



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 697 35 477 T2** 2006.11.30

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 892 849 B1**

(51) Int Cl.⁸: **C12N 5/00** (2006.01)

(21) Deutsches Aktenzeichen: **697 35 477.6**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US97/00767**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **97 903 840.3**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1997/027286**

(86) PCT-Anmeldetag: **21.01.1997**

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: **31.07.1997**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **27.01.1999**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **15.03.2006**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **30.11.2006**

(30) Unionspriorität:

589915 **23.01.1996** **US**

618957 **20.03.1996** **US**

713296 **13.09.1996** **US**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(73) Patentinhaber:

**Indevus Pharmaceuticals, Inc., Lexington, Mass.,
US**

(72) Erfinder:

**SNODGRASS, Ralph, H., Powell, OH 43065, US;
CIOFFI, Joseph, New Albany, OH 43054, US;
ZUPANCIC, J., Thomas, Worthington, OH 43085,
US; SHAFER, W., Alan, Lancaster, OH 43130, US;
MIKHAIL, A., Adel, Columbus, OH 43214, US;
BARUT, A., Bruce, Worthington, OH 43085, US**

(74) Vertreter:

derzeit kein Vertreter bestellt

(54) Bezeichnung: **PROCESS ZUR VERWENDUNG DES OBESE-GENS UND SEINES GENPRODUKTS ZUR STIMULIERUNG DER ENTWICKLUNG VON HAEMOTOPOIETISCHEN ZELLEN**

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

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

Beschreibung**1. EINLEITUNG**

[0001] Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Expression verschiedener Formen eines neuen Rezeptors in hämatopoetischen und endothelialen Zellen. Eine variante Form dieses Rezeptors wurde in Hirnzellen nachgewiesen, und es wurde gezeigt, dass sie an das obese-Genprodukt, Leptin, bindet. Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind insbesondere Verfahren zur Verwendung von Leptin zur Stimulation des Wachstums und der Entwicklung Rezeptor-positiver hämatopoetischer und endothelialer Zellen in vitro und in vivo. Dieser Rezeptor wird außerdem selektiv in hämatopoetischen Progenitorzellen mit langfristigem Repopulationspotenzial exprimiert. Folglich können spezifisch an diesen Rezeptor bindende Mittel zur Identifikation und Isolation von Progenitorzellen für viele verschiedene klinische Applikationen verwendet werden.

2. HINTERGRUND DER ERFINDUNG**2.1. HÄMATOPOETIN-REZEPTOR-GENFAMILIE**

[0002] Eine Reihe verschiedenster Krankheiten, einschließlich Malignitäten und Immundefizienz, stehen zu einer Malfunktion im lymphohämatopoetischen System in Beziehung. Einige dieser Erkrankungen könnten durch Repopulation des hämatopoetischen Systems mit Progenitorzellen, die wenn sie zur Differenzierung getriggert werden, der Defizienz des Patienten begegnen würden, gelindert und/oder geheilt werden. Folglich ist die Fähigkeit zur Initiation und Regulation der Hämatopoese von großer Wichtigkeit (McCune et al., 1988, Science 241: 1632).

[0003] Es wurde gezeigt, dass der Vorgang der Blutzellbildung, durch den eine kleine Anzahl sich selbst erneuernder Stammzellen Anlass zu Zellreihen-spezifischen Progenitorzellen geben, die anschließend zur Produktion der muren zirkulierenden Blutzellen der Proliferation und Differenzierung unterliegen, mindestens teilweise von spezifischen Hormonen reguliert wird. Diese Hormone sind kollektiv als hämatopoetische Wachstumsfaktoren oder Cytokine bekannt (Metcalf 1985, Science 229:16; Dexter, 1987, J. Cell Sci. 88:1; Golde and Gasson, 1988, Scientific American, Juli 62; Tabbara und Robinson, 1991, Anti-Cancer Res. 11:81; Ogawa, 1989, Environ. Health Presp. 80: 199; Dexter, 1989, Bi-. Med. Bull. 45:337).

[0004] Mit dem Aufkommen der rekombinanten DNA-Technologie wurden die Gene, die für eine Anzahl dieser Moleküle kodieren, nunmehr molekular kloniert und in rekombinanter Form exprimiert (Souza et al., 1986, Science 232: 61; Gough et al., 1984, Nature 309: 763; Yokota et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 1070; Kawasaki et al., 1985, Science 230: 291). Diese Cytokine wurden auf ihre Struktur, Biologie und selbst ihr therapeutisches Potenzial untersucht. Einige der am besten charakterisierten Faktoren schließen das Erythropoetin (EPO), den Stammzellofaktor (SCF) oder Steel-Faktor, den Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktor (GM-CSF), den Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktor (M-CSF), Granulozyten-Kolonie-stimulierenden Faktor (G-CSF), die Interleukine (IL-1 bis IL-15) und das Thrombopoetin (TPO) ein.

[0005] Diese Cytokine wirken auf verschiedene Zelltypen auf verschiedenen Stufen während der Entwicklung der Blutzellen, und ihre potenziellen Verwendungszwecke in der Medizin sind weitreichend und schließen Bluttransfusionen, Knochenmarktransplantationen, die Besserung immunsuppressiver Erkrankungen, Krebstherapie, Wundheilung und die Aktivierung der Immunantwort ein (Golde und Gasson, 1988, Scientific American, Juli: 62).

[0006] Außer der Induktion von Proliferation und Differenzierung der hämatopoetischen Progenitorzellen wurde auch gezeigt, dass solche Cytokine eine Anzahl an Funktionen der muren Blutzellen (Stanley et al., 1976, J. Exp. Med 143: 631; Schrader et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 323; Moore et al., 1980, J Immunol. 125: 1302; Kurland et al., 1979, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 2326; Handman und Burgess, 1979, J. Immunol. 122:1134; Vadas et al., 1983, Blood 61: 1232; Vadas et al., 1983, J. Immunol. 130: 795), einschließlich der Beeinflussung der Migration murer hämatopoetischer Zellen aktivieren (Weibart et al., 1986, J. Immunol. 137: 3584).

[0007] Cytokine üben ihre Wirkungen auf Targetzellen durch Bindung an spezifische Zelloberflächenrezeptoren aus. Eine Anzahl an Cytokin-Rezeptoren wurden identifiziert und die Gene, die für sie kodieren, molekular kloniert. Mehrere Cytokin-Rezeptoren wurden in letzter Zeit in eine Hämatopoetin-Rezeptor-Superfamilie (HR-Superfamilie) klassifiziert. Die Gruppierung dieser Rezeptoren wurde auf die Umwandlung wichtiger Aminosäuremotive in den extrazellulären Domänen basiert (Bazan, 1990, Immunology Today 11: 350). Die HR-Fa-

milie ist durch drei konservierte Motive in der extrazellulären Domäne seiner Mitglieder definiert. Das erste stellt ein Trp-Ser-X-Tip-Ser-(WSXWS-Box)-Motiv dar, das hoch konserviert ist und sich Amino-terminal an der Transmembrandomäne befindet. Die meisten Mitglieder der HR-Familie enthalten dieses Motiv. Das zweite besteht aus vier konservierten Cysteinresten, die in der Amino-terminalen Hälfte der extrazellulären Region lokalisiert sind. Das dritte besteht darin, dass sowohl die konservierten Cysteine als auch die WSXWS-Box in zwei getrennten konservierten Domänen des Fibronectins Typ III (FN III) gefunden werden. Die Mitglieder der HR-Familie schließen Rezeptoren für Liganden, wie zum Beispiel EPO, G-CSF (Fukunaga, 1990, Cell 61: 341), GM-CSF, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-2 (β -Untereinheit), IL-12, IL-13, IL-15 und LIF (Cosman, 1990, TIBS 15: 265) ein.

[0008] Liganden für die HR sind kritisch an der Proliferation, Maturation und Differenzierung von Blutzellen beteiligt. So fördert zum Beispiel IL-3 die Proliferation von frühen „multilineage“ pluripotenten Stammzellen und synergisiert mit EPO zur Bildung roter Blutzellen. IL-6 und IL-3 synergieren zur Induktion der Proliferation von frühen hämatopoetischen Präkursoren. Es wurde gezeigt, dass GM-CSF die Proliferation von Granulozyten ebenso wie die Steigerung der Makrophagenfunktion induziert. IL-7 stellt ein sich vom Knochenmark herleitetes Cytokin dar, das bei der Bildung immaturer T- und B-Lymphozyten eine Rolle spielt. IL-4 induziert die Proliferation von Antigen-geprägten B-Zellen und Antigen-spezifischen T-Zellen. Folglich sind Mitglieder dieser Rezeptor-Superfamilie an der Regulation des hämatopoetischen Systems beteiligt.

2.2. DAS OBESE-GEN, -GENPRODUKT UND SEIN REZEPTOR

[0009] Zur Untersuchung des molekularen Mechanismus der Gewichtsregulation klonierten Zhang et al. (1994, Nature 372: 425–432) das murine obese-(ob)-Gen aus ob/ob-Mäusen, die eine einzelne in einem adipösen Phänotyp resultierende Nukleotidmutation enthalten. Wenn ein isoliertes Genfragment als Sonde verwendet wurde, konnte anhand der Northern-Blot-Analyse gezeigt werden, dass es mit RNA nur in weißem Fettgewebe, aber nicht mit der RNA in jedweden anderen Gewebe hybridisierte. Außerdem hybridisierte die Kodierungssequenz des ob-Gens an alle getesteten genomischen DNAs von Vertebraten, was auf eine hochgradige Konservierung dieses Moleküls unter Vertebraten hindeutet. Die deduzierten Aminosäuresequenzen sind zwischen Mensch und Maus zu 84 % identisch, und beide Moleküle enthalten Merkmale von sezernierten Proteinen.

[0010] Bei der Bemühung um das Verständnis der physiologischen Funktion des ob-Gens produzierten mehrere unabhängige Forschergruppen das rekombinante ob-Genprodukt in Bakterien zum in-vivo-Testen (Pelleymounter et al., 1995, Science 269: 540–543; Halaas et al., 1995, Science 269: 543–546; Campfield et al., 1995, Science 269: 546–549). Wenn das OB-Protein (auch als Leptin bekannt) in stark adipöse Mäuse injiziert wurde, die zwei Mutantenkopien des ob-Gens besaßen, zeigte sich bei den Mäusen ein reduzierter Appetit, und sie begannen, Gewicht zu verlieren. Noch wichtiger, Campfield et al. (1995, Science 269: 546–549) injizierten Leptin direkt in den lateralen Ventrikel und beobachteten, dass die Tiere ihre Futteraufnahme reduzierten, was darauf hinweist, dass Leptin auf die zentralen neuronalen Netzwerke zur Regulation des Fressverhaltens und des Energieaufwands wirkt. Dieses Ergebnis stellte zudem den Beleg bereit, dass auf Leptin ansprechende Zellen im Gehirn anwesend sein könnten.

[0011] Vor kurzem wurde ein Leptin-Fusionsprotein generiert und zum Screening nach einem Leptin-Rezeptor (OB-R) in einer cDNA-Expressionsbibliothek verwendet, die aus dem Plexus choroideus der Maus präpariert wurde, einem Gewebe, das die Hirnhöhlen, die als Ventrikel bezeichnet werden, auskleidet (Tartaglia et al., 1995, Cell 83: 1263–1271). Dieser Ansatz führte zum Klonieren einer Form der OB-R-Kodierungssequenz, die einen einzelnen „Membrane-spanning“-Rezeptor aufdeckte, der sich strukturelle Ähnlichkeiten mit mehreren Cytokin-Rezeptoren der Klasse I, wie zum Beispiel der gp130-Signal-transduzierenden Komponente des IL-6-Rezeptors (Taga et al., 1989, Cell 58: 573–581), dem G-CSF-Rezeptor (Fukunaga et al., 1990, Cell 61: 341–350) und dem Leukämie-Inhibitionsfaktor-Rezeptor (Gearing et al., 1991, EMBO J. 10: 2839–2848) teilte. Die Northern-Blot-Analyse und reverse Transkriptions-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) weisen darauf hin, dass die OB-R-mRNA in mehreren Geweben, einschließlich der Lunge, Niere, dem Gehirn und Hypothalamus insgesamt, exprimiert wird, es lag jedoch kein Bericht über die Expression von OB-R in hämatopoetischen Geweben vor.

[0012] Der von Tartaglia, et al. isolierte murine OB-R enthält im Vergleich zu anderen Cytokin-Rezeptoren der Klasse I eine relativ kurze intrazelluläre cytoplasmatische Domäne. Als anschließend sein humanes Homolog aus einer humanen Säuglings-Gehirnbibliothek isoliert wurde, enthielt seine vorausgesagte Proteinsequenz eine viel längere intrazelluläre Domäne. In Anbetracht dieses Befundes wurden Vermutungen angestellt, dass gegebenenfalls verschiedene Formen des Rezeptors existieren könnten (Barinaga, 1996, Science 271: 29).

Es sind jedoch vor dieser erfinderischen Tätigkeit keine alternativen Formen des OB-R identifiziert worden.

3. ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0013] Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Verfahren zur Verwendung von Hu-B1.219-Varianten (einschließlich OB-R) als Marker für die Identifikation und Isolation von Progenitorzellen in den hämatopoetischen und endothelialen Zellreihen und Verfahren zur Verwendung des ob-Gens und seines Genprodukts, Leptin, zur Stimulation von hämatopoetischem/r und endotheliale/r Wachstum und Entwicklung.

[0014] Die Erfindung basiert teilweise auf der Entdeckung der Anmelder von drei Formen eines neuen Mitglieds der HR-Familie, das als Hu-B1.219 bezeichnet wird, die aus einer cDNA-Bibliothek der humanen fetalen Leber isoliert wurden. Der Sequenzvergleich dieser Moleküle mit einer humanen OB-R-Sequenz (Tartaglia et al., 1995, Cell 83:1263–1271) zeigt, dass sie in ihren extrazellulären Domänen nahezu identisch sind. Deshalb stellen diese vier Moleküle variante Formen des Rezeptors dar, die auf Leptin als einen Liganden ansprechen. Während sich die drei hierin beschriebenen Isoformen von dem berichteten OB-R-Protein an nur drei Aminosäurepositionen in der extrazellulären Domäne unterscheiden, enthalten alle vier Varianten umfangreiche Unterschiede in ihren intrazellulären Domänen an ihren 3'-Enden. Obwohl diese Rezeptoren an Leptin binden, können sie folglich verschiedene Signale auf die Ligandenbindung transduzieren. Hu-B1.219 wird außerdem in mehreren Zelllinien von hämatopoetischer und endothelialer Herkunft exprimiert. Die Gewebsexpressionsanalyse weist nach, dass die fetale Lunge und Leber auch hohe Spiegel von seiner mRNA enthalten. Humane CD34⁺-Knochenmarkszellen exprimieren überdies Hu-B 1.219. Wenn fetale Leberzellen von der Maus in mehrere Fraktionen aufgetrennt werden, die auf ihrer Expression von AA4.1 und FcR basieren, wird die Expression des Maus-Homologs von Hu-B 1.219 ausschließlich in der AA4.1⁺/FcR⁺-Population nachgewiesen, von der gezeigt wurde, dass sie auf dieser Stufe der fetalen Leberentwicklung die meisten, wenn nicht alle langfristig replizierenden hämatopoetischen Progenitorzellen enthält. Die Knochenmark- und fetalen Leberzellen proliferieren und differenzieren sich überdies als Response auf die Leptinstimulation, indem sie Colony Forming Units-Erythroid (CFU-E), Burst Forming Units-Erythroid (BFU-E) und Granulozyten-Makrophagen-Kolonien (CFU-GM-Kolonien) bilden. Leptin stimuliert insbesondere Zellen der myeloiden Zellreihe zur Entwicklung zu Makrophagen und Neutrophilen. Leptin stimuliert auch frisch isolierte murine Dottersackzellen, um erythroides Wachstum und Makrophagenwachstum zu proliferieren und hervorzurufen. Hu-B 1.219 wird außerdem in einigen endothelialen Zellen und ihren Präkursoren exprimiert, da sie sich aus dem embryonalen Dottersack herleiten. Deshalb stellt Hu-B 1.219 einen Marker für hämatopoetische und endotheliale Progenitorzellen dar, und seine verschiedenen Isoformen verleihen Ansprechbarkeit auf die Leptin-Stimulation.

[0015] Es werden erfindungsgemäß viele verschiedene Verwendungen in Betracht gezogen, einschließlich, aber nicht beschränkt darauf, die Verwendung von Hu-B 1.219-spezifischen Bindungsmitteln zur Identifikation und Isolation hämatopoetischer und endothelialer Progenitorzellen, die Verwendung von Leptin zur Aktivierung solcher Progenitorzellen für die in-vitro- oder ex-vivo-Expansion, die Verwendung von Leptin für die in-vivo-Stimulation der gleichen Zellpopulationen in Patienten mit einer Immundefizienz und Anämie, die Verwendung von Leptin zur Promotion des myeloiden Wachstums und der myeloiden Entwicklung, und die Verwendung von Leptin zur Promotion der Angiogenese und Vaskulogenese ebenso wie die Augmentation des Spenderzell-Engraftments nach einer Knochenmarktransplantation.

4. KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0016] [Fig. 1A–Fig. 1G](#): Nukleotidsequenz und deduzierte Aminosäuresequenz der Form 1 von Hu-B1.219. Das 3'-Ende dieses Moleküls ist mit einer humanen Retrotransposonsequenz zu 98 % identisch.

[0017] [Fig. 2](#): Nukleotidsequenz-Vergleich zwischen Hu-B1.219, Form 1, Form 2 und Form 3 am 3'-Ende.

[0018] [Fig. 3A–Fig. 3F](#): Aminosäure-Vergleich zwischen Hu-B1.219, Formen 1 (HuB1.219-1), 2 (HuB1.219-2), 3 (HuB1.219-3), humanem OB-R (HuOBR) und murinem OB-R (MuOBR).

[0019] [Fig. 4](#): Northern Blots an mehreren Geweben von humanen Erwachsenen werden mit einer sich aus der extrazellulären Domäne von Hu-B 1.219 herleitenden Sonde gemäß den Anleitungen des Herstellers (Clontech, Palo Alto, CA) durchgeführt.

[0020] [Fig. 5A](#) und [Fig. 5B](#): PCR-Analyse der Hu-B 1.219-Expression in humanen CD34⁺- und CD34⁻-Zellen. [Fig. 5A](#) wird mit humanen Hu-B1.219-Primern nachgewiesen, wohingegen [Fig. 5B](#) mit CD34-Primern nachgewiesen wird. BMMNC stellt mononukleäre Knochenmarkszellen als positive Kontrollen dar.

[0021] [Fig. 6A](#) und [Fig. 6B](#): PCR-Analyse der murinen Hu-B 1.219-Expression in fetalen Leber-Subpopulationen von der Maus, die durch Antikörper gegen AA4.1 und FcR getrennt wurden. [Fig. 6A](#) wird mit Hu-B1.219-Primern nachgewiesen, wohingegen [Fig. 6B](#) mit CD34-Primern nachgewiesen wird. NS steht für nicht sortierte Zellen und BM steht für Knochenmarkszellen als Kontrollen.

[0022] [Fig. 7A–F](#): Expression von Hu-B 1.219-Isoformen in hämatopoetischen Geweben: Differenzierung von ES-Zellen (T0–T6) ([Fig. 7A](#) und B); Dotterzellen aus Embryos (T8–T14) ([Fig. 7C](#) und D); und Embryos (T13–T18) aus der fetalen Leber ([Fig. 7E–F](#)). Die Expression wurde mittels RT-PCR nachgewiesen.

[0023] [Fig. 8A](#) und B: Leptin stimuliert den Dottersack ([Fig. 8A](#)) und die Zellproliferation der fetalen Leber ([8B](#)).

[0024] [Fig. 9A–C](#): Leptin induziert die murine fetale Leber zur Bildung myeloider Kolonien in Kolonien-Assays.

[0025] [Fig. 10A–C](#): Leptin induziert murines adultes Knochenmark zur Bildung myeloider Kolonien in Kolonien-Assays.

[0026] [Fig. 11A](#) und B: Leptin induziert sich von Präkursoren herleitende embryoide Körper (EB) zur Bildung von Kolonien. Sich von EB-herleitende Präkursoren (T6) wurden in MeC mit 100 ng/ml Steel-Faktor und 200 ng/ml Leptin replattiert.

[0027] [Fig. 12A](#) und B: Leptin und EPO induzieren CFU-E aus normalem Knochenmark von der Maus, aber nicht aus dem db/db-Knochenmark. Altersabgestimmte Mäuse aus normalen und db/db-Stämmen werden als Mark-Spender für Colony Forming-Erthroid-Assays, enthaltend eine niedrige Serumkonzentration, verwendet.

[0028] [Fig. 13](#): Leptin induziert CFU-E aus humanem Knochenmark in Colony Forming-Assays. Alle Gruppen enthalten Sättigungsspiegel des rekombinanten EPO bei 2 E/ml.

5. AUSFÜHRLICHE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

5.1. EXPRESSION DES OB-R IN HÄMATOPOETISCHEN ZELLEN

[0029] Gegenstand der Erfindung ist ein neuer hämatopoetischer Progenitorzellmarker und seine Verwendung für die Zellidentifikation und -isolation ebenso wie die Verwendung von Leptin zur Stimulation der hämatopoetischen und endothelialen Entwicklung über diesen als Hu-B 1.219 bekannten Rezeptor. In einer spezifischen Ausführungsform in Bezug auf das Beispiel in Abschnitt 6, nachstehend, wurden mehrere Formen dieses Rezeptors kloniert und charakterisiert. Der Aminosäuresequenz-Vergleich dieser verwandten Moleküle mit einer veröffentlichten humanen OB-R-Sequenz (Tartaglia et al., 1995, Cell 83: 1263–1271) geben nur drei Aminosäure-Differenzen in ihren extrazellulären Domänen, aber eine umfangreiche Diversität in ihren cytoplasmatischen Domänen zu erkennen. [Fig. 1A–Fig. 1G](#) zeigt spezifischer, dass in den hierin beschriebenen Hu-B1.219-Molekülen Nukleotidreste Nr. 349–351 für Alanin kodieren, Nukleotidreste Nr. 421–423 für Arginin kodieren und Nukleotidreste Nr. 763–765 für Arginin kodieren. Die vier Formen divergieren außerdem sowohl hinsichtlich der Länge als auch der Sequenz-Zusammensetzung vom Nukleotidrest Nr. 2771 und darüber hinaus. In dieser Hinsicht ist die hierin beschriebene cytoplasmatische Domäne der Form 1 von Hu-B 1.219 hoch homolog zu einer Retrotransposon-Sequenz (Ono et al., 1987, Nucl. Acid. Res. 15: 8725–8737).

[0030] Die Analyse der Hu-B1.219-Varianten geben eine signifikante Homologie zur Domäne FN III der HR-Familie zu erkennen, was darauf hindeutet, dass sie zur HR-Familie der Rezeptoren gehören. Die Northern-Blot-Hybridisierung und RT-PCR-Analysen deuten darauf hin, dass Hu-B 1.219-mRNA in Zellen von hämatopoetischer und endothelialer Herkunft stark exprimiert werden. Außerdem wird die Hu-B 1.219-Sequenz in bestimmten fetalen Geweben und Tumorzelllinien exprimiert. Daher wird Hu-B 1.219 (oder OB-R), außer seiner Expression im Gehirn zur Gewichtsregulation mittels Leptin, durch hämatopoetische und endotheliale Zellen exprimiert, wodurch diese Zellen auf die Wirkung von Leptin ansprechbar gemacht werden.

[0031] Da zusätzliche variante Formen des Moleküls existieren können, können sie durch markierte DNA-Sonden identifiziert werden, die aus Nukleinsäurefragmenten, die jedwedem Anteil der hierin offenbarten cDNA in einer cDNA-Bibliothek entsprechen, die aus humaner fetaler Leber, humaner Lunge, humaner Niere, dem humanen Plexus choroideus, humanem Hypothalamus, humaner Prostata und humanem Ovar präpariert wurden. Oligonukleotide, die spezifischer entweder dem 5'- oder 3'-Terminus der cDNA-Sequenz entsprechen,

können zum Erhalt längerer Nukleotidsequenzen verwendet werden. Um es kurz zu sagen, die Bibliothek kann zur Ausbeute von maximal 30 000 pfu für jede 150-mm-Platte ausplattiert werden. Es können ca. 40 Platten gescreent werden. Die Platten werden bei 37 °C inkubiert, bis die Plaques einen Durchmesser von 0,25 mm erreichen oder gerade beginnen, Kontakt miteinander zu machen (3–8 Stunden). Auf die weiche Oberseite der Agarose werden Nylonfilter platziert, und nach 60 Sekunden werden die Filter abgezogen und auf einer DNA-Denaturierungslösung, bestehend aus 0,4 N Natriumhydroxid, schwimmen lassen. Die Filter werden dann in Neutralisationslösung, bestehend aus 1 M Tris-Cl, pH 7,5, eingetaucht, bevor sie lufttrocknen dürfen. Die Filter werden in Casein-Hybridisierungspuffer, enthaltend 10 % Dextransulfat, 0,5 M NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 0,1 % Natriumpyrophosphat, 1 % Casein, 1 % SD und denaturierte DNA aus Lachsspermata zu 0,5 mg/ml 6 Stunden bei 60 °C prähybridisiert. Die radiomarkierte Sonde wird dann 2 Minuten bei 95 °C denaturiert und dann der Prähybridisierungslösung, enthaltend die Filter, zugefügt. Die Filter werden 16 Stunden bei 60 °C hybridisiert. Die Filter werden dann in 1X Waschmischung (10X Waschmischung enthält 3 M NaCl, 0,6 M Tris-Base und 0,02 M EDTA) zweimal jeweils 5 Minuten bei Raumtemperatur, dann in 1X Waschmischung, enthaltend 1 % SDS 30 Minuten bei 60 °C und schließlich in 0,3X Waschmischung, enthaltend 0,1 % SDS, 30 Minuten bei 60 °C, gewaschen. Die Filter werden dann luftgetrocknet und einem Röntgenfilm zur Autoradiographie ausgesetzt. Nach dem Entwickeln wird der Film zum Auswählen einer positiven Plaque mit den Filtern abgestimmt. Wenn eine einzelne, isolierte positive Plaque nicht erhalten werden kann, wird der Agar-Pfropfen, enthaltend die Plaques, entfernt und in einen λ -Verdünnungspuffer, enthaltend 0,1 M NaCl, 0,01 M Magnesiumsulfat, 0,035 M Tris-HCl, pH 7,5, 0,01 % Gelatine, gegeben.

[0032] Der Phage kann dann zum Erhalt von einzelnen, gut isolierten positiven Plaques replattiert und erneut gescreent werden. Positive Plaques können isoliert werden und die cDNA-Klone unter Verwendung von Primern, basierend auf der bekannten cDNA-Sequenz, sequenziert werden. Dieser Schritt kann wiederholt werden, bis eine cDNA der vollen Länge erhalten wird.

[0033] Ein Verfahren zur Identifikation aller 3'-Isoformen besteht darin, die 3'-Enden der varianten cDNA aus vielen verschiedenen Geweben, einschließlich, aber nicht beschränkt darauf, dem Plexus choroideus, dem Hypothalamus, der fetalen Leber, dem Knochenmark, dem Ovar oder der Prostata anhand der PCR zu amplifizieren. Zum Erhalt des 3'-Endes der cDNA wird ein Oligo-dT-Prüfer zum Synthetisieren des cDNA-Erststranges verwendet. Hu-B 1.219-spezifische Primer aus der konservierten Region des Gens (z. B. oberstromig vom Nukleotid 2770) und Oligo-dT werden dann zum Amplifizieren des 3'-Endes verwendet. Die PCR-Fragmente werden mittels Standardverfahren kloniert und sequenziert. Nach Erhalt können diese Sequenzen in die Aminosäuresequenz translatiert und auf bestimmte Landmarks, wie zum Beispiel kontinuierliche offene Leserahmen, Regulationsregionen, die mit der Tyrosinkinase-Aktivierung assoziiert sind und schließlich auf eine strukturelle Ähnlichkeit mit bekannten Varianten untersucht werden.

5.2. Hu-B 1.219 ALS EIN PROGENITORZELLMARKER

[0034] Hu-B 1.219 wird in Zellen von hämatopoetischer und endothelialer Herkunft exprimiert. In einer spezifischen Ausführungsform in Bezug auf das Beispiel in Abschnitt 7, nachstehend, wird Hu-B 1.219 in frühe Progenitorzellen und in einen kleinen Prozentsatz von Progenitoren mit langzeitigem Repopulationspotenzial exprimiert. Um den Hu-B 1.219-Rezeptor als einen Marker zur Zellidentifikation und Isolation zu nutzen, können spezifische Bindungsmittel, wie zum Beispiel Antikörper gegen das Protein, generiert werden.

5.2.1. BILDUNG VON ANTIKÖRPERN

[0035] Verschiedene im Stand der Technik bekannte Verfahren können zur Bildung von Antikörpern gegen Epitope des natürlichen oder rekombinanten Hu-B 1.219-Rezeptors verwendet werden. Solche Antikörper schließen polyklonale, monoklonale, chimäre, einkettige, Fab-Fragmente und Fragmente, die durch eine Fab-Expressionsbibliothek produziert werden, ein, sind aber nicht darauf beschränkt. Neutralisierende Antikörper, d. h. diejenigen, die um die Liganden-Bindungsstelle des Rezeptors konkurrieren, sind für Diagnostika und Therapeutika besonders bevorzugt.

[0036] Monoklonale Antikörper, die Hu-B 1.219 binden, können radioaktiv markiert sein, wodurch erlaubt wird, dass man ihre Lokalisierung und Verteilung im Körper nach der Injektion verfolgen kann. Mit einem Radioisotop getaggte Antikörper können als ein nicht invasives diagnostisches Werkzeug zur Bildgebung fetaler Gewebe verwendet werden.

[0037] Es können auch Immuntoxine konzipiert werden, die cytotoxische Mittel an spezifischen Stellen im Körper targetieren. So können zum Beispiel hochaffine, Hu-B 1.219-spezifische monoklonale Antikörper kova-

lent an Bakterien- oder Pflanzentoxine, wie zum Beispiel das Diphtherie-Toxin oder Ricin, komplexiert werden. Ein allgemeines Herstellungsverfahren von Antikörper-/Hybridmolekülen kann die Verwendung von Thiol-Vernetzungsreagenzien, wie zum Beispiel SPDP beinhalten, die die primären Aminogruppen am Antikörper angreifen, und durch Disulfidaustausch, das Toxin an den Antikörper binden.

[0038] Die Hybrid-Antikörper können verwendet werden, um die Hu-B1.219-exprimierenden Tumorzellen spezifisch zu eliminieren.

[0039] Für die Bildung von Antikörpern können verschiedene Wirtstiere durch Injektion mit dem Hu-B 1.219-Protein, Fragmenten davon, synthetischen Peptiden, einschließlich, aber nicht beschränkt darauf, Kaninchen, Mäuse, Ratten, Hamster usw., immunisiert werden. Verschiedene Adjuvanzien können zur Erhöhung des immunologischen Response, abhängig von den Wirtsspezies, einschließlich, aber nicht beschränkt auf Freund's (komplette und inkomplette) Mineralgele, wie zum Beispiel Aluminiumhydroxid, oberflächenaktive Substanzen, wie zum Beispiel Lysolecithin, Pluronic-Polyole, Polyanionen, Peptide, Ölemulsionen, Keyhole-Limpet-Hämocyanin, Dinitrophenol und potenziell nützliche humane Adjuvanzien, wie zum Beispiel BCG (Bacillus-Calmette-Guerin) und Corynebacterium parvum verwendet werden. Monoklonale Antikörper gegen Hu-B1.219 können unter Verwendung von jedwedem Verfahren hergestellt werden, mit dem man die Herstellung der Antikörper-moleküle durch kontinuierliche Zelllinien in Kultur erzielen kann. Diese schließen das ursprünglich von Kohler und Milstein, (Nature, 1975, 256: 495–497) beschriebene Hybridom-Verfahren, das humane B-Zell-Hybridom-Verfahren (Kosbor et al., 1983, Immunology Today, 4: 72; Cote et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80: 2026–2030) und das EBV-Hybridom-Verfahren (Cole et al., 1985, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., S. 77–96) ein, sind aber nicht darauf beschränkt. Außerdem können Verfahren, die für die Herstellung von „chimären Antikörpern“ (Morrison et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851–6855; Neuberger et al., 1984, Nature 312: 604–608; Takeda et al., 1985, Nature 314: 452–454) durch Spleißen der Gene aus einem murinen Antikörpermolekül von geeigneter Antigen-Spezifität zusammen mit Genen aus einem humanen Antikörpermolekül von geeigneter biologischer Aktivität entwickelt wurden, verwendet werden. Als Alternative können Verfahren, die für die Produktion von einkettigen Antikörpern (US-Patent 4,946,778) beschrieben wurden, zum Produzieren von Hu-B1.219-spezifischen einkettigen Antikörpern angepasst werden.

[0040] Antikörper-Fragmente, die spezifische Bindungsstellen von Hu-B 1.219 enthalten, können durch bekannte Verfahren herbeigeführt werden. So schließen solche Fragmente zum Beispiel die $F(ab')_2$ -Fragmente ein, die durch Pepsinverdauung des Antikörpermoleküls und die Fab-Fragmente, die durch Reduktion der Disulfidbrücken der $F(ab')_2$ -Fragmente generiert werden können, ein, sind aber nicht darauf beschränkt. Als Alternative können die Fab-Expressionsbibliotheken konstruiert werden (Huse et al., 1989, Science 246: 1275–1281), um eine schnelle und leichte Identifikation von monoklonalen Fab-Fragmenten mit der gewünschten Spezifität für Hu-B 1.219 zu ermöglichen.

5.2.2. PROGENITORZELLTRENNUNG

[0041] Humane hämatopoetische Progenitorzellen können unter Verwendung eines Antikörpers gegen Hu-B1.219-Protein, eines Leptin-Liganden, eines Leptin-Peptids, das die Rezeptor-bindende Domäne enthält, oder eines Leptin-Fusionsproteins unter Verwendung von im Stand der Technik weithin bekannter üblicher Zelltrennungsv erfahren isoliert werden. Solche Hu-B1219-spezifischen Bindungsmittel können in Kombination mit anderen Mitteln, wie zum Beispiel Anti-CD34-Antikörpern verwendet werden.

[0042] Obwohl es sich beim Knochenmark um die bevorzugte Zellquelle handelt, können andere physiologische Quellen hämatopoetischer Zellen, wie zum Beispiel die Milz, der Thymus, peripheres Blut, Cytokin-mobilisiertes Blut, Nabelschnurblut, der embryonale Dottersack oder die fetale Leber, genutzt werden. Das Knochenmark wird bevorzugt aus dem Darmbeinkamm entnommen, es kann aber auch aus einer anderen Knochenkavität gewonnen werden. Das Knochenmark kann aus einer Knochenkavität mittels dem Fachmann bekannten verschiedenen Verfahren, einschließlich Flushing des Knochens mit einem Gemisch aus physiologischen Medien, ausgeglichener Salzlösung, physiologischen Puffern und anderen natürlich vorkommenden Faktoren entfernt werden. In der Regel wird das Knochenmark filtriert, zentrifugiert und resuspendiert.

[0043] Sobald eine Quelle hämatopoetischer Zellen erhalten ist, können die hämatopoetischen Progenitorzellen aus dem Zellgemisch mittels verschiedener Verfahren, die sich ein Mittel zunutze machen, wie zum Beispiel einen spezifischen Antikörper oder einen Leptin-Liganden, der spezifisch an die Zelloberfläche von Hu-B1.219-kodiertem Rezeptor-Protein bindet, abgetrennt werden. Diese Verfahren können zum Beispiel die Flowcytometrie unter Verwendung eines Fluorescence-Activated-Cell-Sorters (FACS) und spezifischer Fluoro-

chrome, Biotin-Avidin- oder Biotin-Streptavidin-Trennungen unter Verwendung von Biotin, konjugiert an die Zelloberflächenmarker-spezifischen Antikörper und Avidin oder Streptavidin, gebunden an einen festen Träger, wie zum Beispiel eine Affinitätsäulenmatrix oder Kunststoffoberflächen, magnetische Trennungen unter Verwendung von Antikörper-beschichteten magnetischen Perlen, destruktive Trennungen, wie zum Beispiel Antikörper und Komplement oder an Cytotoxine oder radioaktive Isotopen gebundene Antikörper einschließen.

[0044] Die Trennung eines Zellgemischs über Antikörper können mittels negativer oder positiver Selektionsverfahren durchgeführt werden. Bei der negativen Trennung werden Antikörper verwendet, die für Marker spezifisch sind, die an unerwünschten hämatopoetischen Zellen vorhanden sind. Durch einen Antikörper gebundene Zellen können entfernt oder lysiert und das zurückbleibende erwünschte Gemisch zurückbehalten werden. Bei der positiven Trennung können Antikörper, die für Hu-B1.219, oder einen Leptin-Liganden spezifisch sind, verwendet werden. Die durch den Antikörper oder das Leptin gebundenen Zellen werden getrennt und zurückbehalten. Es ist zur Kenntnis zu nehmen, dass positive und negative Trennungen im Wesentlichen simultan oder auf eine sequenzielle Weise verwendet werden können. Es wird auch zur Kenntnis genommen werden, dass erfindungsgemäß jedwedes Trennungsverfahren, das basierend auf der Expression von Hu-B 1.219, wie hierin beschrieben, Zellen isolieren kann, eingeschlossen ist. So kann zum Beispiel ein Zellgemisch zuerst in CD34⁺- und CD34⁻-Fraktionen, gefolgt von einer Hu-B1.219-spezifischen Trennung getrennt werden.

[0045] Derzeit ist die Verwendung der Flowcytometrie, wie zum Beispiel mithilfe eines FACS, das häufigste Verfahren für die auf Antikörpern basierende Trennung. Die Trennung mittels Flowcytometrie wird in der Regel wie folgt durchgeführt. Das suspendierte Gemisch aus hämatopoetischen Zellen wird zentrifugiert und in Medium resuspendiert. Zur Ermöglichung der Bindung der Antikörper an spezifische Zelloberflächenmarker werden an Fluorchrom konjugierte Antikörper zugefügt. Dann wird das Zellgemisch durch einen oder mehr Zentrifugations- und Resuspensionsschritt(e) gewaschen. Das Gemisch wird durch FACS laufen lassen, das die auf verschiedenen Fluoreszenzcharakteristika basierenden Zellen trennt. Die FACS-Systeme sind in verschiedenen Leistungs- und Fähigkeitsgraden, einschließlich Mehrfarbanalyse erhältlich. Die Zellen können anhand eines charakteristischen Profils von Vorwärts- und Seitenstreuung, die durch Größe und Granularität, ebenso wie durch positive und/oder negative Expression bestimmter Zelloberflächenmarker beeinflusst wird, identifiziert werden.

[0046] Andere Trennungsverfahren neben der Flowcytometrie können schnellere Trennungen bereitstellen. Bei einem solchen Verfahren handelt es sich um die auf Biotin-Avidin basierende Trennung mittels der Affinitätschromatographie. In der Regel wird ein derartiges Verfahren durch Inkubation der gewaschenen hämatopoetischen Zellen mit Biotip-gekoppeltem Leptin oder Antikörpern gegen spezifische Marker, gefolgt von der Passage durch eine Avidin-Säule durchgeführt. Biotip-Antikörper-Zell- oder Biotip-Leptin-Zell-Komplexe binden über die Biotip-Avidin-Interaktion an die Säule, während andere Zellen durch die Säule hindurchpassieren. Letztendlich können die Säulen-gebundenen Zellen durch Perturbations- oder andere Verfahren freigesetzt werden. Die Spezifität des Biotip-Avidin-Systems ist für eine schnelle, positive Trennung gut geeignet.

[0047] Die Flowcytometrie und Biotip-Avidin-Verfahren stellen ein hochspezifisches Zelltrennungsmittel bereit. Gegebenenfalls kann eine Trennung durch weniger spezifische Verfahren initiiert werden, die jedoch einen großen Anteil maturer Blutzellen aus der hämatopoetischen Zellquelle entfernen können. So können zum Beispiel zur initialen Entfernung differenzierter hämatopoetischer Zellpopulationen, einschließlich T-Zellen, B-Zellen, natürlicher Killerzellen (NK) und Makrophagen ebenso wie unbedeutendere Zellpopulationen, einschließlich Megakaryozyten, Mastzellen, Eosinophilen und Basophilen, Trennungen mit magnetischen Perlen verwendet werden. Es können gegebenenfalls mindestens ca. 70 % und gewöhnlich mindestens ca. 80 % der vorliegenden hämatopoetischen Zellen insgesamt entfernt werden.

[0048] Ein bevorzugtes initiales Trennungsverfahren stellt die Dichtegradiententrennung bereit. Hier wird das Knochenmark oder eine andere Präparation eines hämatopoetischen Zellgemischs zentrifugiert und der Überstand entfernt. Die Zellen werden zum Beispiel in RPMI 1640-Medium (Gibco) mit 10 % FCS resuspendiert und in einen Dichtegradienten gegeben, der zum Beispiel mit „FICOLL“- oder „PERCOLL“- oder „EUROCOLLINS“-Medium hergestellt wird. Die Trennung kann dann durch Zentrifugation oder automatisch mit einem Cobel & Cell Separator '2991 (Cobev, Lakewood, Colorado) durchgeführt werden. Zusätzliche Trennungsverfahren können abhängig von der Quelle des hämatopoetischen Zellgemischs und seines Inhalts gegebenenfalls erwünscht sein. Wenn zum Beispiel Blut als eine Quelle von hämatopoetischen Zellen verwendet wird, könnte es gegebenenfalls angebracht sein, die roten Blutzellen vor der Trennung jedweder Fraktion zu lysieren. Elutrierung könnte überdies auch allein oder in Kombination mit allen anderen hierin beschriebenen Reinigungsverfahren verwendet werden (Noga et al., 1990, Prog. Clin. Biol. Res. 333: 345; Noga et al., 1992, Prog. Clin. Biol.

5.3. DAS OBESE-GENPRODUKT, LEPTIN

[0049] Die Nukleotid- und Aminosäuresequenzen von humanem wie auch murinem Leptin wurden vor kurzem von Zhang et al. (1994, Nature 372: 425–432) veröffentlicht. Demzufolge wurde die Kodierungssequenz von der Maus zur Expression von funktionellem Leptin in *E. coli* (Pelleymounter et al., 1995, Science 269: 540–543; Halaas et al., 1995, Science 269: 543–546; Campfield et al., 1995, Science 269: 546–549) verwendet. Überdies wurde auch humanes Leptin exprimiert, und es wurde gezeigt, dass es in murinen Experimenten biologisch aktiv ist (Halaas et al., 1995, Science 269: 543–546). Folglich können humane, murine und homologe Kodierungssequenzen aus anderen Spezies exprimiert und das rekombinante Protein durch übliche Verfahren, wie zum Beispiel die Affinitätschromatographie mit einem Antikörper gereinigt werden. Als Alternative kann natürliches Protein aus Leptin sezernierenden Zellen, wie zum Beispiel Fettzelllinien, direkt gereinigt werden.

5.3.1. EXPRESSION VON LEPTINPROTEIN

[0050] Für die erfindungsgemäße praktische Ausführung können zur Herbeiführung rekombinanter DNA-Moleküle, die ihre Expression in geeignete Wirtszellen richten, humane und murine Leptin-Polynukleotidsequenzen, die für die Proteine, Peptidfragmente, Fusionsproteine oder funktionellen Äquivalente davon kodieren, verwendet werden.

[0051] Aufgrund der inhärenten Degeneriertheit des genetischen Codes können andere DNA-Sequenzen, welche im Wesentlichen für die gleiche oder eine funktionelle äquivalente Aminosäuresequenz kodieren, bei der erfindungsgemäßen praktischen Ausführung zum Klonieren und zur Expression des Leptin-Proteins verwendet werden. Solche DNA-Sequenzen schließen insbesondere die ein, die zum Hybridisieren unter stringenten Bedingungen an die humanen Leptin-Sequenzen fähig sind.

[0052] Veränderte DNA-Sequenzen, die erfindungsgemäß verwendet werden können, schließen Deletionen, Additionen oder Substitutionen von verschiedenen Nukleotidresten ein, die in einer Sequenz resultieren, die für das gleiche oder ein funktionell äquivalentes Genprodukt kodiert. Das Genprodukt selbst kann Deletionen, Additionen oder Substitutionen von Aminosäureresten in einer Kodierungssequenz enthalten, die zu einer stummen Veränderung führen, wobei folglich ein funktionell äquivalentes Leptinprotein produziert wird. Solche Aminosäure-Substitutionen können auf der Basis der Ähnlichkeit hinsichtlich der Polarität, Ladung, Löslichkeit, Hydrophobizität, Hydrophilität und/oder der amphipathischen Natur der beteiligten Reste vorgenommen werden. So können zum Beispiel negativ geladene Aminosäuren Asparaginsäure und Glutaminsäure einschließen; positiv geladene Aminosäuren Lysin, Histidin und Arginin einschließen; Aminosäuren mit ungeladenen polaren Kopfgruppen mit ähnlichen Hydrophilitätswerten die folgenden einschließen: Glycin, Asparagin, Glutamin, Serin, Threonin, Tyrosin; und Aminosäuren mit nicht polaren Kopfgruppen Alanin, Valin, Isoleucin, Leucin, Phenylalanine, Prolin, Methionin und Tryptophan.

[0053] Die DNA-Sequenzen von Leptin können manipuliert werden, um die Kodierungssequenz für viele verschiedene Enden, einschließlich, aber nicht beschränkt auf Veränderungen, welche das Processing und die Expression des Genprodukts modifizieren, zu verändern. So können zum Beispiel unter Verwendung von im Stand der Technik überall bekannter Verfahren Mutationen, wie z. B. ortsgerichtete Mutagenese, zum Insertieren neuer Restriktionsstellen, zur Veränderung der Glycosylierungsmuster, Phosphorylierung usw., eingeführt werden.

[0054] In einer anderen erfindungsgemäßen Ausführungsform kann ein Leptin oder eine modifizierte Leptinsequenz an eine heterologe Sequenz zum Kodieren für ein Fusionsprotein ligiert werden. Die Kodierung eines chimären Leptinproteins, das ein heterologes Epitop exprimiert, das von einem gewerblich erhältlichen Antikörper erkannt wird, kann auch nützlich sein. Ein Fusionsprotein kann auch manipuliert werden, damit es eine sich zwischen einer Leptinsequenz und der heterologen Proteinsequenz befindende Spaltstelle enthält, so dass das Leptinprotein von der heterologen Komponente abgespalten werden kann.

[0055] In einer anderen erfindungsgemäßen Ausführungsform könnte die Kodierungssequenz von Leptin unter Verwendung von im Stand der Technik üblicher chemischer Verfahren vollkommen oder teilweise synthetisiert werden. Siehe zum Beispiel Caruthers et al., 1980, Nuc. Acids Res. Symp. Ser. 7: 215–233; Crea und Horn, 180, Nuc. Acids Res. 9(10): 2331; Matteucci and Caruthers, 1980, Tetrahedron Letters 21: 719; and Chow and Kempe, 1981, Nuc. Acids Res. 9 (12): 2807–2817. Als Alternative konnte das Protein selbst unter

Verwendung chemischer Verfahren zum Synthetisieren der Leptin-Aminosäuresequenz vollkommen oder teilweise hergestellt werden. So können zum Beispiel Peptide durch Festphasenverfahren synthetisiert, aus dem Harz gespalten und anhand der präparativen Hochleistungsflüssigkeitschromatographie gereinigt werden, (siehe z. B. Creighton, 1983, *Proteins Structures And Molecular Principles*, W. H. Freeman and Co., N.Y. S. 50–60). Die Zusammensetzung der synthetischen Peptide können mithilfe der Aminosäureanalyse oder des -sequenzierens (z. B. des Edman-Abbauverfahren; siehe Creighton, 1983, *Proteins, Structures and Molecular Principles*, W. H. Freeman und Co., N.Y., S 34–49) bestätigt werden.

[0056] Zur Expression eines biologisch aktiven Leptinproteins wird die Nukleotidsequenz, kodierend für Leptin oder ein funktionelles Äquivalent in einen geeigneten Expressionsvektor, d. h. in einen Vektor inseriert, der die notwendigen Elemente für die Transkription und Translation der inserierten Kodierungssequenz enthält. Sowohl die Leptin-Genprodukte als auch die Wirtszellen oder die mit rekombinanten Leptin-Expressionsvektoren transfizierten und transformierten Wirtszellen oder Zelllinien können für eine Reihe verschiedener Zwecke verwendet werden.

5.3.2. EXPRESSIONSSYSTEME FÜR LEPTIN

[0057] Dem Fachmann überall bekannte Verfahren können zur Konstruktion von Expressionsvektoren, enthaltend die Leptin-Kodierungssequenz und geeigneten transkriptionalen/translationalen Kontrollsignale, verwendet werden. Diese Verfahren schließen in vitro rekombinante DNA-Verfahren, Syntheseverfahren und die in vivo-Rekombination/genetische Rekombination ein. Siehe zum Beispiel die in Sambrook et al., 1989, *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. und Ausubel et al., 1989, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y., beschriebenen Verfahren.

[0058] Es können viele verschiedene Wirtsexpressions-Vektorsysteme zur Expression der Leptin-Kodierungssequenz genutzt werden. Diese schließen Mikroorganismen, wie zum Beispiel die folgenden ein, sind aber nicht darauf beschränkt: Bakterien, transformiert mit der rekombinanten Bakteriophagen-DNA, Plasmid-DNA oder Cosmid-DNA-Expressionsvektoren, enthaltend die Leptin-Kodierungssequenz; Hefe, transformiert mit rekombinanten Hefe-Expressionsvektoren, enthaltend die Leptin-Kodierungssequenz; Insektenzellsysteme, infiziert mit rekombinanten Virus-Expressionsvektoren (z. B. Baculovirus), enthaltend die Leptin-Kodierungssequenz; Pflanzensellensysteme, infiziert mit rekombinanten Virus-Expressionsvektoren (z. B. Blumenkohl-Mosaik-Virus, CaMV; Tabak-Mosaik-Virus, TMV) oder transformiert mit rekombinanten Plasmid-Expressionsvektoren (z. B. Ti-Plasmid), enthaltend die Leptin-Kodierungssequenz; oder Tierzellensysteme.

[0059] Die Expressionselemente dieser Systeme variieren hinsichtlich ihrer Stärke und Spezifitäten. In Abhängigkeit vom benutzten Wirts-/Vektorsystem können jedwede von einer Anzahl an geeigneten Transkriptions- und Translationselementen, einschließlich konstitutiver und induzierbarer Promotoren im Expressionsvektor, verwendet werden. So können zum Beispiel beim Klonieren in bakteriellen Systemen induzierbare Promotoren, wie zum Beispiel pL vom Bakteriophagen λ , plac, ptrp, ptac (der ptrplac-Hybrid-Promotor) und dergleichen verwendet werden; beim Klonieren in Insektenzellensystemen können Promotoren, wie zum Beispiel der Baculovirus-Polyhedrin-Promotor verwendet werden; beim Klonieren in Pflanzensellensystemen können sich vom Genom von Pflanzenzellen (z. B. Hitzeschock-Promotoren; der Promotor für die kleine Untereinheit von RUBISCO; der Promotor für das Chlorophyll α/β -Bindungsprotein) oder von Pflanzenviren (z. B. der 35S-RNA-Promotor von CaMV; der Hüllprotein-Promotor von TMV) herleitende Promotoren, verwendet werden; beim Klonieren in Säugerzellensystemen können sich vom Genom von Säugerzellen (z.B. Metallothionein-Promotor) oder aus Säugerviren (z. B. dem späten Adenovirus-Promotor; dem Vaccinia-Virus-7.5K-Promotor) herleitende Promotoren verwendet werden; beim Generieren von Zelllinien können die multiplen Kopien von Leptin-DNA-, -SV40-, -BPV- und -EBV-basierenden Vektoren mit einem geeigneten selektierbaren Marker verwendet werden.

[0060] In bakteriellen Systemen können in Abhängigkeit vom für das exprimierte Leptin beabsichtigten Gebrauch eine Anzahl von Expressionsvektoren vorteilhaft selektiert werden. Wenn zum Beispiel für die Herstellung von Antikörpern oder zum Screening von Peptid-Bibliotheken große Leptinmengen produziert werden sollen, können Vektoren, welche die Expression großer Mengen von Fusionsproteinprodukten richten, die ohne weiteres gereinigt werden können, wünschenswert sein. Solche Vektoren schließen den Expressionsvektor pUR278 von E. coli ein (Ruffner et al., 1983, *EMBO J.* 2: 1791), worin die Leptin-Kodierungssequenz in den Vektor im Rahmen mit der lac Z-Kodierungsregion dergestalt ligiert sein kann, dass ein Hybrid AS-lac-Z-Protein produziert wird; pIN-Vektoren (Inouye & Inouye, 1985, *Nucleic acids Res.* 13: 3101–3109; Van Heeke & Schuster, 1989, *J. Biol. Chem.* 264: 5503–5509); und dergleichen ein, sind aber nicht darauf beschränkt. pGEX-Vek-

toren können auch zur Expression von Fremdpolypeptiden als Fusionsproteine mit Glutathion-S-Transferase (GST) verwendet werden. Im Allgemeinen sind solche Fusionsproteine löslich und lassen sich leicht aus lysierten Zellen durch Adsorption an Glutathion-Agarose-Perlen, gefolgt von Elution in Anwesenheit von freiem Glutathion reinigen. Die pGEX-Vektoren sind so ausgelegt, dass sie Thrombin- oder Faktor Xa-Protease-Spaltungsorte dergestalt einschließen, dass das klonierte Polypeptid von Interesse aus der GST-Komponente freigesetzt werden kann.

[0061] In Hefe können eine Anzahl von Vektoren, die konstitutive oder induzierbare Promotoren enthalten, verwendet werden. Für einen Überblick siehe *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 2, 1988, Hrsg. Ausubel et al., Greene Publish. Assoc. & Wiley Interscience, Kapitel 13; Grant et al., 1987, *Expression and Secretion Vectors for Yeast*, *Methods in Enzymology*, Hrsg. Wu & Grossman, 1987, Acad. Press, N.Y., Vol. 153, S. 516–544; Glover, 1986, *DNA Cloning*, Vol. II, IRL Press, Wash., D.C., Kapitel 3; und Bitter, 1987, *Heterologous Gene Expression in Yeast*, *Methods in Enzymology*, Hrsg. Berger & Kimmel, Acad. Press, N.Y., Vol. 152, S. 673–684; und *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces*, 1982, Hrsg. Strathern et al., Cold Spring Harbor Press, Vol. I und II.

[0062] In Fällen, in denen Pflanzenexpressionsvektoren verwendet werden, kann der Antrieb der Expression der Leptin-Kodierungssequenz durch jedwede Anzahl von Promotoren erfolgen. Virale Promotoren, wie zum Beispiel die 35S-RNA- und 19S-RNA-Promotoren von CaMV (Brisson et al., 1984, *Nature* 310: 511–514) oder der Hüllprotein-Promotor von TMV (Takamatsu et al., 1987, *EMBO J.* 6: 307–311) können zum Beispiel verwendet werden; als Alternative können Pflanzen-Promotoren, wie zum Beispiel die kleine Untereinheit von RUBISCO (Coruzzi et al., 1984, *EMBO J.* 3: 1671–1680; Broglie et al., 1984, *Science* 224: 838–843); oder Hitzeschock-Promotoren, z. B. hsp17.5-E oder hsp17.3-B von der Sojabohne (Gurley et al., 1986, *Mol. Cell. Biol.* 6: 559–565) verwendet werden. Diese Konstrukte können unter Verwendung von Ti-Plasmiden, Ri-Plasmiden, Pflanzenvirusvektoren, direkter DNA-Transformation, Mikroinjektion, Elektroporation usw. in Pflanzenzellen eingeführt werden. Für Überblicke über solche Verfahren siehe zum Beispiel Weissbach & Weissbach, 1988, *Methods for Plant Molecular Biology*, Academic Press, NY, Abschnitt VIII, S. 421–463; und Grierson & Corey, 1988, *Plant Molecular Biology*, 2. Auflage, Blackie, London, Kapitel 7–9.

[0063] Bei einem alternativen Expressionssystem, das zur Expression von Leptin verwendet werden könnte, handelt es sich um ein Insektensystem. In einem solchen System wird das Nukleopolyhedrovirus *Autographa californica* (AcNPV) als Vektor zur Expression von Fremdgenen verwendet. Das Virus wächst in *Spodoptera frugiperda*-Zellen. Die Leptin-Kodierungssequenz kann in nicht essenzielle Regionen (z. B. das Polyhedrin-Gen) des Virus kloniert und unter die Kontrolle eines AcNPV-Promotors (z. B. des Polyhedrin-Promotors) gebracht werden. Die erfolgreiche Insertion der Leptin-Kodierungssequenz führt zu einer Inaktivierung des Polyhedrin-Gens und der Produktion des nicht okkludierten rekombinanten Virus (d. h. des Virus, dem die proteinartige Hülle mangelt, für das durch das Polyhedrin kodiert wird). Diese rekombinanten Viren werden dann zum Infizieren von *Spodoptera frugiperda*-Zellen, in denen das insertierte Gen exprimiert wird, verwendet (siehe z. B. Smith et al., 1983, *J. Virol.* 46: 584; Smith, US-Patent Nr. 4,215,051).

[0064] In Säugerwirtszellen können eine Anzahl von auf Viren basierenden Expressionssystemen benutzt werden. In Fällen, in denen ein Adenovirus als ein Expressionsvektor verwendet wird, kann die Leptin-Kodierungssequenz an einen Adenovirus-Transkriptions-/Translations-Kontrollkomplex, z. B. den späten Promotor und die „tripartite Leader“-Sequenz ligiert werden. Dieses chimäre Gen kann dann in das Adenovirus-Genom durch in-vitro- oder in-vivo-Rekombination inseriert werden. Die Insertion in eine nicht essenzielle Region des Virusgenoms (z. B. die Region E1 oder E3) führt zu einem rekombinanten Virus, das lebensfähig und zur Expression von Leptin in infizierten Wirten fähig ist (siehe z. B. Logan & Shenk, 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 3655–3659). Als Alternative kann der Vaccinia-7.5K-Promoter verwendet werden. (Siehe z. B. Mackett et al., 1982, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 7415–7419; Mackett et al., 1984, *J. Virol.* 49: 857–864; Panicali et al., 1982, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 4927–4931).

[0065] Spezifische Initiierungssignale könnten zur effizienten Translation von inserierten Leptin-Kodierungssequenzen gegebenenfalls auch erforderlich sein. Diese Signale schließen das ATG-Initiierungscodon und die unmittelbar angrenzenden Sequenzen ein. In Fällen, in denen das gesamte Leptin-Gen, einschließlich seines eigenen Initiierungscodons und unmittelbar angrenzender Sequenzen, in den geeigneten Expressionsvektor inseriert wird, könnten gegebenenfalls keine zusätzlichen translationalen Kontrollsignale erforderlich sein. In Fällen, in denen jedoch nur ein Anteil der Leptin-Kodierungssequenz inseriert wird, müssen exogene translationale Kontrollsignale, einschließlich des ATG-Initiierungscodons, bereitgestellt werden. Das Initiierungscodon muss sich überdies in Phase mit dem Leserahmen der Leptin-Kodierungssequenz befinden, um die Translation des gesamten Inserts zu gewährleisten. Diese exogenen translationalen Kontrollsignale und Initiierung-

scodons können von verschiedenster, sowohl natürlicher als auch synthetischer, Herkunft sein. Die Effizienz der Expression kann durch den Einschluss von geeigneten Transkriptions-Enhancer-Elementen, Transkriptionsterminatoren usw. verbessert werden (siehe Bittner et al., 1987, *Methods in Enzymol.* 153: 516–544).

[0066] Außerdem kann ein Wirtszellstamm gewählt werden, der die Expression der insertierten Sequenzen moduliert oder modifiziert und das Genprodukt auf die gewünschte spezifische Weise verarbeitet. Solche Modifikationen (z. B. Glycosylierung) und Processing (z. B. Spaltung) von Proteinprodukten können für die Funktion des Proteins wichtig sein. Die Anwesenheit mehrerer Konsensus-N-Glycosylierungsstellen im Leptin unterstützen die Möglichkeit, dass eine ordnungsgemäße Modifikation für die Leptin-Funktion wichtig sein kann. Verschiedene Wirtszellen besitzen charakteristische und spezifische Mechanismen für das posttranslationale Processing und die Modifikation von Proteinen. Geeignete Zelllinien oder Wirtssysteme können zur Gewährleistung der richtigen Modifikation und des richtigen Processings des exprimierten Fremdproteins gewählt werden. In dieser Hinsicht können eukaryote Wirtszellen, die die zelluläre Maschinerie zum richtigen Processing des primären Transkripts, der Glycosylierung und der Phosphorylierung des Genprodukts verwendet werden. Solche Säugerwirtszellen schließen CHO, VERO, BHK, HeLa, COS, MDCK, 293, WI38 usw. ein, sind aber nicht darauf beschränkt.

[0067] Für die Langzeit-Produktion rekombinanter Proteine hoher Ausbeute ist eine stabile Expression bevorzugt. So können zum Beispiel Zelllinien, die stabil die Leptin-Sequenz exprimieren, manipuliert werden. Anstelle der Verwendung von Expressionsvektoren, die eine Replikation von viraler Herkunft enthalten, können Wirtszellen mit der Leptin-DNA transformiert werden, die durch geeignete Expressionskontrollelemente (z. B. Promotor, Enhancer, Sequenzen, Transkriptionsterminatoren, Polyadenylierungsstellen usw.) und einen selektierbaren Marker kontrolliert werden. Nach der Einführung von Fremd-DNA dürfen manipulierte Zellen 1–2 Tage in einem angereicherten Medium wachsen und werden dann auf ein Selektivmedium umgestellt. Der selektierbare Marker im rekombinanten Plasmid verleiht Resistenz gegen die Auswahl und erlaubt den Zellen, das Plasmid stabil in ihre Chromosomen zu integrieren und zu wachsen, um Foci zu bilden, die wiederum kloniert und in Zelllinien expandiert werden können.

[0068] Es können eine Anzahl von Selektionssystemen verwendet werden, einschließlich, aber nicht beschränkt auf die Gene von Thymidin-Kinase des Herpes-simplex-Virus (Wigler, et al., 1977, *Cell* 11: 223), Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (Szybalska & Szybalski, 1962, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 48: 2026), und Adenin-Phosphoribosyltransferase (Lowy, et al., 1980, *Cell* 22:817) können in tk⁻, hgprt⁻ bzw. aprt⁻-Zellen eingesetzt werden. Auch eine Antimetabolit-Resistenz kann als Selektionsbasis für dhfr verwendet werden, das Resistenz gegen Methotrexat verleiht (Wigler, et al., 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 3 567; O'Hare, et al., 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 1527); gpt, das Resistenz gegen Mycophenolsäure verleiht (Mulligan & Berg, 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 2072); neo, das Resistenz gegen das Aminoglycosid G-418 verleiht (Colberre-Garapin et al., 1981, *J. Mol. Biol.* 150: 1); und hyg^r, das Resistenz gegen Hygromycin-Gene verleiht (Santerre, et al., 1984, *Gene* 30: 147). Es wurden zusätzliche selektierbare Gene beschrieben, nämlich trpB, das den Zellen ermöglicht, Indol anstelle von Tryptophan zu verwerten; hisD, das den Zellen ermöglicht, Histidin anstelle von Histidin zu verwerten (Hartman & Mulligan, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 8047); und ODC (Ornithindecarboxylase), die Resistenz gegen den Ornithin-Decarboxylase-Inhibitor, 2-(Difluoromethyl)-DL-ornithin, DFMO, verleiht (McConlogue L., 1987, in: *Current Communications in Molecular Biology*, Cold Spring Harbor Laboratory, Hrsg.).

[0069] Sobald das Leptin-Protein durch jedwedes der vorstehend erwähnten Systeme exprimiert wird, können Überstände der kultivierten Zellen oder Zelllysate den verschiedenen Standardverfahren der Proteinreinigung unterzogen werden. So kann zum Beispiel ein Antileptin-Antikörper oder Hu-B 1.219-Protein zu seiner Reinigung mithilfe der Affinitätschromatographie verwendet werden. Als Alternative kann Leptin mithilfe der Ionenaustauschchromatographie oder HPLC gereinigt werden. Danach kann die Reinheit des Proteins durch verschiedene Verfahren, einschließlich SDS-PAGE, bestätigt werden und das Protein sofort verwendet oder zum künftigen Gebrauch eingefroren gelagert werden. Für Zellkulturen und die in-vivo-Verabreichung muss gereinigtes Leptin vor Gebrauch sterilisiert werden.

5.4. AKTIVIERUNG VON Hu-B1.219-EXPRIMIERENDEN ZELLEN DURCH LEPTIN

[0070] Da verschiedene Formen von Hu-B 1.219, einschließlich OB-R, im Wesentlichen in der extrazellulären Domäne identisch sind, können diese Rezeptoren Leptin als einen Liganden binden. Zum Vergleich der Bindungsaffinität von Hu-B1.219-Isoformen zu Leptin werden die varianten Formen in Standardexpressionsvektoren, z. B. CMV-Promoter-Expressionsvektoren kloniert und in COS- und BaF3-Zellen transfiziert. Die Oberflächenexpression des Rezeptors wird dann durch direkte Bindung an einen Anti-Hu-B 1.219-Antikörper be-

wertet. Außerdem können auch, wie von Tartaglia et al. (1995, Cell 83: 12 63) beschrieben, Leptin-Bindungsassays unter Verwendung eines Leptin-Fusionsproteins oder löslichen Leptins, konjugiert an eine Radiomarkierung, einen Fluoreszenzfarbstoff oder ein Enzym durchgeführt werden. Die Ergebnisse werden mit mock-transfizierten Zellen als negative Kontrollen verglichen.

[0071] Da die vier Varianten von Hu-B1.219 verschiedene intrazelluläre Domänen enthalten, können diese Isoformen in Bezug auf ihre Signaltransduktionsfähigkeiten zur Ermittlung der aktivsten Form verglichen werden. Die Stimulation der meisten, wenn nicht aller, hämatopoetischen Rezeptoren mit Liganden führt zur schnellen Phosphorylierung von Tyrosinen, sowohl an den Rezeptoren als auch an einer Kaskade von zellulären Proteinkinasen (Heidin, 1995, Cell 80: 213–233; Ihle, 1995, Nature 377: 591–594). Die Phosphorylierung dieser Moleküle führt zu einem Aktivierungssignal, das letztendlich an den Nukleus propagiert wird, was zur Genaktivierung führt. Bei der Ligandenbindung an einen Hämatopoetin-Rezeptor handelt es sich bei einigen der ersten der auf diese Weise aktivierten Moleküle um die JAK- (Janus)-Familie der Proteinkinasen (Ziemiecki et al., 1994, Trends Cell Biol. 4: 207–212). Diese aktivierten Kinasen phosphorylieren wiederum Mitglieder der STAT-Familie der Moleküle, die nach und nach in den Nukleus translozieren und aktive Transkriptionskomplexe bilden (Darnell et al., 1994, Science 264: 1415–1421; Zhong et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 4806–4810; Hou et al., 1994, Science 265: 1701–1706).

[0072] Deshalb kann die Zellaktivierung durch Leptin durch Untersuchung des Musters der Phosphorylierung von JAK1-3 nach der Hu-B1.219-Bindung bewertet werden. Dies kann durch Kultivierung der hämatopoetischen Zellen oder Hu-B1.219-Transfektanten ($1-100 \times 10^3$) in RPMI 1640 (GIBCO) mit Gentamicin (100 µg/ml), 2 mM Glutamin (GIBCO), 10 % FCS und Leptin (von 0 bis 500 nM) 10–60 Minuten bei 37 °C durchgeführt werden. Nach der Inkubation werden die Zellen in eiskalter PBS gewaschen und in lysierendem Puffer (1 % Triton X-100, 200 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 7,5, 2,5 mM p-Nitrophenylguanidinobenzoat, 100 µM Na_3VO_4 , 1 µM Pepstatin, 50 µM 3,4-Dichlorisocumarin, 1 mM PMSF, 10 µg/ml Leupeptin, 10 µg/ml Aprotinin) 30 Minuten bei 4 °C resuspendiert, gefolgt von der Entfernung von Nuklei und unlöslichem Material durch Zentrifugation. Dein Zelllysate werden polyklonale Antikörper gegen JAK1 und JAK2 (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY) oder humanes Tyk2, einer mit der JAK-Familie verwandten humanen Kinase (Santa Cruz, CA) nach Empfehlung des Herstellers zugefügt. Dieses Gemisch wird 30–60 Minuten bei 4 °C rotiert, und dann werden 100 µl einer 10%igen Protein A-Sepharose-Lösung (Sigma) zugefügt und zusätzliche 30 Minuten bei 4 °C rotiert. Das Präzipitat wird mit Lysepuffer gewaschen und in Standard-SDS-reduzierendem Probenpuffer eluiert und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proteine werden mittels Western-Blots durch Transferieren an Immobilon-Membranen (Millipore) analysiert. Die Membranen werden mit Gelatine (1 %) blockiert und mit Antiphosphotyrosin (4G10, Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY) gemäß den Empfehlungen des Herstellers inkubiert. Phosphorylierte Proteine werden mit ^{125}I -markiertem Protein A (Amersham) nachgewiesen.

[0073] Für das vorstehend erwähnte Experiment können hämatopoetische Zellen aus humanem $\text{CD}34^+$ -Knochenmark und Nabelschnurblut erhalten werden. Für die Experimente an Mäusen können drei primitive Populationen, wie z. B. für die $\text{Ly}-6^+$ -Zellreihe negatives Knochenmark oder das Äquivalent in der fetalen Leber oder $\text{AA}4.1^+$ in der fetalen Leber, bewertet werden.

[0074] Während die Tyrosinphosphorylierung einen Hinweis auf die Zellaktivierung gibt, die sich aus den Liganden-Rezeptor-Interaktionen ergibt, können zusätzliche Manifestationen der Aktivierung auf zellulärer Ebene unter Verwendung von Leptin zur Induktion der Proliferation und/oder Differenzierung von hämatopoetischen Präkursoren untersucht werden. Die Beurteilung der Zellproliferation lässt sich durch die durch visuelle Zählung der Zellzahlen vornehmen. Die Differenzierung hämatopoetischer Zellen kann durch Testen der Fähigkeit von Leptin zur Stimulierung des in-vitro-Wachstums und der Differenzierung verschiedener hämatopoetischer Kolonien untersucht werden. Ein Zellgemisch kann zum Beispiel aus dem Dottersack, der fetalen Leber oder dem Knochenmark isoliert und in Standard-Methylcellulose-Kolonienassays mit und ohne Serumsupplementierungen in Anwesenheit von Leptin (0,1–500 nM) mit oder ohne verschiedene andere Cytokine kultiviert werden (Metcalf 1984, in Clonal Culture of Hematopoietic Cells: Techniques and Applications, Elsevier, NY).

[0075] Ein Standardprotokoll für einen solchen Assay beinhaltet die Dichtegradienten-Zentrifugation eines Zellgemischs mittels Ficoll-Hypaque ($1,077 \text{ g/cm}^3$) und Resuspendieren von ca. 1×10^6 lebensfähigen Zellen in Iscove's modifiziertem Dulbecco's Medium (IMDM) mit 0,5–15 % fetalem Kalbserum (FCS). Die Zellen ($1-100 \times 10^3/\text{ml}$) werden dann mit IMDM, das Methylcellulose (1,3 %), FCS (0,5–15 %), BSA (1 %), Monothio-glycerol (100 µM), Gentamicin (50 µg/ml) und Leptin (0,1–500 nM) enthält, gemischt. In Parallelkulturen können zusätzliche Cytokine folgende einschließen: IL-3 (100 pg/ml), Steel-Faktor oder c-Kit-Ligand oder SCF (10 ng/ml) und EPO (2 E/ml). Nach dem Mischen werden 1 ml des Gemischs in Kulturschalen (25 mm) von Bak-

teriengütegrad bei 37 °C in einem angefeuchteten Inkubator 5 bis 18 Tage dispensiert. Die Zahl und der Typ hämatopoetischer Kolonien werden unter Verwendung eines invertierten Mikroskops bestimmt. Die Kolonienmorphologie wird zum Kategorisieren der verschiedenen Kolonientypen, z. B. BFU-E, CFU-E, CFU-G, CFU-GM, CFU-M, CFU-Blast oder CFU-Fibroblast, verwendet (Metcalf 1984, *Clonal Culture of Hematopoietic Cells: Techniques and Applications*, Elsevier, N.Y.; Freshney, 1994, in *Culture of Hematopoietic Cells*, Wiley-Liss, Inc., S. 265–68). Optimale Leptin-Konzentrationen können in diesem Assay sowohl die Größe als auch die Frequenz dieser primitiven pluripotenten Kolonien steigern.

[0076] Während Leptin allein verwendet werden kann, kann es auch synergistisch mit mehreren Cytokinen zur Förderung des hämatopoetischen Zellwachstums, einschließlich, aber nicht beschränkt auf IL-1, IL-3, IL-6, EPO, Steel-Faktor (SCF) und GM-CSF (1 ng/ml) verwendet werden. Da biologisch aktives Leptin außerdem in fetalem Kalbserum (FCS) anwesend ist, können Kulturen mit 0,5–15 % FCS getestet werden. Die spezifische Aktivität von Leptin in FCS kann durch einen Antileptin-Antikörper oder eine lösliche Variante von Hu-B1.219 als eine Kontrolle inhibiert werden.

[0077] Die Effekte von Leptin können insbesondere an den primitiven Präkursoren, die Zellen mit hohem proliferativen Potenzial (HPPC) (McNiece and Briddell, 1994, in *Culture of Hematopoietic Cells*, Wiley-Liss, Inc., S. 23–40) und Blast-Kolonien (Leary und Ogawa, 1994, in *Culture of Hematopoietic Cells*, Wiley-Liss Inc., S. 41–54) bilden. Zur Bewertung der Effekte von Leptin auf noch primitivere Zellen in diesen Assays, können CD34⁺-Knochenmark, Nabelschnurblut und fetale Leberzellen zuerst durch einen Antikörper sortiert und in den vorstehenden Assays getestet werden. Da neuere Hinweise auf die Existenz von einer CD34⁺-Stammzelle hingedeutet haben, kann auch die CD34⁺-Lin⁺-Population durch Leptin stimuliert werden.

[0078] Überdies kann der Effekt des Leptins auf die Langzeitkultur-initiierenden primitiven Zellen (LTCIC) und auf hämatopoetische Stammzellen bewertet werden. LTCIC stellen Präkursoren dar, die eine hämatopoetische Langzeitkultur initiieren können, und es wird angenommen, dass es sich um eine Funktion der hämatopoetischen Stammzellen handelt (Sutherland und Eaves, 1994, in *Culture of Hematopoietic Cells*, Wiley-Liss, Inc., S. 139–162; Van der Sluijs et al., 1990, *Exp. Hematol.* 18: 893–893; Traycoff et al., 1994, *Exp. Hematol.* 22: 215–222). Die Fähigkeit dieser Kulturbedingungen, die hämatopoetische Stammzelle zu expandieren, kann durch den kompetitiven Repopulationsassay bestätigt werden (Harrison, 1980, *Blood* 55: 77–81). Dieser Assay lässt die Quantifizierung hämatopoetischer Stammzellen zu.

[0079] Da endotheliale Zellen außerdem auch Hu-B 1.219 exprimieren, kann Leptin zur Stimulation des Wachstums der primären endothelialen Zellen bei 0,1–500 nM in Standardkulturen zur Aufrechterhaltung der primären endothelialen Zellen verwendet werden (Masek und Sweetenham, 1994, *Br. J. Haematol.* 88: 855–865; Visner et al., 1994, *Am. J. Physiol.* 267: L406–413; Moyer et al., 1988, *In Vitro Cell Dev. Biol.* 24: 359–368). Als Alternative kann Leptin zur Induktion endothelialer Zellen zur Produktion von Cytokinen verwendet werden (Broudy et al., 1987, *J. Immunol.* 139: 464–468; Seelentag et al., 1987, *EMBO J.* 6: 2261–2265). Überstände von 2- bis 5-tägigen primären endothelialen Zellkulturen oder endothelialen Zelllinien, die in Anwesenheit von Leptin mit oder ohne andere Cytokine(n), wie zum Beispiel dem vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF), dem Platelet-derived Growth Factor (PDGF), dem Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF), dem transformierenden Wachstumsfaktor (TGF) und dem epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) kultiviert wurden, werden geerntet und als eine Supplementierung in den vorstehenden hämatopoetischen Kolonien-Assays getestet.

[0080] Da in einem anderen erfindungsgemäßen Aspekt die Rezeptoren häufig Dimere auf der Zelloberfläche bilden, kann die Kombination der verschiedenen Hu-B 1.219-Isoformen, die eine optimale Signaltransduktion geben, anhand der Wachstumsstimulation und den Phosphorylierungsmustern gemessen werden. Eine Hu-B1.219-Wachstumsfaktor-abhängige Indikatorzelllinie (z. B. BaF3) kann mit verschiedenen Kombinationen der Isoformen unter Verwendung von standardmäßigen CMV-Expressionsvektoren transfiziert werden. Im Anschluss an den Nachweis der Zelloberflächenexpression wird den Kulturen Leptin (0,1–500 nM) zugefügt, gefolgt von der Messung der Wachstumsraten und den Phosphorylierungsmustern mithilfe etablierter Verfahren. Andere Zelllinien, wie zum Beispiel TF-1, FD5 und TS1, können auch verwendet werden.

[0081] Aufgrund der Expression der Isoformen mit frankierten cytoplasmatischen Schwänzen ist es möglich, dass in einigen Geweben eine andere Proteinkette als das Signalmolekül in Assoziation mit Hu-B 1 219 verwendet wird. Ein derartiges Molekül kann gescreent und durch Transfizieren von cDNA-Pools aus Expressionsbibliotheken von einer Reihe verschiedener Gewebe, wie z. B. fetaler Leber, CD34⁺-Knochenmark, Lunge, Ovar usw., zusammen mit Konstrukten, die eine der frankierten Hu-B1.219-Isoformen in eine Wachstumsfaktor-abhängige Zelllinie (z. B. BaF3) exprimieren, ausgewählt werden. Die Fähigkeit in Anwesenheit von Leptin

zu wachsen, wird als ein Readout verwendet. Insbesondere der Insulin-Rezeptor-verwandte Rezeptor (Zhang und Roth, 1992, J. Biol. Chem. 267: 18320), die LIFR α -, IL-2R γ -, IL-4R α - (Mosely et al., 1989, Cell 89: 335) und IL-13R α -Ketten (Hilton et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 497) können als komplementäre Ketten für die Hu-B 1.219-Aktivität funktionieren. Die Verfahren zur Identifikation der einzigartigen cDNA, die für diese Komplementierung verantwortlich ist, sind im Stand der Technik gut etabliert.

[0082] Außerdem können auch Mittel, die Hu-B1.219 auf eine Weise aktivieren, die dem Leptin ähnlich ist, anstelle von Leptin verwendet werden. Diese Mittel schließen kleine Moleküle und Peptide ein, und sie können im folgenden Screening-Assay ausgewählt werden. Zehntausend BaF3- und BaF3/Hu-B 1.219-Zellen (Transfektant-Zellen, die die volle Länge der Hu-B 1.219-Isoform exprimieren) werden in Mikrotiterplatten auf proliferative Effekte nach der Inkubation mit einem Testmittel gescreent. Ohne Stimulation sterben diese Zellen. Jedweder an einer transfizierten Zelllinie und nicht mit dem BaF3-Wirt gesehene wachstumsfördernde Effekt würde darauf hindeuten, dass das Testmittel spezifisch den Hu-B 1.219-Rezeptor oder seinen Signalfaden aktiviert. Dieser Assay wird zum Screening kleiner Moleküle, einschließlich Peptiden von Oligonukleotiden und chemischen Bibliotheken verwendet.

5.5. IN VITRO-VERWENDUNGEN VON LEPTIN

[0083] Angesichts der Expression von Hu-B 1.219 in diversen Zelltypen kann Leptin zur Aktivierung dieser Zellen in Kultur verwendet werden. Die aktivierten Zellen expandieren zahlenmäßig aufgrund der erhöhten Proliferation und/oder differenzieren sich, um zu matureren Zellen zu werden. In diesem Zusammenhang kann die optimal wirksame Konzentration von Leptin für jeden Zelltyp durch die üblichen Titrationsexperimente bestimmt werden, in denen verschiedene Leptinmengen mit den spezifischen Zellen und ihren Aktivierungsspiegeln, gemessen anhand der Tyrosinphosphorylierung, Proliferation oder Differenzierung, inkubiert werden.

[0084] Hämatopoetische Progenitorzellen exprimieren insbesondere Hu-B.1219. Hämatopoetische Zellen können durch Exposition gegenüber Leptin in vitro aktiviert werden, was vor ihrem Gebrauch in vitro und in vivo zu ihrer zahlenmäßigen Expansion führt. Solche hämatopoetischen Zellen können aus dem Knochenmark, dem peripheren Blut (Demuynck et al., 1995, Ann. Hematol. 71: 29–33; Scheding et al., 1994, Stem Cells 12: Suppl. 1: 203–210) und Nabelschnurblut erhalten werden. Zum selektiven Enhancement des Wachstums von hämatopoetischen Stammzellen kann das Spenderzellgemisch zuerst in CD34⁺-Zellen getrennt werden, gefolgt von Leptin-Stimulation. Die expandierten Zellen können als Spenderzellen bei der Knochenmarktransplantation oder als Langzeit-Knochenmarkkulturen (Ponchio et al., 1995, Blood 86: 3314–3321; Testa und Dexter, 1991, Curr. Opin. 3: 272–278; Naughton und Naughton, 1991, US-Patent Nr. 5,032,508) zum Testen der in vitro-Cytotoxizität und der Entdeckung neuer Cytokine verwendet werden.

[0085] Da Hu-B1.219 auch in einigen endothelialen Zellen und ihren Progenitoren exprimiert werden, kann Leptin zur Induktion der Blutgefäßbildung in vitro verwendet werden. Diesbezüglich kann Leptin allein oder in Kombination mit VEGF, PDGF, FGF oder TGF- α verwendet werden. Blutgefäße bilden sich durch eine Kombination aus zwei primären Vorgängen. Ein kleiner Teil des Blutgefäßwachstums hängt von der Angiogenese ab, in einem Vorgang, der dem mit pathologischen Zuständen verwandten ähnlich ist. Das ZNS hängt zum Beispiel einzig und allein von der Angiogenese für die Entwicklung seiner vaskulären Versorgung ab (Nodew, 1989, Am. Rev. Respir. Dis. 140: 1097–1103; Risau et al., 1988, EMBO J. 7: 959–962). Ein zweiter Vorgang, die Vaskulogenese, hängt von der Inkorporation von migratorischen individuellen endothelialen Zellen (Angioblasten) in das sich entwickelnde Blutgefäß ab. Leptin kann zur Förderung der Angiogenese und auch der Vaskulogenese verwendet werden.

[0086] Die Kodierungssequenz von Leptin kann außerdem in einen Expressionsvektor gemäß Abschnitt 5.3, vorstehend, inseriert und in Zelltypen, die kein Leptin produzieren, transferiert werden, um zur endogenen Expression von Leptin zu führen. So werden zum Beispiel hämatopoetische Stammzellen mit der Leptin-Kodierungssequenz isoliert und transfiziert. Danach werden die Zellen in einen Empfänger eines Knochenmarktransplantats transferiert, um die endogene Produktion von Leptin bei der Stimulation der Hämatopoese zu veranlassen (US-Patent Nr. 5,399,346).

5.6. IN VIVO-VERWENDUNGEN VON LEPTIN

[0087] Die angemessene Dosierung und Formulierung von Leptin auf die humane hämatopoetische und endotheliale Entwicklung in vivo kann zuerst in Tiermodellen bestimmt werden. So können zum Beispiel normale Mäuse letal bestrahlt oder chemisch ablatiert und mit syngenen oder allogenen Knochenmark rekonstituiert werden. Da von rekombinantem humanem Leptin gezeigt wurde, dass es an Mauszellen aktiv ist, kann die

Rate der Spenderzell-Engraftments zwischen mit Leptin behandelten und nicht behandelten Gruppen verglichen werden. Aufgrund der Hu-B 1.219-Expression auf primitiven hämatopoetischen Zellen erleichtert Leptin das Wachstum und die Erholung dieser Zellen im Empfänger. Die Wirkung von Leptin auf die hämatopoetische Proliferation und Differenzierung in diesen Situationen in vivo kann durch die Rekonstitution letal bestrahlter Mäuse (900R) mit normalen Knochenmarkszellen ($1-5 \times 10^6$ pro Maus) bewertet werden. Als Kontrollen dienende Tiergruppen werden mit PBS injiziert und andere Gruppen erhalten Leptin (0,1–10 mg/kg) in variierenden Intervallen. Die Aktivität von Leptin wird anhand der Schnelligkeit der Renormalisierung und der Stabilität der Blutprofile (z. B. Hämatokrit, Leukozytenzahl, Differenzialblutbild usw.) bestimmt.

[0088] Außerdem können neonatale, subletal bestrahlte adulte normale oder SCID-Mäuse mit aus dem Knochenmark, Nabelschnurblut oder Fraktionen davon isolierten humanen hämatopoetischen Stammzellen rekonstituiert werden. In diesen Mäusen engraften und differenzieren sich die humanen hämatopoetischen Zellen (McCune et al. 1988, Science 241: 1632–1639; Sandhu et al., 1994, J. Immunol. 152: 3806–3813). Die Wirkungen von Leptin können durch Messung der Wachstumsrate und dem Ausmaß der Differenzierung von humanen Zellen in diesen Tieren bewertet werden.

[0089] Eine wirksame Leptinmenge kann an einen Patienten verabreicht werden, der einen Bedarf an einer verstärkten hämatopoetischen Zellfunktion hat. Ein derartiger Bedarf kann sich aus verschiedenen Formen der Immundefizienzen (B-Zelldefizienzen, T-Zelldefizienzen und kombinierten Defizienzen), Myelosuppression, Anämien und Krebs ergeben. In diesen Fällen kann Leptin allein oder in Kombination mit anderen Cytokinen angewendet werden. Die Fähigkeit von Leptin, das myeloide Wachstum zu stimulieren, deutet darauf hin, dass es für die Induktion der Makrophagen- und Neutrophilen-Entwicklung besonders nützlich ist. Da von diesen Zelltypen bekannt ist, dass sie an inflammatorischen Responses, wie zum Beispiel rheumatoider Arthritis, beteiligt sind, können Inhibitoren des Leptins, wie zum Beispiel ein Antikörper oder ein löslicher OB-R zur Inhibition der Inflammation verwendet werden. Da Makrophagen andererseits am Vorgang der Wundheilung beteiligt sind, kann Leptin zur Promotion der Wundheilung durch Stimulation der Makrophagen verwendet werden. Überdies können Antagonisten von Leptin, z. B. ein modifiziertes Leptin-Molekül oder ein Fragment davon, das an seinen Rezeptor bindet, aber keine Signaltransduktion triggert, zum Blockieren der stimulatorischen Wirkungen des Leptins in Fällen verwendet werden, in denen natürlich vorkommendes Leptin das Tumorstadium in vivo stimuliert.

[0090] Die Leptin-Kodierungssequenz kann außerdem zur Anurendung in der Gentherapie in einen viralen Vektor inseriert werden (Jolly, 1994, Cancer Gene Therapy, 1:51). Insbesondere bevorzugt sind das Retrovirus, Adenovirus, Vaccinia-Virus und Adeno-assoziierte Viren. Das die Leptin-Kodierungssequenz tragende Virus wird in einen Patienten injiziert, um das Leptin direkt durch Sekretion in den Blutstrom oder an ein spezifisches Targetgewebe abzugeben.

5.6.1. DOSIERUNGSBESTIMMUNG

[0091] Das/Die hierin beschriebene(n) Leptin-Protein und Nukleinsäuresequenzen können in therapeutisch wirksamen Dosen zur Behandlung oder zur Besserung verschiedener hämatologischer Erkrankungen und Defizienzen an einen Patienten verabreicht werden. Unter einer therapeutisch wirksamen Dosis versteht man die Menge des Proteins, die ausreicht, um zur Besserung der Symptome der Erkrankung zu führen oder als Alternative zu dieser Menge einer Nukleinsäuresequenz, die ausreicht, um eine Konzentration eines Genprodukts zu exprimieren, die zur Besserung der Erkrankung führt.

[0092] Die Toxizität und therapeutische Wirksamkeit von Leptin können anhand pharmazeutischer Standardverfahren in Zellkulturen oder Versuchstieren, z. B. zur Ermittlung der LD₅₀ (der für 50 % der Population letalen Dosis) und der ED₅₀ (der bei 50 % der Population therapeutisch wirksamen Dosis) bestimmt werden. Das Dosisverhältnis zwischen toxischen und therapeutischen Wirkungen stellt den therapeutischen Index dar und kann als das Verhältnis von LD₅₀/ED₅₀ ausgedrückt werden. Gereinigtes Leptin, das große therapeutische Indices aufweist, ist bevorzugt. Obwohl Leptin-Präparationen, die toxische Nebenwirkungen aufweisen, verwendet werden können, sollte beim Design eines Abgabesystems, das solche Präparationen an den Ort des betroffenen Gewebes targetiert, mit Vorsicht vorgegangen werden, um die potenzielle Schädigung normaler Zellen zu minimieren und dadurch Nebenwirkungen zu reduzieren.

[0093] Die aus den Zellkultur-Assays und Tierversuchen erfassten Daten können bei der Formulierung eines Dosierungsbereichs zum Gebrauch bei Menschen verwendet werden. Die Dosierung von Leptin liegt bevorzugt in einem Bereich der zirkulierenden Konzentrationen, die die ED₅₀ mit wenig oder keiner Toxizität einschließen. Die Dosierung kann in diesem Bereich in Abhängigkeit von der eingesetzten Dosierungsform und

der benutzten Verabreichungsrouten variieren. Eine Dosis kann in Tiermodellen zum Erreichen eines Konzentrationsbereichs im zirkulierenden Plasma formuliert werden, die die IC_{50} (d. h. die Leptin-Konzentration, die eine halbmaximale Inhibition der Symptome erlangt), wie in Zellkulturen bestimmt, formuliert werden. Derartige Informationen können zur akkurateren Bestimmung der nützlichen Dosen bei Menschen verwendet werden. Die Plasmaspiegel können zum Beispiel mittels der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie gemessen werden.

5.6.2. FORMULIERUNG UND VERABREICHUNG

[0094] Pharmazeutische Zusammensetzungen zur erfindungsgemäßen Verwendung können auf übliche Weise unter Verwendung von einem oder mehr physiologisch verträglichen Träger(n) oder Hilfsmittel(n) formuliert werden (Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, 1995, 6. Auflage, Williams & Wilkins). Die Zusammensetzungen können zur parenteralen Verabreichung, d. h. intravenös, subkutan, intradermal oder intramuskulär über zum Beispiel eine Bolusinjektion oder Dauerinfusion formuliert werden. Formulierungen zur Injektion können in Unit Dosage Forms, z. B. in Ampullen oder in Mehrfachdosisbehältnissen mit einem zugefügten Konservierungsmittel dargereicht werden. Die Zusammensetzungen können solche Formen wie Suspensionen, Lösungen oder Emulsionen in öligen oder wässrigen Vehikeln annehmen und können Formulierungsmittel, wie zum Beispiel Suspendier-, Stabilisierungs- und/oder Dispergiermittel, enthalten. Als Alternative kann der Wirkstoff vor Gebrauch in Pulverform zur Konstitution mit einem geeigneten Vehikel, z. B. sterilem pyrogenfreiem Wasser, vorliegen. Es ist bevorzugt, dass Leptin über intravenöse Verabreichung zur direkten Stimulation der Blut-Progenitoren in den Patienten eingeführt wird.

[0095] Leptin kann zur Verabreichung durch Inhalation oder Insufflation (entweder über den Mund oder die Nase) oder in oraler, bukkaler, parenteraler, topischer oder rektaler Verabreichung formuliert werden.

[0096] Zur oralen Verabreichung können die pharmazeutischen Zusammensetzungen zum Beispiel die Form von Tabletten oder Kapseln annehmen, die durch übliche Mittel mit pharmazeutisch verträglichen Hilfsstoffen, wie zum Beispiel Bindungsmitteln (z. B. Maisquellstärke, Polyvinylpyrrolidon oder Hydroxypropylmethylcellulose); Füllstoffen (z. B. Lactose, mikrokristalline Cellulose oder Calciumhydrogenphosphat); Gleitmitteln (z. B. Magnesiumstearat, Talcum oder Siliciumdioxid); Zerfallsmitteln (z. B. Kartoffelstärke oder Natrium-Stärkeglykolat); oder Feuchthaltemitteln (z. B. Natriumlaurylsulfat) hergestellt werden. Die Tabletten können anhand von im Stand der Technik überall bekannten Verfahren beschichtet werden. Flüssige Präparationen zur oralen Verabreichung können die Form von zum Beispiel Lösungen, Sirupen oder Suspensionen annehmen, oder sie können als ein Trockenprodukt vor Gebrauch zur Konstitution mit Wasser oder einem anderen geeigneten Vehikel dargereicht werden. Solche flüssigen Präparationen können mithilfe üblicher Mittel mit pharmazeutisch verträglichen Zusatzstoffen, wie zum Beispiel Suspensionsmitteln (z. B. Sorbitolsirup, Cellulosederivaten oder hydrierten genießbaren Fetten); Emulgatoren (z. B. Lecithin oder Acacia); nicht wässrigen Vehikeln (z. B. Mandelöl, öligen Estern, Ethylalkohol oder fraktionierten Pflanzenölen); und Konservierungsmitteln (z. B. Methyl- oder Propyl-p-hydroxybenzoaten oder Sorbinsäure) hergestellt werden. Die Präparationen können gegebenenfalls auch Puffersalze, Geschmacksstoffe, Farbstoffe und Süßmittel enthalten.

[0097] Präparationen zur oralen Verabreichung können zweckmäßigerweise zum Erhalt der kontrollierten Freisetzung der aktiven Verbindung formuliert werden.

[0098] Zur bukkalen Verabreichung können die Zusammensetzungen die Form von Tabletten oder Pastillen annehmen, die auf übliche Weise formuliert sind.

[0099] Zur Verabreichung durch Inhalation werden die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen in zweckdienlicher Weise in der Form einer Aerosol-Sprühdarreichung aus Druckpackungen oder einem Vernebler, mit der Verwendung eines geeigneten Treibmittels, z. B. Dichlordifluormethan, Trichlorfluormethan, Dichlortetrafluorethan, Kohlendioxid oder einem anderen geeigneten Gas abgegeben. Im Fall eines Druckaerosols kann die Dosierungseinheit durch Bereitstellung eines Ventils zur Abgabe einer genau dosierten Menge bestimmt werden. Kapseln und Patronen aus z. B. Gelatine zum Gebrauch in einem Inhalator oder Insufflationsapparat können dergestalt formuliert werden, dass sie eine Pulvermischung aus dem Protein und einer geeigneten Pulverbasis, wie zum Beispiel Lactose oder Stärke, enthalten.

[0100] Die Zusammensetzungen können auch in rektalen Zusammensetzungen, wie zum Beispiel Suppositorien oder Retentionseinläufen, enthaltend zum Beispiel die üblichen Suppositoriumsgrundmassen, wie zum Beispiel Kakaobutter oder andere Glyceride, formuliert werden.

[0101] Zusätzlich zu den vorstehend beschriebenen Formulierungen können die Zusammensetzungen auch als ein Depotpräparat formuliert werden. Solche lang wirkenden Formulierungen können mittels Implantation (zum Beispiel subkutan oder intramuskulär) oder durch intramuskuläre Injektion verabreicht werden. Folglich können die Zusammensetzungen zum Beispiel mit geeigneten polymeren oder hydrophoben Materialien (zum Beispiel als eine Emulsion in einem verträglichen Öl) oder Ionenaustauschharzen oder als wenig lösliche Derivate, zum Beispiel als ein wenig lösliches Salz, formuliert werden.

[0102] Die Zusammensetzungen können gegebenenfalls in einer Packung oder einer Dispensiervorrichtung, die eine oder mehr Unit Dosage Form(en) mit dem Wirkstoff enthalten kann, dargereicht werden. Die Packung kann eine Metall- oder Kunststoffolie, wie zum Beispiel eine Blisterpackung, umfassen. Die Packung der Dispensiervorrichtung kann von Verabreichungsanleitungen begleitet sein.

6 BEISPIEL: DAS OB-R IST EINE VARIANTE FORM DES ALS Hu-B 1.219 BEZEICHNETEN HÄMATOPOE-TISCHEN REZEPTORS

6.1. MATERIALIEN UND VERFAHREN

6.1.1. NORTHERN-BLOT-ANALYSE

[0103] Zur Untersuchung der Expression des Hu-B1.219-Gens wurden Northern-Blots, enthaltend RNA, die aus vielen verschiedenen humanen Geweben (Clontech, Palo Alto, CA) erhalten wurden, mit einer radiomarkierten 530-Basenpaar-(bp)-DNA-Sonde, entsprechend den Nukleotiden Nr. 578 durchweg bis 1107 (siehe [Fig. 1A–Fig. 1G](#)) hybridisiert. Um es kurz zu fassen, die Blots wurden 3–6 Stunden bei 42 °C in einer Lösung, enthaltend 5X SSPE, 10X Denhardt's-Lösung, 100 µg/ml frisch denaturierte, gescherte Lachsspermata-DNA, 50 % Formamid (frisch deionisiert) und 2 % SDS prähybridisiert. Die radiomarkierte Sonde wurde Hitze-denaturiert und der Prähybridisierungsmischung zugefügt und 18–24 Stunden bei 42 °C unter konstantem Schütteln hybridisieren lassen. Die Blots wurden in 2X SSC, 0,05 % SDS mehrmals bei Raumtemperatur gespült, bevor sie an eine Waschlösung, enthaltend 0,1X SSC, 0,1 % SDS transferiert und 40 Minuten bei 50 °C gerührt wurden. Die Blots wurden dann mit einer Kunststoffumhüllung abgedeckt und auf Whatman-Papier aufgezogen und bei –70 °C einem Röntgenfilm unter Verwendung einer Verstärkerfolie ausgesetzt.

6.1.2. REVERSE TRANSKRIPTION/POLYMERASE-KETTENREAKTION (RT/PCR)

[0104] Die Gesamt-RNA wurde unter Verwendung von Standard-Laborverfahren isoliert (Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, NY). Ca. 1 µg der Gesamt-RNA wurde revers transkribiert und die cDNA wurde mittels PCR amplifiziert (Perkin Elmer, Norwalk, CT). Die PCR-Amplifikationsbedingungen waren für Hu-B 1.219 und die Form-1-Expressionsanalyse die gleichen. Sie waren wie folgt: 30 sec bei 94 °C, 30 sec bei 60 °C, 30 sec bei 72 °C für insgesamt 40 Zyklen. Die amplifizierten Produkte (224 by für Hu-B 1.219 und 816 by für Form 1) wurden mittels der Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt und mittels Ethidiumbromid-Färbung sichtbar gemacht. Die spezifischen Amplimere der Form 1 waren GACTCATTGTGCAGTGTTCAG (oberes) und TAGTGGAGGGAGGGTCAGCAG (unteres). Das obere Amplimer wurde im Allgemeinen von allen 3 Formen geteilt, wohingegen das untere Amplimer Form 1-spezifisch war. Die OB-R-spezifischen (Form 4) Amplimere waren ACATCTTCCCAAATAGC (oberes) und TG-CCTGGGCCTCTATCTC (unteres).

6.2 ERGEBNISSE

[0105] Eine Anzahl von cDNA-Klonen wurde aus einer cDNA-Bibliothek der humanen fetalen Leber isoliert (Clontech, Palo Alto, CA) und die DNA-Sequenzen von mehreren dieser Klone wurden bestimmt. Diese Klone (bezeichnet als Hu-B1.219 Nr. 4, Nr. 33, Nr. 34, Nr. 1, Nr. 36, Nr. 8, Nr. 55, Nr. 60, Nr. 3, Nr. 57, Nr. 62) enthielten überlappende Sequenzen, welche dann in eine angrenzende Nukleotidsequenz kompiliert wurden. Sowohl die Nukleotidsequenz als auch die vorausgesagte Proteinsequenz aus einer solchen cDNA sind in [Fig. 1A–Fig. 1G](#) ersichtlich. Diese cDNA-Sequenz enthält zwei Domänen FN III, wobei jede eine „WS-Box“ enthält, die für Gene der HR-Familie charakteristisch sind. Folglich stellt diese cDNA ein neues Mitglied der HR-Genfamilie dar, auf die hierin als auf Hu-B1.219 (Tabelle 1) verwiesen wird. Basierend auf der in [Fig. 1A–Fig. 1G](#) dargestellten Sequenz von Hu-B1.219 erscheint die Translationsinitiierungsstelle an Position Nr. 97. Die Sequenz kodiert für einen offenen Leserahmen bis zu und einschließlich Nukleotid Nr. 2970. Es wird angenommen, dass die Sequenz von ca. Nukleotid Nr. 2629 bis ca. Nr. 2682 für eine Transmembrandomäne kodiert. Die komplette Sequenz kodiert für ein Protein von 958 Aminosäuren.

[0106] Der sich anschließende Aminosäuresequenz-Vergleich dieses Moleküls mit anderen veröffentlichten Proteinsequenzen ließ erkennen, das es hoch homolog mit einem kürzlich veröffentlichten humanen OB-R-Protein war (Tartaglia, 1995, Cell 83: 1263–1271). In diesem Zusammenhang unterscheidet sich die in [Fig. 1A–Fig. 1G](#) gezeigte Sequenz von Hu-B1.219 von der veröffentlichten humanen OB-R-Sequenz nur an drei Nukleotid-Positionen in der extrazellulären Domäne, d. h. den Nukleotidresten Nr. 349, Nr. 422 und Nr. 764, wobei sich die Aminosäuren Alanin, Arginin bzw. Arginin im Hu-B 1219-Protein ergeben. Die beiden Moleküle sind in der Transmembranregion und einem Anteil der intrazellulären Domäne bis zu und einschließlich Nukleotid Nr. 2769 identisch, dann divergieren sie am Nukleotid Nr. 2770 und darüber hinausgehend.

TABELLE 1

FN III-DOMÄNENGRÖSSEN (BP) DES CYTOKIN-REZEPTOR-GENS

Gen	Human	Maus	Ratte
Hu-B1.219 (5')	273		
Hu-B1.219 (3')	282		
IL-2R β	291	288	291
IL-2R γ	273		
IL-3R α	246	252	
IL-3R β Aic2a		306 und 273	
IL-3R β Aic2b	306 und 282	303 und 276	
IL-4R	294		291
IL-5R α	276	273	
IL-6R	288	285	
gp130	288	291	288
IL-7R		294	
IL-9R	321	321	
mpl		270	
G-CSFR	300	297	
GM-CSFR	288		
CNTRF	282		285
PRLR			288
EPOR	288	285	288
LIFR-1	321 und 297		

[0107] Außer der Sequenz in [Fig. 1A–Fig. 1G](#), auf die als Form 1 von Hu-B1.219 verwiesen wird und die variante Form, von der berichtet wird, dass es sich um OB-R handelt, wurden andere λ -Klone entdeckt, die unterschiedliche Sequenzen aus Form 1 in der Nähe des als Form 2 und Form 3 bekannten 3'-Endes enthielten. Alle drei Formen enthalten die identische Sequenz bis zu und einschließlich Nukleotid Nr. 2770, dann divergieren sie am Nukleotid Nr. 2771 und darüber hinausgehend ([Fig. 2](#)). Ein Alignment der deduzierten Aminosäuresequenzen von allen drei Formen und dem OB-R sind in [Fig. 3A–Fig. 3F](#) ersichtlich. Zwei der original isolierten λ -Klone, Nr. 36 und Nr. 8, enthalten die Sequenzen von Form 1 bzw. Form 2 am 3'-Ende. Die verschiedenen Formen von Hu-B1.219 können sich von einer gemeinsamen Präkursor-mRNA durch einen alternativen Spleißungsmechanismus herleiten. Die Sequenz in dieser Region ist konsistent mit überall bekannten Spleißverbindungsstellen. Es ist bemerkenswert, dass die DNA-Sequenz der Form 1 aus dem Nukleotid Nr. 2768 bis zum Ende bis zu 98 % identisch mit einer humanen Retrotransposon-Sequenz ist, von der angenommen wird, dass sie sich von einer humanen endogenen retroviralen DNA-Sequenz herleitet (Singer, 1982, Cell 28: 433; Weiner et al., 1986, Ann. Rev. Biochem. 55: 631; Lower et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 4480; Ono et al., 1987, Nucl. Acid Res. 15: 8725–8735).

[0108] Angesichts des Vorstehenden stellt der vor kurzem veröffentlichte humane OB-R von Tartaglia (1995, Cell 83: 1263) aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeiten mit den vorstehend erwähnten drei Formen ([Fig. 3A–Fig. 3F](#)) eine vierte Form von Hu-B1.219 dar. Obwohl es im OB-R drei Aminosäuresubstitutionen gibt, könnten sich solche Unterschiede als allele Disparitäten zwischen genetisch diversen Individuen ergeben haben. Die Unterschiede in ihren cytoplasmatischen Domänen könnten an den unterschiedlichen Signalwegen beteiligt sein, die von diesen Rezeptorvarianten in verschiedenen Zellen verwendet werden.

[0109] Zur Untersuchung der Expression der varianten Formen von cDNA wurde die RT/PCR unter Verwendung mehrerer humaner Zelllinien durchgeführt. Die Ergebnisse in Tabelle 2 zeigen, dass Form 1 als RNA in K-562-Zellen und in einer cDNA-Präparation von der humanen fetalen Leber exprimiert wurde. Da Hu-B1.219 aus der cDNA-Bibliothek von der humanen fetalen Leber kloniert wurde, diente dieses als eine positive Kontrolle. In Bezug auf mehrere andere humane Zelllinien wurde Form 1 jedoch nicht nachgewiesen, wohingegen die Hu-B 1.219-Expression positiv war. Form 1 wurde zum Beispiel nicht in KG1a-Zellen exprimiert, während Form 3 exprimiert wurde. Folglich ist es möglich, dass unterschiedliche Formen von Hu-B 1.219 nicht simultan in den gleichen Zellen exprimiert werden. Es könnte eine selektive Expression von bestimmten Formen in bestimmten Zellpopulationen vorliegen. Tabelle 3 zeigt zusätzlich eine Expression von Hu-B 1.219 in Zelllinien von diverser Herkunft, einschließlich hämatopoetisch, endothelial, des Zentralnervensystems (ZNS), der Brust und des Muskelgewebes. Interessant ist es, zur Kenntnis zu nehmen, dass die Variante (Hu-B 1.219.4), von der berichtet wurde, dass es sich um OB-R handelt, auch in diesen Zellen, insbesondere in hämatopoetischen Zelllinien, HEL und K562, nachgewiesen wird (Tabelle 3).

TABELLE 2

RT/PCR-ANALYSE DER VERGLEICHSEXPRESSION VON ZWEI HU-B 1.219-FORMEN

<u>Zelllinien</u>	<u>Hu-B1.219*</u>	<u>Form 1Δ</u>	<u>Form 3Δ</u>
MRC5 (Lungenfibroblast)	++	+/-	+
KG1a (Lymphoblast)	+	-	++
Raji (B-Zell-Lymphom)	+	-	+
Kit 225/K6 (T-Zelle)	+++	-	+
K562 (myeloische Leukämie)	++++	+++	++++
Humane fetale Leber (positive Kontrolle)	+++	+++	+++

* – Analyse mittels Northern-Blots

Δ – Analyse mittels RT/PCR

[0110] Verschiedene humane Gewebs-RNAs wurden mit einem radiomarkierten Hu-B 1.219-Fragment, das den Nukleotid-Nummern von Nr. 578 bis Nr. 1107 entspricht, wie in [Fig. 1A–Fig. 1G](#) für die Northern-Blot-Analysen offenbart, sondiert. Zwei mRNAs unterschiedlicher Größe wurden nachgewiesen. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass ein anderes homologes Gen vorliegen oder ein alternatives Spleißen eines einzelnen RNA-Transkripts vorhanden sein könnte. Die Hu-B 1.219-Expression war in humanen fetalen Geweben, insbesondere in der Leber und Lunge, bei weitem am stärksten. Spurenkonzentrationen wurden in mehreren adulten Geweben gefunden. Interessanterweise war eine chronisch myeloische Leukämie-Zelllinie, K562 (Tabelle 2), hinsichtlich ihrer Expression stark positiv, während auch in A549-Zellen, einer Lungenkarzinom-Zelllinie (Tabelle 4), etwas Expression nachgewiesen wurde. Ein repräsentativer Northern-Blot, der die Expression von Hu-B1.219 in mehreren humanen Geweben aufweist, ist in [Fig. 4](#) dargestellt. Unter Verwendung einer empfindlicheren PCR wurde Hu-B 1.219 auch im Knochenmark nachgewiesen.

TABELLE 3

EXPRESSION VON Hu-B1.219 IN ZELLINIEN MITTELS PCR

<u>Gewebetyp</u>	<u>Zelllinien</u>	<u>Hu-B1.219</u>	<u>Hu-B1.219.1</u>	<u>Hu-B1.219.4</u>
Hämatopoetisch	K562	++++	+++	++
	HEL	++++	++	++++
	Mo7e	+	+/-	-
Endothelial	HYSE	++++	++	++
	HYS-VS1	+	-	+
	HuVEC	++	+	-
	ECV304	++	+	-
ZNS	U188MG	++	+	-
	SF295	+	+	+/-
	U251	++	+	+
	SNB75	+	+	+
	U87MG	+++	++	++
	SNB19	++	+	+
	SF539	++	+	+
Brust	DU4475	++	++	++
	MCF-7	+	+	+/-
Muskelgewebe	143B	++	+	+
	fetaler Myoblast	+++	++	+++

Hu-B 1.219 verweist auf jedwede Membran-gebundenen Isoformen.

Hu-B 1219.1 verweist nur auf Form 1.

Hu-B 1.219.4 verweist auf die Isoform, von der berichtet wird, dass es sich um das humane OB-R handelt.

TABELLE 4

ZUSAMMENFASSUNG DER NORTHERN-BLOT-ANALYSE VON DER Hu-B 1.219-EXPRESSION IN HUMANEN GEWEBEN UND ZELLINIEN

Entwicklungsstufe	Gewebetyp	Expression
Fetal	Gehirn	-
	Lunge	+++
	Leber	+++++
	Niere	+
Adult	Herz	++
	Gehirn	+/-
	Plazenta	+
	Lunge	+
	Leber	+++
	Skelettmuskel	+
	Niere	+/-
	Pankreas	+
	Milz	+/-
	Thymus	+/-
	Prostata	++
	Hoden	+/-
	Ovar	+++
	Dünndarm	++
	Kolon	-
	Leukozyten im peripheren Blut	-
Krebs	HL-60	-
	HeLa	-
	K-562	+++
	MOLT-4	-
	Raji	-
	SW480	-
	A549	+
	G361	-

[0111] Zusammengekommen deuten die Daten darauf hin, dass Hu-B 1.219 ein neues Mitglied der humanen Hämatopoetin-Rezeptor-Familie darstellt. Es wurde ursprünglich aus einem hämatopoetischen Gewebe, der fetalen Leber, kloniert. Es wird durch bestimmte fetale Gewebe exprimiert und teilt sich die strukturelle Homologie mit mehreren Rezeptoren, die mit Liganden interagieren, die zur Beeinflussung der hämatopoetischen Entwicklung fähig sind. In dieser Beziehung teilt es eine bestimmte Sequenzhomologie mit dem/r IL-6R, IL-4R, G-CSFR, IL-3R- β -Kette, gp130, IL-12R und LIFR. Es enthält zwei „WS-Box“-Motive mit dem korrekten Abstand der konservierten Aminosäuren in den Domänen FN III, einer amphipathischen Sequenz in Block 3 der Domänen FN III und alternierend hydrophobe und basische Aminosäuren in Block 6 der Domänen FN III. Es enthält auch konservierte Cysteine in den Cystein-reichen Regionen oberstromig von den Domänen FN III.

[0112] Trotz seiner strukturellen Ähnlichkeiten mit Rezeptoren, die durch hämatopoetische Zellen exprimiert werden, ist die extrazelluläre Domäne von Hu-B 1.219 nahezu identisch mit der vom humanen OB-R, der im Gehirn exprimiert wird. Da faktisch drei variante Formen von Hu-B 1.219 isoliert wurden, die eine extensive Sequenzdiversität primär in ihren intrazellulären cytoplasmatischen Domänen aufweisen, kann der OB-R als eine zusätzliche Isoform des gleichen Rezeptors in Betracht gezogen werden. Die in Tabelle 3 ersichtlichen

Daten bestätigen weiter, dass der OB-R nicht nur in Zellen des Gehirns, sondern auch in hämatopoetischen und endothelialen Zellen exprimiert wird. Da Leptin an OB-R bindet, ist es folglich auch ein Ligand, der die Aktivierung bestimmter Isoformen von Hu-B 1.219 in hämatopoetischen und endothelialen Zellen triggern kann, die diese Rezeptorvarianten exprimieren.

7. BEISPIEL: HU-B1.219 WIRD DURCH LANGZEIT-REPOPULIERENDE HÄMATOPOETISCHE PROGENITORZELLEN EXPRIMIERT

7.1. MATERIALIEN UND VERFAHREN

7.1.1. RNA-EXTRAKTION UND cDNA-SYNTHESE

[0113] Die Gesamt-RNA wurde unter Verwendung des empfohlenen Verfahrens für das RNeasy-Kit (Qiagen, Crawley, UK) extrahiert. RNA wurde zu 1 µg/20 µl einer zufälligen mit Hexamer geprimten RT-cDNA-Synthesereaktion zugefügt. Die Mock-RT-Reaktionen wurden auch für jede der experimentellen Proben durchgeführt. Die RT-Reaktionen wurden 10 Minuten bei Raumtemperatur, 15 Minuten bei 42 °C, 5 Minuten bei 99 °C inkubiert und bei 4 °C gehalten. Alle PCR-Reagenzien wurden von Perkin Elmer (Foster City, California) bezogen.

7.1.2. PCR-BEDINGUNGEN

[0114] Die Qualität von jeder cDNA und Mock-cDNA wurde mittels des relativen Amplifikationsgrades des β-Aktin-Gens bestimmt. Die Bedingungen für die Aktin-Amplifikation betrugen 30 Sekunden bei 94 °C; 30 Sekunden bei 55 °C; 30 Sekunden bei 72 °C für 27 bis 30 Zyklen, gefolgt von einer 5-minütigen Verlängerung bei 72 °C und Halten bei 4 °C. Bei der DNA-Sequenz der β-Aktin-Primer handelte es sich um (vorwärts) 5'-GTGACGGCCAGAGCAAGAG-3' und (rückwärts) 5'-AGGGGCCGGACTCATCGTACTC-3'.

[0115] Die PCR-Amplifikationsbedingungen für das murine Homolog von Hu-B1.219 und CD34 betrugen 30 Sekunden bei 94 °C; 30 Sekunden bei 60 °C; 30 Sekunden bei 72 °C für 40 bis 45 Zyklen, gefolgt von einer 5-minütigen Verlängerung bei 72 °C und Halten bei 4 °C. Die Primer-Sequenzen für Hu-B 1.219 waren (vorwärts) 5'-GGTCAGAAGATGTGGGAAA-3' und (rückwärts) 5'-GTGCCCAGGAACAATTCTT-3'. Diese PCR-Primer amplifizierten sowohl humane als auch murine Sequenzen. Die humanen CD34-Primer-Sequenzen waren (vorwärts) 5'-CTCTTCTGTCCAGTCACAGACC-3' und (rückwärts) 5'-GAATAGCTCTGGTGGCTTGC-3'. Die murinen CD34-Primer-Sequenzen waren (vorwärts) 5'-CTACCACGGAGACTTCTACAC-3' und (rückwärts) 5'-TGGATCCCCAGCTTTCTCAA-3'. Die PCR-Produkte wurden auf einem 1,5%igen TAE-Agarosegel, enthaltend 0,5 µg Ethidiumbromid/ml Puffer analysiert.

[0116] Zusätzliche Primer zum Nachweis des murinen Homologs von Hu-B 1.219 waren (vorwärts) 5'-GT-CAGAAGATGTGG GAAA-3' und (rückwärts) 5'-GTGCCCAGGAACAATTCTT-3'. Die Primer, die den OB-R nachwiesen, waren (vorwärts) 5'-ATTATTTCTCTTGTGTCCTA-3' und (rückwärts) 5'-GTCTGATAAAAGG-AAAA ATGT-3'. Die Primer, die das murine Homolog von Form 3 von Hu-B1.219 amplifizierten, waren (vorwärts) 5'-GTCAGAAGATGTGGGAAA-3' und (rückwärts) 5'-AAGTTGGTAGATTGGGTTCA-3'. Die erwarteten PCR-Produkte waren wie folgt: ein 934-bp-Produkt für Aktin, 581-bp-Produkt für Hu-B1.219-Isoforme, 582 bp für den OB-R und ein 661-bp-Produkt für das murine Homolog von Form 3.

7.1.3. ES-ZELLKULTUREN

[0117] CCE-ES-Zellen wurden auf DMEM, enthaltend 15 % FBS und rLIF, aufrechterhalten. Zwei Tage vor der Initiierung der Differenzierung wurden die Zellen in IMDM, enthaltend 15 % FBS, passagiert. Am Tag null der Differenzierung wurden die Zellen trypsinisiert und in IMDM, enthaltend 15 % FBS, resuspendiert. Petrischalen (100 mm) wurden mit 4500 Zellen/ml beimpft. Die EB-Körper durften sich setzen und wurden an den angegebenen Tagen gesammelt.

7.2. ERGEBNISSE

[0118] Abschnitt 6.2 vorstehend stellt einen Hinureis dar, dass Hu-B 1.219 in hämatopoetischen und endothelialen Zellen exprimiert wird. In diesem Zusammenhang ist seine Expression in der fetalen Leber konsistent mit den hohen hämatopoetischen Aktivitäten in der fetalen Leber, und seine Expression in der fetalen Lunge ist konsistent mit der hochgradigen endothelialen Entwicklung in der fetalen Lunge. Zur präziseren Bestimmung der Expression von Hu-B 1.219 in verschiedenen Populationen hämatopoetischer Zellen wurden huma-

ne Knochenmarkzellen durch Zellsortieren basierend auf ihrer CD34-Expression auf hämatopoetischen Stammzellen hoch angereichert (Collins et al., 1994, *Stem Cells* 12: 577–585; Berenson, 1993, *J. Hematother.* 2: 347–349; Civin und Gore, 1993, *J. Hematother.* 2: 137–144). Wenn RNA, die aus humanem CD34⁺- und CD34⁻-Knochenmarkfraktionen extrahiert wurde, mit Hu-B 1.219-Primern mittels PCR zur Reaktion gebracht wurde, wurde in beiden Fraktionen eine Hu-B 1.219-Message nachgewiesen ([Fig. 5A](#)). Die Tatsache, dass nur die CD34⁺-Fraktion eine CD34-Message in der PCR exprimiert, weist auf die Reinheit der sortierten Population hin ([Fig. 5B](#)). Da die CD34-Fraktion mehrere Zelltypen enthielt, könnte die nachgewiesene Hu-B 1.219-Message von den endothelialen Zellen produziert worden sein. Als Alternative könnte Hu-B 1.219 gegebenenfalls von einer hämatopoetischen CD34⁻-Stammzelle exprimiert werden.

[0119] Die Expression von Fc-Rezeptoren (FcR) und AA4.1-Antigen in murinen fetalen Leberzellen wurde zur Definition von distinkten fetalen Leber-Präkursor-Zellsubpopulationen verwendet (Carlsson et al., 1995, *Eur. J. Immunol.* 25: 2308–2317; Jordan et al., 1995, *Exp. Hematol.* 23: 1011–1015; Trevisan und Iscove, 1995, *J. Exp. Med.* 181: 93–103). Das Sortieren muriner fetaler Leberzellen (Tag 12) basierend auf der Expression dieser beiden Marker resultierte in der Isolation einer kleinen (2–4 %) Subpopulation von AA4.1⁺- und FcR⁻-Zellen, die für primitive hämatopoetische Stammzellen hoch angereichert sind. Repopulationsexperimente mit Tieren haben gezeigt, dass fetale Leberzellen mit diesem Phänotyp ein langzeitiges Repopulationspotenzial nach dem adoptiven Transfer in Empfänger mit einem zerstörten lymphohämatopoetischen System enthalten. Deshalb wurden fetale Leberzellen, basierend auf Expression von AA4.1 und FcR, in verschiedene Fraktionen sortiert, und Primer, konzipiert aus Hu-B 1.219, die das murine Homolog der Hu-B 1.219-Message amplifizieren würden, wurden zum Nachweis seiner Expression verwendet. [Fig. 6A](#) und [Fig. 6B](#) zeigen, dass es sich bei der hoch angereicherten AA4.1⁺/FcR⁻-Subpopulation auf dieser Stufe um die einzige Population handelte, die das murine Homolog von Hu-B 1.219, exprimiert, wohingegen CD34-mRNA in allen getesteten Fraktionen nachgewiesen wurde. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass obwohl CD34 als ein Marker von humanen hämatopoetischen Progenitorzellen verwendet wurde, Hu-B 1.219 die langfristig repopulierenden Zellen in der CD34⁺-Fraktion mit größerer Spezifität markiert.

[0120] Außerdem wurde auch eine Expression des murinen Homologs von Hu-B 1.219 in der Subpopulation des murinen adulten Knochenmarks beobachtet, das nach Ly-6-Expression, aber negativ für mature Zelllinien-Marker, sortiert wurde. Dieses Fraktionierungsverfahren ist ein gut etabliertes Verfahren zur Isolation einer hoch gereinigten Population hämatopoetischer Stammzellen aus dem Knochenmark (Li et al., 1992, *J. Exp. Med.* 175: 1443–1447; Spangrude und Brooks, 1993, *Blood* 82: 3327–3332; Szilvassy und Cory, 1993, *Blood* 81: 2310–2320) dar. Überdies exprimierten murine fetale Leberzellen, die für langfristig repopulierende Zellen anhand eines vor kurzem entwickelten Verfahrens, das sich die Expression des Mac-1-Markers zunutze macht, angereichert wurden, auch das murine Homolog von Hu-B 1.219 (Morrison et al., 1995, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 10302–10306).

[0121] Zusammengefasst deuten die vorstehend erwähnten Studien an Mäusen und Menschen darauf hin, dass es sich bei Hu-B 1.219 um einen Marker einer Subpopulation von frühen Progenitorzellen in der CD34⁺-Fraktion handelt. Die Hu-B 1.219-Expression in langfristig repopulierenden Zellen erlaubt insbesondere seine Verwendung als einen Marker für ihre Isolation. In dieser Beziehung kann ein Antikörper-spezifisches Hu-B 1.219 oder Leptin allein oder in Kombination mit einem Progenitorzellspezifischen Antikörper, wie zum Beispiel Anti-CD34, verwendet werden. Humane Knochenmarkzellen können zum Beispiel zuerst in CD34⁺-Zellen getrennt werden, gefolgt von Sortieren von Hu-B 1.219 zum Erhalt dieser Progenitorzellen. Da die Hu-B 1.219-Expression außerdem in einer CD34⁻-Subpopulation nachgewiesen wird, kann sie auch als ein Marker zum Isolieren einer CD34⁻-Stammzelle verwendet werden.

[0122] Es wurde beschrieben, dass frühe embryonale Dottersackzellen das Potenzial besitzen, sowohl die Bildung hämatopoetischer als auch endothelialer Zellen veranlassen zu können (Wagner und Antczak, 1995, *WO 95/02038*). Im Dottersack produzieren endotheliale Zellen auch die Mikroumgebung für die hämatopoetische Differenzierung und Proliferation. Es ist wichtig, dass man zur Kenntnis nimmt, dass Dottersackzellen mit endotheliale Potenzial (Wei et al., 1995, *Stem Cells* 13: 541–547) auch eine Fähigkeit zur Expression des murinen Homologs von Hu-B 1.219 aufgewiesen haben. Deshalb können Hu-B 1.219 auch als ein Marker für endotheliale Progenitorzellen verwendet werden.

[0123] Embryonale Stammzell-(ES)-Differenzierungskulturen stellen ein in-vitro-Modell der erythroiden Entwicklung aus nicht hämatopoetischen Präkursoren dar (Schmitt et al., *Genes Dev.* 5: 728–740). Da sich ES-Zellen in embryoide Körper (EB) differenzieren, treten die ersten erythroiden Präkursoren am Tag 4 (T4) der Differenzierung in Erscheinung und nehmen hinsichtlich der Frequenz bis zum T6 zu (Keller et al., 1993, *Mol. Cell. Biol.* 13: 473). Die Expression von Hu-B 1.219 wurde während der ES-Differenzierung zur Korrelation

seiner Expression mit erythropoetischer Differenzierung bewertet. Die Hu-B 1.219-Variante OB-R wurde erstmals am T 3,5 nachgewiesen und nahm bis zum T6 der Differenzierung graduell zu ([Fig. 7A](#) und B). Dieses Expressionsmuster lief parallel mit dem dokumentierten Auftreten der kommittierten erythroiden Präkursoren, die sich zu EB entwickeln.

[0124] Die ersten hämatopoetischen Präkursoren treten in vivo im Dottersack nach 7- bis 8-tägiger Entwicklung auf. Am T12 der Gestation der Maus wird die fetale Leber zum primären Ort der Erythropoese (Hara und Ogawa, 1977, Exp. Hematol. 5: 141; Moore und Metcalf 1970, Br. J. Haematol. 18: 279). Dieser Ablauf setzt sich bis zum Tag 18 fort, wenn die hämatopoetische Aktivität in das Knochenmark migriert. Die RT-PCR zeigte, dass sowohl der OB-R als auch Hu-B 1219 Form 3 im Dottersack ([Fig. 7C](#) und D) und in der fetalen Leber ([Fig. 7E](#) und F) in Konzentrationen exprimiert wurden, die der hämatopoetischen Entwicklung entsprechen.

8. BEISPIEL: REKOMBINANTES LEPTIN STIMULIERT DIE KOLONIENBILDUNG IM KNOCHENMARK

8.1. MATERIALIEN UND VERFAHREN

8.1.1. PRODUKTION DES REKOMBINANTEN LEPTINS

[0125] Die Gesamt-RNA wurde unter Verwendung des RNazol-Verfahrens aus braunem Fettgewebe aus C57B-Mäusen isoliert. Die RT-PCR wurde unter Verwendung des „High Fidelity PCR Systems“ von Boehringer Mannheim durchgeführt. Die PCR-Primer: murines Leptin (mOB) U462 GGAATTCATATGGTGCCTATCCAG-AA und L462 GCGGATCCTCAGCATTCAGGGCTAA wurden basierend auf der Genbank-Sequenz U18812 konzipiert (Zhang et al., 1994, Nature 372: 425–432). Das PCR-Produkt wurde unter Verwendung der Promega Wizard-Säule gereinigt. Das PCR-Fragment wurde mit NdeI und BamHI geschnitten und in den NdeI-BamHI-gespaltenen pET15b-Vektor (Novagen) kloniert. Die Klone wurden zunächst im E. coli-Stamm DH10B (GibcoBRL) erhalten, dann an den BL21 (DE3)-Wirt (Novagen) zur Produktion transferiert. Es wurden zwei Spleißvarianten von mOB identifiziert: Eine, die eine einzelne Glutamin-Aminosäure am Rest Nr. 49 vom Initiator-Met fehlte und eine, die ein Glutamin an dieser Position aufwies. Proteine wurden aus beiden Klonen hergestellt. Murines Leptin wurde in E. coli als ein Fusionsprotein mit Polyhistidin am Aminoterminus hergestellt. Rekombinantes murines Leptin wurde als unlösliche Einschlusskörper hergestellt und wie in Sambrook et al., vorstehend beschrieben, gereinigt. Das unlösliche Material wurde zur Rekonstitution von biologisch aktivem Leptin denaturiert und „refolded“. Die Einschlusskörper wurden in 8 M Harnstoff plus 100 mM DTT 2 h bei Raumtemperatur aufgelöst, 1:100 in einem „Refolding-Reaktionspuffer“ (100 mM Tris, pH 8,3, 100 mM (NH₄)SO₄, 100 µM Triton X100, 2 mM reduziertem Glutathion, 0,4 mM oxidiertem Glutathion) verdünnt und 3 bis 5 Tage bei 4 °C inkubiert. Das refolded Leptin wurde durch Zufügen des Histidin-Bindungsharzes (Novagen) über 1 h zurückgewonnen. Das Harz wurde durch Zentrifugation zurückgewonnen, mit „Bindungspuffer“ von Novagen und mit „Waschpuffer“ von Novagen gespült. Das Leptin wurde aus dem Harz mit „Elutionspuffer“ von Novagen plus 1 M Imidazol eluiert. Der abschließende Schritt beinhaltete die Dialyse in PBS. Gewerblich erhältliches HPLC-gereinigtes Leptin (Peprotech Inc., Rocky Hill, NJ) wurde auch mit ähnlichen Ergebnissen verwendet.

8.1.2. METHYLCELLULOSE-KOLONIEN-BILDENDE ASSAYS

[0126] Adulte Knochenmarkzellen wurden aus normalen weiblichen C5-7BL/6-Mäusen, ob/ob-Mäusen und db/db-Mäusen isoliert. Außerdem wurden auch die murine fetale Leber- und Dottersackzellen ebenso wie humane Knochenmarkzellen anhand üblicher Verfahren isoliert. Ca. 1×10^6 lebensfähige Zellen wurden in Iscove's modifiziertem Dulbecco's Medium (IMDM) mit 0,5 bis 15 % fetalem Kalbserum (FCS) isoliert.

[0127] Die Zellen ($1-100 \times 10^3/\text{ml}$) wurden dann mit IMDM, das Methylcellulose (1,3 %) (Sawyer-Biddle, NY, NY), FCS (4 %), BSA (1 %), Monothioglycerol (100 µM), Gentamicin (50 µg/ml), gereinigtes rekombinantes Leptin (1 ng/ml) enthielt, mit oder ohne IL-3 (100 pg/ml), GM-CSF (1 ng/ml) oder EPO (2 E/ml) gemischt. Nach dem Mischen wurde 1 ml des Gemischs in Kulturplatten (25 mm) von Bakteriengütegrad mehrere Tage bei 37 °C in einem angefeuchteten Inkubator dispensiert. Unter Verwendung eines invertierten Mikroskops wurden CFU-E, BFU-E und GEMM ≥ 4 Zellen an ca. Tag 3, 10 bzw. 13 gezählt (Metcalf 1984, Clonal Culture of Hematopoietic Cells: Techniques and Applications, Elsevier, N.Y.; Freshney, 1994, in Culture of Hematopoietic Cells, Wiley-Liss, Inc., S. 265–68).

8.1.3. PROLIFERATIONSASSAYS

[0128] Der murine Dottersack und die fetale Leber wurden aus Mausembryos am T10 bzw. T14 isoliert und mechanisch in einzelne Zellen dispergiert. Mikrotiterplatten wurden mit $2,5 \times 10^4$ Zellen in 50 µl IMDM, enthal-

tend 2 % FBS, beimpft und mit den angezeigten Cytokinen (R & D, Minneapolis, MN) gepulst. Die Platten wurden 72 h bei 37 °C mit 5 % CO₂ inkubiert. Die Zellzahlen wurden unter Verwendung eines kolorimetrischen MTS-Assays (Promega, Madison, WI) gemessen.

8.2. ERGEBNISSE

[0129] Da Dottersack- und fetale Leberzellen Hu-B 1.219-Rezeptoren exprimieren, wurde rekombinantes Leptin auf seine Fähigkeit getestet, diese Zellen zur Proliferation zu stimulieren. In Kulturen stimulierte Leptin signifikant das Wachstum der Dottersack- ([Fig. 8A](#)) wie auch der fetalen Leberzellen ([Fig. 8B](#)) auf eine dosisabhängige Weise. Am Tag 13 der Entwicklung exprimieren 80–90 % der fetalen Leberzellen Ter119, einen Marker der erythroiden Zellreihe der späten Stufe (Okuta et al., 1990, Cell 62: 863). Sortieranalysen deuteten darauf hin, dass sich die auf Leptin ansprechenden Zellen auf dieser Stufe in der Ter119-negativen Subpopulation befanden, aber nach einer 4-tägigen Kultur dieser Population mit Leptin eine 4fache Steigerung der Frequenz der Zellen auftrat, die Makrophagen-/Monozyten-Marker exprimierten, Mac-1 (CD11b) und F4/80, was darauf hindeutet, dass Leptin die myeloide Zellreihe stimulierte.

[0130] Methylcellulose-Kolonien-Assays wurden zur weiteren Bewertung der von Leptin betroffenen hämatopoetischen Zellreihen verwendet. Leptin stimulierte die Zellreihen-kommittierten Kolonienbildenden Präkursoren der Makrophagen- und Neutrophilen-Zellreihen sowohl aus der fetalen Leber ([Fig. 9A–C](#)) als auch dem adulten Knochenmark ([Fig. 10A–C](#)). Die einzige Situation, in der Nichtzellreihenkommittierte Präkursoren stimuliert wurden, wurde in ES-Differenzierungskulturen und GM aus dem Knochenmark beobachtet. In ES-Zellkulturen stimulierte Leptin einen bipotenziellen „E/Mac“-Präkursor, der die Fähigkeit besaß, sowohl die erythroiden als auch Makrophagen-Zellreihen ([Fig. 11A](#) und B) zu produzieren. Die Erythroid-/Makrophagen-Response erforderte das Zufügen des Steel-Faktors (SLF), während dies für die Makrophagen-Response nicht notwendig war. Obwohl diese Kulturen bei niedriger bis mittelgradiger Zelldichte durchgeführt wurden, ist bisher nicht klar, ob sich diese Kolonien aus einzelnen Präkursoren oder einer Kombination von Präkursoren ergaben.

[0131] Methylcellulose-Kolonien-Assays, die sich adultes Knochenmark zunutze machen, wiesen außerdem darauf hin, dass Leptin allein die Anzahl an Makrophagen-Kolonien steigerte und mit EPO zur Stimulation der Colony Forming Unit-Erythroid (CFU-E) ([Fig. 12A](#) und B) synergisierte. Obwohl der Effekt auf CFU-E EPO-abhängig war, verdoppelte sich die Anzahl von Kolonien im Vergleich zu der, die mit Sättigungskonzentrationen von EPO allein beobachtet wurde. Die Nichtansprechbarkeit des Marks von db/db-Mäusen, deren Mutation in der dramatisch reduzierten Expression des OB-R resultierte, auf Leptin, wies auf die direkte Beteiligung von dem Hu-B 1.219 am beobachteten Effekt hin und zeigt an, dass der Effekt von Leptin abhängig ist und keinen Kontaminanten der Präparation darstellt. Die CFU-E-Zählungen in diesen Experimenten verhielten sich in Bezug auf die Input-Zellzahl linear, was auf einen direkten Effekt von Leptin auf die CFU-E deutet. Leptin und EPO stimulierten außerdem die CFU-E-Zahl aus normalem humanem Knochenmark synergistisch, obwohl EPO erforderlich ist, um jedwede stimulatorischen Effekte zu induzieren ([Fig. 13](#)).

[0132] Wenn normale Knochenmarkzellen von der Maus mit Leptin in Anwesenheit von IL-3, GM-CSF und EPO inkubiert wurden, wurde auch eine um das zweifache Steigerung der CFU-E-Zahl im Vergleich zu den Zellen beobachtet, die mit Medium, enthaltend die Cytokine außer Leptin, stimulierten. Leptin verursachte auch eine erhöhte CFU-E-Zahl aus dem Knochenmark von ob/ob-Mäusen. Im Gegensatz dazu stimulierte Leptin nicht CFU-E aus dem Knochenmark von db/db-Mäusen, eine Beobachtung, die mit der eines aberranten OB-R, der von solchen Tieren exprimiert wird, konsistent ist (Chen et al., 1996 Cell 84: 491–495).

[0133] Schlussfolgernd sei gesagt, dass der Hu-B1.219/OB-R nicht nur in frühen hämatopoetischen Progenitorzellen exprimiert wird, sondern dass er diese Zellen für die Stimulation mit Leptin ansprechbar macht, was zur Zellproliferation und -differenzierung zu Zelltypen von diversen hämatopoetischen Zellreihen führt. Folglich handelt es sich bei Leptin um einen Wachstums- und Differenzierungsfaktor der hämatopoetischen Progenitorzellen.

9. HINTERLEGUNG VON MIKROORGANISMEN

[0134] Die folgenden Organismen wurden bei der American Type Culture Collection (ATCC), 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, hinterlegt.

<u>Stammbezeichnung</u>	<u>Zugangsnummer</u>
Hu-B1.219, Nr. 1	75885
Hu-B1.219, Nr. 4	75886
Hu-B1.219, Nr. 8	75887
Hu-B1.219, Nr. 33	75888
Hu-B1.219, Nr. 34	75889
HU-B1.219, Nr. 36	75890
Hu-B1219, Nr. 55	75971
Hu-B1.219, Nr. 60	75973
Hu-B1.219, Nr. 3	75970
Hu-B1.219, Nr. 57	75972
Hu-B1.219, Nr. 62	75974

[0135] Der Umfang der vorliegenden Erfindung ist durch die beispielhaften Ausführungsformen, die zur Erläuterung erfindungsgemäßer individueller Aspekte bestimmt sind, nicht eingeschränkt. In der Tat wird der Fachmann aus der vorstehenden Beschreibung und den beiliegenden Zeichnungen verschiedene erfindungsgemäße Modifikationen zusätzlich zu den hierin gezeigten und beschriebenen erkennen. Es besteht die Absicht, dass diese Modifikationen in den Umfang der anhängenden Ansprüche fallen.

[0136] Alle hierin zitierten Veröffentlichungen sind unter Bezugnahme vollständig eingeschlossen.

MICROORGANISMSOptional Sheet in connection with the microorganism referred to on page 54, lines 1-30 of the description ***A. IDENTIFICATION OF DEPOSIT ***

Further deposits are identified on an additional sheet *

Name of depositary institution *

American Type Culture Collection

Address of depositary institution (including postal code and country) *

12301 Parklawn Drive
Rockville, MD 20852
USDate of deposit * September 14, 1994 Accession Number * 75885**B. ADDITIONAL INDICATIONS *** (leave blank if not applicable). This information is continued on a separate attached sheet**C. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE *** (If the indications are not all designated States)**D. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS *** (leave blank if not applicable)The indications listed below will be submitted to the International Bureau later * (Specify the general nature of the indications e.g.,
Accession Number of Deposit)E. ☐ This sheet was received with the International application when filed (to be checked by the receiving Office)_____
(Authorized Officer)☐ The date of receipt (from the applicant) by the International Bureau *

was

(Authorized Officer)

International Application No: PCT/ /

Form PCT/RO/134 (cont.)

American Type Culture Collection

12301 Parklawn Drive
Rockville, MD 20852
US

<u>Accession No.</u>	<u>Date of Deposit</u>
75886	September 14, 1994
75887	September 14, 1994
75888	September 14, 1994
75889	September 14, 1994
75890	September 14, 1994
75971	December 14, 1994
75973	December 14, 1994
75970	December 14, 1994
75972	December 14, 1994
75974	December 14, 1994

Patentansprüche

1. In-vitro-Verfahren zur Aktivierung hämatopoetischer Zellen, umfassend die Exposition hämatopoetischer Zellen gegenüber einer wirksamen Leptin-Konzentration, vorausgesetzt, dass sich die Zellen nicht vom humanen Embryo herleiten.

2. Verfahren nach Anspruch 1, worin die hämatopoetischen Zellen aus dem Knochenmark erhalten werden.

3. Verfahren nach Anspruch 1, worin die hämatopoetischen Zellen aus dem peripheren Blut erhalten werden.

4. Verfahren nach Anspruch 1, worin die hämatopoetischen Zellen aus der Nabelschnur erhalten werden.

5. Verfahren nach Anspruch 1, worin die hämatopoetischen Zellen aus dem embryonalen Dottersack erhalten werden.

6. Verfahren nach Anspruch 1, worin die hämatopoetischen Zellen aus der fetalen Leber erhalten werden.

7. Verfahren nach Anspruch 1, worin die hämatopoetischen Zellen CD34 exprimieren.

8. Verfahren nach Anspruch 1, worin die hämatopoetischen Zellen Hu-B1.219 exprimieren.

9. Verfahren nach Anspruch 1, worin die hämatopoetischen Zellen gegenüber dem Leptin in Kombination mit einem oder mehr Cytokin(en) exponiert werden.

10. Verfahren nach Anspruch 9, worin das Cytokin für IL-1, IL-3, IL-6, EPO, den Steel-Faktor, LIF oder GM-CSF steht.

11. Verfahren nach Anspruch 1, worin die aktivierten hämatopoetischen Zellen proliferieren.

12. Verfahren nach Anspruch 1, worin sich die aktivierten hämatopoetischen Zellen differenzieren.

13. Verfahren nach Anspruch 12, worin sich die aktivierten hämatopoetischen Zellen in myeloide Zellen differenzieren.
14. Verfahren nach Anspruch 13, worin die myeloiden Zellen Makrophagen darstellen.
15. Verfahren nach Anspruch 13, worin die myeloiden Zellen Neutrophile darstellen.
16. Verfahren nach Anspruch 12, worin sich die aktivierten hämatopoetischen Zellen in Erythrozyten differenzieren.
17. Verwendung von Leptin zur Herstellung eines Arzneimittels zur Verstärkung der hämatopoetischen Zellfunktion in einem Patienten.
18. Verwendung nach Anspruch 17, worin der Patient an Immundefizienz leidet.
19. Verwendung nach Anspruch 17, worin der Patient an Anämie leidet.
20. Verwendung nach Anspruch 18, worin der Patient an myeloider Defizienz leidet.
21. Verwendung nach Anspruch 17 zur Verabreichung mit einem oder mehr Cytokin(en).
22. Verwendung nach Anspruch 21, worin das Cytokin für IL-1, IL-3, IL-6, EPO, den Steel-Faktor, LIF oder GM-CSF steht.
23. Verwendung von Leptin zur Herstellung eines Arzneimittels zum Enhancement des Spenderzell-Engraftments in einem Patienten nach einer Transplantation von Spenderknochenmark.
24. Verwendung nach Anspruch 23 zur Verabreichung mit einem oder mehr Cytokin(en).
25. Verwendung nach Anspruch 24, worin das Cytokin für IL-1, IL-3, IL-6, EPO, den Steel-Faktor, LIF oder GM-CSF steht.
26. Verwendung von Leptin zur Herstellung eines Arzneimittels zur Förderung der Angiogenese in einem Patienten.
27. Verwendung nach Anspruch 26, worin Leptin mit einem oder mehr Cytokin(en) verabreicht wird.
28. Verwendung nach Anspruch 27, worin das Cytokin für FGF, VEGF, EGF, PDGF oder TGF steht.
29. Verwendung von Leptin zur Herstellung eines Arzneimittels zur Förderung der Vaskulogenese in einem Patienten,
30. Verwendung nach Anspruch 29, worin Leptin mit einem oder mehr Cytokin(en) verabreicht wird.
31. Verwendung nach Anspruch 30, worin das Cytokin für FGF, VEGF, EGF, PDGF oder TGF steht.
32. In-vitro-Verfahren zur Identifikation hämatopoetischer Progenitorzellen in einem Zellgemisch, umfassend das Kontaktieren des Zellgemischs mit einem Mittel, das an Hu-B 1.219-Protein bindet und Auswahl der an das Mittel gebundenen Zellen.
33. Verfahren nach Anspruch 32, worin das Mittel einen Antikörper oder ein Fragment davon darstellt.
34. Verfahren nach Anspruch 32, worin das Mittel Leptin oder ein Fragment davon darstellt.
35. In-vitro-Verfahren zum Nachweis von hämatopoetischen Progenitorzellen in einem Zellgemisch, umfassend:
 - a) Extrahieren von RNA aus dem Zellgemisch;
 - b) Kontaktieren der RNA mit einem Oligonukleotid, das sich von einem Anteil der in [Fig. 1A–Fig. 1G](#) erläuterten Sequenz herleitet, und
 - c) Nachweis der Hybridisierung der RNA mit dem Oligonukleotid.

36. In-vitro-Verfahren zur Identifikation von hämatopoetischen Progenitorzellen in einem Gewebe, umfassend:

- a) Kontaktieren eines Gewebes mit einem Oligonukleotid, das sich von einem Anteil der in [Fig. 1A–Fig. 1G](#) hinterlegten Sequenz herleitet; und
- b) Nachweis der Hybridisierung der RNA mit dem Oligonukleotid.

37. Verwendung von Leptin zur Herstellung eines Arzneimittels zur Förderung der Wundheilung durch Induktion der Makrophagen-Aktivierung.

Es folgen 25 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

9	18	27	36	45	54
GCG CGC	GCG ACG CAG	GTG CCC GAG CCC	CGG CCC GCG CCC	ATC TCT GCC TTC	GGT
...
A R	A T Q V P E	P R P A P I	S A F	G	
63	72	81	90	99	108
CGA GTT GGA CCC	CCG GAT CAA GGT	GTA CTT CTC TGA AGT	AAG ATG ATT TGT	CAA	
...
R V G P P D Q G	V L L *	S K M I C Q			
117	126	135	144	153	162
AAA TTC TGT GTG GTT	TTG TTA CAT TGG GAA	TTT ATT TAT GTG ATA	ACT GCG TTT		
...
K F C V V L L H W E F I Y V I T A F					
171	180	189	198	207	216
AAC TTG TCA TAT CCA ATT ACT	CCT TGG AGA TTT AAG TTG	TCT TGC ATG CCA CCA			
...
N L S Y P I T P W R F K L S C M P P					
225	234	243	252	261	270
AAT TCA ACC TAT GAC TAC TTC	CTT TTG CCT GCT GGA CTC	TCA AAG AAT ACT TCA			
...
N S T Y D Y F L L P A G L S K N T S					
279	288	297	306	315	324
AAT TCG AAT GGA CAT TAT GAG	ACA GCT GTT GAA CCT AAG	TTT AAT TCA AGT GGT			
...
N S N G H Y E T A V E P K F N S S G					
333	342	351	360	369	378
ACT CAC TTT TCT AAC TTA TCC	AAA GCA ACT TTC CAC TGT	TGC TTT CGG AGT GAG			
...
T H F S N L S K A T F H C C F R S E					
387	396	405	414	423	432
CAA GAT AGA AAC TGC TCC TTA	TGT GCA GAC AAC ATT GAA	GGA AGG ACA TTT GTT			
...
Q D R N C S L C A D N I E G R T F V					

FIG.1A

441	450	459	468	477	486
TCA ACA GTA AAT TCT	TTA GTT TTT CAA CAA	ATA GAT GCA AAC	TGG AAC ATA CAG		
....
S T V N S	L V F Q Q	I D A N W	N I Q		
495	504	513	522	531	540
TGC TGG CTA AAA GGA	GAC TTA AAA TTA	TTC ATC TGT TAT	GTG GAG TCA TTA	TTT	
....
C W L K G	D L K L F	I C Y V E	S L F		
549	558	567	576	585	594
AAG AAT CTA TTC AGG	AAT TAT AAC TAT	AAG GTC CAT CTT	TTA TAT GTT CTG	CCT	
....
K N L F R	N Y N Y K	V H L L Y	V L P		
603	612	621	630	639	648
GAA GTG TTA GAA GAT	TCA CCT CTG GTT	CCC CAA AAA GGC	AGT TTT CAG ATG	GTT	
....
E V L E D	S P L V P	Q K G S F	Q M V		
657	666	675	684	693	702
CAC TGC AAT TGC AGT	GTT CAT GAA TGT	TGT GAA TGT CTT	GTG CCT GTG CCA	ACA	
....
H C N C S	V H E C C	E C L V P	V P T		
711	720	729	738	747	756
GCC AAA CTC AAC GAC	ACT CTC CTT ATG	TGT TTG AAA ATC	ACA TCT GGT GGA	GTA	
....
A K L N D	T L L M C	L K I T S	G G V		
765	774	783	792	801	810
ATT TTC CGG TCA CCT	CTA ATG TCA GTT	CAG CCC ATA AAT	ATG GTG AAG CCT	GAT	
....
I F R S P	L M S V Q	P I N M V	K P D		
819	828	837	846	855	864
CCA CCA TTA GGT TTG	CAT ATG GAA ATC	ACA GAT GAT GGT	AAT TTA AAG ATT	TCT	
....
P P L G L	H M E I T	D D G N L	K I S		

FIG.1B

873	882	891	900	909	918
TGG TCC AGC CCA CCA TTG GTA CCA TTT CCA CTT CAA TAT CAA GTG AAA TAT TCA					
...
W S S P P L V P F P L Q Y Q V K Y S					
927	936	945	954	963	972
GAG AAT TCT ACA ACA GTT ATC AGA GAA GCT GAC AAG ATT GTC TCA GCT ACA TCC					
...
E N S T T V I R E A D K I V S A T S					
981	990	999	1008	1017	1026
CTG CTA GTA GAC AGT ATA CTT CCT GGG TCT TCG TAT GAG GTT CAG GTG AGG GGC					
...
L L V D S I L P G S S Y E V Q V R G					
1035	1044	1053	1062	1071	1080
AAG AGA CTG GAT GGC CCA GGA ATC TGG AGT GAC TGG AGT ACT CCT CGT GTC TTT					
...
K R L D G P G I W S D W S T P R V F					
1089	1098	1107	1116	1125	1134
ACC ACA CAA GAT GTC ATA TAC TTT CCA CCT AAA ATT CTG ACA AGT GTT GGG TCT					
...
T T Q D V I Y F P P K I L T S V G S					
1143	1152	1161	1170	1179	1188
AAT GTT TCT TTT CAC TGC ATC TAT AAG AAG GAA AAC AAG ATT GTT CCC TCA AAA					
...
N V S F H C I Y K K E N K I V P S K					
1197	1206	1215	1224	1233	1242
GAG ATT GTT TGG TGG ATG AAT TTA GCT GAG AAA ATT CCT CAA AGC CAG TAT GAT					
...
E I V W W M N L A E K I P Q S Q Y D					
1251	1260	1269	1278	1287	1296
GTT GTG AGT GAT CAT GTT AGC AAA GTT ACT TTT TTC AAT CTG AAT GAA ACC AAA					
...
V V S D H V S K V T F F N L N E T K					

FIG.1C

1305	1314	1323	1332	1341	1350
CCT CGA GGA AAG TTT ACC TAT GAT GCA GTG TAC TGC TGC AAT GAA CAT GAA TGC					
...
P R G K F T Y D A V Y C C N E H E C					
1359	1368	1377	1386	1395	1404
CAT CAT CGC TAT GCT GAA TTA TAT GTG ATT GAT GTC AAT ATC AAT ATC TCA TGT					
...
H H R Y A E L Y V I D V N I N I S C					
1413	1422	1431	1440	1449	1458
GAA ACT GAT GGG TAC TTA ACT AAA ATG ACT TGC AGA TGG TCA ACC AGT ACA ATC					
...
E T D G Y L T K M T C R W S T S T I					
1467	1476	1485	1494	1503	1512
CAG TCA CTT GCG GAA AGC ACT TTG CAA TTG AGG TAT CAT AGG AGC AGC CTT TAC					
...
Q S L A E S T L Q L R Y H R S S L Y					
1521	1530	1539	1548	1157	1566
TGT TCT GAT ATT CCA TCT ATT CAT CCC ATA TCT GAG CCC AAA GAT TGC TAT TTG					
...
C S D I P S I H P I S E P K D C Y L					
1575	1584	1593	1602	1611	1620
CAG AGT GAT GGT TTT TAT GAA TGC ATT TTC CAG CCA ATC TTC CTA TTA TCT GGC					
...
Q S D G F Y E C I F Q P I F L L S G					
1629	1638	1647	1656	1665	1674
TAC ACA ATG TGG ATT AGG ATC AAT CAC TCT CTA GGT TCA CTT GAC TCT CCA CCA					
...
Y T M W I R I N H S L G S L D S P P					
1683	1692	1701	1710	1719	1728
ACA TGT GTC CTT CCT GAT TCT GTG GTG AAG CCA CTG CCT CCA TCC AGT GTG AAA					
...
T C V L P D S V V K P L P P S S V K					

FIG.1D

1737	1746	1755	1764	1773	1782
GCA GAA ATT ACT	ATA AAC ATT GGA	TTA TTG AAA ATA	TCT TGG GAA AAG	CCA GTC	
.....
A E I T	I N I G	L L K I	S W E K	P V	
1791	1800	1809	1818	1827	1836
TTT CCA GAG AAT	AAC CTT CAA TTC	CAG ATT CGC TAT	GGT TTA AGT GGA	AAA GAA	
.....
F P E N	N L Q F	Q I R Y	G L S G	K E	
1845	1854	1863	1872	1881	1890
GTA CAA TGG AAG	ATG TAT GAG GTT	TAT GAT GCA AAA	TCA AAA TCT GTC	AGT CTC	
.....
V Q W K	M Y E V	Y D A K	S K S V	S L	
1899	1908	1917	1926	1935	1944
CCA GTT CCA GAC	TTG TGT GCA GTC	TAT GCT GTT CAG	GTG CGC TGT AAG	AGG CTA	
.....
P V P D	L C A V	Y A V Q	V R C K	R L	
1953	1962	1971	1980	1989	1998
GAT GGA CTG GGA	TAT TGG AGT AAT	TGG AGC AAT CCA	GCC TAC ACA GTT	GTC ATG	
.....
D G L G	Y W S N	W S N P	A Y T V	V M	
2007	2016	2025	2034	2043	2052
GAT ATA AAA GTT	CCT ATG AGA GGA	CCT GAA TTT TGG	AGA ATA ATT AAT	GGA GAT	
.....
D I K V	P M R G	P E F W	R I I N	G D	
2061	2070	2079	2088	2097	2106
ACT ATG AAA AAG	GAG AAA AAT GTC	ACT TTA CTT TGG	AAG CCC CTG ATG	AAA AAT	
.....
T M K K	E K N V	T L L W	K P L M	K N	
2115	2124	2133	2142	2151	2160
GAC TCA TTG TGC	AGT GTT CAG AGA	TAT GTG ATA AAC	CAT CAT ACT TCC	TGC AAT	
.....
D S L C	S V Q R	Y V I N	H H T S	C N	

FIG.1E

2169	2178	2187	2196	2205	2214
GGA ACA TGG TCA GAA GAT GTG GGA AAT CAC ACG AAA TTC ACT TTC CTG TGG ACA					
...
G T W S E D V G N H T K F T F L W T					
2223	2232	2241	2250	2259	2268
GAG CAA GCA CAT ACT GTT ACG GTT CTG GCC ATC AAT TCA ATT GGT GCT TCT GTT					
...
E Q A H T V T V L A I N S I G A S V					
2277	2286	2295	2304	2313	2322
GCA AAT TTT AAT TTA ACC TTT TCA TGG CCT ATG AGC AAA GTA AAT ATC GTG CAG					
...
A N F N L T F S W P M S K V N I V Q					
2331	2340	2349	2358	2367	2376
TCA CTC AGT GCT TAT CCT TTA AAC AGC AGT TGT GTG ATT GTT TCC TGG ATA CTA					
...
S L S A Y P L N S S C V I V S W I L					
2385	2394	2403	2412	2421	2430
TCA CCC AGT GAT TAC AAG CTA ATG TAT TTT ATT ATT GAG TGG AAA AAT CTT AAT					
...
S P S D Y K L M Y F I I E W K N L N					
2439	2448	2457	2466	2475	2484
GAA GAT GGT GAA ATA AAA TGG CTT AGA ATC TCT TCA TCT GTT AAG AAG TAT TAT					
...
E D G E I K W L R I S S S V K K Y Y					
2493	2502	2511	2520	2529	2538
ATC CAT GAT CAT TTT ATC CCC ATT GAG AAG TAC CAG TTC AGT CTT TAC CCA ATA					
...
I H D H F I P I E K Y Q F S L Y P I					
2547	2556	2565	2574	2583	2592
TTT ATG GAA GGA GTG GGA AAA CCA AAG ATA ATT AAT AGT TTC ACT CAA GAT GAT					
...
F M E G V G K P K I I N S F T Q D D					

FIG.1F

2601	2610	2619	2628	2637	2646
ATT GAA AAA CAC CAG AGT GAT GCA GGT TTA TAT GTA ATT GTG CCA GTA ATT ATT					
...
I E K H Q S D A G L Y V I V P V I I					
2655	2664	2673	2682	2691	2700
TCC TCT TCC ATC TTA TTG CTT GGA ACA TTA TTA ATA TCA CAC CAA AGA ATG AAA					
...
S S S I L L L G T L L I S H Q R M K					
2709	2718	2727	2736	2745	2754
AAG CTA TTT TGG GAA GAT GTT CCG AAC CCC AAG AAT TGT TCC TGG GCA CAA GGA					
...
K L F W E D V P N P K N C S W A Q G					
2763	2772	2781	2790	2799	2808
CTT AAT TTT CAG AAG ATG CTT GAA GGC AGC ATG TTC GTT AAG AGT CAT CAC CAC					
...
L N F Q K M L E G S M F V K S H H H					
2817	2826	2835	2844	2853	2862
TCC CTA ATC TCA AGT ACC CAG GGA CAC AAA CAC TGC GGA AGG CCA CAG GGT CCT					
...
S L I S S T Q G H K H C G R P Q G P					
2871	2880	2889	2898	2907	2916
CTG CAT AGG AAA ACC AGA GAC CTT TGT TCA CTT GTT TAT CTG CTG ACC CTC CCT					
...
L H R K T R D L C S L V Y L L T L P					
2925	2934	2943	2952	2961	2970
CCA CTA TTG TCC TAT GAC CCT GCC AAA TCC CCC TCT GTG AGA AAC ACC CAA GAA					
...
P L L S Y D P A K S P S V R N T Q E					
2979	2988				
TGA TCA ATA AAA AAA AAA AAA 3					
...	...				
* S I K K K K					

FIG.1G

HuB1.219	FORM	1	2751	2760	2770	2780	2790	2800
HuB1.219		2	2751	AGGACTTAAT	TTTCAGAAGA	TGCTTGAAGG	CAGCATGTTT	GTTAAGAGTC
HuB1.219		3	2751	AGGACTTAAT	TTTCAGAAGA	AAATGCCCTGG	CACAAAGGAA	CTACTGGGTG
				AGGACTTAAT	TTTCAGAAGA	GAACGGACAT	TCTTTGAAGT	CTAATCATGA
HuB1.219	FORM	1	2801	2810	2820	2830	2840	2850
HuB1.219		2	2801	ATCACCACTC	CCTAATCTCA	AGTACCCAGG	GACACAAACA	CTGCGGAAGG
HuB1.219		3	2801	GAGGTTGGTT	GACTTAGGAA	ATGCTTGTGA	AGCTACGTCC	TACCTCGTGC
				TCACTACAGA	TGAACCCAAT	GTGCCAACTT	CCCAACAGTC	TATAGAGTAT
HuB1.219	FORM	1	2851	2860	2870	2880	2890	2900
HuB1.219		2	2851	CCACAGGGTC	CTCTGCATAG	GAACCAACAG	GACCTTTGTT	CACTTGTTTA
HuB1.219		3	2851	GCACCTGCTC	TCCCTGAGGT	GTGCACAATG
				TAGAAGATTT	TTACATTCTG	AAGAAGG...
HuB1.219	FORM	1	2901	2910	2920	2930	2940	2950
HuB1.219		2	2901	TCTGCTGACC	CTCCCTCCAC	TATTGTCCTA	TGACCCCTGCC	AAATCCCCCT
HuB1.219		3	2901
			
HuB1.219	FORM	1	2951	2960	2970	2980	2990	3000
HuB1.219		2	2951	CTGTGAGAAA	CACCCAAGAA	TGATCAATAA	AAAAAAAAAA	A.....
HuB1.219		3	2951
			

FIG.2

FIG. 3A

HuB1.219_1	201	PTAKLNDTLL	210	MCLKITSGGV	220	IFRSPLMSVQ	230	PINMVKPDPP	240	LGLHMEITDD	250
HuB1.219_2	201	PTAKLNDTLL		MCLKITSGGV		IFRSPLMSVQ		PINMVKPDPP		LGLHMEITDD	250
HuB1.219_3	201	PTAKLNDTLL		MCLKITSGGV		IFRSPLMSVQ		PINMVKPDPP		LGLHMEITDD	250
HuOBR	201	PTAKLNDTLL		MCLKITSGGV		IFRSPLMSVQ		PINMVKPDPP		LGLHMEITDD	250
MuOBR	201	PTAKLNDTLL		MCLKITSGGV		IFRSPLMSVQ		PINMVKPDPP		LGLHMEITDD	250
HuB1.219_1	251	GNLKISWSSP	260	PLVPFPLQYQ	270	VKYSNSTTV	280	IREADKIVSA	290	TSLLVDSILP	300
HuB1.219_2	251	GNLKISWSSP		PLVPFPLQYQ		VKYSNSTTV		IREADKIVSA		TSLLVDSILP	300
HuB1.219_3	251	GNLKISWSSP		PLVPFPLQYQ		VKYSNSTTV		IREADKIVSA		TSLLVDSILP	300
HuOBR	251	GNLKISWSSP		PLVPFPLQYQ		VKYSNSTTV		IREADKIVSA		TSLLVDSILP	300
MuOBR	251	GNLKISWSSP		PLVPFPLQYQ		VKYSNSTTV		IREADKIVSA		TSLLVDSILP	300
HuB1.219_1	301	GSSYEYQVRG	310	KRLDGPQIWS	320	DWSTPRVFTT	330	QDVIFYPPKI	340	LTSGSNVSF	350
HuB1.219_2	301	GSSYEYQVRG		KRLDGPQIWS		DWSTPRVFTT		QDVIFYPPKI		LTSGSNVSF	350
HuB1.219_3	301	GSSYEYQVRG		KRLDGPQIWS		DWSTPRVFTT		QDVIFYPPKI		LTSGSNVSF	350
HuOBR	301	GSSYEYQVRG		KRLDGPQIWS		DWSTPRVFTT		QDVIFYPPKI		LTSGSNVSF	350
MuOBR	301	GSSYEYQVRG		KRLDGPQIWS		DWSTPRVFTT		QDVIFYPPKI		LTSGSNVSF	350
HuB1.219_1	351	HC1YKKENKI	360	VPSKEIVWMW	370	NLAEKIPQSQ	380	YDWSOHVSK	390	VTFNLTNETK	400
HuB1.219_2	351	HC1YKKENKI		VPSKEIVWMW		NLAEKIPQSQ		YDWSOHVSK		VTFNLTNETK	400
HuB1.219_3	351	HC1YKKENKI		VPSKEIVWMW		NLAEKIPQSQ		YDWSOHVSK		VTFNLTNETK	400
HuOBR	351	HC1YKKENKI		VPSKEIVWMW		NLAEKIPQSQ		YDWSOHVSK		VTFNLTNETK	400
MuOBR	351	HC1YKKENKI		VPSKEIVWMW		NLAEKIPQSQ		YDWSOHVSK		VTFNLTNETK	400

FIG.3B

HuB1.219_1	401	410	420	430	440	450
HuB1.219_2	401	PRGKFTYDAV	YCCNEHECHH	RYAELYYIDV	NINISCEIDG	YLTGMTCRWS
HuB1.219_3	401	PRGKFTYDAV	YCCNEHECHH	RYAELYYIDV	NINISCEIDG	YLTGMTCRWS
HuOBR	401	PRGKFTYDAV	YCCNEHECHH	RYAELYYIDV	NINISCEIDG	YLTGMTCRWS
MuOBR	401	PRGKFTYDAV	YCCNEHECHH	RYAELYYIDV	NINISCEIDG	YLTGMTCRWS
HuB1.219_1	451	460	470	480	490	500
HuB1.219_2	451	TSTIQSLAES	TLQLRYHRSS	LYCSDIPSII	PISEPKDCYL	QSDGFYECIF
HuB1.219_3	451	TSTIQSLAES	TLQLRYHRSS	LYCSDIPSII	PISEPKDCYL	QSDGFYECIF
HuOBR	451	TSTIQSLAES	TLQLRYHRSS	LYCSDIPSII	PISEPKDCYL	QSDGFYECIF
MuOBR	451	TSTIQSLAES	TLQLRYHRSS	LYCSDIPSII	PISEPKDCYL	QSDGFYECIF
HuB1.219_1	501	510	520	530	540	550
HuB1.219_2	501	QPIFLLSGYT	MMIRINHSLG	SLDSPPTCVL	PDSWKPLPP	SSVKAETITN
HuB1.219_3	501	QPIFLLSGYT	MMIRINHSLG	SLDSPPTCVL	PDSWKPLPP	SSVKAETITN
HuOBR	501	QPIFLLSGYT	MMIRINHSLG	SLDSPPTCVL	PDSWKPLPP	SSVKAETITN
MuOBR	501	QPIFLLSGYT	MMIRINHSLG	SLDSPPTCVL	PDSWKPLPP	SSVKAETITN
HuB1.219_1	551	560	570	580	590	600
HuB1.219_2	551	IGLLKISWEK	PVFPENNLOF	QIRYGLSGKE	VQWKMYEYVD	AKSKSVSLPV
HuB1.219_3	551	IGLLKISWEK	PVFPENNLOF	QIRYGLSGKE	VQWKMYEYVD	AKSKSVSLPV
HuOBR	551	IGLLKISWEK	PVFPENNLOF	QIRYGLSGKE	VQWKMYEYVD	AKSKSVSLPV
MuOBR	551	IGLLKISWEK	PVFPENNLOF	QIRYGLSGKE	VQWKMYEYVD	AKSKSVSLPV

FIG.3C

HuB1.219_1	601	PDLCAVYAVQ	VRCKRLDGLG	YWSNWSNPAY	TVAMD IKVPM	RGPEFWRIIN	650
HuB1.219_2	601	PDLCAVYAVQ	VRCKRLDGLG	YWSNWSNPAY	TVAMD IKVPM	RGPEFWRIIN	650
HuB1.219_3	601	PDLCAVYAVQ	VRCKRLDGLG	YWSNWSNPAY	TVAMD IKVPM	RGPEFWRIIN	650
HuOBR	601	PDLCAVYAVQ	VRCKRLDGLG	YWSNWSNPAY	TVAMD IKVPM	RGPEFWRIIN	650
MuOBR	601	PDLCAVYAVQ	VRCKRLDGLG	YWSNWSNPAY	TVAMD IKVPM	RGPEFWRIIN	650
HuB1.219_1	651	GDTMKKEKNV	TLLWKPLMKN	DSLCSVQRVY	INHTSCNGT	WSEDVGNHTK	700
HuB1.219_2	651	GDTMKKEKNV	TLLWKPLMKN	DSLCSVQRVY	INHTSCNGT	WSEDVGNHTK	700
HuB1.219_3	651	GDTMKKEKNV	TLLWKPLMKN	DSLCSVQRVY	INHTSCNGT	WSEDVGNHTK	700
HuOBR	651	GDTMKKEKNV	TLLWKPLMKN	DSLCSVQRVY	INHTSCNGT	WSEDVGNHTK	700
MuOBR	651	GDTMKKEKNV	TLLWKPLMKN	DSLCSVQRVY	INHTSCNGT	WSEDVGNHTK	700
HuB1.219_1	701	FTFLWTEQAH	TVTFLAINSI	GASVANFNT	FSWPMKSVNI	VQSL SAYPLN	750
HuB1.219_2	701	FTFLWTEQAH	TVTFLAINSI	GASVANFNT	FSWPMKSVNI	VQSL SAYPLN	750
HuB1.219_3	701	FTFLWTEQAH	TVTFLAINSI	GASVANFNT	FSWPMKSVNI	VQSL SAYPLN	750
HuOBR	701	FTFLWTEQAH	TVTFLAINSI	GASVANFNT	FSWPMKSVNI	VQSL SAYPLN	750
MuOBR	701	FTFLWTEQAH	TVTFLAINSI	GASVANFNT	FSWPMKSVNI	VQSL SAYPLN	750
HuB1.219_1	751	SSCVIVSWIL	SPSDYKLMYF	IEWKNLNED	GEIKWLRISS	SVKKYYIHDH	800
HuB1.219_2	751	SSCVIVSWIL	SPSDYKLMYF	IEWKNLNED	GEIKWLRISS	SVKKYYIHDH	800
HuB1.219_3	751	SSCVIVSWIL	SPSDYKLMYF	IEWKNLNED	GEIKWLRISS	SVKKYYIHDH	800
HuOBR	751	SSCVIVSWIL	SPSDYKLMYF	IEWKNLNED	GEIKWLRISS	SVKKYYIHDH	800
MuOBR	751	SSCVIVSWIL	SPSDYKLMYF	IEWKNLNED	GEIKWLRISS	SVKKYYIHDH	800

FIG.3D

FIG. 3E

HuB1.219_1	1001	1010	1020	1030	1040	1050	1050
HuB1.219_2	1001	1050
HuB1.219_3	1001	1050
HuOBR	1001	EQGLINSSVT	KCFSSKNSPL	KDFSNSWE	IEAQAFFILS	DQHPN1ISPH	1050
MuOBR	1001	1050
HuB1.219_1	1051	1060	1070	1080	1090	1100	1100
HuB1.219_2	1051	1100
HuB1.219_3	1051	1100
HuOBR	1051	LTFSEGLDEL	LKLEGNFEE	NNDKSIYYL	GVTSIKKRES	CVLLIDKSRV	1100
MuOBR	1051	1100
HuB1.219_1	1101	1110	1120	1130	1140	1150	1150
HuB1.219_1	1101	1150
HuB1.219_1	1101	1150
HuOBR	1101	SCFPAPCLF	TDIRVLQDSC	SHFVENNINL	GTSSKTFAS	YMPQFQICST	1150
MuOBR	1101	1150
HuB1.219_1	1151	1160	1170	1180	1190	1200	1200
HuB1.219_1	1151	1200
HuB1.219_1	1151	1200
HuOBR	1151	QTHKIMENKM	CDLTV*	1200
MuOBR	1151	1200

FIG.3F

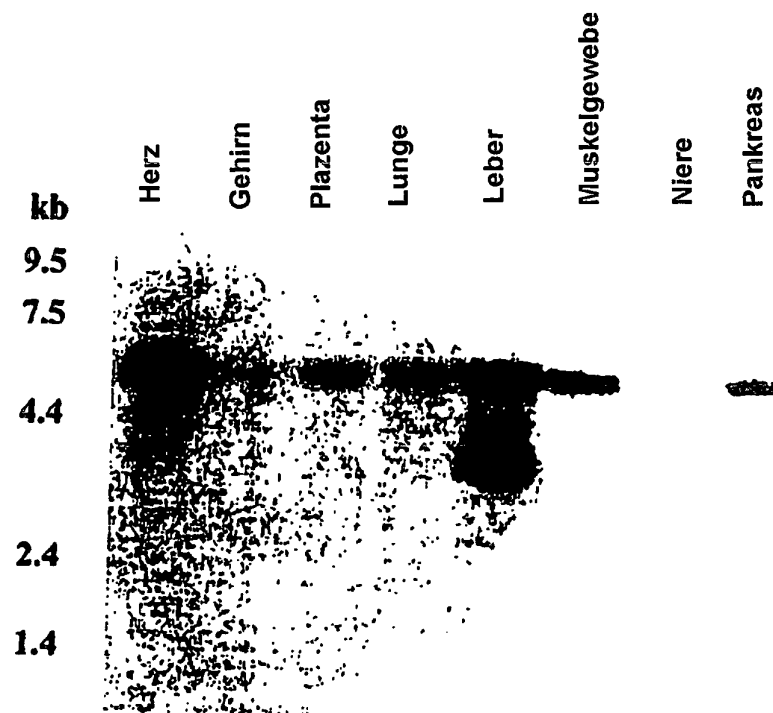


FIG.4

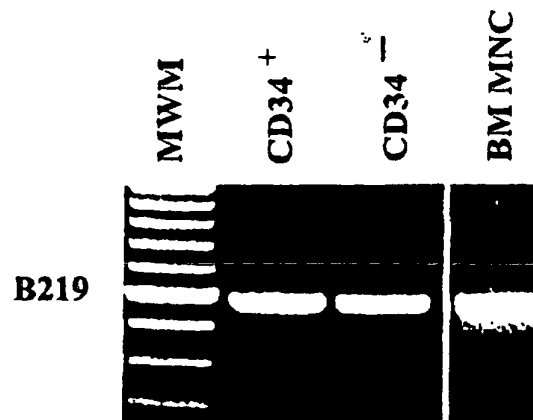


FIG.5A

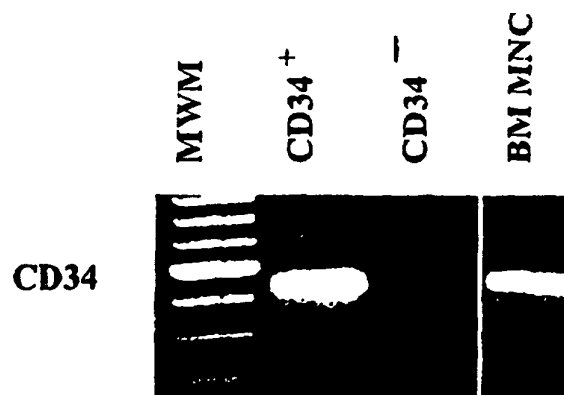


FIG.5B

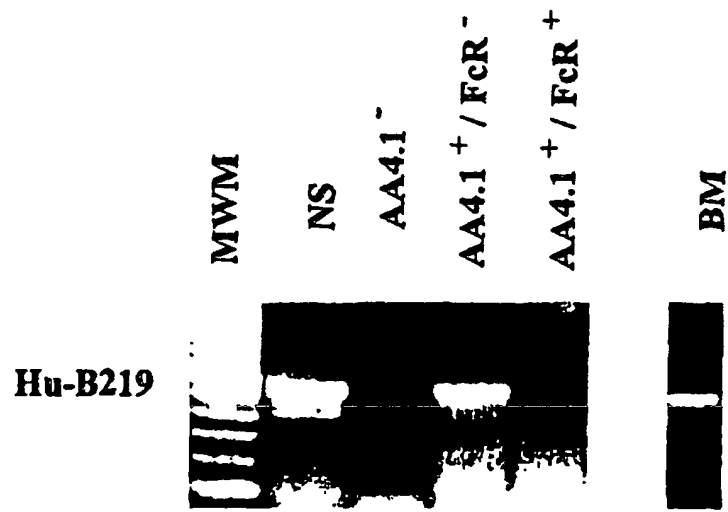


FIG.6A



FIG.6B

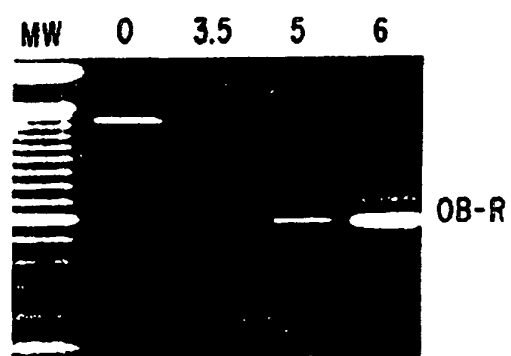


FIG. 7A

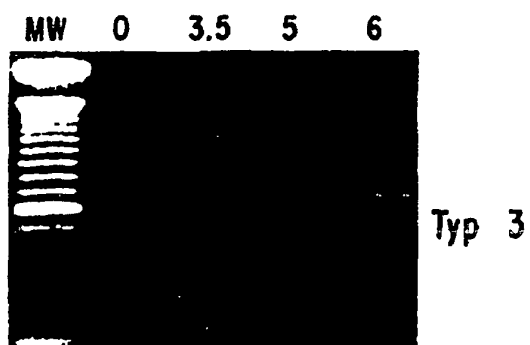


FIG. 7B

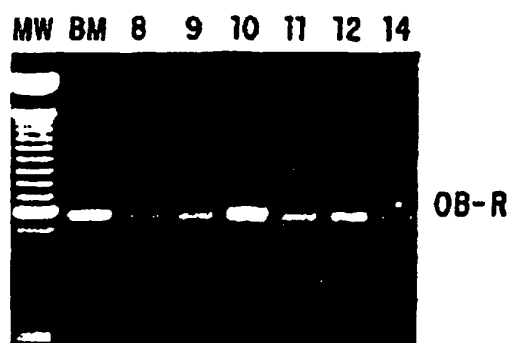


FIG. 7C

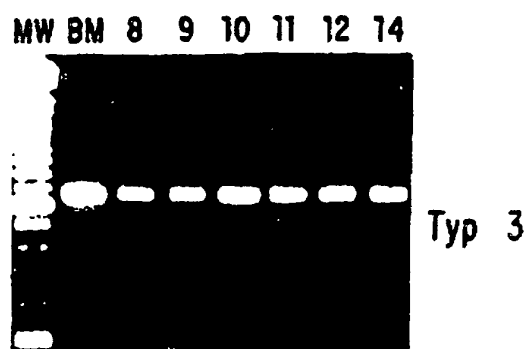


FIG. 7D

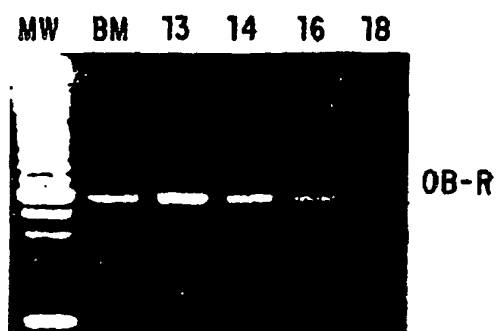


FIG. 7E

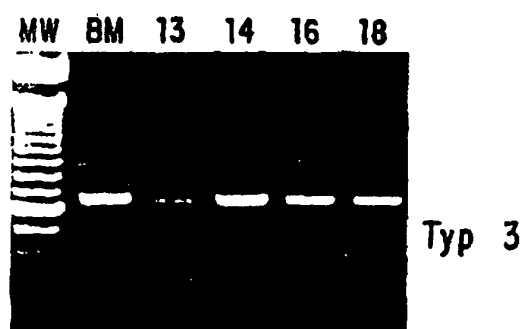


FIG. 7F

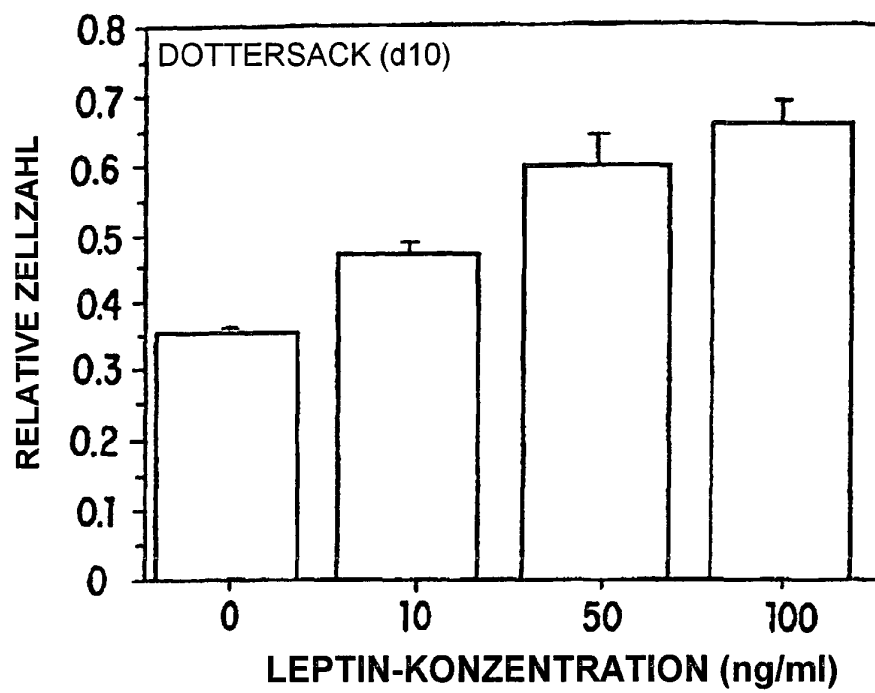


FIG. 8A

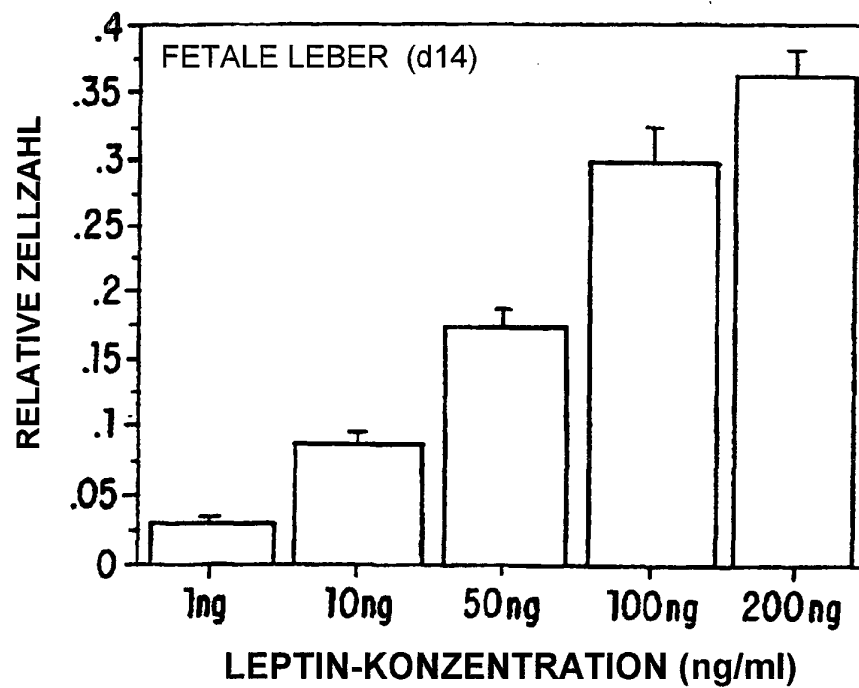


FIG. 8B

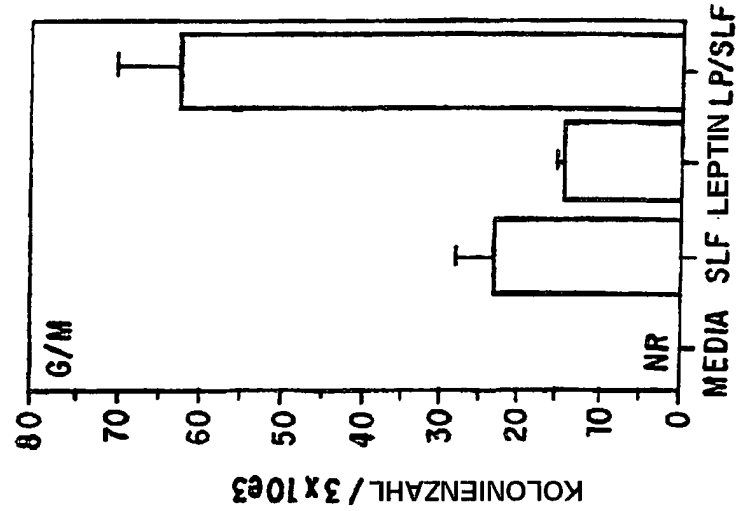


FIG. 9C

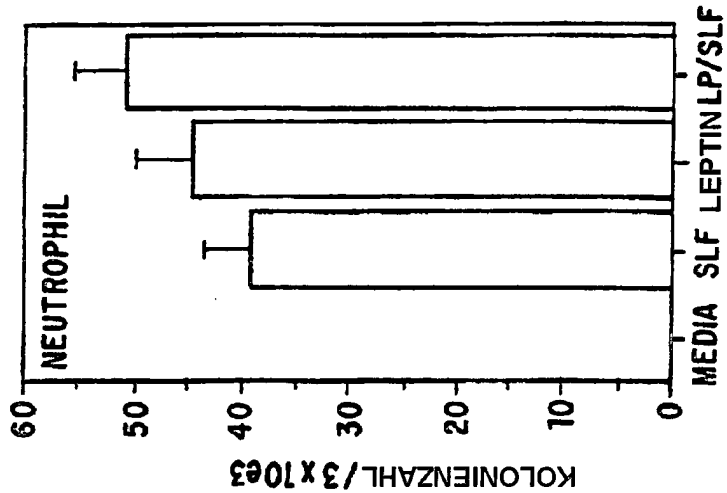


FIG. 9B

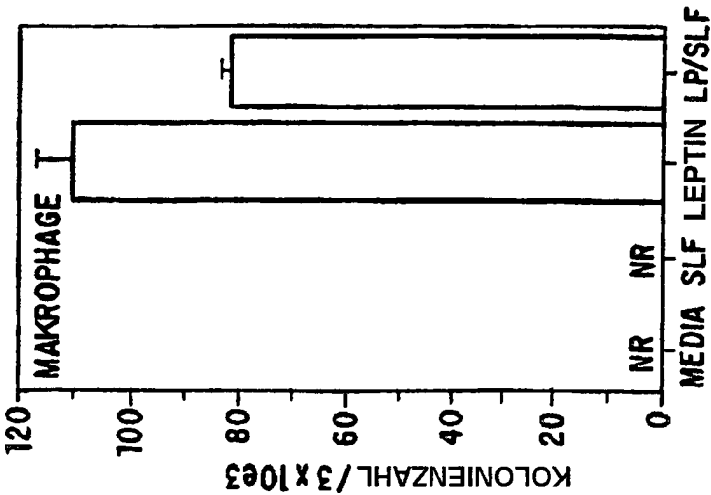


FIG. 9A

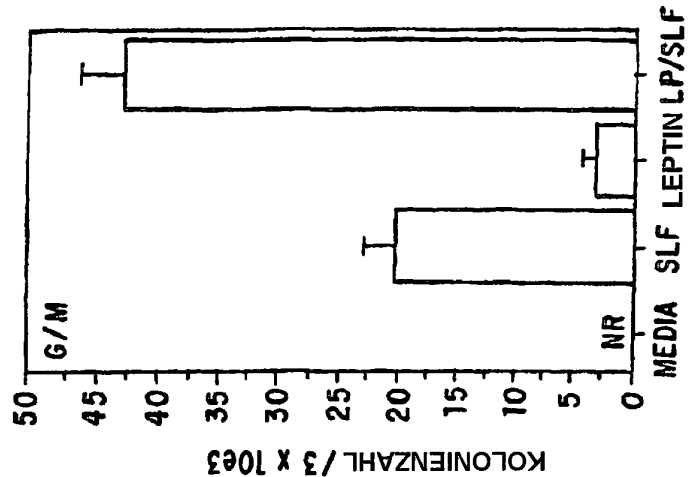


FIG. 10C

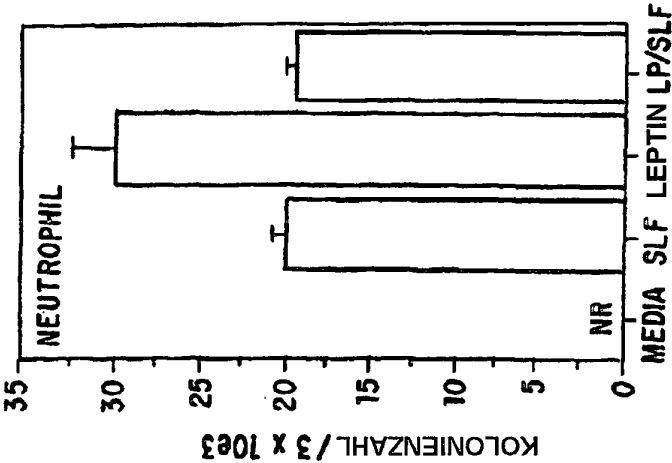


FIG. 10B

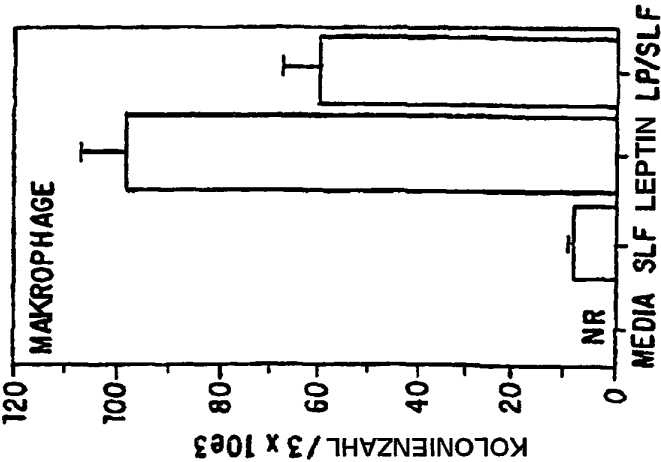


FIG. 10A

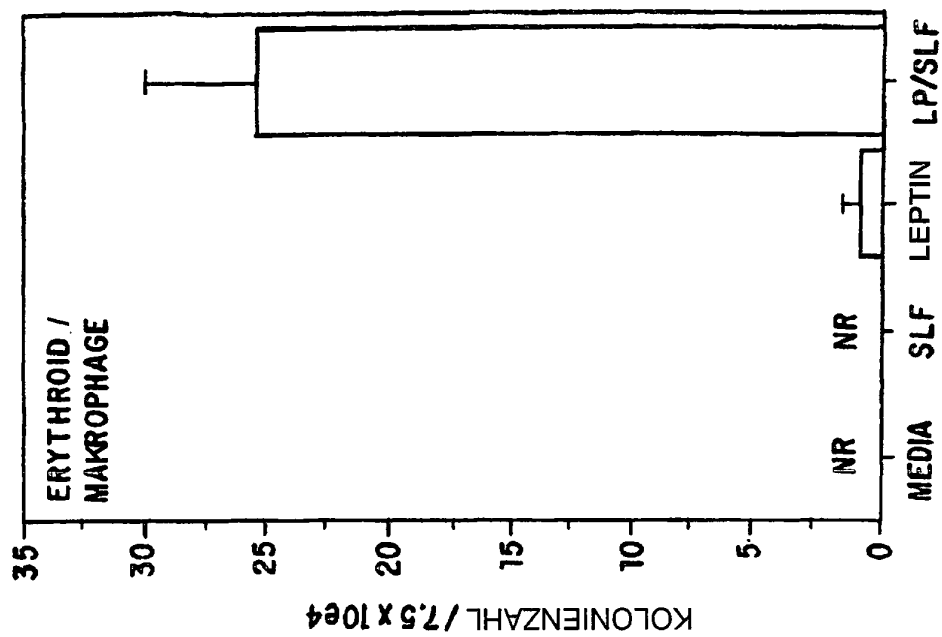


FIG. 11B

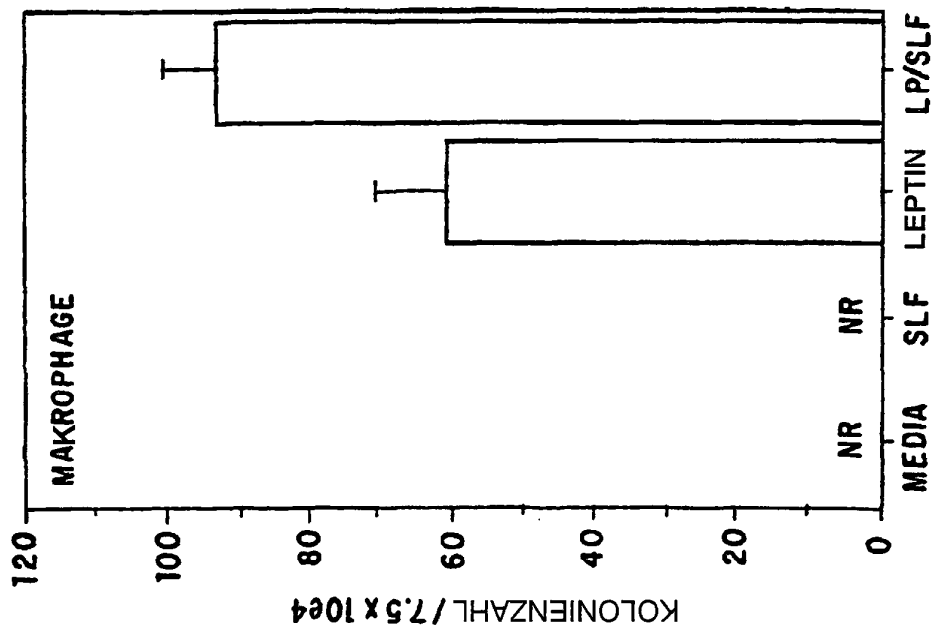


FIG. 11A

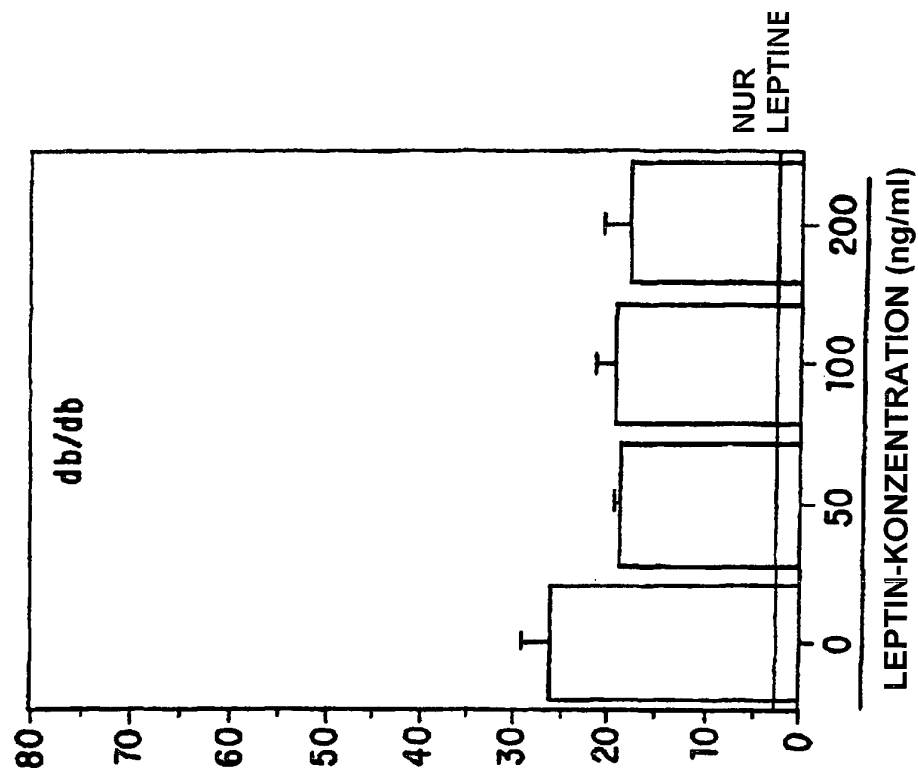


FIG. 12B

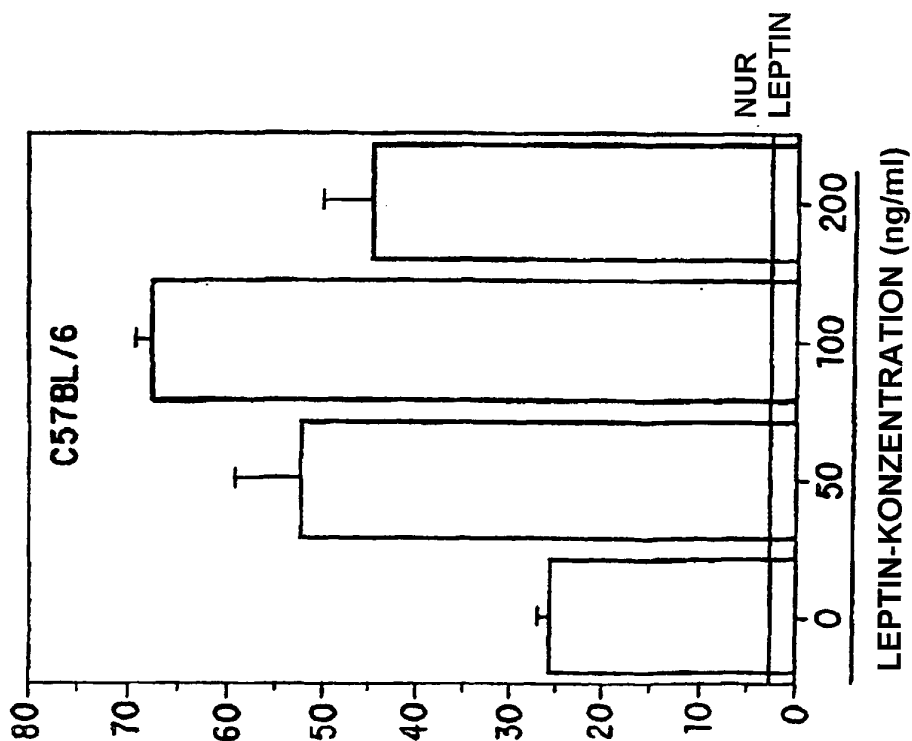


FIG. 12A

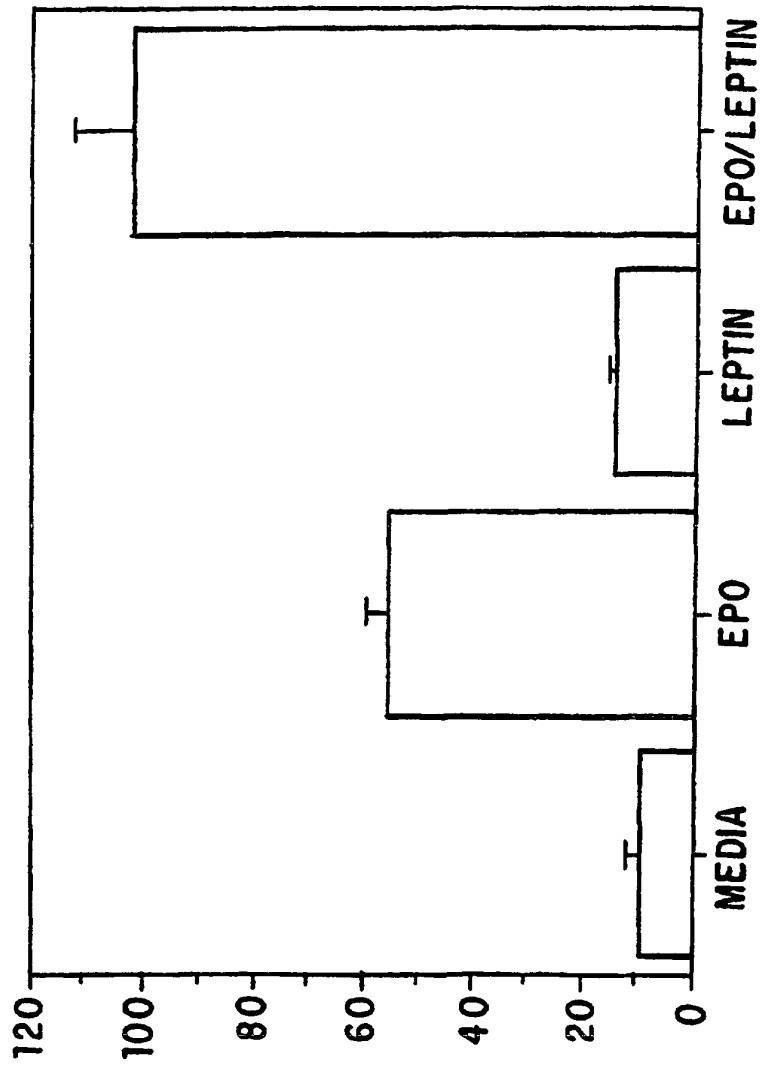


FIG. 13