050] Die Nucleotidsequenzen der vorliegenden Erfindung können entweder direkt oder mit viralen oder nicht-viralen Vektoren zugeführt werden. Wenn sie direkt zugeführt werden, werden die Sequenzen im Allgemeinen nucleaseresistent gemacht. Alternativ können die Sequenzen in Expressionskassetten oder -konstrukte so eingebaut werden, dass die Sequenz in der Zelle exprimiert wird, wie hierin unten diskutiert. Allgemein enthält das Konstrukt die richtige regulatorische Sequenz oder Promotor, um der Sequenz zu ermöglichen, dass sie in der zum Ziel genommenen Zelle exprimiert wird.

[0051] Negativ dominantes Peptid bezieht sich auf eine Teil-cDNS-Sequenz, die einen Teil eines Proteins kodiert, das heißt ein Peptid (siehe Herskowitz, 1987). Dieses Peptid kann eine von dem Protein, von dem es abgeleitet wurde, verschiedene Funktionen haben. Es kann mit dem vollständigen Protein in Wechselwirkung treten und seine Aktivität inhibieren oder es kann mit anderen Proteinen in Wechselwirkung treten und deren Aktivität in Antwort auf das vollständige Protein inhibieren. Negativ dominant bedeutet, dass das Peptid in der Lage ist, die natürlichen Proteine zu überwinden und vollständig ihre Aktivität zu inhibieren, um der Zelle eine abweichende Eigenschaft, wie Resistenz oder Sensitivierung zum Abtöten, zu geben. Für den therapeutischen Eingriff wird entweder das Peptid selber als der aktive Bestandteil einer pharmazeutischen Zusammensetzung zugeführt oder die cDNS kann der Zelle zugeführt werden, unter Verwendung desselben Verfahrens für die Gegensinn-Zufuhr.

[0052] Die vorliegende Erfindung stellt ein Verfahren zum Bereitstellen eines Apoptoseregulierungsgens, Angiogeneseregulierungsgens oder eines Hypoxieregulierungsgens bereit, indem einem Patienten, der einer solchen Therapie bedarf, unter Nutzung von Gentherapie ein exprimierbarer Vektor, der Expressionskontrollsequenzen umfasst, die operabel mit einer der in der Gruppe, umfassend SEQ ID Nr. 1, SEQ ID Nr. 2, SEQ ID Nr. 3, SEQ ID Nr. 4, SEQ ID Nr. 5 und SEQ ID Nr. 6, dargelegten Sequenzen gekoppelt ist, direkt zugeführt wird.

[0053] Gentherapie, wie es hierin verwendet wird, bezieht sich auf den Transfer genetischen Materials (z. B. DNS oder RNS) von Interesse in einen Wirt, um eine genetische oder erworbene Krankheit oder um Zustandsphänotypen zu behandeln oder vorzubeugen. Das genetische Material von Interesse kodiert ein Produkt (z. B. ein Protein, Polypeptid, Peptid, funktionelle RNS, Gegensinn), dessen Produktion in vivo gewünscht wird. Zum Beispiel kann das genetische Material von Interesse ein Hormon, einen Rezeptor, ein Enzym, ein Polypeptid oder Peptid von therapeutischem Wert kodieren. Alternativ kodiert das genetische Material von Interesse ein Suizidgen. Für einen Überblick siehe im Allgemeinen den Text "Gene Therapy" (Advances in Pharmacology 40, Academic Press, 1997).

[0054] Es wurden zwei grundsätzliche Ansätze für die Gentherapie entwickelt: (1) Ex-vivo- und (2) In-vivo-Gentherapie. Bei der Ex-vivo-Gentherapie werden Zellen von einem Patienten entnommen und, während sie kultiviert werden, werden sie in vitro behandelt. Allgemein wird ein funktionelles Ersatzgen in die Zelle im Wege eines geeigneten Genzufuhrvehikels-/verfahrens (Transfektion, Transduktion, homologe Rekombination etc.) und ein Expressionssystem, wenn benötigt, eingebracht und dann werden modifizierte Zellen in Kultur expandiert und dem Wirt/Patienten wieder gegeben. Von diesen genetisch reimplantierten Zellen wurde gezeigt,

dass sie das transfizierte genetische Material in situ exprimieren.

[0055] Bei der In-vivo-Gentherapie werden die Zielzellen nicht aus dem Subjekt entfernt, stattdessen wird das zu übertragende genetische Material in die Zellen des Empfängerorganismus in situ eingeführt, das heißt innerhalb des Empfängers. Bei einer alternativen Ausführung, falls das Wirtsgen defekt ist, wird das Gen in situ repariert (Culver, 1998). Von diesen genetisch veränderten Zellen wurde gezeigt, dass sie das transfizierte genetische Material in situ exprimieren.

[0056] Das Genexpressionsvehikel ist in der Lage, die heterologe Nucleinsäure in eine Wirtszelle zu liefern/zu übertragen. Das Expressionsvehikel kann Elemente einschließen, um das Targeting, die Expression und die Transkription der Nucleinsäure auf eine zellselektive Weise, wie es im Stand der Technik bekannt ist, zu kontrollieren. Es sollte festgestellt werden, dass oftmals das 5'UTR und/oder 3'UTR des Gens durch das 5'UTR und/oder 3'UTR des Expressionsvehikels ersetzt werden kann. Deshalb kann, wie hierin verwendet das Expressionsvehikel, soweit erforderlich, nicht das 5'UTR und/oder 3'UTR des tatsächlich zu transferierenden Gens einschließen, sondern kann nur die spezifische Aminosäurekodierungsregion einschließen.

[0057] Das Expressionsvehikel kann einen Promotor einschließen, um die Transkription des heterologen Materials zu kontrollieren, und kann entweder ein konstitutiver oder induzierbarer Promotor sein, um eine selektive Transkription zu erlauben. Es können Enhancer, die erforderlich sein können, um notwendige Transkriptionsspiegel zu erhalten, wahlweise eingeschlossen sein. Enhancer sind im Allgemeinen nicht-translatierte DNS-Sequenzen, die zusammenhängend mit der kodierenden Sequenz (in cis) arbeiten, um das durch den Promotor diktierte basale Transkriptionsmaß zu ändern. Das Expressionsvehikel kann ebenfalls ein Selektionsgen einschließen, wie hierin unten beschrieben.

[0058] Vektoren können in Zellen oder Gewebe durch jedes einer Vielzahl von im Stand der Technik bekannten Verfahren eingeführt werden. Solche Verfahren können allgemein beschrieben gefunden werden in Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Springs Harbor Laboratory, New York (1989, 1992), in Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989), Chang et al., Somatic Gene Therapy, CRC Press, Ann Arbor, MI (1995), Vega et al., Gene Targeting, CRC Press, Ann Arbor, MI (1995), Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses, Butterworths, Boston MA (1988), und Gilboa et al., (1986), und schließen z. B. die stabile oder transiente Transfektion, Lipofektion, Elektroporation und die Infektion mit rekombinanten viralen Vektoren ein. Zusätzlich, siehe US-Patent 4,866,042 für Vektoren, die das Zentralnervensystem einschließen, und ebenfalls die US-Patente 5,464,764 und 5,487,992 für Positiv-Negativ-Selektionsverfahren.

[0059] Das Einführen von Nucleinsäuren durch Infektion bietet etliche Vorteile gegenüber den anderen aufgelisteten Verfahren. Es kann wegen ihrer infektiösen Art eine höhere Effizienz erhalten werden. Ferner sind Viren sehr spezialisiert und infizieren typischerweise spezifische Zelltypen und pflanzen sich dort fort. Folglich kann ihre natürliche Spezifität verwendet werden, um die Vektoren auf spezifische Zelltypen in vivo oder innerhalb eines Gewebes oder einer gemischten Zellkultur zu richten. Virale Vektoren können ebenfalls mit spezifischen Rezeptoren oder Liganden modifiziert werden, um die Zielspezifität durch rezeptorvermittelte Ereignisse zu ändern.

[0060] Ein spezifisches Beispiel eines viralen DNS-Vektors für das Einführen und Exprimieren von rekombinanten Sequenzen ist der vom Adenovirus abgeleitete Vektor Adenop53TK. Dieser Vektor exprimiert ein Thymidinkinase-(TK-)Gen des Herpesvirus für entweder die positive oder negative Selektion und eine Expressionskassette für die gewünschten rekombinanten Sequenzen. Dieser Vektor kann verwendet werden, um Zellen zu infizieren, die einen Adenovirusrezeptor haben, was die meisten Krebs epithelialen Ursprungs ebenso wie andere einschließt. Dieser Vektor kann, ebenso wie andere, welche ähnliche gewünschte Funktionen zeigen, verwendet werden, um eine gemischte Zellpopulation zu behandeln und kann z. B. eine In-vitro- oder Ex-vivo-Kultur von Zellen, ein Gewebe oder ein menschliches Subjekt einschließen.

[0061] Es können zusätzliche Eigenschaften zu dem Vektor hinzugefügt werden, um seine Sicherheit sicherzustellen und/oder seine, therapeutische Wirksamkeit zu erhöhen. Solche Eigenschaften schließen z. B. Marker ein, die verwendet werden können, um negativ gegen Zellen zu selektieren, die mit dem rekombinanten Virus infiziert sind. Ein Beispiel solch eines negativen Selektionsmarkers ist das oben beschriebene TK-Gen, das Sensitivität für das Antibiotikum Gancyclovir verleiht. Negativselektion ist deshalb ein Mittel, durch welches Infektion kontrolliert werden kann, da sie induzierbaren Suizid durch die Zugabe von Antibiotikum bereitstellt. Solch ein Schutz stellt sicher, dass, falls z. B. Mutationen entstehen, die geänderte Formen des viralen Vektors oder der rekombinanten Sequenz erzeugen, eine zelluläre Transformation nicht geschehen wird.

[0062] Eigenschaften, die die Expression auf bestimmte Zelltypen begrenzen, können ebenfalls eingeschlossen sein. Solche Eigenschaften schließen z. B. Promotoren und regulatorische Elemente ein, die spezifisch für den gewünschten Zelltyp sind.

[0063] Zusätzlich sind rekombinante virale Vektoren nützlich für die In-vivo-Expression einer gewünschten Nucleinsäure, da sie Vorteile wie laterale Infektion und Targetingspezifität bieten. Laterale Infektion ist im Lebenszyklus von z. B. Retroviren innewohnend und ist der Vorgang, durch welchen eine einzelne infizierte Zelle viele Nachfahrendenvirionen produziert, die sich absprossen und benachbarte Zellen infizieren. Das Ergebnis ist, dass ein großes Gebiet schnell infiziert wird, von dem das Meiste anfänglich nicht durch die ursprünglichen viralen Partikel infiziert worden war. Dies steht im Gegensatz zu dem vertikalen Infektionstyp, bei welchem das infektiöse Mittel nur durch Tochternachfahren verbreitet wird. Es können ebenfalls virale Vektoren produziert werden, die unfähig sind, sich lateral zu verbreiten. Diese Eigenschaft kann nützlich sein, falls der gewünschte Zweck das Einführen eines spezifizierten Gens in nur eine lokalisierte Anzahl von Zielzellen ist.

[0064] Wie oben beschrieben, sind Viren sehr spezialisierte infektiöse Mittel, die sich in vielen Fällen schon entwickelt haben, um Wirtsabwehrmechanismen zu umgehen. Typischerweise infizieren Viren spezifische Zelltypen und pflanzen sich dort fort. Die Zielspezifität viraler Vektoren nutzt ihre natürliche Spezifität auf spezifisch vorbestimmte Zielzelltypen und führt dabei ein rekombinantes Gen in die infizierte Zelle ein. Der zu verwendende Vektor in den Verfahren der Erfindung wird von dem zum Ziel zu nehmenden gewünschten Zelltyp abhängen und wird Fachleuten bekannt sein. Zum Beispiel würde, falls Brustkrebs behandelt werden soll, dann ein Vektor verwendet werden, der spezifisch für solche epitheliale Zellen ist. Ähnlich würde, falls Krankheiten oder pathologische Zustände des hämatopoetischen Systems zu behandeln sind, dann ein viraler Vektor verwendet werden, der spezifisch für Blutzellen und ihre Vorläuferzellen, bevorzugt für den spezifischen Typ an hämatopoetischer Zelle ist.

[0065] Es können retrovirale Vektoren konstruiert werden, um entweder als infektiöse Partikel zu funktionieren oder um nur eine einzige Anfangsrunde der Infektion durchzumachen. In dem ersten Fall wird das Genom des Virus so modifiziert, dass es sämtliche der notwendigen Gene, regulatorischen Sequenzen und Verpackungssignale bewahrt, um neues virales Protein und RNS zu synthetisieren. Wenn diese Moleküle erst einmal synthetisiert sind, dann verpackt die Wirtszelle die RNS in neue virale Partikel, die in der Lage sind, weitere Infektionsrunden durchzumachen. Das Vektorgenom wird ebenfalls bearbeitet, um das gewünschte rekombinante Gen zu kodieren und zu exprimieren. In dem Fall der nicht-infektiösen viralen Vektoren wird das Vektorgenom gewöhnlich mutiert, um das virale Verpackungssignal zu zerstören, das erforderlich ist, die RNS in Viruspartikel zu verkapseln. Ohne solch ein Signal werden alle Partikel, die gebildet werden, ein Genom nicht enthalten und können deshalb nicht durch nachfolgende Infektionsrunden fortschreiten. Der spezifische Vektortyp wird von der intendierten Anwendung abhängen. Die tatsächlichen Vektoren sind ebenfalls bekannt und leicht in der Technik zugänglich oder können durch Fachleute unter Verwendung von wohl bekannter Methodik konstruiert werden.

[0066] Der rekombinante Vektor kann auf etlichen Wegen verabreicht werden. Falls z. B. virale Vektoren verwendet werden, kann das Vorgehen einen Vorteil aus ihrer Zielspezifität ziehen und sie müssen folglich nicht lokal an der erkrankten Stelle verabreicht werden. Die lokale Verabreichung kann jedoch eine schnellere und wirksamere Behandlung sicherstellen, wobei die Verabreichung ebenfalls z. B. durch intravenöse oder subkutane Injektion in das Subjekt durchgeführt werden kann. Die Injektion von viralen Vektoren in eine Spinalflüssigkeit kann ebenfalls als eine Applikationsweise verwendet werden, insbesondere in dem Falle neurodegenerativer Erkrankungen. Nach der Injektion werden die viralen Vektoren so lange zirkulieren, bis sie Wirtszellen mit der passenden Zielspezifität für die Infektion erkennen.

[0067] Ein alternativer Applikationsmodus kann durch die direkte Inokulation lokal an der Stelle der Erkrankung oder dem pathologischen Zustand oder durch Inokulation in das Gefäßsystem, welche die Stelle mit Nährstoffen versorgt, oder in die Spinalflüssigkeit sein. Die lokale Verabreichung ist vorteilhaft, da es keinen Verdünnungseffekt gibt und deshalb eine kleinere Dosis erforderlich ist, um die Expression in einer Mehrheit der zum Ziel genommenen Zellen zu erreichen. Zusätzlich kann die lokale Inokulation die Zielerfordernisse erleichtern, die mit anderen Applikationsformen erforderlich ist, da ein Vektor verwendet werden kann, der sämtliche Zellen in dem inokulierten Gebiet infiziert. Falls die Expression nur in einer spezifischen Untergruppe von Zellen in dem geimpften Gebiet gewünscht wird, dann können Promotoren und regulatorische Elemente, die spezifisch für die gewünschte Untergruppe sind, verwendet werden, um dieses Ziel zu bewerkstelligen. Solche Nicht-Ziel-Vektoren können z. B. virale Vektoren, virale Genome, Plasmide, Phagemide und Ähnliche sein. Transfektionsvehikel, wie Liposomen, können ebenfalls verwendet werden, um die oben beschriebenen nicht-viralen Vektoren in Empfängerzellen innerhalb des geimpften Gebiets einzuführen. Solche Transfektions-

vehikel sind Fachleuten bekannt.

[0068] Die pharmazeutischen Zusammensetzungen, die die aktiven Bestandteile der vorliegenden Erfindung enthalten, wie hierin oben beschrieben, werden verabreicht und dosiert in Übereinstimmung mit guter medizinischer Praxis, was den klinischen Zustand des einzelnen Patienten, den Ort und das Verfahren der Applikation, den Verabreichungsplan, das Alter des Patienten, dessen Geschlecht, Körpergewicht und andere dem medizinischen Praktiker bekannte Faktoren berücksichtigt. Die pharmazeutisch "wirksame Menge" für Zwecke hierin ist folglich durch solche Überlegungen bestimmt, wie sie in der Medizin bekannt sind. Diese Menge muss wirksam sein, um eine Verbesserung zu erzielen, einschließlich, jedoch nicht beschränkt auf eine verbesserte Überlebensrate oder eine schnellere Genesung oder eine Verbesserung oder eine Elimination von Symptomen und anderen Indikatoren, wie sie durch geeignete Maßnahmen von Fachleuten in der Medizin ausgewählt sind. Die pharmazeutischen Zusammensetzungen können Kombinationen der aktiven Bestandteile sein, werden jedoch wenigstens einen aktiven Bestandteil einschließen.

[0069] In dem Verfahren der vorliegenden Erfindung können die pharmazeutischen Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung auf verschiedenen Wegen verabreicht werden, unter Berücksichtigung der Art der Verbindungen in den pharmazeutischen Zusammensetzungen. Es sollte bemerkt werden, dass sie als die Verbindung oder als ein pharmazeutisch annehmbares Salz verabreicht werden können und dass sie alleine oder als ein aktiver Bestandteil in Kombination mit pharmazeutisch annehmbaren Trägern, Verdünnungsmitteln, Hilfsstoffen und Vehikeln verabreicht werden können. Die Verbindungen können oral, subkutan oder parenteral, einschließlich intravenös, intraarterial, intramuskulär, intraperitoneal und durch die intranasale Applikation verabreicht werden, ebenso wie intrathekal und durch Infusionstechniken. Implantate der Verbindungen sind ebenfalls nützlich. Der Patient, der behandelt wird, ist ein warmblütiges Tier und insbesondere ein Säuger, einschließlich des Menschen. Die pharmazeutisch annehmbaren Träger, Verdünnungsmittel, Hilfsstoffe und Vehikel, ebenso Implantatträger, beziehen sich im Allgemeinen auf inerte, nicht-toxische feste oder flüssige Füllstoffe, Verdünnungsmittel oder Verkapselungsmaterial, das nicht mit den aktiven Bestandteilen der Erfindung reagiert.

[0070] Es wird bemerkt, dass Menschen im Allgemeinen länger behandelt werden als die Maus oder andere Versuchstiere, die hierin als Beispiel ausgeführt sind, deren Behandlung eine Dauer hat, die proportional zu der Dauer des Erkrankungsfortschreitens und der Arzneimittelwirksamkeit ist. Die Dosen können Einzeldosen oder mehrfache Dosen über einen Zeitraum von etlichen Tagen sein, es sind jedoch Einzeldosen bevorzugt.

[0071] Die Dosen können einzelne Dosen oder mehrfache Dosen über einen Zeitraum von etlichen Tagen sein. Die Behandlung hat im Allgemeinen eine Länge, die proportional zu der Länge des Krankheitsfortschreitens und der Arzneimittelwirksamkeit und den behandelten Patienten ist.

[0072] Wenn die Verbindung der vorliegenden Erfindung parenteral verabreicht wird, wird sie im Allgemeinen in einer injizierbaren Dosiseinheitsform (Lösung, Suspension, Emulsion) formuliert werden. Die für die Injektion geeigneten pharmazeutischen Formulierungen schließen sterile wässrige Lösungen oder Dispersionen und sterile Puder für die Rekonstitution in sterilen injizierbaren Lösungen oder Dispersionen ein. Der Träger kann ein Lösungsmittel oder ein Dispersionsmedium sein, enthaltend z. B. Wasser, Ethanol, Polyol (z. B. Glycerol, -Propylenglykol, flüssiges Polyethylenglykol und Ähnliches), geeignete Mischungen davon und pflanzliche Öle.

[0073] Die richtige Fluidität kann z. B. aufrecht erhalten werden durch die Verwendung eines Überzugs wie Lecithin, durch die Erhaltung der erforderlichen Partikelgröße in dem Fall einer Dispersion und durch die Verwendung von oberflächenaktiven Mitteln. Nicht-wässrige Vehikel wie Baumwollsamenöl, Sesamöl, Olivenöl, Sojaöl, Maiskeimöl, Sonnenblumenöl oder Erdnussöl und Ester, wie Isopropylmyristat, können ebenfalls als Lösungsmittelsysteme für Verbindungszusammensetzungen verwendet werden. Zusätzlich können zahlreiche Additive, welche die Stabilität, Sterilität und Isotonie der Zusammensetzungen verbessern, einschließlich antimikrobiellen Konservierungsmitteln, Antioxidantien, Komplexbildnern und Puffer hinzugefügt werden. Die Verhinderung der Tätigkeit von Mikroorganismen kann durch etliche antibakterielle und Antipilzmittel sichergestellt werden, z. B. durch Parabene, Chlorbutanol, Phenol, Sorbinsäure und Ähnliches. In vielen Fällen wird es wünschenswert sein, isotonische Mittel einzuschließen, z. B. Zucker, Natriumchlorid und Ähnliche. Die verlängerte Absorption der injizierbaren pharmazeutischen Form kann durch die Verwendung von Mitteln zustande gebracht werden, welche die Absorption verzögern, z. B. Aluminiummonostearat und Gelatine. Gemäß der vorliegenden Erfindung würde jedoch jedes verwendete Vehikel, Verdünnungsmittel oder Additiv mit den Verbindungen kompatibel sein müssen.

[0074] Sterile injizierbare Lösungen können zubereitet werden durch Einschließen der bei der Praxis der vor-

liegenden Erfindung genutzten Verbindungen in der erforderlichen Menge des geeigneten Lösungsmittels mit zahlreichen anderen Bestandteilen, falls gewünscht.

[0075] Eine pharmakologische Formulierung der vorliegenden Erfindung kann dem Patienten in einer injizierbaren Formulierung verabreicht werden, die jeden kompatiblen Träger, wie etliche Vehikel, Hilfsstoffe, Additive und Verdünnungsmittel enthält; oder die in der vorliegenden Erfindung genutzten Verbindungen können parenteral dem Patienten in der Form von subkutanen Implantaten mit verzögterer Freisetzung oder in der Form von Zielzufuhrsystemen, wie monoklonale Antikörper, durch Vektor unterstützte Zufuhr, iontophoretisch, Polymermatrizen, Liposomen und Mikrokugeln zugeführt werden. Beispiele an in der vorliegenden Erfindung nützlichen Zufuhrsystemen schließen ein: 5,225,182; 5,169,383; 5,167,616; 4,959,217; 4,925,678; 4,487,603; 4,486,194; 4,447,233; 4,447,224; 4,439,196 und 4,475,196. Viele andere solcher Implantate, Zufuhrsysteme und Module sind Fachleuten wohl bekannt.

[0076] Eine pharmakologische Formulierung der Verbindung, die in der vorliegenden Erfindung genutzt wird, kann dem Patienten oral verabreicht werden. Gewöhnliche Verfahren wie Verabreichung der Verbindungen in Tabletten, Suspension, Lösungen, Emulsionen, Kapseln, Pudern, Sirup und Ähnliche sind nützlich. Bekannte Techniken, welche sie oral oder intravenös zuführt und die die biologische Aktivität bewahren, sind bevorzugt.

[0077] In einem Ausführungsbeispiel kann die Verbindung der vorliegenden Erfindung anfänglich durch intravenöse Injektion verabreicht werden, um die Blutspiegel auf einen geeigneten Spiegel zu bringen. Die Spiegel des Patienten werden dann durch eine orale Dosierungsform aufrechterhalten, obwohl andere Applikationsformen, in Abhängigkeit von dem Zustand des Patienten und wie oben angezeigt, verwendet werden können. Die zu verabreichende Menge wird für den behandelten Patienten variieren und wird von ungefähr 100 ng/kg Körpergewicht bis 100 mg/kg Körpergewicht pro Tag variieren und wird bevorzugt von 10 µg/kg bis 10 mg/kg pro Tag betragen.

[0078] Die vorliegende Erfindung stellt ebenfalls ein Verfahren für die Diagnose der Anwesenheit von Ischämie in einem Patienten bereit, das die Schritte des Analysierens einer Körperflüssigkeit oder Gewebeprobe von dem Patienten hinsichtlich der Anwesenheit oder eines Genproduktes von wenigstens einem exprimierten Gen (heraufreguliert), wie dargelegt in der Gruppe, umfassend SEQ ID Nr. 1, SEQ ID Nr. 2, SEQ ID Nr. 3, SEQ ID Nr. 4, SEQ ID Nr. 5 und SEQ ID Nr. 6, oder von Proteinen, wie dargelegt in SEQ ID Nrn. 7-11, einschließt, und wo Ischämie bestimmt wird, falls das heraufregulierte Gen oder Genprodukt bestätigt wird, wie hierin in dem Beispiel beschrieben. Die Körperflüssigkeiten können Tränenflüssigkeit, Serum, Urin, Schweiß oder eine andere Körperflüssigkeit einschließen, wo sezernierte Proteine aus dem Gewebe, das ein ischämisches Ereignis durchmacht, lokalisiert werden können.

[0079] Zusätzliche Verfahren für die Identifikation des Gens oder Genprodukts sind Immuntests, wie ELISA oder Radioimmuntests (RIA), sie können verwendet werden, wie es Fachleuten bekannt ist, insbesondere um Genprodukte in den Proben zu identifizieren. Immunhistochemisches Färben von Gewebeproben wird ebenfalls für die Identifikation genutzt. Zugängliche Immuntests sind umfassend beschrieben in der Patent- und Wissenschaftsliteratur. Siehe z. B. die US-Patente 3,791,932; 3,839,153; 3,850,752; 3,850,578; 3,853,987; 3,867,517; 3,879,262; 3,901,654; 3,935,074; 3,984,533; 3,996,345; 4,034,074; 4,098,876; 4,879,219; 5,011,771 und 5,281,521. Ferner können für die Identifikation des Gens In-situ-Hybridisierung, Southern-Blotting, konformatiorischer Einzelstrangpolymorphismus, Restriktionsendonucleasefingerprinting (REF), PCR-Amplifikation und DNS-Chipanalyse unter Verwendung der Nucleinsäuresequenz der vorliegenden Erfindung als Primer verwendet werden.

[0080] Die obige Diskussion stellt eine Tatsachenbasis für die Verwendung von Genen, um Hypoxie und Ischämie und damit ebenfalls Apoptose und Angiogenese zu regulieren, bereit. Die verwendeten Verfahren und die Nützlichkeit der vorliegenden Erfindung kann durch das folgende, nicht begrenzende Beispiel und die begleitenden Figuren gezeigt werden.

BEISPIEL

VERFAHREN:

[0081] Die meisten in der Molekularbiologie verwendeten Techniken werden weithin in der Technik praktiziert und die meisten Praktiker sind mit den Standardquellmaterialien, welche spezifische Bedingungen und Vorgänge beschreiben, vertraut. Für die Bequemlichkeit mögen die folgenden Absätze als eine Richtlinie dienen.

[0082] Allgemeine Verfahren in der Molekularbiologie: Es wird im Stand der Technik bekannten und nicht-spezifisch beschriebenen Standard-Molekularbiologietechniken im Allgemeinen gefolgt, wie in Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Springs Harbor Laboratory, New York (1989), und in Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989), besonders für die Northern-Analyse und die In-situ-Analyse, und in Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning, John Wiley & Sons, New York (1988), und in Watson et al., Recombinant DNA, Scientific American Books, New York. Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde allgemein durchgeführt, wie in PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications, Academic Press, San Diego, CA (1990).

[0083] Reaktionen und Manipulationen, die andere Nucleinsäuretechniken einschließen, bis nicht anderweitig festgestellt, wurden durchgeführt, wie allgemein beschrieben in Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, und wie in der Methode, die dargelegt ist in den US-Patenten 4,666,828; 4,683,202; 4,801,531; 5,192,659 und 5,272;057, und hierin durch Bezugnahme einschlossen.

[0084] Zusätzlich kann In-situ-(In-Cell-)PCR in Kombination mit Durchflusszytometrie für die Detektion von Zellen verwendet werden, die spezifische DNS- und mRNS-Sequenzen enthalten (Testoni et al., 1996, Blood 87:3822).

[0085] Allgemeine Verfahren in der Immunologie: Es wird Standardverfahren in der Immunologie, die allgemein im Stand der Technik bekannt sind und die nicht spezifisch beschrieben sind, allgemein gefolgt, wie in Stites et al.(Hrsg.), Basic and Clinical Immunology (8. Auflage), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994), und Mishell und Shiigi (Hrsg.), Selected Methods in Cellular Immunology, W.H. Freeman and Co., New York (1980). Zugängliche Immuntests sind ausgedehnt beschrieben in der Patent- und Wissenschaftsliteratur. Siehe z. B. US-Patente 3,791,932; 3,839,153; 3,850,752; 3,850,578; 3,853,987; 3,867,517; 3,879,262; 3,901,654; 3,935,074; 3,984,533; 3,996,345; 4,034,074; 4,098,876; 4,879,219; 5,011,771 and 5,281,521, ebenso wie Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Springs Harbor, New York, 1989.

Differenzialanalyse

[0086] Es wurden z. B. C6-Gliomzellen oder andere geeignete Zellen, Zelllinien oder Gewebe unter normalen Bedingungen (Normoxie) oder unter Sauerstoffentzugsbedingungen (Hypoxie) allgemein für 4 bis 16 Stunden wachsen gelassen. Die Zellen werden geerntet und RNS wird aus den Cytoplasmaextrakten und aus den Kernfraktionen zubereitet. Nach der Extraktion der RNS werden fluoreszierende cDNS-Sonden zubereitet. Jeder Zustand (z. B. 4 Stunden Hypoxie und Normoxie) wird mit einem unterschiedlich fluoreszierenden Farbstoff markiert. Zum Beispiel kann eine Sonde aus einer Mischung aus Cy3-dCTP-cDNS, zubereitet aus aus hypoxischen Zellen extrahierter RNS, und Cy5-dCTP-cDNS, zubereitet aus aus normoxischen Zellen extrahierter RNS, zusammengesetzt sein. Die Sonden werden für die Hybridisierung an den Mikroarray verwendet, der individuell aufgetüpfelte Ziel-DNS-Klone enthält, die von C6-Zellen abgeleitet sind, welche Hypoxie ausgesetzt waren. Differenzielle Expression wird durch die Menge fluoreszierender cDNS, die mit jedem der Klone auf dem Array hybridisiert, gemessen. Gene, die unter Hypoxie heraufreguliert sind, werden mehr Fluoreszenz von Cy3 als von Cy5 haben. Die Ergebnisse zeigen Gene, die transkriptorisch induzierte mRNS-Arten sind, die sehr schnell auf Hypoxie ansprechen.

Differenzielles Display:

[0087] Reverse Transkription: 2 µg RNS werden mit 1 pmol Oligo-dT-Primer (dT)₁₈ in einem Volumen von 6,5 µl durch Erhitzen auf 70°C für 5 Minuten und Abkühlen auf Eis dem Annealing unterzogen. 2 µl Reaktionspuffer (×5), 1 µl 10 mM dNTP-Mischung und 0,5 µl reverse Transkriptase SuperScript-II (GibcoBRL) wurden hinzugefügt. Die Reaktion wird für eine Stunde bei 42°C durchgeführt. Die Reaktion wird durch die Zugabe von 70 µl TE (10 mM Tris, pH = 8; 0,1 mM EDTA) gestoppt.

[0088] Oligonucleotide, die für das differenzielle Display verwendet werden: Die Oligonucleotide sind allgemein jene, die in dem Delta-RNA-Fingerprinting-Kit (Clontech Labs, Inc.) beschrieben sind. Amplifikationsreaktionen: Jede Reaktion wird in 20 µl durchgeführt und enthält 50 µM dNTP-Mischung, 1 µM von jedem Primer, 1 × Polymerasepuffer, 1 Einheit Expansionspolymerase (Boehringer Mannheim), 2 µCi [α-³²P]dATP und 1 µl cDNS-Matrize. Die Cyclisierungsbedingungen sind allgemein: drei Minuten bei 95°C, dann drei Cyclen von zwei Minuten bei 94°C, fünf Minuten bei 40°C, fünf Minuten bei 68°C. Diesen wird von 27 Cyclen mit einer Minute bei 94°C, zwei Minuten bei 60°C, zwei Minuten bei 68°C gefolgt. Reaktionen wurden abgeschlossen durch eine siebenminütige Inkubation bei 68°C und durch die Zugabe von 20 µl Sequenzierstoplösung (95%

Formamid, 10 mM NaOH, 0,025% Bromphenolblau, 0,025% Xylencyanol).

[0089] Gelanalyse: Allgemein werden 3 bis 4 µl auf ein 5%iges Sequenzpolyacrylamidgel geladen und die Proben werden der Elektrophorese bei 2000 Volt/40 Milliampere unterzogen, bis der langsame Farbstoff (Xylencyanol) sich ungefähr 2 cm von der Unterkante entfernt befindet. Das Gel wird auf ein Filterpapier übertragen, unter Vakuum getrocknet und einem Röntgenfilm ausgesetzt.

[0090] Wiedergewinnung differenzieller Banden: Banden, die irgendeinen Unterschied zwischen den verschiedenen Pools zeigen, werden aus dem getrockneten Gel ausgeschnitten und in ein Mikrozentrifugenröhrchen gegeben. 50 µl steriles H₂O werden hinzugefügt und die Röhrchen werden auf 100°C für 5 Minuten erhitzt. 1 µl wird zu einer 49 µl-PCR-Reaktion unter Verwendung derselben Primer, die für das differenzielle Display verwendet worden sind, hinzugefügt und die Proben werden für 30 Cyclen mit einer Minute bei 94°C, einer Minute bei 60°C und einer Minute bei 68°C amplifiziert. 10 µl werden auf Agarosegel analysiert, um die erfolgreiche Amplifikation sichtbar zu machen und zu bestätigen.

Analyse repräsentativer Unterschiede

[0091] Reverse Transkription: wie oben, jedoch mit 2 µg polyA+-selektierter mRNS.

[0092] Zubereitung doppelsträngiger cDNS: cDNS aus dem vorangegangenen Schritt wird mit Alkali behandelt, um die mRNS zu entfernen, gefällt und in 20 µl H₂O gelöst. 50 µl Puffer, 2 µl 10 mM dATP, H₂O auf 48 µl und 2 µl terminale Desoxynucleotidtransferase (TdT) werden hinzugefügt. Die Reaktion wird 2–4 Stunden bei 37°C inkubiert. 5 µl Oligo-dT (1 µg/µl) wurden hinzugefügt und bei 60°C für fünf Minuten inkubiert. 5 µl 200 mM DTT, 10 µl 10 × Sektionspuffer (100 mM MgCl₂, 900 mM Hepes, pH 6,6), 16 µl dNTPs (1 mM) und 16 U Klenow werden hinzugefügt und die Mischung wird über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert, um ds cDNS zu erzeugen. 100 µl TE werden hinzugefügt und mit Phenol/Chloroform extrahiert. Die DNS wird gefällt und in 50 µl H₂O gelöst.

[0093] Erzeugung von Repräsentationen: cDNS mit DpnII wird durch die Zugabe von 3 µl DpnII-Reaktionspuffer 20 V und DpnII zu 25 µl cDNS verdaut und fünf Stunden bei 37°C inkubiert. 50 µl TE werden hinzugefügt und mit Phenol/Chloroform extrahiert. cDNS wird gefällt und auf eine Konzentration von 10 ng/µl gelöst.

[0094] Treiber: 1,2 µg mit DpnII verdaute cDNS, 4 µl von jedem Oligo und 5 µl Ligationspuffer ×10 werden dem Annealing bei 60°C für zehn Minuten unterzogen. 2 µl Ligase werden hinzugefügt und über Nacht bei 16°C inkubiert. Die Ligationsmischung wird durch Hinzufügen von 140 µl TE verdünnt.

[0095] Amplifikation wird in einem Volumen von 200 µl unter Verwendung des geeigneten Primers und 2 µl Ligationsprodukt durchgeführt und wiederholt in 20 Röhrchen für jede Probe. Vor dem Hinzufügen von Taq-DNS-Polymerase werden die Röhrchen auf 72°C für drei Minuten erhitzt. Die PCR-Bedingungen sind wie folgt: fünf Minuten bei 72°C, zwanzig Cyclen mit einer Minute bei 95°C und drei Minuten bei 72°C, gefolgt von zehn Minuten bei 72°C. Jeweils vier Reaktionen wurden vereinigt, mit Phenol/Chloroform extrahiert und gefällt. Amplifizierte DNS wird auf eine Konzentration von 0,5 µg/µl gelöst und sämtliche Proben werden vereinigt.

[0096] Subtraktion: Tester-DNS (20 µg) wird mit DpnII wie oben verdaut und auf einem 1,2% Agarosegel aufgetrennt. Die DNS wird aus dem Gel extrahiert und 2 µg werden mit den passend Oligos ligiert. Die ligierte Tester-DNS wird dann auf 10 ng/µl mit TE verdünnt. Treiber-DNS wird mit DpnII verdaut und auf eine Endkonzentration von 0,5 µg/µl aufgereinigt. Mische 40 µg Treiber-DNS mit 0,4 µg Tester-DNS. Extraktion wird durchgeführt mit Phenol/Chloroform und gefällt unter Verwendung von zwei Waschschritten mit 70% Ethanol, die DNS wird in 4 µl 30 mM EPPS, pH = 8,0, 3 mM EDTA resuspendiert und mit 35 µl Mineralöl überschichtet. Denaturiere bei 98°C für fünf Minuten, kühle auf 67°C ab und füge 1 µl 5 M NaCl zu der DNS hinzu. Inkubiere bei 67°C für zwanzig Stunden. Verdünne die DNS durch Hinzufügen von 400 µl TE.

[0097] Amplifikation: Amplifikation subtrahierter DNS in einem Endvolumen von 200 µl erfolgt wie folgt: Puffer, Nucleotide und 20 µl verdünnte DNS werden hinzugefügt, auf 72°C erhitzt und Taq-DNS-Polymerase wird hinzugefügt. Inkubiere bei 72°C für fünf Minuten und füge passende Oligos hinzu. Es werden zehn Zyklen mit einer Minute bei 95°C, drei Minuten bei 70°C durchgeführt. Inkubiere zehn Minuten bei 72°C. Die Amplifikation wird in vier gesonderten Röhrchen wiederholt. Die amplifizierte DNS wird mit Phenol/Chloroform extrahiert, gefällt und sämtliche vier Röhrchen werden in 40 µl 0,2 × TE vermischt und mit Mung-Bean-Nuclease (Endonuclease aus Mungo-Bohnen) wie folgt verdaut: zu 20 µl DNS werden 4 µl Puffer, 14 µl H₂O und 2 µl Mung-Bean-Nuclease (10 Einheiten/µl) hinzugefügt. Inkubiere bei 30°C für fünfunddreißig Minuten + erstes differenzi-

elles Produkt (DPI (First Differential Product).

Wiederhole die Subtraktionshybridisierung und PCR-Amplifikation mit dem Treiber:

[0098] Differenzielles Verhältnis von 1:400 (DPII) und 1:40.000 (DPIII) unter Verwendung von geeigneten Oligonucleotiden. Differenzielle Produkte werden dann in einem Bluescript-Vektor an der BAM-HI-Stelle für die Analyse der einzelnen Klone kloniert.

DIFFERENZIELLE EXPRESSION UNTER VERWENDUNG VON GENEXPRESSIONSMIKROARRAY

[0099] Wie hierin oben beschriebene isolierte Boten-RNS wird mit fluoreszierenden dNTPs unter Verwendung einer reversen Transkriptionsreaktion markiert, um eine markierte cDNS-Sonde zu schaffen. mRNS wird aus C6-Zellen, die unter normoxischen Bedingungen kultiviert worden sind, extrahiert und mit Cy3-dCTP (Amersham) markiert und mRNS, die aus C6-Zellen, die unter hypoxischen Bedingungen kultiviert worden sind, extrahiert worden ist, wird mit Cy5-dCTP (Amersham) markiert. Die beiden markierten cDNS-Sonden werden dann vermischt und auf einem Mikroarray hybridisiert (Schena et al., 1996), zusammengesetzt aus z. B. 2000 cDNS-Klonen, die aus einer cDNS-Bibliothek hergeleitet worden sind, die zubereitet worden ist aus C6-Zellen, die unter hypoxischen Bedingungen kultiviert worden sind. Nach der Hybridisierung wird der Mikroarray unter Verwendung eines Laserscangeräts gescannt und die Fluoreszenzmenge von jedem der Fluoreszenzfarbstoffe wird für jeden cDNS-Klon auf dem Mikroarray gemessen, was eine Anzeige für den mRNS-Spiegel in jeder der untersuchten Ausgangs-mRNS-Populationen gibt. Der Vergleich der Fluoreszenz jedes cDNS-Klons auf dem Mikroarray zwischen den beiden unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen ist ein Maß für die differenzielle Expression der angezeigten Gene zwischen den beiden experimentellen Bedingungen.

IN-SITU-ANALYSE

[0100] In-situ-Analyse wird für die Kandidatengene durchgeführt, die durch die differenzielle Antwort auf das Aussetzen an hypoxischen Bedingungen, wie oben beschrieben, identifiziert worden sind. Die Expression wird in zwei experimentellen Systemen untersucht: feste Tumoren und hypoxische Retina.

[0101] Feste Tumoren werden durch Injektionen der Ausgangsgliomzellen, die für die differenzielle Expression verwendet wurden, in Mäusen gebildet. Die Gliomzellen bilden Tumoren, die dann ausgeschnitten, auf Objektträger aufgebracht und verwendet werden, um individuell die Expressionsspiegel des Kandidatengens zu messen. Das Modell des festen Tumors (Benjamin et al., 1997) zeigt, dass die Expression des Kandidatengens in Tumoren um hypoxische Regionen herum, die in dem Zentrum des Tumors gefunden werden und deshalb *in vivo* durch Hypoxie reguliert sind, aktiviert wird. Heraufregulation zeigt weiter an, dass das heraufregulierte Gen Angiogenese fördern kann, welche erforderlich ist, um das Tumorwachstum aufrecht zu erhalten.

[0102] Das Modell der hypoxischen Retina misst Expressionsspiegel in einem Organ, das Hypoxie (Ischämie) ausgesetzt ist und direkt Retinopathie nachahmt. Hypoxie in der Retina wird durch Aussetzen neugeborener Ratten an Hyperoxie, was Blutgefäße in den Retina verkleinert, geschaffen (Alon et al., 1995). Nach dem Überführen auf normale Sauerstoffspiegel wird relative Hypoxie wegen dem Fehlen an Blutzufuhr ausgebildet. Hypoxische Retina wird ausgeschnitten, in Scheiben geschnitten und verwendet, um die Expression des Kandidatengens zu überwachen.

ERGEBNISSE

[0103] Unter Nutzung von Genexpressionsmikroarrayanalyse wurden die in SEQ ID Nrn. 1-6 dargelegten Gene als unter hypoxischen Bedingungen differenziell exprimiert identifiziert.

[0104] Wie in den Figuren gezeigt, wurde differenzielle Expression unter hypoxischen Bedingungen beobachtet. Nothern-Analyse wurde mit 32P-dCTP markierten Sonden, abgeleitet aus den Kandidatengenen, durchgeführt. 2 µg mRNS wurden auf Formaldehyd enthaltenden Agarosegelen fraktioniert, auf eine Nitrocellulose-membran geblottet und mit den markierten cDNS-Sonden hybridisiert.

[0105] Um die Kinetiken der Expression als ein Ergebnis von Hypoxie zu überwachen, wurde mRNS von Zellen in Normoxie zubereitet und 4 und 16 Stunden hypoxischen Bedingungen ausgesetzt. Die Ergebnisse der Analyse zeigten, dass sämtliche Gene (SEQ ID Nrn. 1-6) durch hypoxische Bedingungen induziert worden sind, was die durch die Genexpressionsmikroanalyse gewonnenen Ergebnisse bestätigt.

[0106] In der In-situ-Analyse unter Verwendung des Modells des festen Tumors wurden die SEQ ID Nrn. 1-6 heraufreguliert, das heißt exprimiert. In dem Retinamodell wurden die SEQ ID Nrn. 1, 2 und 6 als in diesem Modell heraufreguliert gefunden.

[0107] SEQ ID Nr. 1 (RTP801) ist das Rattenhomolog von SEQ ID Nr. 2 (RTP779). Die Proteinsequenzen sind die SEQ ID Nr. 9 bzw. SEQ ID Nr. 10. Beide dieser Gene wurden nicht in Gendatenbanken gemeldet und sie werden unter hypoxischem Stress exprimiert und in beiden In-situ-Analysen heraufreguliert. Die Expression dieses Gens wurde beobachtet in dem Ovar, wo aktive Apoptose geschah. Seine Regulation ist abhängig von HIF-1 (Carmeliet et al., 1998), was weiter anzeigt, dass das Gen verbunden ist mit durch Hypoxie induzierter Apoptose. Eine gewisse Homologie wurde zwischen dem 3'UTR von RTP801 und dem 5'UTR eines Transkriptionsfaktors (Ratte) pet-1 (Carmeliet et al., 1998; Spence et al., 1998; Fyodorov et al., 1998) gefunden.

[0108] SEQ ID Nr. 3 (RTP241) ist 1902 bp lang, wurde nicht in Gendatenbanken gemeldet und wird unter hypoxischem Stress exprimiert und in beiden In-situ-Analysen heraufreguliert. Die Gensequenz hat eine gewisse Homologie mit einem Hefegen, das stromaufwärts des cox14-Gens lokalisiert ist. Das Protein (SEQ ID Nr. 7), das durch die Sequenz kodiert wird, enthält eine Signalpeptidregion und wird deshalb sezerniert.

[0109] SEQ ID Nr. 4 (RTP220) ist 4719 bp lang, sie wurde nicht in Gendatenbanken gemeldet und wird unter hypoxischem Stress exprimiert und in den In-situ-Tumoranalysen heraufreguliert. Die Gensequenz hat eine gewisse Homologie mit Anilin aus Drosophila. Die Proteinsequenz wird in SEQ ID Nr. 11 dargelegt.

[0110] SEQ ID Nr. 5 (RTP953/359) ist eine Genteilsequenz, die nicht in Gendatenbanken gefunden worden ist und unter hypoxischem Stress exprimiert wird und in beiden In-situ-Analysen heraufreguliert wird.

[0111] SEQ ID Nr. 6 (RTP971) wird unter hypoxischem Stress exprimiert und in der In-situ-Tumoranalyse heraufreguliert. Die Originalanalyse verwendete die Rattensequenz. SEQ ID Nr. 6 ist das menschliche Homolog und hat mehr als 90% Homologie mit der Rattensequenz. Basierend auf der vorangegangenen Sequenzanalyse scheint es, dass es das Gen Neuroleukin oder ein Mitglied jener Genfamilie ist. Von dem wurde nicht berichtet, dass es auf Hypoxiebedingungen ansprechend ist, und es wird berichtet, dass es ein neuer Motilitätsfaktor für Astrocyten ist. Das berichtete Gen kodiert ein Protein (SEQ ID Nr. 8, menschliches Homolog), das als eine glykolytisches Enzym Phosphohexoseisomerase und als ein Überlebensfaktor für Neuronen identifiziert worden ist (Niinaka et al., 1998; Watanabe et al., 1996).

[0112] Die Astrocytenmotilität ist ein wichtiger Faktor bei der Bildung von Blutgefäßen (Angiogenese) im Gehirn und in der Retina. Astrocyten können als Sauerstoffspiegelsensoren angesehen werden, da sie unter hypoxischen Bedingungen durch die Sekretion von angiogenetischen Faktoren wie WEGF ansprechen. In einem Experiment wurden primäre Astrocytenkulturen etabliert und *in vitro* ohne Serum wachsen gelassen und die Astrocyten waren unbeweglich. Wenn jedoch konditioniertes Medium aus Retinakulturen, die unter hypoxischen Bedingungen kultiviert worden sind, zu den Astrocytenkulturen hinzugefügt wurde, wurde Motilität beobachtet. Falls der Neuroleukin-Inhibitor (Obese et al., 1990), D-Erythrose-4-Phosphat (in einer Konzentration von 1,25 mM) hinzugefügt wurde, wurden deutliche Anzeichen von Inhibition der Motilität in den Astrocytenkulturen beobachtet, was anzeigt, dass die Astrocytenmotilität (und -stellation) von der Neuroleukinaktivität abhängig war. Andere Ergebnisse zeigen, dass SEQ ID Nr. 6 ebenfalls HIF-1-abhängig ist, was weiter anzeigt, dass das Gen in Verbindung steht mit durch Hypoxie induzierte Angiogenese und Apoptose.

[0113] Durch diese Anmeldung hindurch wurde auf zahlreiche Publikationen, einschließlich US-Patenten, durch Bezugnahme auf Autor und Jahr und auf Patente durch die Nummern Bezug genommen. Vollständige Zitierungen der Publikationen sind unten aufgelistet.

[0114] Die Erfindung wurde in einer erläuternden Weise beschrieben und es soll verstanden werden, dass von der Terminologie, welche verwendet worden ist, beabsichtigt ist, dass sie in der Natur der Worte der Beschreibung eher liegt als in der Beschränkung.

[0115] Offensichtlich sind viele Modifikationen und Variationen der vorliegenden Erfindung im Lichte der obigen Lehren möglich. Es soll deshalb verstanden werden, dass die Erfindung innerhalb des Schutzmfangs der angehängten Ansprüche anderweitig, als spezifisch beschrieben, praktiziert werden kann.

LITERATURVERZEICHNIS

Alon et al., (1995). Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels

- and has implications for retinopathy of prematurity. *Nat. Med.*, 1(10): 1024-1028.
- Benjamin et al., (1997). Conditional switching of vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in tumors: induction of endothelial cell shedding and regression of hemangioblastoma-like vessels by VEGF withdrawal. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94(16): 8761-8766.
- Bouck et al., (1996). How tumors become angiogenic. *Adv. Cancer Res.*, 69: 135-174.
- Bunn et al., (1996). Oxygen sensing and molecular adaptation in hypoxia. *Physiol. Rev.*, 76: 839-885.
- Burke und Olson, 1991. "Preparation of Clone Libraries in Yeast Artificial-Chromosome Vectors" in *Methods in Enzymology*, Band 194, "Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology", Hrsg. C. Guthrie and G. Fink, Academic Press, Inc., Kap. 17, S. 251-270.
- Capecci, 1989. "Altering the genome by homologous recombination" *Science*, 244: 1288-1292.
- Carmeliet et al., (1998). Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature*, 394(6692): 485-490.
- Davies et al., 1992. "Targeted alterations in yeast artificial chromosomes for inter-species gene transfer", *Nucleic Acids Research*, 20(11): 2693-2698.
- Dickinson et al., 1993. "High frequency gene targeting using insertional vectors", *Human Molecular Genetics*, 2(8): 1299-1302.
- Duff and Lincoln, 1995. "Insertion of a pathogenic mutation into a yeast artificial chromosome containing the human APP gene and expression in ES cells", *Research Advances in Alzheimer's Disease and Related Disorders*.
- Dor et al., (1997). Ischemia-driven angiogenesis. *Trends Cardiovasc. Med.*, 7: 289-294.
- Duke et al., (1996). Cell Suicide in Health and Disease. *Scientific American*, 80-87.
- Fyodorov et al., (1998). Pet-1, a novel ETS domain factor that can activate neuronal nAChR gene transcription. *J. Neurobiol.*, 34(2): 151-163.
- Gallagher et al., (1997). Identification of p53 Genetic Suppressor Elements Which Confer Resistance to Cisplatin. *Oncogene*, 14: 185-193.
- Gordon, 1989. Transgenic Animals. *Intl. Rev. Cytol.*, 115: 171-229.
- Hanahan et al., (1996). Patterns and Emerging Mechanisms of Angiogenic Switch During Tumorigenesis. *Cell*, 86: 353-364.
- Herskowitz (1987). Functional Inactivation of Genes By Dominant Negative Mutations. *Nature*, 329(6136): 219-222.
- Holzmayer et al., (1992). Isolation of Dominant Negative Mutants and Inhibitory Antisense RNA Sequences by Expression Selection of Random DNA Fragments. *Nucleic Acids Res.*, 20(4): 711-717.
- Huston et al., 1991 "Protein engineering of single-chain Fv analogs and fusion proteins" in *Methods in Enzymology* (J. J. Langone, Hrsg.; Academic Press, New York, NY), 203: 46-88.
- Huxley et al., 1991. "The human HPRT gene on a yeast artificial chromosome is functional when transferred to mouse cells by cell fusion", *Genomics*, 9: 742-750.
- Jakobovits et al., 1993. "Germ-line transmission and expression of a human-derived yeast artificial chromosome", *Nature*, 362: 255-261.
- Johnson and Bird, 1991 "Construction of single-chain Fvb derivatives of monoclonal antibodies and their production in Escherichia coli in Methods in Enzymology (J. J. Langone, Hrsg.; Academic Press, New York, NY), 203: 88-99.
- Lamb et al., 1993. "Introduction and expression of the 400 kilobase precursor amyloid protein gene in transgenic mice", *Nature Genetics*, 5: 22-29.
- Lavitrano et al., 1989. *Cell*, 57: 717-723.
- Lo, 1983. *Mol. Cell Biol.*, 3: 1803-1814.
- Mansour, 1990. Gene targeting in murine embryonic stem cells: Introduction of specific alterations into the mammalian genome. *GATA*, 7(8): 219-227.
- Mernaugh and Mernaugh, 1995 "An overview of phage-displayed recombinant antibodies" in *Molecular Methods In Plant Pathology* (RP Singh and US Singh, Hrsg.; CRC Press Inc., Boca Raton, FL), S. 359-365.
- Niinaka et al., (1998). Expression and secretion of neuroleukin/phosphohexose isomerase/maturation factor as autocrine motility factor by tumor cells. *Cancer Res.*, 58(12): 2667-2674.
- Obeso et al., (1990). A Hemangioendothelioma-Derived Cell Line: Its Use as a Model for the Study of Endothelial Cell Biology. *Laboratory Investigation*, 83: 259-264.
- Pearson and Choi, 1993. Expression of the human β -amyloid precursor protein gene from a yeast artificial chromosome in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 10578-82.
- Rothstein, 1991. "Targeting, disruption, replacement, and allele rescue: integrative DNA transformation in yeast" in *Methods in Enzymology*, Band 194, "Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology", Hrsg. C. Guthrie and G. Fink, Academic Press, Inc., Chap. 19, S. 281-301.
- Schedl et al., 1993. "A yeast artificial chromosome covering the tyrosinase gene confers copy number-dependent expression in transgenic mice", *Nature*, 362: 258-261.

- Schena et al., (1996) Parallel Human Genome Analysis: Microarray-based Expression Monitoring of 1000 genes. PNAS (USA), 93(20): 10614-10619.
- Spence et al., (1998). Glucose metabolism in human malignant gliomas measured quantitatively with PET, 1-[C-11]glucose and FDG: analysis of the FDG lumped constant. J. Nucl. Med., 39(3): 440-448.
- Strauss et al., 1993. "Germ line transmission of a yeast artificial chromosome spanning the murine α_1 (I) collagen locus", Science, 259: 1904-1907.
- Thompson et al., 1989. Cell, 56: 313-321.
- Van der Putten et al., 1985. PNAS USA, 82: 6148-6152.
- Watanabe et al., (1996). Tumor cell autocrine motility factor is the neuroleukin/phosphohexose isomerase polypeptide. Cancer Res., 56(13): 2960-2963.
- Agrawal, 1996. Antisense oligonucleotides: towards clinical trials, TIBTECH, 14: 376. Akhter et al., 1991. Interactions of antisense DNA oligonucleotide analogs with phospholipid membranes (liposomes). Nuc. Res., 19: 5551-5559.
- Blaeser, 1997. Gene Therapy for Cancer. Scientific American, 276(6): 111-115.
- Calabretta et al., 1996. Antisense strategies in the treatment of leukemias. Semin. Oncol., 23: 78.
- Crooke, 1995. Progress in antisense therapeutics, Hematol. Pathol., 2: 59.
- Eckstein 1985. Nucleoside Phosphorothioates. Ann. Rev. Biochem., 54: 367-402.
- Feigner, 1997. Nonviral Strategies for Gene Therapy. Scientific American. Juni, 1997, S. 102-106.
- Gewirtz, 1993. Oligodeoxynucleotide-based therapeutics for human leukemias, Stem Cells Dayt., 11: 96.
- Galileo et al., 1991. J. Cell. Biol., 112: 1285.
- Hanania et al 1995. Recent advances in the application of gene therapy to human disease. Am. J. Med., 99: 537.
- Iyer et al., 1990. J. Org. Chem., 55: 4693-4699.
- Lefebvre-d'Hellencourt et al., 1995. Immunomodulation by cytokine antisense oligonucleotides. Eur. Cytokine Netw., 6: 7.
- Lev-Lehman et al., 1997. Antisense Oligomers in vitro and in vivo. In Antisense Therapeutics, A. Cohen and S. Smicer, Hrsg. (Plenum Press, New York).
- Loke et al., 1989. Characterization of oligonucleotide transport into living cells. PNAS USA, 86: 3474.
- Morrison, 1991. Suppression of basic fibroblast growth factor expression by antisense oligonucleotides inhibits the growth of transformed human astrocytes. J. Biol. Chem., 266: 728.
- Radhakrishnan et al., 1990. The automated synthesis of sulfur-containing oligodeoxyribonucleotides using 3H-1,2-Benzodithiol-3-One 1,1 Dioxide as a sulfur-transfer reagent. J. Org. Chem., 55: 4693-4699.
- Rosolen et al., 1990. Cancer Res., 50: 6316.
- Scanlon et al., 1995: Oligonucleotides-mediated modulation of mammalian gene expression. FASEB J., 9: 1288.
- Shaw et al., 1991. Modified deoxyoligonucleotides stable to exonuclease degradation in serum. Nucleic Acids Res., 19: 747-750.
- Spitzer and Eckstein 1988. Inhibition of deoxynucleases by phosphorothioate groups in oligodeoxyribonucleotides. Nucleic Acids Res., 18: 11691-11704.
- Uhlmann and Peyman, 1990. Antisense Oligonucleotides: A New Therapeutic Principle. Chem. Rev., 90(4): 543-584.
- Wagner et al., 1996. Potent and selective inhibition of gene expression by an antisense heptanucleotide. Nature Biotechnology, 14: 840-844.
- Wagner, 1994. Gene inhibition using antisense oligodeoxynucleotides. Nature, 372: 333.
- Whitesell et al., 1991. Episome-generated N-myc antisense RNA restricts the differentiation potential of primitive neuroectodermal cell lines. Mol. Cell. Biol., 11: 1360.
- Yakubov et al., 1989. PNAS USA, 86: 6454.
- Wright & Anazodo, 1995. Antisense Molecules and Their Potential For The Treatment Of Cancer and AIDS. Cancer J., 8: 185-189.
- Woolf et al., 1990. The stability, toxicity and effectiveness of unmodified and phosphorothioate antisense oligodeoxynucleotides in Xenopus oocytes and embryos. Nucleic Acids Res., 18: 1763-1769.

SEQUENZPROTOKOLL

- (1) ALLGEMEINE INFORMATION:
- (i) ANMELDER: Einat, Paz
Skaliter, Rami
 - (ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: HYPOXIE-REGULIERTE GENE
 - (iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 11
 - (iv) KORRESPONDENZADRESSE:
 - (A) ADDRESSAT: KOHN & ASSOCIATES
 - (B) STRASSE: 30500 Northwestern Hwy., Suite 401
 - (C) STADT: Farmington Hills
 - (D) STAAT: Michigan
 - (E) LAND: U.S.
 - (F) POSTLEITZAHL: 48334
 - (v) COMPUTER-LESBARE FORM:
 - (A) MEDIUM: Diskette
 - (B) COMPUTER: IBM-kompatibler PC
 - (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
 - (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30
 - (vi) DATEN DER GEGENWÄRTIGEN ANMELDUNG
 - (A) ANMELDENUMMER:
 - (B) ANMELDEDATUM:
 - (C) KLASSIFIKATION:
 - (viii) ANWALT-/VERTRETER-INFORMATION:
 - (A) NAME: Kohn, Kenneth I.
 - (B) REGISTRIERUNGNUMMER: 30,955
 - (C) REFERENZ/AKtenzeichen: 0168.00038
 - (ix) TELEKOMMUNIKATIONSDATEN:
 - (A) TELEFON: (248) 539-505
 - (B) TELEFAX: (248) 5395055
- (2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR. 1:
- (i) SEQUENZ-EIGENSCHAFTEN:
 - (A) LÄNGE: 1754 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleinsäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 - (D) TOPOLOGIE: linear
 - (ii) MOLEKÜLART: cDNS
 - (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
 - (iv) GEGENSINN: NEIN
 - (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR. 1:

CCCCCGGGGG AGGTGCGAGA GGGCTGGAAA GGACAGGTCC GGGCAGCGAT CGGGGGTTGG	60
CATCAGTTCG CTCACCCCTTC GAGAGGCAGA TCGCTCTTGT CCGCAATCTT CGCTGACCGC	120
GCTAGCTGCG GCTTCTGTGC TCCTTCGCCG AACCTCATCA ACCAGCGTCC TGGCGTCTGA	180
CCTCGCCATG CCTAGCCTTT GGGATCGTTT CTCGTCCTCC TCTTCCTCTT CGTCCTCGTC	240

CCGAACCTCCG	GCCGCTGATC	GGCCGCCGCG	CTCCGCCTGG	GGGTCTGCGG	CCAGAGAAGA	300
GGGCCTTGAC	CGCTGCGCGA	GCCTGGAGAG	CTCGGACTGC	GAGTCCTGG	ACAGCAGCAA	360
CAGTGGCTTT	GGGCCGGAGG	AAGACTCCTC	ATACCTGGAT	GGGGTGTCTC	TGCCTGACTT	420
TGAGCTGCTC	AGTGACCCCG	AGGATGAGCA	CCTGTGTGCC	AACCTGATGC	AGCTGCTGCA	480
GGAGAGCCTG	TCCCAGGCAGC	GATTGGGCTC	GGGGCCCT	GGCGCCTGCG	TGATGCCGAG	540
CCAGCTGTTG	AGCCAGGTGG	GCAAGGAAC	CCTGCCCTG	GCGTACAGCG	AGCCGTGCGG	600
CCTGCGGGGG	GCACTGCTGG	ACGTCTGTGT	GGAGCAAGGC	AAGAGCTGCC	ATAGTGTGGC	660
TCAGCTGGCT	CTGGACCCCA	GTCTAGTGCC	CACCTTCAG	TTGACCCCTGG	TGCTGCGTCT	720
GGACTCTCGC	CTCTGGCCCA	AGATCCAGGG	CCTGTTGAGT	TCTGCCAACT	CTTCCTTGGT	780
CCCTGGTTAC	AGCCAGTCCC	TGACGCTGAG	CACCGGCTTC	AGAGTCATCA	AAAAGAAACT	840
CTACAGCTCC	GAGCAGCTGC	TCATTGAAGA	GTGTTGAACT	TCGTCCCTGGA	GGGGGGCCGC	900
ACTGCCCCCC	AAAGTGGAGA	CAAGGAATT	CTGTGGTGGA	GACCCGCAGG	CAAGGACTGA	960
AGGACTGTCC	CCTGTGTTAG	AAAATGACA	ATAGCCACCG	GAGGGGCGCA	GGGCCAGGTG	1020
GGAGAAGGAA	GTGTTGTCCA	GGAAAGTCTCT	AGGTTGTGTG	CAGGTGGCCC	CCTGTTGGGG	1080
CACATGCC	TCAGTACTGT	AGCATGAAAC	AAAGGCTTCG	GAGCCACACA	GGCTTCTGGC	1140
TGGATGTGTA	TGTAGCATGT	ATCTTATTAA	TTTTGTATT	ACTGACAAGT	TACAACAGCA	1200
GTTGTGGGCC	AGAGTCAGAA	GGCAGCTGG	TCTGCACTGG	CCTCTGCCCG	GGCTGTTGTC	1260
TGGGGGGAGG	CGGGGGGAGG	TCTCCGACAG	TTTGTGACA	GATCTCATGG	TCTGAAAGGA	1320
CCGAGCTTGT	TCGTCGTTG	GTTGTATCT	TGTTTGGGG	GTGGGGTGGG	GGGATCGGAG	1380
CTTCACTACT	GACCTGTTCG	AGGCAGCTAT	CTTACAGACT	GCATGAATGT	AAGAATAGGA	1440
AGGGGGTGGG	TGTTAGGATC	ATTTGGGATC	TTCAACACTT	GAAACAAAAT	AACACCAGGG	1500
AGCTGCATCC	CAGCCCATCC	CGGTGCCGGT	GTACTGGAGG	AGTGAACGT	GAGGGGATGG	1560
GGCTGAGGGG	GGTGGGGGGC	TGGAACCCCTC	TCCCCCAGAG	GAGGCCACC	TGGGTCTTCC	1620
ATCTAGAACT	GTTTACATGA	AGATACTCAC	GGTCATGAA	TACACTTGAT	GTTCAAGTAC	1680
TAAGACCTAT	GCAATATTTT	TACTTTCTA	ATAAACATGT	TTGTTAAAAC	AAAAAAAAAA	1740
AAAAAAAAAA	AAAA					1754

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR. 2:

- (i) SEQUENZ-EIGENSCHAFTEN:
 - (A) LÄNGE: 1782 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleinsäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLART: cDNS
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iv) GEGENSINN: NEIN
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR. 2:

TTTGGCCCTC GAGGCCAAGA ATTGGCACG AGGGGGGAG GTGCGAGCGT GGACCTGGGA	60
CGGGTCTGGG CGGCTCTCGG TGGTTGGCAC GGGTTGCAC ACCCATTCAA GCGGCAGGAC	120
GCACTTGTCT TAGCAGTTCT CGCTGACCGC GCTAGCTGCG CCTTCTACGC TCCGGCACTC	180
TGAGTTCATC AGCAAACGCC CTGGCGTCTG TCCTCACCAT GCCTAGCCTT TGGGACCGCT	240
TCTCGTCGTC GTCCACCTCC TCTTCGCCCT CGTCCTGCC CCGAACTCCC ACCCCAGATC	300
GGCCGCCGCG CTCAGCCTGG GGGTCGGCGA CCCGGGAGGA GGGGTTTGAC CGCTCCACGA	360
GCCTGGAGAG CTCGGACTGC GAGTCCCTGG ACAGCAGCAA CAGTGGCTTC GGGCCGGAGG	420
AAGACACGGC TTACCTGGAT GGGGTGTCGT TGCCCGACTT CGAGCTGCTC AGTGACCTG	480
AGGATGAACA CTTGTGTGCC AACCTGATGC AGCTGCTGCA GGAGAGCCTG GCCCAGGC	540
GGCTGGGCTC TCGACGCCCT GCGCGCCTGC TGATGCCTAG CCAGTTGGTA AGCCAGGTGG	600
GCAAAGAACT ACTGCGCCTG GCCTACAGCG AGCCGTGCGG CCTGCGGGGG GCGCTGCTGG	660
ACGTCTGCGT GGAGCAGGGC AAGAGCTGCC ACAGCGTGGG CCAGCTGGCA CTCGACCCCA	720
GCCTGGTGCC CACCTTCCAG CTGACCCCTCG TGCTGCGCCT GGACTCACGA CTCTGGCCCA	780
AGATCCAGGG GCTGTTAGC TCCGCCAACT CTCCCTTCCT CCCTGGCTTC AGCCAGTCCC	840
TGACGCTGAG CACTGGCTTC CGAGTCATCA AGAAGAAGCT GTACAGCTCG GAACAGCTGC	900
TCATTGAGGA GTGTTGAAC TCAACCTGAG GGGGCCGACA GTGCCCTCCA AGACAGAGAC	960
GAETGAACCTT TTGGGGTGGGA GACTAGAGGC AGGAGCTGAG GGACTGATTG CTGTGGTTGG	1020
AAAAGTGAGG CAGCCACCTA AGGTGGAGGT GGGGAATAG TGTTTCCCAG GAAGCTCATT	1080
GAGTTGTGTG CGGGTGGCTG TGCAATTGGGG ACACATAACCC CTCAGTACTG TAGCATGAAA	1140
CAAAGGCTTA GGGGCCAACA AGGCTTCCAG CTGGATGTGT GTGTAGCATG TACCTTATTA	1200
TTTTTGTAC TGACAGTTAA CAGTGGTGTG ACATCCAGAG AGCAGCTGG CTGCTCCCGC	1260
CCCAGCCCGG CCCAGGGTGA AGGAAGAGGC ACGTGCTCCT CAGAGCAGCC GGAGGGAGGG	1320
GGGAGGTGG AGGTCGTGGA GGTGGTTGT GTATCTTACT GGTCTGAAGG GACCAAGTGT	1380
GTTTGTGTT TGTTTGTAT CTTGTTTTC TGATCGGAGC ATCACTACTG ACCTGTTGTA	1440
GGCAGCTATC TTACAGACGC ATGAATGTAA GAGTAGGAAG GGGTGGGTGT CAGGGATCAC	1500
TTGGGATCTT TGACACTTGA AAAATTACAC CTGGCAGCTG CGTTTAAGCC TTCCCCCATC	1560
GTGTACTGCA GAGTTGAGCT GGCAGGGAG GGGCTGAGAG GGTGGGGCT GGAACCCCTC	1620
CCCCGGAGGA GTGCCATCTG GGTCTTCAT CTAGAACTGT TTACATGAAG ATAAGATACT	1680
CACTGTTCAT GAATACACTT GATGTTCAAG TATTAAGACC TATGCAATAT TTTTACTTT	1740
TCTAATAAAC ATGTTGTTA AAACAAAAAA AAAAAAAAAA AA	1782

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR. 3:

- (i) SEQUENZ-EIGENSCHAFTEN:
 - (A) LÄNGE: 1900 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleinsäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLART: cDNS

- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iv) GEGENSINN: NEIN
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR. 3:

CCATCCCTCA TAGGACTAAT TATAAGGGTTG GGGGGGCCGC CCCCCCAGGT TCGAGTGGCG	60
ATGGGCCGCG GCTGGGGCTT GCTCGTCGGA CTCTGGCG CGTGTGGCT GCTGCGGTCG	120
GGCCAGGGCG AGGAGCAGCA GCAGGGAGACA GCGGCACAGC GGTGTTCTG TCAGGTTAGT	180
GGTTACCTGG ATGACTGTAC CTGTGATGTC GAGACCATCG ATAAGTTAA TAACTACAGA	240
CTTTTCCCAA GACTACAAA GCTCCTTGAA AGTGAECTACT TTAGATACTA CAAGGTAAAC	300
TTGAGGAAGC CATGTCCTT CTGGAATGAC ATCAACCAAT GTGGAAGAAG AGACTGTGCT	360
GTCAAACCT GCCATTCTGA TGAAGTCCCT GATGGAATTAGTCTGAGCAGTGGCT	420
TCCAAGGAAG CCAACCTCCT TGAGGAGTGT GAGCAGGCTG AGCGGCTCGG AGCAGTGGAC	480
GAATCTCTGA GTGAGGAGAC CCAGAAGGCT GTTCTTCAGT GGACGAAACA CGATGATTCT	540
TCAGACAGCT TCTGTGAAGT TGATGACATA CAGTCCCCCG ATGCTGAGTA TGTGGATTAA	600
CTCCTTAACC CTGAGCGCTA CACAGGCTAC AAGGGGCCGG ACGCTTGGAG GATATGGAGT	660
GTCATCTATG AAGAAAATG CTTAACGCCA CAGACAATTC AAAGGCCTTT GGCTTCGGGG	720
CAAGGAAAAC ATAAAGAGAA CACATTTAC AGCTGGCTAG AAGGCCTCTG TGTAGAAAAG	780
AGAGCATTCT ACAGGCTTAT ATCTGGCCTA CACGCAAGCA TCAATGTACA TTTGAGTGCA	840
AGGTATCTTT TACAAGATAA TTGGCTGGAA AAGAAATGGG GTCATAATGT CACAGAGTTT	900
CAGCAGCGCT TTGATGGGGT TTTGACAGAA GGAGAAGGCC CCAGGAGGCT GAAGAACCTG	960
TACTTTCTTT ACCTGTAGA GTTAAGGGCT CTCTCTAAAG TGCTTCCGTT TTTCGAGCGC	1020
CCAGATTTTC AGCTCTTCAC TGGAAATAAA GTTCAGGATG TGGAAAACAA AGAGTTACTT	1080
CTGGAGATTTC TTCATGAAGT CAAGTCATT CCTTGCAATT TTGATGAGAA TTCTTTTTT	1140
GCGGGGGATA AAAACGAAGC ACATAAGCTA AAGGAGGACT TCCGCCTACA CTTTAGAAC	1200
ATCTCGAGGA TCATGGACTG CGTCGGCTGC TTCAAGTGCC GCCTGTGGGG CAAGCTTCAG	1260
ACTCAGGGTC TGGGCACTGC TCTGAAGATC TTGTTTCTG AAAAACTGAT CGCAAATATG	1320
CCCGAAAGCG GACCCAGTTA TGAATTCCAG CTAACCAGAC AAGAAATAGT GTCGTTGTT	1380
AATGCATTG CAAAGGATTTC CACAAGTGTG AGAGAATTAG AGAACTTCAG ACACATTGTTA	1440
CAGAATGTT ACTGAGGAGG GCGGCTGGAA CCTGCTTGT TCTGCACAGG GGAGTCCAGA	1500
GGGCAGAATG TCTGAGCACG GTGATTGCAAG TGACCGTCCT GAGCCAAACG TTCATATCAA	1560
GCTGCCTTGT TCAAAGGAGA GATACATTGT TTTAAGTAAA TGACATTGTT AACATTGTT	1620
TTCATGTTA ATATTATTGT GAATAAAAGT AGTATTGTTGG TAATGTACAA ATTTTAATAC	1680
TAAGCAAAAG TAAGGTCAATT AAATTGCCCT ATGATGGGGT TGGGGATTAA GCTCAGTGGT	1740
AGAGCTCTTG CCTAGGAAGC GCAAGGCCCT GGGTTCGGTC CCCAGCTCCG AAAAAAAAGA	1800
ACCCCCCCCC CAAAAAAAT TGCCCCATA AAAAGGGTAG GTGAATCCTG CCCCAGGCTC	1860
TCCACCTAAA TTTTTTTTG AAAACTTTTT TCCCCCAAGG	1900

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR. 4:

- (i) SEQUENZ-EIGENSCHAFTEN:
 - (A) LÄNGE: 4121 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleinsäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLART: cDNS
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iv) GEGENSINN: NEIN
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR. 4:

RTTTTTTTTT CCTTTNNAAA NGGNNAAGN NTTCCCCCN CCTTCCTTCN ANTTAAAAAT	60
TTGGGANCCC AAAANGCTT GGGGGGCNNN GGGNNCCNT NGGGGNTTGG GGAGTTNCNC	120
CNNGNGANNT TTNCAGNAA NTTAAANATT TTTTCACCCA ATCNCCTTT TGGGGAAAAG	180
CCTTGCCCTTC ACCTTTCCAA AGCCAACCCG TTTTCAAAGG CTTCAGGTAC CCCCAGTTGG	240
GGAGAAGGGG CCTTTCTGGC CAACCCCTTGC TGGCAAACGA TTTGGTTCTT GGGAAAGATGA	300
TGTTAACGCTA ATTCAATTCTG CCAAAGCCAA AATAGTGTAA CAAGAACAGC CTGGTACCGG	360
CTTGTTCATC CCAAATCTTC TTCTGCAAGT GGACCATCTG CTAGCATCAA TAGTAGCAGT	420
GTTTCAGCAG GAAGCTACAT GCTGTTCCCA AAGGGATGGC AATGCCCTTG TCAAGGAAAG	480
ACCCAACCTTC AAATGCTGCC GATGGGCCTT TGCTTAAAGC CTCAGTGTCC AGCCCTGTGA	540
AAGCATCTTC TTCCCCCTGTG AGATCCGCTC CATTCAATCAC TAGAAACTGT GAGGTGCAGA	600
GTCCTGAGCT ACTTCACAAA ACTGTTAGTC CTCTGAAAAGC AGAGGTGTTG AAACCATGTG	660
AGAAGCCAAC TTTATCCCAG GCACCTTCAGC CCAAAGAGGG AGCTAACAAAG GAAGTTGTC	720
TACAGTCACA GTCCAAGGAC AAACCTTGCAA CACCAGGAGG AAGAGGAATT AAGCCTTTCC	780
TGGAACGCTT TGGAGAGCGT TGTCAAGAAC ACAGTAAAGA AAGTCCAAC TGCAGAGCAT	840
TTCATAGAAC CCCAAATATC ACTCCAAATA CAAAAGCTAT CCAGGAAAGA TTATTCAAGC	900
AAAACACGTG TTTCATCTAC TACCCCAATT TAGCACAGCA GCTCAAACAG GAGCGTGAAA	960
AGGAACCTGGC GTGTCTCCGT GGCCGATTTG ACAAGGGCAG TCTCTGGAGT GCAGAGAAAGG	1020

ATGAAAAGTC AAGAAGCAAA CAGCTAGAAA CCAACAGGAA GTTCACTGTC AGAACTCTCC	1080
CCTCAAGAAA CACCAAATTG TCTCAAGGCA CCCCCTCGAC CTCTGTGTCA GATAAAAGTGG	1140
CTGAGACTCC AACCGCAGTG AAGATTTCTG GTACAGAGCC TGCAAGGTTCC ACTGAAAGCG	1200
AAATGACAAA GTCCAGCCCT TTGAAAATAA CATTGTTTT AGAAGAGGAG AAGTCCTTAA	1260
AAGTAGCATC AGACCCGGAG GTTGAGCAGA AGACTGAAGC AGTGCATGAA GTAGAGATGA	1320
GTGTGGACGA TGAGGATATC AACAGCTCCA AGTCATTAAC GACATCTTCA GTGANNTCCC	1380
TAGNGGAANG GGGAACTGGA CNGTGGAAAA GANCCAAGGA GGAGATGGAC CAAGTGGGGA	1440
ACGGAAAGCA GCGAGGNGCA GGAAGATGTG CNGAATATCT CCTCAATNTC TTNACANGNT	1500
CCCGCTGGCT CAGACGGTTC GGCGTGGTGA ATCTACAGAA TGTAATTCT TCACCTGAGT	1560
TGGAATTGAG AGACTATAGC CTGAGTGCTC CAAGTCCCAA ACCAGGAAAA TTCCAAAGAA	1620
CTCGTGTCCC CCGAGCAGAA TCTGGTACA GCCTCAGITC TGAGGACCGG GACCTTCTT	1680
ACAGCATTGA TGCATATAGG TCTCAAAGAT TCAAAGAAC AGAACGCCCT TCCATAAAGC	1740
AAGTGATTGT TCGAAAGGAA GATGTTACTT CAAAATTGAG TGAAAAGAAT GGTGTCTTT	1800
CTGGTCAAGT TAATATCAA AAAAATGC AGGAACTCAA TAATGACATA AATTTCAGC	1860
AGACAGTGAT CTATCAGGCC AGCCAGGCTC TCAACTGCTG TGTTGATGAA GAGCACGGGA	1920
AAGGATCCCT GGAAGAAGCT GAGGCAGAAA GGCTCTTCT GANTGCAACT GAGAAAAGAG	1980
CACTTCTGAT TGACGAACTG AATAAGCTGA AGAGTGAAGG ACCTCAGAGG AGAAACAAGA	2040
CCGCTGTCGC ATCCCAGAGT GGATTTGCC CATGTAAAGG GTCAGTCACC TTGTCAGAGA	2100
TCTGCCTGCC TCTGAAGGCA GAGTTGTAT GCAGCACCGC GCAAAAGCCA GAGTCATCGA	2160
ATTACTACTA CTTAATTATG CTTAAAGCTG GGGCTGAGCA GATGGTGGCC ACCCCATTAG	2220
CAAGTACTGC AACTCTCTTA GTGGTGATGN CCCTGACATT CCCCACCAAG TTACCCNGA	2280
ANGATGTTTC CAATGACTTT GAAATAAAATG TTGAAGTTA CAGCTTGGTA CAAAAGAAAG	2340
ATTCCCTCAG GCCTGAGAAG AAGAAGAAGG CGTCCAAGTT TAAGGCTATT ACTCCAAAGA	2400
GACTCCTCAC ATCTATAACT TCAAAAAGCA GCCTTCATGC TTCAGTTATG GCCAGTCCAG	2460
GAGGTCTCAG TGCTGTGCAG ACCAGCAACT TTACCCTAGT TGGATCTCAC ACACCTCCT	2520
TATCTTCTGT TGGAGACACT AAGTTGCTT TGGACAAGGT ACCTTTTTG TCTCCGTTGG	2580
AAGGTCACAT CTGTTAAAAA ATAAGCTGTC AAGTGAATTG AGCTGTTGAG GAAAAGGGTT	2640
TCCTTACCAT ATTTGAAGAT GTTAGTGGCT TTGGTGCCTG GCACCGAAGA TGGGTGTGTT	2700
TCTCTGGCAA CTGTATCTCT TACTGGACTT ACCCAGATGA TGAGAGGCGA AAGAATCCCA	2760
TAGGAAGGAT AAATCTGGCC AATTGTATCA GTCATCAGAT AGAACCCAGCC AACAGAGAAT	2820
TTTGTGCAAG ACGCAACACT CTGGAATTGA TTACTGTCCG ACCACAAAGA GAAGACGATC	2880
GAGAAACTCT TGTCAGCCAT GTAGAGACAC ACTCTGTGTC ACCCAAGAAC TGGCTCTCTG	2940
CAGATACTAA AGAAGAGCGG GATCTCTGGA TGCAGAAACT CAACCAAGGTC ATTGTTGATA	3000

TTCGCCCTTG GCAGCCTGAT GCATGCTACA AGCCTGTTGG GAAGCCTTAA GCCGAGGAGC	3060
TTCTGCACCG TGAGAGACTT TGCTAGCTGT GTCTTCTTAA GAAGACAGTT AGAAGCAGCA	3120
GATTGCAGG TTGTATTCTA TGCTTTAAAT ATAAAAGGGT ATGTGCAAAT ATTCACTACA	3180
TATTGTGCAG TATTTATATC TTTCTATGT AAAACTTCAC CCAGTTGTC TTGCATTGTC	3240
ACATGTTGA CAGTCAAATA CTAACAATAT TCATGAGAAT TGATATCCAT GCTAAATATA	3300
ACATTAAGAG TCTTGTGTTA TAGAACCTC ACTAGCCAGT TATTGATGAC AAAAACTATT	3360
ATAATCAAGT TCTGATTTGT CCTTGGAGC TGTGGGTTG AAGGTATTAA GGTCTCAAAC	3420
AGAAACATTT CAGGACATGT TTAGTAAAGA GATGAGAAAA GGCAGCAAAC ACTAGTTAA	3480
GCTGCTCAGA GCTGCTTCC GCAGAGCTGT GGGCAGGACA CCGTAACATT TGGGCTGCA	3540
TAGTCTATGC TGAAGGGTTA AGAGTCACAC AGCTAGTGCT CACTCTGACC CTACGTGTGC	3600
AGTGTGGGGC ACCTTCTCAC AGTGCTCAGG CTTTACTTAA ACAGCTATTT TTCATGTAGT	3660
TGAGGATCCT CATTAACATG TTCAGCCTTT TCTCTTATAA CAAGAGCAAA TGTAAATTGG.	3720
AAAAACACAT ACATAAGGAA TTTCTACCAA GCTGCTGTGA CTACTCCTT GCTTCCCAGA	3780
GTTCTTGTCT CGTTTCCTT TCATGTTGAT CTAAAACACT TTACAAATCT GTTTGAGAT	3840
CACTGAAAAA TATATAAAAGC TATGCATTCC CTTTAAAGCC CAATGCCTTC TTGCAATTAA	3900
AAAATATTAC AATGCATGGC TGCAGTTTT AAATAGTCTG TGTTTCTCCT CTGACTGTCA	3960
GTTTATTGAT GGTTTCATT ATAAAACACT AAATTCTATC ACTGCCATT ATATTCTTA	4020
CTCCATTAA ATGTGGGTTT TCTTATGTAT ATTATAAAAG TATTTATGA CTCCTACATA	4080
AATAAATAAT GTGGAATTGT CNAAANCAAA AAAAAAAAAA A	4121

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR. 5:

- (i) SEQUENZ-EIGENSCHAFTEN:
 - (A) LÄNGE: 2059 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleinsäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLART: cDNS
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iv) GEGENSINN: NEIN
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR. 5:

ACAAACCACC AAACCACCAA ACCTGTTAC TCAGATTCA GGATTGTTCA CATATGTTT	60
AACCACTCAC CCCACCTCAC AGAGGTGACC GAACCCAGGA CTTCAGTCAT GCTGGGCTAG	120
CCCTGCATCC ATGAGCTGTG TGCCCTCAGG CCCTTGCTTA AGCTCCTACG TAGACGTAGA	180
TGTCCTGTT TTATTTAAGG ATTTGAAAAC CAGTCATGGG CACCATGATT TAACACAAAA	240
TACTTCAGTG TGATGGTCTA ATTCCTGAA AATAATTGTT TGTTCTTCTT TCAAGGAAAA	300

ACCAAAACCTT ATGAATCCGA GCCGAACATAT TATAAGCCTT AAAATAAGGA GCCGCCGCC	360
CCACATCCCCA GTCACCCAGT GTTGAGTTT GGTTGCCCTT TCTCACCTGT GTAATCACAG	420
GGTATACAAT TCATGTTCT TATGCATGAA ATTAAATTTC TTTCCCTCTG TGGAGTGGGG	480
CTATATTTTA GACAGGTTTT TATTCGTGGA AGCTCTTCAC TGAGAGCAAT ATTTGAAGTG	540
GCTTAAGAAT TTACGTCACA GCATTTATAA ATGATATACC TCAAAGTTAT GCTCCITTGA	600
TGTCATATAA TGTCTTGAGC AGTTAGGACA GGTTGAGATG TGACATAAGA AAAAGCAGGA	660
TATGTATGTA ATGGATAGGA ATGTCACTTT ACACGTGTTGT GTATTTCTC TGTCCCTAAG	720
ACTTGGTGTGTA GTGCCAAGCA TACAGTTGGT ATCTAATTTC TGTGATGGA AAGTGTATGG	780
ATTTAGTATA CCTTAAGTGA ATGGTGTAGC TTGTGTAACA ATGTACCCCTA TCTCCCTTC	840
CCTCTCACTT TTTCTTCAA ATCGCATAAT AAACCCACAG ATTAGATCAG CTTTCTGGC	900
GGCGACTTCG AAAAGTACTA AATGATCACC GCACAGAAC CAGCCCTTG AAACCCCTCAC	960
TGCTTCACT TGCCTCTCC CACTTGACTG TCCCTGTGTC CTCTGTCTCT CCAAGGAAGG	1020
TCTAAACTCC TACGTCTTC GTTAACAAGC AGTTTAATT TTAAGAAATC TTAACCTTTC	1080
CTGTGCTTGA CACAATTGAC AATCCCTTC TTCAAGCCCC ACCACTCTGC GTCCTTGTAT	1140
CTGGCTTGCT CCTGGGTCTC TTCCCTCTGG TCTCTTICATG TAACCGAAAT ATTAATTCCC	1200
CAGACTTTTC TTTCTTGCTC TAAGTCACTG GACCATACTC TTGTGTAATT TCCATGCAGT	1260
CATCTTATCT TAGCTTCTGT TTCCCTGCTG CGGTCACTTG GCTACCTGTT GCCACGTCTT	1320
CAAGGACTCA CTTCGTTTGC GCTCCTCACT TGGTTAGTTT CAGAACATTA CACTGTTCAA	1380
GGTTCTCCAG TTCGCTCTTC TGTCTTCTGC CTGACTATCG GTGTCTACGT TCTGCTGCTT	1440
CTACTCCAAC ATTTCTATCA CTGTCTTCA ATTTTTATTA CAGTTACTCA AAGGATTTC	1500
TGTGTTTATT TTCCCATCTC TGTTGGCCA GATTACCGAA TTGGGCTTTC TAGAAGCATT	1560
CAGCCTCATC CCTGCTACAG GCAGTTTAG GAGTTTTG GTGAGAGTCT CTGCTTGGTA	1620
TCTAAGACCC TCCTCTTGTG TTTGCCACTC TGCTCTGATA AGAGTGTAA AGAGTTTCC	1680
AGAAAGTCCAG AGTTGTAGCC CTCCAGACCT TCGTAGACAC CATATTTGCA TGGAGAGCCC	1740
TAGGCTTCTT CTGGAAACT CCATGCGTTC TTGAGACTCT GTGACATTAA TTACCCCTGGC	1800
CCTTCCTTGTG GTCACCATTA TAGTTGCAAC CTACCTCTAT TGAATCACTT ATTGTACTGT	1860
ATATTTTATT TTTTAAAGTG TCCTTTACTA GAATGTGAGC TCCTCAGGGG CAGGCAAAGA	1920
AACTTCATTC ATTTGGCATT CTCATAGCAT AATGTTGGT ATATGAGCAT TTAATAAAATG	1980
TTGAATAAAAT TGCTTCACAT GACAGCTGTT CCTCATGGCG GGCGTCTTCA CTGCCTTGT	2040
TGCAAAACGG GGGGGAAAAA	2059

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR. 6:

- (i) SEQUENZ-EIGENSCHAFTEN:
- (A) LÄNGE: 1987 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleinsäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 - (D) TOPOLOGIE: linear

- (ii) MOLEKÜLART: cDNS
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iv) GEGENSINN: NEIN
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR. 6:

CTCGAGAGCT CCGCCATGGC CGCTCTCACCC	60
CGGGACCCCC AGTTCCAGAA GCTGCAGCAA	
TGGTACCGCG AGCACCGCTC CGAGCTGAAC CTGCGCCGCC	120
TCTTCGATGC CAACAAGGAC	
CGCTTCAACC ACTTCAGCTT GACCCTAAC ACCAACCATG	180
GGCATATCCT GGTGGATTAC	
TCCAAGAACCC TGGTGACGGA GGACGTGATG CGGATGCTGG	240
TGGACTTGGC CAAGTCCAGG	
GGCGTGGAGG CCGCCCGGGA GCGGATGTTA AATGGTGAGA	300
AGATCAAACCA CACCGAGGGT	
CGAGCCGTGC TGCACGTGGC TCTGCGAAC CGGTCAAACCA	360
CACCCATCCT GGTAGACGGC	
AAGGATGTGA TGCCAGAGGT CAACAAGGTT CTGGACAAGA	420
TGAAGTCTTT CTGCCAGCGT	
GTCCGGAGCG GTGACTGGAA GGGGTACACA GGCAAGACCA	480
TCACGGACGT CATCAACATT	
GGCATTGTCG GCTCCGACCT GGGACCCCTC ATGGTGACTG	540
AAGCCCTTAA GCCATACTCT	
TCAGGAGGTC CCCCGTCTG GTATGTCCT AACATTGATG	600
GAACTCACAT TGCCAAAACC	
CTGGCCCAGC TGAACCCGGA GTCCTCCCTG TTCATCATTG	660
CCTCCAAGAC CTTTACTACC	
CAGGAGACCA TCACGAATGC AGAGACGGCG AAGGAGTGGT	720
TTCTCCAGGC GGCAAGGAT	
CCTTCTGCAG TGGCGAAGCA CTTTGTGCC CTGTCTACTA	780
ACACAAACCA AGTGAAGGAG	
TTTGGAAATTG ACCCTAAAAA CATGTTCGAG TTCTGGGATT	840
GGGTGGGAGG ACGCTACTCG	
CTGTGGTCGG CCATCGGACT CTCCATTGCC CTGCACGTGG	900
GTTTGACAA CTTCGAGCAG	
CTGCTCTCGG GGGCTCACTG GATGGACCAAG CACTTCCGCA	960
CGACGCCCCCT GGAGAAGAAC	
GCCCCCGTCT TGCTGGCCCT GCTGGGTATC TGGTACATCA	1020
ACTGCTTTGG GTGTGAGACA	
CACGCCATGC TGCCCTATGA CCAGTACCTG CACCGCTTTG	1080
CTGCGTACTT CCAGCAGGGC	
GACATGGAGT CCAATGGAA ATACATCACC AAATCTGGAA	1140
CCCGTGTGGA CCACCAAGACA	
GGCCCCATTG TGTGGGGGAA GCCAGGGACC AATGGCCAGC	1200
ATGCTTTTA CCAGCTCATC	
CACCAAGGCA CCAAGATGAT ACCCTGTGAC TTCTCATCC	1260
CGGTCCAGAC CCAGCACCCCC	
ATACGGAAGG GTCTGCATCA CAAGATCCTC CTGGCCAAGT	1320
TCTTGACAGGCT GCTGCCACAT AAGGTCTTTG AAGGAAATCG	1380
CCCAACCAAC	
TCTATTGTGT TCACCAAGGT CACACCATTG ATGCTTGAG	1440
CCTTGGTCGC CATGTATGAG	
CACAAGATCT TCGTTCAAGGG CATCATCTGG GACATCAACA	1500
GCTTTGACCA GTGGGGAGTG	
GAGCTGGAA AGCAGCTGGC TAAGAAAATA GAGCCTGAGC	1560
TTGATGGCAG TGCTCAAGTG	
1620	

ACCTCTCACG ACGCTTCTAC CAATGGGCTC ATCAACTTCA TCAAGCAGCA GCGCGAGGCC	1680
AGAGTCCAAT AAACTCGTGC TCATCTGCAG CCTCCTCTGT GACTCCCCTT TCTCTTCTCG	1740
TCCCTCCTCC CCGGAGCCGG CACTGCATGT TCCTGGACAC CACCCAGAGC ACCCTCTGGT	1800
TGTGGGCTTG GACCACGAGC CCTTAGCAGG GAAGGCTGGT CTCCCCCAGC CTAACCCCCA	1860
GCCCCCTCCAT GTCTATGCTC CCTCTGTGTT AGAATTGGCT GAAAGTGTTTT TGTGCAGCTG	1920
ACTTTTCTGA CCCATGTTCA CGTTGTTCAC ATCCCATGTA GAAAAACAAA GATGCCACGG	1980
AGGAGGT	1987

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR. 7:

- (i) SEQUENZ-EIGENSCHAFTEN:
 - (A) LÄNGE: 464 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 - (D) TOPOLOGIE: linear
 - (ii) MOLEKÜLART: Protein
 - (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
 - (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR. 7:

Met	Gly	Arg	Gly	Trp	Gly	Leu	Leu	Val	Gly	Leu	Leu	Gly	Val	Val	Trp
1				5					10					15	
Leu	Leu	Arg	Ser	Gly	Gln	Gly	Glu	Glu	Gln	Gln	Gln	Glu	Thr	Ala	Ala
			20				25						30		
Gln	Arg	Cys	Phe	Cys	Gln	Val	Ser	Gly	Tyr	Leu	Asp	Asp	Cys	Thr	Cys
			35				40					45			
Asp	Val	Glu	Thr	Ile	Asp	Lys	Phe	Asn	Asn	Tyr	Arg	Leu	Phe	Pro	Arg
			50			55					60				
Leu	Gln	Lys	Leu	Leu	Glu	Ser	Asp	Tyr	Phe	Arg	Tyr	Tyr	Lys	Val	Asn
			65			70				75				80	
Leu	Arg	Lys	Pro	Cys	Pro	Phe	Trp	Asn	Asp	Ile	Asn	Gln	Cys	Gly	Arg
			85					90					95		
Arg	Asp	Cys	Ala	Val	Lys	Pro	Cys	His	Ser	Asp	Glu	Val	Pro	Asp	Gly
			100					105					110		
Ile	Lys	Ser	Ala	Ser	Tyr	Lys	Tyr	Ser	Lys	Glu	Ala	Asn	Leu	Leu	Glu
			115			120						125			
Glu	Cys	Glu	Pro	Ala	Glu	Arg	Leu	Gly	Ala	Val	Asp	Glu	Ser	Leu	Ser
			130			135					140				
Glu	Glu	Thr	Gln	Lys	Ala	Val	Leu	Gln	Trp	Thr	Lys	His	Asp	Asp	Ser
			145			150				155			160		
Ser	Asp	Ser	Phe	Cys	Glu	Val	Asp	Asp	Ile	Gln	Ser	Pro	Asp	Ala	Glu
			165					170					175		
Tyr	Val	Asp	Leu	Leu	Leu	Asn	Pro	Glu	Arg	Tyr	Thr	Gly	Tyr	Lys	Gly
			180					185					190		

Pro Asp Ala Trp Arg Ile Trp Ser Val Ile Tyr Glu Glu Asn Cys Phe
 195 200 205

Lys Pro Gln Thr Phe Gln Arg Pro Leu Ala Ser Gly Gln Gly Lys His
 210 215 220

Lys Glu Asn Thr Phe Tyr Ser Trp Leu Glu Gly Leu Cys Val Glu Lys
 225 230 235 240

Arg Ala Phe Tyr Arg Leu Ile Ser Gly Leu His Ala Ser Ile Asn Val
 245 250 255

His Leu Ser Ala Arg Tyr Leu Leu Gln Asp Asn Trp Leu Glu Lys Lys
 260 265 270

Trp Gly His Asn Val Thr Glu Phe Gln Gln Arg Phe Asp Gly Val Leu
 275 280 285

Thr Glu Gly Glu Gly Pro Arg Arg Leu Lys Asn Leu Tyr Phe Leu Tyr
 290 295 300

Leu Ile Glu Leu Arg Ala Leu Ser Lys Val Leu Pro Phe Phe Glu Arg
 305 310 315 320

Pro Asp Phe Gln Leu Phe Thr Gly Asn Lys Val Gln Asp Val Glu Asn
 325 330 335

Lys Glu Leu Leu Glu Ile Leu His Glu Val Lys Ser Phe Pro Leu
 340 345 350

His Phe Asp Glu Asn Ser Phe Phe Ala Gly Asp Lys Asn Glu Ala His
 355 360 365

Lys Leu Lys Glu Asp Phe Arg Leu His Phe Arg Asn Ile Ser Arg Ile
 370 375 380

Met Asp Cys Val Gly Cys Phe Lys Cys Arg Leu Trp Gly Lys Leu Gln
 385 390 395 400

Thr Gln Gly Leu Gly Thr Ala Leu Lys Ile Leu Phe Ser Glu Lys Leu
 405 410 415

Ile Ala Asn Met Pro Glu Ser Gly Pro Ser Tyr Glu Phe Gln Leu Thr
 420 425 430

Arg Gln Glu Ile Val Ser Leu Phe Asn Ala Phe Gly Arg Ile Ser Thr
 435 440 445

Ser Val Arg Glu Leu Glu Asn Phe Arg His Leu Leu Gln Asn Val His
 450 455 460

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR. 8:

- (i) SEQUENZ-EIGENSCHAFTEN:
 - (A) LÄNGE: 558 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLART: Protein
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR. 8:

Met Ala Ala Leu Thr Arg Asp Pro Gln Phe Gln Lys Leu Gln Gln Trp
 1 5 10 15

Tyr Arg Glu His Arg Ser Glu Leu Asn Leu Arg Arg Leu Phe Asp Ala
 20 25 30

Asn Lys Asp Arg Phe Asn His Phe Ser Leu Thr Leu Asn Thr Asn His
 35 40 45

Gly His Ile Leu Val Asp Tyr Ser Lys Asn Leu Val Thr Glu Asp Val
 50 55 60

Met Arg Met Leu Val Asp Leu Ala Lys Ser Arg Gly Val Glu Ala Ala
 65 70 75 80

Arg Glu Arg Met Phe Asn Gly Glu Lys Ile Asn Tyr Thr Glu Gly Arg
 85 90 95

Ala Val Leu His Val Ala Leu Arg Asn Arg Ser Asn Thr Pro Ile Leu
 100 105 110

Val Asp Gly Lys Asp Val Met Pro Glu Val Asn Lys Val Leu Asp Lys
 115 120 125

Met Lys Ser Phe Cys Gln Arg Val Arg Ser Gly Asp Trp Lys Gly Tyr
 130 135 140

Thr Gly Lys Thr Ile Thr Asp Val Ile Asn Ile Gly Ile Val Gly Ser
 145 150 155 160

Asp Leu Gly Pro Leu Met Val Thr Glu Ala Leu Lys Pro Tyr Ser Ser
 165 170 175

Gly Gly Pro Arg Val Trp Tyr Val Ser Asn Ile Asp Gly Thr His Ile
 180 185 190

Ala Lys Thr Leu Ala Gln Leu Asn Pro Glu Ser Ser Leu Phe Ile Ile
 195 200 205

Ala Ser Lys Thr Phe Thr Thr Gln Glu Thr Ile Thr Asn Ala Glu Thr
 210 215 220

Ala Lys Glu Trp Phe Leu Gln Ala Ala Lys Asp Pro Ser Ala Val Ala
 225 230 235 240

Lys His Phe Val Ala Leu Ser Thr Asn Thr Thr Lys Val Lys Glu Phe
 245 250 255

Gly Ile Asp Pro Gln Asn Met Phe Glu Phe Trp Asp Trp Val Gly Gly
 260 265 270

Arg Tyr Ser Leu Trp Ser Ala Ile Gly Leu Ser Ile Ala Leu His Val
 275 280 285

Gly Phe Asp Asn Phe Glu Gln Leu Leu Ser Gly Ala His Trp Met Asp
 290 295 300

Gln His Phe Arg Thr Thr Pro Leu Glu Lys Asn Ala Pro Val Leu Leu
 305 310 315 320

Ala Leu Leu Gly Ile Trp Tyr Ile Asn Cys Phe Gly Cys Glu Thr His
 325 330 335

.... Leu Pro Tyr Asp Gln Tyr Leu His Arg Phe Ala Ala ...
 340 345 350
 Gln Gln Gly Asp Met Glu Ser Asn Gly Lys Tyr Ile Thr Lys Ser Gly
 355 360 365
 Thr Arg Val Asp His Gln Thr Gly Pro Ile Val Trp Gly Glu Pro Gly
 370 375 380
 Thr Asn Gly Gln His Ala Phe Tyr Gln Leu Ile His Gln Gly Thr Lys
 385 390 395 400
 Met Ile Pro Cys Asp Phe Leu Ile Pro Val Gln Thr Gln His Pro Ile
 405 410 415
 Arg Lys Gly Leu His His Lys Ile Leu Leu Ala Asn Phe Leu Ala Gln
 420 425 430
 Thr Glu Ala Leu Met Arg Gly Lys Ser Thr Glu Glu Ala Arg Lys Glu
 435 440 445
 Leu Gln Ala Ala Gly Lys Ser Pro Glu Asp Leu Glu Arg Leu Leu Pro
 450 455 460
 His Lys Val Phe Glu Gly Asn Arg Pro Thr Asn Ser Ile Val Phe Thr
 465 470 475 480
 Lys Leu Thr Pro Phe Met Leu Gly Ala Leu Val Ala Met Tyr Glu His
 485 490 495
 Lys Ile Phe Val Gln Gly Ile Ile Trp Asp Ile Asn Ser Phe Asp Gln
 500 505 510
 Trp Gly Val Glu Leu Gly Lys Gln Leu Ala Lys Lys Ile Glu Pro Glu
 515 520 525
 Leu Asp Gly Ser Ala Gln Val Thr Ser His Asp Ala Ser Thr Asn Gly
 530 535 540
 Leu Ile Asn Phe Ile Lys Gln Gln Arg Glu Ala Arg Val Gln
 545 550 555

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR. 9:

- (i) SEQUENZ-EIGENSCHAFTEN:
 - (A) LÄNGE: 229 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLART: Protein
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR. 9:

Met Pro Ser Leu Trp Asp Arg Phe Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser
 1 5 10 15
 Ser Ser Arg Thr Pro Ala Ala Asp Arg Pro Pro Arg Ser Ala Trp Gly
 20 25 30
 Ser Ala Ala Arg Glu Glu Gly Leu Asp Arg Cys Ala Ser Leu Glu Ser
 35 40 45

Ser Asp Cys Glu Ser Leu Asp Ser Ser Asn Ser Gly Phe Gly Pro Glu
 50 55 60

Glu Asp Ser Ser Tyr Leu Asp Gly Val Ser Leu Pro Asp Phe Glu Leu
 65 70 75 80

Leu Ser Asp Pro Glu Asp Glu His Leu Cys Ala Asn Leu Met Gln Leu
 85 90 95

Leu Gln Glu Ser Leu Ser Gln Ala Arg Leu Gly Ser Arg Arg Pro Ala
 100 105 110

Arg Leu Leu Met Pro Ser Gln Leu Leu Ser Gln Val Gly Lys Glu Leu
 115 120 125

Leu Arg Leu Ala Tyr Ser Glu Pro Cys Gly Leu Arg Gly Ala Leu Leu
 130 135 140

Asp Val Cys Val Glu Gln Gly Lys Ser Cys His Ser Val Ala Gln Leu
 145 150 155 160

Ala Leu Asp Pro Ser Leu Val Pro Thr Phe Gln Leu Thr Leu Val Leu
 165 170 175

Arg Leu Asp Ser Arg Leu Trp Pro Lys Ile Gln Gly Leu Leu Ser Ser
 180 185 190

Ala Asn Ser Ser Leu Val Pro Gly Tyr Ser Gln Ser Leu Thr Leu Ser
 195 200 205

Thr Gly Phe Arg Val Ile Lys Lys Lys Leu Tyr Ser Ser Glu Gln Leu
 210 215 220

Leu Ile Glu Glu Cys
 225

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR. 10:

- (i) SEQUENZ-EIGENSCHAFTEN:
 - (A) LÄNGE: 232 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLART: Protein
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR. 10:

Met Pro Ser Leu Trp Asp Arg Phe Ser Ser Ser Ser Thr Ser Ser Ser
 1 5 10 15

Pro Ser Ser Leu Pro Arg Thr Pro Thr Pro Asp Arg Pro Pro Arg Ser
 20 25 30

Ala Trp Gly Ser Ala Thr Arg Glu Glu Gly Phe Asp Arg Ser Thr Ser
 35 40 45

Leu Glu Ser Ser Asp Cys Glu Ser Leu Asp Ser Ser Asn Ser Gly Phe
 50 55 60

Gly Pro Glu Glu Asp Thr Ala Tyr Leu Asp Gly Val Ser Leu Pro Asp
 65 70 75 80

Phe Glu Leu Leu Ser Asp Pro Glu Asp Glu His Leu Cys Ala Asn Leu
 85 90 95

 Met Gln Leu Leu Gln Glu Ser Leu Ala Gln Ala Arg Leu Gly Ser Arg
 100 105 110

 Arg Pro Ala Arg Leu Leu Met Pro Ser Gln Leu Val Ser Gln Val Gly
 115 120 125

 Lys Glu Leu Leu Arg Leu Ala Tyr Ser Glu Pro Cys Gly Leu Arg Gly
 130 135 140

 Ala Leu Leu Asp Val Cys Val Glu Gln Gly Lys Ser Cys His Ser Val
 145 150 155 160

 Gly Gln Leu Ala Leu Asp Pro Ser Leu Val Pro Thr Phe Gln Leu Thr
 165 170 175

 Leu Val Leu Arg Leu Asp Ser Arg Leu Trp Pro Lys Ile Gln Gly Leu
 180 185 190

 Phe Ser Ser Ala Asn Ser Pro Phe Leu Pro Gly Phe Ser Gln Ser Leu
 195 200 205

 Thr Leu Ser Thr Gly Phe Arg Val Ile Lys Lys Lys Leu Tyr Ser Ser
 210 215 220

 Glu Gln Leu Leu Ile Glu Glu Cys
 225 230

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR. 11:

- (i) SEQUENZ-EIGENSCHAFTEN:
 - (A) LÄNGE: 864 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLART: Protein
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.11:

Met Ala Met Pro Leu Ser Arg Lys Asp Pro Thr Ser Asn Ala Ala Asp
 1 5 10 15

 Gly Pro Leu Leu Lys Ala Ser Val Ser Ser Pro Val Lys Ala Ser Ser
 20 25 30

 Ser Pro Val Arg Ser Ala Pro Phe Ile Thr Arg Asn Cys Glu Val Gln
 35 40 45

 Ser Pro Glu Leu Leu His Lys Thr Val Ser Pro Leu Lys Thr Glu Val
 50 55 60

 Leu Lys Pro Cys Glu Lys Pro Thr Leu Ser Gln Ala Leu Gln Pro Lys
 65 70 75 80

 Glu Gly Ala Asn Lys Glu Val Cys Leu Gln Ser Gln Ser Lys Asp Lys
 85 90 95

 Leu Ala Thr Pro Gly Gly Arg Gly Ile Lys Pro Phe Leu Glu Arg Phe
 100 105 110

Gly Glu Arg Cys Gln Glu His Ser Lys Glu Ser Pro Thr Cys Arg Ala
 115 120 125
 Phe His Arg Thr Pro Asn Ile Thr Pro Asn Thr Lys Ala Ile Gln Glu
 130 135 140
 Arg Leu Phe Lys Gln Asn Thr Cys Phe Ile Tyr Tyr Pro Asn Leu Ala
 145 150 155 160
 Gln Gln Leu Lys Gln Glu Arg Glu Lys Glu Leu Ala Cys Leu Arg Gly
 165 170 175
 Arg Phe Asp Lys Gly Ser Leu Trp Ser Ala Glu Lys Asp Glu Lys Ser
 180 185 190
 Arg Ser Lys Gln Leu Glu Thr Asn Arg Lys Phe Thr Val Arg Thr Leu
 195 200 205
 Pro Ser Arg Asn Thr Lys Leu Ser Gln Gly Thr Pro Ser Thr Ser Val
 210 215 220
 Ser Asp Lys Val Ala Glu Thr Pro Thr Ala Val Lys Ile Ser Gly Thr
 225 230 235 240
 Glu Pro Ala Gly Ser Thr Glu Ser Glu Met Thr Lys Ser Ser Pro Leu
 245 250 255
 Lys Ile Thr Leu Phe Leu Glu Glu Lys Ser Leu Lys Val Ala Ser
 260 265 270
 Asp Pro Glu Val Glu Gln Lys Thr Glu Ala Val His Glu Val Glu Met
 275 280 285
 Ser Val Asp Asp Glu Asp Ile Asn Ser Ser Lys Ser Leu Thr Thr Ser
 290 295 300
 Ser Val Xaa Ser Leu Xaa Glu Xaa Gly Thr Gly Xaa Trp Lys Arg Xaa
 305 310 315 320
 Lys Glu Glu Met Asp Gln Val Gly Asn Gly Lys Gln Arg Gly Ala Gly
 325 330 335
 Arg Cys Ala Glu Tyr Leu Leu Asn Xaa Xaa Thr Xaa Ser Arg Trp Leu
 340 345 350
 Arg Arg Phe Gly Val Val Asn Leu Gln Asn Val Ile Ser Ser Pro Glu
 355 360 365
 Leu Glu Leu Arg Asp Tyr Ser Leu Ser Ala Pro Ser Pro Lys Pro Gly
 370 375 380
 Lys Phe Gln Arg Thr Arg Val Pro Arg Ala Glu Ser Gly Asp Ser Leu
 385 390 395 400
 Ser Ser Glu Asp Arg Asp Leu Leu Tyr Ser Ile Asp Ala Tyr Arg Ser
 405 410 415
 Gln Arg Phe Lys Glu Thr Glu Arg Pro Ser Ile Lys Gln Val Ile Val
 420 425 430
 Arg Lys Glu Asp Val Thr Ser Lys Leu Ser Glu Lys Asn Gly Val Phe
 435 440 445
 Ser Gly Gln Val Asn Ile Lys Gln Lys Met Gln Glu Leu Asn Asn Asp
 450 455 460

Ile Asn Leu Gln Gln Thr Val Ile Tyr Gln Ala Ser Gln Ala Leu Asn
 465 470 475 480

Cys Cys Val Asp Glu Glu His Gly Lys Gly Ser Leu Glu Glu Ala Glu
 485 490 495

Ala Glu Arg Leu Phe Leu Xaa Ala Thr Glu Lys Arg Ala Leu Leu Ile
 500 505 510

Asp Glu Leu Asn Lys Leu Lys Ser Glu Gly Pro Gln Arg Arg Asn Lys
 515 520 525

Thr Ala Val Ala Ser Gln Ser Gly Phe Ala Pro Cys Lys Gly Ser Val
 530 535 540

Thr Leu Ser Glu Ile Cys Leu Pro Leu Lys Ala Glu Phe Val Cys Ser
 545 550 555 560

Thr Ala Gln Lys Pro Glu Ser Ser Asn Tyr Tyr Tyr Leu Ile Met Leu
 565 570 575

Lys Ala Gly Ala Glu Gln Met Val Ala Thr Pro Leu Ala Ser Thr Ala
 580 585 590

Thr Leu Leu Val Val Met Xaa Leu Thr Phe Pro Thr Thr Leu Pro Xaa
 595 600 605

Xaa Asp Val Ser Asn Asp Phe Glu Ile Asn Val Glu Val Tyr Ser Leu
 610 615 620

Val Gln Lys Lys Asp Ser Leu Arg Pro Glu Lys Lys Lys Lys Ala Ser
 625 630 635 640

Lys Phe Lys Ala Ile Thr Pro Lys Arg Leu Leu Thr Ser Ile Thr Ser
 645 650 655

Lys Ser Ser Leu His Ala Ser Val Met Ala Ser Pro Gly Gly Leu Ser
 660 665 670

Ala Val Arg Thr Ser Asn Phe Thr Leu Val Gly Ser His Thr Leu Ser
 675 680 685

Leu Ser Ser Val Gly Asp Thr Lys Phe Ala Leu Asp Lys Val Pro Phe
 690 695 700

Leu Ser Pro Leu Glu Gly His Ile Cys Leu Lys Ile Ser Cys Gln Val
 705 710 715 720

Asn Ser Ala Val Glu Glu Lys Gly Phe Leu Thr Ile Phe Glu Asp Val
 725 730 735

Ser Gly Phe Gly Ala Trp His Arg Arg Trp Cys Val Leu Ser Gly Asn
 740 745 750

Cys Ile Ser Tyr Trp Thr Tyr Pro Asp Asp Glu Arg Arg Lys Asn Pro
 755 760 765

Ile Gly Arg Ile Asn Leu Ala Asn Cys Ile Ser His Gln Ile Glu Pro
 770 775 780

Ala Asn Arg Glu Phe Cys Ala Arg Arg Asn Thr Leu Glu Leu Ile Thr
 785 790 795 800

Val Arg Pro Gln Arg Glu Asp Asp Arg Glu Thr Leu Val Ser His Val
 805 810 815

Glu Thr His Ser Val Ser Pro Lys Asn Trp Leu Ser Ala Asp Thr Lys
820 825 830

Glu Glu Arg Asp Leu Trp Met Gln Lys Leu Asn Gln Val Ile Val Asp
835 840 845

Ile Arg Leu Trp Gln Pro Asp Ala Cys Tyr Lys Pro Val Gly Lys Pro
850 855 860

Patentansprüche

1. Isoliertes Polypeptid mit einer Aminosäuresequenz, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus SEQ ID Nr. 9 und SEQ ID Nr. 10.
2. Isoliertes Polypeptid nach Anspruch 1 mit der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 9.
3. Isoliertes Polypeptid nach Anspruch 1 mit der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 10.
4. Isoliertes Nucleinsäuremolekül, umfassend eine Sequenz, die ein Polypeptid mit einer Aminosäuresequenz kodiert, die ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus SEQ ID Nr. 9 und SEQ ID Nr. 10.
5. Isoliertes Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 4, umfassend eine Sequenz, die ein Polypeptid mit der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 9 kodiert.
6. Isoliertes Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 4, umfassend eine Sequenz, die ein Polypeptid mit der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 10 kodiert.
7. Isoliertes Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 4 mit der Sequenz der SEQ ID Nr. 1 oder SEQ ID Nr. 2.
8. Isoliertes Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 7 mit der Sequenz der SEQ ID Nr. 1.
9. Isoliertes Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 7 mit der Sequenz der SEQ ID Nr. 2.
10. Antikörper, der spezifisch an ein Polypeptid mit einer Aminosäuresequenz, die ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus SEQ ID Nr. 9 und SEQ ID Nr. 10, bindet.
11. Antikörper nach Anspruch 10, der spezifisch an ein Polypeptid mit der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 9 bindet.
12. Antikörper nach Anspruch 10, der spezifisch an ein Polypeptid mit der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 10 bindet.
13. Antikörper nach Anspruch 10, der ein monoklonaler oder polyklonaler Antikörper ist.
14. Antikörper nach Anspruch 13, der mit einer detektierbaren Einheit konjugiert ist.
15. Polypeptidmolekül, kodiert durch die Nucleinsäure nach Anspruch 8 oder Anspruch 9.
16. Polypeptidmolekül nach Anspruch 15, kodiert durch die Nucleinsäure mit der Sequenz der SEQ ID Nr. 1.
17. Polypeptidmolekül nach Anspruch 15, kodiert durch die Nucleinsäure mit der Sequenz der SEQ ID Nr. 2.
18. Isoliertes Polypeptidmolekül, kodiert durch die Nucleinsäure mit der Sequenz der SEQ ID Nr. 1 oder SEQ ID Nr. 2.
19. Polypeptidmolekül nach Anspruch 18, kodiert durch Nucleinsäure mit der Sequenz der SEQ ID Nr. 1.
20. Polypeptidmolekül nach Anspruch 18, kodiert durch Nucleinsäure mit der Sequenz der SEQ ID Nr. 2.

Es folgen 5 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

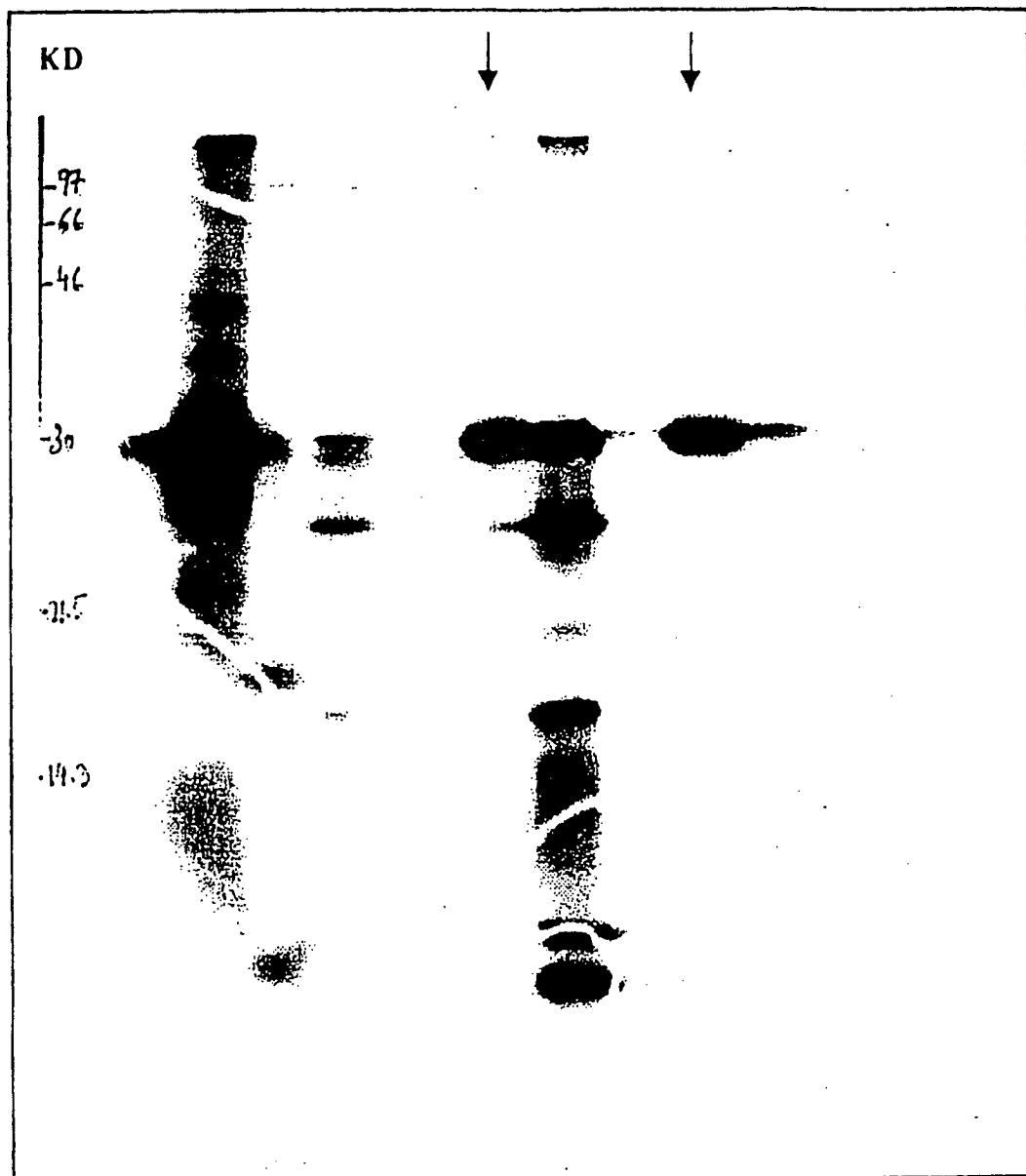


Fig-1

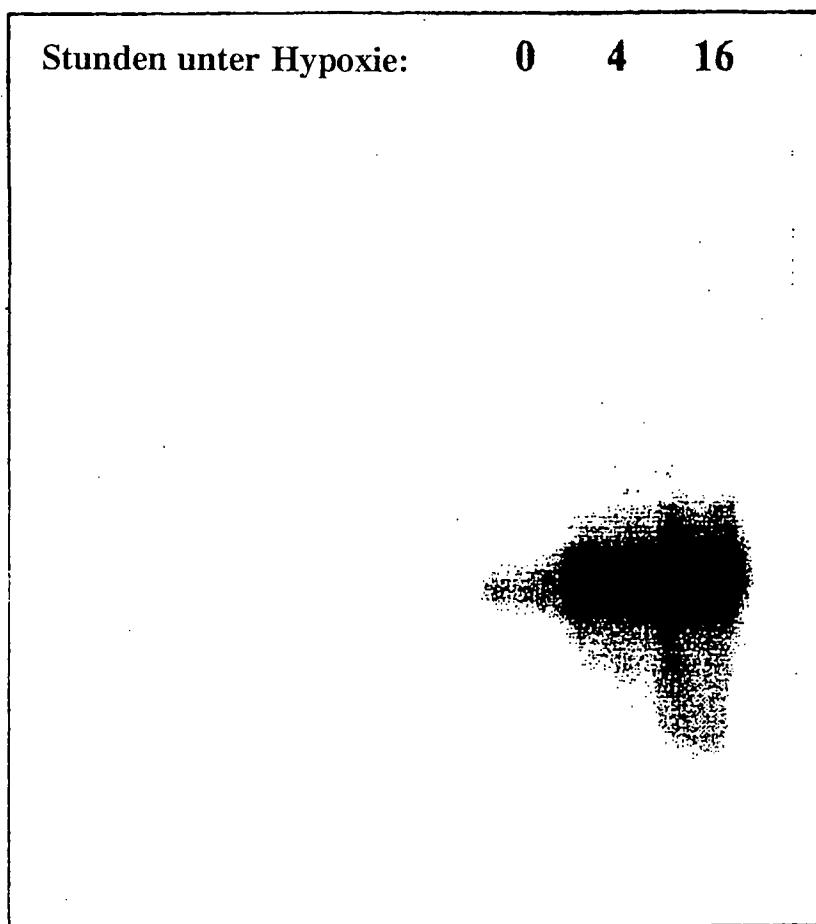


Fig-2

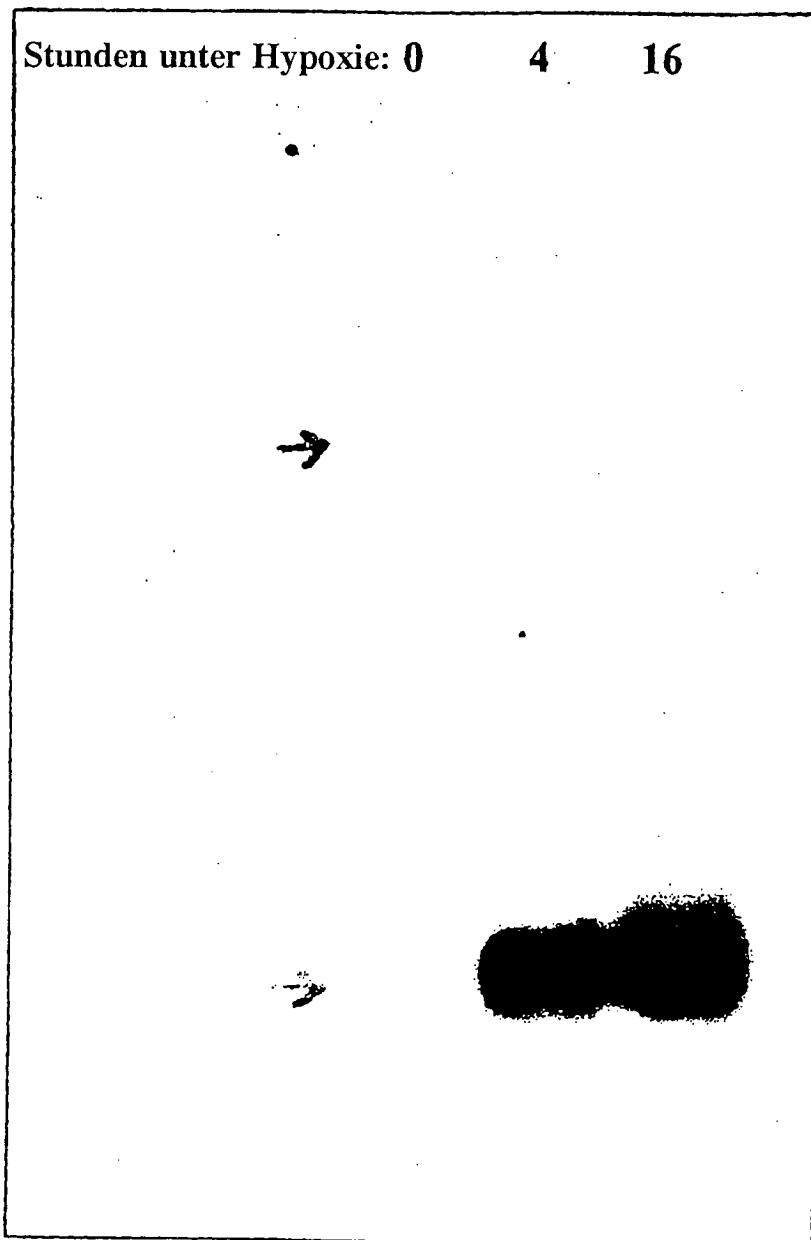


Fig-3

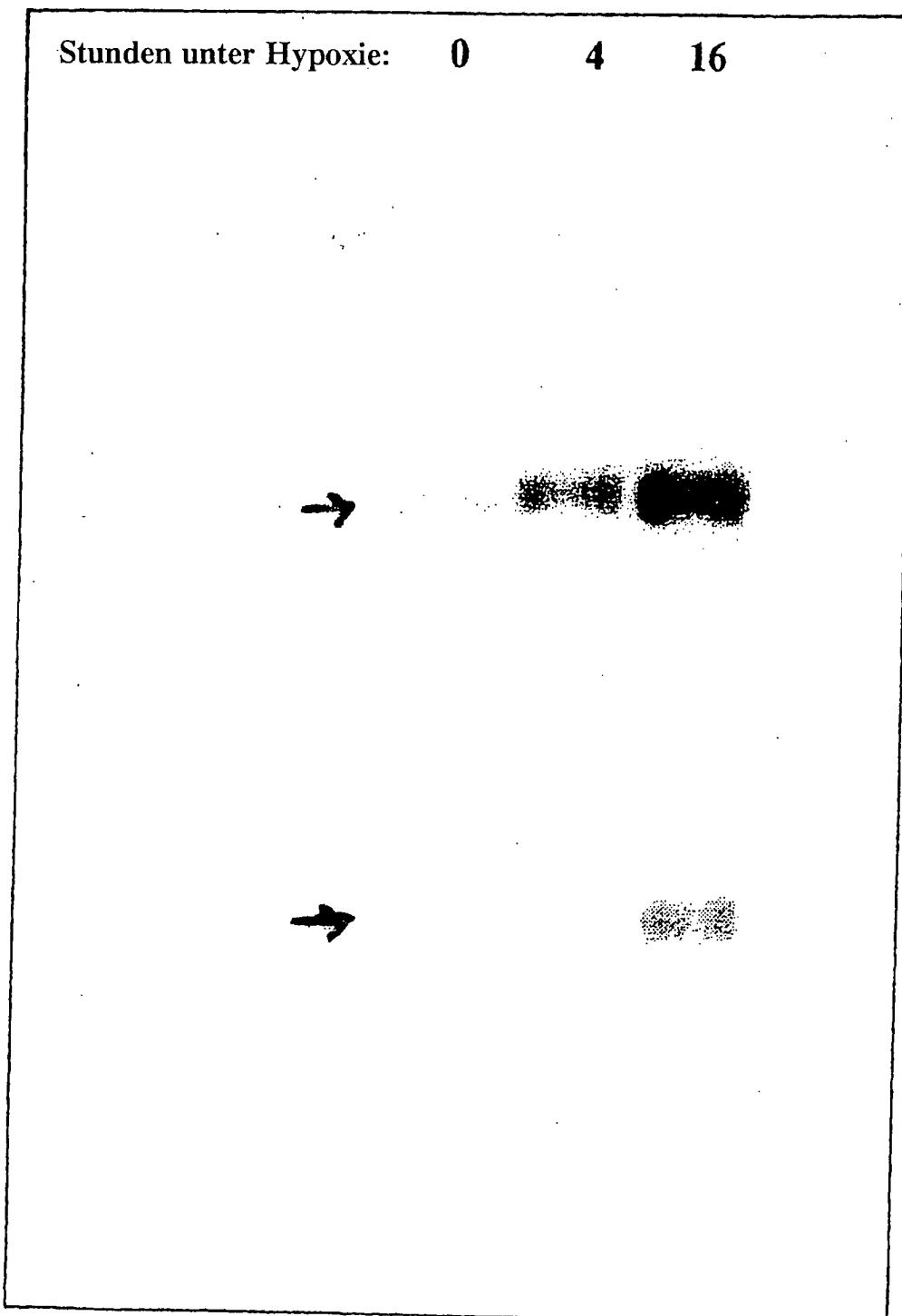


Fig-4

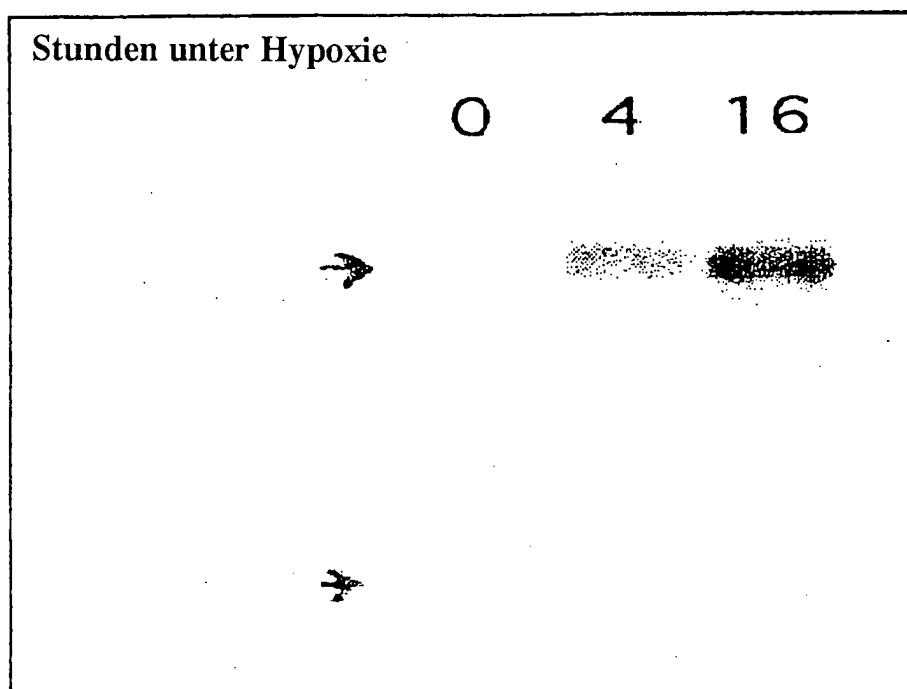


Fig-5