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

(10) **DE 696 34 627 T3** 2008.12.11

(12) Übersetzung der geänderten europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 805 859 B2**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **696 34 627.3**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/GB96/00143**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **96 900 656.8**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1996/023068**
(86) PCT-Anmeldetag: **24.01.1996**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **01.08.1996**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **12.11.1997**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **20.04.2005**
(97) Veröffentlichungstag des geänderten Patents beim EPA: **25.06.2008**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **11.12.2008**

(51) Int Cl.[8]: ***C12N 15/12*** (2006.01)
C07K 14/715 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61K 38/19 (2006.01)
C07K 14/52 (2006.01)

Patentschrift wurde im Einspruchsverfahren geändert

(30) Unionspriorität:
9501683 **27.01.1995** **GB**

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

(73) Patentinhaber:
Glaxo Group Ltd., Greenford, Middlesex, GB

(74) Vertreter:
HOFFMANN & EITLE, 81925 München

(72) Erfinder:
WELLS, Timothy Nigel Carl, Brentford, GB;
POWER, Christine Anna, Brentford, GB

(54) Bezeichnung: **Ein Chemokin Rezeptor für MCP-1, MIP-1 alpha und/oder RANTES**

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

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft Chemokinrezeptoren.

[0002] Chemokine sind eine wachsende Familie von chemotaktischen Cytokinen, die mit einer Rolle in der Rekrutierung und Aktivierung von Zellen in Verbindung gebracht wurden (Oppenheim, J.J. et al., Ann. Rev. Immunol. 9, 617–48 (1991), Schall, T.J., Cytokine, 3 165–183 (1991)). Sie sind primär verantwortlich für die Aktivierung und Rekrutierung von Leukozyten, aber nicht ausschließlich. Eine weitere Analyse dieser Überfamilie von Proteinen hat gezeigt, daß sie in zwei weitere Unterfamilien von Proteinen unterteilt werden kann. Diese wurden als CXC- oder α-Chemokine und CC- oder β-Chemokine auf Basis der Abstände der zwei konservierten Cysteinreste nahe dem Aminoterminus der Proteine bezeichnet.

[0003] Bis heute wurden zwei Rezeptoren für die CC-Chemokinfamilie identifiziert. Der erste Rezeptor, der primär für MIP-1α ("Macrophage inflammatory polypeptide-1α") und RANTES ("Raised an Activation, Normal T-Cell derived and Secreted") ist, wurde zuvor beschrieben (Gao, J.L. et al., J. Exp. Med., 177 1421–7 (1993), Neote, K. et al., Cell 72 415–25 (1993)). Der zweite CC-Chemokinrezeptor, der kürzlich beschrieben wurde, ist für MCP-1 ("monocyte chemotractant Protein-1"), Charo I. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 2752–2756 (1996). Kürzlich wurde gezeigt, daß ein weiterer Rezeptor, US28, der durch das humane Cytomegalovirus exprimiert wird, ein Rezeptor für RANTES, MIP-1α und MCP-1 ist (Gao, J.L. und Murphy P.M., J. Biol. Chem. 269, 28539–28542 (1994)). Alle drei Rezeptoren sind vom Sieben-Transmembran-alpha-Helixsegment-Typ und werden in die Membranen von Zellen exprimiert.

[0004] Jedoch verbleibt ein Bedarf an der Identifizierung von bislang nicht offenbarten Chemokinrezeptoren und an ihrer Charakterisierung, um ein vollständigeres Bild der Struktur und Funktion von Chemokinrezeptoren zu entwickeln.

[0005] Erfindungsgemäß wird ein Chemokinrezeptor mit der in Fig. 3 gezeigten Aminosäuresequenz bereitgestellt.

[0006] Dieser Rezeptor kann bevorzugt MCP-1, MIP-1α und RANTES binden. Er kann bedeutend in der Basophil- und T-Zell-Funktion sein.

[0007] Er wurde zur Durchmusterung auf pharmazeutisch aktive Mittel verwendet, die Proteine sein können oder nicht. Sie können in einer pharmazeutischen Zusammensetzung zusammen mit einem pharmazeutisch akzeptablen Träger bereitgestellt werden.

[0008] Sie kann durch Vermischen des Trägers mit dem pharmazeutisch aktiven Mittel unter sterilen Bedingungen hergestellt werden. Die pharmazeutische Zusammensetzung kann in Einheitsarzneiform bereitgestellt werden. Sie kann als Teil eines Kits angeboten werden, das Gebrauchsanweisungen einschließt.

[0009] Die pharmazeutische Zusammensetzung kann zur Verabreichung auf jedem geeigneten Weg angepaßt werden, zum Beispiel auf dem oralen (einschließlich bukkalen oder sublingualen), rektalen, nasalen, topischen (einschließlich bukkalen, sublingualen oder transdermalem), vaginalen oder parenteralen (einschließlich subkutanen, intramuskulären, intravenösen oder intradermalen) Weg.

[0010] Ein erfindungsgemäßer Rezeptor kann zur Durchmusterung auf Mittel verwendet werden, die nützlich in der Behandlung von Allergien sind, zum Beispiel Asthma, atopische Dermatitis, Rhinitis, Heuschnupfen, Ekzem oder Lebensmittelallergien. Er kann ebenfalls nützlich in der Durchmusterung auf Mittel sein, die nützlich in der Behandlung von Konjunktivitis sind. MCP-1, MIP-1α und RANTES binden alle an den erfindungsgemäßen Rezeptor und können eine Histaminfreisetzung aus Basophilen verursachen. Ein Mittel, das diese Bindung blockiert, kann dadurch die Freisetzung von Histamin aus Basophilen verhindern oder reduzieren (d. h. antagonistisch gegen MCP-1, MIP-1α oder RANTES wirken). Solche Mittel können Varianten von MCP-1, MIP-1α oder RANTES sein (worin eine oder mehrere Aminosäuren relativ zu MCP-1, MIP-1α oder RANTES deletiert, substituiert oder inseriert sind), obwohl dies nicht wesentlich ist.

[0011] Er kann ebenfalls an der Aktivierung von T-Lymphozyten beteiligt sein, eine übliche Eigenschaft von Immun- und anderen inflammatorischen Zuständen.

[0012] Die Bindung der Mittel an den erfindungsgemäßen Rezeptor kann durch geeignete Techniken getestet werden.

[0013] Zum Beispiel können elektrophysiologische Techniken verwendet werden. In einer solchen Technik kann zum Beispiel eine Xenopus-Eizelle zur Expression eines erfindungsgemäßen Rezeptors verwendet werden. Der Rezeptor kann an der Eizellenmembran im Anschluß an Mikroinjektion von RNA, die für den Rezeptor codiert, in die Eizelle exprimiert werden.

[0014] Wenn ein Ligand an den Rezeptor bindet, kann er eine Freisetzung von Calciumionen entweder aus intrazellulären Vorräten oder aus extrazellulären Quellen verursachen. Diese Calciumströme verursachen dann einen Chloridstrom durch die Zellmembran, der elektrophysiologisch gemessen werden kann.

[0015] Solche Ströme werden z. B. erörtert in C. Wahlestedt, Ann. N.Y. Acad. Sci. 632 116–22 (1991) und R. Boton et al., J. Physiol. (London) 408, 511–534 (1989).

[0016] Als Alternative zur Verwendung von elektrophysiologischen Techniken oder anderen Techniken, die auf einer biologischen Reaktion auf die Rezeptorbindung beruhen, können direktere Bindungstest verwendet werden. So könnten Liganden mit einem detektierbaren Marker markiert werden, der an einen Rezeptor binden darf, und der Marker könnte dann detektiert werden. Geeignete Marker, die verwendet werden könnten, schließen Radiomarkierungen, Fluoreszenzmarkierungen, Enzyme, die eine detektierbare Veränderung verursachen können, etc. ein.

[0017] Der erfindungsgemäße Rezeptor kann ebenfalls zur Durchmusterung auf Mittel verwendet werden, die zur Behandlung von Atheromen geeignet sind. In dieser Hinsicht sollte bemerkt werden, das MCP-1 ein Schlüsselrekrutierer von Monozyten zu atherosklerotischen Plaques ist. Der Rezeptor kann zur Durchmusterung auf Mittel verwendet werden, die eine solche Rekrutierung verhindern oder reduzieren (antagonistisch gegen MCP-1α wirken). Solche Mittel können Varianten von MCP-1 selbst sein (worin eine oder mehrere Aminosäuren relativ zu MCP-1 deletiert, substituiert oder inseriert sind), obwohl dies nicht wesentlich ist.

[0018] Eine weitere Verwendung des erfindungsgemäßen Rezeptors besteht in der Durchmusterung auf Mittel, die eine Inhibierung der Stammzellproliferation verursachen, mit anderen Worten in der Durchmusterung auf Agonisten von MIP-1α. Es wurde gezeigt, daß MIP-1α die Proliferation der hömopoetischen Stammzellproliferation inhibiert (G.J. Graham et al., Nature 344 442-(1990)). Als solche könnten Rezeptoragonisten zur Verhinderung der Stammzellproliferation während der Chemotherapie verwendet werden, was deshalb die Stammzellen vor potentiell schädigenden Wirkungen einer solchen Chemotherapie schützen würde.

[0019] MIP-1α ist als Stammzellproliferationsinhibitor bekannt, und Mittel, die ebenfalls Stammzellproliferationsinhibitoren sind, können unter Verwendung des erfindungsgemäßen Rezeptors durchmustert werden. Solche Mittel können Varianten von MIP-1α selbst sein (worin eine oder mehrere Aminosäuren relativ zu MIP-1α deletiert, substituiert oder inseriert sind), obwohl dies nicht wesentlich ist.

[0020] Eine weitere Verwendung des erfindungsgemäßen Rezeptors liegt in der Durchmusterung auf Mittel, die nützlich in der Reduzierung der Wahrscheinlichkeit einer Transplantatabstoßung oder in der Erhöhung der Dauer, bevor eine Abstoßung stattfindet, sind. Hohe Mengen von RANTES werden manchmal in Nierentransplantaten gefunden und können mit der Abstoßung solcher Transplantate verbunden sein. Mittel, die die Bindung von RANTES an den erfindungsgemäßen Rezeptor verhindern oder reduzieren können, können deshalb nützlich in der Transplantation sein, indem sie antagonistisch gegen RANTES wirken. Solche Mittel können Varianten von RANTES selbst sein (worin eine oder mehrere Aminosäuren relativ zu RANTES deletiert, substituiert oder inseriert sind), obwohl dies nicht wesentlich ist.

[0021] Eine weitere Verwendung der vorliegenden Erfindung liegt in der Durchmusterung auf Substanzen, die nützlich in der Behandlung von Krankheiten sind, die durch Viren vermittelt werden. Daher kann sie als Durchmusterung auf antivirale Mittel verwendet werden.

[0022] Ein Beispiel dafür ist die Durchmusterung auf Mittel, die nützlich in der Behandlung von AIDS sind. Es wurde vorgeschlagen, daß die Mengen von MIP-1α und RANTES zumindest teilweise verantwortlich für das längere Überleben von bestimmten AIDS-Patienten als andere sind. Da ein erfindungsgemäßer Rezeptor an MIP-1α und/oder RANTES binden kann, kann er zur Durchmusterung auf andere Mittel verwendet werden, die nützlich in der Behandlung von AIDS sein könnten.

[0023] Es wird ebenfalls angemerkt, daß das humane Cytomegalovirus und Herpesviren Chemokinrezeptoren aufweisen. Die vorliegende Erfindung könnte zur Durchmusterung auf Mittel verwendet werden, die nützlich in der Behandlung von durch solche Viren vermittelten Krankheiten sind.

[0024] Es sollte angemerkt werden, daß die vorliegende Erfindung nicht auf den Rezeptor mit der in Fig. 3 gezeigten Aminosäuresequenz beschränkt ist, sondern daß sie Varianten (allelische und nicht-allelische Varianten) mit einer oder mehreren Aminosäuredeletionen, -insertionen oder -substitutionen relativ zur Sequenz umfaßt, mit der Maßgabe, daß die Varianten wenigstens 90% Identität mit der in Fig. 3 gezeigten Aminosäuresequenz haben und an zumindest eines der Chemokine RANTES, MIP-1α und MCP-1 binden können. (Wünschenswert können die Rezeptoren jedoch an alle diese Chemokine binden). Die Bindung kann durch Überwachen der Reaktion von Zellen in einem elektrophysiologischen Test unter Verwendung von Eizellen wie schon beschrieben bestimmt werden.

[0025] Zum Beispiel wird der Fachmann einsehen, daß verschiedene Aminosäuren häufig gegen andere Aminosäuren ausgetauscht werden können, die ähnliche Eigenschaften haben, ohne bestimmte Eigenschaften eines Proteins substantiell zu verändern oder nachteilig zu beeinflussen. So können die Aminosäuren Glycin, Valin, Leucin oder Isoleucin häufig gegeneinander ausgetauscht werden (Aminosäuren mit aliphatischen Hydroxyl-Seitenketten). Andere Aminosäuren, die häufig gegeneinander ausgetauscht werden können, schließen die folgenden ein: Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan (Aminosäuren mit aromatischen Seitenketten); Lysin, Arginin und Histidin (Aminosäuren mit basischen Seitenketten); Aspartat und Glutamat (Aminosäuren mit sauren Seitenketten); Asparagin und Glutamin (Aminosäuren mit Amid-Seitenketten) und Cystein und Methionin (Aminosäuren mit schwefelhaltigen Seitenketten). So schließt die vorliegende Erfindung in ihrem Umfang Varianten des in Fig. 3 gezeigten Rezeptors ein, der eine oder mehrere solcher Substitutionen einschließt.

[0026] Es ist jedoch bevorzugt, daß Varianten des Rezeptors mit der in Fig. 3 gezeigten Aminosäuresequenz im wesentlichen Aminosäureidentität mit der Aminosäuresequenz aufweisen. Der Grad der Aminosäureidentität kann unter Verwendung eines Programms wie "Bestfit" (Smith and Waterman, Advances in Applied Mathematics, 482–489 (1981)) berechnet werden, um das beste Segment der Ähnlichkeit zwischen den zwei Sequenzen zu finden. Die Angleichung beruht auf der Maximierung der Bewertung, die unter Verwendung einer Matrix aus Aminosäureähnlichkeiten erreicht wird, wie diejenige, die von Schwarz und Dayhof beschrieben wurde (1979), Atlas of Protein Sequences and Structure, M.O. Dayhof, Hrsg., S. 353–358.

[0027] Der Grad der Sequenzidentität ist zumindest 90% oder wenigstens 95%.

[0028] Der Rezeptor oder die Variante davon kann ein N-terminales Methionin einschließen. Solche Methionine werden manchmal während der Translation eingebaut und anschließend nicht entfernt.

[0029] Der Rezeptor oder die Variante kann kovalent an eine andere Einheit (z. B. ein Protein) gebunden sein. So können Fusionsproteine gebildet werden. Diese sind allgemein fachbekannt und können zur Unterstützung der Identifizierung oder Reinigung oder zur anderweitigen Veränderung der Eigenschaften des Rezeptors oder eine Variante davon verwendet werden (z. B. zur Veränderung seiner Stabilität und/oder Bindungseigenschaften).

[0030] Trunkierte Varianten des Rezeptors mit der in Fig. 3 gezeigten Aminosäuresequenz können ebenfalls bereitgestellt werden, da eine oder mehrere Aminosäuren aus der Sequenz deletiert werden können, während die Bindung an MIP-1α, RANTES und/oder MCP-1 beibehalten wird. Dies können N-terminale Deletionen, C-terminale Deletionen, oder solche sein, die innerhalb der Sequenz auftreten.

[0031] Der Rezeptor oder die Variante (von beliebiger Natur) kann in einer im wesentlichen reinen Form bereitgestellt werden. Er/sie kann aus anderen Proteinen isoliert werden und kann aus einer Zellmembran isoliert werden. Er/sie kann in glycosylierter oder unglycosylierter Form sein (abhängig vom verwendeten Expressionssystem). Ein(e) erfindungsgemäße(r) Rezeptor oder Variante davon kann durch jede geeignete Technik bereitgestellt werden.

[0032] Genklonierungstechniken werden bevorzugt verwendet. Solche Techniken werden zum Beispiel offenbart in J. Sambrook et al., Molecular Cloning, 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989).

[0033] Alternativ kann eine chemische Synthese verwendet werden (obwohl dies weniger bevorzugt ist). Zum Beispiel können kurze synthetische Peptide hergestellt und dann zusammen verknüpft werden, um eine erfindungsgemäße Substanz bereitzustellen. Solche Peptide können durch den Fachleuten bekannte Techniken hergestellt werden. So kann ein Ende eines Moleküls immobilisiert werden und der gewünschte Aminosäurereste sequenziell addiert werden. Schutzgruppen können verwendet werden, um unerwünschte Nebenreaktionen zu vermeiden, und können dann entfernt werden.

[0034] Varianten des erfindungsgemäßen Rezeptors zusammen mit dem Rezeptor selbst werden nachfolgend als erfindungsgemäße Substanzen bezeichnet.

[0035] Solche Substanzen können zum Erzeugen oder Selektieren von Antikörpern verwendet werden. Sie schließen Antikörper ein, die an eine erfindungsgemäße Substanz binden. Bevorzugte Antikörper binden spezifisch an erfindungsgemäße Substanzen, so daß sie zur Reinigung solcher Substanzen verwendet werden können. Die Antikörper können monoklonal oder polyklonal sein.

[0036] Polyklonale Antikörper können durch Stimulieren ihrer Produktion in einem geeigneten tierischen Wirt (z. B. Maus, Ratte, Meerschweinchen, Kaninchen, Schaf, Ziege oder Affe) erzeugt werden, wenn die erfindungsgemäße Substanz in das Tier injiziert wird. Falls erforderlich, kann ein Hilfsstoff zusammen mit der erfindungsgemäßen Substanz verabreicht werden. Die Antikörper können dann aufgrund ihrer Bindung an eine erfindungsgemäße Substanz gereinigt werden.

[0037] Monoklonale Antikörper können aus Hybridomen hergestellt werden. Diese können durch Fusionieren von Myelomzellen und Milzzellen gebildet werden, die den gewünschten Antikörper erzeugen, um eine unsterbliche Zellinie zu bilden. Dies ist die allgemein bekannte Kohler-Milstein-Technik (Nature 256, 52–55 (1975)).

[0038] Techniken zur Herstellung von monoklonalen und polyklonalen Antikörpern, die an ein besonderes Protein binden, sind jetzt gut auf diesem Gebiet entwickelt. Sie werden in Standardlehrbüchern der Immunologie erörtert, z. B. in Roitt et al., Immunology, zweite Auflage (1989), Curchill Livingstone, London.

[0039] Zusätzlich zu ganzen Antikörpern sind Derivate davon eingeschlossen, die an erfindungsgemäße Substanzen binden können.

[0040] So werden Antikörperfragmente und synthetische Konstrukte offenbart. Beispiele für Antikörperfragmente und synthetische Konstrukte werden von Dougall et al. angegeben, Tibtech 12, 372–379 (September 1994).

[0041] Antikörperfragmente schließen zum Beispiel Fab-, $F(ab')_2$- und Fv-Fragmente ein (siehe Roitt et al., oben).

[0042] Fv-Fragmente können zur Herstellung eines synthetischen Konstrukts modifiziert werden, das als ein einkettiges Fv-(scFv)-Molekül bekannt ist. Dieses schließt einen Peptidlinker ein, der kovalent V_h- und V_l-Regionen verbindet, die zur Stabilität des Moleküls beitragen.

[0043] Andere synthetische Konstrukte schließen CDR-Peptide ein. Dies sind synthetische Peptide, die Antigen-bindende Determinanten umfassen. Peptidmimetika können ebenfalls verwendet werden. Diese Moleküle sind gewöhnlich konformationsbeschränkte organische Ringe, die die Struktur einer CDR-Schleife nachahmen und Antigen-interaktive Seitenketten einschließen.

[0044] Synthetische Konstrukte schließen chimäre Moleküle ein. So sind zum Beispiel humanisierte (oder primatisierte) Antikörper oder Derivate davon im Umfang der vorliegenden Erfindung. Ein Beispiel für einen humanisierten Antikörper ist ein Antikörper mit humanen Gerüstregionen, aber hypervariablen Regionen aus Nagetier.

[0045] Synthetische Konstrukte schließen ebenfalls Moleküle ein, die eine kovalent gebundene Einheit umfassen, die das Molekül mit einer wünschenswerten Eigenschaft zusätzlich zur Antigenbindung versieht. Zum Beispiel kann die Einheit ein Marker (z. B. ein Fluoreszenz- oder radioaktiver Marker) oder ein pharmazeutisch aktives Mittel sein.

[0046] Die Antikörper oder Derivate davon besitzen eine große Vielzahl von Anwendungen. Sie können in der Reinigung und/oder Identifizierung der erfindungsgemäßen Substanzen verwendet werden. So können sie in der Diagnose verwendet werden.

[0047] Sie können in Form eines Kits zur Durchmusterung auf die erfindungsgemäßen Substanzen bereitgestellt werden.

[0048] Die vorliegende Erfindung schließt ebenfalls in ihrem Umfang Nukleinsäuremoleküle ein, die für erfin-

dungsgemäße Substanzen codieren (d. h. für den zuvor genannten Rezeptor oder Varianten davon). Die Nukleinsäuremoleküle können RNA oder DNA sein und können in isolierter oder rekombinanter Form bereitgestellt werden.

[0049] Erfindungsgemäße Nukleinsäuremoleküle können durch jede geeignete Technik bereitgestellt werden.

[0050] Genklonierungstechniken sind bevorzugt (siehe Sambrook et al., oben). Varianten einer gegebenen Nukleinsäuresequenz können durch Mutagenesetechniken hergestellt werden (z. B. ortsspezifische Mutagenese).

[0051] Chemische Synthesetechniken können alternativ verwendet werden, aber sind weniger bevorzugt.

[0052] Vektoren können zum Einführen der erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle verwendet werden. Die Vektoren können eukaryontische oder prokaryontische Vektoren sein und können in geeignete Wirtszellen oder in nicht-zelluläre Expressionssysteme eingeführt werden.

[0053] In dieser Offenbarung befinden sich Nukleinsäuremoleküle, die komplementär zu den zuvor genannten Nukleinsäuremolekülen sind. Diese werden manchmal als "antisense-Moleküle" bezeichnet. Sie können mit komplementären Nukleinsäuremolekülen hybridisieren und können deshalb die Expression eines Genprodukts verhindern oder reduzieren. So können sie zur Veränderung der Genexpression verwendet werden.

[0054] Die Verwendung solcher Moleküle ist nützlich in der Untersuchung der Genfunktion und -regulation. Geeignete Markierungs- und Hybridisierungstechniken können nützlich zur Identifizierung des Ortes von codierenden Regionen sein.

[0055] Hier werden ebenfalls Nukleinsäuren offenbart, die als Sonden für Chemokinrezeptoren verwendet werden können. Bevorzugte Sonden können spezifisch mit einer Nukleinsäure hybridisieren, die für das Protein mit den in Fig. 3 angegebenen Aminosäuresequenzen oder für Varianten davon codiert, wie oben beschrieben. Solche Sonden können jede geeignete Länge aufweisen, aber würden typischerweise mehr als 15 Nukleotide lang sein und können wenigstens 100 Nukleotide lang sein.

[0056] Wünschenswert werden Sonden mit einer Zielsequenz unter stringenten Hybridisierungsbedingungen hybridisieren. Ein Beispiel für stringente Hybridisierungsbedingungen ist eine Temperatur von 35–65°C und eine Salzkonzentration von ca. 0,9 molar. Andere stringente Hybridisierungsbedingungen können verwendet werden, und die Salzkonzentration muß nicht so hoch wie 0,9 molar sein.

[0057] Die hier in den Fig. 1 und Fig. 3 angegebenen Nukleinsäuresequenzen oder Fragmente davon können als Sonden oder Primer oder zur Herstellung von Sonden oder Primern verwendet werden.

[0058] Die Primer können zur Amplifizierung von Nukleinsäuresequenzen, z. B. unter Verwendung von PCR oder anderen Amplifikationstechniken, verwendet werden. Die Sonden können in der Diagnose oder in der Reinigung verwendet werden.

[0059] Die vorliegende Erfindung wird jetzt allein mittels Beispielen unter Verweis auf die begleitenden Zeichnungen erläutert werden, worin gilt:

[0060] Fig. 1 zeigt eine cDNA-Sequenz und eine abgeleitete Aminosäuresequenz eines als "TM(2-7)5.5" bezeichneten Klons, der zum Sondieren einer λGT11-cDNA-Bibliothek aus humaner Milz verwendet wurde.

[0061] Fig. 2 zeigt verschiedene Primer, die in der Sequenzierung eines Klons verwendet wurden, der aus der Bibliothek isoliert wurde, auf die oben in bezug auf Fig. 1 bezug genommen wurde, wobei die TM(2-7)5.5-DNA als Sonde verwendet wurde.

[0062] Fig. 3 zeigt die cDNA-Sequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz in bezug auf den Klon, auf oben in Fig. 2 bezug genommen wurde, wobei der Klon als "K5.5" bezeichnet wurde.

[0063] Fig. 4 bis Fig. 6 zeigen Northern Blot-Analysen, die unter Verwendung von TM(2-7)5.5-DNA in verschiedenen Hybridisierungsuntersuchungen hergestellt wurden. In diesen Figuren wird das folgende Bewertungssystem verwendet:

+++ Sehr starkes positives Signal, das nach vier Stunden Belichtung der Autoradiographie sichtbar ist.
++ Klares positives Signal, das nach vier Stunden Belichtung der Autoradiographie sichtbar ist.
+ Signal nach vier Stunden Belichtung der Autoradiographie nicht sichtbar, aber klar nach 24 Stunden.
+/– Schwaches positives Signal, das nur nach 24 Stunden Belichtung sichtbar ist.
– Kein Signal.

[0064] Die Sonden wurden mit einer spezifischen Aktivität von 106 cpm/ml Hybridisierungslösung verwendet.

[0065] Fig. 7 zeigt eine Analyse von K5.5-Rezeptor-mRNA-Expressionsprodukten aus Leukozyten und einigen humanen Zellinien an Agarosegelen, wobei die RNA unter Verwendung von reverser Transkriptase-PCR amplifiziert wurde.

[0066] Fig. 8A zeigt eine Analyse des in Xenopus-Eizellen, in die K5.5-cRNA mikroinjiziert worden war, mit Spannungsklemmen bei Stimulierung mit verschiedenen Chemokinliganden induzierten Stroms.

[0067] Fig. 8B zeigt eine Analyse ähnlich der in bezug auf Fig. 8A durchgeführten, aber unter Verwendung unterschiedlicher Chemokine (neben MIP-1α, das in beiden Figuren zum Vergleich gezeigt ist). Die Autoren der vorliegenden Erfindung konnten keine Daten erhalten, die die Bindung von IL-8 an CC-CKR3-Moleküle zeigen. Bevorzugte Rezeptoren im Umfang der vorliegenden Erfindung binden nicht an IL-8.

[0068] Fig. 9 zeigt die Ergebnisse eines Bindungstests unter Verwendung von [^{125}I]-MIP-1α und [^{125}I]-RANTES zur Bindung an humane und murine CC-CKR-3-Moleküle.

BEISPIELE

[0069] Eine Angleichung der Aminosäuresequenzen von IL-8-Rezeptor A und B und von C-C-CKR-1 (MIP-1α/RANTES-Rezeptor) zeigte, daß eine Region zwischen den vorgeschlagenen Transmembrandomänen 3 und 4 die konservierte Aminosäuresequenz R Y L A I V H A enthält.

[0070] Eine zweite konservierte Aminosäuresequenz tritt in der vorgeschlagenen 7-Transmembrandomäne in diesen drei Rezeptoren sowie in den zwei chemotaktischen Nicht-Chemokin-Peptidrezeptoren für fMLP (Formyl-Methionin-Leucin-Phenylalanin) und C5a wie folgt auf:
C L(oder V, I) N P I(oder L, M, V) I(oder L) Y A(oder V) F(oder V)

[0071] Entartete Oligonukleotide wurden hergestellt, die die Mehrzahl der möglichen Codonen enthalten, die zum Erhalt der oben genannten Aminosäuresequenzen translatiert werden könnten.

[0072] Diese Oligonukleotide hatten die folgenden Sequenzen:
s) sense 5' GIT AYY TIG CIA THG TIC AVG C
oder
b) antisense 5' AMI RCR TAI ADI AII GGR TTI AIR C
unter Verwendung der IUB/GCG-Codes, worin gilt:
I = Inosin, das für A, T, G oder C substituieren kann
V = C oder T
H = A, C oder T
M = A oder C
R = A oder G
D = A, G oder T

[0073] Die Oligonukleotide wurden dann zur Klonierung eines humanen CC-Chemokinrezeptors unter Verwendung des nachfolgend dargestellten Verfahrens verwendet.

(a) Klonierung einer als humanes K5.5 bezeichneten Sequenz (CC-CKR-3)*

[0074] (* Die Bezeichnung CC-CKR-3 wird hier aus Gründen der Übereinstimmung mit der im Prioritätsdokument verwendeten Bezeichnung verwendet. Es wird jedoch angemerkt, daß andere Forschungsgruppen jetzt die Bezeichnung CC-CKR-3 für ein unterschiedliches Molekül verwenden und daß das hier als CC-CKR-3 bezeichnete Molekül jetzt in der Literatur als CC-CKR-4 bezeichnet werden mag.)

[0075] Vollständige RNA wurde aus 1 × 10^8 KU812-Zellen durch das Verfahren von Chomczynski und Sacchi

isoliert (1987)("Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-Phenol-chloroform extraction", Anal. Biochem. 162, 156–159). Diese Zellen waren aus einer humanen basophilen KU812-Zellinie, die ein Geschenk von Dr. K. Kishi, Niigata, Japan war.

[0076] PolyA+–mRNA wurde anschließend durch oligodT-Cellulosechromatographie unter Verwendung eines polyA quik mRNA-Reinigungskits (Stratagene) isoliert. Einsträngige cDNA wurde aus 1 µg polyA+–mRNA in einer 50 µl-Reaktion hergestellt, die 1 µg oligod$T_{12\text{-}18}$, 4 mM Methylquecksilberhydroxid, 1 mM dNTPs, 50 mM Tris-HCl pH 8,3-Puffer, 50 mM KCl, 8 mM $MgCl_2$, 10 Einheiten RNAsin und 100 Einheiten AMV reverse Transkriptase-XL (Life Sciences Inc.) enthielt, für 60 min bei 42°C. 5 µl-Teilmengen der Reaktionsmischung wurden dann 40 Durchläufen von PCR (95°C, 2 min; 37°C, 2 min und 72°C, 2 min) in 10 mM Tris-HCl pH 8,3-Puffer, 50 mM KCl, 1,5 mM $MgCl_2$, 0,2 mM dNTPS und 2,5 Einheiten Amplitaq™ (Perkin Elmer Cetus) unter Verwendung von jeweils 3 µM degeneriertem Oligonukleotidprimer (sense 5' GIT AYY TIG CIA THG TIC AVG C und antisense 5 AMI RCR TAI ADI AII GGR TTI AIR C) in einem Techne PHC-2-Thermozykler unterworfen.

[0077] PCR-Reaktionsprodukte wurden an 1% Agarosegelen, die 0,5 µg/ml Ethidiumbromid enthielten, visualisiert. Die mit der vorhergesagten Größe (500–550 bp) wandernden Reaktionsprodukte wurden durch Standardverfahren gelgereinigt (J. Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY).

[0078] Gelgereinigte DNA wurde dann durch sequenzielle Behandlung mit T4-Polynukleotidkinase (New England Biolabs) gemäß den Herstelleranweisungen in einem Gesamtvolumen von 50 µl für 1 h bei 37°C abgestumpft. Nach dieser Zeit wurden 2,5 µl von 2,5 mM dNTPs und 1 µl von E. coli-DNA-Polymerase I Klenow-Fragment (New England Biolabs) hinzugegeben und die Inkubation für weitere 30 min bei 37°C fortgesetzt. Die Reaktionsmischung wurde dann bei 70°C für 30 min wärmeinaktiviert und dann einmal mit Tris-HCl pH 8,0 gesättigtem Phenol/Chloroform (1:1 V/V) extrahiert. DNA wurde durch Zugabe von 10 µl 3M Natriumacetat pH 5,5, 1 µl Glycogen (20 mg/ml)(Boehringer) und 250 µl Ethanol bei –20°C ausgefällt. Die DNA wurde durch Zentrifugieren mit 10 000 × g für 20 min bei 4°C gewonnen und mit 70% Ethanol gewaschen. Das fertige Pellet wurde in sterilem Wasser in einer Konzentration von 10 ng/µl resuspendiert.

[0079] Ein pBluescript II SK-Klonierungsvektor (Stratagene) wurde wie folgt hergestellt: 20 µg von CsCl-Gradienten-gereinigtem Plasmid wurden in einem Reaktionsvolumen von 100 µl für 2 h bei 37°C mit 200 Einheiten EcoRV oder EcoRI (New England Biolabs) gemäß den Herstelleranweisungen verdaut. Nach 2 h wurde der verdaute Vektor mit 10 µl von alkalischer Kälberdarmphosphatase (20 Einheiten/ml)(Boehringer) für weitere 30 min bei 37°C behandelt. Die Reaktionsmischung wurde durch Erwärmen auf 68°C für 15 min inaktiviert und dann einmal mit Tris-HCl pH 8,0 gesättigtem Phenol/Chloroform (1:1 V/V) extrahiert. Plasmid-DNA wurde durch Zugabe von 10 µl 3M Natriumacetat pH 5,5 und 250 µl Ethanol bei –20°C ausgefällt. Die DNA wurde durch Zentrifugieren mit 10 000 × g für 20 min bei 4°C gewonnen und mit 70%igem Ethanol gewaschen. Das fertige Pellet wurde in sterilem Wasser in einer Konzentration von 50 ng/ml resuspendiert.

[0080] Abgestumpftes PCR-Produkt (10 ng) wurde mit 50 ng von EcoRV-verdautem, mit alkalischer Phosphatase behandeltem pBluescript II SK-Plasmid-Klonierungsvektor in einem 20 µl-Volumen unter Verwendung von 2 µl TV-DNA-Ligase (400 000 Einheit/ml)(New England Biolabs) für wenigstens 16 h bei 15°C ligiert. Ligationsprodukte wurden auf 100 µl mit 1 × TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0/1 mM EDTA) verdünnt und mit Phenol/Chloroform wie zuvor beschrieben extrahiert. Die Ligationsprodukte wurden durch Zugabe von 10 µl 3M Natriumacetat pH 5,5, 1 µl Glycogen (20 mg/ml) und 250 µl Ethanol für 15 min bei –70°C ausgefällt. DNA wurde durch Zentrifugieren wie oben beschrieben gewonnen und in 10 µl sterilem Wasser resuspendiert. 5 µl der resuspendierten Ligationsprodukte wurden dann in den elektrokompetenten E. coli-Stamm XL-1 blue (recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac, [F' proAB, lacIqZDM15, Tn10 (tet^r)](40 µl) unter Verwendung eines RioRad Gene-Pulser gemäß den Herstelleranweisungen elektroporiert. Im Anschluß an die Elektroporation wurde 1 ml LB-Medium hinzugegeben, und die Zellen wurden bei 37°C für 1 h kultiviert. Nach dieser Zeit wurden 100 µl-Teilmengen des Kulturmediums auf LB-Platten ausplattiert, die 100 µg/ml Ampicillin enthielten, und für 16 h bei 37°C gezüchtet. Individuelle bakterielle Kolonien wurden dann in 5 ml LB-Medium gepickt, das 100 µg/ml Ampicillin enthielt, und über Nacht bei 37°C gezüchtet. Plasmid-DNA-Zubereitungen im kleinen Maßstab (Mini-Preps) wurden dann aus 3 ml jeder Kultur unter Verwendung eines Wizard™-Mini-Prep-DNA-Reinigungssystems (Promega) gemäß den Herstelleranweisungen hergestellt. 3 µl-Teilmengen von Mini-Prep-DNA wurden dann mit Restriktionsenzymen HindIII und EcoRI (beide von New England Biolabs) gemäß den Herstelleranweisungen in einem Reaktionsvolumen von 15 µl verdaut. Die Reaktionsprodukte wurden an 1% Agarosegelen analysiert, die 0,5 µg/ml Ethidiumbromid enthielten. Mini-Prep-DNAs, die eine Insertgröße von ca. 500–550 bp lieferten, wurden dann der DNA-Sequenzanalyse unter Verwendung von T3- und T7-Primern und Sequenase (USB) gemäß den Herstelleranweisungen unterworfen.

[0081] Ein Vergleich der erhaltenen Sequenzen mit den GenBank/EMBL/DDBJ-Datenbanken zeigte, daß 10 von 23 analysierten Sequenzen 60% Identität auf der DNA-Ebene mit dem humanen C-C CKR-1 (MIP-1α/RANTES-Rezeptor) zeigten (Neote et al., Molecular cloning, functional expression and signalling characteristics of C-C chemokine receptor, Cell 72, 415–425 (1993)). Die Sequenz eines der als TM(2-7)5.5 bezeichneten Klone (abgekürzt mit K5.5) ist in Fig. 1 gezeigt.

[0082] Mit CsCl-Gradienten gereinigte Plasmid-DNA wurde für Klon K5.5 durch Standardverfahren hergestellt. 20 µg Plasmid-DNA wurden bei 37°C mit den Restriktionsenzymen HindIII und EcoRI gemäß den Herstelleranweisungen (New England Biolabs) verdaut. Die Verdauprodukte wurden an 1% Agarosegelen analysiert, die 0,5 µg/ml Ethidiumbromid enthielten. Die 514 bp-Insert-DNA, die dem sequenzierten PCR-Produkt entsprach, wurde wie zuvor beschrieben gelgereinigt. 100 ng des 514 bp-inserts wurden mit ^{32}P-dCTP (Amersham International) unter Verwendung eines statistisch geprimten DNA-Markierungskits (Boehringer) gemäß den Herstelleranweisungen markiert und zur Durchmusterung von 5×10^5 Klonen einer λGT11-cDNA-Bibliothek aus menschlicher Milz (Clontech) gemäß den Herstelleranweisungen verwendet. Im Anschluß an Hybridisierung wurden duplizierte positive Klone erneut mit der gleichen Sonde durchmustert, bis eine reine positive Phagenplaque erhalten wurde. Phagen-DNA wurde aus positiven Plaques unter Verwendung von Standardverfahren gewonnen (J. Sambrook et al. (1989)). Gereinigte Phagen-DNA (100 µg) wurde mit 200 Einheiten EcoRI (New England Biolabs) in Puffer 2 (New England Biolabs) für 16 h bei 37°C verdaut. Verdauprodukte wurden an 1% Agarosegelen fraktioniert, die Ethidiumbromid enthielten (0,5 µg/ml), und cDNA-Inserte wurden gelgereinigt und in den EcoRI-Ort von pBluescript II SK-Vektor wie oben beschrieben ligiert. Ligationsprodukte wurden in den E. coli-Stamm XL-1 blue (recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac, [F' proAB, lacIqZDM15, Tn10 (tet^r)] durch Elektroporation wie zuvor transformiert. Individuelle ampicillinresistente bakterielle Kolonien wurden in L-Bouillon übergeimpft, die 100 µg/ml Ampicillin enthielt, und für 16 h bei 37°C gezüchtet. Mini-Prep-DNA wurde aus 3 ml Übernacht-Kulturmedium wie oben beschrieben hergestellt. 3 µl-Teilmengen der Mini-Prep-DNA wurden dann mit dem Restriktionsenzym EcoRI gemäß den Herstelleranweisungen in einem Reaktionsvolumen von 15 µl verdaut. Die Reaktionsprodukte wurden an 1% Agarosegelen analysiert, die 0,5 µg/ml Ethidiumbromid enthielten. Mini-Preps, die cDNA-Inserte enthielten, wurden anschließend unter Verwendung von Sequenase™ und T3- und T7-Primern an einem Applied Biosystems DNA-Sequenzer sequenziert.

[0083] Es wurde durch Sequenzieren mit dem T7-Primer gezeigt, daß ein als E1-C19 bezeichneter Klon das mutmaßliche 5'-Ende von K5.5 enthielt. Mit CsCl-Gradienten gereinigte DNA von Klon E1-C19 wurde anschließend erneut mit T3- und T7-Primern und mehreren internen Sequenzierungsprimern auf Basis der vorhergehenden Sequenzierungsergebnisse sequenziert (Primersequenzen sind in Fig. 2 gezeigt). Die Sequenz der E1-C19-Insert-cDNA ist in Fig. 3 gezeigt.

(b) Northern Blot-Analyse

[0084] Multiple Northern Blots von Gewebe wurden von Clontech erworben und mit dem 514 bp HindIII/EcoRI-Fragment von pTM(2-7)5.5 gemäß den Herstelleranweisungen hybridisiert. Für andere Northern Blots wurde vollständige RNA aus Zellinien und Leukozytenpopulationen aus peripherem Blut durch das Verfahren Chomczynski und Sacchi (1987) hergestellt. Alle in dieser Untersuchung verwendeten Zellinien wurden in RPMI 1640-Medium gehalten, das 10% hitzinaktiviertes FCS und 50 µg/ml Gentamycin enthielt (alle erworben von Gibco-BRL). Mononukleäre Zellen und polymorphonukleäre Zellen aus peripherem Vollblut wurden durch Zentrifugieren mit Dichtegradient an Ficoll (Pharmacia) gereinigt. Die Leukozyten wurden durch FACS unter Verwendung des geeignet markierten Antikörpers an einem FACS-Star (Becton Dickinson) sortiert, um reine Populationen (> 90%) von 3-Zellen (CD20), T-Zellen (CD4, CD8, CD45R0, CD45RA) und Monozyten (CD14) zu erhalten. Pulmonale Makrophagen und gemischten Lungenleukozyten wurden aus herausgeschnittenen Proben der menschlichen Lunge unter Verwendung des Verfahrens von Nicod et al. (1989) hergestellt ("Separation of potent und poorly functional human lung accessory cells based an autofluorescence", J. Leukocyte. Biol. 45, 458).

[0085] 5 µg von jeder RNA wurden elektrophretisch in 1% Agarosegelen behandelt, die 2,2% (V/V) Formaldehyd enthielten, auf Nitrocellulose übertragen und mit dem ^{32}P-dCTP-markierten 514 bp-Insert aus TM(2-7)5.5 unter Verwendung des Northern Blot-Standardverfahrens (Sambrook et al. (1989)) sondiert. Die Ergebnisse sind in Fig. 4 bis Fig. 6 gezeigt.

(c) Analyse der K5.5-Rezeptor-mRNA-Expression in Leukozyten und einigen humanen Zellinien durch reverse Transkriptase-PCR

[0086] 10 µg von vollständiger RNA (in einem Volumen von 10 µl) und 0,5 µl von 0,5 mg/ml Lösung von oligodT_{15} wurden für 10 min auf 70°C erwärmt und dann auf Eis für 2 min abgekühlt, gefolgt von Zugabe von 4 µl von 5X Erststrangpuffer, 2 µl 0,1 M DTT, 1 µl 10 mM dNTPs und 1 µl Superscript™ für 1 h bei 37°C. Alle Reagenzien für die reverse Transkriptions-(RT)-reaktion waren von Gibco-BRL, ausgenommen oligodT_{15} (Stratagene). 2 µl-Teilmengen von jeder RT-Reaktion wurden dann 40 Durchlaufen von PCR (2 min 95°C; 2 min 55°C und 2 min 72°C) in einer 100 µl-Reaktionsmischung unterworfen, die jeweils 100 pmol der Primer K5-5FLA und K5-5FLB enthielt. Die PCR-Reaktionsprodukte (10 µl) wurden an 1% Agarosegelen wie oben beschrieben auf Gegenwart eines 1085 bp-Reaktionsprodukts analysiert, das der vollständigen codierenden Sequenz von K5.5 entspricht. Die Ergebnisse sind in Fig. 7 gezeigt, worin die Proben in den in Fig. 7 angegebenen Bahnen wie folgt sind:

Bahn	Probe
1	Molekulargewichtsmarker (1 kb-Treppe)
2	PB T-Zellen (IL-2-stimuliert)
3	PB T-Zellen
4	Jurkat
5	MOLT-4
6	PB B-Zellen
7	PB B-Zellen
8	pulmonale Makrophagen
9	PB-Monozyten
10	KU812
11	EOL-3
12	SW900 (Lungenepithel-Zellinie)
13	CCLu32 (Lungenfibroblasten-Zellinie)
14	LL24 (Lungenfibroblasten-Zellinie)
15	AALT.16 (Zellinie aus glatter Aortamuskulatur)

(d) Expression von K5.5-cRNA in Xenopus-Eizellen

[0087] An einem CsCl-Gradienten gereinigte pEI-C19-Plasmid-DNA (5 µg) wurde unter Verwendung des Restriktionsenzyms BamHI (New England Biolabs) in einem 100 µl Reaktionsvolumen über Nacht bei 37°C linearisiert. Linearisierte Plasmide wurden mit 2 µl Proteinase K (16,7 mg/ml, Boehringer) für 30 min bei 37°C behandelt. Die DNA wurde zweimal mit Phenol (0,1 M Trisgesättigt, pH 8,0) und einmal mit Chloroform extrahiert. Glycogen (1 µl einer 20 mg/ml Vorratslösung) wurde zur wäßrigen Phase hinzugegeben, und linearisierte DNA wurde nach Zugabe von 0,1 Volumina 3M Natriumacetat pH 5,5 und 2,5 Volumina Ethanol für 1 h bei –80°C ausgefällt. Die DNA wurde durch Zentrifugieren (14 000 U/min, 4°C in einer Mikrozentrifuge) gewonnen, mit 70%igem Ethanol gewaschen und in RNase-freiem Wasser mit 250 ng/ml gelöst.

[0088] Verkappte cRNA-Transkripte wurden aus 1 µg von mit BamHI (New England Biolabs) linearisierter DNA in einem 100 µl-Reaktionsvolumen erzeugt, das 20 µl Transkriptionspuffer (5X), 4 µl NTP-Mischung (10 mM ATP, UTP und CTP, 3 mM GTP), 4 µl 0,75M DTT, 2,5 µl RNAsin, 0,5 µl GTP (10 mN), 4 µl CAP-Analogon (10 mM m7G(5')ppp(5')F) und 2,5 µl T7- bzw. T3-RNA-Polymerase enthielt. Alle für die In-vitro-Transkriptionsreaktion verwendeten Reagenzien waren von Promega, ausgenommen CAP-Analogon (Pharmacia). Nach 1,5 h bei 37°C wurden 4 µl RQ1-DNase (Promega) hinzugegeben, und die Reaktionsmischung wurde für weitere 15 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktionsmischung wurde zweimal mit 0,1 M Tris-HCl pH 8,0 gesättigtem Phenol/Chloroform (1:1 V/V) und einmal mit Chloroform extrahiert. Glycogen (1 µl wie oben) wurde zur wäßrigen Phase hinzugegeben, und cRNA wurde über Nacht bei –20°C nach Zugabe von 0,1 Volumina 3M Natriumacetat pH 5,5 und 2,5 Volumina Ethanol ausgefällt. cRNA wurde durch Zentrifugieren (14 000 U/min, 4°C, 20 min in einer Mikrozentrifuge) gewonnen, das Pellet in 70%igem Ethanol gewaschen und in sterilem Wasser mit 1 µg/µl resuspendiert. Eine ungefähre Abschätzung der cRNA-Konzentration wurde durch Laufenlassen einer Teilmenge des resuspendierten Materials an einem 1% Agarosegel, das 2,2% (V/V) Formaldehyd enthielt, ge-

gen RNA-Marker bekannter Konzentration erhalten. Die Proben wurden vor der Verwendung bei –80°C gelagert.

[0089] Eizellen wurden von ausgewachsenen weiblichen Xenopus laevis durch Standardverfahren gewonnen (Bertrand et al., 1991). Eizellen wurden durch Inkubation in 0,2% (G/V) Collagenase (Sigma) in 50 ml OR2-Medium ohne Ca2+ und ohne Mg2+ in einem Rollkolben unter langsamem Rühren für 2 h bei Raumtemperatur vom Follikel befreit (OR2-Medium ist 82,5 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 1 mM N_2HPO_4, 15 mM HEPES, 2 mM $CaCl_2$, 1 mM $MgCl_2$ pH 7,6). Die Eizellen wurden vorsichtig mit OR2, gefolgt von MBS gespült (modifizierte Barth-Kochsalzlösung: 88 mm NaCl, 1 mM KCl, 0,33 mM $Ca(NO_3)_2$, 0,41 mM $CaCl_2$, 0,82 mM $MgSO_4$, 2,4 mM $NaHCO_3$, 10 mM HEPES pH 7,6) und für wenigstens 1–2 h in MBS erholen gelassen, bevor Eizellen des Stadium V–VI ausgewählt wurden. Ausgewählte Eizellen wurden in MBS, das mit Penicillin/Streptomycin ergänzt war (100 Einheiten/ml)(Gibco-BRL), über Nacht bei 18°C vor der Injektion inkubiert.

[0090] Die Eizellen wurden unter Verwendung einer Inject + Matic-Luftpumpe (Gabay) unter Verwendung von Nadeln mikroinjiziert, die aus kallibrierten 6 ml-Drummond-Kapillaren hergestellt wurden. cRNA (25 ng in 50 nl) wurde in das Cytoplasma injiziert. Die Eizellen wurden individuell in Vertiefungen einer flachbödigen Kulturschale mit 96 Vertiefungen übertragen und in MBS über 24–72 h inkubiert.

[0091] Elektrophysiologische Aufzeichnungen wurden 1 bis 3 Tage nach der Injektion in mit OR2-Medium superfusionierten Eizellen bei Raumtemperatur unter Bedingungen mit Spannungsklemmen unter Verwendung von zwei Mikroelektroden (1–2 M, beide mit 3M KCl gefüllt) durchgeführt, wobei das Membranpotential routinemäßig bei –100 mV unter Verwendung eines Gene Clamp 500-Instruments (Axon) eingestellt wird.

[0092] Testchemokine wurden von PeptroTech erworben oder inhäusig im Glaxo Institute for Molecular Biology hergestellt und in einer Konzentration von 1 µM in PBS resuspendiert. 50 µl von jedem Chemokin wurden direkt auf spannungsgeklemmte Eizellen aufgetragen, und der induzierte Strom wurde an einem mit einem IBM-PC verbundenen Tektronix 5113-Zweistrahl-Speicheroszilloskop überwacht. Wenn multiple Chemokine an einer einzelnen Eizelle getestet wurden, erlaubte man eine Erholungszeit von 2 min zwischen jeder Anwendung. Die Ergebnisse sind in **Fig. 8A** gezeigt.

[0093] **Fig. 8B** zeigt die Ergebnisse einer ähnlichen Analyse zu der in **Fig. 8A** veranschaulichten, aber unter Verwendung unterschiedlicher Chemokine (neben MIP-1α).

[0094] Es ist ersichtlich, daß keine signifikante elektrophysiologische Reaktion beobachtet wurde, wenn IL-8 verwendet wurde, im Gegensatz zu dem für MIP-1α erhaltenen Ergebnis.

(e) HL-60-Zelltransfektion und Ligandenbindungstest

[0095] 30 µg humanes CC-CKR-3-pcDNA1neo, murines CC-CKR-3-pcDNA1neo oder pcDNA1neo wurden in 500 µl HL-60-Zellen (2×10^7 Zellen/ml in 0,15 M NaCl, 20 mM HEPES, pH 7,3) unter Verwendung eines BioRad Geno Pulster elektroporiert (260 V, 960 µF, Küvette mit 0,4 cm Spalt). Die Zellen wurden in T-175-Kolben übergeimpft, die 25 ml serumfreies AIM-V-Medium (GIBCO) enthielten. Am Tag 2 oder 3 nach der Transfektion wurden die Zellen in einem Gesamtvolumen von 45 ml AIM-V-Medium verdünnt, das 600 µg/ml G418 enthielt und am Tag 6 wurden die Zellen weiter auf 180 ml AIM-V-Medium verdünnt, das 600 µg/ml G418 enthielt. An den Tagen 7–15 nach der Transfektion wurden die Zellen in AIM-V-Medium (+G418) mit einer Dichte von 0,4 – 1,2 × 10^6 Zellen/ml gehalten, und die Bindungstests wurden während dieses Zeitraums durchgeführt. Die kompetitive Gleichgewichtsbindung wurde durch Inkubieren von 5 × 10^5 Zellen in 100 µl Bindungspuffer (1 mM $CaCl_2$, 5 mM $MgCl_2$, 0,5% BSA, 50 mM HEPES, pH 7,2), 0,34 nM [^{125}I]-Radioligand und 0,5–2000 nM kaltem Liganden in Millipore®-DV-Filterplatten mit 96 Vertiefungen durchgeführt. Nach 1,5 h Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Zellen viermal durch Vakuumfiltration mit Bindungspuffer gespült, der 0,5 M NaCl enthielt. 50 µl Optiphase Szintillationsmittel (Wallac) wurden zu jeder Vertiefung hinzugegeben, und die Radioaktivität wurde mit einem Wallac Microbeta Plattenlesegerät gemessen. Alle Bindungsdaten wurden als Prozentwert der Gesamtbindung normiert. Die Gesamtbindung für einen gegebenen Liganden wurde als die Radioaktivität definiert, die in Abwesenheit von konkurrierendem Liganden an 5 × 10^5 Zellen gebunden war, die mit humanem CC-CKR-3 transfiziert waren (Bereich: 1000–2500 cpm).

[0096] Die Ergebnisse sind in **Fig. 9** gezeigt, die eine Bindung von [^{125}I]MIP-1α und [^{125}I]RANTES mit hoher Affinität an humanes und murines CC-CKR-3 veranschaulicht. HL-60-Zellen wurden mit humanem CC-CKR-3 (●), murinem CC-CKR-3 (■) oder einem leeren Vektor (O) transfiziert und in AIM-V-Medium, das G418 enthielt, für 7–15 Tage gehalten. Kompetitive Gleichgewichtstests wurden wie oben beschrieben mit [^{125}I]MIP-1α (A)

und [^{125}I]RANTES (B) durchgeführt. Jeder Punkt stellt den Mittelwert ± Standardabweichung von zweifachen Punkten aus vier (A) oder drei (B) separaten Experimenten dar. Die Daten wurden mit der GraFit 3.01-Software als Kurve angepaßt (Leatherbarrow, R.J., GraFit Versions 3.01, Erithicus Software Ltd., Staines, UK (1992)), wobei die Gleichung $B/Bmax^{app} = 1/1 + ([L[/IC_{50}))$ verwendet wurde, worin B = cpm gebunden, $Bmax^{app}$ = cpm gebunden in Abwesenheit von konkurrierendem Liganden, L = konkurrierender Ligand und IC_{50} = [Radioligand] + K_d ist (Cheng., Y. und Prussof., H.W. Biochem. Pharmacol. 22: 3099–3108 (1973)).

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:
(A) NAME: GLAXO GROUP LIMITED
(B) STRASSE: GLAXO HOUSE; BERKELEY AVENUE
(C) ORT: GREENFORD
(D) BUNDESLAND: MIDDLESEX
(E) LAND: UNITED KINGDOM
(F) POSTLEITZAHL: UB6 0NN

(A) NAME: WELLS, Timothy Nigel Carl
(B) STRASSE: c/o GLAXO INSTITUTE FOR MOLECULAR BIOLOGY, 14 CHEMIN DE AULX
(C) ORT: PLAN-LES-OUATES
(D) BUNDESLAND: GENF
(E) LAND: SCHWEIZ
(F) POSTLEITZAHL: 1228

(A) NAME: POWER, Christine Anna
(B) STRASSE: c/o GLAXO INSTITUTE FOR MOLECULAR BIOLOGY, 14 CHEMIN DE AULX
(C) ORT: PLAN-LES-OUATES
(D) BUNDESLAND: GENF
(E) LAND: SCHWEIZ
(F) POSTLEITZAHL: 1228

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: STOFFE UND IHRE VERWENDUNGEN

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 20

(iv) COMPUTERLESBARE FASSUNG:
(A) DATENTRÄGER: Diskette
(B) COMPUTER: IBM-PC-kompatibel
(C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
(D) SOFTWARE: PatentIn Ausgabe #1.0, Version #1.30 (EPO)

(v) DATEN DER VORLIEGENDEN ANMELDUNG:
ANMELDENUMMER: WO PCT/GB96/00143

(vi) DATEN DER FRÜHEREN ANMELDUNG:
(A) ANMELDENUMMER: GB 9501683.8
(B) ANMELDEDATUM: 27. Jan. 1995

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:1:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 8 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(C) STRANGFORM: Doppelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:1:

Arg Tyr Leu Ala Ile Val His Ala
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:2:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 9 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:2:

Cys Xaa Asn Pro Xaa Xaa Tyr Xaa Xaa
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:3:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 22 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:3:

GNTAYYTNGC NATHGTNCAY GC **22**

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:4:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 26 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(Iv) ANTISENSE: Ja

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:4:

AMNRCRTTAN ADNANNGGRT TNANRC **26**

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:5:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 514 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
(B) LAGE: 3..512

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:5:

GGTATCTGGC GATAGTGCAC GCGGTGTTTT CCTTGAGGGC AAGGACCTTG ACTTATGGGG 60

TCATCACCAG TTTGGCTACA TGGTCAGTGG CTGTGTTCGC CTCCCTTCCT GGCTTTCTGT 120

TCAGCACTTG TTATACTGAG CGCAACCATA CCTACTGCAA AACCAAGTAC TCTCTCAACT 180

CCACGACGTG GAAGGTTCTC AGCTCCCTGG AAANCAACAT TCTCGGATTG GTGATCCCCT 240

TAGGGATCAT GCTGTTTTGC TACTCCATGA TCATCAGGAC CTTGCAGCAT TGTAAAAATG 300

AGAAGAAGAA CAAGGCGGTG AAGATGATCT TTGCCGTGGT GGTCCTCTTC CTTGGGTTCT 360

GGACACCTTA CAACATAGTG CTCTTCCTAG AGACCCTGGT GGAGCTAGAA GTCCTTCAGG 420

ACTGCACCTT TGAAAGATAC TTGGACTATG CCAGCCAGGC CACAGAAACT CTGGCTTTTG 480

TTCACTGCTG CCTCAATCCC CTCCTCTACG CCGT 514

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:6:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 22 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(iv) ANTISENSE: Ja

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:6:

AGAGTACTTG GTTTTGCAGT AG 22

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:7:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 21 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(iv) ANTISENSE: Ja

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:7:

GCAGCAGTGA ACAAAAGCCA G 21

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:8:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 21 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:8:

CATAGTGCTC TTCCTAGAGA C 21

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:9:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 21 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(iv) ANTISENSE: Ja

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:9:

GGTTGAGCAG GTACACATCA G 21

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:10:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 19 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:10:

CAATACTGTG GGCTCCTCC 19

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:11:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 17 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(iv) ANTISENSE: Ja

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:11:

GCTCAGGTCC ATGACTG 17

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:12:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 17 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:12:

CTCATGAGCA TTGATAG 17

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:13:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 17 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:13:

CTGAGCGCAA CCATACC 17

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:14:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 17 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:14:

GCTAGAAGTC CTTCAGG 17

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:15:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 17 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:15:

GGATCATGAT CTTCATG 17

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:16:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 25 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:16:

AAATGAAACC CCACGGATAT AGCAG 25

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:17:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 23 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(iv) ANTISENSE: Ja

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:17:

TCCTACAGAG CATCATGAAG ATC 23

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:18:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 1607 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
(B) LAGE: 183..1265

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:18:

CGGGGGTTTT GATCTTCTTC CCCTTCTTTT CTTCCCCTTC TTCTTTCCTT CCTCCCTCCC 60

TCTCTCATTT CCCTTCTCCT TCTCCCTCAG TCTCCACATT CAACATTGAC AAGTCCATTC 120

AGAAAAGCAA GCTGCTTCTG GTTGGGCCCA GACCTGCCTT GAGGAGCCTG TAGAGTTAAA 180

AAATGAACCC CACGGATATA GCAGATACCA CCCTCGATGA AAGCATATAC AGCAATTACT 240

ATCTGTATGA AAGTATCCCC AAGCCTTGCA CCAAAGAAGG CATCAAGGCA TTTGGGGAGC 300

TCTTCCTGCC CCCACTGTAT TCCTTGGTTT TTGTATTTGG TCTGCTTGGA AATTCTGTGG 360

TGGTTCTGGT CCTGTTCAAA TACAAGCGGC TCAGGTCCAT GACTGATGTG TACCTGCTCA 420

ACCTTGCCAT CTCGGATCTG CTCTTCGTGT TTTCCCTCCC TTTTTGGGGC TACTATGCAG 480

CAGACCAGTG GGTTTTTGGG CTAGGTCTGT GCAAGATGAT TTCCTGGATG TACTTGGTGG 540

GCTTTTACAG TGGCATATTC TTTGTCATGC TCATGAGCAT TGATAGATAC CTGGCGATAG 600

TGCACGCGGT GTTTTCCTTG AGGGCAAGGA CCTTGACTTA TGGGGTCATC ACCAGTTTGG 660

CTACATGGTC AGTGGCTGTG TTCGCCTCCC TTCCTGGCTT TCTGTTCAGC ACTTGTTATA 720

CTGAGCGCAA CCATACCTAC TGCAAAACCA AGTACTCTCT CAACTCCACG ACGTGGAAGG 780

TTCTCAGCTC CCTGGAAATC AACATTCTCG GATTGGTGAT CCCCTTAGGG ATCATGCTGT 840

TTTGCTACTC CATGATCATC AGGACCTTGC AGCATTGTAA AAATGAGAAG AAGAACAAGG 900

CGGTGAAGAT GATCTTTGCC GTGGTGGTCC TCTTCCTTGG GTTCTGGACA CCTTACAACA 960

TAGTGCTCTT CCTAGAGACC CTGGTGGAGC TAGAAGTCCT TCAGGACTGC ACCTTTGAAA 1020

GATACTTGGA CTATGCCATC CAGGCCACAG AAACTCTGGC TTTTGTTCAC TGCTGCCTTA 1080

ATCCCATCAT CTACTTTTTT CTGGGGGAGA AATTTCGCAA GTACATCCTA CAGCTCTTCA 1140

AAACCTGCAG GGGCCTTTTT GTGCTCTGCC AATACTGTGG GCTCCTCCAA ATTTACTCTG 1200

CTGACACCCC CAGCTCATCT TACACGCAGT CCACCATGGA TCATGATCTC CATGATGCTC 1260

TGTAGAAAAA TGAAATGGTG AAATGCAGAG TCAATGAACT TTTCCACATT CAGAGCTTAC 1320

TTTAAAATTG GTATTTTTAG GTAAGAGATC CCTGAGCCAG TGGTCAGGAG GAAAGGCTTA 1380

CACCCACAGG TGGGAAAGAC AGGTTCTCAT CCCTGCAGGN AGGTTTTTCT TCTCCCCACT 1440

TAGANAAAGT NCCAGGCCTG GAAGGGGTCC AACCCNGGGT TGAGGATCCT TCCCCCAAAC 1500

CCAGGGTTTG GCCTGGAGGA TTAATNCAAA ANNTTTNTTG AAACTCTTGA ANANGTTGNG 1560

NTAAGTTTNG GGGGGTTNTT TTGAAGGNAA GTTTTTCCCT TCTTNCC 1607

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:19:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 170 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:19:

Tyr Leu Ala Ile Val His Ala Val Phe Ser Leu Arg Ala Arg Thr Leu
1 5 10 15

Thr Tyr Gly Val Ile Thr Ser Leu Ala Thr Trp Ser Val Ala Val Phe
20 25 30

Ala Ser Leu Pro Gly Phe Leu Phe Ser Thr Cys Tyr Thr Glu Arg Asn
35 40 45

His Thr Tyr Cys Lys Thr Lys Tyr Ser Leu Asn Ser Thr Thr Trp Lys
50 55 60

Val Leu Ser Ser Leu Glu Xaa Asn Ile Leu Gly Leu Val Ile Pro Leu
65 70 75 80

Gly Ile Met Leu Phe Cys Tyr Ser Met Ile Ile Arg Thr Leu Gln His
85 90 95

Cys Lys Asn Glu Lys Lys Asn Lys Ala Val Lys Met Ile Phe Ala Val
100 105 110

Val Val Leu Phe Leu Gly Phe Trp Thr Pro Tyr Asn Ile Val Leu Phe
115 120 125

Leu Glu Thr Leu Val Glu Leu Glu Val Leu Gln Asp Cys Thr Phe Glu
130 135 140

Arg Tyr Leu Asp Tyr Ala Ser Gln Ala Thr Glu Thr Leu Ala Phe Val
145 150 155 160

His Cys Cys Leu Asn Pro Leu Leu Tyr Ala
165 170

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:20:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 360 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:20:

```
Met Asn Pro Thr Asp Ile Ala Asp Thr Thr Leu Asp Glu Ser Ile Tyr
1               5                  10                  15

Ser Asn Tyr Tyr Leu Tyr Glu Ser Ile Pro Lys Pro Cys Thr Lys Glu
            20                  25                  30

Gly Ile Lys Ala Phe Gly Glu Leu Phe Leu Pro Pro Leu Tyr Ser Leu
        35                  40                  45

Val Phe Val Phe Gly Leu Leu Gly Asn Ser Val Val Val Leu Val Leu
    50                  55                  60

Phe Lys Tyr Lys Arg Leu Arg Ser Met Thr Asp Val Tyr Leu Leu Asn
65                  70                  75                  80

Leu Ala Ile Ser Asp Leu Leu Phe Val Phe Ser Leu Pro Phe Trp Gly
                85                  90                  95

Tyr Tyr Ala Ala Asp Gln Trp Val Phe Gly Leu Gly Leu Cys Lys Met
            100                 105                 110

Ile Ser Trp Met Tyr Leu Val Gly Phe Tyr Ser Gly Ile Phe Phe Val
        115                 120                 125

Met Leu Met Ser Ile Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Val His Ala Val Phe
    130                 135                 140

Ser Leu Arg Ala Arg Thr Leu Thr Tyr Gly Val Ile Thr Ser Leu Ala
145                 150                 155                 160

Thr Trp Ser Val Ala Val Phe Ala Ser Leu Pro Gly Phe Leu Phe Ser
                165                 170                 175

Thr Cys Tyr Thr Glu Arg Asn His Thr Tyr Cys Lys Thr Lys Tyr Ser
            180                 185                 190

Leu Asn Ser Thr Thr Trp Lys Val Leu Ser Ser Leu Glu Ile Asn Ile
        195                 200                 205

Leu Gly Leu Val Ile Pro Leu Gly Ile Met Leu Phe Cys Tyr Ser Met
    210                 215                 220

Ile Ile Arg Thr Leu Gln His Cys Lys Asn Glu Lys Lys Asn Lys Ala
225                 230                 235                 240

Val Lys Met Ile Phe Ala Val Val Val Leu Phe Leu Gly Phe Trp Thr
                245                 250                 255

Pro Tyr Asn Ile Val Leu Phe Leu Glu Thr Leu Val Glu Leu Glu Val
            260                 265                 270

Leu Gln Asp Cys Thr Phe Glu Arg Tyr Leu Asp Tyr Ala Ile Gln Ala
        275                 280                 285

Thr Glu Thr Leu Ala Phe Val His Cys Cys Leu Asn Pro Ile Ile Tyr
    290                 295                 300

Phe Phe Leu Gly Glu Lys Phe Arg Lys Tyr Ile Leu Gln Leu Phe Lys
305                 310                 315                 320

Thr Cys Arg Gly Leu Phe Val Leu Cys Gln Tyr Cys Gly Leu Leu Gln
                325                 330                 335

Ile Tyr Ser Ala Asp Thr Pro Ser Ser Ser Tyr Thr Gln Ser Thr Met
            340                 345                 350

Asp His Asp Leu His Asp Ala Leu
        355                 360
```

Patentansprüche

1. Polypeptid, das eine oder mehrere Aminosäuredeletionen, -insertionen oder -substitutionen relativ zu der in **Fig. 3** gezeigten Aminosäuresequenz (SEQ ID N0:20) hat und wenigstens 90% Aminosäuresequenzidentität mit der in **Fig. 3** gezeigten Aminosäuresequenz (SEQ ID N0:20) hat, wobei das Polypeptid ein Chemokinrezeptor ist, der an RANTES, MIP-1α und/oder MCP-1 binden kann.

2. Polypeptid, das die in **Fig. 3** gezeigte Aminosäuresequenz (SEQ ID N0:20) hat und ein Chemokinrezeptor ist.

3. Nukleinsäure, die für ein Polypeptid gemäß Anspruch 1 oder 2 codiert.

4. Nukleinsäure gemäß Anspruch 3, die die in SEQ ID N0:18 (**Fig. 3**) gezeigte Nukleotidsequenz hat.

5. Nukleinsäure gemäß Anspruch 4, die die Nukleotide 183–1262 der in SEQ ID N0:18 (**Fig. 3**) gezeigten Nukleotidsequenz umfaßt.

6. Vektor, der eine Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 3 bis 5 umfaßt.

7. Wirt, der einen Vektor gemäß Anspruch 6 umfaßt.

8. Verfahren zum Erhalt eines Polypeptids gemäß Anspruch 1 oder 2, umfassend das Inkubieren eines Wirts gemäß Anspruch 7 unter Bedingungen, die die Expression des Polypeptids verursachen, und das anschließende Reinigen des Polypeptids.

Es folgen 10 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

FIG. 1

cDNA-Sequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz von Klon TM(2-7)5.5

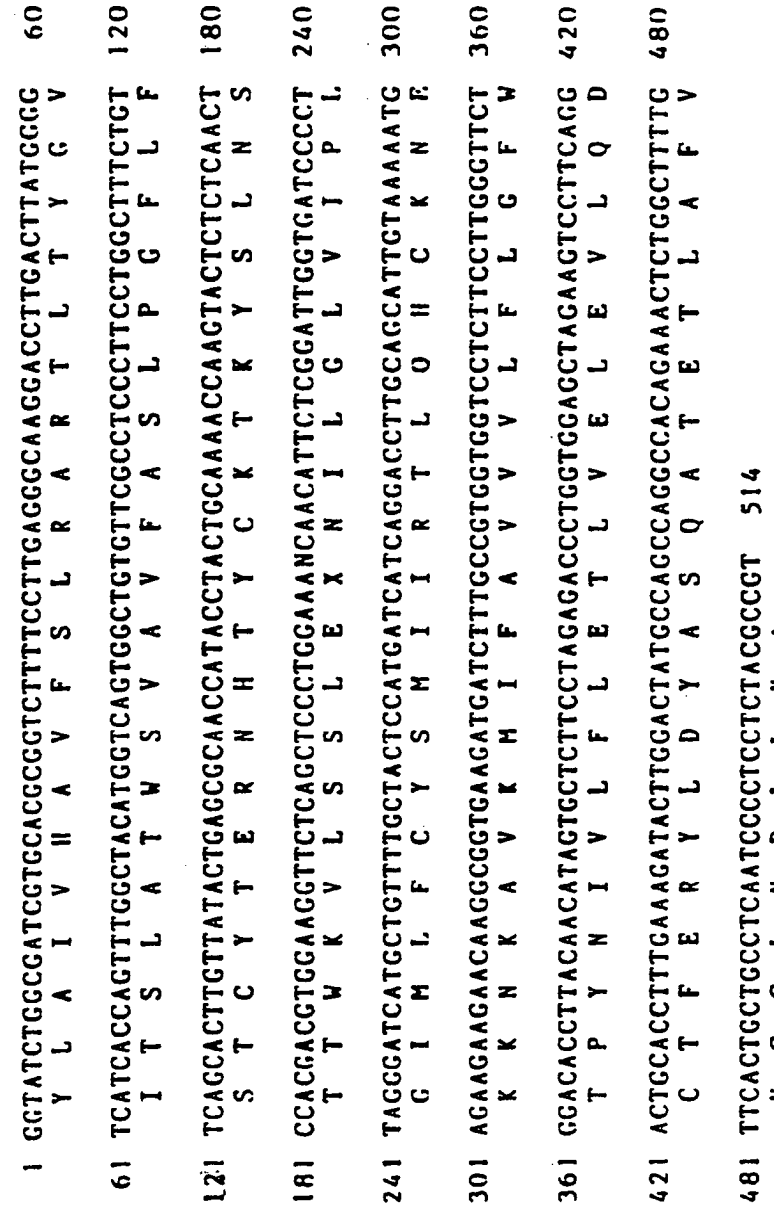


FIG. 2

Zur Bestimmung der vollständigen Sequenz von E1-C19 verwendete Oligonukleotidprimer

K5-5AS	5' AGA GTA CTT GGT TTT GCA GTA G	(ANTISENSE)
K5-5AS2	5' GCA GCA GTG AAC AAA AGC CAG	(ANTISENSE)
K5-5A	5' CAT AGT GCT CTT CCT AGA GAC	(SENSE)
K5-5B	5' GGT TGA GCA GGT ACA CAT CAG	(ANTISENSE)
K5-5C	5' CAA TAC TGT GGG CTC CTC C	(SENSE)
K5-5D	5' GCT CAG GTC CAT GAC TG	(SENSE)
K5-5E	5' CTC ATG AGC ATT GAT AG	(SENSE)
K5-5F	5' CTG AGC GCA ACC ATA CC	(SENSE)
K5-5G	5' GCT AGA AGT CCT TCA GG	(SENSE)
K5-5H	5' GGA TCA TGA TCT TCA TG	(SENSE)
K5-5FLA	5' AAA TGA AAC CCC ACG GAT ATA GCAG	(SENSE)
K5-5FLB	5' TCC TAC AGA GCA TCA TGA AGA TC	(ANTISENSE)

FIG. 3

cDNA-Sequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz von K5.5

```
  1 CGGGGGTTTTGATCTTCTTCCCCTTCTTTTCTTCCCCTTCTTCTTTCCTTCCTCCCTCCC  60

 61 TCTCTCATTTCCCTTCTCCTTCTCCCTCAGTCTCCACATTCAACATTGACAAGTCCATTC 120

121 AGAAAAGCAAGCTGCTTCTGGTTGGGCCCAGACCTGCCTTGAGGAGCCTGTAGAGTTAAA 180

181 AAATGAACCCCACGGATATAGCAGATACCACCCTCGATGAAAGCATATACAGCAATTACT 240
      M  N  P  T  D  I  A  D  T  T  L  D  E  S  I  Y  S  N  Y  Y

241 ATCTGTATGAAAGTATCCCCAAGCCTTGCACCAAAGAAGGCATCAAGGCATTTGGGGAGC 300
      L  Y  E  S  I  P  K  P  C  T  K  E  G  I  K  A  F  G  E  L

301 TCTTCCTGCCCCCACTGTATTCCTTGGTTTTTGTATTTGGTCTGCTTGGAAATTCTGTGG 360
      F  L  P  P  L  Y  S  L  V  F  V  F  G  L  L  G  N  S  V  V

361 TGGTTCTGGTCCTGTTCAAATACAAGCGGCTCAGGTCCATGACTGATGTGTACCTGCTCA 420
      V  L  V  L  F  K  Y  K  R  L  R  S  M  T  D  V  Y  L  L  N

421 ACCTTGCCATCTCGGATCTGCTCTTCGTGTTTTCCCTCCCTTTTTGGGGCTACTATGCAG 480
      L  A  I  S  D  L  L  F  V  F  S  L  P  F  W  G  Y  Y  A  A

481 CAGACCAGTGGGTTTTTGGGCTAGGTCTGTGCAAGATGATTTCCTGGATGTACTTGGTGG 540
      D  Q  W  V  F  G  L  G  L  C  K  M  I  S  W  M  Y  L  V  G

541 GCTTTTACAGTGGCATATTCTTTGTCATGCTCATGAGCATTGATAGATACCTGGCGATAG 600
      F  Y  S  G  I  F  F  V  M  L  M  S  I  D  R  Y  L  A  I  V

601 TGCACGCGGTGTTTTCCTTGAGGGCAAGGACCTTGACTTATGGGGTCATCACCAGTTTGG 660
      H  A  V  F  S  L  R  A  R  T  L  T  Y  G  V  I  T  S  L  A

661 CTACATGGTCAGTGGCTGTGTTCGCCTCCCTTCCTGGCTTTCTGTTCAGCACTTGTTATA 720
      T  W  S  V  A  V  F  A  S  L  P  G  F  L  F  S  T  C  Y  T

721 CTGAGCGCAACCATACCTACTGCAAAACCAAGTACTCTCTCAACTCCACGACGTGGAAGG 780
      E  R  N  H  T  Y  C  K  T  K  Y  S  L  N  S  T  T  W  K  V

781 TTCTCAGCTCCCTGGAAATCAACATTCTCGGATTGGTGATCCCCTTAGGGATCATGCTGT 840
      L  S  S  L  E  I  N  I  L  G  L  V  I  P  L  G  I  M  L  F

841 TTTGCTACTCCATGATGATCAGGACCTTGCAGCATTGTAAAAATGAGAAGAAGAACAAGG 900
      C  Y  S  M  I  I  R  T  L  Q  H  C  K  N  E  K  K  N  K  A

901 CGGTGAAGATGATCTTTGCCGTGGTGGTCCTCTTCCTTGGGTTCTGGACACCTTACAACA 960
      V  K  M  I  F  A  V  V  V  L  F  L  G  F  W  T  P  Y  N  I
```

```
961  TAGTGCTCTTCCTAGAGACCCTGGTGGAGCTAGAAGTCCTTCAGGACTGCACCTTTGAAA  1021
       V  L  F  L  E  T  L  V  E  L  E  V  L  Q  D  C  T  F  E  R

1021 GATACTTGGACTATGCCATCCAGGCCACAGAAACTCTGGCTTTTGTTCACTGCTGCCTTA  1080
       Y  L  D  Y  A  I  Q  A  T  E  T  L  A  F  V  H  C  C  L  N

1081 ATCCCATCATCTACTTTTTTCTGGGGGAGAAATTTCGCAAGTACATCCTACAGCTCTTCA  1140
       P  I  I  Y  F  F  L  G  E  K  F  R  K  Y  I  L  Q  L  F  K

1141 AAACCTGCAGGGGCCTTTTTGTGCTCTGCCAATACTGTGGGCTCCTCCAAATTTACTCTG  1200
       T  C  R  G  L  F  V  L  C  Q  Y  C  G  L  L  Q  I  Y  S  A

1201 CTGACACCCCCAGCTCATCTTACACGCAGTCCACCATGGATCATGATCTCCATGATGCTC  1260
       D  T  P  S  S  S  Y  T  Q  S  T  M  D  H  D  L  H  D  A  L

1261 TGTAGAAAAATGAAATGGTGAAATGCAGAGTCAATGAACTTTTCCACATTCAGAGCTTAC  1320
       *

1321 TTTAAAATTGGTATTTTTAGGTAAGAGATCCCTGAGCCAGTGGTCAGGAGGAAAGGCTTA  1380

1381 CACCCACAGGTGGGAAAGACAGGTTCTCATCCCTGCAGGNAGGTTTTTCTTCTCCCCACT  1440

1441 TAGANAAAGTNCCAGGCCTGGAAGGGGTCCAACCCNGGGTTGAGGATCCTTCCCCCAAAC  1500

1501 CCAGGGTTTGGCCTGGAGGATTAATNCAAAANNTTTNTTGAAACTCTTGAANANGTTGNG  1560

1561 NTAAGTTTNGGGGGGTTNTTTTGAAGGNAAGTTTTTCCCTTCTTNCC  1607
```

FIG. 3 (Forts.)

FIG. 4

Northern-Blot-Analyse der K5.5-Expression in peripherem Gewebe

Gewebe	K5.5
Herz	-
Hirn	-
Plazenta	-
Lunge	-
Leber	-
Skelettmuskel	-
Niere	-
Bauchspeicheldrüse	-
Milz	++
Thymus	+++
Prostata	-
Hoden	+/-
Eierstock	-
Dünndarm	+/-
Dickdarm	-
Leukozyten aus peripherem Blut	+++

FIG. 5

Expression von K5.5-Rezeptor-mRNA in T-Zellpopulationen aus peripherem Blut und einigen T-Zellinien

T-Zelle/T-Zellinien	K5.5
T-Zellen + IL-2 (4 h)	++
" (12 h)	++
" (24 h)	++
" (48 h)	++
" (72 h)	++
" (7 Tage)	++
T-Zellen + PMA (2 Tage)	++
Jurkat	+
MOLT-4	+/-
T-Zellen (unstimuliert)	+
CD8 + T-Zell-Klon	+
T8-Klon	+++
T8 + GH	+++
T8 + GR	-
T8 + Giα	+
T4-Klon	+++
TT20 (IL2-stimuliert)	++
CD45 RO	-
CD45RO (stimuliert)	-
CD45RA	-
CD45RA (stimuliert)	-
HUT 78	-
HUT 78 (stimuliert)	-

FIG. 6

Expression von K5.5-Rezeptor-mRNA in Nicht-T-Leukozyten und -Zellinien

Nicht-T-Leukozyten/linien	K5.5
B-Zellen aus peripherem Blut	+
B-Zellen (aktiviert)	
Raji	-
GCC (Mandel)	-
GCC (Anti-CD40-MAb)	-
BL2-Linie	-
RPMI 8666	-
KU812	++
EOL-3-Linie	+/-
Makrophagen (alveolar)	-
Gemischte Lungenleukozyten	+/-
Monozyten	-
HMC-1-Linie	-

FIG. 7

Analyse der K5.5-Rezeptor-mRNA-Expression durch RT-PCR in humanen Zellinien und Leukozytenpopulationen aus peripherem Blut

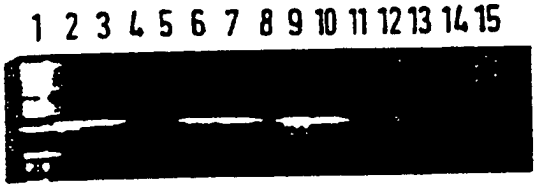


FIG. 8A

In spannungsgeklemmten Eizellen bei Stimulation mit unterschiedlichen Chemokinliganden (1 µM) in 2-minütigen Intervallen induzierter Strom (Ergebnisse der individuellen getesteten Eizellen sind gezeigt)

K5.5

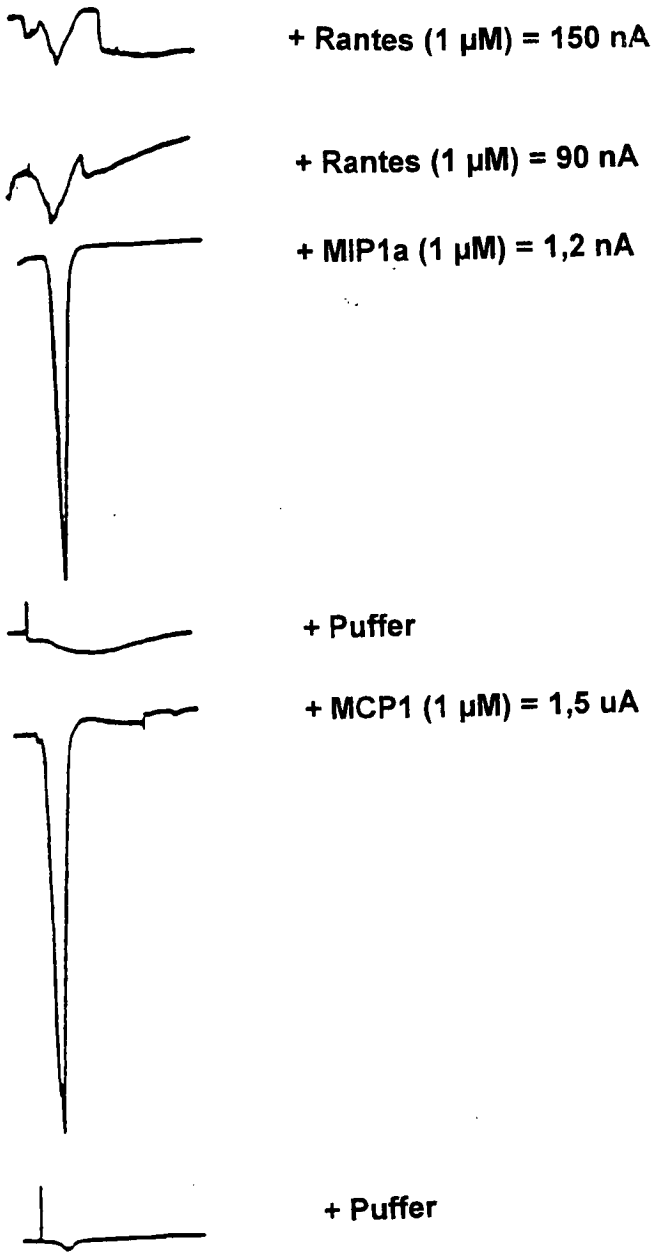
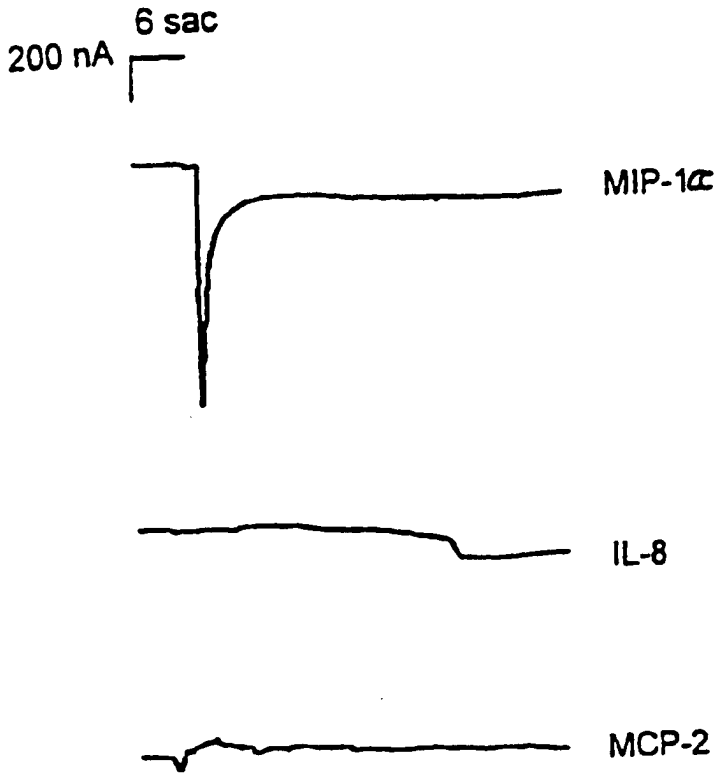
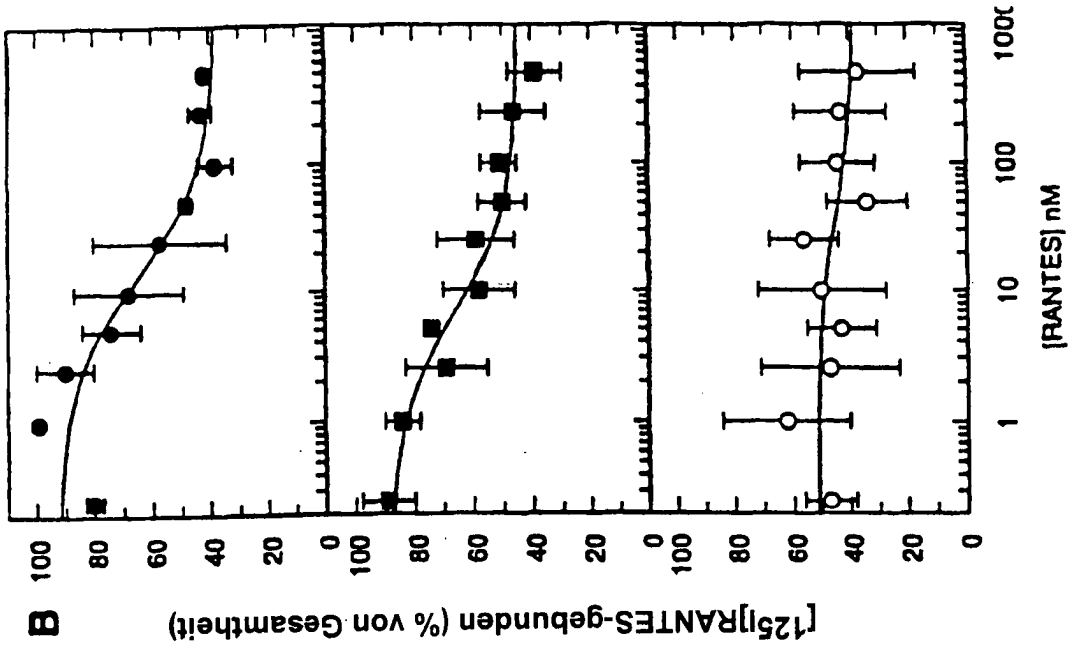


FIG. 8B




B
[125I]RANTES-gebunden (% von Gesamtheit)
[RANTES] nM

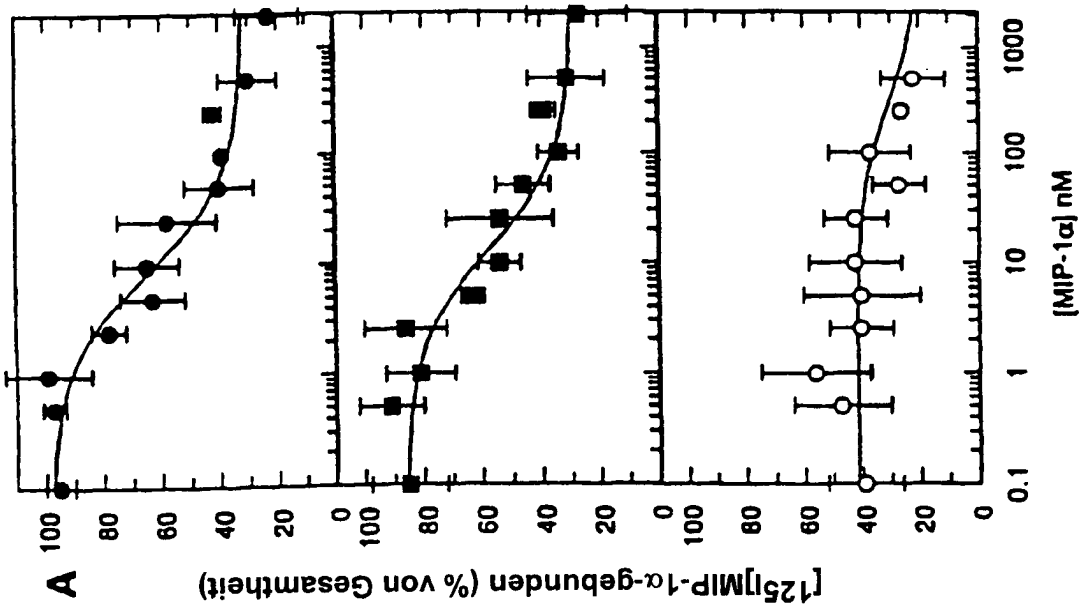

A
[125I]MIP-1α-gebunden (% von Gesamtheit)
[MIP-1α] nM

FIG. 9