

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
27. Juli 2006 (27.07.2006)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2006/077101 A2

(51) Internationale Patentklassifikation:
A61K 39/00 (2006.01) **C07K 16/00** (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)

(74) Anwalt: **REITSTÖTTER, KINZEBACH & PARTNER**
(GBR); Sternwartstrasse 4, 81679 München (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2006/000420

(22) Internationales Anmeldedatum:
18. Januar 2006 (18.01.2006)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2005 002 353.3 18. Januar 2005 (18.01.2005) DE
60/645,211 18. Januar 2005 (18.01.2005) US
60/668,704 5. April 2005 (05.04.2005) US
10 2005 015 832.3 6. April 2005 (06.04.2005) DE
60/681,211 13. Mai 2005 (13.05.2005) US
10 2005 022 285.4 13. Mai 2005 (13.05.2005) DE

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **ABBOTT GMBH & CO. KG** [DE/DE]; Max-Planck-Ring 2, 65205 Wiesbaden (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **HAHN, Alfred** [DE/DE]; Isoldestrasse 27, 68199 Mannheim (DE). **LOEBBERT, Ralph** [DE/DE]; Hildastrasse 21, 69115 Heidelberg (DE). **TEUSCH, Nicole** [DE/DE]; Im Boehichen 29a, 64683 Einhausen (DE). **MÖLLER, Achim** [DE/DE]; Im Zaunrücken 10, 67269 Grünstadt (DE).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: **AGER-PEPTIDES AND USE THEREOF**

(54) Bezeichnung: **AGER-PEPTIDE UND DEREN VERWENDUNG**

(57) Abstract: The invention relates to the identification, functionality and use of domains of the N-terminus of the receptor for Advanced Glycation End Products (AGER). Said domains are highly conserved in all AGER protein sequences, with the designated receptor multimerisation epitope (RME). They represent mediators for the AGER automatic association and heteromerisation with other proteins. The invention also relates to the identification, functionality and use of peptides which are derived from the C-domains of AGER (AGER-CDP). The inventive AGER-RMEs and AGER-CDPs are suitable as targets for identifying AGER-ligands, which modulate natural ligand exchange effects as immunogens for the active or passive immunisation of individuals, as diagnostic means which are used to identify immunogenic reactions, and as peptide ligands which are used to modulate protein-protein-exchange effects involving AGER.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft die Identifizierung, Funktionalität und Verwendung von Domänen aus dem N-Terminus des Rezeptors für Advanced Glycation End Products (AGER). Diese Domänen, mit der Bezeichnung Rezeptor Multimerisierungs Epitop (RME) sind hochkonserviert in sämtlichen AGER Proteinsequenzen. Sie stellen die Mediatoren für die AGER Selbstassoziation und Heteromerisierung mit anderen Proteinen dar. Ebenso betrifft die Erfindung die Identifizierung, Funktionalität und Verwendung von Peptiden, die von der C-Domäne von AGER abgeleitet sind (AGER-CDP). Die erfindungsgemäßen AGER-RMEs und AGER-CDPs eignen sich als Targets zur Identifizierung von AGER-Liganden, welche die natürliche Ligandenwechselwirkung modulieren; als Immunogen für die aktive oder passive Immunisierung von Individuen, als diagnostische Mittel zur Identifizierung immunogener Reaktionen sowie als Peptidliganden zur Modulation von Protein-Protein-Wechselwirkungen unter Beteiligung von AGER.

WO 2006/077101 A2

AGER-Peptide und deren Verwendung

Beschreibung

- 5 Die vorliegende Erfindung betrifft die Identifizierung, Funktionalität und Verwendung von Domänen aus dem N-Terminus des Rezeptors für Advanced Glycation End Products (AGER oder RAGE). Diese Domänen, mit der Bezeichnung Rezeptor Multimerisierungs Epitop (RME) sind hochkonserviert in sämtlichen AGER Proteinsequenzen. Sie stellen die Mediatoren für die AGER Selbstassoziation und Heteromerisierung mit
10 anderen Proteinen dar. Ebenso betrifft die Erfindung die Identifizierung, Funktionalität und Verwendung von Peptiden, die von der C-Domäne von AGER abgeleitet sind (AGER-CDP). Die erfindungsgemäßen AGER-RMEs und AGER-CDPs eignen sich als Target zur Identifizierung von AGER-Liganden, welche die natürliche Ligandenwechselwirkung modulieren; als Immunogen für die aktive oder passive Immunisierung von
15 Individuen, als diagnostische Mittel zur Identifizierung immunogener Reaktionen sowie als Peptidliganden zur Modulation von Protein-Protein-Wechselwirkungen unter Beteiligung von AGER.

Stand der Technik

- 20 Aus dem Stand der Technik ist bekannt, dass zahlreiche menschliche Erkrankungen mit einem vermehrten Auftreten von AGER oder AGER-bindenden Liganden assoziiert sind (Jerums G et al.: Arch Biochem Biophys. 2003 Nov 1;419(1):55-62.; Bucciarelli LG et al.: Cell Mol Life Sci. 2002 Jul;59(7):1117-28; Hofmann HS et al.: Am J Respir Crit
25 Care Med. 2004 Sep 1;170(5):516-9.; Lotze MT et al: Curr Opin Investig Drugs. 2003 Dec;4(12):1405-9).

- Die WO-A-2004/016229 beschreibt N-terminale AGER-Fragmente, welche die Fähigkeit zur Ligandenbindung besitzen (RAGE-LBE) und schlägt deren Verwendung u.a.
30 (als Fusionsprotein mit einem Immunglobulinelement) zur Behandlung von AGER-assoziierten Erkrankungen vor. Als Beispiele für solche Erkrankungen werden genannt, Amyloidosen, Krebs, Arthritis, Crohn'sche Erkrankung, chronische inflammatorische Erkrankungen, akute inflammatorische Erkrankungen, kardiovaskuläre Erkrankungen, Diabetes, Diabeteskomplikationen, Prion-assoziierte Erkrankungen, Vaskulitis, Nephropathien, Retinopathien und Neuropathien. Insbesondere werden als AGER-assoziierte Erkrankungen genannt: Alzheimer, rheumatoide Arthritis, Osteoarthritis,
35 Bowel Disease, multiple Sklerose, Psoriasis, Lupus, Autoimmunerkrankungen im allgemeinen, Sepsis, Arteriosklerose und Restenose. Insbesondere wird in der internationalen Patentanmeldung vorgeschlagen, AGER-Fragmente mit einer Länge von 118 –

344 Aminosäuren (jeweils beginnend am ersten N-terminalen Rest des Rezeptors) zu verwenden. Kürzere Fragmente werden nicht beschrieben. Weiterhin findet man in der WO-Schrift einen allgemeinen Hinweis auf die mögliche therapeutische Brauchbarkeit isolierter Antikörper, welche mit einem Epitop der AGER-Aminosäuresequenz spezifisch immunoreaktiv sind. Es werden aber weder spezielle Epitope vorgeschlagen, noch werden spezifische Antikörper hergestellt.

Es ist daher Aufgabe der vorliegenden Erfindung, neue Therapieansätze zur Behandlung AGER-assoziiierter Erkrankungen bereitzustellen.

Kurze Beschreibung der Erfindung

Obige Aufgabe wurde überraschenderweise durch Isolierung und Charakterisierung spezieller Rezeptor Multimerisierungs Epitope (RME) und von Peptiden der Ig ähnlichen C-Domäne von AGER gelöst.

Figurenbeschreibung

Figur 1 zeigt einen Sequenzvergleich (ClustAll W alignment) von RAGE aus Mensch, Maus, Ratte und Rind. Der NtermR31 entsprechende Sequenzabschnitt ist mit „|+...+|“ oberhalb der Sequenz gekennzeichnet. Die Angaben zur Sequenzübereinstimmung finden sich jeweils in der letzten Zeile eines Sequenzblocks. Identische Aminosäurepositionen sind mit „*“ gekennzeichnet, „.“ und „:“ stehen für ähnliche Aminosäuren; bei fehlender Übereinstimmung wurde ein Leerzeichen („ “) eingetragen. Die Ig-ähnliche Domäne vom V-Typ (V-Domäne) ist für die humane Sequenz durch fette Unterstreichung hervorgehoben; die Ig-ähnliche Domäne C2-Typ 1 ist für die humane Sequenz durch gepunktete Unterstreichung hervorgehoben; die Ig-ähnliche Domäne C2-Typ 2 ist für die humane Sequenz durch fette unterbrochene Unterstreichung hervorgehoben.

Figur 2 zeigt die Plasmidkarte des erfindungsgemäß verwendeten Plasmids pAP-tag5/PPC/hNOGO66Nr.5

Figur 3 zeigt die Plasmidkarten verschiedener erfindungsgemäß verwendeter Plasmide:

pIRES hNgR hp75 NgR (SEQ ID NO:18) (Fig. 3a)

pcDNA3 hRhoA wt (SEQ ID NO:23) (Fig. 3b)

pcDNA4 His Myc(mycHis)A hRhoA wt (SEQ ID NO:21) (Fig. 3c)

pcDNA3.1 (V5-His)hp75 Nr.16 (SEQ ID NO:16) (Fig. 3d)

Figur 4a zeigt den immunologischen Nachweis von exprimiertem Rho durch erfindungsgemäß isolierte positive Klone (#1 bis #8) der Tripletransfektante HEK293 RhoA/NgR/p75 (Klone 1 bis 9), positive Kontrolle (C) erhalten durch transiente Transfektion mit 100 ng pcDNA4(mycHis)A hRhoA wt; als Marker (M) wurde verwendet:
5 Benchmark Prestain Protein Ladder, Invitrogen, Bestellnummer #10748-010; Figur 4b zeigt das Ergebnis einer FACS-Analyse auf exprimierte Zelloberflächenrezeptoren hNgR und hp75 einer erfindungsgemäß hergestellten HEK293-Tripletransfektante (Klon #4 und #8) sowie von nichttransformierten HEK293-Zellen (oben), jeweils für Analysen mit Anti-p75- bzw. Anti-NgR- Antikörpern.

10

Figur 5 zeigt das Ergebnis eines ELISA, mit welchem Serum immunisierter Kaninchen Antikörper gegen das N-terminale Peptid NtermR31 nachgewiesen wurden.

Figur 6 zeigt das Ergebnis eines ELISA, mit welchem die relative Antikörpermenge
15 gegen NtermR31 in verschiedenen Patientenplasmen nachgewiesen wurde. 1: gesunde Kontrolle; 2: AP23, MCIF06.7,F; 3: LAP30, Alzheimer Dementia, F00.0, early onset, F; 4: LAP39, MCIF06.7,F; 5: LAP45, MCIF06.7,M; 6: LAP53, MCIF06.7, F; 7: LAP60, Alzheimer Dementia, late onset, M.

Figur 7a zeigt das Ergebnis eine Dot Blot-Verfahrens zur Charakterisierung des polyklonalen Anti-NtermR31-Serums (untere Hälfte) mit verschiedenen erfindungsgemäß hergestellten Peptiden bzw. sRAGE-Formen. In der oberen Hälfte sind entsprechende Kontrollansätze mit Präimmunserum gezeigt. Beschreibung der Ansätze: 1: NtermR31;
2: ScraNtermR31; 3: ScraNtermR13; 4: NtermR13; 5: sRAGE-6xHIS (AA23-352, NP-
25 001127); 6: human sRAGE/Fc (R&D Systems; #1145-RG; AA 1-344); 7: human sRAGE/Fc (1-130AA); 8: mouse sRAGE (R&D Systems; # Custom03); 9: rat sRAGE/Fc (R&D Systems; #1616-RG; AA 1-342); Figur 7b zeigt das Ergebnis entsprechender Experimente mit monoklonalem anti-NtermR31 Antikörper „clone 37“. Beschreibung der Ansätze: 1: NtermR13; 2: NtermR31; 3: ScraNtermR13; 4: ScraNtermR31; 5: N/C
30 truncated(sRAGE-6xHIS) (AA 102-352, NP_001127); 6: human sRAGE/Fc (AA 1-130); 7: human sRAGE/Fc (R&D Systems; #1145-RG; AA 1-344); 8: human sRAGE-6xHIS (AA 23-352, NP_001127); 9: mouse sRAGE (R&D Systems; # Custom03); 10: rat sRAGE/Fc (R&D Systems; #1616-RG; AA 1-342)).

Figur 8 zeigt die Bindung von NtermR31 und NtermR13 an sRAGE im Alphascreen-Assay in Abhängigkeit von der eingesetzten Peptidkonzentration.

Figur 9 zeigt die Bindung verschiedener Kontrollpeptide an sRAGE im Alphascreen-Assay in Abhängigkeit von der Peptidkonzentration.

Figur 10A veranschaulicht die Kompetition von AP-Nogo-66-Bindung (0,1 nM) an den Nogo-Rezeptor (NogoR) durch sRAGE (Kreise) und löslichen His-NogoR (Dreiecke) in Abhängigkeit von der jeweiligen Konkretorkonzentration; Figur 10B zeigt die Kompetition der AP-Nogo66-Bindung (0,1 nM) an den Nogo-Rezeptor durch NtermR31 in Abhängigkeit von der jeweiligen Konkretorkonzentration.

Figur 11A zeigt mikroskopische Aufnahmen unstimulierter bzw. mit AP-Nogo66-stimulierter HEK293 RhoA/NgR/p75-Zellen. Nach Stimulierung mit AP-Nogo66 ist eine deutliche Veränderung in der Zellgeometrie durch Kontraktion zu beobachten. Figur 11B zeigt die konzentrationsabhängige Verringerung des prozentualen Anteils kontrahierter HEK-Zellen bei verschiedenen Konzentrationen von NtermR31 bzw. sRAGE. Der jeweils hellere, linke Balken eines Balkenpaars zeigt das Versuchsergebnis für den jeweils zugeordneten, unstimulierten Kontrollansatz (ohne AP-Nogo66). Beschreibung für die Bahnen 1 bis 7: 1: keine Behandlung; 2: NtermR31 (0,2 µM); 3: NtermR31 (1 µM); 4: NtermR31 (5 µM); 5: sRAGE (0,2 µM); 6: sRAGE (1 µM); 7: sRAGE (5 µM)

Figur 12a zeigt immunhistologische Untersuchungen an Dünnschnitten von transgenem APP-Mäusehirn unter Verwendung von kommerziellem anti-RAGE-Antikörpern. Im Gyrus dentatus 10 Wochen alter Mäuse (linkes Bild) ist eine starke Stimulation von membrangebundenem RAGE zu einem Zeitpunkt zu beobachten, wo noch keine Amyloidplaques gebildet werden. Wenn Amyloid verstärkt gebildet wird und Plaques entstehen (ab dem 9. bis 12. Lebensmonat) so verschwindet membrangebundenes RAGE zugunsten von löslichem RAGE. Dies erklärt die deutlich geringere Anfärbung in 11 Monate alten Mäusen (rechtes Bild). Figur 12b zeigt dagegen, dass erfindungsgemäßes NtermR31 Antiserum („Biotrend“) nicht im jungen Tier (10 Wochen) färbt (linkes Bild) wohl aber mit ähnlichem Muster wie kommerzielles Antiserum im alten Tier (10 Monate) (rechtes Bild).

Figur 13 zeigt das Ergebnis eines ELISA, mit welchem in Mausplasma sRAGE nachgewiesen wurde. Es ist deutlich zu erkennen, dass in 12 Monate alten Tieren (Balken 1) eine deutlich höhere Plasmakonzentration von sRAGE zu finden ist als in 10 Wochen jungen Tieren (Balken 2).

Figur 14 zeigt das Ergebnis eines Kompetitionsexperiments der sRAGE/Aβ-Oligomer-Interaktion durch Anti-NtermR31-Antikörper (Kreise) und Anti-sRAGE-Antikörper (Quadrate)(AF1145) in Abhängigkeit von der eingesetzten Immunglobulinkonzentration (nM) in einem HTRF-Assay. Als Kontrolle wurde außerdem ein Kaninchen-IgG-Nicht-Immunserum (Dreiecke) eingesetzt. Die Kontrollansätze ohne sRAGE (gestrichelte

Linien) zeigen keine Veränderung der gemessenen Fluoreszenzwerte bei steigender Antikörperkonzentration. In Gegenwart von sRAGE bewirkt die Zugabe von Kaninchen-Kontrollserum keine Abnahme der Fluoreszenz und somit keine Inhibition der sRAGE-A β - Wechselwirkung. Dagegen beobachtet man bei steigender Konzentration an polyklonalen anti-sRAGE Antikörpern und polyklonalen anti-NtermR31 Antikörpern eine signifikante Inhibition der sRAGE-A β - Wechselwirkung.

Figur 15 zeigt den Effekt von 500 nM NtermR31 auf die Langzeitpotenzierung (LTP) in Hippokampusschnitten männlicher Wistar-Ratten. Kontrollschnitte n=11, 6 Tiere; Nterm-behandelte Schnitte n=7, 4 Tiere. p=0.016, repeated measures ANOVA.

Figur 16 zeigt den Effekt von 500 nM ScraNterm31 auf LTP in Hippokampusschnitten männlicher Wistar-Ratten. Kontrollschnitte n=7, 4 Tiere; ScraNterm-behandelte Schnitte n=10, 5 Tiere. p=0.794, repeated measures ANOVA.

Figur 17 zeigt den Effekt von 500 nM Nterm31 auf die I/O-Relation bei LTP Untersuchungen an männlichen Wistar-Ratten.

Figur 18 zeigt die kompetitive Inhibition der sRAGE-A β -Oligomer Wechselwirkung durch die erfindungsgemäßen AGER-CDP Peptide 6 und 7.

Figur 19 zeigt die A β -Oligomer Bindung durch sRAGE (1-331) und das N-terminal verkürzte sRAGE (102-331), welches keine funktionale V-Domäne mehr aufweist.

Figur 20 zeigt das Ergebnis der Charakterisierung zweier erfindungsgemäßer monoklonaler anti-RAGE Antikörper (ML37-11H8 und ML37-6A6) in Dot Blots mit dem vollständigen sRAGE-Protein (1-331 sRAGE-HIS) (jeweils Vertikale Reihe 1) sowie einer N-terminal verkürzten Version (102-331-sRAGE-HIS) (jeweils vertikale Reihe 2).

Figur 21 zeigt die Konkurrenz der sRAGE – A β Globulomer Bindung mit den monoklonalen anti-RAGE Antikörpern ML37-6A6 und ML37-11H8 im Vergleich mit unspezifischem Maus IgG1 und 2a.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

I. Spezielle Gegenstände der Erfindung

Ein erster Gegenstand der Erfindung betrifft die Verwendung des Rezeptor Multimerisierungs Epitops (RME) des Advanced-Glycation-End Products Rezeptors (AGER), umfassend ein zur Auto-Multimerisierung befähigtes Peptidfragment der N-terminalen AGER-Ektodomäne, oder eines von der non-V-Domäne AGER Domäne, wie insbesondere einer Ig-ähnlichen C-Domäne (wie insbesondere von der Ig-ähnlichen C2-Domäne, Typ 1 und/oder der Ig-ähnlichen C2-Domäne Typ2) abgeleiteten Peptids (AGER-CDP), oder eines funktionalen, immunogenen Äquivalents von AGER-RME oder von AGER-CDP, als Immunogen zur Herstellung eines polyklonalen Antiserums oder monoklonaler Antikörper gegen AGER-RME bzw. AGER-CDP.

Insbesondere wird dabei AGER-RME mit einer Länge von etwa 8 bis 50 Aminosäureresten eingesetzt, welches abgeleitet ist von der humanen AGER-Ektodomäne mit einer Aminosäuresequenz gemäß Genbank Ref. Seq. Sequenz NM_001136 oder von einer funktional äquivalenten Ektodomäne, insbesondere von der Ig-ähnlichen Domäne vom V-Typ (V-Domäne).

Beispielsweise umfasst das AGER-RME folgende Sequenz:

C(K/R)GAPKKP(P/T)Q(Q/R/K)LE (SEQ ID NO :1)

Vorzugsweise umfasst das AGER-RME eine Sequenz, die ausgewählt ist unter

CRGAPKKPPQQL (SEQ ID NO :2)

CKGAPKKPPQRLE (SEQ ID NO :3)

CKGAPKKPTQKLE (SEQ ID NO :4)

Ein erfindungsgemäß brauchbares AGER-RME kann aber auch eine Sequenz der folgenden allgemeinen Formel umfassen:

$X^1 - X^2 - X^3 - X^4$

worin

X^1 für ein Wasserstoffatom, oder die Aminosäure Q oder das Dipeptid DQ steht;

X^2 für NITARIG(K/E)PL(V/M)L(N/S/K) (SEQ ID NO:5) steht;

X^3 für eine Sequenz nach SEQ ID NO: 1, 2, 3 oder 4 steht; und

X^4 für die Peptidsequenz WKLN steht.

Beispielsweise werden erfindungsgemäß AGER-CDPs mit einer Länge von etwa 5 bis 50 Aminosäureresten eingesetzt, die abgeleitet sind von der humanen AGER-Ektodomäne mit einer Aminosäuresequenz gemäß Genbank Ref. Seq. Sequenz NM_001136 oder einer funktional äquivalenten Ektodomäne, insbesondere einer Ig-ähnlichen C-Domäne, insbesondere der C2-Domäne Typ 1 und/oder Typ 2 davon (vgl. auch Figur 1).

Geeignete AGER-CDP-Peptid umfassen eine eine der folgenden Sequenzen:

- 10 DGKPLVPNEKGVSVKEQTRRHPEGLFTLQ (SEQ ID NO: 31)
 TLQSELMVTPARGGDPRTFSCSFSPGLPR (SEQ ID NO: 32) und
 LPRHRALRTAPIQPRVWEPVPLEEVQLVVE (SEQ ID NO: 33).

15 Alternativ kann das AGER-RME oder AGER-CDP, insbesondere mit einer der oben angegebenen Sequenzen, als cyclisches Peptid vorliegen.

20 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft die Verwendung einer AGER-RME oder eines AGER-CDP gemäß obiger Definition als diagnostischen Marker, wie z.B. als Capture-Antigen, zur Diagnose von Krankheiten oder Krankheitsstadien, bei denen Auto-Antikörper gegen das AGER-RME auftreten.

25 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft die Verwendung einer AGER-RME oder eines AGER-CDP gemäß obiger Definition, der AGER-Ektodomäne mit einer Aminosäuresequenz gemäß Genbank Ref. Seq. Sequenz NM_001136 und N-terminaler Subfragmente davon, sowie von Muteinen und Derivaten dieser AGER-Moleküle, oder von AGER-RME- oder AGER-CDP-bindenden Liganden zur Herstellung eines pharmazeutischen Mittels zur Diagnose oder Therapie von AGER-medierten Krankheiten oder Krankheitsstadien.

30 Erfindungsgemäß therapierbare Krankheiten oder Krankheitsstadien sind solche, die mit einer AGER/AGER-, AGER/Ligand-, AGER/Rezeptor-, AGER/Rezeptor/Ligand-, AGER/Rezeptor/Co-Rezeptor- und/oder AGER/Rezeptor/Counter-Rezeptor-Wechselwirkung assoziiert sind.

35 Als Beispiele für Erkrankungen die mit einer AGER/AGER-Wechselwirkung assoziiert sind, können genannt werden: Alzheimer und Amyloidosen; als Beispiele für Erkrankungen die mit einer AGER/Ligand- Wechselwirkung assoziiert sind, können genannt werden: Alzheimer und HIV-assoziierte Demenz; als Beispiele für Erkrankungen die mit einer AGER/Rezeptor- Wechselwirkung assoziiert sind, können genannt werden: Rü-

ckenmarksverletzung und Schädeltrauma; als Beispiele für Erkrankungen die mit einer AGER/Rezeptor/Co-Rezeptor- und/oder AGER/Rezeptor/Counter-Rezeptor-Wechselwirkung assoziiert sind, können genannt werden: Multiple Sklerose, Sepsis, Arteriosklerose.

5

Die erfindungsgemäß therapierbaren und/oder diagnostizierbaren Krankheiten oder Krankheitsstadien können weiterhin aus folgenden Gruppen ausgewählt sein:

- a) mechanischen Verletzungen von Schädel und Rückenmark;
- b) ischaemischen Schäden, wie Schlaganfall;
- 10 c) chronischen Erkrankungen, ausgewählt unter neurodegenerative, inflammatorische und Autoimmun-Erkrankungen, wie insbesondere Multiple Sklerose, Parkinson, Alzheimer's, HIV-1 assoziierte Demenz;
- d) diabetischen Folgeerkrankungen, wie diabetische Nephropathie, diabetische Neuropathie, und diabetische Vaskulopathie;
- 15 e) Tumorprogression und Metastasierung;
- f) veränderten Neurogeneseprozesse bei psychotischen Erkrankungen, wie Depression und Schizophrenie, und chronischen Schmerzzuständen die durch exzessive Neuritensprossung und/oder pathologische Synaptogenese hervorgerufen werden, wie Phantomschmerz nach Amputation;
- 20 g) Störungen der neuronalen Regeneration, des axonalen Sproutings, der Neuritenextension und der neuronalen Plastizität
- h) zentralen/peripheren Amyloiderkrankungen; und
- i) Arteriosklerose.

- 25 Nach einer besonderen Ausführungsform ist der AGER-RME- oder AGER-CDP-bindende Ligand ein anti-AGER-RME- oder anti-AGER-CDP-Antikörper.

- Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft die Verwendung von AGER-RME oder eines AGER-CDP nach obiger Definition als Target zum Nachweis oder zur Identifizierung von AGER-bindenden Liganden.
- 30

- Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft die Verwendung von AGER-RME oder eines AGER-CDP nach obiger Definition als Immunogen zur aktiven oder passiven Immunisierung.

35

Gegenstand der Erfindung ist weiterhin ein polyklonales anti-AGER-RME oder anti-AGER-CDP Antiserums, erhältlich durch Immunisierung eines Säugers mit einer antigenen Menge eines AGER-RME bzw. eines AGER-CDP Peptids gemäß obiger Definition.

Gegenstand der Erfindung sind weiterhin monoklonale anti-AGER-RME oder anti-AGER-CDP-Antikörper oder Antigen-bindende Fragmente davon, gegebenenfalls in humanisierter Form.

5

Bevorzugte Antikörper oder Antiseren weisen wenigstens eine der folgenden Eigenschaften auf:

- a) verbesserte Spezifität für ein AGER-RME oder ein AGER-CDP gemäß obiger Definition,
- 10 verbesserte Spezifität für ein unter Beteiligung des AGER-RME oder eines AGER-CDP nach obiger Definition ausgebildetes Neoepitop,
- b) Inhibition der AGER-RME- vermittelten Multimerisierung mit sRAGE oder anti-AGER-RME Antikörper (insbesondere zu beobachten in einem AlphaScreen- oder Assay);
- 15 c) spezifische Erkennung eines AGER-Ligand-induzierten, z.B. durch A β 1-42 induzierten, Rezeptorstatus von sRAGE;
- d) Induzierung einer Rezeptorkonfiguration von sRAGE, welche die Bindung eines AGER-Liganden, wie z.B. ausgewählt unter A β 1-42, A β 20-42, A β 12-42 und deren Globulomere, Amyloid, AGE, an sRAGE moduliert, wie z.B. fördert.

20

Gegenstand der Erfindung sind weiterhin monoklonale, bispezifische Antikörper, umfassend

- a) eine erste Antigen-bindende Domäne, abgeleitet von einem monoklonalen Antikörper nach obiger Definition, und
 - 25 b) eine zweite Antigen-bindende Domäne mit Spezifität für wenigstens einen Zelloberflächen-Rezeptor, der zu einer Wechselwirkung mit AGER-RME oder AGER-CDP befähigt sind, wie z.B. AGER, NgR, oder mit Spezifität für einen Liganden, Co- oder Counter-Rezeptor für einen dieser Rezeptoren,
- oder ein Antigen-bindendes Fragment davon, gegebenenfalls in humanisierter Form.

30

Weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Hybridprotein, umfassend ein AGER-RME oder ein AGER-CDP nach obiger Definition. Derartige Hybridproteine umfassend außerdem einen funktionalen Teil eines Proteins, ausgewählt unter Immunglobulinen und Fragmenten davon, wie z.B. ein Ig-Fc Fragment funktional verknüpft mit, beispielsweise dem C-Terminus von AGER-RME oder AGER-CDP.

35

Gegenstand der Erfindung sind auch AGER-RME- oder AGER-CDP-Derivate, umfassend AGER-RME oder AGER-CDP nach obiger Definition in PEGylierter Form oder

gekoppelt mit einem, beispielsweise optischen, enzymatischen oder radioaktiven, Marker.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft pharmazeutische Mittel, umfassend in
5 einem pharmazeutisch verträglichen Träger wenigstens einen aktiven Bestandteil ausgewählt unter:

- a) AGER-RME oder AGER-CDP nach obiger Definition;
- b) für AGER-RME nach obiger Definition kodierenden Nukleinsäuresequenzen;
- c) monoklonale oder polyklonale anti-AGER-RME oder anti-AGER-CDP-
10 Antikörpern nach obiger Definition;
- d) bispezifischen Antikörpern nach obiger Definition, und
- e) Hybridproteinen und Derivaten nach obiger Definition.

Erfindungsgemäße pharmazeutisches Mittel können zusätzlich als weiteren aktiven
15 Bestandteil einen Wirkstoff enthalten, der ausgewählt ist unter:

- a) Neurotrophen Faktoren, wie Nervenwachstumsfaktoren, wie z.B. NGF, NT-3, BDNF; Inosin; Neuroimmunophilinen, wie FK506, GPI1046; Chondroitinsulfat-Proteoglycan-abbauenden Enzymen, wie Chondroitinase ABC;
- b) Antikörper gegen Neuritenwachstumshemmer; Nogo-A, wie die Antikörper IN-1,
20 7B12; MAG; Omgp; und/oder deren Rezeptoren; wie anti-NgR- und anti-p75-Antikörper;
- c) löslichem NgR-Fragment; Nogo-A-Peptidfragmenten, wie NEP1-40 und Nogo66,
- d) Inhibitoren der p75-vermittelten Signalkaskade, wie RHO A-Inhibitoren, ROCK-Inhibitoren, wie Y-27632,
- 25 e) cAMP und funktionalen Analoga, Proteinkinase A, Arginase I, Polyamine, ciliary neurotrophic factor.

Solche pharmazeutischen Mittel eignen sich beispielsweise zur intrathecalen, intravenösen, subkutanen, oralen oder parenteralen, nasalen und Inhalations-Verabreichung.

30 Gegenstand der Erfindung ist weiterhin ein Immunogen, umfassend AGER-RME oder AGER-CDP nach obiger Definition in einen pharmazeutisch verträglichen Träger und gegebenenfalls mit einem Adjuvans zur aktiven Immunisierung.

35 Gegenstand der Erfindung ist auch ein Verfahren zum Nachweis von Effektoren des AGER-Rezeptors, wobei man eine Probe, in der man einen Effektor vermutet, mit einem AGER-RME- oder einem AGER-CDP-Polypeptid nach obiger Definition inkubiert und den Ansatz auf die Bildung eines Effektor-AGER-RME-Komplexes oder Effektor-AGER-CDP-Komplexes untersucht.

5 Gegenstand der Erfindung sind weiterhin Expressionsvektoren, umfassend wenigstens eine kodierende Nukleinsäuresequenz für ein lineares AGER-RME oder AGER-CDP gemäß obiger Definition, operativ verknüpft mit wenigstens einer regulativen Nukleinsäuresequenz.

Die Erfindung betrifft zudem rekombinante Mikroorganismen, welche wenigstes einen solchen Vektor trägt.

10 Gegenstand der Erfindung sind auch Hybridomzelllinien, welche einen monoklonalen Antikörper nach obiger Definition produzieren.

15 Die Erfindung betrifft weiterhin Verfahren zur Herstellung von AGER-RME oder AGER-CDP nach obiger Definition oder eines dieses enthaltenden Hybridproteins, wobei man einen rekombinanten Miroorganismus nach obiger Definition kultiviert und das produzierte Proteinprodukt aus der Kultur isoliert.

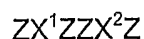
20 Die Erfindung betrifft weiterhin Verfahren zur Herstellung eines monoklonalen Antikörpers nach obiger Definition, wobei man eine Hybridomzelllinie nach obiger Definition kultiviert und das produzierte Proteinprodukt aus der Kultur isoliert.

25 Die Erfindung umfasst weiterhin funktionale, insbesondere immunogene Äquivalente von AGER-RME gemäß obiger Definition, welche einen Homologiegrad von weniger als 100% zu SEQ ID NO: 6 aufweisen.

Erfindungsgemäße funktionalen Äquivalente von AGER-RME weisen wenigstens eine der folgenden Eigenschaften auf:

- 30 a. Inhibition der Signaltransduktion im Aktin-Cytoskelett-Rearrangement (ACR)-Assay;
b. Konkurrenz mit sRAGE um die Bindung mit einem AGER-Liganden, wie z.B. Aß Globulomere, Aß1-42, Aß 20-42, Aß 12-42, Amyloid, AGE;
c. Auto-Multimerisierung oder Multimerisierung mit AGER-RME oder s-RAGE.

35 Erfindungsgemäße funktionale Äquivalente von AGER-RME können weiterhin eine Kernsequenz mit hoher positiver Ladungsdichte der folgende allgemeinen Formel aufweisen:



worin

die Reste Z unabhängig voneinander für einen Aminosäurerest mit positiv geladener Seitenkette stehen, wie insbesondere Lysin und Arginin; und

- 5 die Reste X¹ und X² unabhängig voneinander für beliebige 1 bis 5 gleiche oder verschiedene Aminosäure stehen, welche keine positiv geladenen Seitenketten tragen.

- Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft Kombinationen von wenigstens einem ersten und wenigstens einem zweiten monoklonalen Antikörpern mit unterschiedlicher Antispezifität, wobei wenigstens ein erster monoklonaler Antikörper (oder eine Gruppe aus 2 oder mehreren, wie z.B. 2, 3 oder 4, erster monoklonaler Antikörper) an ein Antigen bindet, das ganz oder teilweise von einem Sequenzbereich der Ig-ähnlichen V-Domäne von AGER (oder sRAGE) gebildet wird, und wenigstens ein zweiter monoklonaler Antikörper (oder eine Gruppe aus 2 oder mehreren, wie z.B. 2, 3 oder 4, zweiter monoklonaler Antikörper) an ein Antigen bindet, das ganz oder teilweise von einem Sequenzbereich einer von der Ig-ähnlichen V-Domäne verschiedenen AGER Domäne (non-V-Domäne) gebildet wird.

- Insbesondere sind solche Antikörperkombinationen beschrieben, wobei die von der Ig-ähnlichen V-Domäne verschiedene AGER Domäne eine Ig-ähnliche C-Domäne (beispielsweise umfassend C2-Typ1 und/oder C2-Typ2) von AGER ist.

- Weiterhin werden solche Antikörperkombinationen beschrieben, wobei wenigstens ein erster monoklonaler Antikörper und gegebenenfalls wenigstens ein zweiter monoklonaler Antikörper mit der Bindung von von AGER oder einem löslichen Äquivalent davon mit einem AGER-Bindungspartner, wie z.B. einem A β -Globulomer, kompetitiert.

Gegenstand der Erfindung ist auch die Verwendung derartiger Antikörperkombinationen als Arzneimittel.

- 30 Die Erfindung betrifft weiterhin pharmazeutische Mittel, umfassend eine Antikörperkombination nach obiger Definition.

- Außerdem betrifft die Erfindung die Verwendung erfindungsgemäßer Antikörperkombinationen zur Herstellung eines pharmazeutischen Mittels zur Therapie von Krankheiten oder Krankheitszuständen gemäß obiger Definition.

II. Erläuterungen allgemeiner Begriffe

- Als „Rezeptoren“ bezeichnet man im Rahmen der vorliegenden Erfindung insbesondere an einer Zellmembran gebundene Oberflächenmoleküle, welche mit einem, bei-

spielsweise löslichen, Liganden in Wechselwirkung treten können und als Folge dieser Wechselwirkung ein beispielsweise in das Zellinnere gerichtetes Signal oder eine Signalkaskade (auch als Signalling bezeichnet) auslösen können.

- 5 Als „Co-Rezeptoren“ bezeichnet man Membranstrukturelemente, die sich in derselben Zelle befindet wie der Rezeptor. Der Co-Rezeptor ist nötig, um die Funktionalität des Rezeptors zu definieren und /oder zu modulieren.

- 10 Als „Counter-Rezeptoren“ bezeichnet man membrangebundene Oberflächenmoleküle, die sich auf zwei verschiedenen (benachbarten) Zellen befinden und die miteinander in Kontakt treten und dadurch ein Signalling auslösen können.

- 15 Als „Ligand“ bezeichnet man einen natürlichen, d.h. in vivo gebildeten oder künstlich erzeugten, nieder- oder hochmolekularen Bindungspartner für eine „Rezeptor“. Der Ligand ist vorzugsweise in der extrazellulären Umgebung frei beweglich.

- 20 Als „Rezeptor Multimerisierungs Epitop“ (RME) versteht man ein Peptidfragment das insbesondere zur Auto-Multimerisierung befähigt ist und somit dimere, trimerer, tetramere etc. Komplexe mit Oligo- oder Polypeptiden von im wesentlichen gleicher Aminosäuresequenz ausbilden kann. Zusätzlich kann das RME auch zur Heteromultimerisierung befähigt sein und Komplexe mit wenigstens einem davon verschiedenen Oligo- oder Polypeptid bilden. Die Komplexbildung kann beispielsweise durch Gelchromatographie, native Gelelektrophorese ggf. nach Stabilisierung der Komplexe durch Vernetzung, z.B. mit üblichen Methoden der Proteinbiochemie, nachweisbar sein.

- 25 Als „Immunogen“ bezeichnet man ein erfindungsgemäßes Peptidfragment in glycosylierter oder nicht-glycosylierter Form, welches zur Induktion der Bildung von Antikörpern gegen das Immunogen geeignet ist. Gegebenenfalls kann eine Bindung des Immunogens (als Hapten) an einen makromolekularen Träger von Vorteil sein.

- 30 Als „Epitop“ oder antigene Determinante bezeichnet man den die Spezifität eines Antikörpers bestimmenden Bereich eines Antigens, wie z.B. eine Proteins. Wird dieses Epitop, beispielsweise durch äußere Einflüsse, wie z.B. eine Wechselwirkung eines Proteins mit einem Liganden, in einem Abschnitt des Proteins neu gebildet oder auf der zugänglichen Moleküloberfläche exprimiert, so spricht man von einem „Neoepitop“.
- 35

Als „Domäne“ eine Proteins oder Antikörpers bezeichnet man eine durch alpha-Helix- und/oder beta-Faltblattelemente gebildete komplexe, innerhalb des Proteins abge-

grenzte Struktur. sRAGE umfasst beispielsweise Ig-ähnliche Domänen vom V-Typ und C2-Typ 1 und C2-Typ2 Domänen, wie in Figur 1 veranschaulicht.

5 „sRAGE“ umfasst eine lösliche Form der AGER-Ektodomäne, wie z.B. sRAGE 1 – 331 gemäß SEQ ID NO:37). Wenn nicht s anderes angegeben ist, so bezeichnet sRAGE insbesondere sRAGE 1 – 331.

10 Die AGER „V-Domäne“ bezeichnet eine im Bereich des N-Terminus des AGER Moleküls zu findende Ig-ähnlichen Sequenzabschnitt, wie in Figur 1 für verschiedene AGER Moleküle veranschaulicht, wie insbesondere Teilsequenzen entsprechend den Resten 23-115 (Ala23 – Val115) der Humansequenz in Figur 1. Eine AGER „non-V-Domäne“ ist C-terminal zu oben bezeichneter V-Domäne im AGER Molekül zu finden. Beispiele für solche non-V-Domänen sind die Ig-ähnlichen C-Domänen, insbesondere C2-Domäne vom Typ 1 und Typ 2 wie in Figur 1 für verschiedene AGER Moleküle veranschaulicht.

III. Weitere Angaben zur Ausführung der Erfindung

1. Polypeptide

20 Gegenstand der Erfindung sind insbesondere Rezeptor Multimerisierungs Epitops (RME) des Advanced-Glycation-End Products Rezeptors (AGER), umfassend ein zur Auto-Multimerisierung befähigtes Peptidfragment der N-terminalen AGER-Ektodomäne, oder eines funktionalen, immunogenen Äquivalents von AGER-RME.

25 Erfindungsgemäß bevorzugte AGER-RME sind lineare oder cyclische Peptide mit einer Länge von etwa 8 bis 50 Aminosäureresten, abgeleitet von der humanen AGER-Ektodomäne mit einer Aminosäuresequenz gemäß Genbank Ref. Seq. Sequenz NM_001136 oder einer funktional äquivalenten Ektodomäne.

30 Bevorzugte AGER-RME können folgende Sequenz

C(K/R)GAPKKP(P/T)Q(Q/R/K)LE (SEQ ID NO :1)

und insbesondere eine der Sequenzen

35

CRGAPKKPPQQLE (SEQ ID NO :2)

CKGAPKKPPQRLE (SEQ ID NO :3)

CKGAPKKPTQKLE (SEQ ID NO :4)

umfassen.

Gegenstand der Erfindung sind auch AGER-CDP Peptide mit einer Länge von etwa 5 bis 50 Aminosäureresten, die abgeleitet sind von der humanen AGER-Ektodomäne mit einer Aminosäuresequenz gemäß Genbank Ref. Seq. Sequenz NM_001136 oder einer funktional äquivalenten Ektodomäne, insbesondere einer Ig-ähnlichen C-Domäne davon.

Beispiele geeigneter AGER-CDP Peptid umfassen eine der folgenden Sequenzen:

10

DGKPLVPNEKGVSVKEQTRRHPETGLFTLQ (SEQ ID NO: 31)
TLQSELMVTPARGGDP RPTFSCSFSPGLPR (SEQ ID NO: 32) und
LPRHRALRTAPIQPRVWEPVPLEEVQLVVE (SEQ ID NO: 33).

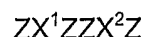
15 Erfindungsgemäß mit umfasst sind ebenfalls „funktionale Äquivalente“ der konkret offenbarten neuen Polypeptide.

„Funktionale Äquivalente“ oder Analoga der konkret offenbarten AGER-RME Polypeptide sind im Rahmen der vorliegenden Erfindung davon verschiedene Polypeptide, wie z. B. solche mit einem Homologiegrad von weniger als 100% zu SEQ ID NO: 6 (Nterm 31) oder SEQ ID NO:3 (Nterm 13), welche aber weiterhin die gewünschte biologische Aktivität besitzen, wie z.B. Inhibition der Signaltransduktion im Aktin-Cytoskelett-Rearrangement (ACR)-Assay; Konkurrenz mit sRAGE um die Bindung mit einem AGER-Liganden; Auto-Multimerisierung oder Multimerisierung mit AGER-RME oder sRAGE.

„Funktionale Äquivalente“ oder Analoga der konkret offenbarten AGER-CDP Polypeptide sind im Rahmen der vorliegenden Erfindung davon verschiedene Polypeptide, wie z. B. solche mit einem Homologiegrad von weniger als 100% zu SEQ ID NO: 31, 32 oder 33 welche aber weiterhin die gewünschte biologische Aktivität besitzen, wie z.B. die in den Beispielen beschriebene Inhibition der sRAGE-A β -1-42-Oligomer-Bindung.

Funktionale Äquivalente von AGER-RME können aber auch eine charakteristische Kernsequenz oder Leitstruktur mit hoher positiver Ladungsdichte der folgende allgemeinen Formel aufweisen

35



worin die Reste Z unabhängig voneinander für einen Aminosäurerest mit positiv geladener Seitenkette stehen; und

40

die Reste X¹ und X² unabhängig voneinander für beliebige 1 bis 5 gleiche oder verschiedene Aminosäure stehen, welche keine positiv geladenen Seitenketten tragen.

Unter "funktionalen Äquivalenten" versteht man erfindungsgemäß insbesondere Mutanten, welche in wenigstens einer der Sequenzpositionen der oben genannten konkreten Sequenzen eine andere als die konkret genannte Aminosäure aufweisen aber trotzdem eine der hierin genannten biologischen Aktivitäten besitzen. "Funktionale Äquivalente" umfassen somit die durch eine oder mehrere Aminosäure-Additionen, -Substitutionen, -Deletionen und/oder -Inversionen erhältlichen Mutanten, wobei die genannten Veränderungen in jeglicher Sequenzposition auftreten können, solange sie zu einer Mutante mit dem erfindungsgemäßen Eigenschaftsprofil führen. Funktionale Äquivalenz ist insbesondere auch dann gegeben, wenn die Reaktivitätsmuster zwischen Mutante und unverändertem Polypeptid qualitativ übereinstimmen, d.h. beispielsweise gleiche biologische Effekte nur unterschiedlich stark ausgeprägt zu beobachten sind. Beispiele für geeignete Substitutionen von Aminosäureresten sind folgende:

Ursprünglicher Rest

Beispiele der Substitution

Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln; His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Pro
His	Asn ; Gln
Ile	Leu; Val
Leu	Ile; Val
Lys	Arg ; Gln ; Glu
Met	Leu ; Ile
Phe	Met ; Leu ; Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp ; Phe
Val	Ile; Leu

„Funktionale Äquivalente“ im obigen Sinne sind auch Präkursoren der beschriebenen Polypeptide sowie funktionale Derivate und Salze der Polypeptide. Unter dem Aus-

druck „Salze“ versteht man sowohl Salze von Carboxylgruppen als auch Säureadditionssalze von Aminogruppen der erfindungsgemäßen Proteinmoleküle. Salze von Carboxylgruppen können in an sich bekannter Weise hergestellt werden und umfassen anorganische Salze, wie zum Beispiel Natrium-, Calcium-, Ammonium-, Eisen- und
5 Zinksalze, sowie Salze mit organischen Basen, wie zum Beispiel Aminen, wie Triethanolamin, Arginin, Lysin, Piperidin und dergleichen. Säureadditionssalze, wie zum Beispiel Salze mit Mineralsäuren, wie Salzsäure oder Schwefelsäure und Salze mit organischen Säuren, wie Essigsäure und Oxalsäure sind ebenfalls Gegenstand der Erfindung.

10

„Funktionale Derivate“ erfindungsgemäßer Polypeptide können an funktionellen Aminosäure-Seitengruppen oder an deren N- oder C-terminalen Ende mit Hilfe bekannter Techniken ebenfalls hergestellt werden. Derartige Derivate umfassen beispielsweise aliphatische Ester von Carbonsäuregruppen, Amide von Carbonsäuregruppen, erhältlich durch Umsetzung mit Ammoniak oder mit einem primären oder sekundären Amin;
15 N-Acylderivate freier Aminogruppen, hergestellt durch Umsetzung mit Acylgruppen; oder O-Acylderivate freier Hydroxygruppen, hergestellt durch Umsetzung mit Acylgruppen.

20 „Funktionale Äquivalente“ umfassen natürlich auch Polypeptide welche aus anderen Organismen, zugänglich sind, sowie natürlich vorkommende Varianten. Beispielsweise lassen sich durch Sequenzvergleich Bereiche homologer Sequenzregionen festlegen und in Anlehnung an die konkreten Vorgaben der Erfindung äquivalente Enzyme ermitteln.

25

„Funktionale Äquivalente“ sind außerdem Fusionsproteine, welche ein der oben genannten Polypeptidsequenzen oder davon abgeleitete funktionale Äquivalente und wenigstens eine weitere, davon funktionell verschiedene, heterologe Sequenz in funktioneller N- oder C-terminaler Verknüpfung (d.h. ohne gegenseitigen wesentliche funktionelle Beeinträchtigung der Fusionsproteinteile) aufweisen. Nichtlimitierende Beispiele für derartige heterologe Sequenzen sind z.B. Enzyme und Immunoglobuline.
30

Erfindungsgemäß mit umfasste „funktionale Äquivalente“ sind Homologe zu den konkret offenbarten Proteinen. Diese besitzen wenigstens 60 %, vorzugsweise wenigstens
35 75% ins besondere wenigsten 85 %, wie z.B. 90%, 95% oder 99%, Homologie zu einer der konkret offenbarten Sequenzen, berechnet nach dem Algorithmus von Pearson und Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 85(8), 1988, 2444-2448. Eine prozentuale Homologie eines erfindungsgemäßen homologen Polypeptids bedeutet insbesondere

prozentuale Identität der Aminosäurereste bezogen auf die Gesamtlänge einer der hierin konkret beschriebenen Aminosäuresequenzen.

- 5 Unter einer „abgeleiteten“ Aminosäuresequenz wird erfindungsgemäß, wenn keine anderen Angaben gemacht werden, eine Sequenz verstanden, die mit der Ausgangssequenz eine Identität von mindestens 80% oder mindestens 90%, insbesondere 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% und 99% aufweist.

- 10 Unter „Identität“ zwischen zwei Sequenzen wird Identität der Aminosäurereste über die jeweils gesamte Sequenzlänge verstanden, wie z.B. die Identität, die durch Vergleich mit Hilfe der Vector NTI Suite 7.1 Software der Firma Informax (USA) unter Anwendung der Clustal Methode (Higgins DG, Sharp PM. Fast and sensitive multiple sequence alignments on a microcomputer. Comput Appl. Biosci. 1989 Apr;5(2):151-1) unter Einstellung folgender Parameter berechnet wird:

15

Multiple alignment parameter:		Pairwise alignment parameter:	
Gap opening penalty	10	FAST algorithm	on
Gap extension penalty	10	K-tuple	size 1
Gap separation penalty range	8	Gap penalty	3
Gap separation penalty	off	Window size	5
% identity for alignment delay	40	Number of best diagonals	5
Residue specific gaps	off		
Hydrophilic residue gap	off		
Transition weighing	0		

20

Im Falle einer möglichen Proteinglykosylierung umfassen erfindungsgemäße Äquivalente Proteine des oben bezeichneten Typs in deglykosylierter bzw. glykosylierter Form sowie durch Veränderung des Glykosylierungsmusters erhältliche abgewandelte Formen.

25

Homologe der erfindungsgemäßen Peptide können durch Screening kombinatorischer Banken von Mutanten, wie z.B. Verkürzungsmutanten, identifiziert werden. Beispielsweise kann eine variierte Bank von Peptid-Varianten durch kombinatorische Mutagenese auf Nukleinsäureebene erzeugt werden, wie z.B. durch enzymatisches Ligieren eines Gemisches synthetischer Oligonukleotide. Es gibt eine Vielzahl von Verfahren, die zur Herstellung von Banken potentieller Homologer aus einer degenerierten Oligonukleotidsequenz verwendet werden können. Die chemische Synthese einer degenerierten Gensequenz kann in einem DNA-Syntheseautomaten durchgeführt werden, und

das synthetische Gen kann dann in einen geeigneten Expressionsvektor ligiert werden. Die Verwendung eines degenerierten Gensatzes ermöglicht die Bereitstellung sämtlicher Sequenzen in einem Gemisch, die den gewünschten Satz an potentiellen Proteinsequenzen codieren. Verfahren zur Synthese degenerierter Oligonukleotide sind dem Fachmann bekannt (Z.B. Narang, S.A. (1983) Tetrahedron 39:3; Itakura et al. (1984) Annu. Rev. Biochem. 53:323; Itakura et al., (1984) Science 198:1056; Ike et al. (1983) Nucleic Acids Res. 11:477).

2. Nukleinsäuren

Gegenstand der Erfindung sind weiterhin die kodierenden Nukleinsäuresequenzen für die oben beschriebenen AGER-RME oder AGER-CDP Peptide, sowie davon abgeleitete Nukleinsäuresequenzen.

Alle erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen (einzeln- und doppelsträngige DNA- und RNA-Sequenzen, wie z.B. cDNA und mRNA) sind in an sich bekannter Weise durch chemische Synthese aus den Nukleotidbausteinen, wie beispielsweise durch Fragmentkondensation einzelner überlappender, komplementärer Nukleinsäurebausteine der Doppelhelix herstellbar. Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phosphoamiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, Seiten 896–897) erfolgen. Die Anlagerung synthetischer Oligonukleotide und Auffüllen von Lücken mit Hilfe des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase und Ligationsreaktionen sowie allgemeine Klonierungsverfahren werden in Sambrook et al. (1989), Molecular Cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, beschrieben.

Unter einer „abgeleiteten“ Nukleinsäuresequenz wird erfindungsgemäß, wenn keine anderen Angaben gemacht werden, eine Sequenz verstanden, die mit der Ausgangsequenz eine Identität von mindestens 80% oder mindestens 90%, insbesondere 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% und 99% aufweist.

Unter „Identität“ zwischen zwei Nukleinsäuren wird die Identität der Nukleotide über die jeweils gesamte Nukleinsäurelänge verstanden, insbesondere die Identität, die durch Vergleich mit Hilfe der Vector NTI Suite 7.1 Software der Firma Informax (USA) unter Anwendung der Clustal Methode (siehe oben).

Gegenstand der Erfindung sind auch Nukleinsäuresequenzen, kodierend für eines der obigen Peptide und deren funktionalen Äquivalenten, welche z.B. unter Verwendung künstlicher Nukleotidanaloga zugänglich sind.

Die Erfindung betrifft sowohl isolierte Nukleinsäuremoleküle, welche für erfindungsgemäße Peptide oder biologisch aktive Abschnitte davon kodieren, sowie Nukleinsäurefragmente, die z.B. als Hybridisierungssonden oder Primer zur Identifizierung oder Amplifizierung von erfindungsgemäßer kodierenden Nukleinsäuren verwendet werden können.

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle können zudem untranslatierte Sequenzen vom 3'- und/oder 5'-Ende des kodierenden Genbereichs enthalten

10

Ein "isoliertes" Nukleinsäuremolekül wird von anderen Nukleinsäuremolekülen abgetrennt, die in der natürlichen Quelle der Nukleinsäure zugegen sind und kann überdies im wesentlichen frei von anderem zellulären Material oder Kulturmedium sein, wenn es durch rekombinante Techniken hergestellt wird, oder frei von chemischen Vorstufen oder anderen Chemikalien sein, wenn es chemisch synthetisiert wird.

15

Ein erfindungsgemäßes Nukleinsäuremolekül kann mittels molekularbiologischer Standard-Techniken und der erfindungsgemäß bereitgestellten Sequenzinformation isoliert werden. Beispielsweise kann cDNA aus einer geeigneten cDNA-Bank isoliert werden, indem eine der konkret offenbarten vollständigen Sequenzen oder ein Abschnitt davon als Hybridisierungssonde und Standard-Hybridisierungstechniken (wie z.B. beschrieben in Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2. Aufl., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989) verwendet werden. Überdies lässt sich ein Nukleinsäuremolekül, umfassend eine der erfindungsgemäßen Sequenzen oder ein Abschnitt davon, durch Polymerasekettenreaktion isolieren, wobei die Oligonukleotidprimer, die auf der Basis dieser Sequenz erstellt wurden, verwendet werden. Die so amplifizierte Nukleinsäure kann in einen geeigneten Vektor kloniert werden und durch DNA-Sequenzanalyse charakterisiert werden. Die erfindungsgemäßen Oligonukleotide können ferner durch Standard-Syntheseverfahren, z.B. mit einem automatischen DNA-Synthesegerät, hergestellt werden.

20

25

30

Die Erfindung umfasst weiterhin die zu den konkret beschriebenen Nukleotidsequenzen komplementären Nukleinsäuremoleküle oder einen Abschnitt davon.

35

Die erfindungsgemäß Nukleotidsequenzen ermöglichen die Erzeugung von Sonden und Primern, die zur Identifizierung und/oder Klonierung von homologer Sequenzen in anderen Zelltypen und Organismen verwendbar sind. Solche Sonden bzw. Primer umfassen gewöhnlich einen Nukleotidsequenzbereich, der unter stringenten Bedingungen

an mindestens etwa 12, vorzugsweise mindestens etwa 25, wie z.B. etwa 40, 50 oder 75 aufeinanderfolgende Nukleotide eines Sense-Stranges einer erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz oder eines entsprechenden Antisense-Stranges hybridisiert.

- 5 Weitere erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenzen sind abgeleitet von kodierenden Sequenzen zu den erfindungsgemäßen AGER-RMEs oder AGER-CDPs und unterscheiden sich davon durch Addition, Substitution, Insertion oder Deletion einzelner oder mehrerer Nukleotide, kodieren aber weiterhin für Peptide mit dem gewünschten Eigenschaftsprofil.

10

Erfindungsgemäß umfasst sind auch solche Nukleinsäuresequenzen, die sogenannte stumme Mutationen umfassen oder entsprechend der Codon-Nutzung eines speziellen Ursprungs- oder Wirtsorganismus, im Vergleich zu einer konkret genannten Sequenz verändert sind, ebenso wie natürlich vorkommende Varianten, wie z.B. Spleißvarianten oder Allelvarianten, davon. Gegenstand sind ebenso durch konservative Nukleotid-

15 substitutionen (d.h. die betreffende Aminosäure wird durch eine Aminosäure gleicher Ladung, Größe, Polarität und/oder Löslichkeit ersetzt) erhältliche Sequenzen.

20

Gegenstand der Erfindung sind auch die durch Sequenzpolymorphismen von den konkret offenbarten Nukleinsäuren abgeleiteten Moleküle. Diese genetischen Polymorphismen können zwischen Individuen innerhalb einer Population aufgrund der natürlichen Variation existieren. Diese natürlichen Variationen bewirken üblicherweise eine Varianz von 1 bis 5 % in der Nukleotidsequenz eines Gens.

25

Weiterhin umfasst die Erfindung auch Nukleinsäuresequenzen, welchen mit oben genannten kodierenden Sequenzen hybridisieren oder dazu komplementär sind. Diese Polynukleotide lassen sich bei Durchmusterung von genomischen oder cDNA-Banken auffinden und gegebenenfalls daraus mit geeigneten Primern mittels PCR vermehren und anschließend beispielsweise mit geeigneten Sonden isolieren. Eine weitere Mög-

30 lichkeit bietet die Transformation geeigneter Mikroorganismen mit erfindungsgemäßen Polynukleotiden oder Vektoren, die Vermehrung der Mikroorganismen und damit der Polynukleotide und deren anschließende Isolierung. Darüber hinaus können erfindungsgemäße Polynukleotide auch auf chemischem Wege synthetisiert werden.

35

Unter der Eigenschaft, an Polynukleotide „hybridisieren“ zu können, versteht man die Fähigkeit eines Poly- oder Oligonukleotids unter stringenten Bedingungen an eine nahezu komplementäre Sequenz zu binden, während unter diesen Bedingungen unspezifische Bindungen zwischen nicht-komplementären Partnern unterbleiben. Dazu sollten die Sequenzen zu 70-100%, vorzugsweise zu 90-100%, komplementär sein. Die Ei-

genschaft komplementärer Sequenzen, spezifisch aneinander binden zu können, macht man sich beispielsweise in der Northern- oder Southern-Blot-Technik oder bei der Primerbindung in PCR oder RT-PCR zunutze. Üblicherweise werden dazu Oligonukleotide ab einer Länge von 30 Basenpaaren eingesetzt. Unter stringenten Bedingungen versteht man beispielsweise in der Northern-Blot-Technik die Verwendung einer 50 – 70 °C, vorzugsweise 60 – 65 °C warmen Waschlösung, beispielsweise 0,1x SSC-Puffer mit 0,1% SDS (20x SSC: 3M NaCl, 0,3M Na-Citrat, pH 7,0) zur Elution unspezifisch hybridisierter cDNA-Sonden oder Oligonukleotide. Dabei bleiben, wie oben erwähnt, nur in hohem Maße komplementäre Nukleinsäuren aneinander gebunden. Die Einstellung stringenter Bedingungen ist dem Fachmann bekannt und ist z.B. in Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6. beschrieben.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft "Antisense"-Nukleinsäuren. Diese umfasst eine Nukleotidsequenz, die zu einer kodierenden "Sense"-Nukleinsäure, komplementär ist. Die Antisense-Nukleinsäure kann zum gesamten kodierenden Strang oder nur zu einem Abschnitt davon komplementär sein. Bei einer weiteren Ausführungsform ist das Antisense-Nukleinsäuremolekül antisense zu einem nicht-kodierenden Bereich des kodierenden Stranges einer Nukleotidsequenz. Der Begriff "nicht-kodierender Bereich" betrifft die als 5'- und 3'-untranslatierte Bereiche bezeichneten Sequenzabschnitte.

Ein Antisense-Oligonukleotid kann bspw. etwa 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 oder 50 Nukleotide lang sein. Eine erfindungsgemäße Antisense-Nukleinsäure kann durch chemische Synthese und enzymatische Ligationsreaktionen mittels im Fachgebiet bekannter Verfahren konstruiert werden. Eine Antisense-Nukleinsäure kann chemisch synthetisiert werden, wobei natürlich vorkommende Nukleotide oder verschieden modifizierte Nukleotide verwendet werden, die so gestaltet sind, dass sie die biologische Stabilität der Moleküle erhöhen, oder die physikalische Stabilität des Duplexes erhöhen, der zwischen der Antisense- und Sense-Nukleinsäure entstanden ist. Beispielsweise können Phosphorthioat-Derivate und acridinsubstituierte Nukleotide verwendet werden. Beispiele modifizierter Nukleotide, die zur Erzeugung der Antisense-Nukleinsäure verwendet werden können, sind u.a. 5-Fluoruracil, 5-Bromuracil, 5-Chloruracil, 5-Ioduracil, Hypoxanthin, Xanthin, 4-Acetylcytosin, 5-(Carboxyhydroxymethyl)uracil, 5-Carboxymethylaminomethyl-2-thiouridin, 5-Carboxymethylaminomethyluracil, Dihydrouracil, Beta-D-Galactosylqueosin, Inosin, N6-Isopentenyladenin, 1-Methylguanin, 1-Methylinosin, 2,2-Dimethylguanin, 2-Methyladenin, 2-Methylguanin, 3-Methylcytosin, 5-Methylcytosin, N6-Adenin, 7-Methylguanin, 5-Methylaminomethyluracil, 5-Methoxyaminomethyl-2-thiouracil, Beta-D-Mannosylqueosin, 5'-Methoxycarboxymethyluracil, 5-Methoxyuracil, 2-Methylthio-N6-

isopentenyladenin, Uracil-5-oxyessigsäure (v), Wybutoxosin, Pseudouracil, Queosin, 2-Thiocytozin, 5-Methyl-2-thiouracil, 2-Thiouracil, 4-Thiouracil, 5-Methyluracil, Uracil-5-oxyessigsäuremethylester, Uracil-5-oxyessigsäure (v), 5-Methyl-2-thiouracil, 3-(3-Amino-3-N-2-carboxypropyl)uracil, (acp3)w und 2,6-Diaminopurin. Die Antisense-
5 Nukleinsäure kann auch biologisch hergestellt werden, indem ein Expressionsvektor verwendet wird, in den eine Nukleinsäure in Antisense-Richtung subkloniert worden ist.

3. Expressionskonstrukte und Vektoren

10 Gegenstand der Erfindung sind außerdem Expressionskonstrukte, enthaltend unter der genetischen Kontrolle regulativer Nukleinsäuresequenzen eine für ein erfindungsgemäßes AGER-RME oder AGER-CDP oder funktionales Äquivalent oder Immunglobulin kodierende Nukleinsäuresequenz; sowie Vektoren, umfassend wenigstens eines dieser Expressionskonstrukte.

15 Vorzugsweise umfassen solche erfindungsgemäßen Konstrukte 5'-stromaufwärts von der jeweiligen kodierenden Sequenz einen Promotor und 3'-stromabwärts eine Terminatorsequenz sowie gegebenenfalls weitere übliche regulative Elemente, und zwar jeweils operativ verknüpft mit der kodierenden Sequenz. Unter einer „operativen Ver-
20 knüpfung“ versteht man die sequentielle Anordnung von Promotor, kodierender Sequenz, Terminator und gegebenenfalls weiterer regulativer Elemente derart, dass jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der Expression der kodierenden Sequenz bestimmungsgemäß erfüllen kann. Beispiele für operativ verknüpfbare Sequenzen sind Targeting-Sequenzen sowie Enhancer, Polyadenylierungssignale und dergleichen.
25 Weitere regulative Elemente umfassen selektierbare Marker, Amplifikationssignale, Replikationsursprünge und dergleichen. Geeignete regulatorische Sequenzen sind z.B. beschrieben in Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990).

30 Zusätzlich zu den artifiziellen Regulationssequenzen kann die natürliche Regulationssequenz vor dem eigentlichen Strukturgen noch vorhanden sein. Durch genetische Veränderung kann diese natürliche Regulation gegebenenfalls ausgeschaltet und die Expression der Gene erhöht oder erniedrigt werden. Das Genkonstrukt kann aber auch einfacher aufgebaut sein, das heißt es werden keine zusätzlichen Regulationssignale
35 vor das Strukturgen insertiert und der natürliche Promotor mit seiner Regulation wird nicht entfernt. Statt dessen wird die natürliche Regulationssequenz so mutiert, dass keine Regulation mehr erfolgt und die Genexpression gesteigert oder verringert wird. Die Nukleinsäuresequenzen können in einer oder mehreren Kopien im Genkonstrukt enthalten sein.

Beispiele für brauchbare Promotoren sind: cos-, tac-, trp-, tet-, trp-tet-, lpp-, lac-, lpp-lac-, lacIq-, T7-, T5-, T3-, gal-, trc-, ara-, SP6-, lambda-PR- oder lambda-PL-Promotor, die vorteilhafterweise in gram-negativen Bakterien Anwendung finden; sowie die gram-positiven Promotoren amy und SPO2, die Hefepromotoren ADC1, MFalpha, AC, P-60, CYC1, GAPDH oder die Pflanzenpromotoren CaMV/35S, SSU, OCS, lib4, usp, STLS1, B33, not oder der Ubiquitin- oder Phaseolin-Promotor. Besonders bevorzugt ist die Verwendung induzierbarer Promotoren, wie z.B. licht- und insbesondere temperaturinduzierbarer Promotoren, wie der P₇P₁-Promotor. Prinzipiell können alle natürlichen Promotoren mit ihren Regulationssequenzen verwendet werden. Darüber hinaus können auch synthetische Promotoren vorteilhaft verwendet werden.

Die genannten regulatorischen Sequenzen sollen die gezielte Expression der Nukleinsäuresequenzen und der Proteinexpression ermöglichen. Dies kann beispielsweise je nach Wirtsorganismus bedeuten, dass das Gen erst nach Induktion exprimiert oder überexprimiert wird, oder dass es sofort exprimiert und/oder überexprimiert wird.

Die regulatorischen Sequenzen bzw. Faktoren können dabei vorzugsweise die Expression positiv beeinflussen und dadurch erhöhen oder erniedrigen. So kann eine Verstärkung der regulatorischen Elemente vorteilhafterweise auf der Transkriptionsebene erfolgen, indem starke Transkriptionssignale wie Promotoren und/oder "Enhancer" verwendet werden. Daneben ist aber auch eine Verstärkung der Translation möglich, indem beispielsweise die Stabilität der mRNA verbessert wird.

Die Herstellung einer Expressionskassette erfolgt durch Fusion eines geeigneten Promotors mit einer geeigneten kodierenden Nukleotidsequenz sowie einem Terminator- oder Polyadenylierungssignal. Dazu verwendet man gängige Rekombinations- und Klonierungstechniken, wie sie beispielsweise in T. Maniatis, E.F. Fritsch und J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) sowie in T.J. Silhavy, M.L. Berman und L.W. Enquist, Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) und in Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience (1987) beschrieben sind.

Das rekombinante Nukleinsäurekonstrukt bzw. Genkonstrukt wird zur Expression in einem geeigneten Wirtsorganismus vorteilhafterweise in einen wirtsspezifischen Vektor inseriert, der eine optimale Expression der Gene im Wirt ermöglicht. Vektoren sind dem Fachmann wohl bekannt und können beispielsweise aus "Cloning Vectors" (Pouwels P. H. et al., Hrsg, Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985) entnommen wer-

den. Unter Vektoren sind außer Plasmiden auch alle anderen dem Fachmann bekannten Vektoren, wie beispielsweise Phagen, Viren, wie SV40, CMV, Baculovirus und Adenovirus, Transposons, IS-Elemente, Phasmide, Cosmide, und lineare oder zirkuläre DNA zu verstehen. Diese Vektoren können autonom im Wirtsorganismus repliziert oder
5 chromosomal repliziert werden.

Als Beispiele für geeignete Expressionsvektoren können genannt werden:

10 Übliche Fusionsexpressionsvektoren, wie pGEX (Pharmacia Biotech Inc; Smith, D.B. und Johnson, K.S. (1988) *Gene* 67:31-40), pMAL (New England Biolabs, Beverly, MA) und pRIT 5 (Pharmacia, Piscataway, NJ), bei denen Glutathion-S-Transferase (GST), Maltose E-bindendes Protein bzw. Protein A an das rekombinante Zielprotein fusioniert wird.

15 Nicht-Fusionsprotein-Expressionsvektoren wie pTrc (Amann et al., (1988) *Gene* 69:301-315) und pET 11d (Studier et al. *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, Kalifornien (1990) 60-89).

20 Hefe-Expressionsvektor zur Expression in der Hefe *S. cerevisiae*, wie pYepSec1 (Baldari et al., (1987) *Embo J.* 6:229-234), pMFa (Kurjan und Herskowitz (1982) *Cell* 30:933-943), pJRY88 (Schultz et al. (1987) *Gene* 54:113-123) sowie pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, CA). Vektoren und Verfahren zur Konstruktion von Vektoren, die sich zur Verwendung in anderen Pilzen, wie filamentösen Pilzen, eignen, umfassen diejenigen, die eingehend beschrieben sind in: van den Hondel, C.A.M.J.J. & Punt, P.J.
25 (1991) "Gene transfer systems and vector development for filamentous fungi, in: *Applied Molecular Genetics of Fungi*, J.F. Peberdy et al., Hrsg., S. 1-28, Cambridge University Press: Cambridge.

30 Baculovirus-Vektoren, die zur Expression von Proteinen in gezüchteten Insektenzellen (bspw. Sf9-Zellen) verfügbar sind, umfassen die pAc-Reihe (Smith et al., (1983) *Mol. Cell Biol.* 3:2156-2165) und die pVL-Reihe (Lucklow und Summers (1989) *Virology* 170:31-39).

35 Pflanzen-Expressionsvektoren, wie solche, die eingehend beschrieben sind in: Becker, D., Kemper, E., Schell, J. und Masterson, R. (1992) "New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left border", *Plant Mol. Biol.* 20:1195-1197; und Bevan, M.W. (1984) "Binary Agrobacterium vectors for plant transformation", *Nucl. Acids Res.* 12:8711-8721.

Säugetier-Expressionsvektoren, wie pCDM8 (Seed, B. (1987) Nature 329:840) und pMT2PC (Kaufman et al. (1987) EMBO J. 6:187-195).

5 Weitere geeignete Expressionssysteme für prokaryontische und eukaryotische Zellen sind in Kapitel 16 und 17 von Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T., Molecular cloning: A Laboratory Manual, 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989 beschrieben.

4. Rekombinante Wirtsorganismen

10

Mit Hilfe der erfindungsgemäßen Vektoren sind rekombinante Organismen herstellbar, welche beispielsweise mit wenigstens einem erfindungsgemäßen Vektor transformiert sind und zur Produktion der erfindungsgemäßen Polypeptide eingesetzt werden können. Vorteilhafterweise werden die oben beschriebenen erfindungsgemäßen rekombinanten Konstrukte in ein geeignetes Wirtssystem eingebracht und exprimiert. Dabei werden vorzugsweise dem Fachmann bekannte geläufige Klonierungs- und Transfektionsmethoden, wie beispielsweise Co-Präzipitation, Protoplastenfusion, Elektroporation, retrovirale Transfektion und dergleichen, verwendet, um die genannten Nukleinsäuren im jeweiligen Expressionssystem zur Expression zu bringen. Geeignete Systeme werden beispielsweise in Current Protocols in Molecular Biology, F. Ausubel et al., Hrsg., Wiley Interscience, New York 1997, oder Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2. Aufl., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989 beschrieben.

25 Als Wirtsorganismen sind prinzipiell alle Organismen geeignet, die eine Expression der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren, ihrer Allelvarianten, ihrer funktionellen Äquivalente oder Derivate ermöglichen. Unter Wirtsorganismen sind beispielsweise Bakterien, Pilze, Hefen, pflanzliche oder tierische Zellen zu verstehen. Bevorzugte Organismen sind Bakterien, wie solche der Gattungen Escherichia, wie z. B. Escherichia coli, Streptomyces, Bacillus oder Pseudomonas, eukaryotische Mikroorganismen, wie Saccharomyces cerevisiae, Aspergillus, höhere eukaryotische Zellen aus Tieren oder Pflanzen, beispielsweise Sf9 oder CHO-Zellen.

35 Die Selektion erfolgreich transformierter Organismen kann durch Markergene erfolgen, die ebenfalls im Vektor oder in der Expressionskassette enthalten sind. Beispiele für solche Markergene sind Gene für Antibiotikaresistenz und für Enzyme, die eine farbbewirkende Reaktion katalysieren, die ein Anfärben der transformierten Zelle bewirkt. Diese können dann mittels automatischer Zellsortierung selektiert werden. Erfolgreich mit einem Vektor transformierte Mikroorganismen, die ein entsprechendes Antibiotika-

resistenzgen (z.B. G418 oder Hygromycin) tragen, lassen sich durch entsprechende Antibiotika-enthaltende Medien oder Nährböden selektieren. Markerproteine, die an der Zelloberfläche präsentiert werden, können zur Selektion mittels Affinitätschromatographie genutzt werden.

5

Gewünschtenfalls kann das Genprodukt auch in transgenen Organismen, wie transgenen Tieren, insbesondere Mäusen, Schafen oder transgenen Pflanzen zur Expression, gebracht werden.

- 10 Gegenstand der Erfindung sind weiterhin Verfahren zur rekombinanten Herstellung erfindungsgemäßer AGER-RME- oder AGER-CDP-Peptide oder funktioneller, biologisch aktiver Fragmente davon, wobei man einen Peptide-produzierenden rekombinanten Wirtsorganismus kultiviert, gegebenenfalls die Expression der Polypeptide induziert und diese aus der Kultur isoliert. Die Peptide können so auch in großtechnischem
- 15 Maßstab produziert werden, falls dies erwünscht ist.

- Der rekombinante Wirt kann nach bekannten Verfahren kultiviert und fermentiert werden. Bakterien können beispielsweise in TB- oder LB-Medium und bei einer Temperatur von 20 bis 40°C und einem pH-Wert von 6 bis 9 vermehrt werden. Im Einzelnen
- 20 werden geeignete Kultivierungsbedingungen beispielsweise in T. Maniatis, E.F. Fritsch and J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) beschrieben.

- Die Zellen werden dann, falls die Polypeptide nicht in das Kulturmedium sezerniert
- 25 werden, aufgeschlossen und das Produkt nach bekannten Proteinisolierungsverfahren aus dem Lysat gewonnen. Die Zellen können wahlweise durch hochfrequenten Ultraschall, durch hohen Druck, wie z.B. in einer French-Druckzelle, durch Osmolyse, durch Einwirkung von Detergenzien, lytischen Enzymen oder organischen Lösungsmitteln, durch Homogenisatoren oder durch Kombination mehrerer der aufgeführten Verfahren
- 30 aufgeschlossen werden.

- Eine Aufreinigung der Peptide kann mit bekannten, chromatographischen Verfahren erzielt werden, wie Molekularsieb-Chromatographie (Gelfiltration), wie Q-Sepharose-Chromatographie, Ionenaustausch-Chromatographie und hydrophobe Chroma-
- 35 tographie, sowie mit anderen üblichen Verfahren wie Ultrafiltration, Kristallisation, Ausfällen, Dialyse und nativer Gelelektrophorese. Geeignete Verfahren werden beispielsweise in Cooper, F. G., Biochemische Arbeitsmethoden, Verlag Walter de Gruyter, Berlin, New York oder in Scopes, R., Protein Purification, Springer Verlag, New York, Heidelberg, Berlin beschrieben.

Besonders geeignet ist es, zur Isolierung des rekombinanten Peptids Vektorsysteme oder Oligonukleotide zu verwenden, die die cDNA um bestimmte Nukleotidsequenzen verlängern und damit für veränderte Polypeptide oder Fusionsproteine kodieren, die
5 z.B. einer einfacheren Reinigung dienen. Derartige geeignete Modifikationen sind beispielsweise als Anker fungierende sogenannte "Tags", wie z.B. die als Hexa-Histidin-Anker bekannte Modifikation oder Epitope, die als Antigene von Antikörpern erkannt werden können (beschrieben zum Beispiel in Harlow, E. and Lane, D., 1988, Antibodies: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor (N.Y.) Press). Diese Anker können zur
10 Anheftung der Peptide an einen festen Träger, wie z.B. einer Polymermatrix, dienen, die beispielsweise in einer Chromatographiesäule eingefüllt sein kann, oder an einer Mikrotiterplatte oder an einem sonstigen Träger verwendet werden kann.

Gleichzeitig können diese Anker auch zur Erkennung der Peptide verwendet werden.
15 Zur Erkennung der Peptide können außerdem übliche Marker, wie Fluoreszenzfarbstoffe, Enzymmarker, die nach Reaktion mit einem Substrat ein detektierbares Reaktionsprodukt bilden, oder radioaktive Marker, allein oder in Kombination mit den Ankern zur Derivatisierung der Peptide verwendet werden.

20 5. Immunglobuline

5.1 Definition

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind monoklonale oder polyklonale Antikörper,
25 die an ein erfindungsgemäßes AGER-RME oder AGER-CDP oder Derivat/Äquivalent davon spezifisch binden, d.h. Antikörper mit Spezifität für ein erfindungsgemäßes AGER-RME oder Derivat/Äquivalent davon. Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind auch Teile dieser Antikörper, insbesondere antigenbindende Teile davon, d.h. Antikörperfragmente, die ein erfindungsgemäßes AGER-RME oder AGER-CDP oder
30 ein Derivat/Äquivalent davon binden.

Unter einem „Derivat/Äquivalent“ von AGER-RME oder AGER-CDP versteht man in diesem Zusammenhang auch Vorstufen wie AGER oder sRAGE oder andere AGER
35 Splice-Varianten in unterschiedlichen konformativen Zuständen, die beispielsweise durch Wechselwirkung dieser Moleküle mit einen korrespondierenden Bindungspartner transient oder permanent induziert werden.

Vorzugsweise wählt man den erfindungsgemäßen Antikörper so, dass er eine bestimmte Bindungskinetik aufweist (z. B. hohe Affinität, geringe Dissoziation, niedrige

off-Geschwindigkeit, starke neutralisierende Aktivität) für die spezifische Bindung an erfindungsgemäßes AGER-RME oder AGER-CDP oder Derivat/Äquivalent davon.

5 So können Antikörper mit einer Affinität für das erfindungsgemäße AGER-RME oder AGER-CDP oder Derivat/Äquivalent davon im Bereich von $K_D=10^{-6}$ – 10^{-12} M bereitgestellt werden.

10 Einem weiteren Aspekt zufolge kann man die erfindungsgemäßen Antikörper so wählen, dass sie das AGER-RME oder AGER-CDP oder Derivat/Äquivalent davon mit einer k_{off} -Geschwindigkeitskonstanten von $0,1\text{ s}^{-1}$ oder weniger binden.

Bei den Antikörpern handelt es sich vorzugsweise um isolierte Antikörper. Einem weiteren Aspekt zufolge sind die Antikörper neutralisierende Antikörper. Zu den erfindungsgemäßen Antikörpern gehören insbesondere monoklonale und rekombinante Antikörper. Der erfindungsgemäße Antikörper kann eine Aminosäuresequenz umfassen, die vollständig von einer einzigen Spezies abstammt, kann also z.B. ein humaner Antikörper oder ein Mausantikörper sein. Weiteren Ausführungsformen zufolge kann der Antikörper ein chimärer Antikörper oder ein CDR-Graft-Antikörper oder eine andere Form eines humanisierten Antikörpers sein.

20 Der Begriff „Antikörper“ soll sich auf Immunglobulinmoleküle beziehen, die aus 4 Polypeptidketten, zwei schweren (H) Ketten und zwei leichten (L) Ketten, gebildet sind. Die Ketten sind in der Regel durch Disulfid-Bindungen miteinander verknüpft. Jede schwere Kette setzt sich aus einer variablen Region der schweren Kette (hier als HCVR oder VH abgekürzt) und einer konstanten Region der schweren Kette zusammen. Die konstante Region der schweren Kette wird aus drei Domänen CH1, CH2 und CH3 gebildet. Jede leichte Kette setzt sich aus einer variablen Region der leichten Kette (hier als LCVR oder VL abgekürzt) und einer konstanten Region der leichten Kette zusammen. Die konstante Region der leichten Kette wird aus einer Domäne CL gebildet. Die VH- und VL-Regionen können weiter unterteilt werden in hypervariable Regionen, die als komplementaritätsbestimmende Regionen (CDR für Complementarity Determining Region) bezeichnet werden und mit konservierteren Regionen, die als Gerüstregionen (FR für Frame Work Region) bezeichnet werden, durchsetzt sind. Jede VH- und VL-Region wird aus drei CDRs und vier FRs gebildet, die vom N-Terminus zum C-Terminus in folgender Reihenfolge angeordnet sind: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

Der Begriff „antigenbindender Teil“ eines Antikörpers (oder einfach „Antikörperteil“) bezieht sich auf ein oder mehrere Fragmente eines Antikörpers mit Spezifität für ein

erfindungsgemäßes AGER-RME oder AGER-CDP oder Derivat/Äquivalent davon, wobei das oder die Fragmente nach wie vor die Fähigkeit besitzen, das AGER-RME oder AGER-CDP oder Derivat/Äquivalent davon spezifisch zu binden. Es ist gezeigt worden, dass die antigenbindende Funktion eines Antikörpers von Fragmenten eines vollständigen Antikörpers wahrgenommen werden können. Zu Beispielen bindender Fragmente gehören im Sinne des Begriffs „antigenbindender Teil“ eines Antikörpers (i) ein Fab-Fragment, d.h. ein aus den VL-, VH-, CL- und CH1-Domänen zusammengesetztes monovalentes Fragment; (ii) ein F(ab')₂-Fragment, d.h. ein bivalentes Fragment, welches zwei in der Hinge-Region über eine Disulfid-Brücke miteinander verknüpfte Fab-Fragmente beinhaltet; (iii) ein Fd-Fragment, das sich aus den VH- und CH1-Domänen zusammengesetzt; (iv) ein Fv-Fragment, das sich aus den VL- und VH-Domänen eines einzelnen Arms eines Antikörpers zusammengesetzt; (v) ein dAb-Fragment (Ward *et al.*, (1989) *Nature* 341:544-546), das aus einer VH-Domäne oder VH, CH1, CH2, DH3, oder VH, CH2, CH3 besteht; und (vi) eine isolierte komplementaritätsbestimmende Region (CDR). Wenngleich die beiden Domänen des Fv-Fragments, nämlich VL und VH, von getrennten Genen kodiert sind, können sie des weiteren mit einem synthetischen Linker unter Verwendung rekombinanter Verfahren miteinander verbunden werden, wodurch sie als eine einzige Proteinkette hergestellt werden können, worin die VL- und VH-Regionen sich zusammenfinden, um monovalente Moleküle zu bilden (als Einzelkette-Fv (ScFv) bekannt; siehe z.B. Bird *et al.* (1988) *Science* 242:423-426; und Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883). Derartige Einzelketten-Antikörper sollen auch von dem Begriff „antigenbindender Teil“ eines Antikörpers erfasst werden. Andere Formen von Einzelketten-Antikörpern wie „Diabodies“ gehören ebenfalls dazu. Diabodies sind bivalente, bispezifische Antikörper, in denen VH- und VL-Domänen auf einer einzelnen Polypeptidkette exprimiert sind, wobei allerdings ein Linker verwendet wird, der zu kurz ist, als dass sich die beiden Domänen auf derselben Kette zusammenfinden können, wodurch man die Domänen zwingt, mit komplementären Domänen einer anderen Kette zu paaren und zwei antigenbindende Stellen zu bilden (siehe z.B. Holliger, P., *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448; Poljak, R.J., *et al.* (1994) *Structure* 2:1121-1123).

Des weiteren kann ein Antikörper oder antigenbindender Teil davon Teil eines größeren Immunadhäsionsmoleküls sein, das durch kovalente oder nicht kovalente Assoziierung des Antikörpers oder Antikörperteils mit einem oder mehreren weiteren Proteinen oder Peptiden gebildet wird. Zu solchen Immunadhäsionsmolekülen gehört die Verwendung der Streptavidin-Kernregion, um ein tetrameres scFv-Molekül herzustellen (Kipriyanov, S.M., *et al.* (1995) *Human Antibodies and Hybridomas* 6:93-101) und die Verwendung eines Cysteinrestes, eines Markerpeptids und eines C-terminalen Poly-

histidin-Tags, um bivalente und biotinylierte scFv-Moleküle zu machen (Kipriyanov, S.M., *et al.* (1994) *Mol. Immunol.* 31:1047-1058).

5 Antikörperteile, wie Fab und F(ab')₂-Fragmente, können aus ganzen Antikörpern hergestellt werden, indem man konventionelle Techniken verwendet, wie die Verdauung mit Papain bzw. Pepsin. Darüber hinaus können Antikörper, Antikörperteile und Immunadhäsionsmoleküle erhalten werden, indem man standardisierte rekombinante DNA-Techniken verwendet. Ein „isolierter Antikörper mit Spezifität für ein erfindungs-
10 gemäßes AGER-RME oder AGER-CDP oder Derivat/Äquivalent davon“ umschreibt einen Antikörper mit Spezifität für ein erfindungsgemäßes AGER-RME oder AGER-CDP oder Derivat/Äquivalent davon, der im wesentlichen frei von anderen Antikörpern mit unterschiedlichen Antigenspezifitäten ist.

15 Der Begriff „neutralisierender Antikörper“ beschreibt einen Antikörper, dessen Bindung an ein bestimmtes Antigen zur Inhibierung der biologischen Aktivität des Antigens führt. Diese Inhibierung der biologischen Aktivität des Antigens kann beurteilt werden, indem man einen oder mehrere Indikatoren für die biologische Aktivität des Antigens misst, wobei man einen geeigneten in vitro- oder in vivo-Assay verwendet.

20 Der Begriff „monoklonaler Antikörper“ beschreibt einen Antikörper, der von einem Hybridom abstammt (z. B. ein Antikörper, der von einem mittels Hybridomtechnologie, wie der standardisierten Hybridommethodik nach Köhler und Milstein, hergestellten Hybridom sekretiert wird). Ein von einem Hybridom abstammender Antikörper mit Spezifität für ein erfindungsgemäßes AGER-RME oder AGER-CDP oder Derivat/Äquivalent davon wird daher als monoklonaler Antikörper bezeichnet.
25

Der Begriff „rekombinanter Antikörper“ beschreibt Antikörper, die mit rekombinanten Mitteln hergestellt, exprimiert, erzeugt oder isoliert werden, wie Antikörper, die unter Verwendung eines in eine Wirtszelle transfizierten, rekombinanten Expressionsvektors
30 exprimiert werden; Antikörper, die aus einer rekombinanten kombinatorischen Antikörperbank isoliert sind; Antikörper, die aus einem Tier (z. B. einer Maus), das durch humane Immunglobulingene transgen ist, isoliert sind (siehe z. B. Taylor, L.D., *et al.* (1992) *Nucl. Acids Res.* 20:6287-6295); oder Antikörper, die auf irgend eine andere Weise, bei der bestimmte Immunglobulin-Gensequenzen (wie humane Immunglobulin-Gensequenzen) mit anderen DNA-Sequenzen zusammengesetzt werden, hergestellt, exprimiert, erzeugt oder isoliert werden. Zu rekombinanten Antikörpern gehören
35 beispielsweise chimäre, CDR-Graft- und humanisierte Antikörper.

Der Begriff „humaner Antikörper“ beschreibt Antikörper, deren variable und konstante Regionen Immunglobulinsequenzen der Humankeimbahn, wie beispielsweise von Kabat *et al.* (siehe Kabat, *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition*, U.S. Department of Health und Human Services, NIH Publication Nr. 91-3242) beschrieben, entsprechen oder davon abstammen. Die erfindungsgemäßen humanen Antikörper können allerdings Aminosäurereste beinhalten, die nicht von humanen Keimbahn-Immunglobulinsequenzen kodiert sind (z. B. Mutationen, die durch zufällige oder ortsspezifische Mutagenese *in vitro* oder durch somatische Mutation *in vivo* eingeführt sind), beispielsweise in den CDRs, und insbesondere in CDR3. Erfindungsgemäße rekombinante humane Antikörper haben variable Regionen und können auch konstante Regionen beinhalten, die von Immunglobulinsequenzen der Humankeimbahn abstammen (siehe Kabat, E.A., *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition*, U.S. Department of Health und Human Services, NIH Publication Nr. 91-3242). Bestimmten Ausführungsformen zufolge werden derartige rekombinante humane Antikörper allerdings einer *in vitro*-Mutagenese (oder falls ein durch humane Ig-Sequenzen transgenes Tier verwendet wird, einer somatischen *in vivo*-Mutagenese) unterzogen, so dass die Aminosäuresequenzen der VH- und VL-Regionen der rekombinanten Antikörper Sequenzen sind, die, wenngleich sie mit VH- und VL-Sequenzen der Humankeimbahn verwandt sind oder davon abstammen, innerhalb des humanen Antikörper-Keimbahnrepertoires *in vivo* natürlicherweise nicht existieren. Bestimmten Ausführungsformen zufolge sind derartige rekombinante Antikörper das Resultat einer selektiven Mutagenese oder Rückmutation, oder beides.

Der Begriff „Rückmutation“ bezieht sich auf ein Verfahren, bei dem einige oder sämtliche der somatisch mutierten Aminosäuren eines humanen Antikörpers mit den entsprechenden Keimbahnresten einer homologen Keimbahnantikörpersequenz ersetzt werden. Die Sequenzen für die schwere und leichte Kette eines erfindungsgemäßen humanen Antikörpers werden getrennt mit den Keimbahnsequenzen in der VBASE-Datenbank verglichen, um die Sequenzen mit der größten Homologie zu identifizieren. Abweichungen im erfindungsgemäßen humanen Antikörper werden auf die Keimbahnsequenz zurückgeführt, indem man an definierten Nukleotidpositionen, die solche abweichenden Aminosäuren kodieren, mutiert. Die direkte oder indirekte Bedeutung jeder auf diese Weise als Kandidat für eine Rückmutation identifizierten Aminosäure für die Antigenbindung sollte untersucht werden, und eine Aminosäure, die nach Mutation eine wünschenswerte Eigenschaft des humanen Antikörpers beeinträchtigt, sollte in den endgültigen humanen Antikörper nicht miteinbezogen werden. Um die Anzahl der Aminosäuren für eine Rückmutation so gering wie möglich zu halten, können diejenigen Aminosäurepositionen unverändert bleiben, die zwar von der am nächsten kommenden Keimbahnsequenz abweichen aber mit der entsprechenden Aminosäurese-

quenz einer zweiten Keimbahnsequenz identisch sind, vorausgesetzt, daß die zweite Keimbahnsequenz mit der Sequenz des erfindungsgemäßen humanen Antikörpers zumindest in 10 und vorzugsweise in 12 Aminosäuren auf beiden Seiten der fraglichen Aminosäure identisch und co-linear ist. Rückmutationen können auf beliebiger Stufe
5 der Antikörpertoptimierung vorgenommen werden.

Der Begriff „chimärer Antikörper“ umfasst Antikörper, in denen einzelne Teile des Moleküls aus verschiedenen Spezies abgeleitet sind. So sind chimäre Antikörper, ohne darauf beschränkt zu sein, z.B. Antikörper, die Sequenzen für die variable Region der
10 schweren und leichten Kette aus einer Spezies beinhalten, in denen aber die Sequenzen einer oder mehrerer der CDR-Regionen aus VH und/oder VL mit CDR-Sequenzen einer anderen Spezies ersetzt sind. In solchen Antikörpern können die variablen Regionen der schweren und leichten Kette aus Maus aufweisen, in denen eine oder mehrere der Maus-CDRs (z. B. CDR3) durch humane CDR-Sequenzen ersetzt sind.

15 Der Begriff „humanisierter Antikörper“ beschreibt Antikörper, die Sequenzen der variablen Region schwerer und leichter Kette aus einer nichthumanen Spezies (z. B. Maus, Ratte, Kaninchen, Huhn, Kamelid, Ziege) beinhalten, in denen jedoch wenigstens ein Teil der VH- und/oder VL-Sequenz verändert worden ist, um „humanähnlicher“ zu sein,
20 d. h. variablen Sequenzen der humanen Keimbahn ähnlicher zu sein. Eine Art eines humanisierten Antikörpers ist ein CDR-Graft-Antikörper, bei dem humane CDR-Sequenzen in nichthumane VH- und VL-Sequenzen eingesetzt sind, um die entsprechenden nichthumanen CDR-Sequenzen zu ersetzen.

25 Eine Methode, die Bindungskinetik eines Antikörpers zu messen, basiert auf der sogenannten Oberflächenplasmonresonanz. Der Begriff „Oberflächenplasmonresonanz“ bezieht sich auf ein optisches Phänomen, mit dem sich biospezifische Wechselwirkungen analysieren lassen, indem man Veränderungen von Proteinkonzentrationen mit einer Biosensormatrix nachweist, wobei man beispielsweise das BIAcore-System verwendet (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden und Piscataway, NJ). Für weitere
30 Beschreibungen siehe Jönsson, U., *et al.* (1993) *Ann. Biol. Clin.* 51:19-26; Jönsson, U., *et al.* (1991) *Biotechniques* 11:620-627; Johnsson, B., *et al.* (1995) *J. Mol. Recognit.* 8:125-131; und Johnsson, B., *et al.* (1991) *Anal. Biochem.* 198:268-277.

35 Der Begriff „ K_{off} “ beschreibt die off-Geschwindigkeitskonstante für die Dissoziation eines Antikörpers aus dem Antikörper/Antigen-Komplex.

Der Begriff „ K_d “ beschreibt die Dissoziationskonstante einer bestimmten Antikörper-Antigen-Wechselwirkung.

Die Bindungsaffinität der erfindungsgemäßen Antikörper kann beurteilt werden, indem man standardisierte in vitro-Immunoassays, wie ELISA- oder BIAcore-Analysen, verwendet.

5

5.2 Herstellung von Immunglobulinen

5.2.1 Herstellung von polyklonalen Antikörpern

- 10 Die vorliegende Erfindung betrifft polyklonale anti-AGER-RME oder anti-AGER-CDP Antikörper und deren Herstellung

Dazu wird ein Wirt mit wenigstens einem erfindungsgemäßen AGER-RME oder AGER-CDP oder Derivat/Äquivalent davon immunisiert; und ein als Antwort auf die Immunisierung gebildetes Antikörper-haltiges Serum des Wirts gewinnt.

Sind die zu verwendenden AGER-RMEs oder AGER-CDPs nicht oder nur schwach immunogen, so kann man ihre Immunogenität dadurch erhöhen, daß man sie an Träger, vorzugsweise ein Trägerprotein, wie Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH), Limulus Polyphenus Hemocyanin ((LPH), Rinderserumalbumin (BSA) oder Ovalbumin (OVA), koppelt. Dazu stehen dem Fachmann eine Reihe von Kopplungsmöglichkeiten zur Verfügung, die allgemein bekannt sind. Zweckmäßig kann beispielsweise die Umsetzung mit Glutardialdehyd sein, beispielsweise durch Inkubation von AGER-RMEs oder AGER-CDPs mit einem geeigneten Peptid oder Peptid-Gemisch in Wasser oder einem wässrigen Lösungsmittel. Diese Umsetzung kann bequemerweise bei Umgebungstemperatur, also in der Regel Raumtemperatur, durchgeführt werden. Es kann allerdings auch zweckmäßig sein, zu kühlen oder leicht zu erwärmen. In der Regel führt die Umsetzung innerhalb weniger Stunden zum erwünschten Ergebnis, eine Reaktionsdauer von beispielsweise 2 h liegt im üblichen Bereich. Die Glutardialdehyd-Konzentration liegt in der Regel im ppm- bis %-Bereich, zweckmäßigerweise von 10 ppm bis zu 1 %, vorzugsweise von 100 ppm bis 0,5 %. Die Optimierung der Reaktionsparameter liegt im Bereich des fachmännischen Könnens.

Zusätzlich zum Antigen enthalten die Zusammensetzungen in der Regel weitere Hilfsstoffe, insbesondere üblicherweise zur Immunisierung eingesetzte Adjuvantien, z.B. Freund-Adjuvanz. Insbesondere verwendet man komplettes Freund-Adjuvanz für die erste Immunisierung wohingegen alle weiteren Immunisierungen mit inkomplettem Freund-Adjuvanz durchgeführt werden. Zur Herstellung der Immunisierungscocktails wird das Antigen (Immunogen), vorzugsweise als oben beschriebenes Komponenten-

35

Gemisch, zu dem oder den Hilfsstoffen gegeben. In der Regel wird dabei das Antigen emulgiert.

5 Als Wirt eignen sich insbesondere Nager oder auch Kaninchen. Diesen oder anderen geeigneten Wirten werden die Immunisierungscocktails, vorzugsweise subkutan, injiziert. Die Antikörpertiter können mit einem Immunoassay, beispielsweise kompetitiv mit einem gegen Wirt-IgG gerichteten Schaf-Antiserum und markiertem AGER-RME oder AGER-CDP, bestimmt werden. So kann gegen Ende der Immunisierung entschieden werden, ob ein bestimmter Wirt zur Antikörpergewinnung geeignet ist. Werden be-
10 spielsweise vier Immunisierungen durchgeführt, so kann man nach der dritten Immunisierung den Antikörpertiter bestimmen und dann aus Tieren, die einen ausreichenden Antikörpertiter aufweisen, Antikörper gewinnen.

15 Zur Gewinnung gebildeter Antikörper ist es bevorzugt, den Wirten über mehrere Wochen oder Monate Blut abzunehmen. Abschließend kann man den Wirt ausbluten lassen. Aus dem so gewonnenen Blut kann in an sich bekannter Weise Serum gewonnen werden, das die erwünschten Antikörper enthält. Das so erhaltene Vollserum kann erforderlichenfalls in fachmännischer Weise weiter aufgereinigt werden, um die darin enthaltene Antikörperfraktion und insbesondere die AGER-RME- oder AGER-CDP-
20 erkennenden Antikörper anzureichern.

Gemäß einer besonderen Ausführungsform dieses Verfahrens selektiert man wenigstens einen Antikörper des Serums, der das als Immunogen verwendete AGER-RME AGER-CDP oder ein Derivat/Äquivalent davon spezifisch erkennt. Spezifität meint in
25 diesem Zusammenhang eine höhere Bindungsaffinität des Antikörpers für das Immunogen als für andere, insbesondere immunogen verwandte Proteine, wie APP (Amyloid Precursor Protein).

5.2.2 Herstellung von monoklonalen Antikörpern

30 Erfindungsgemäß brauchbare Immunglobuline sind inter Anwendung an sich bekannter Methoden zugänglich. So gestattet die Hybridomtechnologie die Herstellung von monospezifischen Antikörpern für ein interessierendes Antigen. Weiterhin sind rekombinante Antikörpertechniken, wie das in-vitro-Screenen von Antikörperbanken entwickelt
35 worden, mit deren Hilfe sich ebenfalls derartige spezifische Antikörper herstellen lassen.

So kann man beispielsweise ein Tier mit dem interessierenden Antigen immunisieren. Dieser in-vivo-Ansatz kann des weiteren beinhalten, dass man aus den Lymphozyten

oder Milzzellen eines Tieres eine Reihe von Hybridomen etabliert und ein Hybridom selektiert, das einen das Antigen spezifisch bindenden Antikörper sekretiert. Bei dem zu immunisierenden Tier kann es sich beispielsweise um eine Maus, Ratte, Kaninchen, Huhn, Kamelid oder Schaf handeln, oder um eine transgene Version eines der zuvor

5 genannten Tiere, beispielsweise eine transgene Maus mit humanen Immunglobulingenen, die nach einem antigenen Stimulus humane Antikörper macht. Zu weiteren Typen von Tieren, die immunisiert werden können, zählen Mäuse mit schwerer kombinierter Immundefizienz (SCID), die mit humanen peripheren mononukleären Blutzellen (chimäre hu-PBMC-SCID-Mäuse) oder mit lymphoiden Zellen oder Vorläufern davon re-

10 konstituiert worden sind, genauso wie Mäuse, die mit einer letalen Gesamtkörperbestrahlung behandelt, anschließend mit Knochenmarkszellen aus einer Maus mit schwerer kombinierter Immundefizienz (SCID) gegen Strahlung geschützt und anschließend mit funktionalen humanen Lymphozyten transplantiert worden sind (das sogenannte Trimera-System). Eine weiterer Typus eines zu immunisierenden Tieres ist ein Tier

15 (z.B. eine Maus), in dessen Genom ein endogenes Gen, welches das interessierende Antigen kodiert, ausgeschaltet wurde („knocked out“), z.B. durch homologe Rekombination, so dass dieses Tier nach Immunisierung mit dem Antigen das Antigen als fremd erkennt. Für den Fachmann ist klar, dass die mit diesen Verfahren hergestellten polyclonalen oder monoklonalen Antikörper charakterisiert und selektiert werden, indem

20 man bekannte Screening-Verfahren verwendet, zu denen ELISA-Techniken gehören, ohne jedoch darauf beschränkt zu sein.

Einer weiteren Ausführungsform zufolge, screent man eine rekombinante Antikörperbank mit dem Antigen. Die rekombinante Antikörperbank kann beispielsweise auf der

25 Oberfläche von Bakteriophagen oder auf der Oberfläche von Hefezellen oder auf der Oberfläche von bakteriellen Zellen exprimiert sein. Die rekombinante Antikörperbank kann beispielsweise eine scFv-Bank oder eine Fab-Bank sein. Gemäß einer weiteren Ausführungsform sind Antikörperbanken als RNA-Protein-Fusionen exprimierbar.

30 Ein weiterer Ansatz zur Herstellung erfindungsgemäßer Antikörper beinhaltet eine Kombination aus *in vivo*- und *in vitro*-Ansätzen. Beispielsweise kann man das Antigen auf das Antikörper-Repertoire einwirken lassen, indem man ein Tier mit dem Antigen *in vivo* immunisiert und anschließend eine aus lymphoiden Zellen des Tieres hergestellte rekombinante Antikörperbank oder Einzeldomänen-Antikörperbank (z.B. mit schwerer und/oder leichter Kette) mit dem Antigen *in vitro* screent. Einem weiteren Ansatz zufolge lässt man das Antigen auf das Antikörper-Repertoire einwirken, indem man ein Tier mit dem Antigen *in vivo* immunisiert und anschließend eine aus lymphoiden Zellen des Tieres hergestellte rekombinante Antikörperbank oder Einzeldomänen-Bank einer Affinitätsreifung unterzieht. Einem weiteren Ansatz zufolge lässt man das Antigen auf das

Antikörper-Repertoire einwirken, indem man ein Tier mit dem Antigen *in vivo* immunisiert, anschließend einzelne Antikörper-produzierende Zellen, die einen interessierenden Antikörper sekretieren, selektiert und aus diesen selektierten Zellen cDNAs für die variable Region der schweren und leichten Kette gewinnt (z.B. mittels PCR) und die variablen Regionen der schweren und leichten Kette *in vitro* in Säugerwirtszellen exprimiert (was als das Lymphozyten-Antikörper-Selektionsverfahren, oder SLAM für „Selected Lymphocyte Antibody Method“, bezeichnet wird), wodurch sich die selektierten Antikörper-Gensequenzen weiter selektieren und manipulieren lassen. Außerdem können monoklonale Antikörper durch Expressionsklonierung selektiert werden, indem man die Antikörpergene für die schwere und leichte Kette in Säugerzellen exprimiert und diejenigen Säugerzellen selektiert, die einen Antikörper mit der gewünschten Bindungsaffinität sekretieren.

Mit vorliegender Erfindung werden definierte Antigene in Form von AGER-RMEs oder AGER-CDPs zum Screenen und Gegenscreenen zur Verfügung gestellt. So können erfindungsgemäß diejenigen polyklonalen und monoklonalen Antikörper selektiert werden, die ein erfindungsgemäß gewünschtes Eigenschaftsprofil gemäß obiger Definition aufweisen, wie z.B. einen AGER-induzierten Rezeptorstatus spezifisch erkennen.

Mit den erfindungsgemäßen Verfahren zur Herstellung von Antikörpern lassen sich verschiedene Antikörpertypen herstellen. Hierzu gehören im Wesentlichen humane Antikörper, chimäre Antikörper, humanisierte Antikörper und CDR-Graft-Antikörper sowie Antigen-bindende Teile davon.

Im Folgenden werden Verfahren zur Herstellung erfindungsgemäßer Antikörper beschrieben. Dabei wird zwischen In-vivo-Ansätzen, In-vitro-Ansätzen, oder einer Kombination aus beiden, unterschieden.

In-vivo-Ansätze:

Ausgehend von den in-vivo erzeugten Antikörper produzierenden Zellen können monoklonale Antikörper mittels standardisierter Techniken, wie der ursprünglich von Köhler und Milstein (1975, *Nature* 256:495-497) (siehe auch Brown *et al.* (1981) *J. Immunol* 127:539-46; Brown *et al.* (1980) *J Biol Chem* 255:4980-83; Yeh *et al.* (1976) *PNAS* 76:2927-31; und Yeh *et al.* (1982) *Int. J. Cancer* 29:269-75) beschriebenen Hybridom-technik, hergestellt werden. Die Technologie zur Produktion monoklonaler Antikörperhybridome ist hinlänglich bekannt (siehe allgemein R. H. Kenneth, in *Monoclonal Antibodies: A New Dimension In Biological Analyses*, Plenum Publishing Corp., New York, New York (1980); E. A. Lerner (1981) *Yale J. Biol. Med.*, 54:387-402; M. L. Gef-

ter et al. (1977) *Somatic Cell Genet.*, 3:231-36). Eine immortalisierte Zelllinie (typischerweise ein Myelom) wird dazu mit Lymphozyten (typischerweise Splenozyten oder Lymphknotenzellen oder periphere Blutlymphozyten) eines mit dem erfindungsgemäßen AGER-RME oder AGER-CDP oder Derivat/Äquivalent davon immunisierten Säugers fusioniert, und die Kulturüberstände der resultierenden Hybridomzellen werden gescreent, um ein Hybridom zu identifizieren, das einen monoklonalen Antikörper mit Spezifität für erfindungsgemäßes AGER-RME oder AGER-CDP oder für ein Derivat/Äquivalent davon produziert. Dazu kann man ein beliebiges, von vielen hinlänglich bekannten Protokollen für die Fusion von Lymphozyten und immortalisierten Zelllinien anwenden (siehe auch G. Galfre et al. (1977) *Nature* 266:550-52; Geftter et al. *Somatic Cell Genet.*, cited *supra*; Lerner, *Yale J. Biol. Med.*, cited *supra*; Kenneth, *Monoclonal Antibodies*, cited *supra*). Darüber hinaus sind dem Fachmann mannigfaltige Variationen solcher Verfahren, die ebenfalls brauchbar sind, bekannt. Typischerweise stammen die immortalisierten Zelllinien (z.B. eine Myelomzelllinie) von der gleichen Säugerspezies ab wie die Lymphozyten. Beispielsweise kann man murine Hybridome etablieren, indem man Lymphozyten aus einer mit einer erfindungsgemäßen immunogenen Zubereitung immunisierten Maus mit einer immortalisierten Mauszelllinie fusioniert. Bevorzugte immortalisierte Zelllinien sind Maus-Myelomzelllinien, welche für Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin enthaltendes Kulturmedium (HAT-Medium) sensitiv sind. Man kann eine beliebige von vielen Myelomzelllinien als Fusionspartner standardmäßig verwenden, z.B. die P3-NS1/1-Ag4-1-, P3-x63-Ag8.653- or Sp2/O-Ag14-Myelomlinie. Diese Myelomzelllinien sind von der American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, MD, erhältlich. Typischerweise werden HAT-sensitive Maus-Myelomzellen mit Maus-Splenozyten unter Verwendung von Polyethylenglykol (PEG) fusioniert. Die aus der Fusion resultierenden Hybridomzellen werden dann unter Verwendung von HAT-Medium selektiert, wodurch nicht fusionierte und nicht produktiv fusionierte Myelomzellen abgetötet werden (nicht fusionierte Splenozyten sterben nach mehreren Tagen ab, da sie nicht transformiert sind). Monoklonale Antikörperproduzierende Hybridomzellen, die ein erfindungsgemäßes AGER-RME oder AGER-CDP oder ein Derivat/Äquivalent davon spezifisch erkennen, werden identifiziert, indem man die Hybridomkulturüberstände auf solche Antikörper screent, z.B. indem man einen Standard-ELISA-Assay verwendet, um diejenigen Antikörper zu selektieren, die erfindungsgemäßes AGER-RME oder AGER-CDP oder ein Derivat/Äquivalent davon spezifisch binden können.

35

Je nach Art des gewünschten Antikörpers, können verschiedene Wirtstiere für die in-vivo-Immunisierung verwendet werden. Ein Wirt, der eine endogene Version des interessierenden Antigens selbst exprimiert, kann verwendet werden. Alternativ kann ein Wirt verwendet werden, der für eine endogene Version des interessierenden Antigens

defizient gemacht wurde. Es wurde beispielsweise gezeigt, dass Mäuse, die über homologe Rekombination am entsprechenden endogenen Gen für ein bestimmtes endogenes Protein defizient gemacht wurden (d.h. Knockout-Mäuse) eine humorale Antwort gegen das Protein, mit dem sie immunisiert wurden, erzeugen und daher zur Herstellung hochaffiner monoklonaler Antikörper gegen das Protein verwendet werden können (siehe z.B. Roes, J. et al. (1995) *J. Immunol. Methods* 183:231-237; Lunn, M.P. et al. (2000) *J. Neurochem.* 75:404-412).

Für die Herstellung nicht humaner Antikörper gegen erfindungsgemäßes AGER-RME oder AGER-CDP oder ein Derivat/Äquivalent davon sind viele nicht-menschliche Säuger als Wirte für die Antikörperherstellung geeignet. Hierzu gehören Mäuse, Ratten, Hühner, Kamelide, Kaninchen und Ziegen (und Knockout-Versionen davon), wenngleich Mäuse zur Hybridomherstellung bevorzugt sind. Desweiteren kann man zur Herstellung im Wesentlichen humaner Antikörper gegen ein humanes Antigen mit dualer Spezifität ein nicht-humanes Wirtstier verwenden, das ein humanes Antikörper-Repertoire exprimiert. Zu solchen nicht-humanen Tieren gehören transgene Tiere (z.B. Mäuse), die humane Immunglobulin-Transgene tragen (chimäre hu-PBMC-SCID-Mäuse) und Mensch/Maus-Bestrahlungschimären, die nachstehend eingehender beschrieben sind.

Einer Ausführungsform zufolge ist das Tier, das mit einem erfindungsgemäßen AGER-RME oder AGER-CDP oder Derivat/Äquivalent davon immunisiert wird, ein nicht-humaner Säuger, vorzugsweise eine Maus, der durch humane Immunglobulingene transgen ist, so dass der nicht-humane Säuger nach einem antigenen Stimulus humane Antikörper macht. Typischerweise werden in solche Tiere Immunglobulin-Transgene für schwere und leichte Kette mit humaner Keimbahnkonfiguration eingeführt, wobei die Tiere so verändert wurden, dass ihre endogenen Loci für schwere und leichte Kette inaktiv sind. Stimuliert man solche Tiere mit Antigen (z.B. mit einem humanen Antigen), werden Antikörper, die von den humanen Immunglobulinsequenzen abstammen (d.h. humane Antikörper), produziert. Aus den Lymphozyten solcher Tiere können mittels standardisierter Hybridomtechnologie humane monoklonale Antikörper gemacht werden. Zur weiteren Beschreibung transgener Mäuse mit humanen Immunglobulinen und ihre Verwendung bei der Herstellung humaner Antikörper siehe beispielsweise US-Patent Nr. 5,939,598, WO 96/33735, WO 96/34096, WO 98/24893 und WO 99/53049 (Abgenix Inc.), und US-Patent Nr. 5,545,806, Nr. 5,569,825, Nr. 5,625, 126, Nr. 5,633, 425, Nr. 5,661,016, Nr. 5,770,429, Nr. 5,814,318, Nr. 5,877,397 und WO 99/45962 (Genpharm Inc.); siehe ebenfalls MacQuitty, J.J. und Kay, R.M. (1992) *Science* 257:1188; Taylor, L.D. et al. (1992) *Nucleic Acids Res.* 20:6287-6295; Lonberg, N. et al. (1994) *Nature* 368:856-859; Lonberg, N. und Huszar, D. (1995) *Int.*

Rev. Immunol. 13:65-93; Harding, F.A. und Lonberg, N. (1995) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 764:536-546; Fishwild, D. M. *et al.* (1996) *Nature Biotechnology* 14:845-851; Mendez, M. J. *et al.* (1997) *Nature Genetics* 15:146-156; Green, L.L. und Jakobovits, A. (1998) *J. Exp. Med.* 188:483-495; Green, L.L. (1999) *J. Immunol. Methods* 231:11-23; Yang, X.D. *et al.* (1999) *J. Leukoc. Biol.* 66:401-410; Gallo, M.L. *et al.* (2000) *Eur. J. Immunol.* 30:534-540.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform kann das Tier, das mit erfindungsgemäßigem AGER-RME oder AGER-CDP oder einem Derivat/Äquivalent davon immunisiert wird, eine Maus mit schwerer kombinierter Immundefizienz (SCID) sein, die mit humanen peripheren mononukleären Blutzellen oder lymphoiden Zellen oder Vorläufern davon rekonstituiert wurde. Solche Mäuse, die als chimäre hu-PBMC-SCID-Mäuse bezeichnet werden, produzieren nachgewiesenermaßen humane Immunglobulinantworten nach einem antigenen Stimulus. Zur weiteren Beschreibung dieser Mäuse und ihrer Verwendung für die Erzeugung von Antikörpern siehe beispielsweise Leader, K.A. *et al.* (1992) *Immunology* 76:229-234; Bombil, F. *et al.* (1996) *Immunobiol.* 195:360-375; Murphy, W.J. *et al.* (1996) *Semin. Immunol.* 8:233-241; Herz, U. *et al.* (1997) *Int. Arch. Allergy Immunol.* 113:150-152; Albert, S.E. *et al.* (1997) *J. Immunol.* 159:1393-1403; Nguyen, H. *et al.* (1997) *Microbiol. Immunol.* 41:901-907; Arai, K. *et al.* (1998) *J. Immunol. Methods* 217:79-85; Yoshinari, K. und Arai, K. (1998) *Hybridoma* 17:41-45; Hutchins, W.A. *et al.* (1999) *Hybridoma* 18:121-129; Murphy, W.J. *et al.* (1999) *Clin. Immunol.* 90:22-27; Smithson, S.L. *et al.* (1999) *Mol. Immunol.* 36:113-124; Chamat, S. *et al.* (1999) *J. Infect. Diseases* 180:268-277; und Heard, C. *et al.* (1999) *Molec. Med.* 5:35-45.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform ist das Tier, das mit erfindungsgemäßigem AGER-RME oder AGER-CDP oder einem Derivat/Äquivalent davon immunisiert wird, eine Maus, die mit einer letalen Ganzkörperbestrahlung behandelt, anschließend mit Knochenmarkszellen aus Mäusen mit schwerer kombinierter Immundefizienz (SCID) gegen Strahlung geschützt, und anschließend mit funktionalen humanen Lymphozyten transplantiert worden ist. Dieser als das Trimera-System bezeichnete Chimärentyp wird verwendet, um humane monoklonale Antikörper herzustellen, indem man die Mäuse mit dem interessierenden Antigen immunisiert und anschließend monoklonale Antikörper unter Verwendung von standardisierter Hybridomtechnologie herstellt. Zur weiteren Beschreibung dieser Mäuse und ihrer Verwendung für die Erzeugung von Antikörpern siehe beispielsweise Eren, R. *et al.* (1998) *Immunology* 93:154-161; Reisner, Y und Dagan, S. (1998) *Trends Biotechnol.* 16:242-246; Ilan, E. *et al.* (1999) *Hepatology* 29:553-562; und Bocher, W.O. *et al.* (1999) *Immunology* 96:634-641.

In-vitro-Ansätze:

- Alternativ zur Herstellung erfindungsgemäßer Antikörper durch Immunisierung und Selektion können erfindungsgemäße Antikörper identifiziert und isoliert werden, indem man rekombinante kombinatorische Immunglobulin-Bank mit einem erfindungsgemäßen AGER-RME oder AGER-CDP oder Derivat/Äquivalent davon screenen, um so Mitglieder der Immunglobulin-Bank, die spezifisch an das AGER-RME oder AGER-CDP oder Derivat/Äquivalent davon binden, zu isolieren. Kits zur Erzeugung und zum Screenen von Display-Banken sind kommerziell erhältlich (z.B. das Recombinant Phage Antibody System von Pharmacia, Katalog-Nr. 27-9400-01; und der SurfZAP® Phage Display Kit von Stratagene, Katalog-Nr. 240612). In vielen Ausführungsformen ist die Display-Bank eine scFv-Bank oder eine Fab-Bank. Die Phagendisplay-Technik zum Screenen rekombinanter Antikörperbanken ist hinlänglich beschrieben worden. Beispiele für Verfahren und Verbindungen, die bei der Erzeugung und dem Screenen von Antikörper-Display-Banken besonders vorteilhaft verwendet werden können, sind beispielsweise in McCafferty *et al.* WO 92/01047, US-Patent Nr. 5,969,108 und EP 589 877 (beschreibt insbesondere den Display von scFv), Ladner *et al.* US-Patent Nr. 5,223,409, Nr. 5,403,484, Nr. 5,571,698, Nr. 5,837,500 und EP 436 597 (beschreibt beispielsweise die pIII-Fusion); Dower *et al.* WO 91/17271, US-Patent Nr. 5,427,908, US-Patent Nr. 5,580,717 und EP 527 839 (beschreibt insbesondere den Display von Fab); Winter *et al.* International Publication WO 92/20791 und EP 368,684 (beschreibt insbesondere die Klonierung von Sequenzen für variable Immunglobulin-Domänen); Griffiths *et al.* US-Patent Nr. 5,885,793 und EP 589 877 (beschreibt insbesondere die Isolierung von humanen Antikörpern gegen humane Antigene unter Verwendung rekombinanter Banken); Garrard *et al.* WO 92/09690 (beschreibt insbesondere Phagenexpressionstechniken); Knappik *et al.* WO 97/08320 (beschreibt die humane rekombinante Antikörperbank HuCal); Salfeld *et al.* WO 97/29131, (beschreibt die Herstellung eines rekombinanten humanen Antikörpers gegen ein humanes Antigen (humanen Tumor-Nekrose-Faktor alpha), sowie in-vitro-Affinitätsreifung des rekombinanten Antikörpers) und Salfeld *et al.* U.S. Provisional Application Nr. 60/126,603 und die hierauf basierenden Patentanmeldungen (beschreibt ebenfalls die Herstellung rekombinanter humaner Antikörper gegen humanes Antigen (humanes Interleukin-12), sowie die *in-vitro*-Affinitätsreifung des rekombinanten Antikörpers) zu finden.
- Weitere Beschreibungen von Screenings rekombinanter Antikörperbanken sind in wissenschaftlichen Publikationen zu finden, wie Fuchs *et al.* (1991) *Bio/Technology* 9:1370-1372; Hay *et al.* (1992) *Hum Antibod Hybridomas* 3:81-85; Huse *et al.* (1989) *Science* 246:1275-1281; Griffiths *et al.* (1993) *EMBO J* 12:725-734; Hawkins *et al.* (1992) *J Mol Biol* 226:889-896; Clarkson *et al.* (1991) *Nature* 352:624-628; Gram *et al.*

(1992) *PNAS* 89:3576-3580; Garrad *et al.* (1991) *Bio/Technology* 9:1373-1377; Hoogenboom *et al.* (1991) *Nuc Acid Res* 19:4133-4137; Barbas *et al.* (1991) *PNAS* 88:7978-7982; McCafferty *et al.* *Nature* (1990) 348:552-554; und Knappik *et al.* (2000) *J. Mol. Biol.* 296:57-86.

5

Alternativ zur Verwendung von Bakteriophagen-Display-Systemen können rekombinante Antikörper-Banken auf der Oberfläche von Hefezellen oder bakteriellen Zellen exprimiert werden. Verfahren zur Herstellung und zum Screenen von Banken, die auf der Oberfläche von Hefezellen exprimiert sind, sind in WO 99/36569
10 beschrieben. Verfahren zur Herstellung und zum Screenen von Banken, die auf der Oberfläche von bakteriellen Zellen exprimiert sind, sind in WO 98/49286 genauer beschrieben.

Sobald ein interessierender Antikörper aus einer kombinatorischen Bank identifiziert ist, werden die DNAs, welche die leichten und schweren Ketten des Antikörpers kodieren, mittels standardisierter molekularbiologischer Techniken isoliert, beispielsweise
15 mittels PCR-Amplifikation von DNA aus der Display-Packung (z.B. dem Phagen), die man während des Screenens der Bank isoliert hat. Nukleotidsequenzen von Genen für leichte und schwere Antikörperketten, mit denen PCR-Primer hergestellt werden können, sind dem Fachmann bekannt. Viele solcher Sequenzen sind beispielsweise in
20 Kabat, E.A., *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition*, U.S. Department of Health und Human Services, NIH Publication Nr. 91-3242 und der Datenbank für Sequenzen der Humankeimbahn VBASE beschrieben.

Ein erfindungsgemäßer Antikörper oder Antikörperteil kann hergestellt werden, indem
25 man die Gene für leichte und schwere Immunglobulinketten in einer Wirtszelle rekombinant exprimiert. Um einen Antikörper rekombinant zu exprimieren, wird eine Wirtszelle mit einem oder mehreren rekombinanten Expressionsvektoren, die DNA-Fragmente tragen, welche die leichten und schweren Immunglobulinketten des Antikörpers kodieren, transfiziert, so dass die leichten und schweren Ketten in der Wirtszelle exprimiert
30 und vorzugsweise in das Medium, in dem die Wirtszellen kultiviert werden, sekretiert werden. Aus diesem Medium können die Antikörper gewonnen werden. Man verwendet standardisierte rekombinante DNA-Methodik, um Gene für schwere und leichte Antikörperketten zu erhalten, diese Gene in rekombinante Expressionsvektoren einzusetzen und die Vektoren in Wirtszellen einzuführen. Eine derartige Methodik ist beispielsweise in Sambrook, Fritsch und Maniatis (Hrsg.), *Molecular Cloning; A Laboratory Manual, Second Edition*, Cold Spring Harbor, N.Y., (1989), Ausubel, F.M. *et al.* (Hrsg.) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates, (1989)
35 und im US-Patent Nr. 4,816,397 von Boss *et al.* beschrieben.

Sobald DNA-Fragmente, die VH- und VL-Segmente des interessierenden Antikörpers kodieren, erhalten werden, können diese DNA-Fragmente mit standardisierten rekombinanten DNA-Techniken weiter manipuliert werden, beispielsweise um die Gene für variable Regionen in Gene für Antikörperketten voller Länge, in Gene für Fab-Fragmente oder in ein scFv-Gen zu überführen. Bei diesen Manipulationen wird ein VL- oder VH-kodierendes DNA-Fragment operativ mit einem weiteren ein weiteres Protein, z.B. eine konstante Antikörperregion oder einen flexiblen Linker, kodierenden DNA-Fragment verknüpft. Der Begriff „operativ verknüpft“ soll hier meinen, dass die beiden DNA-Fragmente so miteinander verbunden sind, dass die von den beiden DNA-Fragmenten kodierten Aminosäuresequenzen im Leseraster (in-frame) bleiben.

Die isolierte, die VH-Region kodierende DNA kann in ein Gen für eine schwere Kette voller Länge überführt werden, indem man die VH-Region kodierende DNA mit einem weiteren, konstante Regionen der schweren Kette (CH1, CH2 und CH3) kodierenden DNA-Molekül operativ verknüpft. Die Sequenzen von Genen für konstante Regionen humaner schwerer Ketten sind hinlänglich bekannt (siehe z.B. Kabat, E.A., *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition*, U.S. Department of Health und Human Services, NIH Publication Nr. 91-3242), und DNA-Fragmente, die diese Regionen überspannen, können mittels standardisierter PCR-Amplifikation erhalten werden. Die konstante Region der schweren Kette kann eine konstante Region aus IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM or IgD sein, wobei eine konstante Region aus IgG1 oder IgG4 bevorzugt ist. Um ein Gen für ein Fab-Fragment der schweren Kette zu erhalten, kann die VH-kodierende DNA mit einem weiteren, lediglich die konstante Region CH1 der schweren Kette kodierenden DNA-Molekül operativ verknüpft werden.

Die isolierte, die VL-Region kodierende DNA kann in ein Gen für eine leichte Kette voller Länge (sowie ein Gen für eine Fab-leichte Kette) überführt werden, indem man die VL-kodierende DNA mit einem weiteren, die konstante Region CL der leichten Kette kodierenden DNA-Molekül operativ verknüpft. Die Sequenzen von Genen der konstanten Region humaner leichter Kette sind hinlänglich bekannt (siehe Kabat, E.A., *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition*, U.S. Department of Health und Human Services, NIH Publication Nr. 91-3242), und DNA-Fragmente, die diese Regionen überspannen, können mittels standardisierter PCR-Amplifikation erhalten werden. Die konstante Region der leichten Kette kann eine konstante kappa- oder lambda-Region sein, wobei eine konstante kappa-Region bevorzugt ist.

Um ein scFv-Gen zu erzeugen, können die VH- und VL-kodierenden DNA-Fragmente mit einem weiteren, einen flexiblen Linker, z.B. die Aminosäuresequenz (Gly₄-Ser)₃ kodierenden Fragment operativ verknüpft werden, so dass die VH- und VL-Sequenzen

als fortlaufendes einzelkettiges Protein exprimiert werden, wobei die VL- und VH-Regionen über den flexiblen Linker miteinander verbunden sind (siehe Bird *et al.* (1988) *Science* 242:423-426; Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883; McCafferty *et al.*, *Nature* (1990) 348:552-554).

5

VH- und VL-Einzeldomänen mit Spezifität für erfindungsgemäßes AGER-RME oder AGER-CDP oder ein Derivat/Äquivalent davon können mit den oben beschriebenen Verfahren aus Einzeldomänen-Banken isoliert werden. Zwei VH-Einzeldomänen-Ketten (mit oder ohne CH1) oder zwei VL-Ketten oder ein Paar aus einer VH- und einer VL-Kette mit der gewünschten Spezifität können verwendet werden, um erfindungsgemäße AGER-RMEs oder AGER-CDPs oder Derivate/Äquivalente davon zu binden.

10

Um die erfindungsgemäßen rekombinanten Antikörper oder Antikörperteile zu exprimieren, können die DNAs, welche die leichten und schweren Ketten von partieller oder voller Länge kodieren, in Expressionsvektoren inseriert werden, so dass die Gene mit transkriptionalen und translationalen Kontrollsequenzen operativ verknüpft sind. In diesem Zusammenhang soll der Begriff „operativ verknüpft“ meinen, dass ein Antikörpergen in einem Vektor so ligiert ist, dass transkriptionale und translationale Kontrollsequenzen innerhalb des Vektors ihre beabsichtigte Funktion zur Regulation der Transkription und Translation des Antikörpergens erfüllen.

15

20

Der Expressionsvektor und die Expressionskontrollsequenzen werden so gewählt, dass sie mit der zur Expression verwendeten Wirtszelle kompatibel sind. Das Gen für die leichte Antikörperkette und das Gen für die schwere Antikörperkette können in getrennte Vektoren inseriert werden, oder beide Gene werden in denselben Expressionsvektor inseriert, was der Regelfall ist. Die Antikörpergene werden in den Expressionsvektor mittels standardisierter Verfahren inseriert (z.B. Ligation komplementärer Restriktionsschnittstellen am Antikörpergenfragment und Vektor, oder Ligation stumpfer Enden, falls keine Restriktionsschnittstellen vorhanden sind). Vor der Insertion der Sequenzen für die leichte und schwere Kette kann der Expressionsvektor bereits Sequenzen für konstante Antikörperregionen tragen. Beispielsweise ist es ein Ansatz, die VH- und VL-Sequenzen in Antikörpergene voller Länge zu überführen, indem man sie in Expressionsvektoren inseriert, die bereits die konstanten Regionen für schwere bzw. leichte Kette kodieren, so dass das VH-Segment mit dem oder den CH-Segment(en) innerhalb des Vektors operativ verknüpft ist, und auch das VL-Segment mit dem CL-Segment innerhalb des Vektors operativ verknüpft ist. Zusätzlich oder alternativ kann der rekombinante Expressionsvektor ein Signalpeptid kodieren, welches die Sekretion der Antikörperkette aus der Wirtszelle erleichtert. Das Gen für die Antikörperkette kann in den Vektor kloniert werden, so dass das Signalpeptid in Leseraster

25

30

35

mit dem N-Terminus des Gens für die Antikörperkette verknüpft ist. Das Signalpeptid kann ein Immunglobulin-Signalpeptid oder ein heterologes Signalpeptid sein (d.h. ein Signalpeptid aus einem Nicht-Immunglobulin-Protein). Zusätzlich zu den Genen für die Antikörperkette können die erfindungsgemäßen Expressionsvektoren regulatorische Sequenzen aufweisen, welche die Expression der Gene für die Antikörperkette in einer Wirtszelle kontrollieren. Der Begriff „regulatorische Sequenz“ soll Promotoren, Enhancer und weitere Expressionskontrollelemente (z.B. Polyadenylierungssignale) einschließen, welche die Transkription oder Translation der Gene für die Antikörperkette kontrollieren. Solche regulatorischen Sequenzen sind beispielsweise in Goeddel;
5 *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA (1990) beschrieben. Dem Fachmann ist bekannt, dass das Design des Expressionsvektors, wozu die Selektion regulatorischer Sequenzen gehört, von Faktoren abhängen kann, wie der Wahl der zu transformierenden Wirtszelle, der gewünschten Expressionsstärke des Proteins, etc. Zu bevorzugten regulatorischen Sequenzen für
10 eine Expression in Säugerwirtszellen gehören virale Elemente, die zu einer starken Proteinexpression in Säugerzellen führen, wie Promotoren und/oder Enhancer, die vom Cytomegalovirus (CMV) (wie der CMV-Promoter/Enhancer), Simian-Virus 40 (SV40) (wie der SV40-Promoter/Enhancer), Adenovirus (z.B. der Späte Adenovirus-Hauptpromotor (AdMLP für Adenovirus Major Late Promoter) und Polyoma abstammen. Zur weiteren Beschreibung viraler regulatorischer Elemente und Sequenzen da-
15 von, siehe z.B. US-Patent Nr. 5,168,062 von Stinski, US-Patent Nr. 4,510,245 von Bell *et al.* und US-Patent Nr. 4,968,615 von Schaffner *et al.*

Zusätzlich zu den Genen für die Antikörperkette und die regulatorischen Sequenzen
25 können die erfindungsgemäßen rekombinanten Expressionsvektoren zusätzliche Sequenzen aufweisen, wie Sequenzen, welche die Replikation des Vektors in Wirtszellen regulieren (z.B. Replikationsstartpunkte) und selektierbare Markergene. Die selektierbaren Markergene erleichtern die Selektion von Wirtszellen, in die der Vektor eingeführt wurde (siehe z.B. US-Patents Nr. 4,399,216, 4,634,665 und 5,179,017, alle von
30 Axel *et al.*). Zum Beispiel ist es üblich, dass das selektierbare Markergen eine Wirtszelle, in die der Vektor eingesetzt wurde, gegen Wirkstoffe wie G418, Hygromycin oder Methotrexat resistent macht. Zu bevorzugten selektierbaren Markergenen gehören das Gen für die Dihydrofolatreduktase (DHFR) (zur Verwendung in dhfr-Wirtszellen mit Methotrexat-Selektion/Amplifikation) und das neo-Gen (zur G418-Selektion).

35 Für die Expression der leichten und schweren Ketten wird der oder werden die schwere und leichte Ketten kodierende(n) Expressionsvektor(en) mittels standardisierter Techniken in eine Wirtszelle transfiziert. Die verschiedenen Formen des Begriffs „Transfektion“ sollen eine Vielzahl von Techniken erfassen, die gewöhnlicherweise zur

Einführung exogener DNA in eine prokaryotische oder eukaryotische Wirtszelle verwendet werden, z.B. Elektroporation, Calcium-Phosphat-Fällung, DEAE-Dextran-Transfektion und ähnliches. Wenngleich es theoretisch möglich ist, die erfindungsgemäßen Antikörper entweder in prokaryotischen oder eukaryotischen Wirtszellen zu exprimieren, ist die Expression der Antikörper in eukaryotischen Zellen und insbesondere in Säugerwirtszellen bevorzugt, da die Wahrscheinlichkeit, dass ein korrekt gefalteter und immunologisch aktiver Antikörper zusammengesetzt und sekretiert wird, in solchen eukaryotischen Zellen und insbesondere Säugerzellen höher ist als in prokaryotischen Zellen. Über die prokaryotische Expression von Antikörpergenen ist berichtet worden, dass sie für die Produktion großer Ausbeuten aktiven Antikörpers ineffektiv sei (Boss, M.A. und Wood, C. R. (1985) *Immunology Today* 6:12-13).

Zu Säugerwirtszellen, die für die Expression erfindungsgemäßer rekombinanter Antikörper bevorzugt sind, gehören CHO-Zellen (einschließlich dhfr-CHO-Zellen, die in Urlaub und Chasin, (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-4220 beschrieben sind und mit einem DHFR-selektierbaren Marker verwendet werden, wie z.B. in R.J. Kaufman und P.A. Sharp (1982) *Mol. Biol.* 159:601-621 beschrieben ist), NS0-Myelomzellen, COS-Zellen und SP2-Zellen. Werden rekombinante Expressionsvektoren, welche die Antikörpergene kodieren, in Säugerwirtszellen eingeführt, so werden die Antikörper hergestellt, indem man die Wirtszellen so lange kultiviert, bis der Antikörper in den Wirtszellen exprimiert oder vorzugsweise der Antikörper in das Kulturmedium, in dem die Wirtszellen wachsen, sekretiert wird. Die Antikörper können aus dem Kulturmedium gewonnen werden, indem man standardisierte Verfahren zur Aufreinigung von Proteinen verwendet.

Es können ebenfalls Wirtszellen verwendet werden, um Teile intakter Antikörper, wie Fab-Fragmente oder scFv-Moleküle, herzustellen. Variationen der zuvor beschriebenen Vorgehensweise gehören selbstverständlich zur Erfindung. Beispielsweise kann es wünschenswert sein, eine Wirtszelle mit DNA zu transfizieren, die entweder die leichte Kette oder die schwere Kette (aber nicht beide) eines erfindungsgemäßen Antikörpers kodiert. Sind leichte oder schwere Ketten vorhanden, die für die Bindung des interessierenden Antigens nicht erforderlich sind, so kann die DNA, die entweder eine solche leichte oder eine solche schwere Kette oder beide kodiert, mittels rekombinanter DNA-Technologie zum Teil oder vollständig entfernt werden. Moleküle, die von solchen verkürzten DNA-Molekülen exprimiert werden, gehören ebenfalls zu den erfindungsgemäßen Antikörpern. Darüber hinaus können bifunktionale Antikörper hergestellt werden, in denen eine schwere und eine leichte Kette ein erfindungsgemäßer Antikörper sind und die andere schwere und leichte Kette Spezifität für ein anderes als das interessierende

Antigen besitzen, indem man einen erfindungsgemäßen Antikörper mit einem zweiten Antikörper mittels standardisierter chemischer Verfahren quervernetzt.

In einem bevorzugten System zur rekombinanten Expression eines erfindungsgemäßen Antikörpers oder Antigen-bindenden Teils davon wird ein rekombinanter Expressionsvektor, der sowohl die schwere Antikörperkette als auch die leichte Antikörperkette kodiert, mittels Calcium-Phosphat-vermittelter Transfektion in dhfr-CHO-Zellen eingeführt. Innerhalb des rekombinanten Expressionsvektors sind die Gene für die schwere und leichte Antikörperkette jeweils mit regulatorischen CMV-Enhancer/AdMLP-Promotor-Elementen operativ verknüpft, um eine starke Transkription der Gene zu bewirken. Der rekombinante Expressionsvektor trägt auch ein DHFR-Gen, mit dem sich CHO-Zellen, die mit dem Vektor transfiziert sind, selektieren lassen, indem man die Methotrexat-Selektion/Amplifikation verwendet. Die selektierten transformierten Wirtszellen werden kultiviert, so dass die schweren und leichten Antikörperketten exprimiert werden, und intakter Antikörper wird aus dem Kulturmedium gewonnen. Man verwendet standardisierte molekularbiologische Techniken, um den rekombinanten Expressionsvektor herzustellen, die Wirtszellen zu transfizieren, die Transformanten zu selektieren, die Wirtszellen zu kultivieren und den Antikörper aus dem Kulturmedium zu gewinnen. So betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Synthese eines erfindungsgemäßen rekombinanten Antikörpers, indem man eine erfindungsgemäße Wirtszelle in einem geeigneten Kulturmedium kultiviert, bis ein erfindungsgemäßer rekombinanter Antikörper synthetisiert ist. Das Verfahren kann des weiteren beinhalten, dass man den rekombinanten Antikörper aus dem Kulturmedium isoliert.

Alternativ zum Screenen rekombinanter Antikörperbanken durch Phage-Display können weitere, dem Fachmann bekannte Methoden zum Screenen großer kombinatorischer Banken eingesetzt werden, um die erfindungsgemäßen Antikörper zu identifizieren. Bei einer Art eines alternativen Expressionssystems ist die rekombinante Antikörperbank in Form von RNA-Protein-Fusionen exprimiert, wie in WO 98/31700 von Szostak und Roberts, und in Roberts, R.W. und Szostak, J.W. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:12297-12302 beschrieben. In diesem System erzeugt man durch in-vitro-Translation synthetischer mRNAs, die an ihrem 3'-Ende Puromycin, ein Peptidylakzeptor-Antibiotikum, tragen, zwischen einer mRNA und dem Peptid oder Protein, das sie kodiert, eine kovalente Fusion. So kann eine spezifische mRNA aus einem komplexen Gemisch von mRNAs (z.B. einer kombinatorischen Bank) anhand der Eigenschaften des kodierten Peptids oder Proteins (z.B. des Antikörpers oder eines Teils davon) wie dem Binden des Antikörpers oder Teils davon an erfindungsgemäßes AGER-RME oder AGER-CDP oder ein Derivat/Äquivalent davon angereichert werden. Antikörper oder Teile davon kodierende Nukleinsäuresequenzen, die aus dem Screenen solcher

Bänke gewonnen werden, können mit rekombinanten Mitteln in der oben beschriebenen Weise exprimiert werden (z.B. in Säugerwirtszellen) und darüber hinaus einer weiteren Affinitätsreifung unterzogen werden, indem man entweder in weiteren Durchgängen mRNA-Peptid-Fusionen screent, wobei man in die ursprünglich selektierte(n) Sequenz(en) Mutationen einführt, oder indem man andere Verfahren zur in-vitro-Affinitätsreifung rekombinanter Antikörper in der oben beschriebenen Weise verwendet.

Kombinationen aus in vivo- und in vitro-Ansätzen:

10

Die erfindungsgemäßen Antikörper können ebenfalls hergestellt werden, indem man eine Kombination aus in-vivo- und in-vitro-Ansätzen anwendet, wie Verfahren, in denen man zunächst erfindungsgemäßes AGER-RME oder AGER-CDP oder ein Derivat/Äquivalent davon auf ein Antikörper-Repertoire in vivo in einem Wirtstier einwirken lässt, um die Produktion von AGER-RME- oder AGER-CDP- oder Derivat/Äquivalentbindenden Antikörpern zu stimulieren, und anschließend die weitere Antikörperselektion und/oder Antikörperreifung (d.h. Optimierung) mit Hilfe einer oder mehrerer in-vitro-Techniken bewerkstelligt wird. Einer Ausführungsform zufolge kann ein solches kombiniertes Verfahren beinhalten, dass man zunächst ein nicht-humanes Tier (z.B. eine Maus, Ratte, Kaninchen, Huhn, Kamelide, Ziege oder eine transgene Version davon oder eine chimäre Maus) mit dem erfindungsgemäßen AGER-RME oder AGER-CDP oder Derivat/Äquivalent davon immunisiert, um eine Antikörper-Antwort gegen das Antigen zu stimulieren, und anschließend unter Verwendung von Immunglobulinsequenzen aus Lymphozyten, die durch die Einwirkung des AGER-RMEs oder AGER-CDPs oder Derivats/Äquivalents in vivo stimuliert worden sind, eine Phage-Display-Antikörperbank herstellt und screent. Der erste Schritt dieser kombinierten Vorgehensweise kann in der oben im Zusammenhang mit den in-vivo-Ansätzen beschriebenen Weise durchgeführt werden, während der zweite Schritt dieser Vorgehensweise in der oben in Zusammenhang mit den in-Vitro-Ansätzen beschriebenen Weise durchgeführt werden kann. Zu bevorzugten Methoden für die Hyperimmunisierung von nicht-humanen Tieren mit anschließendem in-vitro-Screening von Phage-Display-Bänken, die aus den stimulierten Lymphozyten hergestellt wurden, gehören diejenigen, die von BioSite Inc., siehe z.B. WO 98/47343, WO 91/17271, US-Patent Nr. 5,427,908 und US-Patent Nr. 5,580,717 beschrieben sind.

35

Einer weiteren Ausführungsform zufolge beinhaltet ein kombiniertes Verfahren, dass man zunächst ein nicht-humanes Tier (z.B. eine Maus, Ratte, Kaninchen, Huhn, Kamelide, Ziege oder eine Knockout- und/oder transgene Version davon, oder eine chimäre Maus) mit einem erfindungsgemäßen AGER-RME oder AGER-CDP oder Deri-

vat/Äquivalent davon immunisiert, um eine Antikörperantwort gegen das AGER-RME oder AGER-CDP oder Derivat/Äquivalent davon zu stimulieren, und die Lymphozyten, welche die Antikörper mit der gewünschten Spezifität produzieren, selektiert, indem man (z.B. aus den immunisierten Tieren hergestellte) Hybridome screent. Die Gene für
5 die Antikörper oder Einzeldomän-Antikörper werden aus den selektierten Klonen isoliert (mittels standardisierter Klonierungsverfahren, wie der Reversen Transkriptase-Polymerasekettenreaktion) und einer in-vitro-Affinitätsreifung unterzogen, um dadurch die Bindungseigenschaften des selektierten Antikörpers oder der selektierten Antikörper zu verbessern. Der erste Schritt dieser Vorgehensweise kann in der oben in Zu-
10 sammenhang mit den in-vivo-Ansätzen beschriebenen Weise vollzogen werden, während der zweite Schritt dieser Vorgehensweise in der oben in Zusammenhang mit den in-vitro-Ansätzen beschriebenen Weise vollzogen werden kann, insbesondere indem man Verfahren zur in-vitro-Affinitätsreifung verwendet, wie diejenigen, die in WO 97/29131 und WO 00/56772 beschrieben sind.

15 In einem weiteren kombinierten Verfahren werden die rekombinanten Antikörper aus einzelnen isolierten Lymphozyten erzeugt, indem man eine Vorgehensweise verwendet, die dem Fachmann als Lymphozyten-Antikörper-Selektionsverfahren (SLAM) bekannt und in US-Patent Nr. 5,627,052, WO 92/02551 und Babcock, J.S. *et al.* (1996)
20 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:7843-7848 beschrieben ist. In diesem Verfahren wird ein nicht-humanes Tier (z.B. eine Maus, Ratte, Kaninchen, Huhn, Kamelide, Ziege, oder eine transgene Version davon, oder eine chimäre Maus) zunächst in vivo mit erfindungsgemäßem AGER-RME oder AGER-CDP oder einem Derivat/Äquivalent davon immunisiert, um eine Immunantwort gegen das AGER-RME oder AGER-CDP oder
25 Derivat/Äquivalent zu stimulieren, und dann werden einzelne, interessierende Antikörper sekretierende Zellen selektiert, indem man einen antigenspezifischen hämolytischen Plaque-Assay verwendet. Hierzu können das AGER-RME oder AGER-CDP oder Derivat/Äquivalent davon, oder interessierende strukturell verwandte Moleküle an Schaf-Erythrozyten gekoppelt werden, wobei man einen Linker wie Biotin verwendet,
30 wodurch sich einzelne Zellen, die Antikörper mit geeigneter Spezifität sekretieren, unter Verwendung des hämolytischen Plaque-Assays identifizieren lassen. In Anschluss an die Identifizierung von Zellen, die interessierende Antikörper sekretieren, werden cDNAs für die variablen Regionen der leichten und schweren Ketten aus den Zellen durch Reverse Transkriptase-PCR gewonnen und diese variablen Regionen können
35 dann in Zusammenhang mit geeigneten konstanten Immunglobulinregionen (z.B. humanen konstanten Regionen) in Säugerwirtszellen wie COS- oder CHO-Zellen exprimiert werden. Die mit den aus in vivo selektierten Lymphozyten abstammenden, amplifizierten Immunglobulinsequenzen transfizierten Wirtszellen können dann einer weiteren in-vitro-Analyse und -Selektion unterzogen werden, indem man beispielsweise die

transfizierten Zellen ausbreitet, um Zellen zu isolieren, die Antikörper mit der gewünschten Spezifität exprimieren. Die amplifizierten Immunglobulinsequenzen können des weiteren in vitro manipuliert werden.

5 6. Pharmazeutische Mittel

6.1 Allgemein

10 Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind auch pharmazeutische Mittel (Zusammensetzungen), die als Wirkstoff ein erfindungsgemäßes Protein (AGER-RME oder AGER-CDP; AGER-RME- oder AGER-CDP-bindende Liganden, wie anti-AGER-RME oder anti-AGER-CDP-Antikörper, bispezifische Antikörper, Hybridproteine gemäß obiger Definition; AGER-Ektodomäne und N-terminale Subfragmente) oder eine kodierende AGER-RME-Nukleinsäuresequenz und gegebenenfalls einen pharmazeutisch ver-
15 träglichen Träger beinhalten. Erfindungsgemäße pharmazeutische Zusammensetzungen können des weiteren wenigstens ein zusätzliches therapeutisches Agens, z. B. ein oder mehrere zusätzliche therapeutische Agenzien zur Behandlung einer der hierin beschriebenen Erkrankungen beinhalten.

20 Zu pharmazeutisch verträglichen Trägern gehören sämtliche Lösungsmittel, Dispersionsmedien, Überzüge, antimikrobielle Agenzien, isotonisierende und die Absorption verzögernde Agenzien, und dergleichen, sofern sie physiologisch kompatibel sind.

Zu pharmazeutisch akzeptablen Trägern gehören beispielsweise Wasser, Kochsalzlösung, Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung, Lactose, Dextrose, Succrose, Sorbitol, 25 Manitol, Stärken, Akaziengummi, Calciumphosphat, Alginate, Traganth, Gelantine, Calciumsilikat, mikrokristalline Cellulose, Polyvinylpyrrolidon, Cellulose, Wasser, Sirup und Methylcellulose. Ferner können die Formulierungen pharmazeutisch akzeptable Träger oder übliche Hilfsstoffe, wie Gleitmittel, beispielsweise Talg, Magnesiumstearat und Mineralöl; Netzmittel; emulgierende und suspendierende Mittel; konservierende Mittel, wie Methyl- und Propylhydroxybenzoate; Antioxidantien; Antireizstoffe; Chelatbildner; Dragierhilfsmittel; Emulsionsstabilisatoren Filmbildner; Gelbildner; Geruchsmaskierungsmittel; Geschmackskorrigentien; Harze; Hydrokolloide; Lösemittel; Lösungsvermittler; Neutralisierungsmittel; Permeationsbeschleuniger; Pigmente; quaternäre Ammoniumverbindungen; Rückfettungs- und Überfettungsmittel; Salben-, Creme- oder Öl-Grundstoffe; Silikon-Derivate; Spreithilfsmittel; Stabilisatoren; Sterilanzien; 35 Suppositoriengrundlagen; Tabletten-Hilfsstoffe, wie Bindemittel, Füllstoffe, Gleitmittel, Sprengmittel oder Überzüge; Treibmittel; Trocknungsmittel; Trübungsmittel; Verdickungsmittel; Wachse; Weichmacher; Weißöle umfassen. Eine diesbezügliche Ausges-

taltung beruht auf fachmännischem Wissen, wie beispielsweise in Fiedler, H.P., Lexikon der Hilfsstoffe für Pharmazie, Kosmetik und angrenzende Gebiete, 4. Auflage, Aulendorf: ECV-Editio-Kantor-Verlag, 1996, dargestellt ist. Vgl. auch Hager's Handbuch der Pharmazeutischen Praxis, Springer Verlag, Heidelberg.

5

Die pharmazeutischen Zusammensetzungen können beispielsweise zur parenteralen Verabreichung geeignet sein. Hierzu wird der Wirkstoff, wie z.B. der Antikörper, vorzugsweise als injizierbare Lösungen mit einem Wirkstoffgehalt von 0,1 – 250 mg/ml zubereitet. Die injizierbaren Lösungen können in flüssiger oder lyophilisierter Form in einem Flintglas oder Vial, einer Ampulle oder einer gefüllten Spritze als Dosierungsform zubereitet sein.

Der Puffer kann L-Histidin (1 – 50 mM, vorzugsweise 5 – 10 mM) enthalten und einen pH-Wert von 5,0 – 7,0, vorzugsweise von 6,0, aufweisen. Zu weiteren geeigneten Puffern gehören, ohne darauf beschränkt zu sein, Natriumsuccinat-, Natriumcitrat-, Natriumphosphat- oder Kaliumphosphat-Puffer.

Man kann Natriumchlorid verwenden, um die Tonizität der Lösung auf eine Konzentration von 0 – 300 mM (vorzugsweise 150 mM für eine flüssige Dosierungsform) einzustellen. Cryoschutzmittel können für eine lyophilisierte Dosierungsform mit einbezogen werden, wie z.B. Sucrose (z.B. 0 – 10 %, vorzugsweise 0,5 – 1,0 % (w/w)). Zu weiteren geeigneten Cryoschutzmitteln gehören Trehalose und Laktose. Füllstoffe können für eine lyophilisierte Dosierungsform mit einbezogen werden, z.B. Mannitol (z.B. 1 – 10 %, vorzugsweise 2 – 4 % (w/w)). Stabilisatoren können sowohl in flüssigen als auch lyophilisierten Dosierungsformen verwendet werden, z.B. L-Methionin (z.B. 51 – 50 mM, vorzugsweise 5 – 10 mM). Zu weiteren geeigneten Füllstoffen gehören Glycin und Arginin. Ebenso können Tenside verwendet werden, beispielsweise Polysorbat-80 (z.B. 0 – 0,05 %, vorzugsweise 0,005 – 0,01 % (w/w)). Zu weiteren Tensiden gehören Polysorbat-20 und BRIJ-Tenside.

30

Die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen können eine Vielzahl von Formen annehmen. Zu diesen gehören flüssige, halbfeste und feste Dosierungsformen, wie flüssige Lösungen (z. B. injizierbare und infundierbare Lösungen, Lotionen, Augen- und Ohrentropfen), Liposome, Dispersionen oder Suspensionen und feste Formen, wie Pulver, Puder, Granulate, Tabletten, Pastillen, Sachets, Cachets, Dragees, Kapseln wie Hart- und Weichgelatine kapseln, Suppositorien oder vaginale Arzneiformen, halbfeste Arzneiformen, wie Salben, Cremes, Hydrogele, Pasten oder Pflaster. Auch implantierte Abgabevorrichtungen können zur Verabreichung erfindungsgemäßer Wirkstoffe verwendet werden. Die bevorzugte Form hängt von der beabsichtigten Verabrei-

35

5 chungsart und der therapeutischen Anwendung ab. Typischerweise werden Zusammensetzungen in Form von injizierbaren oder infundierbaren Lösungen bevorzugt. Ein geeigneter Verabreichungsweg ist z.B. parenteral (z. B. intravenös, subkutan, intraperitoneal, intramuskulär). Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform wird der Wirkstoff durch intravenöse Infusion oder Injektion verabreicht. Einer weiteren bevorzugten Ausführungsform zufolge wird der Wirkstoff durch intramuskuläre oder subkutane Injektion verabreicht.

10 Therapeutische Zusammensetzungen müssen typischerweise steril und unter den Herstellungs- und Lagerungsbedingungen stabil sein. Die Zusammensetzungen können als Lösung, Mikroemulsion, Dispersion, liposomal oder einer weiteren für hohe Wirkstoffkonzentrationen geeigneten, geordneten Struktur formuliert werden. Sterile injizierbare Lösungen können hergestellt werden, indem man die aktive Verbindung (wie z.B. den Antikörper) in der benötigten Menge in ein geeignetes Lösungsmittel gegebenfalls mit einem oder einer Kombination der vorstehend genannten Inhaltsstoffe, je nach Bedarf, einbringt und anschließend steril filtriert. Dispersionen werden in der Regel zubereitet, indem man die aktive Verbindung in ein steriles Vehikel einbringt, welches ein Grunddispersionsmedium und gegebenenfalls weitere benötigte Inhaltsstoffe enthält. Im Falle eines sterilen lyophilisierten Pulvers zur Herstellung steriler injizierbarer Lösungen stellen die Vakuumtrocknung und Sprühtrocknung bevorzugte Herstellungsverfahren dar, mit denen ein Pulver des aktiven Inhaltsstoffes und gegebenenfalls weiterer erwünschter Inhaltsstoffe aus einer zuvor steril filtrierten Lösung erhalten wird. Die richtige Fließfähigkeit einer Lösung kann beibehalten werden, indem man beispielsweise einen Überzug wie Lecithin verwendet, im Fall von Dispersionen die benötigte Partikelgröße beibehält oder Tenside verwendet. Eine verlängerte Absorption injizierbarer Zusammensetzungen kann erreicht werden, indem man ein Agens, das die Absorption verzögert, beispielsweise Monostearatsalze und Gelatine, in die Zusammensetzung mit einbringt.

30 Die erfindungsgemäßen Wirkstoffe können mit einer Vielzahl von Verfahren, die dem Fachmann bekannt sind, verabreicht werden, wenngleich für viele therapeutische Anwendungen die subkutane Injektion, intravenöse Injektion oder Infusion die bevorzugte Verabreichungsart darstellt. Der Fachmann weiß, dass Weg und/oder Art der Verabreichung vom gewünschten Resultat abhängen. Bestimmten Ausführungsformen zufolge kann die aktive Verbindung mit einem Träger zubereitet werden, der die Verbindung gegen rasche Freisetzung schützt, so zum Beispiel eine Formulierung mit kontrollierter Freisetzung, wozu Implantate, transdermale Pflaster und mikroverkapselte Abgabesysteme gehören. Es können biologisch abbaubare biokompatible Polymere verwendet werden, wie Ethylenvinylacetat, Polyanhydride, Polyglykolsäure, Collagen, Polyor-

thoester und Polymilchsäure. Die Verfahren zur Zubereitung solcher Formulierungen sind dem Fachmann allgemein bekannt, siehe zum Beispiel *Sustained und Controlled Release Drug Delivery Systems*, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

5

Bestimmten Ausführungsformen zufolge kann ein erfindungsgemäßer Wirkstoff oral verabreicht werden, beispielsweise in einem inerten Verdünnungsmittel oder einem assimilierbaren essbaren Träger. Der Wirkstoff (und gewünschtenfalls weitere Inhaltsstoffe) können auch in einer Hart- oder Weichgelatine kapsel eingeschlossen, zu Tabletten verpresst oder direkt der Nahrung zugesetzt werden. Für die orale therapeutische Verabreichung können die Wirkstoffe mit Exzipienten vermischt und in Form von schluckbaren Tabletten, Buccaltabletten, Kapseln, Elixieren, Suspensionen, Sirups und dergleichen verwendet werden. Soll ein erfindungsgemäßer Wirkstoffe über einen anderen als den parenteralen Weg verabreicht werden, kann es erforderlich sein, eine Beschichtung aus einem Material zu wählen, das seine Inaktivierung verhindert.

Die erfindungsgemäßen Wirkstoffe können zusammen mit einem oder mehreren zusätzlichen therapeutischen Agenzien verabreicht werden, die bei der Behandlung der zuvor beschriebenen Erkrankungen brauchbar sind.

20

Die pharmazeutischen Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung enthalten in der Regel eine therapeutisch wirksame Menge oder eine prophylaktisch wirksame Menge wenigstens eines erfindungsgemäßen Wirkstoffs. In Abhängigkeit von der gewünschten Behandlung, ob beispielsweise eine therapeutische oder prophylaktische Behandlung gewünscht ist, können Dosierungspläne gewählt und angepasst werden. Beispielsweise kann man eine Einzeldosis, mehrere getrennte Dosen über die Zeit verteilt oder eine ansteigende bzw. sinkende Dosierung je nach den Anforderungen der therapeutischen Situation verabreichen. Es ist insbesondere von Vorteil, parentale Zusammensetzungen in Einheitsdosierungsform zu formulieren, um die Verabreichung zu erleichtern und eine Gleichförmigkeit der Dosierung zu gewährleisten.

30

Der behandelnde Arzt kann die für die jeweilige Therapie und den jeweiligen Wirkstoff am meisten geeignete Darreichungsform, Art der Verabreichung und Dosierung ohne weiteres bestimmen.

35

Eine therapeutisch oder prophylaktisch wirksame Menge eines erfindungsgemäßen Wirkstoffs kann beispielsweise im Bereich von 0,1 – 20 mg/kg und vorzugsweise 1 – 10 mg/kg liegen, ohne darauf beschränkt zu sein. Natürlich können diese Mengen je nach Art und Schwere des zu lindernden Zustandes variieren.

6.2 Vakzine

Die erfindungsgemäßen AGER-RME oder AGER-CDP und Derivate/Äquivalente davon
5 sind als Immunogen zur Vakzinierung eines zu behandelnden Patienten brauchbar.

Zu diesem Zweck brauchbare Vakzine stellen in der Regel eine pharmazeutische Zusammensetzung dar, die wenigstens ein erfindungsgemäßes AGER-RME und/oder AGER-CDP und/oder wenigstens ein erfindungsgemäßes Derivat/Äquivalent davon
10 enthält. Ferner kann die Zusammensetzung einen physiologisch verträglichen Träger und gegebenenfalls weitere Hilfsstoffe, beispielsweise Immunstimulantien, enthalten.

Während geeignete Träger im Prinzip beliebig gewählt werden können, richtet sich die Art des Trägers in der Regel nach dem Verabreichungsweg. So können die erfindungsgemäßen Vakzine insbesondere in einer zur parenteralen, beispielsweise intra-
15 venösen, intramuskulären und subkutanen Verabreichung geeigneten Form formuliert werden. In diesen Fällen beinhaltet der Träger vorzugsweise Wasser, Kochsalzlösung, Alkohol, ein Fett, ein Wachs und/oder einen Puffer.

Es können beliebige einer Vielzahl von Immunstimulantien in den erfindungsgemäßen Vakzinen verwendet werden. Beispielsweise kann ein Adjuvans mit einbezogen werden. Die meisten Adjuvantien enthalten eine Substanz, die das Antigen vor einem raschen Abbau schützen sollen, wie Aluminiumhydroxid oder ein Mineralöl, sowie ein von Lipid A, aus Bortadella pertussis oder Mycobacterium tuberculosis abgeleitetes Protein.
20 Geeignete Adjuvantien sind in der Regel kommerziell erhältlich, beispielsweise komplettes oder inkomplettes Freund-Adjuvans; AS-2; Aluminiumsalze, wie Aluminiumhydroxid (gegebenenfalls als Gel) oder Aluminiumphosphat; Calcium-, Eisen- oder Zinksalze; eine unlösliche Suspension acylierten Tyrosins; acylierte Zucker; kationisch oder anionisch derivatisierte Polysaccharide; Polyphosphazene; biologisch abbaubare
25 Mikrosphären; Monophosphoryl-Lipid A. Cytokine, wie GM-CSF oder Interleukin-2, -7 oder -12 können ebenfalls als Adjuvantien verwendet werden.
30

7. Therapieverfahren

35 7.1 AGER assoziierte Erkrankungen

Erfindungsgemäß werden die Voraussetzungen für Diagnose und oder Therapie „AGER-assoziierte“ Erkrankungen verbessert bzw. erstmals geschaffen. „Ager assoziierte“ Erkrankungen sind insbesondere solche, die mit einer AGER/AGER-,

AGER/Ligand-, AGER/Rezeptor-, AGER/Rezeptor/Ligand-, AGER/Rezeptor/Co-Rezeptor- und/oder AGER/Rezeptor/Counter-Rezeptor-Wechselwirkung assoziiert sind. „Ager-assoziierte“ Erkrankungen können zudem durch eine vermehrte Expression oder sonstige Bildung von AGER oder AGER-Liganden charakterisiert sein.

5

Als AGER-assoziierte Erkrankungen sind insbesondere die folgenden in der WO 2004/016229 genannten und/oder in der Literatur beschriebenen Krankheiten zu nennen:

- 10 Amyloidosen, Krebs, Arthritis, Crohn'sche Erkrankung, chronische inflammatorische Erkrankungen, akute inflammatorische Erkrankungen (Schmidt AM et al: J Clin Invest. 2001 Oct;108(7):949-55.), kardiovaskuläre Erkrankungen, Diabetes, Diabeteskomplikationen (Yan SD et al: Eur J Clin Invest. 1997 Mar;27(3):179-81), Prion-assoziierte Erkrankungen (Sasaki N et al: Neurosci Lett. 2002 Jun 28;326(2):117-20), Vaskulitis,
- 15 Nephropathien, Retinopathien und Neuropathien (Thornalley PJ: Int Rev Neurobiol. 2002;50:37-57.). Alzheimer (Weldon DT et al: Geriatrics. 1997 Sep;52 Suppl 2:S13-6; Yan SD et al: Biochim Biophys Acta. 2000 Jul 26;1502(1):145-57), rheumatoide Arthritis, Osteoarthritis (Drinda S et al: Rheumatol Int. 2004 Mar 26), Bowel Disease (Foell D et al: Gut. 2003 Jun;52(6):847-53), multiple Sklerose (Yan SS et al: Nat Med. 2003
- 20 Mar;9(3):287-93.), Psoriasis (Foell D et al: Rheumatology (Oxford). 2003 Nov;42(11):1383-9.), Lupus (Tanji N et al: J Am Soc Nephrol. 2000 Sep;11(9):1656-66.), Autoimmunerkrankungen im allgemeinen, Sepsis (Lillensiek B et al: J Clin Invest. 2004 Jun;113(11):1641-50), Arteriosklerose und Restenose (Schmidt AM et al: Circ Res. 1999 Mar 19;84(5):489-97.).

25

7.2 Therapieansätze

Erfindungsgemäße Therapieansätze basieren auf der modulierenden Wirkung wenigstens eines der oben genannten therapeutischen Agenzien auf eine mit der zu behandelnden Erkrankung assoziierten Wechselwirkung des Typs: AGER/AGER,

30 AGER/Ligand, AGER/Rezeptor, AGER/Rezeptor/Ligand, AGER/Rezeptor/Co-Rezeptor oder AGER/Rezeptor/Counter-Rezeptor.

Der bei der erfindungsgemäß durchgeführten Therapie zu beobachtende therapeutische Effekt kann dabei auf einer agonistischen, partiell agonistischen, antagonistischen

35 oder invers agonistischen Wirkung auf wenigstens eine dieser Wechselwirkungen beruhen.

Insbesondere kann dabei die therapeutische Wirkung beruhen auf:

- a) der Induktion, teilweisen Hemmung oder vollständigen Unterbrechung eines Signalweges; und/oder
- b) der Bildung von durch den Körper besser eliminierbaren oder physiologisch/pathophysiologisch unwirksamen Komplexstrukturen.

8. Diagnostizierverfahren

- 10 Als diagnostische Agenzien sind erfindungsgemäß insbesondere AGER-RME und AGER-CDP und Derivate/Äquivalente gemäß obiger Definition sowie anti-AGER-RME und anti.AGER-CDP -Antikörper zu nennen.

- 15 Die vorliegende Erfindung ermöglicht daher insbesondere die verbesserte qualitative oder quantitative Bestimmung oben definierter Krankheitszustände durch Nachweis krankheitstypischer Antigene oder Antikörper.

- 20 Die Bestimmung erfolgt vorzugsweise mit immunologischen Methoden. Prinzipiell kann dies mit jedem analytischen bzw. diagnostischen Testverfahren erfolgen, bei dem Antikörper eingesetzt werden. Hierzu gehören Agglutinations- und Präzipitations-Techniken, Immunoassays, immunhistochemische Verfahren und Immunoblot-Techniken, z.B. Western-Blotting oder Dot Blot-Verfahren. Auch in vivo-Verfahren gehören dazu, beispielsweise bildgebende Verfahren.

- 25 Von Vorteil ist der Einsatz in Immunoassays. Geeignet sind sowohl kompetitive Immunoassays, d.h. Antigen und markiertes Antigen (Tracer) konkurrieren um die Antikörperbindung, als auch Sandwich-Immunoassays, d.h. die Bindung spezifischer Antikörper an das Antigen wird mit einem zweiten, meist markierten Antikörper nachgewiesen. Diese Assays können sowohl homogen, d.h. ohne eine Trennung in feste und flüssige Phase, als auch heterogen sein, d.h. gebundene Markierungen werden von ungebundenen getrennt, beispielsweise über Festphasen-gebundene Antikörper. Die verschiedenen heterogenen und homogenen Immunoassay-Formate können je nach Markierung und Meßmethode bestimmten Klassen zugeordnet werden, beispielsweise RIAs (Radioimmunoassays), ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay), FIA (Fluoreszenz-Immunoassay), LIA (Lumineszenz-Immunoassay), TRFIA (zeitlich aufgelöster FIA), IMAC (Immunaktivierung), EMIT (Enzyme multiplied immune test), TIA (Turbidimetrischer Immunoassay), I-PCR (Immuno-PCR).

Zur erfindungsgemäßen Antigen-Bestimmung sind kompetitive Immunoassays bevorzugt. Dabei konkurriert markiertes Antigen (Tracer) mit dem zu quantifizierenden Antigen der Probe um die Bindung an den verwendeten Antikörper. Aus der Menge des verdrängten Tracers lässt sich mit Hilfe einer Standardkurve die Antigenmenge, sprich
5 die Antigenmenge, in der Probe bestimmen.

Von den für diese Zwecke zur Verfügung stehenden Markierungen haben sich Enzyme als vorteilhaft erwiesen. Beispielsweise können Systeme auf Basis von Peroxidasen, insbesondere der Meerrettich-Peroxidase, der alkalischen Phosphatase und der β -D-Galactosidase, verwendet werden. Für diese Enzyme stehen spezifische Substrate zur
10 Verfügung, deren Umsetzung sich z.B. photometrisch verfolgen lässt. Geeignete Substratsysteme basieren auf p-Nitrophenylphosphat (p-NPP), 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat/Nitroblau-Tetrazolium (BCIP/NPT), Fast-Red/Naphthol-AS-TS-Phosphat für die alkalische Phosphatase; 2,2-Azino-bis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) (ABTS), o-Phenylendiamin (OPT), 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB), o-Dianisidin, 5-Aminosalicylsäure, 3-Dimethylaminobenzoessäure (DMAB) und 3-Methyl-2-benzothiazolinhydrazon (MBTH) für Peroxidasen; o-Nitrophenyl- β -D-galactosid (o-NPG), p-Nitrophenyl- β -D-Galactosid und 4-Methylumbelliphenyl- β -D-galactosid (MUG)
15 für die β -D-Galactosidase. Diese Substratsysteme sind in vielen Fällen in gebrauchsfertiger Form kommerziell erhältlich, beispielsweise in Form von Tabletten, die auch weitere Reagenzien, wie zweckmäßige Puffer und ähnliches enthalten können.
20

Die Kopplung von Markierungen an Peptide oder Antikörper zur Herstellung von Tracern kann in an sich bekannter Weise erfolgen. Darüber hinaus stehen eine Reihe zur
25 Konjugation an Proteine zweckmäßig modifizierte Markierungen zur Verfügung, beispielsweise Biotin-, Avidin-, Extravidin- oder Streptavidin-konjugierte Enzyme, Maleimid-aktivierte Enzyme und ähnliches. Diese Markierungen können direkt mit dem erfindungsgemäß zu verwendenden Molekül umgesetzt werden.

30 Wird ein heterogenes Immunoassay-Format gewählt, so kann der Antigen-Antikörper-Komplex zwecks Trennung beispielsweise über einen an den Träger gekoppelten anti-idiotypischen Antikörper, z.B. einen gegen Kaninchen-IgG gerichteten Antikörper, an den Träger gebunden werden. Träger, insbesondere Mikrotiterplatten, die mit entsprechenden Antikörpern beschichtet sind, sind bekannt und kommerziell erhältlich.

35 Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Immunoassay-Sets mit wenigstens einem vorstehend beschriebenen Antikörper und weiteren Komponenten. Es handelt sich hierbei um eine Zusammenstellung, in der Regel als Verpackungseinheit, von Mitteln zur Durchführung einer erfindungsgemäßen AGER-Bestimmung. Zwecks

möglichst einfacher Handhabung werden diese Mittel vorzugsweise im wesentlichen gebrauchsfertig bereitgestellt. Eine vorteilhafte Anordnung bietet den Immunoassay in Kit-Form an. Ein Kit umfasst in der Regel mehrere Behältnisse zur getrennten Anordnung von Komponenten. Alle Komponenten können in gebrauchsfertiger Verdünnung, als Konzentrat zum Verdünnen oder als Trockensubstanz oder Lyophilisat zum Lösen oder Suspendieren bereitgestellt werden; einzelne oder sämtliche Komponenten können eingefroren sein oder bei Umgebungstemperatur bis zum Gebrauch aufbewahrt werden. Seren sind vorzugsweise schockgefroren, beispielsweise bei -20°C, so dass in diesen Fällen ein Immunoassay vor Gebrauch vorzugsweise bei Gefriertemperaturen zu halten ist.

Weitere, dem Immunoassay beigelegte Komponenten können sein: Standardprotein, Tracer; Kontrollserum, Mikrotiterplatten, vorzugsweise mit Antikörper beschichtet, Puffer, beispielsweise zum Testen, zum Waschen oder zur Umsetzung des Substrats, und das Enzymsubstrat selbst.

Allgemeine Prinzipien von Immunoassays und die Erzeugung und Verwendung von Antikörpern als Hilfsmittel in Labor und Klinik finden sich beispielsweise in Antibodies, A Laboratory Manual (Harlow, E., and Lane, D., Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1988).

9. Screening-Verfahren

Gegenstand der Erfindung sind auch Verfahren zum Nachweis von Effektoren des AGER-Rezeptors, wobei man eine Probe, in der man einen Effektor vermutet, mit einem AGER-RME- oder AGER-CDP-Polypeptid inkubiert und den Ansatz auf die Bildung eines Effektor-AGER-RME oder -AGER-CDP-Komplexes untersucht.

Derartige Effektoren können eine agonistische, partiell agonistische, antagonistische oder invers agonistische Wirkung besitzen. Es können dies z.B. synthetische niedermolekulare Substanzen, synthetische Peptide, natürliche oder synthetische Antikörpermoleküle oder Naturstoffe sein.

Solche erfindungsgemäßen Verfahren werden in der Regel als *in vitro*-Screening-Verfahren durchgeführt, mit denen man aus einer Vielzahl verschiedener Substanzen diejenigen auslesen kann, die im Hinblick auf eine künftige Anwendung am aussichtsreichsten zu sein scheinen.

Beispielsweise können mittels kombinatorischer Chemie umfangreiche Stoffbanken angelegt werden, die eine Vielzahl potentieller Wirkstoffe umfassen. Das Durchmustern kombinatorischer Substanzbibliotheken nach Stoffen mit gewünschter Aktivität ist automatisierbar. Screening-Roboter dienen der effizienten Auswertung der vorzugsweise auf Mikrotiterplatten angeordneten Einzelassays. So betrifft die vorliegende Erfindung auch Screening-Verfahren, d.h. sowohl Primär- als auch Sekundärscreening-Verfahren, bei denen vorzugsweise wenigstens eines der nachfolgend beschriebenen Verfahren zur Anwendung kommt. Kommen mehrere Verfahren zur Anwendung, so kann das zeitlich versetzt oder gleichzeitig an ein und derselben Probe oder an verschiedenen Proben einer zu untersuchenden Substanz geschehen.

Eine effektive Technologie zur Durchführung derartiger Verfahren ist der im Bereich des Wirkstoffscreenings bekannte Scintillation Proximity Assay, kurz SPA genannt. Kits und Komponenten zur Durchführung dieses Assays können kommerziell bezogen werden, beispielweise bei Amersham Pharmacia Biotech. Im Prinzip werden solubilisierte oder membrangebundene Rezeptoren auf Szintillationssubstanz enthaltenden, kleinen Fluoromikrosphären immobilisiert. Bindet beispielsweise ein Radioligand an die immobilisierten Rezeptoren, so wird die Szintillationssubstanz zur Lichtemission angeregt, da die räumliche Nähe zwischen Szintillationssubstanz und Radioligand gegeben ist.

Eine weitere effektive Technologie zur Durchführung derartiger Verfahren ist die im Bereich des Wirkstoffscreenings bekannte FlashPlateR-Technologie. Kits und Komponenten zur Durchführung dieses Assays können kommerziell bezogen werden, beispielweise bei NEN Life Science Products. Dieses Prinzip basiert ebenfalls auf Mikrotiterplatten (96er oder 384er), die mit Scintillationssubstanz beschichtet sind.

Screeningverfahren unter Verwendung des hierin beschriebenen Actin Cytoskeletal Rearrangement (ACR) Assays sind ebenfalls anwendbar.

Die nach diesen Verfahren identifizierbaren Substanzen oder Teile aus Substanzgemischen sind ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

Die Erfindung wird nun unter Bezugnahme auf folgende nichtlimitierende Herstellungs- und Anwendungsbeispiele näher erläutert

Experimenteller Teil

I. Allgemeine Angaben

a) Bestandteile von Kulturmedien

RPMI-Glutamax (Invitrogen, Carlsbad, USA)

Geneticin (G418); (Antibiotikum; Selektionsmarker) (Invitrogen)

5 Fetal Bovine Serum (FBS) Dialyzed, (Invitrogen)

Antibiotic-Antimycotic (Invitrogen)

Zeocin (Antibiotikum; Selektionsmarker) (Invitrogen)

LIPOFECTAMINE (Invitrogen)

10 b) Zellen

Menschliche embryonale Nierenzellen (HEK293) (ATCC = American Tissue Culture Collection, Bestellnr.: CRL-1573) wurden mit Rho (HEK293-RhoA) oder mit Rho in Kombination mit dem Rezeptorkomplex NgR/p75 (HEK293-RhoA/NgR/p75) stabil
15 transfiziert. Die Zellen wurden in RPMI-Glutamax Medium, ergänzt mit 5 % hitzeinaktiviertem fötalem Rinderserum (FBS), HEPES (10 mM), Penicillin (100 U/ml), Streptomycin (100 mM) und entweder Neomycin (HEK293-RhoA) oder Neomycin in Kombination mit Zeocin (HEK293-RhoA/NgR/p75), gehalten.

20 c) Reagenzien

Nogo-66, enthaltend ein N-terminales alkalische Phosphatase-Tag (AP-Nogo66)	
L-alpha-Lysophosphatitsäure (LPA)	Sigma, München, DE
Anti-RhoA-Antikörper	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
Anti-Nogo66 Antikörper (NogoA12-A)	Alpha Diagnostics International, San Antonio, Texas, USA
Alexa Phalloidin 568 oder 488 (Farbstoff zur Fluoreszenz-Färbung von F-Aktin)	Molecular Probes, Eugene, USA
DAPI (Hoechst 33342, Trihydrochlorid, trihydrat)	Molecular Probes Inc., Eugene, USA

d) Allgemeine Testmethoden

25

1) ACR-Assay mit Immunofluoreszenz-Messung:

1 x 10⁴ Zellen wurden in Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen zwei Tage vor der Stimulierung überimpft. Die Stimulation der Zellen erfolgte mit einem geeigneten Reagens (z.B. LPA oder AP-Nogo-66) in Kulturmedium (RPMI-Glutamax) enthaltend 5% FCS. Nach einer 5- bis 10-minütigen Stimulationsperiode wurde die Aktivierung mit kalter PBS unterbrochen. Die Zellen wurden mit 3 - 4 %-iger Paraformaldehydlösung fixiert, mit PBS, enthaltend 0,2 % Triton X-100 permeabilisiert und 30 - 45 Minuten mit Phalloidin Alexa 568 oder 488 inkubiert. Zusätzlich erfolgte eine 5 minütige Inkubation mit DAPI zur Kernfärbung. Die Zellen wurden mit Hilfe eines Epifluoreszenzmikroskops (Axiovert 25) visualisiert. Fluoreszenzmikrogramme wurden mit einer gekühlten CCD Kamera von Zeiss aufgenommen.

2) FACS Analyse

Reagenzien:

15

Maus-anti-Human p75; IgG Monoklonaler Antikörper	Sigma N-5408
Anti-Maus-FITC	Sigma F-5262
Ziege-anti-Human NogoR	R&D Systems; AF1208
Anti-Ziege-FITC	Sigma F7367

Durchführung:

Zunächst wurden die HEK293-Zellen mit PBS gewaschen. Adhärenz Zellen wurden mit PBS, enthaltend 5 mM EDTA abgelöst. Anschließend wurden 2 x 10⁶ Zellen in ein Eppendorff-Gefäß überführt und 2 Minuten bei 1300 Upm zentrifugiert. Die Zellen wurden in PBS, enthaltend 1 % BSA (1 ml/Gefäß) resuspendiert und 2 Minuten bei 1300 Upm zentrifugiert.

Die Pellets wurden erneut mit 0,1 ml PBS/1 % BSA einschließlich Primärantikörper (Maus-anti-Human p75 1:100, oder Ziege-anti-Human NogoR 1:50) resuspendiert und 90 Minuten bei 4°C inkubiert. Anschließend gab man 0,1 ml PBS/1 % BSA hinzu, mischte und zentrifugierte 2 Minuten bei 1300 Upm.

Die Pellets wurden in PBS, enthaltend 1 % BSA (0,1 ml/Gefäß) und Sekundärantikörper (anti-Maus-FITC 1:100; oder anti-Ziege-FITC 1:100); resuspendiert und 60 Minuten bei 4°C inkubiert.

- 5 Man gab PBS, enthaltend 1 % BSA (1 ml/Gefäß) hinzu, mischte und zentrifugierte 2 Minuten bei 1300 Upm. Nach Abzentrifugation wurden die Pellets erneut in PBS/ 0,1 % Propidiumjodid zur Detektion toter Zellen resuspendiert. Nach Resuspendieren erfolgte eine FACS-Analyse (FACScan, Firma Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland).

10 II. Herstellungsbeispiele

Herstellungsbeispiel 1: Herstellung von AP-Nogo66

a) Klonierung des Nogo66 Fragments von hNogoA

15

Es wurde ausgegangen von der publizierten hNogoA Sequenz (NCBI): AF148537. Die beiden folgenden synthetischen Oligonukleotide wurden von der publizierten Sequenz abgeleitet:

- 20 Mez 402: **GCCACCATGAGGATATACAAGGGTGTGATCC** (SEQ ID NO:9); Oligo ab Aminosäure R1055 (kursiv) mit Start ATG (unterstrichen) und Kozak Sequenz (fett)

Mez 404: **CTTCAGAGAATCAACTAAATCATC** (SEQ ID NO:10); Oligo bis Aminosäure K1120 (fett)

25

Mit diesen beiden Oligos wurde in frontal cortex cDNA als Template (hergestellt mit Superscript first strand synthesis system for RT-PCR; Invitrogen, Carlsbad, CA) (Novak et al., Brain Res. Mol. Brain, 2002, 107(2): 183-189) eine PCR durchgeführt. Die Reaktion wurde nach Standardmethode, wie Innis et al. (PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press (1990)) mit Herculase (Stratagene, La Jolla, USA), durchgeführt. Das erhaltene DNA Fragment mit einer Größe von 207 bp wurde mit dem QIAEX II Gel Extraction Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) nach Angaben des Herstellers gereinigt. Das amplifizierte, gereinigte Fragment wurde in pcDNA3.1V5-His TOPO (pcDNA3.1/V5-His TOPO TA Expression Kit, #K4800-01) gesetzt. Mit dem so erhaltenen Konstrukt pcDNA3.1V5-His hNOGO66 wurden E.coli TOP10 Zellen (Invitrogen, Carlsbad, CA) nach Standardmethoden wie in Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, (1989)) beschrieben,

30

35

transformiert. Eine Selektion auf Plasmid tragende Zellen wurde durch das Antibiotikum Ampicillin erreicht.

5 Die Identifikation von neun Klonen mittels PCR zeigte bei drei Klonen eine Bande in der richtigen Größe von 207 bp. Die Richtigkeit der Sequenz wurde durch Sequenzanalyse überprüft.

10 Die kodierende Nogo66-Sequenz wurde mit XbaI aus obigem Plasmid pcDNA3.1V5-His hNogo66 herausgeschnitten und in das Plasmid pAP-tag5 (GenHunter Cooperation, Nashville, TN, USA) über XbaI einkloniert. Man erhält das Plasmid pAP-tag5/PPC/hNogo66 Nr.5. (SEQ ID NO:11) dargestellt in Figur 2.

b) Herstellung der stabilen Zelllinie:

15 HEK293 Zellen wurden in Wachstumsmedium (DMEM mit 10% fötalem Rinderserum unter Zusatz von Penicillin/Streptomycin) bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Für die Transfektion wurden die Zellen in Platten mit 6 Kavitäten (1x 10⁶ pro Well) ausgesät und über Nacht inkubiert. Die Zellen wurden mit einem Cocktail, der 1µg Plasmid DNA (pAP-tag5/PPC/hNogo66 Nr.5) und 3µl Fugene6 (ROCHE Diagnostics, Mannheim)
20 enthielt, nach Angaben der Herstellers transfiziert. Zwei Tage später wurden die Zellen durch Behandlung mit Trypsin abgelöst, in eine Zellkulturflasche mit 175cm² Grundfläche überführt und die Selektion durch Zugabe von 150µg/ml Zeocin in Wachstumsmedium gestartet. Heranwachsende Zeocin-resistente Zellkolonien wurden nach etwa 4 Wochen mit Trypsin abgelöst und mit einem Zellsorter in 96-well Platten vereinzelt.
25 Nach etwa drei Wochen wurde ein Aliquot des Mediumüberstands der herangewachsenen Einzellzellkolonien, deren Konfluenz zu diesem Zeitpunkt zwischen 5 und 85% abgeschätzt wurde, auf Nitrozellulose pipettiert. Durch Zugabe einer Lösung von NBT (Nitroblau-Tetrazoliumsalz) und BCIP (5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat) wurde die Proteinexpression über die Aktivität der Alkalischen Phosphatase anhand der entstehenden Färbung nachgewiesen.
30

c) Expression von AP-Nogo66:

35 Ein HEK293 Klon (Klon Nr. 5), welcher AP-Nogo66 produziert, wurde in Kulturmedium (RPMI Glutamax +10% FCS, 150 µg/ml Zeocin, Antibiotic / Antimycotic) durch mehrmalige Passage (ca. 20) in Kulturflaschen vermehrt. Die AP-Nogo66 Expression wurde nach jeder zweiten oder dritten Passage im Dot Blot Test (mit NBT/BCIP Reagens) überprüft.

Um AP-Nogo66 in Serum-freiem Medium zu produzieren wurden die Zelle zunächst bis fast zur Konfluenz in Triple-Flasks kultiviert, dann erfolgte ein Mediumwechsel zu Expressionsmedium (Pro293a - CDM Medium (Biowhittaker; # 12-764Q), 2mM Glutamin, Antibiotic / Antimycotic). Daraufhin wurden die Zellen 3 - 4 Tage bei 37 °C kultiviert, die
5 Überstände wurden abgenommen und abzentrifugiert (1500 Upm, 5 min). Die Überstände wurden bei -80°C gesammelt. Zur weiteren Verarbeitung wurden sie aufgetaut, mit Proteinaseinhibitoren (PMSF 0,1mM, Pefabloc SC 1mM) versetzt und in Amicon Tubes (Millipore) aufkonzentriert und die AP-Nogo66 Konzentration wurde bestimmt (ca. 3 µg/ml) (Mw von monomerer AP: 67 kDa und monomerem AP-Nogo66 etwa. 75
10 kDa in SDS Gelen).

Der AP-Nogo66-Pool wurde mit anti-AP-Agarose immunopräzipitiert. Das Präzipitat wurde durch 10-minütiges Erhitzen bei 95°C in Gegenwart von 5% Mercaptoethanol denaturiert und so von den Agarose Beads entfernt, schließlich durch Westen-Analyse
15 mittels Antikörpern mit Spezifität für AP und Nogo66 verifiziert. Durch Gelchromatographie (Superose 12, Amersham Biosciences. Laufmittel: 20 mM Natriumphosphat, 140 mM Natriumchlorid, pH 7.4) wurde bestimmt, dass AP-Nogo66 als Dimer läuft und ein Mw von etwa 140 kDa aufweist. In Vorversuchen wurde festgestellt, dass AP-Nogo66, nicht aber GST-Nogo66 funktionell aktiv war. Es wird daher vermutet, dass
20 NgR-Liganden womöglich als Dimer vorliegen müssen, um funktionell zu sein. Wie die Kristallstruktur der Alkalischen Phosphatase zeigt, wird die Dimerisierung vom AP-Tag induziert (Versuche nicht gezeigt).

Herstellungsbeispiel 2: Herstellung von rekombinanten HEK-Zelllinien zur Durchführung des funktionellen Aktin Cytoskeletal Rearrangement (ACR) Assay

25

1. Herstellung der erforderlichen Konstrukte

a) Klonierung von hp75; Herstellung von pcDNA3.1(V5-His)hp75 Nr.16 (Fig. 3d)

30

Es wurde von den publizierten Sequenzen für humanes p75 ausgegangen: NM_002507; M14764 (die beide 100% identisch sind). Die folgenden Oligonukleotide wurden von der publizierten Sequenz abgeleitet:

35 Mey 36: GCCACCATGGGGGCAGGTGCCACC (SEQ ID NO:13) ; Oligo mit Start-Codon (fett) mit Kozak Sequenz (kursiv)

Mey 35: **TCACACT**TGGGGATGTGGCAG (SEQ ID NO:12); Oligo mit Stop Codon (fett) ein Basenaustausch T statt C (unterstrichen) da das Oligo von der publizierten Ratten Sequenz abgeleitet ist

- 5 Mey 71: GCAGCCCCATCAGTCCGC (SEQ ID NO:14); Oligo beginnend 64 Basenpaare vor Start ATG

Anschließend wurde eine PCR (analog zu Nogo 66 Klonierung, Beispiel 1) mit dem Primerpaar Mey 35/71 in cDNA aus der Zelllinie SH-SY5Y (humane Neuroblastomazelllinie ATCC # CRL-2266) durchgeführt. Die PCR mit Mey35/71 lieferte ein 1348 bp Fragment. Dieses wurde gereinigt.

Eine anschließende PCR mit dem Primerpaar Mey 35/36 im Mey 35/71-Fragment ergab eine deutliche Bande (Fragmentgröße: 1284 bp). Diese wurde gereinigt. Dann wurde diese Bande in pcDNA3.1/V5-His TOPO Vector (SEQ ID NO:15) (pcDNA3.1(V5-His)TOPO TA Expression Kit Invitrogen #K4800-01) ungeschnitten eingesetzt (Prinzip Topoisomerase) Mit dem so erhaltenen Konstrukt (pcDNA3.1 hp75) wurden TOP10 Zellen nach Standardmethoden (analog zu Nogo 66 Klonierung, Beispiel 1) transformiert.

20 13 Klone dieser Transformation wurden überprüft und vier Klone mit der richtigen Orientierung (Nr.13, 15, 16 und 18) konnten identifiziert werden. Klon Nr16 wurde weiter verwendet. Die Sequenz des enthaltenen Konstruktes (pcDNA3.1(V5-His)hp75 Nr.16 ; vgl. auch Figur 3d) ist in SEQ ID NO:16 dargestellt. Weitere Informationen zu dieser Sequenz sind im folgenden Abschnitt zusammengefasst.

	Human p75	start: 40	stop:1320
	Neomycin	start:2596	stop:3390
	Ampicillin	start:4897	stop:5757 compl.
30	Bgh pA	start:1487	stop:1701
	SV40 pA	start:3416	stop:3654
	His tag	start:1441	stop:1458
	V5 Epitope	start:1397	stop:1438
	F1 ori	start:1764	stop:2177
35	SV40 promoter + ori	start:2242	stop:2567
	pUC ori	start:4086	stop:4759

b) Herstellung von pIRES hp75

Plasmid pIRES (Clontech, Palo Alto, USA) wurde mit Xba I und Not I (Roche Diagnostics) unter Verwendung eines Restriktionsansatzes (40 µl; 1,5 h bei 37 °C) enthaltend 5 µg DNA, 2 µl Xba I, 2 µl Not I, 4 µl 10x Puffer H (Roche) und 32 µl Wasser bidest. geschnitten. Das ausgeschnittene Fragment wurde mit Hilfe des Qiagen Gelextraktionskit aus einem DNA-Gel in herkömmlicher Weise gewonnen.

Plasmid pcDNA3.1 hp75, hergestellt wie oben beschrieben, wurde mit Spe I und und Not I (Roche Diagnostics) unter Verwendung eines Restriktionsansatzes (40 µl; 1,5 h bei 37 °C) enthaltend 5 µg DNA, 2 µl Spe I, 2 µl Not I, 4 µl 10x Puffer H (Roche), 32 µl Wasser bidest geschnitten. Das ausgeschnittene Fragment wurde mit Hilfe des Qiagen Gelextraktionskit aus einem DNA-Gel in herkömmlicher Weise gewonnen.

Die auf diese Weise hergestellten Restriktionsfragmente wurden unter Verwendung des folgenden Ansatzes über Nacht bei 16 °C ligiert: 5 µl hp75-Konstrukt, 2 µl geschnittener pIRES, 1,5 µl T4-DNA Ligase (Roche) 3 µl 10x Puffer T4 (Roche), 20,5 µl Wasser bidest. Diese Ligation mit der Bezeichnung pIRES hp75 wurde dann in den Bakterienstamm SuperComp XL2 Blue (Stratagene) transformiert.

c) Herstellung von pIRES hNgR hp75 (Fig. 3a)

pcDNA hNgR CDS1, kommerziell erworben von RZPD (Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH, Klon.Nr.: IRAL-p962L1427Q2), enthaltend die kodierende Sequenz für humanen Nogo-Rezeptor (hNgR), wurde unter Verwendung eines Restriktionsansatzes 13 µl; 1 h bei 37 °C) enthaltend 5 µg DNA, 1,5 µl Hind III (Roche), 1,5 µl 10x Puffer B (Roche) und 10 µl Wasser bidest. verdaut (blunt end). Das ausgeschnittene Fragment wurde mit Hilfe des Qiagen Gelextraktionskit aus einem DNA-Gel in herkömmlicher Weise gewonnen.

Zum Auffüllen der Enden wurden 20 µl des geschnittenen pcDNA hNgR CDS1-Konstrukt in einem Ansatz (100 µl; 30 min 11 °C), enthaltend 2 µl T4-DNA Polymerase (Roche), 10 µl 10x Puffer T4 (Roche), 1 µl 100 mM DTT (Gibco), 10 µl 20 mM NTP Mix (Stratagene) und 77 µl Wasser bidest. inkubiert. Das T4-fill-in wurde mit Hilfe des Qiagen Gelextraktionskit aus einem DNA-Gel gewonnen.

Zur Dephosphorylierung, um eine Re-Ligierung der blunt ends zu vermeiden, wurden 50 µl des T4 fill-ins des hNgR CDS1-Konstruktes mit 2 µl Alkalische Phosphatase (Roche), 10 µl 10x Puffer (Roche) und 38 µl Wasser bidest. zunächst 30 min bei 37 °C und anschließend 15 min bei 65 °C inkubiert. Das so erhaltenen Dephosphorylierungskonstrukt wurde schließlich mit Qiagen Hit clean-up aufgereinigt.

Das gereinigte pcDNA h NgR Hind II blunt Fragment wurde dann mit EcoRI unter Verwendung eines Restriktionsansatzes (15 µl, 1 h bei 37 °C), enthaltend 10 µl Eluat (aus Qiagen Hit clean-up), 1,5 µl EcoR I (Roche), 1,5 µl 10x Puffer H (Roche) und 2,0 µl Wasser bidest., verdaut und mit Hilfe des Qiagen Gelextraktionskit aus einem DNA-Gel nach Restriktion gewonnen.

pIRES hp75 (wie oben hergestellt) wurde mit EcoR I und Hind III unter Verwendung eines Restriktionsansatzes (27 µl, 1,5 h bei 37 °C), enthaltend 5 µg DNA, 1,5 µl EcoR I, 1,5 µl Hind III, 4 µl 10x Puffer H (Roche) und 20 µl Wasser bidest. geöffnet. Das gewünschte hp75 Fragment wurde mit Hilfe des Qiagen Gelextraktionskit aus einem DNA-Gel nach Restriktion gewonnen und mit dem oben hergestellten hNgR-Konstrukt unter Verwendung eines Ligationsansatzes, enthaltend 5 µNgR-Konstrukt, 2 µl geschnittener pIRES hp75, 1,5 µl T4-DNA Ligase (Roche), 3 µl 10x Puffer T4 (Roche) und 20,5 µl Wasser bidest. über Nacht 16 °C ligiert. Das erhaltene Konstrukt pIRES hNgR hp75 (Fig 3a; SEQ ID NO:18) wurde dann in den Bakterienstamm SuperComp XL2 Blue (Stratagene) transformiert.

Weitere Sequenzinformationen zu pIRES hNgR hp75 sind in folgendem Abschnitt zusammengefasst:

	CMV prom.	108 - 857
	NOGO R	1202-2620
	IRES	2658-3238
25	hp75	3294-4574
	SV40pA	4648-4869
	f1ori	4964-5419
	Neo	5483-6856
	amp	7261-8121
30	pUC ori	8266-93 compl.

d) Herstellung von pcDNA4(mycHis)A hRhoA wt (Fig. 3c)

Das Plasmid pOTB7 RhoA (kommerziell erworben von RZPD, Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH, Klon.Nr.: IRAL-p962A174), das die kodierende Sequenz für humane RhoA GTPase enthält, wurde unter Verwendung des folgenden Restriktionsansatzes (25 µl, 1,5 h bei 37 °C), enthaltend 5 µg DNA, 1,5 µl EcoR I, 1,5 µl Xho I (Roche), 3 µl 10x Puffer H (Roche) und 19 µl Wasser bidest. verdaut.

In einem zweiten Ansatz wurde pcDNA4(mycHis) (Invitrogen, Carlsbad, USA) unter Verwendung des folgenden Restriktionsansatzes (25 µl, 1,5 h bei 37 °C), enthaltend 5 µg DNA, 1,5 µl EcoR I, 1,5 µl Xho I (Roche), 3 µl 10x Puffer H (Roche) und 19 µl Wasser bidest. ebenfalls verdaut.

5

Anschließend wurden die geschnittenen Fragmente, wie oben beschrieben gereinigt und ligiert, wobei man das Plasmid pcDNA4(mycHis)A h RhoA wt (vgl. Fig. 3c; SEQ ID NO:21) erhält. Das erhaltene Konstrukt wurde dann in den Bakterienstamm Super-Comp XL2 Blue (Stratagene) transformiert.

10

Weitere Sequenzinformationen zu pcDNA4(mycHis)A hRhoA wt sind in folgendem Abschnitt zusammengefasst:

CMV prom. 197-851

15 RhoA 1058-1636

His 2437-2454

myc 2392-2421

Bgh pA 2480-2707

SV40 pA 4143-4273

20 f1ori 2753-3181

amp 5477-6334 compl.

pUC ori 4656-5329

Zeo 3639-4010

EM7 prom. 3565-3620

25 SV40 prom. 3209-3517

d) Herstellung von pcDNA3 hRhoA wt (Fig. 3b)

Die Herstellung erfolgt in Analogie zu pcDNA4(mycHis)A hRhoA wt, wobei man aber anstelle von pcDNA4(mycHis) das oben bereits beschriebenen Plasmid pcDNA3.1V5-His TOPO verwendet.

Weitere Sequenzinformationen zu pcDNA3 hRhoA wt (vgl. Fig. 3b; SEQ ID NO:23) sind in folgendem Abschnitt zusammengefasst:

35

CMV prom. 6124-6778

h RhoA 127-705

Bgh pA 1478-1718

SV40 pA 3402-3597

	SV40 ori	2259-2584
	ColE1 ori	4141-4515
	f1ori	1788-2201
	Neo	2620-3411
5	amp	4919-5779 compl.

2. Generierung stabiler rekombinanter HEK Zelllinien

10 a) Herstellung der Doppel-Transfektante HEK293 NgR/p75

HEK293 Wildtyp- Zellen (kultiviert in RPMI –Glutamax + 10% dial. FCS + 1% Antibiotic-Antimycotic) wurden in einem ersten Transfektionsschritt mit dem Plasmid pIRES hNgR hp75 transfiziert. Dazu wurden in Kulturschalen mit 10 Vertiefungen je Ansatz 2
 15 µg Plasmid-DNA in 100 µl serumfreien RPMI-Gutamax Medium und 2×10^6 Zellen in 12 µl LIPOFECTAMINE in 100 µl serumfreien RPMI-Gutamax Medium vermischt, und 15 bis 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Man füllte dann mit serumfreien Medium auf ein Gesamtvolumen von 1 ml je Transfektionsansatz auf. Anschließend gab man zu jeder Schale 2 ml serumfreies RPMI-Gutamax Medium und man inkubierte 6
 20 h bei 37 °C. Dann erfolgte ein Mediumwechsel auf RPMI-Glutamax + 5% dialysiertes FCS und inkubierte 1 Tag bei 37 °C. Anschließend wurden die Schaleninhalte gesplittet (in unterschiedlichen Verdünnungen: 1:10; 1:50, 1:100, 1:250, 1:500, 1:1000; 1 Ansatz/ Schale pro Verdünnung) (in RPMI–Glutamax + 10% dialysiertes FCS + 1% Antibiotic-Antimycotic + G418; 800 µg/ml)

25 Klone wurden aus derjenigen Verdünnung isoliert, die die ersten separierten Klone ergab. Sterile Mini-Glaszylinder (BASF) wurden mit einer sterilen Pinzette mit einem Ende in sterile Vaseline (BASF) vorsichtig eingetaucht. Das mit der Vaseline benetzte Ende der Mini-Glaszylinder wurde auf die zuvor ausgewählten Einzelklone vorsichtig
 30 aufgesetzt. Der Einzelklon sollte vollständig vom Mini-Glaszylinder umschlossen sein. In die Mini-Glaszylinder wurden nun mit einer Eppendorf-Pipette mit steriler Spitze 40 µl Trypsin (Gibco, Trypsin-EDTA) zugegeben. Das Trypsin ließ man 1-2 Minuten auf die Zellen einwirken. Durch mehrmaliges (3-4 Mal) Anziehen und Abgeben des Trypsins mit einer Eppendorf-Pipette (sterile Spitze) wurden die Zellen resuspendiert.
 35 Die resuspendierten Zellen wurden mit der Eppendorf-Pipette vollständig vom Mini-Glaszylinder in eine 24-well Platte (Tissue culture plate, Falcon, Becton Dickinson, jedes well enthielt 1 ml Medium RPMI-Glutamax + 5% dialysiertes FCS) überführt.

Der Nachweis von positiven Klonen erfolgte mittels FACS wie oben beschrieben. Dabei wurde die Überexpression der Rezeptoren NgR und p75 an der Zelloberfläche bestimmt (Ergebnisse nicht gezeigt).

5 b) Herstellung der Triple-Transfektante HEK293 RhoA/NgR/p75

Ein gemäß a) hergestellter positiver Klon (Klon 5) der Zelllinie HEK293 NgR/p75 wird in analoger Weise mit dem Plasmid pcDNA4(mycHis)A hRhoA transfiziert. Im letzten Schritt erfolgte eine Splittung der Ansätze in RPMI-Glutamax (+ 10% dialysiertes FCS
10 + 1% Antibiotic-Antimycotic + G418; 800 µg/ml, + Zeocin 125 µg/ml)

Zum Nachweis positiver Klone wurde diese durch Immunoblotting auf RhoA Expression und durch FACS Analyse auf Expression der Rezeptoren NgR und p75 getestet.

15 Zum RhoA-Nachweis wurde ein von dem jeweiligen Klon abgeleitetes Zellhomogenat durch SDS-PAGE-Gelelektrophorese (NuPAGE Polyacrylamid Gel 4-12%, 1,5 mm stark (Invitrogen Carlsbad, USA); die Proteinproben wurden mit 5% Mercaptoethanol denaturiert) aufgetrennt und nach Immunoblotting mit monoklonalem Maus-anti-RhoA Antikörper nach Standardmethode getestet. Ein typisches Ergebnis ist in Figur 4a dargestellt. Bei positiven Klonen beobachtet man eine RhoA-Bande mit einem
20 Molekulargewicht von etwa 21 kD.

Zum Nachweis der Expression von NgR und p75 wurde eine FACS-Analyse wie oben beschrieben durchgeführt. Ein typisches Ergebnis ist in Figur 4b dargestellt.

25

Herstellungsbeispiel 3: Herstellung von rekombinantem humanem sRAGE Protein und N-terminal verkürztem sRAGE

30 a) Herstellung von sRAGE Protein (sRAGE 1-331) (SEQ ID NO:37)

Grundlage für die Expression und Aufreinigung von rekombinanten sRAGE Protein war die stabil mit dem Vektor pcDNA3 (-) 6.1 C HIS A transfizierte HEK 293 Zelllinie „293/6.1 sRAGE His 6“.

35 Im Folgenden wird zunächst die Herstellung dieser Zelllinie beschrieben: Molekularbiologische Standardtechniken wurden gemäß Sambrook, J. and Russell D. (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual: 2nd.Edition, Cold Spring Harbor Press, NY durchgeführt.

Gesamt-RNA aus Lymphozyten (PBL) wurde mit dem Superscript RT-PCR System (Invitrogen, Carlsbad, USA) revers transkribiert, um anschließend mit den Oligonukleotidprimern

5

RAGE-SE : *CCG AAT TCC GGA AGC AGG ATG GCA GCC G* (SEQ ID NO:25) und
RAGE-AS: *CCC TCG AGC CCC TCA AGG CCC TCA GTA CTA CT* (SEQ ID NO:26)

10 die RAGE cDNA, wie sie in der Genbank Ref. Seq. Sequenz NM_001136 beschrieben ist, zu amplifizieren. Nach Gelaufreinigung mit dem QIAquick Gel extraction Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) wurde die cDNA mit den Restriktionsendonucleasen EcoR1 und XhoI geschnitten, um nach erneuter Gelaufreinigung in den ebenfalls XhoI/EcoR1 geschnittenen Vektor pcDNA 3 (Invitrogen, Carlsbad, USA) ligiert zu werden. Nach Transformation in E.coli XL-1 blue Zellen (Invitrogen, Carlsbad, USA) wurde
15 ein positiver rekombinanter Klon amplifiziert, die Sequenz verifiziert und die Plasmid-DNA mit dem Plasmid Mini-Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) isoliert. Ausgehend von diesem Plasmid mit der Bezeichnung pcDNA3/RAGE 2.6 wurde mit den Primern

20 N-SE A: *AGT AAC GGC CGC CAG TGT GCT GGA ATT CGG A* (SEQ ID NO:27) und
C-SE B: *CCG GTA CCA CCT GCA GTT GGC CCC TCC TCG CC* (SEQ ID NO:28)

die cDNA (Genbank Ref. Seq. Sequenz NM_001136) des löslichen RAGE (sRAGE) amplifiziert. Das PCR Produkt wurde mit EcoR1 und Kpn1 Restriktionsendonucleasen geschnitten und nach oben beschriebener Aufreinigung in den mit EcoR1/Kpn1 linearisierten Vektor „pcDNA3.1(-) Myc HIS“ (Invitrogen, Carlsbad, USA) ligiert. Der so neu
25 entstandene Plasmid-Vektor „pcDNA 3 (-) 6.1 C HIS A“ wurde mit dem Transfektionsreagenz „Superfect“ (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Angaben des Herstellers in HEK 293 transfiziert. Nach Selektion der „positiven“ Zellen mit 800 µg/ml G418 in MEM Medium (#M4528, Sigma, München, Deutschland) + 10% FCS, 2 mM L-Glutamin, 100
30 U/ml Pennicillin/Streptavidin (Invitrogen, Carlsbad, USA) wurden serielle Verdünnungen der Zellsuspension hergestellt, so dass ausgehend von einem Einzelklon die Zelllinie „293/6.1 sRAGE His 6“ identifiziert werden konnte.

Die Identität der sRAGE Expression und Sekretion des Proteins ins Kulturmedium wurde im Western Blot mit RAGE-spezifischen Antikörpern (Santa Cruz; # sc5563) überprüft.
35

Zur Protein-Produktion wurde diese Zelllinie in 4 X 20 l Wannenstapel in serumhaltigen MEM (s.o.) angezogen. Die Zellen wurden dann in serumfreien Medium Pro293a-CDM

(#12-764Q, BioWhittaker, Vervier, Belgien) bei 37 °C für 3 Tage kultiviert, bevor der Mediumüberstand abgenommen und über „Hemoflow F-Series High-Flux“ Säulen (Fresenius Medical Care AG, Bad Homburg, Deutschland) auf 1400 ml aufkonzentriert wurde.

5

Die Proteinaufreinigung erfolgte über „Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography (IMAC) und wurde von der Firma Diarect AG (Freiburg, Deutschland) durchgeführt. Als NiNTA Säulenmaterial wurde „chelating sepharose FF“ (Amersham-Bioscience, Uppsala, Schweden) eingesetzt. Äquilibrierung, Bindung an die Säulenmatrix und Aufreinigung erfolgten gemäß den Herstellerangaben. Die Elution des Proteins erfolgte stufenweise mit steigenden Imidazol-Konzentrationen. Die verschiedenen Fraktionen wurden im Western Blot mit anti-HIS Antikörpern auf den Gehalt an sRAGE Protein überprüft. Das gereinigte sRAGE Protein (Genbank Ref. Seq. Sequenz NM_001136) eluierte spezifisch bei 250–500 mM Imidazol. Die so gewonnenen Fraktionen wurden vereinigt, aufkonzentriert und dreimal gegen PBS dialysiert (2 x 4h, 1 x 16 h).

10

15

b) Herstellung von N-terminal verkürztem sRAGE (sRAGE 102-331) (SEQ ID NO:34)
Ausgehend von dem Plasmid „pcDNA3/RAGE 2.6“ (vgl. Herstellungsbeispiel 3a) wurde mit den Primern

20

„N-trunc HindIII“: *CGA AGC TTG ATG AAC AGG AAT GGA AAG GAG ACC AAG*
(SEQ ID NO:35)
und

25

„N-trunc XhoI“: *TCC TCG AGC ACC TGC AGT TGG CCC CTC CTC GCC T*
(SEQ ID NO:36)

die cDNA der N-terminal verkürzten RAGE-Ektodomäne amplifiziert. Nach Gelaufreinigung mit dem QIAquick Gelextraction Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) wurde die cDNA mit den Restriktionsendonucleasen HindIII und XhoI geschnitten, um nach erneuter Gelaufreinigung in den ebenfalls HindIII/XhoI geschnittenen Vektor psecTAG 2A (Invitrogen, Carlsbad, USA) ligiert zu werden. Nach Transformation in E.coli „TOP10 One Shot“ Zellen (Invitrogen, Carlsbad, USA) wurde ein positiver rekombinanter Klon amplifiziert, die Sequenz verifiziert und die Plasmid-DNA mit dem Plasmid Mini-Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) isoliert.

30

35

Der so neu entstandene Plasmid-Vektor „psecTAG/N-C trunc sRAGE1“ wurde mit dem „FreeStyle“ Transfectionssystem (Invitrogen, Carlsbad, USA) nach Herstellerangaben

exprimiert. Nach 96 Stunden wurden die Zellen abzentrifugiert und der serum-freie Überstand (60 ml) zur Proteinaufreinigung eingesetzt.

Die Proteinaufreinigung erfolgte über „Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography (IMAC) durchgeführt. Als NiNTA Säulenmaterial wurde „NI-NTA-Superflow“ (Qiagen, Hilden, Deutschland) eingesetzt. Gemäß den Herstellerangaben erfolgte Äquilibrierung und Bindung an die Säulenmatrix. Die Elution des Proteins erfolgte im Elutionspuffer [PBS, 160 mM NaCl, 150 mM Imidazol, pH 8.0]. Die verschiedenen Fraktionen wurden im PAGE auf den Gehalt an N-C truncated sRAGE Protein überprüft. Die ersten drei Fraktionen á 250 µl wurden vereinigt, aufkonzentriert und gegen TBS dialysiert. Die endgültige Proteinkonzentration wurde photometrisch bestimmt.

Herstellungsbeispiel 4: sRAGE Peptidfragmente

Die folgenden Peptide wurden nach Standardmethoden der Peptidsynthese hergestellt:

NtermR31: QNITARIGEPLVLKCKGAPKKPPQRLEWKLN (SEQ ID NO:6)

NtermR13: CKGAPKKPPQRLE (SEQ ID NO:3)

ScraNtermR31: APLACPRELIKGKWEVKPKRNPKNQLTIGQL (SEQ ID NO:7)

ScraNtermR13: GKPRAPKCLKPEQ (SEQ ID NO:8)

Herstellungsbeispiel 5: Herstellung von His-NogoR Fusionsprotein

Grundlage für die Expression und Aufreinigung von rekombinanten His-NogoR Fusionsprotein (Genbank:NM_023004) war die stabil mit dem Vektor „pcDNA4/hNogoR-TM6“ transfizierte HEK 293 Zelllinie „CHO“

Im Folgenden wird zunächst die Herstellung dieser Zelllinie beschrieben: Molekularbiologische Standardtechniken wurden gemäß Sambrook and Russel (2001) durchgeführt.

Ausgangspunkt für die Herstellung des NgR-HIS Expressionsplasmids war der bei der RZPD GmbH (Berlin, Deutschland) käuflich erworbene cDNA Klon *pOTB7 I-RALp962L1427Q2*. Aus der Plasmid-DNA wurde mittels PCR unter Verwendung der Oligonukleotidprimern:

hNogoR Hind III: CCAAGCTTATGAAGAGGGCGTCCGCTGGAGGGAG (SEQ ID NO:29)

hNogoR Eco RI –TM: CCGAATTCTAGGGCACCTGAGCCTTCTGAGTCACC (SEQ ID NO:30)

die gewünschte kodierende Nukleotidssequenz amplifiziert.

5

Nach Gelaufreinigung mit dem QIAquick Gelextraction Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) wurde die cDNA mit den Restriktionsendonucleasen HindIII und EcoRI geschnitten, um nach erneuter Gelaufreinigung in den ebenfalls HindIII/EcoRI geschnittenen Vektor pcDNA4/MycHIS A (Invitrogen, Carlsbad, USA) ligiert zu werden.

10 Nach Transformation in E.coli Top10 One Shot Zellen (Invitrogen, Carlsbad, USA) wurde ein positiver rekombinanter Klon amplifiziert, die Sequenz verifiziert und die Plasmid-DNA mit dem Plasmid Mini-Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) isoliert.

Der so neu entstandene Plasmid-Vektor „pcDNA4/hNogoR-TM6“ wurde mit dem
15 Transfektionsreagenz „Fugene 6“ (Roche, Mannheim, Deutschland) nach Angaben des Herstellers in CHO-K1 transfiziert. Nach Selektion der „positiven“ Zellen mit 800 µg/ml G418 in MEM Medium (#M4528, Sigma, München, Deutschland) enthaltend 10% FCS, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin/Streptavidin (Invitrogen, Carlsbad, USA) wurden serielle Verdünnungen der Zellsuspension hergestellt, so dass ausgehend von einem
20 Einzelklon die Zelllinie „CHO-K1/“ identifiziert werden konnte.

Die Identität der Nogo-Rezeptor Expression und Sekretion des Proteins ins Kulturmedium wurde im Dot Blot mit anti-HIS spezifischen Antikörpern (#1922416, Roche, Mannheim, Deutschland) überprüft.

25

Der Zellklon wurde unter normalen Zellkulturbedingungen vermehrt und in einen Wannenstapel eingesät. Nach 21 Tagen des Wachstums unter FCS wurde das Medium durch frisches serumfreies Medium ersetzt. Nach 3 Tagen wurden 40 Liter serumfreier Zellkulturüberstand gewonnen. Dieser Überstand wurde mit Hilfe einer Fresenius Hemoflow F60 auf 1 Liter konzentriert (Faktor 40). Anschließend wurden 50ml Ni-NTA-Superflow Beads (Qiagen, Hilden), welche mit PBS voräquilibriert waren, zu dem Konzentrat gegeben und bei 4°C für 3 Stunden gerührt. Die Beads wurden durch Abstellen des Rührers sedimentiert (über Nacht bei 4°C), der Überstand wurde verworfen und die Ni-NTA Beads in eine Säule gefüllt. Die Beads wurden bei Raumtemperatur mit
30 drei Säulenvolumen 20mM Na-Phosphatpuffer, 300mM NaCl pH8.0 gewaschen. Anschließend erfolgten Waschschrte mit 5 Säulenvolumen 20mM Na-Phosphatpuffer, 300mM NaCl, 10mM Imidazole pH8.0. Eluiert wurde der gebundene Hexa-His-getaggte NgR mit 20mM Na-Phosphatpuffer, 300mM NaCl, 100mM Imidazole pH8.0. Das Eluat wurde über Nacht gegen 25mM Tris/HCl pH7.0 dialysiert. Das Dialysat wurde

bei Raumtemperatur auf eine Q-Sepharose Säule (Amersham Biosciences, 1.6 x 3cm ; Volumen 6ml) gegeben. Anschließend wurde mit folgenden Puffern gearbeitet:

Puffer A : 50mM Tris/HCl ; pH7.0;

5 Puffer B : 50mM Tris/HCl ; 1M NaCl ; pH7.0

Mit einem Fluß von 2ml / min wurde mit folgendem Gradienten eluiert:

0% Puffer B für 5 Säulenvolumen; 0-50% Puffer B in 12 Säulenvolumen; 50-100% Puffer B in 2 Säulenvolumen, sowie 100% Puffer B in 5 Säulenvolumen.

10

Pro Säulenvolumen wurden zwei Fraktionen gewonnen. Diese wurden durch Standard SDS-Gelelektrophorese analysiert. Fraktionen mit der höchsten NgR-Reinheit wurden für den Anteil des hochglykosylierten Rezeptors (Molekulargewicht ca. 110.000-120.000), sowie für den Anteil des niedrigglykosylierten Rezeptors (Molekulargewicht ca. 75.000-90.000) vereinigt. Die vereinigten Fraktionen wurden gegen 20mM Na-Phosphatpuffer, 140mM NaCl pH 7.4 bei 4°C über Nacht dialysiert. Die Dialysate wurden anschließend durch einen 0.2µm Sterilfilter filtriert und bei 4°C aufbewahrt.

15

Herstellungsbeispiel 6: Herstellung eines monoklonalen Anti-NtermR31 Antikörpers

20

Für die Erzeugung monoklonaler Antikörper gegen NtermR31 wurde die folgende Strategie gewählt. Als Immunogen wurde das Peptid an bovines Thyroglobulin (BTG, Sigma, T-1001) konjugiert, welches Maleimidgruppen (abgeleitet von Sulfosuccinimidyl 4-(N-maleimidomethyl)-cyclohexan-1-carboxylat) trägt. Für die Detektion von erzeugten Anti-Peptid-Antikörpern wurde dasselbe Peptid, konjugiert an Rinderserumalbumin (BSA, Sigma, A-7906) welches ebenfalls Maleimidgruppen (abgeleitet von Succinimidyl-6-[(β-maleimidopropionamido)hexanoat]) unterschiedlicher chemischer Struktur trägt. Die Konjugation des gleichen Peptids an zwei verschiedene hochmolekulare Träger über zwei verschiedene Vernetzer erlaubt die Selektion monoklonaler Antikörper mit Spezifität gegen das Peptid.

25

30

a) Herstellung des Immunisierungsantigens

35 NtermR31 wurde an BTG unter Verwendung des Sulfhydrylgruppen-reaktiven heterobifunktionellen Vernetzers Sulfosuccinimidyl 4-(N-maleimidomethyl)-cyclohexan-1-

carboxylat (Sulfo-SMCC) konjugiert. Die Konjugation erfolgte unter Anwendung der folgenden zweistufigen Methode.

1. Maleylierung des Trägerproteins

5

4 mg Sulfo-SMCC in Wasser (10 mg/ml) wurden zu 2 ml der Trägerproteinlösung (10 mg/ml) in HEPES-gepufferter Kochsalzlösung (20 mM HEPES-Na, 150 mM NaCl, pH 7.5) bei 4°C gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 30 Minuten bei 4°C und anschließend weitere 30 Minuten bei 25°C inkubiert. Nach Inkubation wurde das Reaktionsgemisch auf einer Säule mit Sephadex G-50 (1,5x14 cm), äquilibriert mit dem gleichen Puffer, entsalzt. Nach dem Entsalzen erhielt man 8 ml der maleylierten BTG-Lösung in einer Konzentration von 2,5 mg/ml.

10

2. Kupplung von maleyliertem BTG an das Peptid NtermR31

15

1,2 ml einer Lösung des Peptids NtermR31 (10 mg/ml) in HEPES-gepufferter Kochsalzlösung wurden zu 5 ml der maleylierten BTG-Lösung (2,5 mg/ml) im gleichen Puffer gegeben und 2 Stunden bei 4°C und anschließend 4 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nicht umgesetzte Maleimidgruppen wurden mit 2-Mercaptoethanol in einer Endkonzentration von 10 mM und Inkubation über Nacht blockiert. Anschließend wurde gegen Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS, 10 mM Natriumphosphat, 150 mM Natriumchlorid, pH 7.2) bei 4°C und viermaligem Pufferwechsel dialysiert (MW Ausschluss 10.000).

20

25 b) Herstellung des ELISA-Antigens

Das Peptid NtermR31 wurde unter Verwendung des Sulfhydrylgruppen-reaktiven heterobifunktionellen Vernetzers Succinimidyl-6-[(β -maleimido-propionamido)hexanoat] (SMPH) an BSA konjugiert. Die Konjugation erfolgte nach folgender zweistufiger Methode.

30

1. Maleylierung des Trägerproteins

4 mg SMPH in Wasser (10 mg/ml) wurden zu 2 ml der Trägerproteinlösung (10 mg/ml) in HEPES-gepufferter Kochsalzlösung (20 mM HEPES-Na, 150 mM NaCl, pH 7,5) bei 4°C gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 30 Minuten bei 4°C und anschließend weitere 30 Minuten bei 25°C inkubiert. Nach Inkubation wurde das Reaktionsgemisch auf einer Säule mit Sephadex G-50 (1,5x14 cm), äquiliert mit dem gleichen Puffer, entsalzt. Nach dem Entsalzen erhielt man 8 ml der maleylierten BSA-Lösung in einer Konzentration von 2,5 mg/ml.

2. Kupplung von maleyliertem BSA an NtermR31

10

1,2 ml einer Lösung des Peptids NtermR31 (10 mg/ml) in HEPES-gepufferter Kochsalzlösung wurden zu 5 ml der maleylierten BSA-Lösung (2,5 mg/ml) im gleichen Puffer gegeben und 2 Stunden bei 4°C, und anschließend 4 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nicht umgesetzte Maleimidgruppen wurden mit 2-Mercaptoethanol in einer Endkonzentration von 10 mM und Inkubation über Nacht blockiert. Anschließend wurde gegen Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS, 10 mM Natriumphosphat, 150 mM Natriumchlorid, pH 7.2) bei 4°C und viermaligem Pufferwechsel dialysiert (MW Ausschluss 10.000).

20 c) Immunisierung

5 Mäuse (8 Wochen alt) wurden durch Injektion mit 100 µg BTG-Peptidkonjugat, emulgiert in komplettem Freud'schen Adjuvans (Sigma, F-5881), behandelt. Die Injektion erfolgte in den Peritonealraum 90 Tage vor Fusion. Sämtliche anderen Injektionen wurden nach folgendem Schema in den Peritonealraum verabreicht. Inkomplettes Freud'sches Adjuvans von Sigma (Katalognummer F-5506) wurde verwendet.

Immunisierung	Tage vor Fusion	Antigenmenge µg	Adjuvans
1	90	100	Komplett
2	60	100	Inkomplett
3	30	100	Inkomplett
4	15	100	W/o Adjuvans
5	7	200	W/o Adjuvans
6	4	200	W/o Adjuvans

d) Myelomzelllinie

Als Myelomzelllinie wurde SP2/0-Ag14 von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen verwendet. Die Zellen synthetisieren oder sezernieren keine Immunglobulinketten, sie sind resistent gegen Azaguanin (8-AZG, 20 µg/ml), wachsen
5 nicht in HAT (Hypoxantin 10^{-4} M, Aminopterin 10^{-5} M und Thymidin 4×10^{-5} M)-Medium. Die SP2/0 Zellen wurden in Gewebekulturkolben in Standardkulturmedium (DMEM + 10% fötales Kälberserum (FCS) supplementiert mit 20 µg/ml 8-AZG, um HGPRT+ Revertanten abzutöten) kultiviert. Eine Woche vor der Fusion wurden die SP2/0 Zellen in
10 Standardkulturmedium ohne 8-AZG gehalten.

e) Zellfusionierung und Plattierung

Drei Milzorgane von immunisierten Mäusen wurden aseptisch entfernt und zerkleinert.
15 Einzelzellsuspensionen wurden daraus hergestellt. Die Milzlymphozyten wurden mit der SP2/0 Myelomzelllinie (Verhältnis: 5 Lymphozyten/1 SP2/0) in Gegenwart von Polyethylenglycol 3350 fusioniert. Die auf diese Weise produzierten Zellen wurden in DMEM, enthaltend HAT und 20% FCS resuspendiert. Die Zellen wurden in acht 96er Gewebekulturplatten (Corning Costar) ausplattiert, welche Zellen von Peritoneal-
20 Exsudat als Feeder-Schicht enthielten. Die Platten wurden 10 Tage bei 37°C in feuchter Atmosphäre, enthaltend 5% Kohlendioxid, inkubiert. Während dieser Phase wurden die Zellen zweimal mit HAT Medium gefüttert.

Ein Teil der Milzzellsuspension wurde 10 Tage in einem T-Kolben kultiviert.
25

f) Screening Assay

Ein indirekter ELISA, ausgelegt für die Detektion von IgG, wurde für das Screening der Zellkulturüberstände eingesetzt. Die Tests wurden in flachbödigen Polystyrol-
30 Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen (Greiner, Cat.# 756071) wie folgt durchgeführt: 100 µl Aliquots einer Lösung aus 0,5 M Carbonat/Bicarbonatpuffer, pH 9,6, enthaltend 4 µg/ml BSA – NtermR31 Konjugat (bezogen auf BSA) wurde jeder Vertiefung der Platte zugegeben. Nach Inkubation über Nacht in einer Feuchtkammer bei 4°C wurden die Platten viermal mit Tris-gepufferter Kochsalzlösung (TBS, 50 mM Tris, 500 mM NaCl,

pH 7,8), enthaltend 0,01% Triton X-100 (Waschpuffer) gewaschen und mit 200 µl/Vertiefung 2%iger Gelatine (aus Kaltwasserfisch-Haut, Sigma G-7765) in TBS (Blockierungspuffer) 1 Stunde bei Raumtemperatur (RT) blockiert. Die Platten wurden mit Waschpuffer gewaschen und 100 µl Zellkulturüberstand wurde den jeweiligen Vertiefungen zugesetzt. Der Zellkulturüberstand von SP2/0 Myelomzellen wurde als negative Kontrolle verwendet. Der Splenozyten-Zellkulturüberstand wurde als positive Kontrolle verwendet.

Die Platten wurden 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach mehreren Waschschritten wurden die ELISA-Platten mit Ziege-Anti-Maus IgG (Maus Fc-spezifisch), konjugiert mit alkalischer Phosphatase (Sigma, A-2429) (50 µl/Vertiefung, verdünnt in Blockierungspuffer, 1:5000) 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem weiteren Waschschriff wurde den Platten 150 µl/Vertiefung Substratpuffer (2 mM 4-Nitrophenylphosphat (SIGMA, N3254) in 5% Diethanolamin + 0,5 mM MgCl₂, pH 9,8) zugesetzt. Die Substratumsetzung wurde in einem 12-Kanal Dynex Opsys MR Mikropplattenlesegerät bei einer Wellenlänge von 405 nm detektiert.

g) Selektion stabiler Antikörperproduzenten

Das Erstscreening wurde 10 Tage nach der Fusion durchgeführt. Zellen aus positiven IgG-produzierenden Vertiefungen wurden in Vertiefungen von Platten mit 24 Vertiefungen überführt und 4 Tage kultiviert. Ein ELISA für BSA-NtermR31 zur Bestimmung von Kulturen, welche den interessierenden Antikörper produzieren, wurde durchgeführt. Dieses Vermehrungsverfahren wurde zweimal nach 3 und nach 5 Tagen wiederholt. So wurde unter anderem ein anti-NtermR31 Ab mit der internen Bezeichnung „Clone 37“ isoliert.

h) Cryokonservierung der Hybridomzellen

Ein Aliquot der jeweiligen Hybridome wurde in 1,0 ml Gefriermedium (90% (v/v) FCS, 10% (v/v) Dimethylsulfoxid) resuspendiert und in Gefriertuben überführt. Dann wurden die Gefäße sofort in eine Kühlkammer (Kühlrate 1°C pro Minute) überführt. Nach Erreichen einer Temperatur von unter -60°C wurden die Zellen in Flüssigstickstoff zur Lagerung überführt.

III. Ausführungsbeispiele

Ausführungsbeispiel 1: ELISA-Messung von Autoantikörpern gegen das N-terminale Peptid NtermR 31 von sRAGE in humanem Plasma

a) Materialien:

- Mikrotiterplatten: SigmaScreen; Streptavidin Coated Plate (Sigma, M-4058; 96-well (black));
- Nterm 31 (SEQ ID NO:6) (umfassend 31 N-terminale Aminosäuren des reifen RAGE ohne Leader-Peptid), biotinyliert von Fa. Thermo Electron GmbH; Ulm; OR183539/2), gelöst, 3,9 mg/ml; weiterverdünnt zur Anwendung auf 1 µg/ml in TBS, 0,1% Tween20; 0,1% BSA
- Waschpuffer: TBS 0,1% Tween20
- TBS, Tris buffered Saline, : 20 mM Tris pH 7,4; 0,9% NaCl
- Substrat: 4-Nitrophenylphosphat: Fa. Roche; Nr. 726923; eine Tablette in 100 ml 100 mM Tris/HCl pH 9,8 gelöst
- Antikörper:
 - o Ziege-Anti-Kaninchen IgG (whole molecule), konjugiert mit alkalischer Phosphatase (AP-Conjugate); Fa. Sigma A-3812; Verdünnung im ELISA 1: 5000 in TBS 0,1% Tween20; 0,1% BSA
 - o Ziege-Anti-Human IgG (Fc specific); konjugiert mit alkalischer Phosphatase (AP-Conjugate); Fa. Sigma A-9544, Verdünnung im ELISA 1: 5000 in TBS 0,1% Tween20; 0,1% BSA
 - o Polyklonales Antiserum von Kaninchen, welches mehrfach mit dem Peptid immunisiert worden war = Anti-31mer-8508; (Tier 6304), 20 ml vom 8.6.2004; versetzt mit 0,02% Thimerosal (Rabbit polyclonal AB 1:500); Die Immunisierung und Gewinnung des Serums wurden von der Firma Bio-Trend (Köln, Deutschland) durchgeführt.
 - o Plasmen von Alzheimer Demenz (AD) Patienten wurden von Prof. Henn (Zentralinstitut für die seelische Gesundheit, Mannheim) erhalten:
Non AD control; weiblich: Kontrollplasma;
Plasmen von Patienten: AP23 MCIF06.7 weiblich; LAP30 Alzheimer Dementia weiblich 00.0 early onset; LAP39 MCI F06.7 weiblich; LAP45 MCI F06.7 männlich; LAP53 MCI F06.7 weiblich; LAP60 Alzheimer Dementia late onset männlich.

Die Proben wurden weiterverdünnt im ELISA in TBS 0,1% Tween20; 0,1% BSA

b) Versuchsdurchführung:

5 Je 100 µl des verdünnten NtermR31 Peptids wurde in jeden Napf der Mikrotiterplatte pipettiert. Anschließend wurde für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Der Überstand wurde verworfen, die Platten wurden je dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Je 100 µl des Kaninchenserums (Positivkontrolle) oder der verschiedenen Plasmen wurden pro Napf in verschiedenen Verdünnungen für je 3 Stunden bei Raumtemperatur in den Platten inkubiert. Der Überstand wurde verworfen, die Platten wurden je dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurden pro Napf je 100 µl der entsprechenden Enzym-markierten Antikörper (Anti-human für die humanen Plasmaproben; Anti-Kaninchen für das Kaninchen Antiserum) pipettiert und für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde erneut je dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Jeder Napf erhielt dann 100 µl der Substratlösung. Nach einer Entwicklungszeit von ca. 10 Minuten wurde die Enzymreaktion durch Zugabe von 50µl 1 M NaOH pro Napf gestoppt. Die Flüssigkeit aus den Näpfen wurde in eine durchsichtige Mikrotiterplatte (flexible plate; Fa. Falcon Nr. 353912) überführt. Die Absorption in den Näpfen der Mikrotiterplatte wurde in einem entsprechenden Photometer bei 405 nm gemessen.

20 c) Ergebnisse:

Im Serum des immunisierten Kaninchens waren Antikörper gegen das N-terminale Peptid mit Hilfe dieses ELISA nachweisbar (vgl. Figur 5). Der ELISA ist daher zum Nachweis von Antikörpern gegen das N-terminale Peptid NtermR31 von humanem RAGE geeignet.

Die mit verschiedenen Patientenseren erhaltene Ergebnisse sind in Figur 6 dargestellt. Gezeigt ist das Verhältnis der Absorptionswerte bei einer Verdünnung der Plasmen von 1:3. In Plasma von Alzheimerpatienten mit einem frühen Ausbruch (early onset) zeigt sich eine Verdopplung der Reaktion. Dementsprechend sind in diesem Plasma deutlich mehr Antikörper gegen das N-terminale RAGE-Peptid NtermR31 nachzuweisen.

35 **Ausführungsbeispiel 2: Charakterisierung des polyklonalen anti-NtermR31 Serums und eines monoklonalen anti-NtermR31 Antikörpers**

a) Materialien

- Nitrocellulose-Membranen (0,45 µm Porengröße, # LC2001, Firma: Invitrogen)

- Blockierungsreagenz (Roche Applied Science; # 1921673)
- NBT/BCIP Lösung (1 Tablette auf 10ml H₂O; Roche Applied Science, # 1697 471)
- Protein/Peptidproben
- 5 NtermR31 (s.o.)
- ScraNtermR31 (s.o.)
- ScraNtermR13 (s.o.) NtermR13 (s.o.) sRAGE-6xHIS (AA 23-352, NP_001127)
- human sRAGE/Fc (R&D Systems; #1145-RG; AA 1-344)
- human sRAGE/Fc (AA 1-130)
- 10 mouse sRAGE (R&D Systems; # Custom03)
- rat sRAGE/Fc (R&D Systems; #1616-RG; AA 1-342)
- Antikörper
- polyklonales anti-NtermR31 Serum und Präimmunserum bezogen über die Firma Biotrend (Köln, Deutschland) (vgl. Ausführungsbeispiel 1),
- 15 sekundären Antikörper Shp X Rb IgG AlkPhos (Chemikon, # AP304A)

b) Versuchsdurchführung für polyklonales Serum:

- Die Charakterisierung des polyklonalen anti-NtermR31 Serums wurde mit Hilfe eines
- 20 Dot Blot Verfahrens durchgeführt. Auf Nitrozellulose-Membranen wurden 5 bzw. 50 ng der oben aufgelisteten Protein- bzw. Peptidproben in einem Volumen von 0,5 µl aufgetragen. Die Membran wurde über Nacht bei 4°C in 1 X Blockierungsreagenz blockiert. Die Membranen wurden dann mit Präimmunserum und Antiserum NtermR31 vom Kaninchen 6304 in einer Verdünnung von 1:1000 in 0,5% Blockierungsreagenz für eine
- 25 Stunde inkubiert. Nach drei Waschschritten in 1 X PBS bei Raumtemperatur erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper Shp X Rb IgG AlkPhos für eine Stunde bei Raumtemperatur in 0,5% Blockierungsreagenz. Die Membran wurde erneut 3 X 5 Minuten in PBS gewaschen, bevor mit NBT/BCIP Lösung gefärbt wurde. Die Färbelösung wurde nach Erreichen des gewünschten Signal/Hintergrundverhältnisses abgezogen und die Membranen mit Wasser gespült.
- 30

c) Ergebnisse für polyklonales Serum:

- Das Versuchsergebnis ist in Figur 7a) dargestellt. Das polyklonale anti-NtermR31 Antiserum erkennt, wie zu erwarten, in dem durchgeführten Dot Blot das Peptid NtermR31.
- 35 Auch die Proteine sRAGE-6xHIS (AA 23-352, NP_001127), human sRAGE/Fc (R&D Systems; #1145-RG) und human sRAGE/Fc (1-130 AA) werden mit hoher Empfindlichkeit erkannt, was durch die Färbung von jeweils 5 ng Protein belegt wird. Diese Proteine enthalten jeweils am N-terminalen Teil die komplette Teilsequenz von NtermR31, so

dass auch hier das Ergebnis der Erwartung entspricht. Die hoch konservierten RAGE-Proteine aus Maus und Ratte werden ebenfalls deutlich erkannt, so dass diesem Antiserum eine Kreuzreaktivität mit RAGE aus Maus und Ratte zugeschrieben werden kann.

5

Ein überraschender Befund ist die schlechte bzw. fehlende Detektion des Peptids NtermR13, dass eine Teilsequenz (Kernsequenz) von NtermR31 ist und im homogenen Bindungsassay (AlphaScreen; vgl. unten) die wesentliche Bindungsaktivität aufweist. Eine wahrscheinliche Erklärung für dieses Ergebnis könnte in der bevorzugten Erkennung eines Konformations-Eptiops in NtermR31 durch den polyklonalen Antikörper sein. Nur wenn das Peptid durch intramolekulare Wechselwirkung diese Konformation einnimmt, wird es von dem Antiserum deutlich erkannt. Das kürzere NtermR13 Teilpeptid kann diese räumliche Struktur nicht einnehmen und wird daher nicht erkannt. Die vollständige 31 Aminosäuren umfassende Sequenz oder Peptide welche diese Sequenz enthalten sind daher als Immunogen besonders geeignet.

Eine weitere mögliche Erklärung könnte eine klar unterschiedliche Immunogenität des Peptids NtermR13 im Vergleich mit den nicht überlappenden Bereichen von NtermR31 (Bereich 1-14; Bereich 28-31) sein. Eine Analyse der Peptidsequenz mit dem Software Paket Abie Pro 3.0 (ChangBioscience.com), das für die Selektion von antigenen Peptidsequenzen zur Antikörperproduktion eingesetzt wird, widerspricht jedoch dieser Erklärung. Die Analyse von NtermR31 mit Abie Pro 3.0 zeigt, dass vier 13-mer Peptide mit guten antigenen Eigenschaften vorhergesagt werden, wobei ein Peptid exakt der Sequenz NtermR13 entspricht. Die drei anderen Peptide sind jeweils um eine Aminosäure N-terminal versetzt, so dass auch hier jeweils eine große Überlappung mit NtermR13 gegeben ist. Eine deutlich schlechtere Immunogenität von NtermR13 ist daher eher unwahrscheinlich und die Hypothese der 3D Konformation ist als die wahrscheinliche anzusehen. Diese Konformation kann ebenfalls nicht von den „srambled“ Peptiden eingenommen werden, was deren Nichterkennung im Western-dot-blot erklärt.

30

d) Versuchsdurchführung für monoklonalen anti-NtermR31 Antikörper

Die Charakterisierung des monoklonalen anti NtermR31 Antikörper aus dem Zellkulturüberstand „Clone 37“ wurde mit Hilfe eines Dot Blot Verfahrens durchgeführt. Auf Nitrozellulose-Membranen (0,45 µm Porengröße, # LC2001, Firma: Invitrogen) wurden 5 bzw. 50 ng der oben aufgelisteten Protein- bzw. Peptidproben im Triplikat in einem Volumen von 0,5 µl aufgetragen. Die Membran wurde über Nacht bei 4°C in 1 X Blockierungsreagenz (Roche Applied Science; # 1921673) blockiert. Die Membranen wur-

35

den dann mit Zellkulturüberstand, bezogen über die Firma Biotrend (Köln, Deutschland), in einer Verdünnung von 1:10 in 0,5% Blockierungsreagenz (Roche Applied Science; # 1921673) eine Stunde inkubiert. Nach drei Waschschritten in 1 X PBS bei Raumtemperatur erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper Shp X Ms IgG F(ab')₂ AP (Chemikon, # AQ330A) für eine Stunde bei Raumtemperatur in einer 1:5000 Verdünnung in 0,5% Blockierungsreagenz. Die Membran wurde erneut 3 X 5 Minuten in PBS gewaschen, bevor mit NBT/BCIP Lösung (1 Tablette auf 10ml H₂O; Roche Applied Science, # 1697 471) gefärbt wurde. Die Färbelösung wurde nach Erreichen des gewünschten Signal/Hintergrundverhältnisses abgezogen und die Membranen mit Wasser gespült.

e) Ergebnisse für monoklonalem Antikörper:
Die Ergebnisse sind in Figur 7 b dargestellt. Diese zeigt, dass die Spezifität von anti-NtermR31 mAb vergleichbar ist zum polyklonalen Kaninchenantiserum (Erkennung von NtermR31, keine Reaktion auf scrambled-Kontrollen und NtermR13, sowie Spezieskreuzreaktion zwischen Mensch, Ratte, Maus).

Ausführungsbeispiel 3: AlphaScreen-Messung der sRAGE Interaktion mit den Peptiden NtermR31 bzw. NtermR13

a) Materialien

Für die Messung der NtermR31 bzw. NtermR13 Bindung an den RAGE Rezeptor wurde das AlphaScreen™ System (Bestell Nummer: 6760610M) von der Firma Perkin Elmer (Shelton, CT, USA) eingesetzt.

NtermR13 biotinyliert (Thermo Electron, Ulm)

NtermR31 biotinyliert (Thermo Electron, Ulm)

b) Versuchsdurchführung

Der gesamte homogene Assay wurde in 25 mM HEPES, 100 mM NaCl pH 7,4 und 0,1% BSA im 20 µl Volumen durchgeführt. Der Ansatz enthielt 2,5 ng/µl des Fusionsproteins sRAGE-6xHIS (Aminosäuren 23-352, NP_001127), 20 ng/µl Anti-HIS Acceptor-Beads, 20 ng/µl Streptavidin Donor-Beads und NtermR13 bzw. NtermR31 Peptide in den Konzentrationen 0,1,5,10,25,50,100,150 und 300 nM.

Die Einzelkomponenten wurden in einer definierten zeitlichen Reihenfolge zusammengebracht: Zunächst wurde sRAGE 6xHIS für 30 Minuten mit den Acceptor-Beads inkubiert.

biert. Die verschiedenen Peptidmengen wurden dann zugesetzt, um nach weiteren 30 Minuten die Donor-Beads hinzuzugeben. Nach weiteren 60 Minuten erfolgte die Fluoreszenzmessung im AlphaQuest Gerät der Firma Perkin-Elmer mit einer Zeitverzögerung von einer Sekunde. Jeder Messpunkt wurde als Triplikat bestimmt. Die Auswertung und grafische Aufarbeitung der Ergebnisse erfolgten mit dem Softwarepaket GraphPrism 4.0.

c) Ergebnisse

- Die Ergebnisse sind in Figur 8 dargestellt. Die Peptide NtermR31 und NtermR13 binden in dem hier beschriebenen Versuch mit hoher Affinität an sRAGE Protein. Die ermittelten EC_{50} Werte im AlphaScreen Bindungsassay liegen bei 62 bzw. 66 nM.

Ausführungsbeispiel 4: AlphaScreen-Messung der sRAGE Interaktion mit Kontrollpeptiden

a) Materialien

Für die Messung der Bindung an den RAGE Rezeptor wurde das AlphaScreen™ System (Bestell Nummer:6760610M) von der Firma Perkin Elmer (Shelton, CT, USA) eingesetzt.

Folgende Peptide wurden in biotinylierter Form eingesetzt:

- Amyloid A β -1-42 Oligomer (hergestellt gemäß WO 2004 067561)
 Scrambled NtermR13: G K P R A P K C L K P E Q
 NtermR13: C K G A P K K P P Q R L E
 AlterCharge1: F S R I R A T H W R V D G
 Non-polar: F P V I P A L F W I V L M
 Plus7: R L K R G H A
 Minus7: E T E D S D T

Unterstrichen: positiv geladene Aminosäuren

Kursiv: negativ geladene Aminosäure

b) Versuchsdurchführung

Der Assay wurde nach Vorschrift des Herstellers und in 25 mM HEPES, 100 mM NaCl pH 7,4 und 0,1% BSA im 20 μ l Volumen durchgeführt. Der Ansatz enthielt 2,5 ng/ μ l

des Fusionsproteins sRAGE-6xHIS (Aminosäuren 23-352, NP_001127), 20 ng/μl Anti-HIS Acceptor-Beads, 20 ng/μl Streptavidin Donor-Beads und die biotinylierten Peptide in den Konzentrationen 0, 10, 30, 100, und 300 nM. Die Peptide, mit Ausnahme von Aβ 1-42 Oligomeren, wurden bei 50°C für 10 Minuten unmittelbar vor dem Versuch erhitzt, um mögliche Aggregationen zu lösen.

Die Einzelkomponenten wurden in einer definierten zeitlichen Reihenfolge zusammengebracht: Zunächst wurde sRAGE 6xHIS für 30 Minuten mit den Acceptor-Beads inkubiert. Die verschiedenen Peptidmengen wurden dann zugesetzt, um nach weiteren 30 Minuten die Donor-Beads hinzuzugeben. Nach weiteren 60 Minuten erfolgte die Fluoreszenzmessung im AlphaQuest Gerät der Firma Perkin-Elmer mit einer Zeitverzögerung von einer Sekunde. Jeder Messpunkt wurde als Triplikat bestimmt. Die Auswertung und grafische Aufarbeitung der Ergebnisse erfolgten mit dem Softwarepaket GraphPrims 4.0.

c) Ergebnisse:

Die Versuchsergebnisse sind in Figur 9 dargestellt. Die in diesem Versuch eingesetzten Kontrollpeptide sollen die Natur der Bindung von NtermR31 bzw. NtermR13 an RAGE aufklären. Als positive Kontrolle diente die Bindung von Aβ Oligomer an RAGE.

Sowohl das völlig unpolare und neutrale Peptid „Unpol13“ als auch das negativ geladene Peptid „Minus7“ binden in dem Experiment nicht an den Rezeptor, wie die niedrigen kaum sichtbaren Kurven für diese Peptide (Verlauf auf der X –Achse) belegen. Die Hypothese, dass positive Ladungen für die Bindung notwendig sind wird durch die Peptide „ScraNtermR13“, „AlterCharge1“ und „Plus7“ eindrucksvoll bestätigt. Die größte Ladungsdichte besitzt das Heptamer Plus7, was zusammen mit ScraNtermR13 die höchste maximale Signalstärke in dem Versuch erreicht. ScraNtermR13 ist aus den gleichen Aminosäuren aufgebaut wie NtermR13, jedoch in willkürlicher Abfolge. Da diese Kontrolle mit gleicher bzw. leicht höherer Affinität an sRAGE bindet, ist die Aminosäuresequenz nach der derzeitigen Datenlage nur insofern von Relevanz, als dass positive Ladungen in einer bestimmten Dichte vorhanden sein müssen. Dass noch nicht einmal die spezifische Kombination der positiven Ladungsträger für die Bindung notwendig ist, wird durch das Peptid AlterCharge1 belegt, was als 13mer vier positive Ladungen trägt, die jedoch nicht wie beim NtermR13 von 3 Lysinen und einem Arginin stammen, sondern von drei Argininen und einem Histidin.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass offenbar für die Bindung an RAGE ionische Peptid/Rezeptorinteraktionen über positive Ladungen in dem Peptid NtermR13

ausreichend sind. Solche positiven Ladungsaggregationen gehen aber nur dann besonders in den Bindungsvorgang ein, wenn sie in einem grösseren Polypeptid mittels einer besonderen 3D-Faltung auf der Oberfläche eines Polypeptids/Proteins z.B. sRAGE, präsentiert werden

5

Ausführungsbeispiel 5: AP-Nogo66 Kompetitions-Assay:

a) Materialien:

10 Mikrotiterplatten (Maxisorb, Nunc)

AttoPhos Substrat (Roche Nr.1681982, Germany)

His-NogoR: exprimiert in CHO-K1 Zellen und nach Aufreinigung mit einer Reinheit > 90% des niedrig glycosylierten Nogo-Rezeptors mit einem Molekulargewicht von 80 kDa in SDS-PAGE

15 AP-Nogo66 (s.o.)

sRAGE (s.o.)

Nterm 31 (s.o.)

NtermR13 (s.o.)

scraNtermR13 (s.o.)

20 scraNtermR31 (s.o.)

b) Versuchsdurchführung:

Mikrotiterplatten (Nunc Maxisorb) wurden mit 0,1 ml einer Lösung von His-NogoR (5
25 µg/ml in Natriumcarbonatpuffer, pH 9) über Nacht bei 4 °C beschichtet. Anschließend wurde ein 1-stündiger Blockierungsschritt mit 2-%-igem Rinderserumalbumin (BSA) in Tris-HCl, pH 7,2, bei Zimmertemperatur durchgeführt. Für Lösungen von His-NogoR, sRAGE und NtermR31 wurden Ausgangskonzentrationen von 200 nM eingestellt. Diese Stammlösungen wurden dann dreifach verdünnt. AP-Nogo66 (3 µg/ml) wurde mit
30 Puffer (Tris-HCl, pH 7,2 und 0,1 % BSA) auf 0,2 nM verdünnt. 0,05 ml AP-Nogo66 (0,2 nM) wurde zu den jeweiligen Verdünnungen der Proteine (0,05 ml) zugesetzt und 90 Minuten bei Umgebungstemperatur inkubiert. Die jeweiligen Endkonzentrationen betrugen: 0,1 nM für AP-Nogo66 und 100, 33,3, 11,1, 3,7, und 1,2 nM für His-NogoR, sRAGE und NtermR31.

35

Nach jedem Inkubationsschritt wurden die Platten mit Waschpuffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,2 und 0,05 % Tween20) gewaschen. Die Bindung von AP-Nogo66 wurde mit dem Substrat AttoPhos (Roche) für die alkalische Phosphatase detektiert und die Fluoreszenzeinheiten mit dem Instrument Polarstar (BMG Labtech, Germany) gemessen. Die

Ergebnisse sind für die Proteine in Figur 10A und für das Peptid Nterm 31 in Figur 10B dargestellt.

c) Ergebnisse:

5

Die Bindung von AP-Nogo66 an den NgR, der auf der Mikrotiterplatte gebunden war, wurde durch den gleichen löslichen Liganden mit einem IC_{50} von 2 nM blockiert. Überraschenderweise verhindert das sRAGE Protein im ähnlichen Konzentrationsbereich mit einem IC_{50} von 3,5 nM die AP-Nogo66 Bindung (Figur 10A). Auch mit dem Peptid

10

NtermR31 (IC_{50} von 50 nM) wurde eine signifikante Blockierung der Bindung von AP-Nogo66 gefunden (Figur 10B).

Ausführungsbeispiel 6: Funktioneller Zytoskelettarrangement (ACR)-Assay

15 a) Materialien:

Hek293 RhoA/NgR/p75 (s.o.)

NtermR13 (s.o.)

NtermR31 (s.o.)

20

sRAGE (s.o.)

AP-Nogo66 (s.o.)

Amphoterin scr; (Thermo Electron, Ulm, DE)

(NH₂Cys(DY555)KSKKVEAVKKAKAGGKPKDRAAYAKEIDKLEKK-COOH)

25

MTP Biocoat Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen

RPME-Glutamax (Invitrogen)

Phalloidin Alexa 568 oder 488 (Molecular Probes, Eugene, USA)

DAPI (Molecular Probes, Eugene, USA)

30

b) Versuchsdurchführung:

1 x 10⁴ Hek293 RhoA/NgR/p75 Zellen wurden in MTP Biocoat Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen zwei Tage vor dem eigentlichen Versuchsbeginn überimpft. Die so erhaltenen Zelllinien wurden mit dem jeweiligen RAGE-Peptid (NtermR13, NtermR31, sRAGE) bei verschiedenen Konzentrationen (0,2 µM, 1µM, 5µM) oder einem Kontrollpeptid (Amphoterin scr; Konz. = 0.2,1, 5 µM) vorinkubiert. Die Stimulation der Zellen erfolgte mit dem NgR-Liganden AP-Nogo-66 (9,6 µg/ml) in Kulturmedium enthaltend 5% FCS. Für jede Versuchsreihe wurde ein unstimulierter Kontrollansatz (ohne AP-Nogo66) hergestellt. Nach einer 5- bis 10-minütigen Stimulationsperiode wurde die Aktivierung

35

mit kalter PBS unterbrochen. Die Zellen wurden mit 3 - 4 %-iger Paraformaldehydlösung fixiert, mit PBS, enthaltend 0,2 % Triton X-100 permeabilisiert und 30 - 45 Minuten mit Phalloidin Alexa 568 oder 488 inkubiert. Zusätzlich erfolgte eine 5 minütige Inkubation mit DAPI zur Kernfärbung. Die Zellen wurden mit Hilfe eines Epifluoreszenzmikroskops (Axiovert 25) visualisiert. Fluoreszenzmikrogramme wurden mit einer gekühlten CCD Kamera von Zeiss aufgenommen und der prozentuale Anteil kontrahierter Zellen, bezogen auf die Gesamtzellzahl ermittelt.

c) Ergebnisse:

10

Die Versuchsergebnisse für NtermR 31 und sRAGE sind in **Figur 11B** dargestellt. Man beobachtet für beide Peptide eine konzentrationsabhängige Verringerung des prozentualen Anteils an kontrahierten HEK-Zellen. Dies zeigt, dass NtermR 31 und sRAGE die NgR-abhängige Stimulation der Zellkontraktion von HEK-Zellen mit zunehmender Konzentration mehr und mehr unterbinden, d.h. die Bindung von Nogo-66 an seinen Rezeptor NgR blockieren. **Figur 11A** zeigt mikroskopische Aufnahmen unstimulierter bzw. mit AP-Nogo66 stimulierter HEK293 RhoA/NgR/p75 Zellen. Der erhöhte Anteil kontrahierter HEK-Zellen nach Stimulation mit AP-Nogo-66 ist deutlich erkennbar.

15

20 **Ausführungsbeispiel 7: FIHC-Analyse mit anti-RAGE in transgenem APP-Mäusehirn**

a) Materialien

25 TBST Waschlösung (Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween 20, 10-fach Konzentrat; DakoCytomation; Glostrup, Dänemark S3306) 1:10 verdünnt mit destilliertem Wasser.

Esel-Serum (Serotec GmbH, Düsseldorf, DE) 5 % in TBST

Primärantikörper:

30 - Kaninchen-anti-RAGE (Abcam, Distributeur: Acris GmbH, Hiddenhaus, DE,; ab3611) 1:200 verdünnt in TBST

- Kaninchen-anti-RAGE (Biotrend; Köln, DE; anti-31-mer-8508), 1:200 verdünnt in TBST; erfindungsgemäßes anti-NtermR31 Serum;

Sekundärantikörper:

35 - Esel-anti-Kaninchen-Cy3 (Jackson Immuno, Distributeur Dianova GmbH, Hamburg, DE), 1:500 verdünnt mit TBST

Vectashield hardset mounting medium (Vector Laboratories; Burlingame, UK H-1400)

- Tg2576 Mäuse (Taconic M&B A/S, Ry, Dänemark), welche das Gen für humanes Amyloid Präkursor Protein (APP) tragen

b) Versuchsdurchführung:

Gefrierschnitte mit einer Dicke von 40 µm, angefertigt vom Gyrus dentatus von Tg2576 Mäusen mit einem Alter von 10 Wochen bzw. 11 Monaten wurden 20 Minuten mit Esel-Serum und über Nacht mit einem der Primärantikörper inkubiert. Nach 3 Waschschritten in TBST-Puffer wurden die Schnitte mit Esel-anti-Kaninchen-Cy3-Sekundärantikörper 60 Minuten inkubiert und abschließend dreimal mit TBST-Puffer gewaschen. Die Schnitte wurden dann auf Superfrost Plus Glasträgern aufgebracht, luftgetrocknet und mit einem Deckglas abgedeckt. Fluorezenzaufnahmen der Dünnschnitte wurden in einem Axioplan Imaging System analysiert. (Mikroskop Axioplan Imaging 2; Fa. Carl Zeiss, Jena, Deutschland).

c) Ergebnisse:

Die Versuchsergebnisse sind in der beiliegenden Figur 12 dargestellt.

APP transgene Mäuse zeigen eine enorme Stimulation von membrangebundenem RAGE zu einen Zeitpunkt, wo noch keine Amyloidplaques gebildet werden. Wenn Amyloid verstärkt gebildet wird und Paques entstehen (ab dem 9-12 Lebensmonat), verschwindet membrangebundenes RAGE zugunsten von löslichem RAGE, welches im Plasma gemessen werden kann. Alte Tiere haben daher besonders hohe sRAGE Plasmaspiegel.

Die Immunhistochemie liefert einen weiteren Beleg dafür, dass das anti-NtermR31-Antiserum (Figur 12b) distinkt ist von kommerziellen anti-RAGE Antiseren, wie dem Abcam Serum (Figur 12a). Die Tatsache, dass das anti-NtermR31 Antiserum auf jungen Tg2576 Tieren im Gegensatz zum Abcam Antiserum nicht färbt, bei den alten Tieren aber vergleichbare Anfärbung zeigt, kann so interpretiert werden, dass das Epitop der AGER-RME nur im Fall von gebundenem Liganden (bei Tg2576 also Amyloid beta) effektiv präsentiert und für Antikörper zugänglich ist. Bei jungen Tg2576 ist allerdings noch nicht viel Amyloid beta gebildet. Die Tiere beginnen laut Literatur (Ujije M et al.: Microcirculation. 2003 Dec;10(6):463-70) erst ab 10 Monaten Alzheimer-Plaques zu bilden, was auf eine gesteigerte Amyloidbildung erst zu späteren Zeitpunkten hinweist und damit die erfindungsgemäße Hypothese zur Immunogenität des AGER-RME untermauert.

Ausführungsbeispiel 8: Nachweis von sRAGE in Mausplasma mittels ELISA**a) Material**

- 5 Mikrotiterplatten (Flexible plate, 96 well, flat bottom, Falcon)
Ziege-Anti-mouse RAGE Antibody; R&D Systems; AF1179
Transgene Mäuse (Tg2576)
Streptavidin-AP Conjugate (Roche, Mannheim, Nr. 1089161)
AttoPhos Substrate Set (Fa. Roche, Mannheim, Nr. 1681982)
10 rekombinantes lösliches Maus-RAGE (Firma R&D Systems, Wiesbaden; Custom03)

b) Versuchsdurchführung:

- Mikrotiterplatten wurden mit je 100µl Antikörperlösung (Ziege-Anti-Maus RAGE;
15 Stammlösung: 100 µg/ml; verdünnt eingesetzt in einer Konzentration von 1µg/ml in 50 mM NaHCO₃) gecoatet über Nacht bei 4°C. Anschließend wurden die Näpfe je dreimal mit TBS / 0,1% Tween 20 gewaschen. Um Adsorptionseffekte zu minimieren wurde mit je 100ml einer 1% BSA-Lösung in TBS / 0,1% Tween20 eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde wie oben beschrieben je dreimal mit TBS / 0,1%
20 Tween 20 gewaschen.

- Als Proben für lösliches Maus RAGE wurde Plasma von 10 Wochen und 12 Monate alten transgenen Mäusen (Tg2576), sowie von Mäusen des nicht transgenen Stammes C57Bl6 eingesetzt. Das Plasma wurde in einer Verdünnung 1:20 in TBS/01% Tween
25 20 in einem Volumen von je 100 µl eingesetzt. Anschließend wurde je dreimal gewaschen wie oben beschrieben. Als Detektionsantikörper wurde je 100 µl eines biotinylierten Ziegen-Anti-Maus RAGE-Antikörpers (Stammlösung: 50 µg/ml in TBS/0,1%BSA; verdünnt eingesetzt in einer Verdünnung von 1:200 in TBS/ 0,1% Tween20 / 0,1% BSA) pro Napf gegeben. Nach Inkubation für 60 Minuten bei
30 Raumtemperatur wurde erneut gewaschen (wie oben). Anschließend wurde mit je 100µl Streptavidin-AP Conjugate in einer Verdünnung von 1:2500 in TBS / 0,1% BSA /0,1% Tween20 für 2 Stunden inkubiert. Wiederum wurde dreimal gewaschen. Die Enzymmenge wurde mit Hilfe von je 100 µl des AttoPhos Substrate Set nachgewiesen. Nach Inkubation für 90 Minuten wurde die Fluoreszenz in einem Polarstargerät mit
35 Anregung von 440 nm und Emission von 540 nm gemessen.

Als Kontrolle für den ELISA wurde ein rekombinantes lösliches Maus-RAGE (Firma R&D Systems, Wiesbaden; Custom03) eingesetzt.

c) Ergebnis:

Figur 13 zeigt das Ergebnis der Messung von sRAGE im Plasma von 12 Monate alten (1) und 10 Wochen jungen (2) transgenen Tg2576 Mäusen. Man sieht, dass sRAGE im Plasma von alten Mäusen erhöht ist. Dies ist dadurch erklärbar, dass mit steigendem Alter der Tiere die Expression von RAGE von der membrangebundenen (bei jungen Tieren) auf die lösliche Form (bei alten Tieren) umschaltet und zwar in Abhängigkeit von der Amyloidproduktion. Dieses Ergebnis stützt den erfindungsgemäßen Befund, dass NtermR31 Antiserum einen "aktiven Rezeptorstatus" erkennt, der mit kommerziellen Antiseren nicht definiert wird (vgl. Ausführungsbeispiel 7, Figur 12). Das Plasma des nicht-transgenen Stamms C57B16 zeigte vergleichbare sRAGE Plasmakonzentrationen wie die jungen transgenen Tiere (Daten nicht gezeigt).

Ausführungsbeispiel 9: Konkurrenz der sRAGE/A β -Oligomer-Interaktion durch Anti-NtermR31 und Anti-sRAGE Antikörper

a) Materialien und Versuchsdurchführung

Die Versuche zur Verdrängung der sRAGE – Amyloid Beta Oligomer (Globulomer) Bindung durch Antikörper wurden mit der „homogeneous time-resolved fluorescence“ (HTRF) Technologie der Firma CIS Bio International (Bagnols, Frankreich) durchgeführt. Die HTRF Donor- und Akzeptor-Komponenten, Anti6HIS-Europiumcryptat (CIS Bio Katalog Nummer: 61HISKLA; 500 wells/13 μ g) und Streptavidin XL – 665 (CIS Bio Katalog Nummer: 611SAXLA, 500 wells/250 μ g), wurden in jeweils 250 μ l H₂O bidest. gelöst. Ausgehend von diesen Stammlösungen wurden 1:50 Arbeitsverdünnungen mit einer Endkonzentration von 7.4 nM Anti6His-Cryptate bzw. 121.2 nM Streptavidin XL-665 in PBS, pH 7.4 hergestellt.

Als Negativkontrolle in diesem Versuch diente Kaninchen IgG (Best.Nr.: I5006; Sigma, Taufkirchen, Deutschland). Als positive Kontrolle wurde der polyklonale anti RAGE Antikörper AF1145 (R&D Systems; Wiesbaden, Deutschland) eingesetzt. Die verwendeten anti NtermR31 Immunglobuline wurden, wie an anderer Stelle bereits beschrieben, über die Firma Biotrend (Köln, Deutschland) erworben.

Zur Versuchsdurchführung wurden zunächst in separaten Ansätzen 4 μ l des rekombinanten sRAGE Proteins (Herstellung und Reinigung wie beschrieben, Konzentration 1 μ M) mit jeweils 4 μ l der zu testenden Antikörperlösungen bzw. der IgG Kontrolle in den Konzentrationen 7,14 μ M, 3,57 μ M, 1,78 μ M, 0,892 μ M, 0,446 μ M, 0,223 μ M, 0,112 μ M, 0,056 μ M und 0 μ M für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Danach wurden dem Ansatz 4 µl einer 4 µM Stammlösung des Aβ 1/5 biotin Globulomers zugesetzt (finale Konzentration 800nM) und eine weitere Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die hier angegebene A beta 1/5 biotin Globulomer Konzentration be-
5 zieht sich auf die Aβ 1-42 Monomere, die zur Herstellung der Globulomere (gemäß WO 2004 067561) verwendet wurden. Jeweils 2 µl der oben beschriebenen 7,4 nM Anti6His-Cryptate Lösung und der 121,2 nM Streptavidin wurden zugesetzt, um dann diesen Ansatz weitere zwei Stunden bei nun 4°C zu inkubieren. Nach dem Zusatz von
10 4 µl einer 2M KF Stammlösung wurde der Gesamtansatz im BMG Pherastar Fluoreszenzmeßgerät (BMG Labtech GmbH, Offenburg, Deutschland) im HTRF Modus gemessen. Die berechneten %DeltaF Werte wurden in GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, San Diego, USA) übertragen und ausgewertet. Die im Graphen angegebenen Konzentrationen beziehen sich auf die Endkonzentration des 20 µl Gesamtansatzes.

15

b) Ergebnis

Das Versuchsergebnis ist in Figur 14 gezeigt. Wie erwartet beobachtet man in den Kontrollansätzen ohne sRAGE keine Veränderung der gemessenen Fluoreszenzwerte
20 bei steigender Antikörperkonzentration. In Gegenwart von sRAGE bewirkt die Zugabe von Kaninchen-Kontrollserum keine Abnahme der Fluoreszenz und somit keine Inhibition der sRAGE-Aβ- Wechselwirkung. Dagegen beobachtet man bei steigender Konzentration an polyklonalen anti-sRAGE Antikörpern (ab ca. 50nM) und polyklonalen anti-NtermR31 Antikörpern (ab ca. 800 nM) eine signifikante Inhibition der sRAGE-Aβ-
25 Wechselwirkung.

Ausführungsbeispiel 10: Effekt von NtermR31 auf excitatorische synaptische Übertragung und Langzeitpotenzierung

30 a) Vorbemerkung

Die Langzeitpotenzierung (LTP) ist ein zelluläres Modell für Lernen und Gedächtnis. Die hier verwendete Induktionsmethode ("Theta Burst"-Stimulation) löst ein sogenanntes "schwaches" LTP aus, welches nach mehreren Stunden auf die Ausgangswerte
35 zurückfällt. Die LTP ist zurückzuführen auf eine Verstärkung der Synapse, die - im Gegensatz zu Kurzzeitpotenzierung - auch längerfristige postsynaptische Veränderungen beinhaltet (z.B. Modifikation der Rezeptorzusammensetzung der postsynaptischen Membran). LTP-ähnliche Zustände wurden bei Gedächtnisbildung im Tier gemessen, umgekehrt beeinflusst die LTP-Induktion im Tier die Gedächtnisleistung. Aufgrund der

besseren Zugänglichkeit von Substanzen wurden synaptische Übertragung und LTP im Hirnschnitt gemessen. Abgeleitet wurde in der CA1-Region des Hippokampus.

b) Material und Methoden

5

400 µm dicke transverse Hippokampusschnitte von 7-8 Wochen alten männliche Wistar-Ratten (Harlan Winkelmann, Bochum, Deutschland) wurden mit Hilfe eines Tissue Chopper hergestellt und mindestens 1 Stunde bei 33 °C in mit Carbogen begastem künstlichem Liquor (aCSF) der folgenden Zusammensetzung: NaCl 124mM; KCl 4,9mM; MgSO₄ 1,3mM; CaCl₂ 2,5mM; KH₂PO₄ 1,2mM; NaHCO₃ 25,6mM; Glucose 10mM; pH 7,4. äquiliibriert. Abgeleitet wurde vom Tauchschnitt in mit Carbogen begastem künstlichem Liquor (aCSF) gleicher Zusammensetzung.

10

Stimulation des Schaffer Kollaterals erfolgte im Stratum Radiatum mit Hilfe einer monopolaren Stimulationselektrode mit biphasischem Puls (Voltbereich 1-5V). Excitatorische postsynaptischen Potentiale (EPSPs) wurden mit aCSF-gefüllten Glaselektroden gegen chlorierte Silberreferenzelektrode (Bad) im Stratum Radiatum abgeleitet. Diese geben vor allem die Stärke der glutamatergen synaptischen Übertragung wieder.

15

Die Werte wurden aus der Steigung des Feld-EPSPs ermittelt, die alle 5 min für einen Zeitraum von 120 Minuten vor und 120 Minuten nach LTP-Induktion abgeleitet worden sind. LTP wurde ausgelöst durch sogenannte Theta-Burst-Stimulation (4x2 Pulse im Abstand von 200 ms, bei 10 ms Doppelpulsintervall). Einwasch der Substanz erfolgte 100 Minuten vor Tetanisierung.

20

25

c) Ergebnisse

Untersucht wurde die Auswirkung von NtermR31 auf synaptische die Transmission und die LTP. Eine Applikation von 500 nM NtermR31 supprimiert deutlich sowohl Kurzzeit- als auch Langzeitpotenzierung. Die Verminderung des potenzierten Signals ist über die gesamte posttetanische Meßzeit signifikant ($p=0.016$; repeated measures ANOVA) (vgl. Figur 15). Einwasch des Kontrollpeptids (scraNtermR31, gleiche Aminosäurezusammensetzung, aber unterschiedliche Sequenz) hat keine Auswirkung auf Kurzzeit- und Langzeitpotenzierung ($p=0.794$; repeated measures ANOVA) (vgl. Figur 16). Der Effekt des NtermR31-Peptides ist demnach spezifisch für die Aminosäuresequenz. Die Kurzzeitpotenzierung ist der LTP-Kurve zu entnehmen und entspricht den ersten Minuten der Potenzierung.

30

35

Die NtermR31-Administration hat keine Auswirkung auf die basissynaptische Übertragung. Die Applikation von NtermR31 über eine Dauer von 90 Minuten verändert nicht

40

die Größe der EPSPs, und lässt somit normale glutamaterge Neurotransmission unbeeinflusst (vgl. Figur 15). Auch die Input/Output-Relation wird durch NtermR31 nicht beeinflusst (vgl. Figur 17), was ebenfalls auf normale synaptische Übertragung unter Einwirkung dieses Peptides deutet. Es gab keine Hinweise auf multiple Populationser-

5 eignisse in den Traces, weswegen keine Beeinträchtigung der regulären GABAergen Übertragung angenommen wird. Insgesamt kann daher angenommen werden, daß NtermR31 spezifisch auf LTP wirkt. Daraus folgt, daß NtermR31 gezielt in plastische synaptische Prozesse eingreift, die mit Lernen und Gedächtnis in Verbindung gebracht werden können.

10

Ausführungsbeispiel 11: Konkurrenz der sRAGE/A β -Globulomer-Interaktion durch AGER-CDP

a) Material und Methoden:

15

A β 1-42 Globulomer, hergestellt gemäß WO 2004 067561, biotinyliert

Die folgenden synthetischen AGER-CDPs wurden verwendet:

- 20 TLQSELMVTPARGGDPRTFSCSFSPGLPR (Peptid 6) (SEQ ID NO: 32)
LPRHRALRTAPIQPRVWEPVPLEEVQLVVE (Peptid 7) (SEQ ID NO: 33)

Die Versuche zur Verdrängung der sRAGE – A β Globulomer Bindung durch RAGE-Peptide wurden mit der „homogeneous time-resolved fluorescence“ (HTRF) Technologie der Firma CIS Bio International (Bagnols, Frankreich) durchgeführt. Die HTRF Donor- und Akzeptor-Komponenten, Anti6HIS-Europiumcryptat (CIS Bio Katalog Nummer: 61HISKLA; 500 wells/13 μ g) und Streptavidin XL – 665 (CIS Bio Katalog Nummer: 611SAXLA, 500 wells/250 μ g), wurden in jeweils 250 μ l H₂O bidest. gelöst. Ausgehend von diesen Stammlösungen wurden 1:50 Arbeitsverdünnungen mit einer Endkonzentration von 7.4 nM Anti6His-Cryptate bzw. 121.2 nM Streptavidin XL-665 in

30 PBS, 0,1 % BSA, pH 7,4 hergestellt.

35

Von den Peptiden 6 und 7 wurden Arbeitslösungen in den Konzentrationen 200 μ M, 100 μ M, 50 μ M, 25 μ M, 12,5 μ M, 6,25 μ M, 3,125 μ M, 1,56 μ M und 0,78 μ M hergestellt.

Zur Versuchsdurchführung wurden zunächst jeweils 4 μ l der Arbeitslösungen von Peptid 6 und 7, sowie einer Pufferkontrolle mit 4 μ l einer 4 μ M Stammlösung des A β 1/5 Biotin Globulomers gemischt (finale Assay-Konzentration 800nM) und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die hier angegebene A β 1/5 biotin Globulomer Konzentration bezieht sich auf die A β 1-42 Monomere, die zur Herstellung der Globulomere

40

verwendet wurden. Dem Assay wurden dann 4 µl des rekombinanten sRAGE Proteins (Herstellung und Reinigung gemäß Herstellungsbeispiel 3a; Konzentration 1 µM) zugesetzt und der Ansatz wiederum bei RT für 1h inkubiert.

5 Jeweils 2 µl der oben beschriebenen 7,4 nM Anti6His-Cryptate und der 121,2 nM Streptavidin Lösung wurden zugesetzt, um dann diesen Ansatz weitere zwei Stunden bei nun 4°C zu inkubieren. Nach dem Zusatz von 4 µl einer 2M KF Stammlösung wurde der Gesamtansatz im BMG Pherastar Fluoreszenzmeßgerät (BMG Labtech GmbH, Offenburg, Deutschland) im HTRF Modus gemessen. Für die Max-Signal Kurve wurden
10 separate Messungen ohne Peptid durchgeführt. Für die Background Kurve wurden Messungen mit jeweils nur der Anti6HIS-Cryptate - und Streptavidin XL - Lösung verwendet. Die berechneten %DeltaF Werte wurden in GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, San Diego, USA) übertragen und ausgewertet. Die im Graphen angegebenen Konzentrationen beziehen sich auf die Endkonzentration des 20 µl Gesamtansatzes.
15

b) Versuchsergebnisse:

Die Ergebnisse sind in beiliegender Figur 18 dargestellt. Man beobachtet eine Inhibition der Aβ-Oligomerbindung an sRAGE bei steigenden Konzentrationen der von der Ig-ähnlichen C2 Domäne von humanem sRAGE abgeleiteten Peptide 6 und 7. Die inhibitorische Aktivität ist bei Peptid 7 stärker ausgeprägt.
20

Ausführungsbeispiel 12: Bindung N-terminal verkürzte sRAGE Fragmente an Aβ-Oligomer 25

a) Material und Methoden:

Folgende sRAGE Peptide wurden eingesetzt:

30 sRAGE 1-331 (umfassend die komplette RAGE-Ektodomäne) (vgl. Herstellungsbeispiel 3a)
sRAGE 102-331 (umfassend die N-terminal verkürzte RAGE Ektodomäne) (vgl. Herstellungsbeispiel 3b)
35

Die direkte Bindung von sRAGE 1-331 und sRAGE 102-331 an Aβ Globulomer wurde mit der „homogeneous time-resolved fluorescence“ (HTRF) Technologie der Firma CIS Bio International (Bagnols, Frankreich) durchgeführt. Die HTRF Donor- und Akzeptor-Komponenten, Anti6HIS-Europiumcryptat (CIS Bio Katalog Nummer: 61HISKLA; 500
40 wells/13 µg) und Streptavidin XL – 665 (CIS Bio Katalog Nummer: 611SAXLA, 500

wells/250µg), wurden in jeweils 250 µl H₂O bidest. gelöst. Ausgehend von diesen Stammlösungen wurden 1:100 Arbeitsverdünnungen mit einer Endkonzentration von 3,7 nM Anti6His-Cryptate bzw. 60,6 nM Streptavidin XL-665 in PBS, 0,1 % BSA, pH 7,4 hergestellt.

5

Von den A beta 1/5 biotin Globulomeren wurden Arbeitslösungen mit den Konzentrationen 10 µM, 5 µM, 2,5 µM, 1,25 µM, 0,625 µM, 312,5 nM, 156,25 nM hergestellt.

10

Jeweils 4 µl dieser Arbeitslösungen bzw. 4 µl einer Pufferkontrolle wurden jeweils mit 4 µl einer 1 µM RAGE 1-331 bzw. 102-331 RAGE Stammlösung gemischt und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die hier angegebene A beta 1/5 biotin Globulomer Konzentration bezieht sich auf die Aβ 1-42 Monomere, die zur Herstellung der Globulomere verwendet wurden.

15

Jeweils 4 µl der oben beschriebenen 3,7 nM Anti6His-Cryptate und der 60,6 nM Streptavidin Lösungen wurden zugesetzt, um dann diesen Ansatz weitere zwei Stunden bei nun 4°C zu inkubieren. Nach dem Zusatz von 4 µl einer 2M KF Stammlösung wurde der Gesamtansatz im BMG Pherastar Fluoreszenzmeßgerät (BMG Labtech GmbH, Offenburg, Deutschland) im HTRF Modus gemessen. Für die Background Kurve wurden Messungen mit jeweils nur der Anti6HIS-Cryptate - und Streptavidin XL - Lösung verwendet. Die berechneten %DeltaF Werte wurden in GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, San Diego, USA) übertragen und ausgewertet. Die im Graphen angegebenen Konzentrationen beziehen sich auf die Endkonzentration des 20 µl Gesamtansatzes.

25

b) Versuchsergebnisse:

30

Die Ergebnisse sind in beiliegender Figur 19 dargestellt. Man beobachtet dabei, dass nicht nur die Ig-ähnliche, N-terminale V-Domäne von sRAGE an der Bindung von Aβ-Oligomeren beteiligt ist, sondern dass auch die Ig-ähnlichen C2 Domäne von sRAGE Bindungsaffinität für das Aβ-Oligomer besitzt. Beide Bindungsaffinitäten sind vergleichbar stark ausgeprägt.

35

Ausführungsbeispiel 13: Herstellung und Charakterisierung monoklonaler anti-RAGE Antikörper

a) Antikörperherstellung

40

1. Immunisierung von Mäusen:

Balb/c und A/J Mäuse (6-8 Wochen alt) wurden subkutan mit 30 µg sRAGE-HIS Antigen in komplettem Freud's Adjuvans immunisiert. Die Tiere wurden danach dreimal in Abständen von je drei Wochen wiederum mit 30 µg sRAGE-Antigen, das für diese Immunisierungen in Immuneasy™ (Firma: Qiagen) vorlag, injiziert. Vier Tage vor der Fusion wurden die Mäuse nochmals abschließend mit 10 µg sRAGE intravenös geimpft.

2. Zellfusion und Screening von Hybridomen:

Milz-Zellen von immunisierten Tieren wurden mit SP2/0-Ag14 Myelom-Zellen in einem Verhältnis von 5:1 nach Standardmethoden fusioniert. Für die Fusion wurde PEG 3000 verwendet und die Selektion wurde in einem Medium, das Azaserin und Hypoxantin enthielt durchgeführt. Sieben bis zehn Tage nach der Fusion, beim Auftreten von makroskopisch sichtbaren Kolonien, wurden die Zellkulturüberstände sowohl im ELISA auf Antikörper gegen sRAGE-HIS als auch im FACS unter Verwendung von stabil transfizierten sRAGE exprimierenden HEK-293 Zellen getestet. Positive Zellen aus der ELISA/FACS Analyse wurden weiter propagiert und durch serielle Verdünnungen kloniert.

3. ELISA Protokoll:

ELISA Platten wurden mit sRAGE-Protein (1µg/ml) in PBS übernacht bei 4°C beschichtet. Nach dem Blockieren der Platten mit Milch wurden die Mäuse-Sera bzw. die Hybridom-Überstände in 1x PBS, 0,1 % BSA (Sigma) verdünnt. Die Verdünnungen wurden seriell durchgeführt beginnend mit einem Verhältnis von 1:500. Zum Screenen wurden Verdünnungen von 1:5 verwendet. 50 µl Serum oder Zellkultur-Überstand wurden in jedes Well pipettiert und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach drei Waschschritten in 1x PBS, 0,1% BSA wurden jeweils 50 µl anti-Maus IgG-Fc-HRP (Pierce) in einer 1:5000 Verdünnung in PBS zugesetzt und für eine weitere Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach drei Waschschritten wurden 50 µl ABTS Substrat (Sigma) zugesetzt. Nach fünf Minuten bei Raumtemperatur wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 µl 2N H₂SO₄ Lösung abgestoppt und die Platten wurden bei 450 nm gelesen.

4. FACS Protokoll:

RAGE exprimierende 293 HEK Zellen oder nicht transfizierte Kontrollzellen wurden aus Zellkulturplatten geerntet und in 1xPBS, 0,1% BSA Lösung einmal gewaschen. Die Zellen wurden mit den Hybridoma-Überständen für eine Stunde auf Eis inkubiert. Nach erneutem zweimaligem Waschen der Zellen erfolgte die Inkubation mit Ziege anti-Maus

Ig-PE für eine Stunde auf Eis. Die Zellen wurden erneut gewaschen, resuspendiert und die Bindung wurde im Becton Dickenson FACScan Gerät detektiert.

5. Produktion und Reinigung von monoklonalen Antikörpern:

5

Die Hybridom-Zelllinien wurden in Medium mit 5 % fetalem Rinderserum (niedriger IgG Gehalt, Invitrogen) expandiert. Die Überstände wurden geerntet und aufkonzentriert. Reinigung der monoklonalen anti-RAGE Antikörper erfolgte über Protein A Chromatographie und nachfolgender Dialyse in PBS.

10

Auf diese Weise wurden beispielsweise Antikörper mit der Bezeichnung ML37-11H8 und ML37-6A6 gewonnen und weiter charakterisiert.

b) Charakterisierung im „Dot Blot“ Verfahren

15

Für die Charakterisierung der so erzeugten monoklonalen anti-RAGE Antikörper wurden Dot Blots mit dem vollständigen sRAGE-Protein (1-331 sRAGE-HIS) sowie einer N-terminal verkürzten Version (102-331-sRAGE-HIS) hergestellt. Auf Hybond-ECL Nitrozellulose Membranen (Amersham, RPN68D) wurden jeweils in einem Volumen von 1 µl 1xPBS im Duplikat folgende Proteinmengen aufgetragen: 30 ng, 10 ng, 3 ng, 1 ng, 0,3 ng, 0,1 ng, 0,03 ng, und 0,01 ng. Die getrockneten Membranen wurden daraufhin für 1 Stunde im „Western Blocking“ Reagenz (Roche, Nr. 1921673) mit konstanter Geschwindigkeit geschüttelt, um dann für eine weitere Stunde unter den gleichen Bedingungen mit den monoklonalen Antikörpern ML37-6A6 bzw. ML37-11H8 in einer Konzentration von 7,14 nM inkubiert zu werden. Nach vier Waschschritten für jeweils fünf Minuten in 1xPBS wurden die Filter in Western Blocking Reagenz (Roche, Nr. 192173), das den sekundäre Antikörper „goat anti mouse IgG AP“ (Sigma Nr. A-7434) in einer 1:2000 fachen Verdünnung enthielt, für eine Stunde geschüttelt. Nach weiteren vier Waschschritten für jeweils fünf Minuten in 1X PBS wurden die Filter in einer nach Herstellerangaben angesetzten NBT/BCIP Substrat Lösung (Roche, Nr. 1697471) inkubiert. Die Färbungsreaktion wurde nach 10 Minuten mit destilliertem Wasser abgestoppt.

Die Ergebnisse zeigen (vgl. Figur 20), dass beide Antikörper das vollständige 1-331 sRAGE-HIS Protein (Reihe (1)) erkennen. Unterschiede der Antikörper werden hinsichtlich der Detektion des N-terminal verkürzten 102-331 sRAGE-HIS Proteins (Reihe (2)) deutlich. Der Antikörper ML37-6A6 bindet auch die N-terminal verkürzte Version, was für den Antikörper ML37-11H8 nicht der Fall ist.

40

c) Charakterisierung durch Kompetition der sRAGE-A β Globulomer Bindung

Versuche zur Verdrängung der sRAGE – A β Globulomer Bindung durch monoklonale anti RAGE Antikörper wurden mit der „homogeneous time-resolved fluorescence“ (HTRF) Technologie der Firma CIS Bio International (Bagnols, Frankreich) durchgeführt. Die HTRF Donor- und Akzeptor-Komponenten, Anti6His-Europiumcryptat (CIS Bio Katalog Nummer: 61HISKLA; 500 wells/13 μ g) und Streptavidin XL – 665 (CIS Bio Katalog Nummer: 611SAXLA, 500 wells/250 μ g), wurden in jeweils 250 μ l Aqua bidest gelöst. Ausgehend von diesen Stammlösungen wurden 1:40 Arbeitsverdünnungen mit einer Endkonzentration von 10.25 nM Anti6His-Cryptate bzw. 151.5 nM Streptavidin XL-665 in PBS, pH 7.4 hergestellt. Als Negativkontrollen in diesem Versuch dienten Maus IgG1 und Maus IgG2a (Best.Nr.: M-5284 bzw. M-5409; Sigma, Taufkirchen, Deutschland).

Zur Versuchsdurchführung wurden zunächst in separaten Ansätzen 4 μ l des rekombinanten sRAGE Proteins (Herstellung und Reinigung wie beschrieben, Konzentration 1 μ M) mit jeweils 4 μ l der zu testenden Antikörperlösungen bzw. der IgG Kontrollen in den Konzentrationen 2 μ M, 1 μ M, 0,5 μ M, 0,25 μ M, 0,125 μ M, 62,5 nM, 31,25 nM, 15,62 nM, 7,81 nM, 3,9 nM für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Backgroundkontrolle enthält kein sRAGE Protein und keine Antikörper, die Max-Signalkontrolle enthält sRAGE und keine Antikörper. Volumenverluste wurden durch entsprechende Mengen an Bindungspuffer (1xPBS pH 7.4; 0,1% BSA) ausgeglichen.

Danach wurden dem Ansatz 4 μ l einer 4 μ M Stammlösung des A β 1/5 biotin Globulomers zugesetzt (finale Konzentration 800nM) und eine weitere Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die hier angegebene A beta 1/5 biotin Globulomer Konzentration bezieht sich auf die A β 1-42 Monomere, die zur Herstellung der Globulomere verwendet wurden. Jeweils 2 μ l der oben beschriebenen 10,25 nM Anti6His-Cryptate Lösung und der 151,5 nM Streptavidin-XL wurden zugesetzt, um dann diesen Ansatz eine weitere Stunde zu inkubieren. Nach dem Zusatz von 4 μ l einer 2M KF Stammlösung wurde der Gesamtansatz im BMG Pherastar Fluoreszenzmeßgerät (BMG Labtech GmbH, Offenburg, Deutschland) im HTRF Modus gemessen. Die berechneten %DeltaF Werte wurden in GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, San Diego, USA) übertragen und ausgewertet. Die im Graphen angegebenen Konzentrationen beziehen sich auf die Endkonzentration des 20 μ l Gesamtansatzes.

Man beobachtet (vgl Figur 21), dass sowohl der Antikörper ML37-11H8 als auch der Antikörper ML37-6A6 in der Lage sind, die A β -Globulomer – sRAGE Bindung effizient zu kompetieren. Wie in der Dot Blot Analyse gezeigt, erkennen die Antikörper unterschiedliche Teile des sRAGE-Proteins, was unzweifelhaft belegt, dass sowohl C-

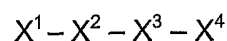
terminale als auch N-terminale Bereiche von sRAGE als Angriffspunkt für antagonistische therapeutische Reagenzien dienen können.

Patentansprüche

1. Verwendung des Rezeptor Multimerisierungs Epitops (RME) des Advanced-Glycation-End Products Rezeptors (AGER), umfassend ein zur Auto-Multimerisierung befähigtes Peptidfragment der N-terminalen AGER-Ektodomäne, oder eines von der AGER Ig-ähnlichen C-Domäne abgeleiteten Peptids (AGER-CDP), oder eines funktionalen, immunogenen Äquivalents von AGER-RME oder von AGER-CDP, als Immunogen zur Herstellung eines polyklonalen Antiserums oder monoklonaler Antikörper gegen AGER-RME bzw. AGER-CDP.
2. Verwendung nach Anspruch 1, wobei AGER-RME mit einer Länge von etwa 8 bis 50 Aminosäureresten eingesetzt wird, das abgeleitet ist von der humanen AGER-Ektodomäne mit einer Aminosäuresequenz gemäß Genbank Ref. Seq. Sequenz NM_001136 oder einer funktional äquivalenten Ektodomäne; insbesondere der V-Domäne davon.
3. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 und 2, wobei AGER-RME folgende Sequenz umfasst:

C(K/R)GAPKKP(P/T)Q(Q/R/K)LE (SEQ ID NO :1)

4. Verwendung nach Anspruch 3, wobei AGER-RME eine Sequenz umfasst, die ausgewählt ist unter
- CRGAPKKPPQQLE (SEQ ID NO :2)
 CKGAPKKPPQRLE (SEQ ID NO :3)
 CKGAPKKPTQKLE (SEQ ID NO :4)
5. Verwendung nach einem der Ansprüche 3 und 4, wobei AGER-RME eine Sequenz umfasst, die ausgewählt ist unter:



worin

- X¹ für ein Wasserstoffatom, oder die Aminosäure Q oder das Dipeptid DQ steht;
- X² für NITARIG(K/E)PL(V/M)L(N/S/K) (SEQ ID NO:5) steht;
- X³ für eine Sequenz nach Anspruch 3 oder 4 steht; und
- X⁴ für die Peptidsequenz WKLN steht.

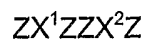
6. Verwendung nach einem der Ansprüche 3 bis 5, wobei AGER-RME ausgewählt ist unter SEQ ID NO: 1, 2, 3 und 5, sowie Sequenzen der allgemeinen Formel $X^1 - X^2 - X^3 - X^4$ worin X^1 bis X^4 wie oben definiert sind.
- 5 7. Verwendung nach Anspruch 1, wobei das AGER-CDP mit einer Länge von etwa 5 bis 50 Aminosäureresten eingesetzt wird, das abgeleitet ist von der humanen AGER-Ektodomäne mit einer Aminosäuresequenz gemäß Genbank Ref. Seq. Sequenz NM_001136 oder einer funktional äquivalenten Ektodomäne, insbesondere der C-like Domäne davon.
- 10 8. Verwendung nach Anspruch 7, wobei das Peptid eine der folgenden Sequenzen umfasst:
- 15 a) DGKPLVPNEKGVSVKEQTRRHPETGLFTLQ (SEQ ID NO: 31)
b) TLQSELMVTPARGGDP RPTFSCSFSPGLPR (SEQ ID NO: 32) und
c) LPRHRALRTAPIQPRVWEPVPLEEVQLVVE (SEQ ID NO: 33).
9. Verwendung nach Anspruch 8, wobei das AGER-CDP ausgewählt ist unter SEQ ID NO: 31, 32 und 33.
- 20 10. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das AGER-RME oder AGER-CDP als cyclisches Peptid vorliegt.
- 25 11. Verwendung einer AGER-RME oder eines AGER-CDP gemäß der Definition in einem der vorhergehenden Ansprüche zur Diagnose von Krankheiten oder Krankheitsstadien, bei denen Auto-Antikörper gegen das AGER-RME oder das AGER-CDP auftreten.
- 30 12. Verwendung einer AGER-RME oder eines AGER-CDP gemäß der Definition in einem der Ansprüche 1 bis 10, der AGER-Ektodomäne mit einer Aminosäuresequenz gemäß Genbank Ref. Seq. Sequenz NM_001136 und N-terminaler Subfragmente davon, sowie von Muteinen und Derivaten dieser AGER-Moleküle, oder von AGER-RME- oder AGER-CDP-bindenden Liganden zur Herstellung eines pharmazeutischen Mittels zur Diagnose oder Therapie von AGER-medierten
- 35 13. Verwendung nach Anspruch 12, wobei ein AGER-RME- oder AGER-CDP-bindender Ligand verwendet wird.

14. Verwendung nach Anspruch 12 oder 13, wobei die Krankheiten oder Krankheitsstadien mit einer AGER/AGER-, AGER/Ligand-, AGER/Rezeptor-, AGER/Rezeptor/Ligand-, AGER/Rezeptor/Co-Rezeptor- und/oder AGER/Rezeptor/Counter-Rezeptor-Wechselwirkung assoziiert sind.
- 5
15. Verwendung nach einem der Ansprüche 12 bis 14, wobei die Krankheiten oder Krankheitsstadien ausgewählt sind unter
- a) mechanischen Verletzungen von Schädel und Rückenmark,
 - b) ischaemischen Schäden,
 - 10 c) chronische Erkrankungen, ausgewählt unter neurodegenerative, inflammatorische und Autoimmun-Erkrankungen,
 - d) diabetische Folgeerkrankungen,
 - e) Tumorprogression und Metastasierung
 - f) veränderte Neurogeneseprozesse bei psychotischen Erkrankungen und
 - 15 chronischen Schmerzzuständen die durch exzessive Neuritensprossung und/oder pathologische Synaptogenese hervorgerufen werden
 - g) Störungen der neuronalen Regeneration, des axonalen Sproutings, der Neuritenextension und der neuronalen Plastizität
 - h) zentrale/periphere Amyloiderkrankungen; und
 - 20 i) Arteriosklerose.
16. Verwendung nach einem der Ansprüche 12 bis 15, wobei der AGER-RME- oder AGER-CDP-bindende Ligand ein anti-AGER-RME- oder anti-AGER-CDP-Antikörper ist.
- 25
17. Verwendung von AGER-RME oder eines AGER-CDP nach einem der Ansprüche 1 bis 10 als Target zum Nachweis oder zur Identifizierung von AGER-bindenden Liganden.
- 30
18. Verwendung von AGER-RME oder eines AGER-CDP nach einem der Ansprüche 1 bis 9 als Immunogen zur aktiven oder passiven Immunisierung.
19. Polyklonales anti-AGER-RME- oder anti-AGER-CDP-Antiserum, erhältlich durch Immunisierung eines Säugers mit einer antigenen Menge eines AGER-RME Peptids oder eines AGER-CDP gemäß der Definition in einem der Ansprüche 1 bis
- 35
- 10.
20. Monoklonaler anti-AGER-RME- oder anti-AGER-CDP-Antikörper oder ein Antigen-bindendes Fragment davon, gegebenenfalls in humanisierter Form.
- 40

21. Antiserum nach Anspruch 19 oder Antikörper nach Anspruch 20, mit wenigstens einer der folgenden Eigenschaften:
- a) verbesserter Spezifität für ein AGER-RME oder ein AGER-CDP gemäß einem der Ansprüche 1 bis 10,
 - 5 b) verbesserter Spezifität für ein unter Beteiligung des AGER-RME oder eines AGER-CDP nach Anspruch 1 bis 9 ausgebildetes Neoepitop,
 - c) Inhibition der AGER-RME-vermittelten Multimerisierung mit sRAGE oder anti-AGER-RME Antikörper;
 - 10 d) spezifische Erkennung eines AGER-Ligand-induzierten Rezeptorstatus von sRAGE;
 - e) Induzierung einer Rezeptorkonfiguration von sRAGE, welche die Bindung des AGER-Liganden an sRAGE moduliert.
22. Monoklonaler bispezifischer Antikörper, umfassend eine
- 15 a) erste Antigen-bindende Domäne, abgeleitet von einem monoklonalen Antikörper nach Anspruch 20 oder 21, und
 - b) eine zweite Antigen-bindende Domäne mit Spezifität für Zelloberflächen-Rezeptoren, die zu einer Wechselwirkung mit AGER-RME oder AGER-CDP befähigt sind oder mit Spezifität für einen Liganden, Co- oder Counter-
 - 20 Rezeptor für einen dieser Rezeptoren,
- oder ein Antigen-bindendes Fragment davon, gegebenenfalls in humanisierter Form.
23. Hybridprotein, umfassend ein AGER-RME oder ein AGER-CDP nach einem der
- 25 Ansprüche 1 bis 9.
24. Hybridprotein nach Anspruch 23, außerdem umfassend einen funktionalen Teil eines Proteins, ausgewählt unter Immunglobulinen und Fragmenten davon.
- 30 25. Hybridprotein nach Anspruch 23, umfassend ein Ig-Fc Fragment funktional verknüpft mit AGER-RME oder AGER-CDP.
26. AGER-RME-Derivat oder AGER-CDP-Derivat, umfassend AGER-RME oder AGER-CDP nach einem der Ansprüche 1 bis 9 in PEGylierter Form oder gekoppelt mit einem Marker.
- 35 27. Pharmazeutisches Mittel, umfassend in einem pharmazeutisch verträglichen Träger wenigsten einen aktiven Bestandteil ausgewählt unter:
- a) AGER-RME oder AGER-CDP nach einem der Ansprüche 1 bis 10

- b) für AGER-RME oder AGER-CDP nach einem der Ansprüche 1 bis 10 kodierenden Nukleinsäuresequenzen;
 - c) monoklonale oder polyklonale anti-AGER-RME- oder anti-AGER-CDP- Antikörpern nach einem der Ansprüche 19 bis 21;
 - 5 d) bispezifischen Antikörpern nach Anspruch 22, und
 - e) Hybridproteinen und Derivaten nach Anspruch 23 bis 25.
28. Pharmazeutisches Mittel nach Anspruch 27, enthaltend wenigstens einen monoklonalen oder polyklonalen anti-AGER-RME- oder anti-AGER-CDP- Antikörpern nach einem der Ansprüche 19 bis 21
- 10
29. Pharmazeutisches Mittel nach nach Anspruch 27 oder 28, zusätzlich enthaltend als aktiven Bestandteil einen Wirkstoff, ausgewählt unter
- 15 a) Neurotrophen Faktoren, Inosin, Neuroimmunophilinen, Chondroitinsulfat-Proteoglycan-abbauenden Enzymen;
 - b) Antikörper gegen Neuritenwachstumsinhibitoren, Nogo-A, MAG, Omgp, und/oder deren Rezeptoren,
 - c) löslichem NgR-Fragment, Nogo-A-Peptidfragmenten,
 - d) Inhibitoren der p75-vermittelten Signalkaskade,
 - 20 e) cAMP und funktionale Analoga, Proteinkinase A, Arginase I, Polyamine, ciliary neurotrophis factor.
30. Pharmazeutisches Mittel nach einem der Ansprüche 27 bis 29, zur intrathecalen, intravenösen, subkutanen, oralen oder parenteralen, nasalen und Inhalations-Verabreichung.
- 25
31. Immunogen, umfassend AGER-RME oder AGER-CDP nach einem der Ansprüche 1 bis 10 in einen pharmazeutisch verträglichen Träger und gegebenenfalls mit einer Adjuvans zur aktiven Immunisierung.
- 30
32. Verfahren zum Nachweis von Effektoren des AGER-Rezeptors, wobei man eine Probe, in der man einen Effektor vermutet, mit einem AGER-RME-Polypeptid oder einem AGER-CDP nach einem der Ansprüche 1 bis 10 inkubiert und den Ansatz auf die Bildung eines Effektor-AGER-RME-Komplexes oder eines Effektor-AGER-CDP-Komplexes untersucht.
- 35
33. Expressionsvektor, umfassend wenigstens eine kodierende Nukleinsäuresequenz für AGER-RME oder AGER-CDP gemäß der Definition nach einem der Ansprüche 1 bis 9, operativ verknüpft mit wenigstens einer regulativen Nukleinsäuresequenz.
- 40

34. Rekombinanter Mikroorganismus, welcher wenigstes einen Vektor nach Anspruch 33 trägt.
- 5 35. Hybridomzelllinie, welche einen monoklonalen Antikörper nach einem der Ansprüche 19 bis 21 produziert.
- 10 36. Verfahren zur Herstellung von AGER-RME oder AGER-CDP nach einem der Ansprüche 1 bis 9 oder eines Hybridproteins nach einem der Ansprüche 23 bis 25, wobei man einen rekombinanten Mikroorganismus nach Anspruch 34 kultiviert und das produzierte Proteinprodukt aus der Kultur isoliert.
- 15 37. Verfahren zur Herstellung eines monoklonalen Antikörpers nach einem der Ansprüche 19 bis 21, wobei man eine Hybridomzelllinie nach Anspruch 35 kultiviert und das produzierte Proteinprodukt aus der Kultur isoliert.
- 20 38. Funktionales Äquivalent von AGER-RME gemäß der Definition in einem der Ansprüche 1 bis 6, welches einen Homologiegrad von weniger als 100% zu SEQ ID NO: 6 aufweist.
- 25 39. Funktionales Äquivalent von AGER-RME nach Anspruch 38, wobei dieses wenigstens eine der folgenden Eigenschaften aufweist:
 a) Inhibition der Signaltransduktion im Aktin-Cytoskelett-Rearrangement (ACR)-Assay;
 b) Konkurrenz mit sRAGE um die Bindung mit einem AGER-Liganden;
 c) Auto-Multimerisierung oder Multimerisierung mit AGER-RME oder s-RAGE.
- 30 40. Funktionales Äquivalent von AGER-RME nach Anspruch 38 oder 39, wobei es eine Kernsequenz mit hoher positiver Ladungsdichte der folgende allgemeinen Formel aufweist:



- 35 worin die Reste Z unabhängig voneinander für einen Aminosäurerest mit positiv geladener Seitenkette stehen; und
 die Reste X^1 und X^2 unabhängig voneinander für beliebige 1 bis 5 gleiche oder verschiedene Aminosäure stehen, welche keine positiv geladenen Seitenketten tragen.
- 40

41. Kombination von wenigstens zwei monoklonalen Antikörpern mit unterschiedlicher Antigenspezifität, wobei wenigstens ein erster monoklonaler Antikörper an ein Antigen bindet, das ganz oder teilweise von einem Sequenzbereich der Ig-ähnlichen V-Domäne von AGER gebildet wird, und wenigstens ein zweiter monoklonaler Antikörper an ein Antigen bindet, das ganz oder teilweise von einem Sequenzbereich einer von der Ig-ähnlichen V-Domäne verschiedenen AGER Domäne gebildet wird.
42. Antikörperkombination nach Anspruch 41, wobei die von der Ig-ähnlichen V-Domäne verschiedene AGER Domäne die Ig-ähnliche C-Domäne von AGER ist.
43. Antikörperkombination nach Anspruch 41 oder 42, wobei wenigstens ein erster monoklonaler Antikörper und gegebenenfalls wenigstens ein zweiter monoklonaler Antikörper mit der Bindung von von AGER oder einem löslichen Äquivalent davon mit einem Bindungspartner kompetitiert.
44. Antikörperkombination nach Anspruch 43, wobei der Bindungspartner ein Aß-Globulomer ist.
45. Antikörperkombination nach einem der Ansprüche 41 bis 44 zur Verwendung als Arzneimittel.
46. Pharmazeutisches Mittel umfassend eine Antikörperkombination nach einem der Ansprüche 41 bis 44.
47. Verwendung einer Antikörperkombination nach einem der Ansprüche 41 bis 44 zur Herstellung eines pharmazeutischen Mittels zur Therapie von Krankheiten oder Krankheitszuständen gemäß der Definition in einem der Ansprüche 14 und 15.

Sequenzvergleich RAGE:

```

                                     |+++++|
Mensch      MAAGTAVGAWVLVLSLWGAVVGAONITARIGEPLVLKCKGAPKKPPQORLEWKLNTGRTEA
Maus        MPAGTAARAWVLVLALWGAVAGGQNITARIGEPLVLSCKGAPKKPPQLEWKLNTGRTEA
Ratte       MPTGTVARAWVLVLALWGAVAGGQNITARIGEPLMLSCKGAPKKPTQKLEWKLNTGRTEA
Rind        MAAGAVVGAWMLVLSLGGTGTGDONITARIGKPLVLNCKGAPKKPPQLEWKLNTGRTEA
          *:.*:.*. *:.*:.* *:.*. *****:.*:.*. *****:.*:*****

Mensch      WKVLSPOGGGPWDSVARVLPNGSLFLPAVGIODEGIFRCQAMNRRNGKETKSNYRVRVYQI
Maus        WKVLSPOGG-PWDSVAQILPNGSLLLPATGIVDEGTFRCRATNRRGKEVKSNYRVRVYQI
Ratte       WKVLSPOGD-PWDSVARILPNGSLLLPAIGIVDEGTFRCRATNRLGKEVKSNYRVRVYQI
Rind        WKVLSPOGD-PWDSVARVLPNGSLLLPAVGIODEGTFRCRATSRSGKETKSNYRVRVYQI
          ***** . *****:*****:*** ** *** *:.* . ***.*****

Mensch      PGKPEIVDSASELTAGVPNKVGTCVSEGSYPAGTLSWHLDGKPLVPNEKGVSVKEOTRRH
Maus        PGKPEIVDPASELTASVPNKVGTCVSEGSYPAGTLSWHLDGKLLIPDGKETLVKEETRRH
Ratte       PGKPEIVNPASELTANVPNKVGTCVSEGSYPAGTLSWHLDGKPLIPDGKGTVVKEETRRH
Rind        PGKPEIVDPASELMAGVPNKVGTCVSEGGYPAGTLNWLDDGKTLIPDGKGVSVKEETKRH
          *****:***** * *****:*****.* ***** *:.*: * . ***:***

Mensch      PETGLFTLQSELMVTPARGGDPPTFSCSFSPGLPRHRAIRTAPIOPRVW-----
Maus        PETGLFTLRSELTVIPTQGGTTHPTFSCSFSLGLPRRRPLNTAPIQLRVR-----
Ratte       PETGLFTLRSELTVTTPAQGGT-PTYSCSFSLGLPRRRPLNTAPIQPRVR-----
Rind        PKTGLFTLHSELMVTPARGGALHPTFSCSFTPLPRRRALHTAPIQLRVWSEHRGEGEPN
          *:*****:*** * *:.* ** *:*****: *****:.*.***** **

Mensch      -EPVPLEEVQLVVEPEGGAAPGGTVTTLTCEVPAOPSPQIHWMKDGVPLPLPPSPVLLP
Maus        -EPGPPEGIQLLVEPEGGIVAPGGTVTTLTCAISAQPPPQVHWIKDGAPLPLAPSPVLLP
Ratte       -EPLPPEGIQLLVEPEGGTVAPGGTVTTLTCAISAQPPPQIHWIKDGTPLPLAPSPVLLP
Rind        VDAVPLKEVQLVVEPEGGAAPGGTVTTLTCEAPAQPPPQIHWIKDGRPLPLPPGPMLLLP
          :. * : :*:***** ***** .***.***:*** *****:.*:***

Mensch      EIGPODOGTYSVCVATHSSHGPQESRAVSISIIEPGEEGPTAGSVGGSGLGLTLALALGILG
Maus        EVGHADEGTYSVCVATHPSHGPQESPPVSIRVTETGDEGPAEGSVGESGLGLTLALALGILG
Ratte       EVGHEDEGIYSCVATHPSHGPQESPPVNIRVTETGDEGQAAGSVDGSGLGLTLALALGILG
Rind        EVGPEDQGTYSVCVATHPSHGPQESRAVSVTIETGEEGTAGSVEGPGLTLALTALGILG
          *:.* *:.* *****.***** .*:.* : *:.*: * ** *****:*****

Mensch      GLGTAALLIGVILWQRR-QRRGEERKAPENQEEEE-RAELNQSEEPEAGESSTGGP
Maus        GLGVVALLVGAILWRKR-QPRREERKAPESQEDEEE-RAELNQSEEAEMPENGAGGP
Ratte       GLGIAALLIGAILWRKR-QPRLEERKAPESQEDEEE-RAELNQSEEAEMPENGAGGP
Rind        GLGTVALLIGIVWHRRRQRKQGERKVPENQEEEEERAE LNQPEEPEAAESSTGGP
          *** .***:.*:.*:.* * : :***.***.***.*** *****:*** * ..:***

```

ClustAll W Alignment der Protein Sequenzen:

Ref.Seq Ids:

NP_001127 Mensch

NP_031451 Maus

NP_445788 Ratte

NP_776407 Rind

lg-like V-typelg-like_C2-type_1lg-like_C2-type_2**Fig. 1**

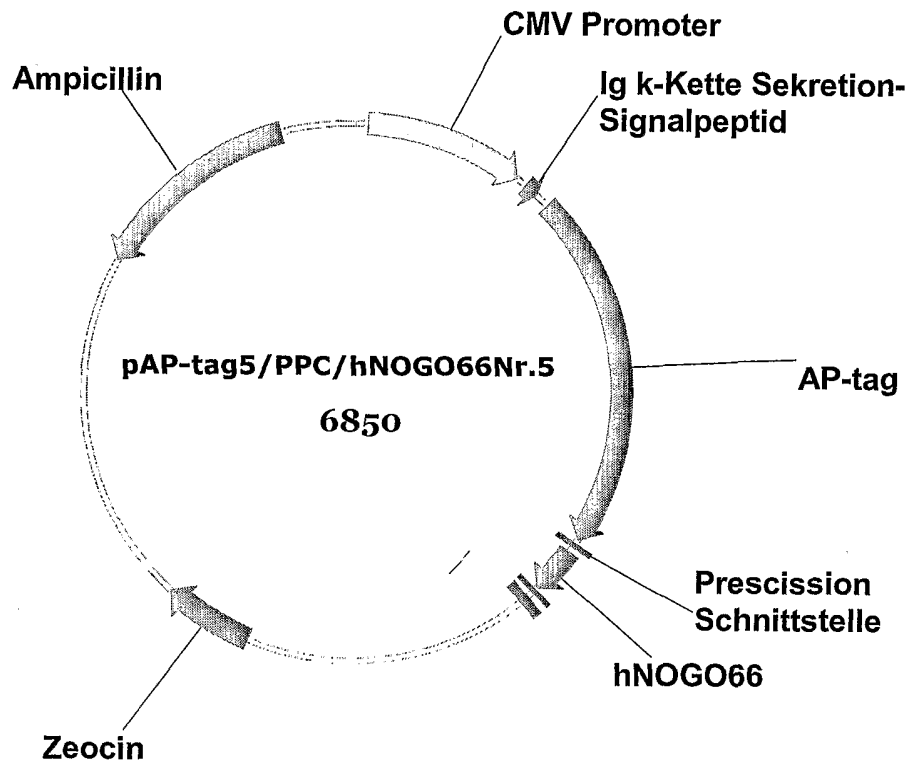


Fig. 2

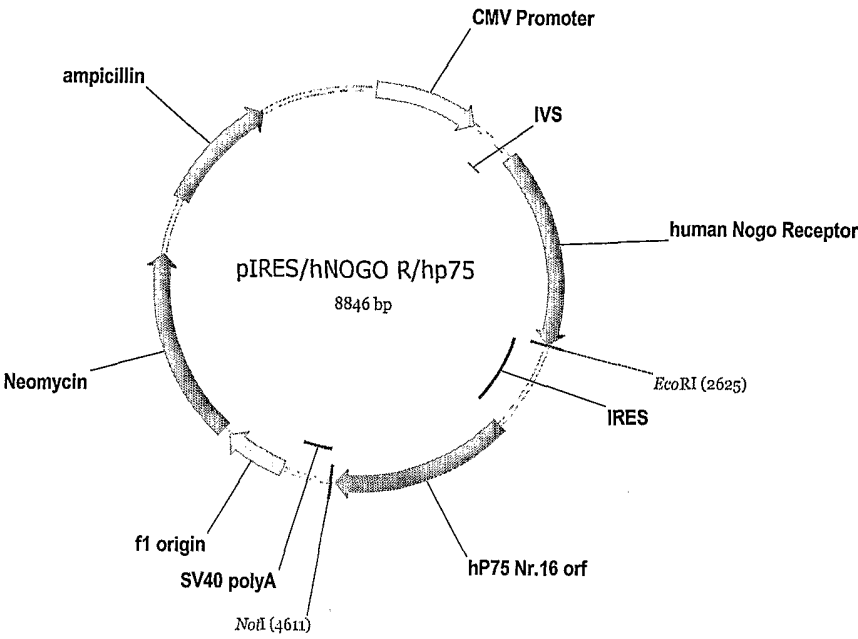


Fig. 3a

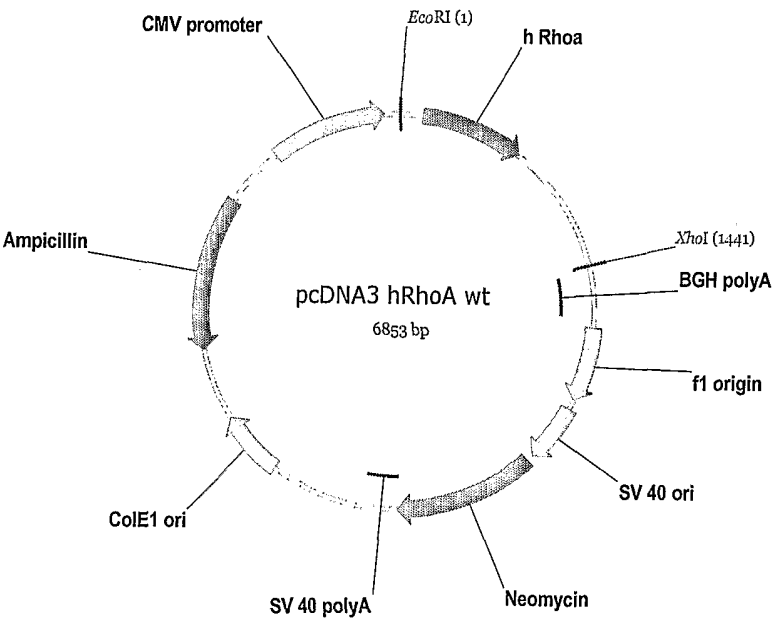


Fig. 3b

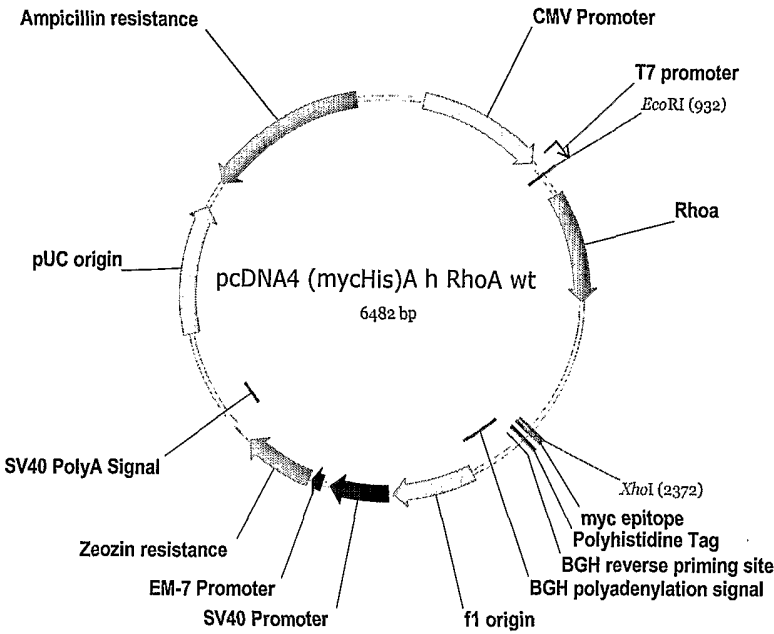


Fig. 3c

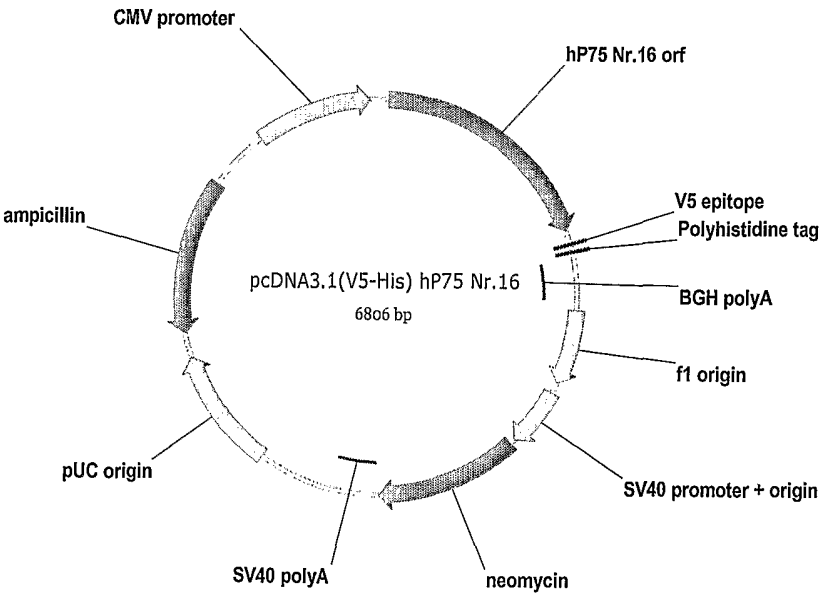
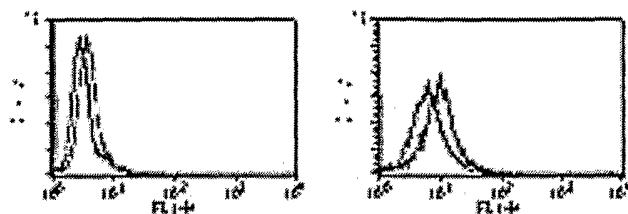
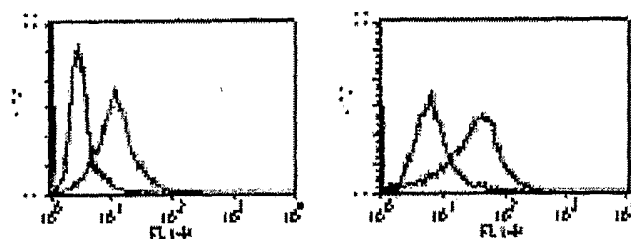
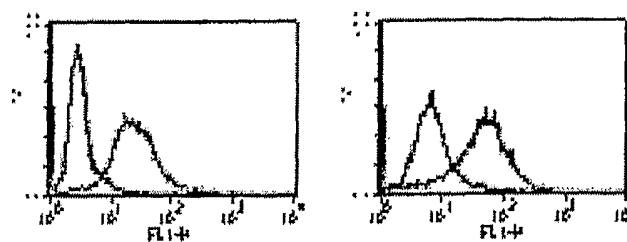


Fig. 3d

M C #1 #2 #3 #4 #5 #6 #7 #8 #9

Fig. 4a

Anti p75**Anti NgR****HEK293****HEK293-Tripletransfektante****# 4****# 8****Fig. 4b**

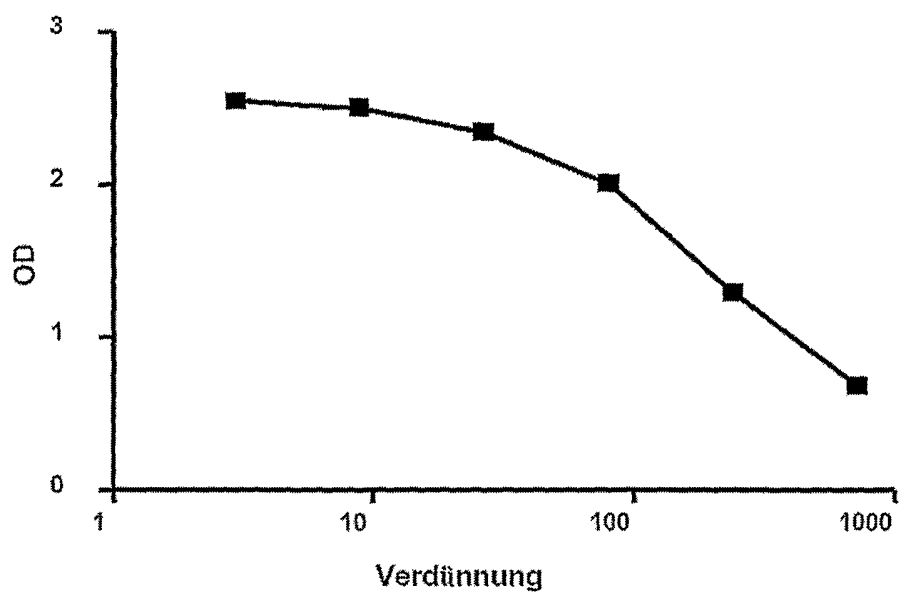


Fig. 5

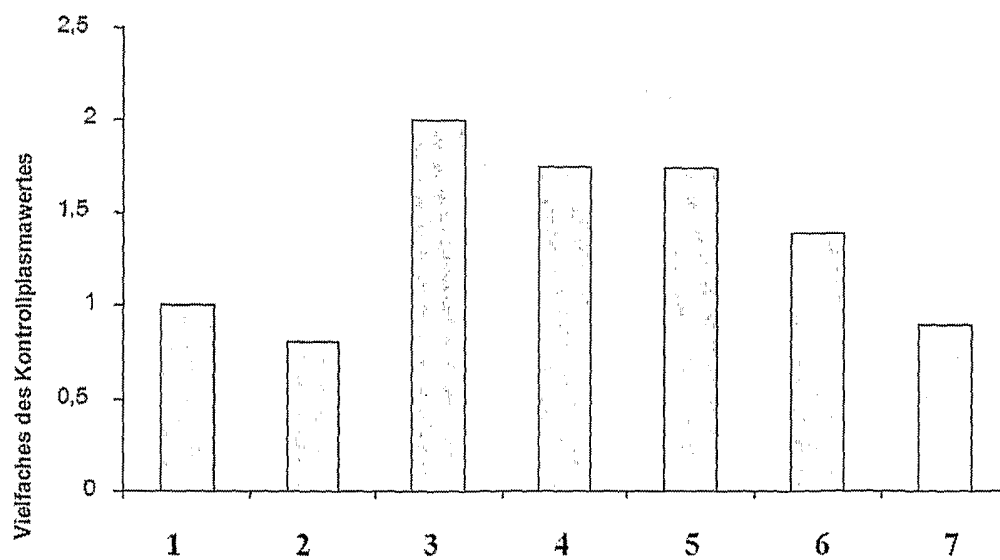


Fig. 6

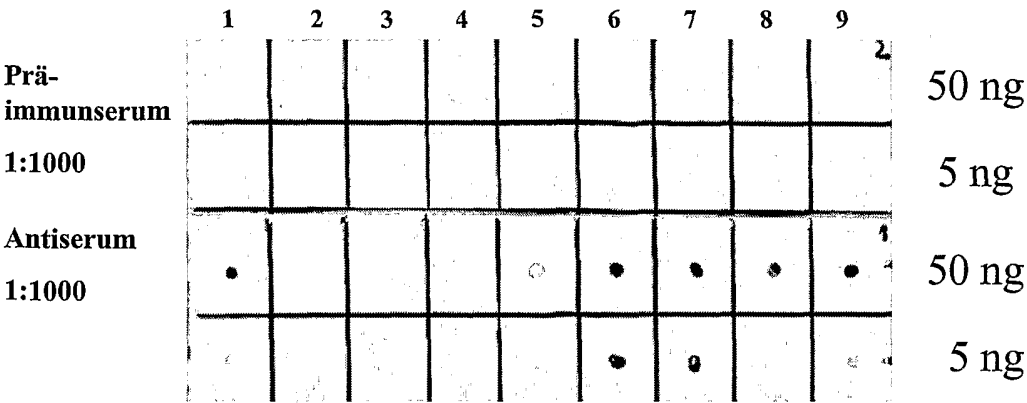


Fig. 7a

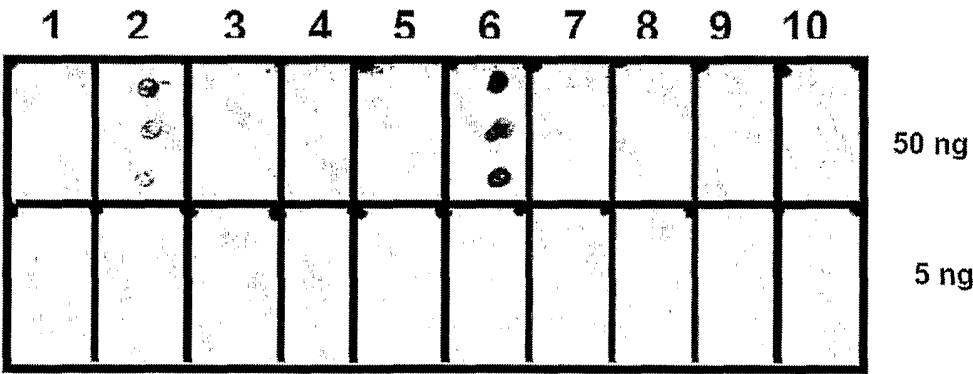


Fig. 7b

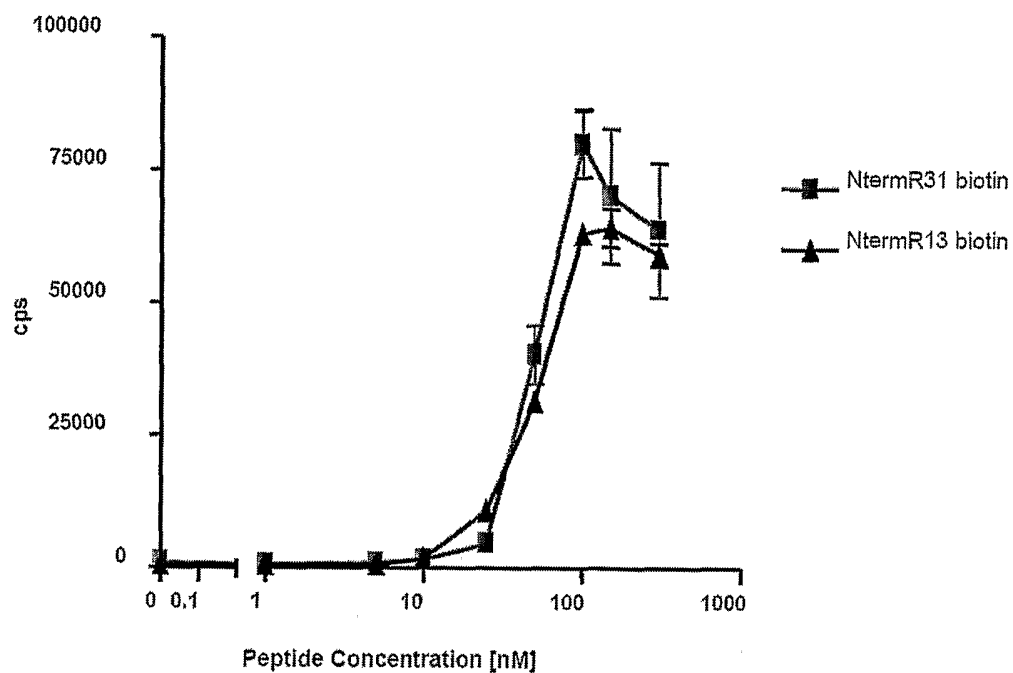


Fig. 8

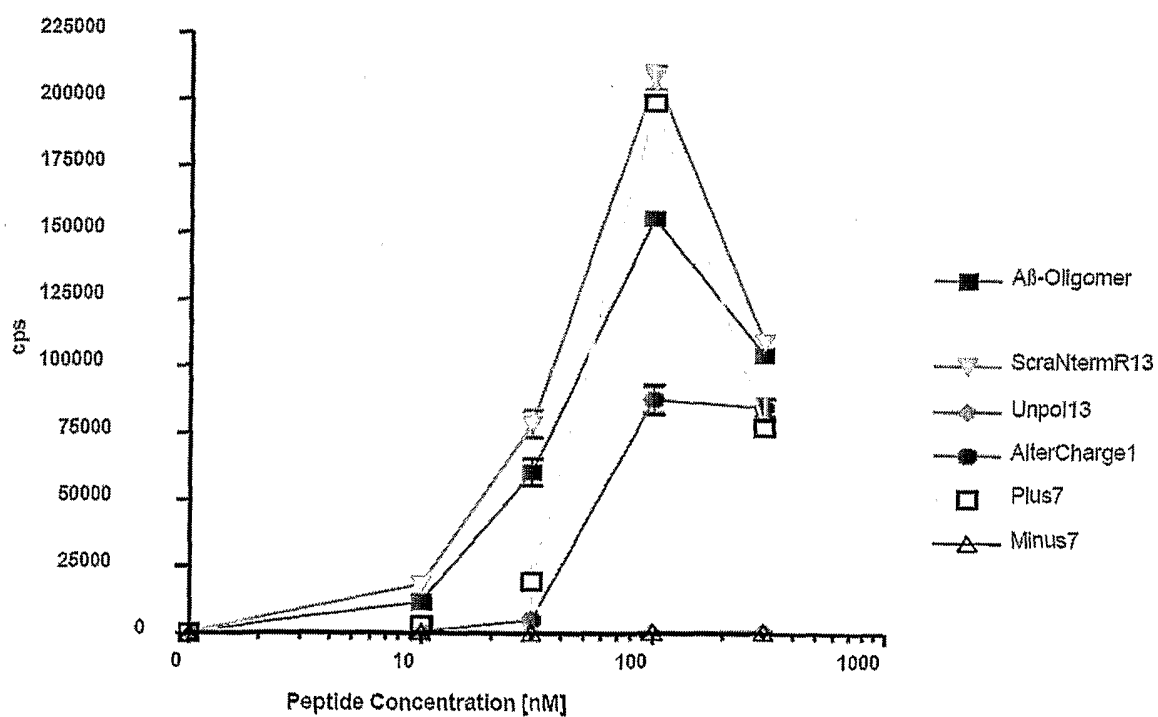
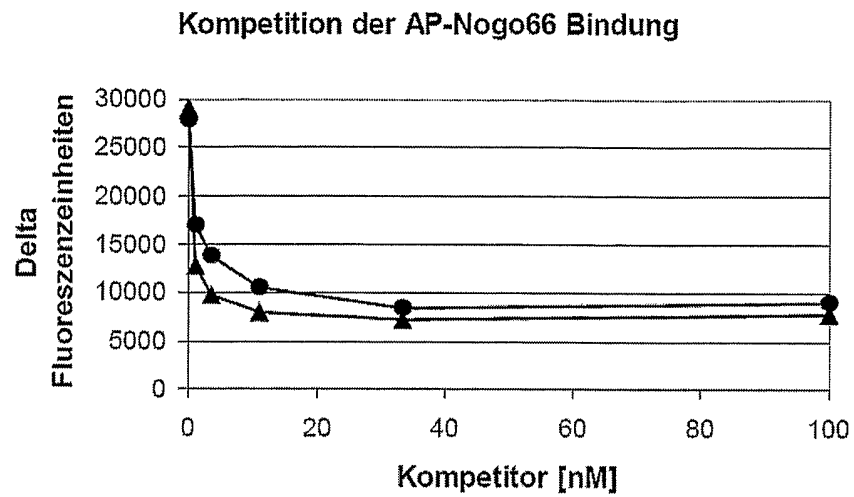


Fig. 9

A)



B)

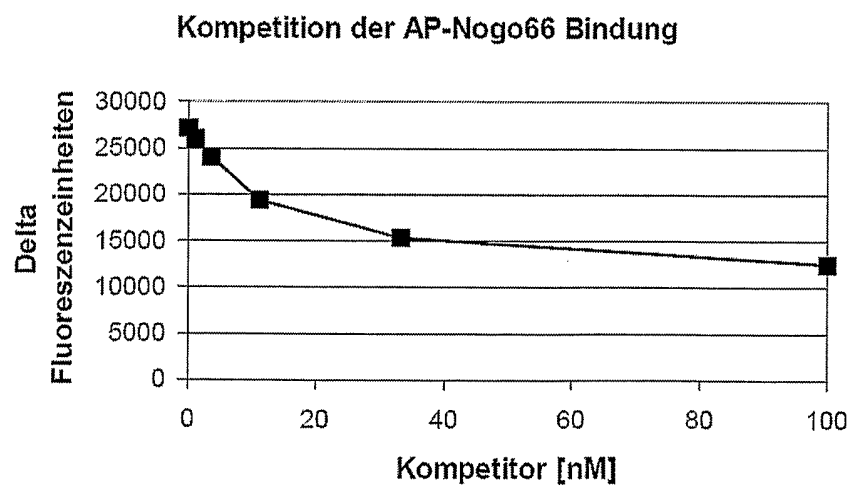
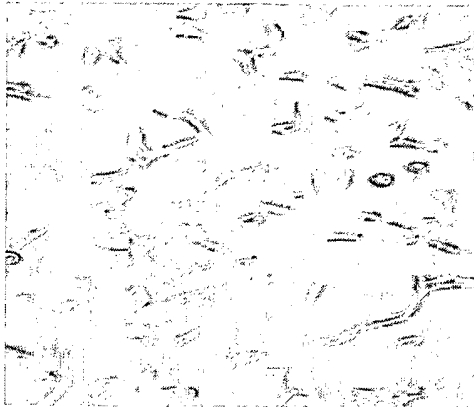
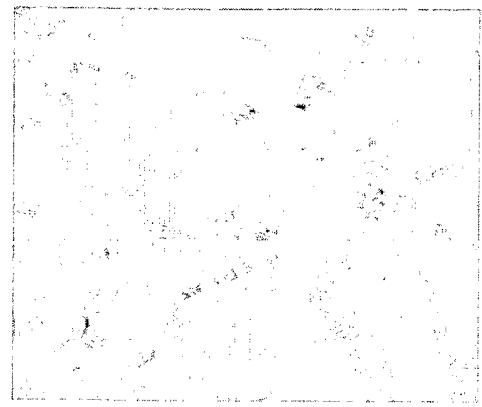


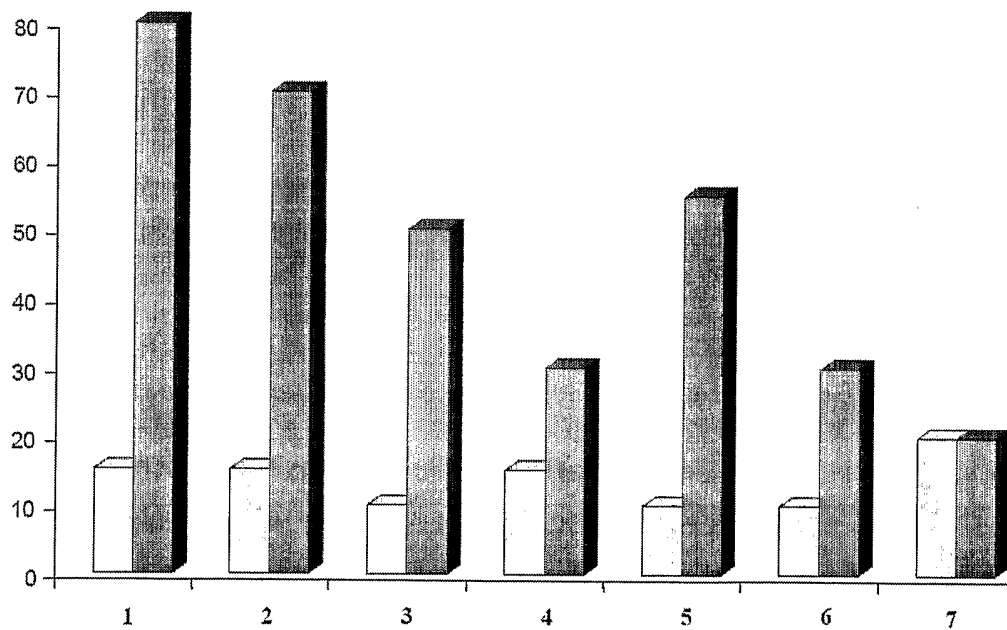
Fig. 10

A)

unstimuliert



stimuliert mit AP-nogo66

B)**Fig. 11**

Herkömmliches Antiserum

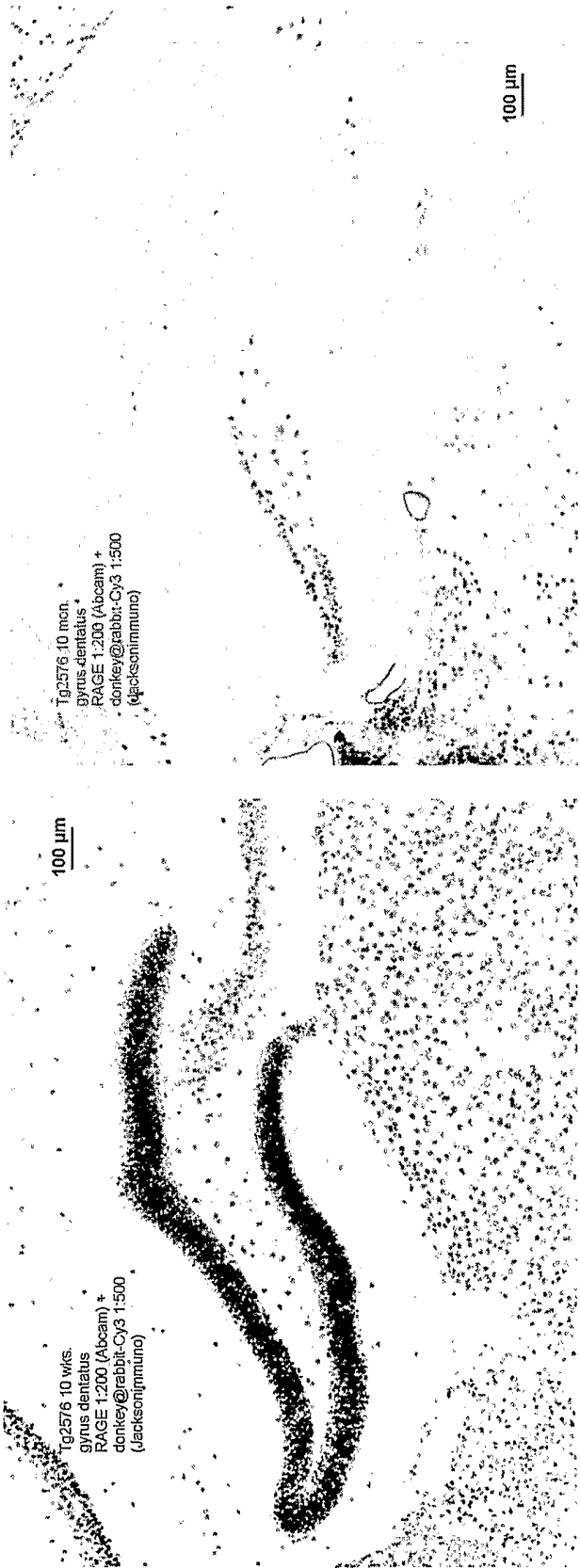


Fig. 12a

Erfindungsgemäßes NtermR 31 Antiserum

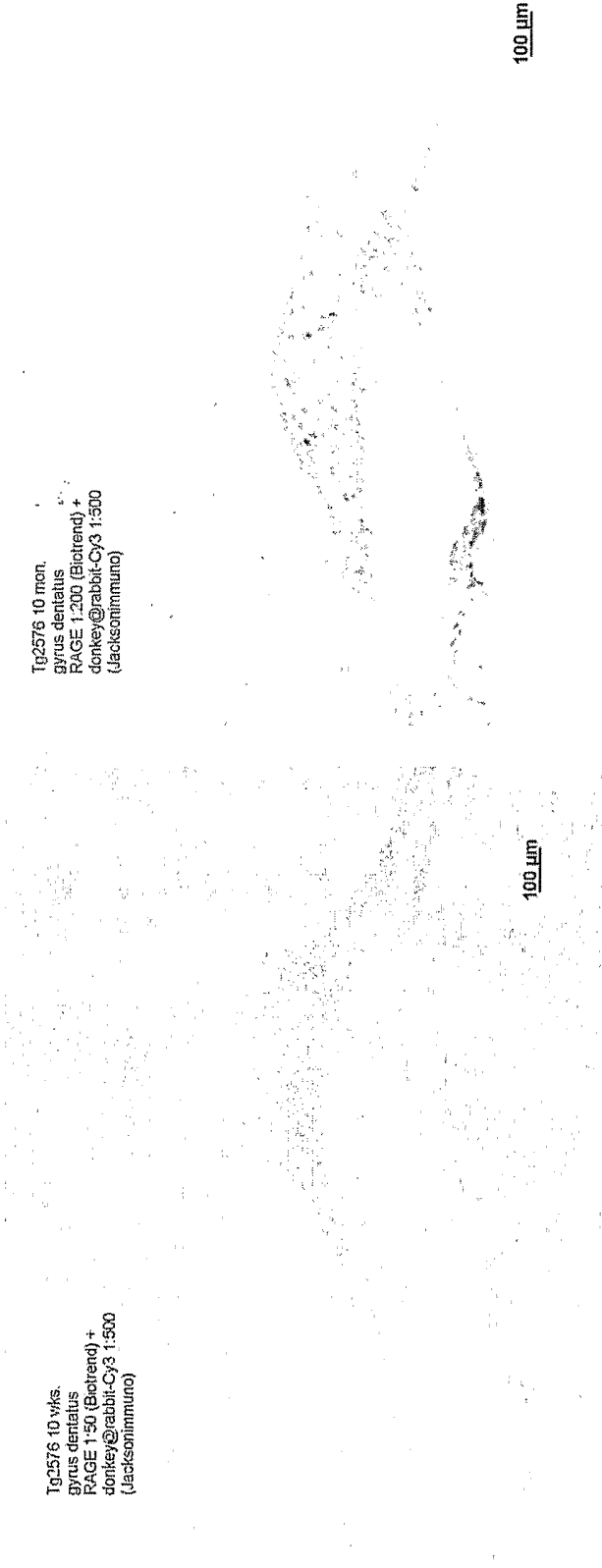


Fig. 12b

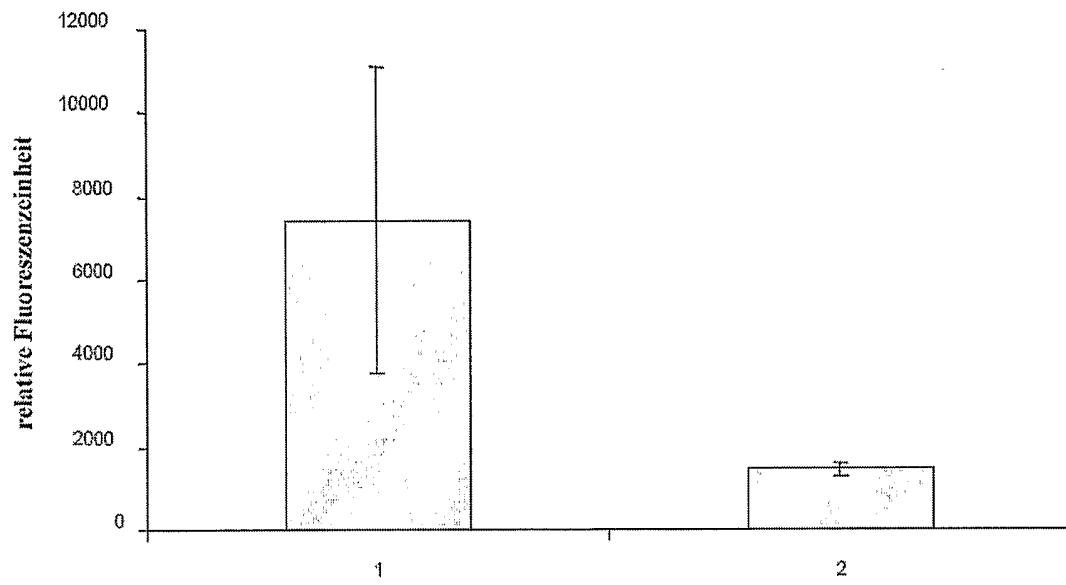
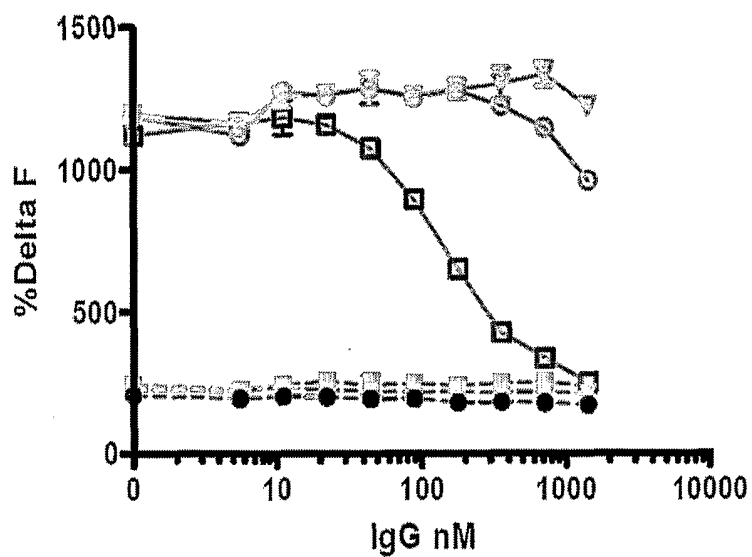


Fig. 13

Verdrängung der sRAGE - A β Globulomer Bindung durch Antikörper



- AF1145 -Rage
- AF1145 +Rage
- Kaninchen IgG -Control -Rage
- Kaninchen IgG -Control +Rage
- anti-NtermR31 IgG # 6304 -RAGE
- anti NtermR31 IgG # 6304 +Rage

Fig. 14

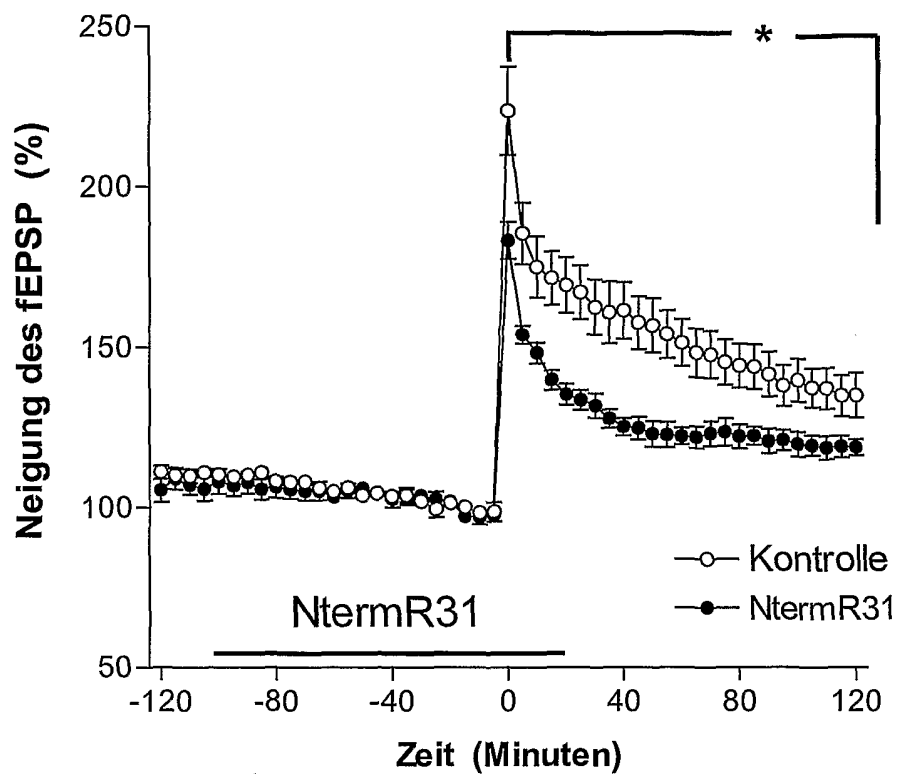


Fig. 15

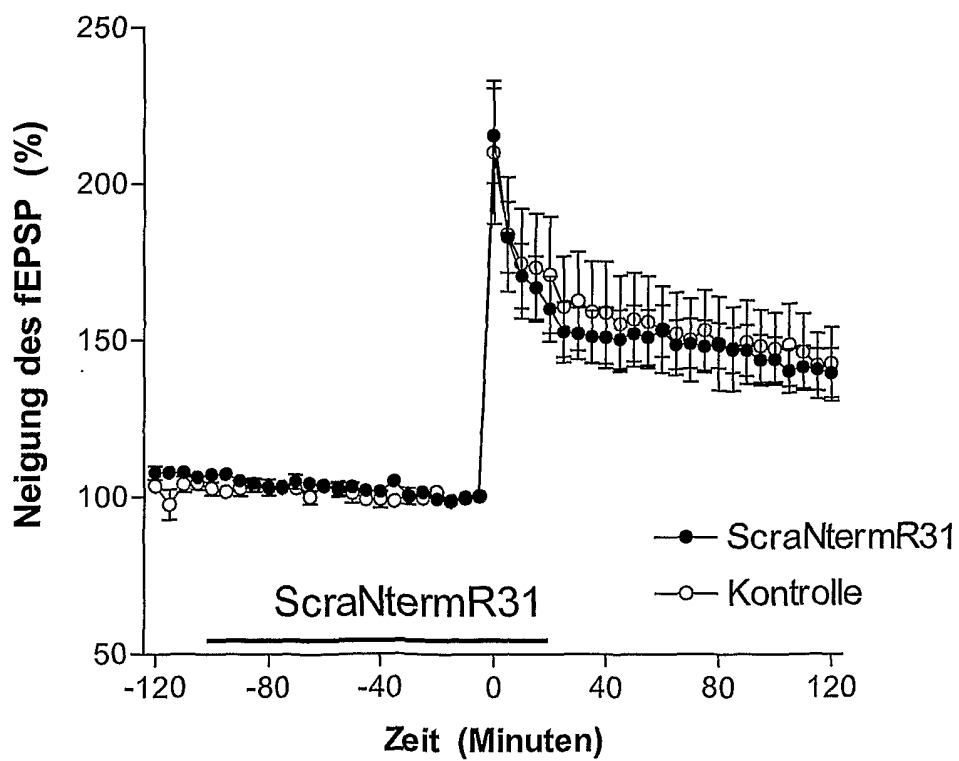


Fig. 16

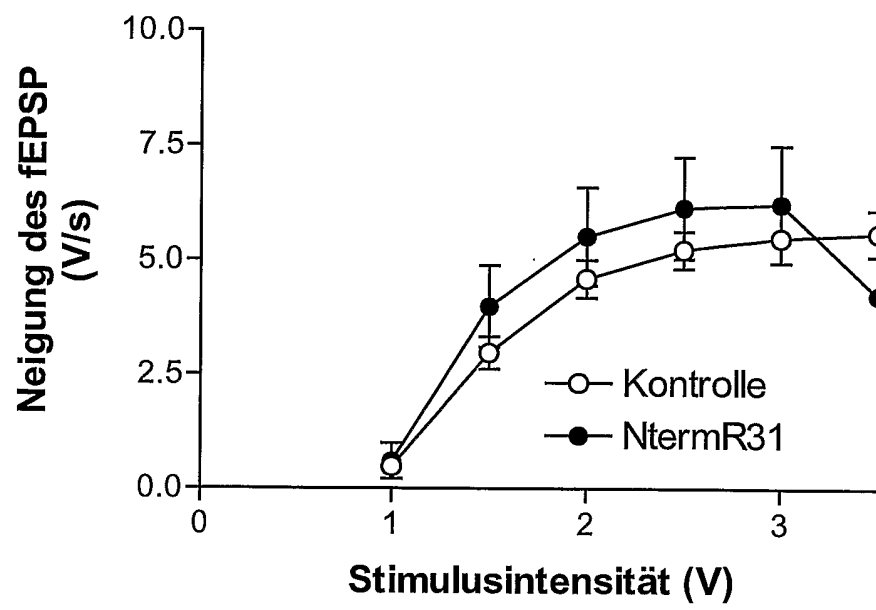


Fig. 17

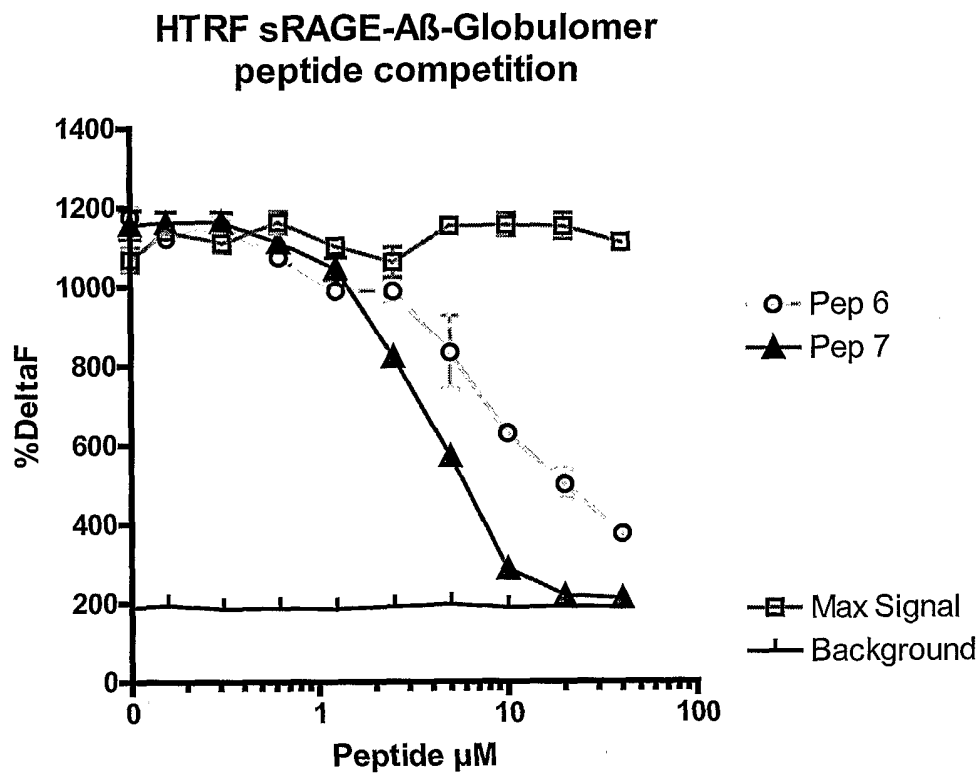


Fig. 18

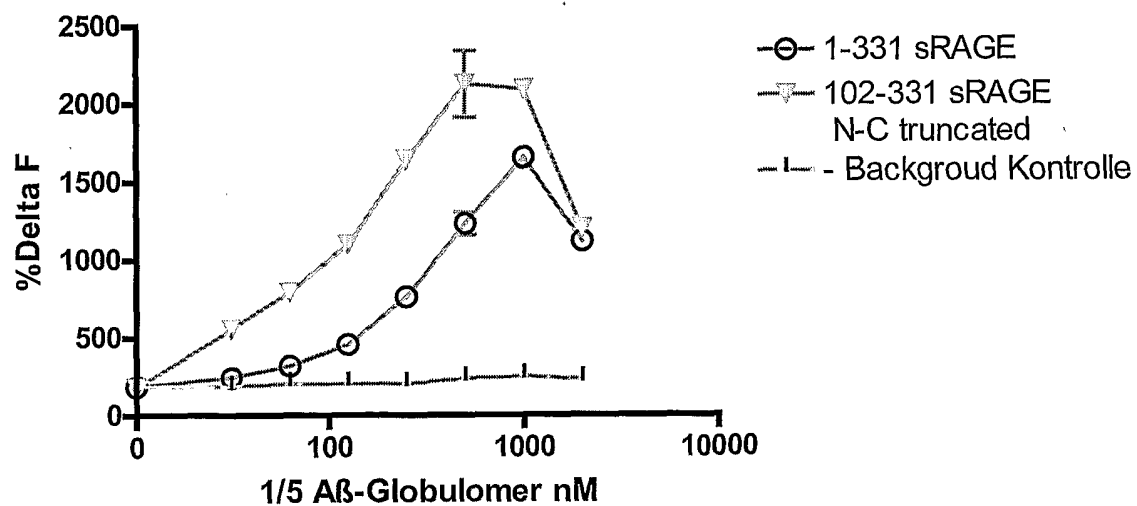
HTRF sRAGE - Globulomer Binding

Fig. 19

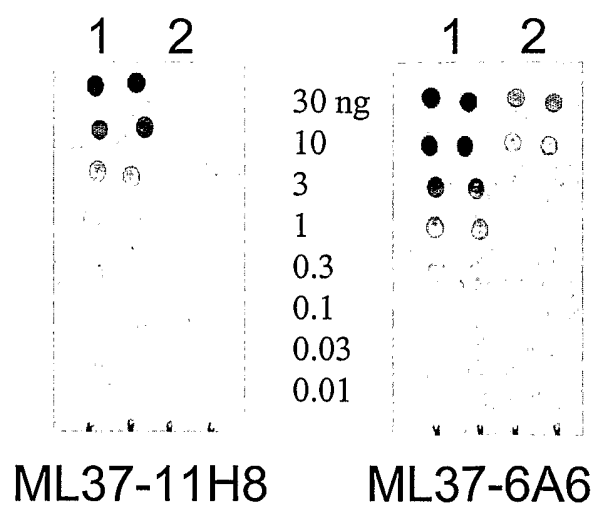


Fig. 20

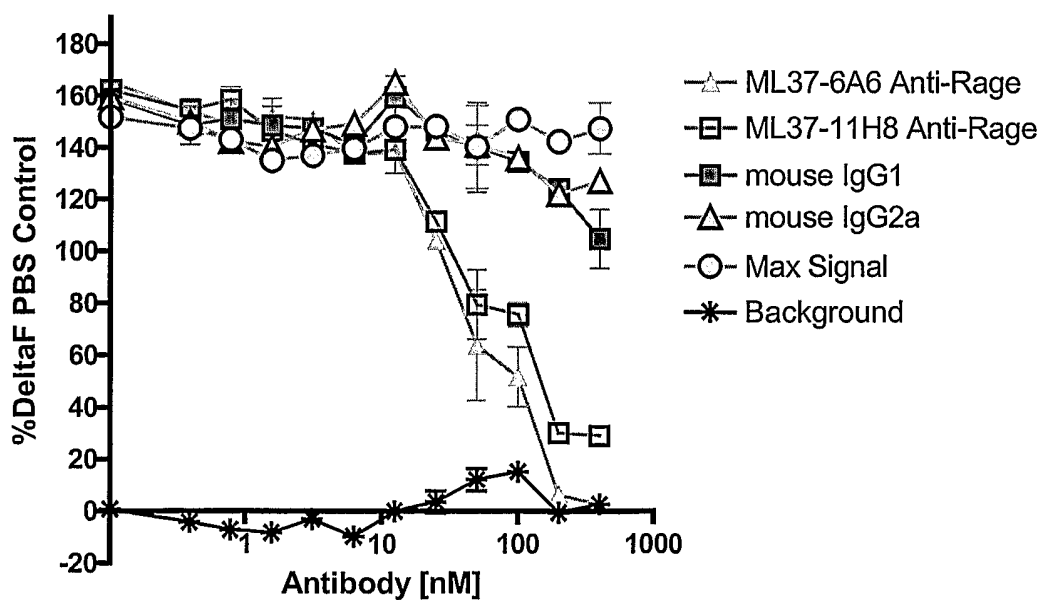


Fig. 21

SEQUENCE LISTING

<110> Abbott GmbH & Co. KG

<120> AGER-RME and AGER-CDF

<130> M/45213

<160> 37

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> AGER-RME Sequence

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2) .. (2)

<223> Xaa is Lys or Arg

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (9)..(9)

<223> Xaa is Pro or Thr

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (11)..(11)

<223> Xaa is Gln, Lys or Arg

<400> 1

Cys Xaa Gly Ala Pro Lys Lys Pro Xaa Gln Xaa Leu Glu
1 5 10

<210> 2

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Nterm13-1

<400> 2

Cys Arg Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Gln Leu Glu
1 5 10

<210> 3

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Nterm13

<400> 3

Cys Lys Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg Leu Glu
1 5 10

<210> 4

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Nterm13-2

<400> 4

Cys Lys Gly Ala Pro Lys Lys Pro Thr Gln Lys Leu Glu
1 5 10

<210> 5

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Partial AGER-RME sequence

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (8)..(8)

<223> Xaa is Lys or Glu

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (11)..(11)

<223> Xaa is Val or Met

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (13)..(13)

<223> Xaa is Asn, Ser or Lys

<400> 5

Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Xaa Pro Leu Xaa Leu Xaa
1 5 10

<210> 6

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Nterm31

<400> 6

Gln	Asn	Ile	Thr	Ala	Arg	Ile	Gly	Glu	Pro	Leu	Val	Leu	Lys	Cys	Lys
1				5					10					15	

Gly	Ala	Pro	Lys	Lys	Pro	Pro	Gln	Arg	Leu	Glu	Trp	Lys	Leu	Asn
			20					25					30	

<210> 7

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ScraNterm31

<400> 7

Ala	Pro	Leu	Ala	Cys	Pro	Arg	Glu	Leu	Ile	Lys	Gly	Lys	Trp	Glu	Val
1				5					10					15	

Lys	Pro	Lys	Arg	Asn	Pro	Lys	Asn	Gln	Leu	Thr	Ile	Gly	Gln	Leu
			20					25					30	

<210> 8

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ScraNterm13

<400> 8

Gly Lys Pro Arg Ala Pro Lys Cys Leu Lys Pro Glu Gln
1 5 10

<210> 9

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer mez402

<400> 9

gccaccatga ggatatacaa ggggtgtgatc c

31

<210> 10

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer mez404

<400> 10

cttcagagaa tcaactaaat catc

24

<210> 11

<211> 6850

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Plasmid pP-tag5APnogo66

<400> 11

aattgcatga agaatctgct tagggtagg cgttttgcgc tgcttcgcga tgtacggggc	60
agatatacgc gttgacattg attattgact agttattaat agtaatcaat tacgggggtca	120
ttagttcata gcccatatat ggagttccgc gttacataac ttacggtaaa tggcccgcc	180
ggctgaccgc ccaacgaccc ccgcccattg acgtcaataa tgacgtatgt tcccatagta	240
acgccaatag ggactttcca ttgacgtcaa tgggtggact atttacggta aactgcccac	300
ttggcagtac atcaagtgtg tcatatgcc agtacgccc ctattgacgt caatgacggt	360
aaatggccc cctggcatta tgcccagtac atgaccttat gggactttcc tacttggcag	420
tacatctacg tattagtcac cgctattacc atgggtgatgc ggttttggca gtacatcaat	480
gggcgtggat agcgggtttga ctacgggga tttccaagtc tccaccccat tgacgtcaat	540
gggagtttgt tttggcacca aaatcaacgg gactttccaa aatgtcgtaa caactccgcc	600
ccattgacgc aaatgggcgg taggcgtgta cgggtggagg tctatataag cagagctctc	660
tggctaacta gagaaccac tgcttactgg cttatcgaaa ttaatacgac tcactatagg	720
gagacccaag ctggctagcc accatggaga cagacacact cctgctatgg gtactgctgc	780
tctgggttcc aggttccact ggtgacgcgg ccagccggc caggcgcgcg gcccgtagt	840
acgaagctta cgtaagatct tcoggaatca tcccagttga ggaggagaac ccggacttct	900
ggaaccgcga ggcagccgag gccctgggtg ccgccaagaa gctgcagcct gcacagacag	960
ccgccaagaa cctcatcatc ttccctgggc atgggatggg ggtgtctacg gtgacagctg	1020

ccaggatcct aaaagggcag aagaaggaca aactggggcc tgagataccc ctggccatgg 1080
accgcttccc atatgtggct ctgtccaaga catacaatgt agacaaacat gtgccagaca 1140
gtggagccac agccacggcc tacctgtgcg ggggtcaaggc caacttccag accattggct 1200
tgagtgcagc cgcccgcttt aaccagtgc acacgacacg cggcaacgag gtcattctcg 1260
tgatgaatcg ggccaagaaa gcagggaggt cagtgggagt ggtaaccacc acacgagtgc 1320
agcacgcctc gccagccggc acctacgccc acacgggtgaa ccgcaactgg tactcggacg 1380
ccgacgtgcc tgccctggcc cgccaggagg ggtgccagga catcgctacg cagctcatct 1440
ccaacatgga cattgacgtg atcctaggtg gaggccgaaa gtacatgttt cccatgggaa 1500
ccccagaccc tgagtacca gatgactaca gccaagggtg gaccaggctg gacgggaaga 1560
atctggtgca ggaatggctg gcgaagcgcc aggggtgccc gtatgtgtgg aaccgactg 1620
agctcatgca ggcttccctg gaccogtctg tgaccatct catgggtctc tttgagcctg 1680
gagacatgaa atacgagatc caccgagact ccacactgga cccctccctg atggagatga 1740
cagaggctgc cctgcgcctg ctgagcagga acccccgcg cttcttcctc ttcgtggagg 1800
gtggtcgcat cgaccatggt catcatgaaa gcagggctta cggggcactg actgagacga 1860
tcatgttcga cgacgccatt gagagggcg gccagctcac cagcgaggag gacacgctga 1920
gcctcgtaac tgccgaccac tcccacgtct tctccttcgg aggctacccc ctgagaggga 1980
gctccatctt cgggctggcc cctggcaagg cccgggacag gaaggcctac acggtcctcc 2040
tatacggaaa cgggtccaggc tatgtgctca aggacggcgc cgggccgat gttaccgaga 2100
gagagagcgg gagcccgag tatcggcagc agtcagcagt gccctggac gaagagaccc 2160
acgcaggcga ggacgtggcg gtgttcgccc gcggcccgca ggcgacactg gttcacggcg 2220
tgcaggagca gaccttcata gcgcacgtca tggccttcgc cgcctgcctg gagccctaca 2280
ccgcctgcga cctggcgccc cccgcgggca ccaccgacgc cgcgcacccg gggtatctcg 2340
aggaagcgct ctctctagat ctggaagttc tgttccaggg gccctggga tctaggatat 2400
acaagggtgt gatccaagct atccagaaat cagatgaagg ccaccattc agggcatatc 2460

tggaatctga agttgctata tctgaggagt tggttcagaa gtacagtaat tctgctcttg 2520
gtcatgtgaa ctgcacgata aaggaaactca ggccgctctt cttagttgat gatttagttg 2580
attctctgaa gtagtctaga agggcccgaa caaaaactca tctcagaaga ggatctgaat 2640
agcgcgctcg accatcatca tcatcatcat tgagtttaaa cccgctgac agcctcgact 2700
gtgccttcta gttgccagcc atctgttgtt tgccctccc ccgtgccttc cttgaccctg 2760
gaagggtgcca ctccactgt cctttcctaa taaaatgagg aaattgcac gcattgtctg 2820
agtaggtgtc attctattct ggggggtggg gtggggcagg acagcaaggg ggaggattgg 2880
gaagacaata gcaggcatgc tggggatgcg gtgggctcta tggcttctga ggcggaaaga 2940
accagctggg gctctagggg gtatccccac gcgccctgta gcggcgcat aagcgcggcg 3000
ggtgtggtgg ttacgcgcag cgtgaccgt acacttgcca gcgccctagc gcccgctcct 3060
ttcgctttct tcccttctt tctcgccacg ttcgccggt tccccgtca agctctaaat 3120
cggggcatcc ctttaggggt ccgatttagt gctttacggc acctcgacc caaaaaactt 3180
gattaggggt atggttcacg tagtgggcca tcgccctgat agacggtttt tcgccctttg 3240
acgttggagt ccacgttctt taatagtga ctctgttcc aaactggaac aacctcaac 3300
cctatctcgg tctattcttt tgatttataa gggattttgg ggatttcggc ctattggtta 3360
aaaaatgagc tgatttaaca aaaatttaac gcgaattaat tctgtggaat gtgtgtcagt 3420
tagggtgtgg aaagtcccca ggctcccag caggcagaag tatgcaaagc atgcatctca 3480
attagtcagc aaccagggtg ggaaagtccc caggctcccc agcaggcaga agtatgcaaa 3540
gcatgcatct caattagtca gcaaccatag tccgcccct aactccgcc atcccgcctc 3600
taactccgcc cagttccgcc cattctccgc cccatggctg actaatTTTT tttatttatg 3660
cagaggccga ggccgctct gcctctgagc tattccagaa gtagtgagga ggcttttttg 3720
gaggcctagg cttttgcaaa aagctcccg gagcttgtat atccattttc ggatctgac 3780
agcacgtgtt gacaattaat catcggcata gtatatcggc atagtataat acgacaagg 3840
gaggaaactaa accatggcca agttgaccag tgccgttccg gtgctcacg cgcgcgacgt 3900

cgccggagcg gtcgagttct ggaccgaccg gctcgggttc tcccgggact tcgtggagga 3960
cgacttcgcc ggtgtggtcc gggacgacgt gaccctgttc atcagcgcg tccaggacca 4020
ggtggtgccg gacaacaccc tggcctgggt gtgggtgcgc ggcctggacg agctgtacgc 4080
cgagtggtcg gaggtcgtgt ccacgaactt ccgggacgcc tccgggcccgg ccatgaccga 4140
gatcggcgag cagccgtggg ggggggagtt cgccctgcgc gacccggccg gcaactgcgt 4200
gcacttcgtg gccgaggagc aggactgaca cgtgctacga gatttcgatt ccaccgccgc 4260
cttctatgaa aggttgggct tcggaatcgt tttccgggac gccggctgga tgatcctcca 4320
gcgcggggat ctcatgctgg agttcttcgc ccacccaac ttgtttattg cagcttataa 4380
tggttacaaa taaagcaata gcatcacaaa tttcacaaat aaagcatttt tttcactgca 4440
ttctagtgtg ggtttgtcca aactcatcaa tgtatcttat catgtctgta taccgtcgac 4500
ctctagctag agcttggcgt aatcatggtc atagctgttt cctgtgtgaa attgttatcc 4560
gctcacaatt ccacacaaca tacgagccgg aagcataaag tgtaaagcct ggggtgccta 4620
atgagtgagc taactcacat taattgcgtt gcgctcactg cccgctttcc agtcgggaaa 4680
cctgtcgtgc cagctgcatt aatgaatcgg ccaacgcgcg gggagaggcg gtttgcgat 4740
tgggcgctct tccgcttcc tgcctcactga ctgcgtgcgc tcggtcgttc ggctgcggcg 4800
agcggtatca gctcactcaa aggcggtaat acggttatcc acagaatcag gggataacgc 4860
aggaaagaac atgtgagcaa aaggccagca aaaggccagg aaccgtaaaa aggcgcgctt 4920
gctggcgttt ttccataggc tccgcccccc tgacgagcat cacaaaaatc gacgctcaag 4980
tcagaggtag cgaaaccga caggactata aagataaccg gcgtttcccc ctggaagctc 5040
cctcgtgcgc tctcctgttc cgaccctgcc gcttaccgga tacctgtccg cttttctccc 5100
ttcgggaagc gtggcgcttt ctcaatgctc acgctgtagg tatctcagtt cgggtgtaggt 5160
cgttcgtccc aagctgggct gtgtgcacga acccccgtt cagcccgacc gctgcgcctt 5220
atccggtaac tatcgtcttg agtccaaccc ggtaagacac gacttatcgc cactggcagc 5280
agccactggt aacaggatta gcagagcgag gtatgtaggc ggtgctacag agttcttgaa 5340

gtggtggcct aactacggct acactagaag gacagtatctt ggtatctgcg ctctgctgaa 5400
gccagttacc ttcggaaaaa gagttggtag ctcttgatcc ggcaaaaaa ccaccgctgg 5460
tagcgggtgt ttttttgttt gcaagcagca gattacgcgc agaaaaaaag gatctcaaga 5520
agatcctttg atcttttcta cggggtctga cgctcagtgg aacgaaaact cacgttaagg 5580
gattttggtc atgagattat caaaaaggat cttcacctag atccttttaa attaaaaatg 5640
aagttttaaa tcaatctaaa gtatatatga gtaaaacttg tctgacagtt accaatgctt 5700
aatcagttag gcacctatct cagcgatctg tctatttcgt tcatccatag ttgcctgact 5760
ccccgtcgtg tagataacta cgatacggga gggcttacca tctggcccca gtgctgcaat 5820
gataccgcga gacccacgct caccggctcc agatttatca gcaataaacc agccagccgg 5880
aagggccgag cgcagaagtg gtcttgcaac tttatccgcc tccatccagt ctattaattg 5940
ttgccgggaa gctagagtaa gtagttcgcc agttaatagt ttgcgcaacg ttgttgccat 6000
tgctacaggc atcgtggtgt cacgctcgtc gtttggtatg gcttcattca gctccggttc 6060
ccaacgatca aggcgagtta catgatcccc catgttgtgc aaaaaagcgg ttagctcctt 6120
cggctctccg atcgttgtca gaagtaagtt ggccgcagtg ttatcactca tggttatggc 6180
agcactgcat aattctctta ctgtcatgcc atccgtaaga tgcttttctg tgactggtga 6240
gtactcaacc aagtcattct gagaatagtg tatgcggcga ccgagttgct cttgcccggc 6300
gtcaatacgg gataataccg cgccacatag cagaacttta aaagtgtca tcattgaaa 6360
acgttcttcg gggcgaaaac tctcaaggat cttaccgctg ttgagatcca gttcgatgta 6420
accactcgt gcaccaact gatcttcagc atcttttact ttcaccagcg tttctgggtg 6480
agcaaaaaa ggaaggcaaa atgccgcaaa aaagggaata agggcgacac ggaaatgttg 6540
aatactcata ctcttccttt ttcaatatta ttgaagcatt tatcagggtt attgtctcat 6600
gagcggatac atatttgaat gtatttagaa aaataaaca ataggggttc cgcgacatt 6660
tccccgaaaa gtgccacctg acgtcgacgg atcgggagat cgatctccg atcccctatg 6720
gtcgactctc agtacaatct gctctgatgc cgcatagtta agccagtatc tgctccctgc 6780

ttgtgtgttg gaggtcgctg agtagtgcgc gagcaaaatt taagctacaa caaggcaagg 6840

ottgaccgac 6850

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer mey35

<400> 12

tcacactggg gatgtggcag 20

<210> 13

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR Primer mey 36

<400> 13

gccaccatgg gggcaggtgc cacc 24

<210> 14

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer mey71

<400> 14

gcagcccat cagtcgc

18

<210> 15

<211> 5523

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Plasmid pcDNA3.1V5-His TOPO

<400> 15

gacggatcgg gagatctccc gatccctat ggtcgactct cagtacaatc tgctctgatg 60

ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtggt ggaggtcgct gagtagtgcg 120

cgagcaaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg aagaatctgc 180

ttagggttag gcgttttgcg ctgcttcgcg atgtacgggc cagatatacg cgttgacatt 240

gattattgac tagttattaa tagtaatcaa ttacggggtc attagttcat agcccatata 300

tggagttccg cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc 360

ccgcccatt gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc 420

attgacgtca atgggtggac tatttacggt aaactgcca cttggcagta catcaagtgt 480

atcatatgcc aagtacgcc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt 540

atgccagta catgacctta tgggactttc ctacttggca gtacatctac gtattagtca 600

tcgctattac catggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg 660

actcacgggg atttccaagt ctccacccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc 720

aaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgta acaactccgc cccattgacg caaatgggcg 780

gtaggcgtgt acggtgggag gtctatataa gcagagctct ctggctaact agagaaccca 840

ctgcttactg gcttatcgaa attaatacga ctactatag ggagacccaa gctggctagt 900

taagcttggg accgagctcg gatccactag tccagtgtgg tggaattgcc cttaagggca 960

attctgcaga tatccagcac agtggcggcc gctcgagtct agagggcccg cggttcgaag 1020

gtaagcctat ccctaaccct ctctcggtc tcgattctac gcgtaccggt catcatcacc 1080

atcaccattg agtttaaacc cgctgatcag cctcgactgt gccttctagt tgccagccat 1140

ctgttgtttg cccctcccc gtgccttcct tgaccctgga aggtgccact cccactgtcc 1200

tttcctaata aaatgaggaa attgcatcgc attgtctgag taggtgtcat tctattctgg 1260

ggggtggggt ggggcaggac agcaaggggg aggattggga agacaatagc aggcacgtctg 1320

gggatgcggt gggctctatg gcttctgagg cgaaagaac cagctggggc tctagggggg 1380

atccccacgc gccctgtagc ggcgcattaa gcgcggcggg tgtgggtggtt acgcgcagcg 1440

tgaccgctac acttgccagc gccctagcgc ccgctccttt cgctttcttc ccttcctttc 1500

tgccacgtt cgccggcctt ccccgtaag ctctaaatcg gggcatccct ttagggttcc 1560

gatttagtgc ttacggcac ctgcaccca aaaaacttga ttaggggtgat ggttcacgta 1620

gtgggccatc gccctgatag acggtttttc gccctttgac gttggagtcc acgttcttta 1680

atagtggact cttgttccaa actggaacaa cactcaacc tatctcggtc tattcttttg 1740

atttataagg gattttggg atttcggcct attgggttaa aaatgagctg atttaacaaa 1800

aatttaacgc gaattaattc tgtggaatgt gtgtcagtta ggggtgtggaa agtccccagg 1860

ctccccaggc aggcagaagt atgcaaagca tgcattctca ttagtcagca accaggtgtg 1920

gaaagtcccc aggcctccca gcaggcagaa gtatgcaaag catgcatctc aattagtcag 1980

caaccatagt cccgccccta actccgcca tcccgccct aactccgcc agttccgcc 2040

attctccgcc ccatggctga ctaatttttt ttatttatgc agaggccgag gccgcctctg 2100

cctctgagct attccagaag tagtgaggag gcttttttgg aggcctaggc ttttgcaaaa 2160
agctcccggg agcttgtata tccattttcg gatctgatca agagacagga tgaggatcgt 2220
ttcgcatgat tgaacaagat ggattgcacg caggttctcc ggccgcttgg gtggagagggc 2280
tattcggcta tgactgggca caacagacaa tcggctgctc tgatgccgcc gtgttcgggc 2340
tgtcagcgca gggggcggcg gttctttttg tcaagaccga cctgtccggg gccctgaatg 2400
aactgcagga cgaggcagcg cggctatcgt ggctggccac gacgggcgtt ccttgcgag 2460
ctgtgctcga cgttgtcact gaagcgggaa gggactggct gctattgggc gaagtgccgg 2520
ggcaggatct cctgtcatct caccttgctc ctgccgagaa agtatccatc atggctgatg 2580
caatgcggcg gctgcatacg cttgatccgg ctacctgcc attcgaccac caagcgaaac 2640
atcgcatcga gcgagcacgt actcggatgg aagccggtct tgcgatcag gatgatctgg 2700
acgaagagca tcaggggctc gcgccagccg aactgttcgc caggctcaag gcgcgcatgc 2760
ccgacggcga ggatctcgtc gtgaccatg gcgatgcctg cttgccgaat atcatggtgg 2820
aaaatggccg cttttctgga ttcacgact gtggccggct ggggtgtggcg gaccgctatc 2880
aggacatagc gttggctacc cgtgatattg ctgaagagct tggcggcgaa tgggctgacc 2940
gcttcctcgt gctttacggt atcgccgctc ccgattogca gcgcatcgcc ttctatcgcc 3000
ttcttgacga gttcttctga gcgggactct ggggttcgcg aaatgaccga ccaagcgacg 3060
cccaacctgc catcacgaga tttcgattcc accgccgcct tctatgaaag gttgggcttc 3120
ggaatcgttt tccgggacgc cggctggatg atcctccagc gcggggatct catgctggag 3180
ttcttcgccc accccaactt gtttattgca gcttataatg gttacaaata aagcaatagc 3240
atcacaaatt tcacaaataa agcatttttt tcaactgcatt ctagttgtgg tttgtccaaa 3300
ctcatcaatg tatcttatca tgtctgtata ccgtcgacct ctagctagag cttggcgtaa 3360
tcatggtcat agctgtttcc tgtgtgaaat tgttatccgc tcacaattcc acacaacata 3420
cgagccggaa gcataaagtg taaagcctgg ggtgcctaata gagtgagcta actcacatta 3480
attgcgttgc gctcactgcc cgctttccag tcgggaaacc tgtcgtgccca gctgcattaa 3540

tgaatcggcc aacgcgcggg gagaggcggg ttgcgtattg ggcgctcttc cgcttcctcg 3600
ctcactgact cgctgcgctc ggtcgttcgg ctgcggcgag cggatcagc tcaactcaaag 3660
gcggtaatac ggttatccac agaatacagg gataacgcag gaaagaacat gtgagcaaaa 3720
ggccagcaaa aggccaggaa ccgtaaaaag gccgcgttgc tggcggtttt ccataggctc 3780
cgccccctg acgagcatca caaaaatcga cgctcaagtc agagggtggcg aaacccgaca 3840
ggactataaa gataccaggc gtttccccct ggaagctccc tcgtgcgctc tcctgttccg 3900
accctgcgcg ttaccggata cctgtccgcc tttctccctt cgggaagcgt ggcgctttct 3960
caatgctcac gctgtaggta tctcagttcg gtgtaggctg ttcgctccaa gctgggctgt 4020
gtgcacgaac ccccggttca gcccgaccgc tgcgccttat ccggtacta tcgtcttgag 4080
tccaacccgg taagacacga cttatcgcca ctggcagcag ccaactggtaa caggattagc 4140
agagcgaggg atgtaggcgg tgctacagag ttottgaagt ggtggcctaa ctacggctac 4200
actagaagga cagtatttgg tatctgcgct ctgctgaagc cagttacott cggaaaaaga 4260
gttggtagct cttgatccgg caaacaacc accgctggta gcggtggttt ttttgtttgc 4320
aagcagcaga ttacgcgcag aaaaaagga tctcaagaag atcctttgat cttttctacg 4380
gggtctgacg ctcagtggaa cgaaaactca cgttaaggga ttttggcat gagattatca 4440
aaaaggatct tcacctagat ctttttaa ataaaaatgaa gttttaaatc aatctaaagt 4500
atatatgagt aaacttggc tgacagttac caatgcttaa tcagtgaggc acctatctca 4560
gcgatctgtc tatttcgttc atccatagtt gcctgactcc ccgtcgtgta gataactacg 4620
atacgggagg gcttaccatc tggccccagt gctgcaatga taccgcgaga cccacgctca 4680
cgggctccag atttatcagc aataaaccag ccagccggaa gggccgagcg cagaagtggg 4740
cctgcaactt tatccgcctc catccagtct attaatgtt gccgggaagc tagagtaagt 4800
agttcgccag ttaatagttt gcgcaacgtt gttgccattg ctacaggcat cgtgggtgtca 4860
cgctcgtcgt ttggtatggc ttcattcagc tccggttccc aacgatcaag gcgagttaca 4920
tgatcccca tgttggtgcaa aaaagcgggt agctccttcg gtcctccgat cgttgtcaga 4980

agtaagttgg ccgcagtgtt atcactcatg gttatggcag cactgcataa ttctcttact 5040
gtcatgccat ccgtaagatg cttttctgtg actgggtgagt actcaaccaa gtcattctga 5100
gaatagtgtg tgcggcgacc gagggtgtct tgcccggcgt caatacggga taataccgcg 5160
ccacatagca gaactttaaa agtgctcatc attggaaaac gttcttcggg gcgaaaactc 5220
tcaaggatct taccgctgtt gagatccagt tcgatgtaac cactcgtgc acccaactga 5280
tcttcagcat cttttacttt caccagcgtt tctgggtgag caaaaacagg aaggcaaaat 5340
gccgcaaaaa agggaataag ggcgacacgg aaatgttgaa tactcatact cttccttttt 5400
caatattatt gaagcattta tcagggttat tgtctcatga gcggatacat atttgaatgt 5460
atttagaaaa ataaacaaat aggggttccg cgcacatttc cccgaaaagt gccacctgac 5520
gtc 5523

<210> 16

<211> 13612

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Plasmid pcDNA3.1 hp75 Nr.16

<220>

<221> CDS

<222> (40)..(1320)

<223> human p75 sequence

<400> 16

gatccactag tccagtgtgg tggaattgcc cttgccacc atg ggg gca ggt gcc 54

	Met	Gly	Ala	Gly	Ala	
	1				5	
acc ggc cgc gcc atg gac ggg ccg cgc ctg ctg ctg ttg ctg ctt ctg						102
Thr Gly Arg Ala Met Asp Gly Pro Arg Leu Leu Leu Leu Leu Leu						
	10		15		20	
ggg gtg tcc ctt gga ggt gcc aag gag gca tgc ccc aca ggc ctg tac						150
Gly Val Ser Leu Gly Gly Ala Lys Glu Ala Cys Pro Thr Gly Leu Tyr						
	25		30		35	
acg cac agc ggt gag tgc tgc aaa gcc tgc aac ctg ggc gag ggt gtg						198
Thr His Ser Gly Glu Cys Cys Lys Ala Cys Asn Leu Gly Glu Gly Val						
	40		45		50	
gcc cag cct tgt gga gcc aac cag acc gtg tgt gag ccc tgc ctg gac						246
Ala Gln Pro Cys Gly Ala Asn Gln Thr Val Cys Glu Pro Cys Leu Asp						
	55		60		65	
agc gtg acg ttc tcc gac gtg gtg agc gcg acc gag ccg tgc aag ccg						294
Ser Val Thr Phe Ser Asp Val Val Ser Ala Thr Glu Pro Cys Lys Pro						
70		75		80		85
tgc acc gag tgc gtg ggg ctc cag agc atg tcg gcg ccg tgc gtg gag						342
Cys Thr Glu Cys Val Gly Leu Gln Ser Met Ser Ala Pro Cys Val Glu						
	90		95		100	
gcc gac gac gcc gtg tgc cgc tgc gcc tac ggc tac tac cag gat gag						390
Ala Asp Asp Ala Val Cys Arg Cys Ala Tyr Gly Tyr Tyr Gln Asp Glu						
	105		110		115	
acg act ggg cgc tgc gag gcg tgc cgc gtg tgc gag gcg ggc tcg ggc						438
Thr Thr Gly Arg Cys Glu Ala Cys Arg Val Cys Glu Ala Gly Ser Gly						
	120		125		130	
ctc gtg ttc tcc tgc cag gac aag cag aac acc gtg tgc gag gag tgc						486
Leu Val Phe Ser Cys Gln Asp Lys Gln Asn Thr Val Cys Glu Glu Cys						
	135		140		145	
ccc gac ggc acg tat tcc gac gag gcc aac cac gtg gac ccg tgc ctg						534
Pro Asp Gly Thr Tyr Ser Asp Glu Ala Asn His Val Asp Pro Cys Leu						
150		155		160		165
ccc tgc acc gtg tgc gag gac acc gag cgc cag ctc cgc gag tgc aca						582
Pro Cys Thr Val Cys Glu Asp Thr Glu Arg Gln Leu Arg Glu Cys Thr						
	170		175		180	
cgc tgg gcc gac gcc gag tgc gag gag atc cct ggc cgt tgg att aca						630

Arg Trp Ala Asp Ala Glu Cys Glu Glu Ile Pro Gly Arg Trp Ile Thr	
185 190 195	
cgg tcc aca ccc cca gag ggc tcg gac agc aca gcc ccc agc acc cag	678
Arg Ser Thr Pro Pro Glu Gly Ser Asp Ser Thr Ala Pro Ser Thr Gln	
200 205 210	
gag cct gag gca cct cca gaa caa gac ctc ata gcc agc acg gtg gca	726
Glu Pro Glu Ala Pro Pro Glu Gln Asp Leu Ile Ala Ser Thr Val Ala	
215 220 225	
ggg gtg gtg acc aca gtg atg ggc agc tcc cag ccc gtg gtg acc cga	774
Gly Val Val Thr Thr Val Met Gly Ser Ser Gln Pro Val Val Thr Arg	
230 235 240 245	
ggc acc acc gac aac ctc atc cct gtc tat tgc tcc atc ctg gct gct	822
Gly Thr Thr Asp Asn Leu Ile Pro Val Tyr Cys Ser Ile Leu Ala Ala	
250 255 260	
gtg gtt gtg ggt ctt gtg gcc tac ata gcc ttc aag agg tgg aac agc	870
Val Val Val Gly Leu Val Ala Tyr Ile Ala Phe Lys Arg Trp Asn Ser	
265 270 275	
tgc aag cag aac aag caa gga gcc aac agc cgg cca gtg aac cag acg	918
Cys Lys Gln Asn Lys Gln Gly Ala Asn Ser Arg Pro Val Asn Gln Thr	
280 285 290	
ccc cca cca gag gga gaa aaa ctc cac agc gac agt ggc atc tcc gtg	966
Pro Pro Pro Glu Gly Glu Lys Leu His Ser Asp Ser Gly Ile Ser Val	
295 300 305	
gac agc cag agc ctg cat gac cag cag ccc cac acg cag aca gcc tcg	1014
Asp Ser Gln Ser Leu His Asp Gln Gln Pro His Thr Gln Thr Ala Ser	
310 315 320 325	
ggc cag gcc ctc aag ggt gac gga ggc ctc tac agc agc ctg ccc cca	1062
Gly Gln Ala Leu Lys Gly Asp Gly Gly Leu Tyr Ser Ser Leu Pro Pro	
330 335 340	
gcc aag cgg gag gag gtg gag aag ctt ctc aac ggc tct gcg ggg gac	1110
Ala Lys Arg Glu Glu Val Glu Lys Leu Leu Asn Gly Ser Ala Gly Asp	
345 350 355	
acc tgg cgg cac ctg gcg ggc gag ctg ggc tac cag ccc gag cac ata	1158
Thr Trp Arg His Leu Ala Gly Glu Leu Gly Tyr Gln Pro Glu His Ile	
360 365 370	
gac tcc ttt acc cat gag gcc tgc ccc gtt cgc gcc ctg ctt gca agc	1206

Asp Ser Phe Thr His Glu Ala Cys Pro Val Arg Ala Leu Leu Ala Ser	
375	380 385
tgg gcc acc cag gac agc gcc aca ctg gac gcc ctc ctg gcc gcc ctg	1254
Trp Ala Thr Gln Asp Ser Ala Thr Leu Asp Ala Leu Leu Ala Ala Leu	
390	395 400 405
cgc cgc atc cag cga gcc gac ctc gtg gag agt ctg tgc agt gag tcc	1302
Arg Arg Ile Gln Arg Ala Asp Leu Val Glu Ser Leu Cys Ser Glu Ser	
	410 415 420
act gcc aca tcc cca gtg tgaaagggca attctgcaga tatccagcac	1350
Thr Ala Thr Ser Pro Val	
	425
agtggcggcc gctcgagtct agagggcccg cggttcgaag gtaagcctat ccctaaccct	1410
ctcctcggtc tcgattctac gcgtaccggt catcatcacc atcaccattg agtttaaacc	1470
cgctgatcag cctcgactgt gccttctagt tgccagccat ctgttgtttg cccctcccc	1530
gtgccttcct tgaccctgga aggtgccact ccactgtcc tttcctaata aaatgaggaa	1590
attgcatcgc attgtctgag taggtgtcat tctattctgg ggggtgggt ggggcaggac	1650
agcaaggggg aggattggga agacaatagc aggcattgctg gggatgcggt gggctctatg	1710
gcttctgagg cggaagaac cagctggggc tctaggggt atccccacgc gccctgtagc	1770
ggcgcattaa gcgcggcggg tgtggtggtt acgcgcagcg tgaccgctac acttgccagc	1830
gccctagcgc ccgctccttt cgctttcttc ccttcctttc tcgccacgtt cgccggcttt	1890
ccccgtcaag ctctaaatcg gggcatccct ttaggggtcc gatttagtgc ttacggcac	1950
ctcgacccca aaaaacttga ttaggggtgat gggtcacgta gtgggccatc gccctgatag	2010
acggtttttc gccctttgac gttggagtcc acgttcttta atagtggact cttgttccaa	2070
actggaacaa cactcaacc tatctcggtc tattcttttg atttataagg gatthtgggg	2130
atttcggcct attggttaaa aatgagctg atttaacaaa aatttaacgc gaattaattc	2190
tgtggaatgt gtgtcagtta ggggtgtggaa agtccccagg ctccccaggc aggcagaagt	2250
atgcaaagca tgcattctcaa ttagtcagca accagggtgtg gaaagtcccc aggctcccca	2310
gcaggcagaa gtatgcaaag catgcatctc aattagtcag caaccatagt cccgccccta	2370

actccgcca tcccgccct aactccgcc agttccgcc attctccgcc ccatggctga 2430
ctaatttttt ttatttatgc agaggccgag gccgcctctg cctctgagct attccagaag 2490
tagtgaggag gcttttttgg aggcctaggc ttttgcaaaa agctccggg agcttgata 2550
tccattttcg gatctgatca agagacagga tgaggatcgt ttcgcatgat tgaacaagat 2610
ggattgcacg caggttctcc ggccgcttgg gtggagaggc tattcggcta tgactgggca 2670
caacagacaa tcggctgctc tgatgccgcc gtgttcggc tgtcagcgca ggggcgccc 2730
gttctttttg tcaagaccga cctgtccggt gccctgaatg aactgcagga cgaggcagcg 2790
cggctatcgt ggctggccac gacggcggtt ccttgccgag ctgtgctcga cgttgtcact 2850
gaagcgggaa gggactggct gctattgggc gaagtgcgg ggaggatct cctgtcatct 2910
caccttgctc ctgccgagaa agtatccatc atggctgatg caatgcggcg gctgcatacg 2970
cttgatccgg ctacctgcc attcgaccac caagcgaaac atcgcatcga gcgagcacgt 3030
actcggatgg aagccggtct tgcgatcag gatgatctgg acgaagagca tcaggggctc 3090
gcgccagccg aactgttcgc caggctcaag gcgcgcatgc ccgacggcg ggatctcgtc 3150
gtgacccatg gcgatgcctg cttgccgaat atcatggtgg aaaatggccg cttttctgga 3210
ttcatcgact gtggccggct ggggtgtggc gaccgctatc aggacatagc gttggctacc 3270
cgtgatattg ctgaagagct tggcggcgaa tgggctgacc gcttcctcgt gctttacggt 3330
atcgccgctc ccgattcgca gcgcatcgcc ttctatcgcc ttcttgacga gttcttctga 3390
gcgggactct ggggttcgcg aaatgaccga ccaagcgacg cccaacctgc catcacgaga 3450
tttcgattcc accgccgct tctatgaaag gttgggcttc ggaatcggtt tccgggacgc 3510
cggctggatg atcctccagc gcggggatct catgctggag ttcttcgccc accccaactt 3570
gtttattgca gcttataatg gttacaaata aagcaatagc atcaciaatt tcacaaataa 3630
agcatttttt tcaactgcatt ctagtgtgg tttgtccaaa ctcacatg tatcttatca 3690
tgtctgtata ccgtcgacct ctgctagag cttggcgtaa tcatggtcat agctgtttcc 3750
tgtgtgaaat tgttatccgc tcacaattcc acacaacata cgagccggaa gcataaagtg 3810

taaagcctgg ggtgcctaata gagtgagcta actcacatta attgcgttgc gctcactgcc 3870
cgctttccag tcgggaaacc tgtcgtgcc a gctgcattaa tgaatcggcc aacgcgcggg 3930
gagaggcggg ttgcgtattg ggcgctcttc cgcttcctcg ctcaactgact cgctgcgctc 3990
ggtcgttcgg ctgcggcgag cggatcagc tcaactcaaag gcggtataac ggttatccac 4050
agaatcaggg gataacgcag gaaagaacat gtgagcaaaa ggccagcaaa aggccaggaa 4110
ccgtaaaaag gccgcgttgc tggcgttttt ccataggctc cgccccctg acgagcatca 4170
caaaaatcga cgctcaagtc agagggtggc aaacccgaca ggactataaa gataccaggc 4230
gtttccccct ggaagctccc tcgtgcgctc tcctgttccg accctgccgc ttaccggata 4290
cctgtccgcc tttctccctt cgggaagcgt ggcgctttct caatgctcac gctgtaggta 4350
tctcagttcg gtgtaggctg ttgcgtccaa gctgggctgt gtgcacgaac ccccggttca 4410
gcccgaccgc tgcgccttat ccggtaaacta tcgtcttgag tccaaccgg taagacacga 4470
cttatcgcca ctggcagcag ccaactgtaa caggattagc agagcgaggc atgtaggcgg 4530
tgctacagag ttcttgaagt ggtggcctaa ctacggctac actagaagga cagtatttgg 4590
tatctgcgct ctgctgaagc cagttacott cggaaaaaga gttggttagct cttgatccgg 4650
caaacaaacc accgctggta gcgggtggtt ttttgtttgc aagcagcaga ttacgcgcag 4710
aaaaaaagga tctcaagaag atcctttgat cttttctacg ggtctgacg ctcaagtggaa 4770
cgaaaactca cgttaaggga ttttggtcat gagattatca aaaaggatct tcacctagat 4830
ccttttaaat taaaaatgaa gttttaaatc aatctaaagt atatatgagt aaacttggtc 4890
tgacagttac caatgcttaa tcagtgggc acctatctca gcgatctgtc tatttcggtc 4950
atccatagtt gcctgactcc ccgtcgtgta gataactacg atacgggagg gcttaccatc 5010
tggtcccgag gctgcaatga taccgcgaga cccacgctca ccggctccag atttatcagc 5070
aataaaccag ccagccggaa gggccgagcg cagaagtggg cctgcaactt tatccgcctc 5130
catccagtct attaatgtt gccgggaagc tagagtaagt agttcgccag ttaatatgtt 5190
gcgcaacgtt gttgccattg ctacaggcat cgtggtgtca cgctcgtcgt ttggtatggc 5250

ttcattcagc tccggttccc aacgatcaag gcgagttaca tgatcccca tgttgtgcaa 5310
aaaagcgggt agctccttcg gtcctccgat cgttgtcaga agtaagttgg ccgcagtgtt 5370
atcactcatg gttatggcag cactgcataa ttctcttact gtcatgccat ccgtaagatg 5430
cttttctgtg actggtgagt actcaaccaa gtcattctga gaatagtgtg tgcggcgacc 5490
gagttgctct tgcccggcgt caatacggga taataccgcg ccacatagca gaactttaaa 5550
agtgtcatc attggaaaac gttcttcggg gcgaaaactc tcaaggatct taccgctgtt 5610
gagatccagt tcgatgtaac ccactcgtgc acccaactga tcttcagcat cttttacttt 5670
caccagcgtt tctgggtgag caaaaacagg aaggcaaaat gccgcaaaaa agggaataag 5730
ggcgacacgg aaatgttgaa tactcatact ctctcttttt caatattatt gaagcattta 5790
tcagggttat tgtctcatga gcgatacat atttgaatgt atttagaaaa ataaacaaat 5850
aggggttccg cgcacatttc cccgaaaagt gccacctgac gtccgggaga tctcccgatc 5910
ccctatggtc gactctcagt acaatctgct ctgatgccgc atagttaagc cagtatctgc 5970
tccctgcttg tgtgttgag gtcgctgagt agtgcgcgag caaaatttaa gctacaacaa 6030
ggcaaggctt gaccgacaat tgcataga atctgcttag ggtaggcgt tttgcgctgc 6090
ttcgcgatgt acgggccaga tatacgcgtt gacattgatt attgactagt tattaatagt 6150
aatcaattac ggggtcatta gttcatagcc catatatgga gttccgcgtt acataactta 6210
cggtaaattg cccgcctggc tgaccgcca acgaccccg ccattgacg tcaataatga 6270
cgtatgttcc catagtaacg ccaataggga ctttccattg acgtcaatgg gtggactatt 6330
tacggtaaac tgcccacttg gcagtacatc aagtgtatca tatgccaagt acgcccccta 6390
ttgacgtcaa tgacggtaaa tggcccgctt ggcattatgc ccagtacatg accttatggg 6450
actttcctac ttggcagtac atctacgtat tagtcatcgc tattaccatg gtgatgcggt 6510
tttggcagta catcaatggg cgtggatagc ggtttgactc acggggattt ccaagtctcc 6570
acccattga cgtcaatggg agtttgtttt ggcacaaaa tcaacgggac tttccaaaat 6630
gtcgtaaaca ctccgcccc ttgacgcaaa tgggcggtag gcgtgtacg tgggaggtct 6690

atataagcag agctctctgg ctaactagag aaccactgc ttactggctt atcgaaatta 6750
atacgactca ctataggag acccaagctg gctagttaag cttggtaccg agctcggatc 6810
cactagtcca gtgtggtgga attgcccttg ccacatggg ggcaggtgcc accggccgcg 6870
ccatggacgg gccgcgcctg ctgctgttgc tgcttctggg ggtgtccctt ggaggtgcca 6930
aggaggcatg cccacaggc ctgtacacgc acagcgggtga gtgctgcaa gcctgcaacc 6990
tgggcgaggg tgtggcccag ctttgtggag ccaaccagac cgtgtgtgag ccctgcctgg 7050
acagcgtgac gttctccgac gtggtgagcg cgaccgagcc gtgcaagccg tgcaccgagt 7110
gcgtggggct ccagagcatg tcggcgccgt gcgtggaggc cgacgacgcc gtgtgccgct 7170
gcgcctacgg ctactaccag gatgagacga ctgggcgctg cgaggcgtgc cgctgtgctg 7230
aggcgggctc gggcctcgtg ttctcctgcc aggacaagca gaacaccgtg tgcgaggagt 7290
gccccgacgg cacgtattcc gacgaggcca accacgtgga cccgtgcctg ccctgcaccg 7350
tgtgagagga caccgagcgc cagctccgcg agtgacacg ctgggccgac gccgagtgcg 7410
aggagatccc tggccgttgg attacacggt ccacaccccc agagggtctg gacagcacag 7470
ccccagcac ccaggagcct gaggcacctc cagaacaaga cctcatagcc agcacggtgg 7530
caggtgtggt gaccacagtg atgggcagct ccagcccgt ggtgaccga ggcaccaccg 7590
acaacctcat ccctgtctat tgctccatcc tggctgctgt ggttgtgggt cttgtggcct 7650
acatagcctt caagaggtgg aacagctgca agcagaacaa gcaaggagcc aacagccggc 7710
cagtgaacca gacgccccca ccagaggag aaaaactcca cagcgacagt ggcattctccg 7770
tggaagacca gagcctgcat gaccagcagc cccacacgca gacagcctcg ggccaggccc 7830
tcaagggtga cggaggcctc tacagcagcc tgccccagc caagcgggag gaggtggaga 7890
agcttctcaa cggctctgcg ggggacacct ggcgacacct ggcgggcgag ctgggctacc 7950
agcccagca catagactcc tttaacctg aggcctgccc cgttcgcgcc ctgcttgcaa 8010
gctggggcac ccaggacagc gccacactgg acgccctcct ggccgccctg cgccgcatcc 8070
agcgagccga cctcgtggag agtctgtgca gtgagtccac tgccacatcc ccagtgtgaa 8130

agggcaattc tgcagatata cagcacagtg gcggccgctc gagtctagag ggcccgcggt 8190
tcgaaggtaa gcctatccct aaccctctcc tcggtctcga ttctacgcgt accggtcatc 8250
atcaccatca ccattgagtt taaacccgct gatcagcctc gactgtgcct tctagttgcc 8310
agccatctgt tgtttgcccc tcccccgtc cttccttgac cctggaagggt gccactcca 8370
ctgtcctttc ctaataaaat gaggaattg catcgcatg tctgagtagg tgtcattcta 8430
ttctgggggg tggggtgggg caggacagca agggggagga ttgggaagac aatagcaggc 8490
atgctgggga tgcggtgggc tctatggctt ctgaggcgga aagaaccagc tggggctcta 8550
gggggtatcc ccacgcgcc tgtagcggcg cattaagcgc ggcggtgtg gtggttacgc 8610
gcagcgtgac cgctacactt gccagcgccc tagcgccgc tcctttcgct ttcttcctt 8670
cctttctgc caggttcgcc ggctttcccc gtcaagctct aaatcggggc atcccttag 8730
ggttcgatt tagtgcttta cggcacctcg acccaaaaa acttgattag ggtgatggtt 8790
cacgtagtgg gccatcgccc tgatagacgg ttttctgcgc tttgacgtt gagtccacgt 8850
tctttaatag tggactcttg ttccaaactg gaacaacact caaccctatc tcggtctatt 8910
cttttgattt ataagggtt ttggggattt cggcctattg gttaaaaaat gagctgattt 8970
aacaaaaatt taacgcgaat taattctgtg gaatgtgtgt cagttagggt gtggaaagtc 9030
cccaggctcc ccaggcaggc agaagtatgc aaagcatgca tctcaattag tcagcaacca 9090
ggtgtggaat gtccccaggc tccccagcag gcagaagtat gcaaagcatg catctcaatt 9150
agtcagcaac catagtcccg cccctaactc cgcccatccc gccctaact ccgcccagtt 9210
ccgcccattc tcgccccat ggctgactaa ttttttttat ttatgcagag gccgaggccg 9270
cctctgcctc tgagctattc cagaagtagt gaggaggctt ttttgaggc ctaggctttt 9330
gcaaaaagct ccggggagct tgtatatcca ttttcggatc tgatcaagag acaggatgag 9390
gatcgtttcg catgattgaa caagatggat tgcacgcagg ttctccggcc gcttgggtgg 9450
agaggctatt cggctatgac tgggcacaac agacaatcgg ctgctctgat gccgccgtgt 9510
tccggctgtc agcgcagggg cgcccgttc ttttgtcaa gacogacctg tccggtgcc 9570

tgaatgaact gcaggacgag gcagcgcggc tatcgtggct ggccacgacg ggcgttcctt 9630
gcgcagctgt gctcgacgtt gtcactgaag cgggaaggga ctggctgcta ttgggcgaag 9690
tgccggggca ggatctcctg tcctctcacc ttgctcctgc cgagaaagta tccatcatgg 9750
ctgatgcaat gcggcggttg catacgcttg atccggctac ctgccattc gaccaccaag 9810
cgaaacatcg catcgagcga gcacgtactc ggatggaagc cggctctgtc gatcaggatg 9870
atctggacga agagcatcag gggctcgcgc cagccgaact gttcgccagg ctcaaggcgc 9930
gcatgcccga cggcgaggat ctgctcgtga cccatggcga tgcctgcttg ccgaatatca 9990
tggtggaaaa tggccgcttt tctggattca tcgactgtgg ccggctgggt gtggcgacc 10050
gctatcagga catagcgttg gctaccctg atattgctga agagcttggc ggcaatggg 10110
ctgaccgctt cctcgtgctt tacggtatcg ccgtcccg ttcgcagcgc atgccttct 10170
atgccttct tgacgagttc ttctgagcgg gactctggg ttcgcgaaat gaccgaccaa 10230
gcgacgcca acctgccatc acgagatttc gattccaccg ccgccttcta tgaaagggtg 10290
ggcttcggaa tcgttttccg ggacgcggc tggatgatcc tccagcgcg ggatctcatg 10350
ctggagttct tcgcccacc caacttgtt attgcagctt ataattggtt caaataaagc 10410
aatagcatca caaatttcac aaataaagca tttttttcac tgcattctag ttgtggttg 10470
tccaaactca tcaatgtatc ttatcatgtc tgtatacgt cgaccttag ctagagcttg 10530
gcgtaatcat ggtcatagct gtttctgtg tgaaattgtt atccgctcac aattccacac 10590
aacatacgag ccggaagcat aaagtgtaaa gcctggggtg cctaagagt gagctaactc 10650
acattaattg cgttgcgctc actgccgct ttccagtcgg gaaacctgtc gtgccagctg 10710
cattaatgaa tcggccaacg cgcggggaga ggcggtttgc gtattgggcg ctcttccgct 10770
tcctcgctca ctgactcgt gcgctcgtc gttcggctgc ggcgagcgg atcagctcac 10830
tcaaaggcgg taatacgtt atccacagaa tcaggggata acgcaggaaa gaacatgtga 10890
gcaaaaggcc agcaaaaggc caggaaccgt aaaaaggcgg cgttgctggc gtttttccat 10950
aggctccgcc cccctgacga gcatcacaaa aatcgacgt caagtcagag gtggcgaaac 11010

ccgacaggac tataaagata ccaggcggtt ccccttgga gctccctcgt gcgctctcct 11070
gttccgaccc tgccgcttac cggatacctg tccgcctttc tcccttcggg aagcgtggcg 11130
ctttctcaat gctcacgctg taggtatctc agttcgggtg aggtcgttcg ctccaagctg 11190
ggctgtgtgc acgaaccccc cgttcagccc gaccgctgcg ccttatccgg taactatcgt 11250
cttgagtcca acccggttaag acacgactta tcgccactgg cagcagccac tggtaacagg 11310
attagcagag cgaggtatgt aggcgggtgt acagagttct tgaagtgggtg gcctaactac 11370
ggctacacta gaaggacagt atttgggtatc tgcgctctgc tgaagccagt taccttcgga 11430
aaaagagttg gtagctcttg atccggcaaa caaaccaccg ctggtagcgg tggttttttt 11490
gtttgcaagc agcagattac gcgcagaaaa aaaggatctc aagaagatcc tttgatcttt 11550
tctacggggt ctgacgctca gtggaacgaa aactcacgtt aagggtttt ggtcatgaga 11610
ttatcaaaaa ggatcttcac ctagatcctt ttaaattaaa aatgaagttt taaatcaatc 11670
taaagtatat atgagtaaac ttggtctgac agttaccaat gcttaatcag tgaggcacct 11730
atctcagcga tctgtctatt tcgttcattc atagttgcct gactccccgt cgtgtagata 11790
actacgatac gggagggtt accatctggc ccagtgctg caatgatacc gcgagacca 11850
cgctcaccgg ctccagattt atcagcaata aaccagccag ccggaagggc cgagcgaga 11910
agtgtcctg caactttatc cgcctccatc cagtctatta attgttgccg ggaagctaga 11970
gtaagtagtt cgccagttaa tagtttgccg aacgttggtt ccattgctac aggcacgtg 12030
gtgtcacgct cgtcgtttgg tatggcttca ttcagctccg gttcccaacg atcaaggcga 12090
gttacatgat ccccatgtt gtgcaaaaa gcggttagct ccttcggtcc tccgatcgtt 12150
gtcagaagta agttggccgc agtggttatc ctcatggtta tggcagcact gcataattct 12210
cttactgtca tgccatccgt aagatgcttt tctgtgactg gtgagtactc aaccaagtca 12270
ttctgagaat agtgtagcg gcgaccgagt tgcctctgcc cggcgtcaat acgggataat 12330
accgcgccac atagcagaac tttaaaagt ctcattcttg gaaaacgttc ttcggggcga 12390
aaactctcaa ggatcttacc gctgttgaga tccagttcga tgtaaccac tcgtgcaccc 12450

aactgatctt cagcatcttt tactttcacc agcgtttctg ggtgagcaaa aacaggaagg 12510
caaaatgccg caaaaaaggg aataaggcg acacggaaat gttgaatact catactcttc 12570
ctttttcaat attattgaag catttatcag ggttattgtc tcatgagcgg atacatattt 12630
gaatgtattt agaaaaataa acaaataggg gttccgcgca catttccccg aaaagtgcc 12690
cctgacgtcc gggagatctc ccgatcccct atggtcgact ctcagtacaa tctgctctga 12750
tgccgcatag ttaagccagt atctgctccc tgcttgtgtg ttggaggtcg ctgagtagtg 12810
cgcgagcaaa atttaagcta caacaaggca aggcttgacc gacaattgca tgaagaatct 12870
gcttaggggtt aggcgttttg cgctgcttcg cgatgtacgg gccagatata cgcgttgaca 12930
ttgattattg actagttatt aatagtaatc aattacgggg tcattagtgc atagcccata 12990
tatggagtgc cgcgttacat aacttacggt aaatggcccg cctggctgac cgcccaacga 13050
ccccgcccc ttgacgtcaa taatgacgta tgttcccata gtaacgcaa tagggacttt 13110
ccattgacgt caatgggtgg actatttacg gtaaaactgcc cacttggcag tacatcaagt 13170
gtatcatatg ccaagtacgc ccctattga cgtcaatgac ggtaaatggc ccgcctggca 13230
ttatgcccag tacatgacct tatgggactt tcctacttgg cagtacatct acgtattagt 13290
catcgctatt accatggtga tgcggttttg gcagtacatc aatgggcgtg gatagcgggt 13350
tgactcacgg ggatttccaa gtctccaccc cattgacgtc aatgggagtt tgttttggca 13410
ccaaaatcaa cgggactttc caaaatgtcg taacaactcc gcccattga cgcaaatggg 13470
cggtaggcgt gtacgggtgg aggtctatat aagcagagct ctctggctaa ctagagaacc 13530
cactgcttac tggcttatcg aaattaatac gactcaactat agggagaccc aagctggcta 13590
gttaagcttg gtaccgagct cg 13612

<210> 17

<211> 427

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Plasmid pcDNA3.1 hp75 Nr.16

<400> 17

Met Gly Ala Gly Ala Thr Gly Arg Ala Met Asp Gly Pro Arg Leu Leu
1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Leu Gly Val Ser Leu Gly Gly Ala Lys Glu Ala Cys
20 25 30

Pro Thr Gly Leu Tyr Thr His Ser Gly Glu Cys Cys Lys Ala Cys Asn
35 40 45

Leu Gly Glu Gly Val Ala Gln Pro Cys Gly Ala Asn Gln Thr Val Cys
50 55 60

Glu Pro Cys Leu Asp Ser Val Thr Phe Ser Asp Val Val Ser Ala Thr
65 70 75 80

Glu Pro Cys Lys Pro Cys Thr Glu Cys Val Gly Leu Gln Ser Met Ser
85 90 95

Ala Pro Cys Val Glu Ala Asp Asp Ala Val Cys Arg Cys Ala Tyr Gly
100 105 110

Tyr Tyr Gln Asp Glu Thr Thr Gly Arg Cys Glu Ala Cys Arg Val Cys
115 120 125

Glu Ala Gly Ser Gly Leu Val Phe Ser Cys Gln Asp Lys Gln Asn Thr
130 135 140

Val Cys Glu Glu Cys Pro Asp Gly Thr Tyr Ser Asp Glu Ala Asn His
145 150 155 160

Val Asp Pro Cys Leu Pro Cys Thr Val Cys Glu Asp Thr Glu Arg Gln
165 170 175

Leu Arg Glu Cys Thr Arg Trp Ala Asp Ala Glu Cys Glu Glu Ile Pro
180 185 190

Gly Arg Trp Ile Thr Arg Ser Thr Pro Pro Glu Gly Ser Asp Ser Thr
195 200 205

Ala Pro Ser Thr Gln Glu Pro Glu Ala Pro Pro Glu Gln Asp Leu Ile
210 215 220

Ala Ser Thr Val Ala Gly Val Val Thr Thr Val Met Gly Ser Ser Gln
225 230 235 240

Pro Val Val Thr Arg Gly Thr Thr Asp Asn Leu Ile Pro Val Tyr Cys
245 250 255

Ser Ile Leu Ala Ala Val Val Val Gly Leu Val Ala Tyr Ile Ala Phe
260 265 270

Lys Arg Trp Asn Ser Cys Lys Gln Asn Lys Gln Gly Ala Asn Ser Arg
275 280 285

Pro Val Asn Gln Thr Pro Pro Pro Glu Gly Glu Lys Leu His Ser Asp
290 295 300

Ser Gly Ile Ser Val Asp Ser Gln Ser Leu His Asp Gln Gln Pro His
305 310 315 320

Thr Gln Thr Ala Ser Gly Gln Ala Leu Lys Gly Asp Gly Gly Leu Tyr
325 330 335

Ser Ser Leu Pro Pro Ala Lys Arg Glu Glu Val Glu Lys Leu Leu Asn
340 345 350

Gly Ser Ala Gly Asp Thr Trp Arg His Leu Ala Gly Glu Leu Gly Tyr
355 360 365

Gln Pro Glu His Ile Asp Ser Phe Thr His Glu Ala Cys Pro Val Arg
370 375 380

Ala Leu Leu Ala Ser Trp Ala Thr Gln Asp Ser Ala Thr Leu Asp Ala
385 390 395 400

Leu Leu Ala Ala Leu Arg Arg Ile Gln Arg Ala Asp Leu Val Glu Ser
405 410 415

Leu Cys Ser Glu Ser Thr Ala Thr Ser Pro Val
420 425

<210> 18

<211> 8846

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Plasmid pIRES hNgR hp75

<220>

<221> CDS

<222> (1202)..(2620)

<223> human NogoR sequence

<220>

<221> CDS

<222> (3294) .. (4574)

<223> human p75 sequence

<400> 18

```
gtgatgctcg tcaggggggc ggagcctatg gaaaaacgcc agcaacgcgg ccttttttacg      60
gttcctggcc ttttgctggc cttttgctca catggctcga cagatcttca atattggcca      120
ttagccatat tattcattgg ttatatagca taaatcaata ttggctattg gccattgcat      180
acgttgtatc tatatcataa tatgtacatt tataattggct catgtccaat atgaccgcca      240
tgttggcatt gattattgac tagttattaa tagtaatcaa ttacgggggc attagttcat      300
agcccatata tggagttccg cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg      360
cccaacgacc ccgcccatt gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata      420
gggactttcc attgacgtca atgggtggag tatttacggg aaactgcca cttggcagta      480
catcaagtgt atcatatgcc aagtcgccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc      540
gcctggcatt atgccagta catgacctta cgggactttc ctacttggca gtacatctac      600
gtattagtca tcgctattac catggtgatg cggttttggc agtacaccaa tgggcgtgga      660
tagcggtttg actcacgggg atttccaagt ctccacccca ttgacgtcaa tgggagtttg      720
ttttggcacc aaaatcaacg ggactttoca aaatgtcgta acaactgcga tcgcccggcc      780
cgttgacgca aatgggcggg aggcgtgtac ggtgggaggt ctatataagc agagctcggt      840
tagtgaaccg tcagatcact agaagcttta ttgcggtagt ttatcacagt taaattgcta      900
acgcagtcag tgcttctgac acaacagtct cgaacttaag ctgcagtgac tctcttaagg      960
tagccttgca gaagttggtc gtgaggcact gggcaggtaa gtatcaaggt tacaagacag     1020
gtttaaggag accaatagaa actgggcttg tcgagacaga gaagactctt gcgtttctga     1080
taggcaccta ttggtcttac tgacatcac tttgcctttc tctccacagg tgtccactcc     1140
cagttcaatt acagctctta aggctagagt acttaatacg actcactata ggctagagct     1200
```

t atg aag agg gcg tcc gct gga ggg agc cgg ctg ctg gca tgg gtg ctg	1249
Met Lys Arg Ala Ser Ala Gly Gly Ser Arg Leu Leu Ala Trp Val Leu	
1 5 10 15	
tgg ctg cag gcc tgg cag gtg gca gcc cca tgc cca ggt gcc tgc gta	1297
Trp Leu Gln Ala Trp Gln Val Ala Ala Pro Cys Pro Gly Ala Cys Val	
20 25 30	
tgc tac aat gag ccc aag gtg acg aca agc tgc ccc cag cag ggc ctg	1345
Cys Tyr Asn Glu Pro Lys Val Thr Thr Ser Cys Pro Gln Gln Gly Leu	
35 40 45	
cag gct gtg ccc gtg ggc atc cct gct gcc agc cag cgc atc ttc ctg	1393
Gln Ala Val Pro Val Gly Ile Pro Ala Ala Ser Gln Arg Ile Phe Leu	
50 55 60	
cac ggc aac cgc atc tcg cat gtg cca gct gcc agc ttc cgt gcc tgc	1441
His Gly Asn Arg Ile Ser His Val Pro Ala Ala Ser Phe Arg Ala Cys	
65 70 75 80	
cgc aac ctc acc atc ctg tgg ctg cac tcg aat gtg ctg gcc cga att	1489
Arg Asn Leu Thr Ile Leu Trp Leu His Ser Asn Val Leu Ala Arg Ile	
85 90 95	
gat gcg gct gcc ttc act ggc ctg gcc ctc ctg gag cag ctg gac ctc	1537
Asp Ala Ala Ala Phe Thr Gly Leu Ala Leu Leu Glu Gln Leu Asp Leu	
100 105 110	
agc gat aat gca cag ctc cgg tct gtg gac cct gcc aca ttc cac ggc	1585
Ser Asp Asn Ala Gln Leu Arg Ser Val Asp Pro Ala Thr Phe His Gly	
115 120 125	
ctg ggc cgc cta cac acg ctg cac ctg gac cgc tgc ggc ctg cag gag	1633
Leu Gly Arg Leu His Thr Leu His Leu Asp Arg Cys Gly Leu Gln Glu	
130 135 140	
ctg ggc ccg ggg ctg ttc cgc ggc ctg gct gcc ctg cag tac ctc tac	1681
Leu Gly Pro Gly Leu Phe Arg Gly Leu Ala Ala Leu Gln Tyr Leu Tyr	
145 150 155 160	
ctg cag gac aac gcg ctg cag gca ctg cct gat gac acc ttc cgc gac	1729
Leu Gln Asp Asn Ala Leu Gln Ala Leu Pro Asp Asp Thr Phe Arg Asp	
165 170 175	
ctg ggc aac ctc aca cac ctc ttc ctg cac ggc aac cgc atc tcc agc	1777
Leu Gly Asn Leu Thr His Leu Phe Leu His Gly Asn Arg Ile Ser Ser	
180 185 190	

gtg ccc gag cgc gcc ttc cgt ggg ctg cac agc ctc gac cgt ctc cta	1825
Val Pro Glu Arg Ala Phe Arg Gly Leu His Ser Leu Asp Arg Leu Leu	
195 200 205	
ctg cac cag aac cgc gtg gcc cat gtg cac ccg cat gcc ttc cgt gac	1873
Leu His Gln Asn Arg Val Ala His Val His Pro His Ala Phe Arg Asp	
210 215 220	
ctt ggc cgc ctc atg aca ctc tat ctg ttt gcc aac aat cta tca gcg	1921
Leu Gly Arg Leu Met Thr Leu Tyr Leu Phe Ala Asn Asn Leu Ser Ala	
225 230 235 240	
ctg ccc act gag gcc ctg gcc ccc ctg cgt gcc ctg cag tac ctg agg	1969
Leu Pro Thr Glu Ala Leu Ala Pro Leu Arg Ala Leu Gln Tyr Leu Arg	
245 250 255	
ctc aac gac aac ccc tgg gtg tgt gac tgc cgg gca cgc cca ctc tgg	2017
Leu Asn Asp Asn Pro Trp Val Cys Asp Cys Arg Ala Arg Pro Leu Trp	
260 265 270	
gcc tgg ctg cag aag ttc cgc ggc tcc tcc tcc gag gtg ccc tgc agc	2065
Ala Trp Leu Gln Lys Phe Arg Gly Ser Ser Ser Glu Val Pro Cys Ser	
275 280 285	
ctc ccg caa cgc ctg gct ggc cgt gac ctc aaa cgc cta gct gcc aat	2113
Leu Pro Gln Arg Leu Ala Gly Arg Asp Leu Lys Arg Leu Ala Ala Asn	
290 295 300	
gac ctg cag ggc tgc gct gtg gcc acc ggc cct tac cat ccc atc tgg	2161
Asp Leu Gln Gly Cys Ala Val Ala Thr Gly Pro Tyr His Pro Ile Trp	
305 310 315 320	
acc ggc agg gcc acc gat gag gag ccg ctg ggg ctt ccc aag tgc tgc	2209
Thr Gly Arg Ala Thr Asp Glu Glu Pro Leu Gly Leu Pro Lys Cys Cys	
325 330 335	
cag cca gat gcc gct gac aag gcc tca gta ctg gag cct gga aga cca	2257
Gln Pro Asp Ala Ala Asp Lys Ala Ser Val Leu Glu Pro Gly Arg Pro	
340 345 350	
gct tcg gca ggc aat gcg ctg aag gga cgc gtg ccg ccc ggt gac agc	2305
Ala Ser Ala Gly Asn Ala Leu Lys Gly Arg Val Pro Pro Gly Asp Ser	
355 360 365	
ccg ccg ggc aac ggc tct ggc cca cgg cac atc aat gac tca ccc ttt	2353
Pro Pro Gly Asn Gly Ser Gly Pro Arg His Ile Asn Asp Ser Pro Phe	
370 375 380	

ggg act ctg cct ggc tct gct gag ccc ccg ctc act gca gtg cgg ccc 2401
 Gly Thr Leu Pro Gly Ser Ala Glu Pro Pro Leu Thr Ala Val Arg Pro
 385 390 395 400

gag ggc tcc gag cca cca ggg ttc ccc acc tcg ggc cct cgc cgg agg 2449
 Glu Gly Ser Glu Pro Pro Gly Phe Pro Thr Ser Gly Pro Arg Arg Arg
 405 410 415

cca ggc tgt tca cgc aag aac cgc acc cgc agc cac tgc cgt ctg ggc 2497
 Pro Gly Cys Ser Arg Lys Asn Arg Thr Arg Ser His Cys Arg Leu Gly
 420 425 430

cag gca ggc agc ggg ggt ggc ggg act ggt gac tca gaa ggc tca ggt 2545
 Gln Ala Gly Ser Gly Gly Gly Gly Thr Gly Asp Ser Glu Gly Ser Gly
 435 440 445

gcc cta ccc agc ctc acc tgc agc ctc acc ccc ctg ggc ctg gcg ctg 2593
 Ala Leu Pro Ser Leu Thr Cys Ser Leu Thr Pro Leu Gly Leu Ala Leu
 450 455 460

gtg ctg tgg aca gtg ctt ggg ccc tgc tgagaattca cgcgtcgagc 2640
 Val Leu Trp Thr Val Leu Gly Pro Cys
 465 470

atgcatctag ggcggccaat tccgcccctc tccctccccc ccccctaacg ttactggccg 2700

aagccgcttg gaataaggcc ggtgtgcgtt tgtctatatg tgattttcca ccatattgcc 2760

gtcttttggc aatgtgaggg ccggaacc tggccctgtc ttcttgacga gcattcctag 2820

gggctcttcc cctctcgcca aaggaatgca aggtctgttg aatgtcgtga aggaagcagt 2880

tcctctggaa gcttcttgaa gacaaacaac gtctgtagcg accctttgca ggcagcggaa 2940

ccccccacct ggcgacaggt gcctctgcgg ccaaaagcca cgtgtataag atacacctgc 3000

aaaggcggca caacccagt gccacgttgt gagttggata gttgtggaaa gagtcaaatg 3060

gctctcctca agcgtattca acaaggggct gaaggatgcc cagaaggtac ccattgtat 3120

gggatctgat ctggggcctc ggtgcacatg ctttacatgt gtttagtcga ggtaaaaaa 3180

acgtctaggc ccccggaacc acggggacgt gggtttcctt tgaaaaacac gatgataagc 3240

ttgccacaac ccgggatcct ctagtcagtg gtgggtggaat tgcccttgcc acc atg 3296
 Met

ggg gca ggt gcc acc ggc cgc gcc atg gac ggg ccg cgc ctg ctg ctg	3344
Gly Ala Gly Ala Thr Gly Arg Ala Met Asp Gly Pro Arg Leu Leu Leu	
475 480 485 490	
ttg ctg ctt ctg ggg gtg tcc ctt gga ggt gcc aag gag gca tgc ccc	3392
Leu Leu Leu Leu Gly Val Ser Leu Gly Gly Ala Lys Glu Ala Cys Pro	
495 500 505	
aca ggc ctg tac acg cac agc ggt gag tgc tgc aaa gcc tgc aac ctg	3440
Thr Gly Leu Tyr Thr His Ser Gly Glu Cys Cys Lys Ala Cys Asn Leu	
510 515 520	
ggc gag ggt gtg gcc cag cct tgt gga gcc aac cag acc gtg tgt gag	3488
Gly Glu Gly Val Ala Gln Pro Cys Gly Ala Asn Gln Thr Val Cys Glu	
525 530 535	
ccc tgc ctg gac agc gtg acg ttc tcc gac gtg gtg agc gcg acc gag	3536
Pro Cys Leu Asp Ser Val Thr Phe Ser Asp Val Val Ser Ala Thr Glu	
540 545 550	
ccg tgc aag ccg tgc acc gag tgc gtg ggg ctc cag agc atg tcg gcg	3584
Pro Cys Lys Pro Cys Thr Glu Cys Val Gly Leu Gln Ser Met Ser Ala	
555 560 565 570	
ccg tgc gtg gag gcc gac gac gcc gtg tgc cgc tgc gcc tac ggc tac	3632
Pro Cys Val Glu Ala Asp Asp Ala Val Cys Arg Cys Ala Tyr Gly Tyr	
575 580 585	
tac cag gat gag acg act ggg cgc tgc gag gcg tgc cgc gtg tgc gag	3680
Tyr Gln Asp Glu Thr Thr Gly Arg Cys Glu Ala Cys Arg Val Cys Glu	
590 595 600	
gcg ggc tcg ggc ctc gtg ttc tcc tgc cag gac aag cag aac acc gtg	3728
Ala Gly Ser Gly Leu Val Phe Ser Cys Gln Asp Lys Gln Asn Thr Val	
605 610 615	
tgc gag gag tgc ccc gac ggc acg tat tcc gac gag gcc aac cac gtg	3776
Cys Glu Glu Cys Pro Asp Gly Thr Tyr Ser Asp Glu Ala Asn His Val	
620 625 630	
gac ccg tgc ctg ccc tgc acc gtg tgc gag gac acc gag cgc cag ctc	3824
Asp Pro Cys Leu Pro Cys Thr Val Cys Glu Asp Thr Glu Arg Gln Leu	
635 640 645 650	
cgc gag tgc aca cgc tgg gcc gac gcc gag tgc gag gag atc cct ggc	3872
Arg Glu Cys Thr Arg Trp Ala Asp Ala Glu Cys Glu Glu Ile Pro Gly	
655 660 665	

cggtggattacacggctccacacccccaagggttcggacagcaca gcc	3920
Arg Trp Ile Thr Arg Ser Thr Pro Pro Glu Gly Ser Asp Ser Thr Ala	
670 675 680	
ccc agc acc cag gag cct gag gca cct cca gaa caa gac ctc ata gcc	3968
Pro Ser Thr Gln Glu Pro Glu Ala Pro Pro Glu Gln Asp Leu Ile Ala	
685 690 695	
agc acg gtg gca ggt gtg gtg acc aca gtg atg ggc agc tcc cag ccc	4016
Ser Thr Val Ala Gly Val Val Thr Thr Val Met Gly Ser Ser Gln Pro	
700 705 710	
gtg gtg acc cga ggc acc acc gac aac ctc atc cct gtc tat tgc tcc	4064
Val Val Thr Arg Gly Thr Thr Asp Asn Leu Ile Pro Val Tyr Cys Ser	
715 720 725 730	
atc ctg gct gct gtg gtt gtg ggt ctt gtg gcc tac ata gcc ttc aag	4112
Ile Leu Ala Ala Val Val Val Gly Leu Val Ala Tyr Ile Ala Phe Lys	
735 740 745	
agg tgg aac agc tgc aag cag aac aag caa gga gcc aac agc cgg cca	4160
Arg Trp Asn Ser Cys Lys Gln Asn Lys Gln Gly Ala Asn Ser Arg Pro	
750 755 760	
gtg aac cag acg ccc cca cca gag gga gaa aaa ctc cac agc gac agt	4208
Val Asn Gln Thr Pro Pro Pro Glu Gly Glu Lys Leu His Ser Asp Ser	
765 770 775	
ggc atc tcc gtg gac agc cag agc ctg cat gac cag cag ccc cac acg	4256
Gly Ile Ser Val Asp Ser Gln Ser Leu His Asp Gln Gln Pro His Thr	
780 785 790	
cag aca gcc tcg ggc cag gcc ctc aag ggt gac gga ggc ctc tac agc	4304
Gln Thr Ala Ser Gly Gln Ala Leu Lys Gly Asp Gly Gly Leu Tyr Ser	
795 800 805 810	
agc ctg ccc cca gcc aag cgg gag gag gtg gag aag ctt ctc aac ggc	4352
Ser Leu Pro Pro Ala Lys Arg Glu Glu Val Glu Lys Leu Leu Asn Gly	
815 820 825	
tct gcg ggg gac acc tgg cgg cac ctg gcg ggc gag ctg ggc tac cag	4400
Ser Ala Gly Asp Thr Trp Arg His Leu Ala Gly Glu Leu Gly Tyr Gln	
830 835 840	
ccc gag cac ata gac tcc ttt acc cat gag gcc tgc ccc gtt cgc gcc	4448
Pro Glu His Ile Asp Ser Phe Thr His Glu Ala Cys Pro Val Arg Ala	
845 850 855	

ctg ctt gca agc tgg gcc acc cag gac agc gcc aca ctg gac gcc ctc 4496
 Leu Leu Ala Ser Trp Ala Thr Gln Asp Ser Ala Thr Leu Asp Ala Leu
 860 865 870

ctg gcc gcc ctg cgc cgc atc cag cga gcc gac ctc gtg gag agt ctg 4544
 Leu Ala Ala Leu Arg Arg Ile Gln Arg Ala Asp Leu Val Glu Ser Leu
 875 880 885 890

tgc agt gag tcc act gcc aca tcc cca gtg tgaaagggca attctgcaga 4594
 Cys Ser Glu Ser Thr Ala Thr Ser Pro Val
 895 900

tatccagcac agtggcggcc gcttcccttt agtgagggtt aatgcttcga gcagacatga 4654

taagatacat tgatgagttt ggacaaacca caactagaat gcagtgaaaa aaatgcttta 4714

tttgtgaaat ttgtgatgct attgctttat ttgtaaccat tataagctgc aataaacaag 4774

ttaacaacaa caattgcatt cattttatgt ttcaggttca gggggagatg tgggaggttt 4834

tttaaagcaa gtaaaacctc tacaaatgtg gtaaaatccg ataaggatcg atccgggctg 4894

gcgtaatagc gaagaggccc gcaccgatcg cccttcccaa cagttgcgca gcctgaatgg 4954

cgaatggacg cgccctgtag cggcgcatta agcgcggcgg gtgtggtggt tacgcgcagc 5014

gtgaccgcta cacttgccag cgccctagcg cccgctcctt tcgctttcctt cccttccttt 5074

ctgcgcacgt tcgcgggctt tccccgtcaa gctctaaatc gggggctccc tttaggggtc 5134

cgatttagag ctttacggca cctcgaccgc aaaaaacttg atttgggtga tggttcacgt 5194

agtggggcat cgccctgata gacggttttt cgccctttga cgttggagtc cacgttcttt 5254

aatagtggac tcttgttcca aactggaaca acactcaacc ctatctcggt ctattctttt 5314

gatttataag ggattttgcc gatttcggcc tatttggttaa aaaatgagct gatttaacaa 5374

atatttaacg cgaattttta caaaatatta acgtttacaa tttcgctga tgcgggtattt 5434

tctccttacg catctgtgcg gtatttcaca ccgcatacgc ggatctgcgc agcaccatgg 5494

cctgaaataa cctctgaaag aggaacttgg ttaggtacct tctgaggcgg aaagaaccag 5554

ctgtggaatg tgtgtcagtt aggggtgtgga aagtccccag gctccccagc aggcagaagt 5614

atgcaaagca tgcattctca ttagtcagca accagggtgtg gaaagtcccc aggctcccca 5674

gcaggcagaa gtatgcaaag catgcatctc aattagtcag caaccatagt cccgccccta 5734
actccgcca tcccgcct aactccgcc agttccgcc attctccgcc ccatggctga 5794
ctaatttttt ttatttatgc agaggccgag gccgcctcgg cctctgagct attccagaag 5854
tagtgaggag gcttttttgg aggcctaggc ttttgcaaaa agcttgattc ttctgacaca 5914
acagtctcga acttaaggct agagccacca tgattgaaca agatggattg cacgcaggtt 5974
ctccggccgc ttgggtggag aggtatttcg gctatgactg ggcacaacag acaatcggct 6034
gctctgatgc cgccgtgttc cggtgtcag gcgagggcg cccggttctt tttgtcaaga 6094
ccgacctgtc cgggtccctg aatgaactgc aggacgaggc agcgcggcta tcgtggctgg 6154
ccacgacggg cgttccttgc gcagctgtgc tcgacgttgt cactgaagcg ggaagggact 6214
ggctgctatt gggcgaagtg ccggggcagg atctcctgtc atctcacctt gctcctgccg 6274
agaaagtatc catcatggct gatgcaatgc gccggctgca tacgcttgat cgggctacct 6334
gcccattcga ccaccaagcg aaacatcgca tcgagcgagc acgtactcgg atggaagccg 6394
gtcttgctga tcaggatgat ctggacgaag agcatcaggg gctcgcgcca gccgaactgt 6454
tcgccaggct caaggcgcgc atgcccgcgc gcgaggatct cgtcgtgacc catggcgatg 6514
cctgcttgcc gaatatcatg gtggaaaatg gccgcttttc tggattcatc gactgtggcc 6574
ggctgggtgt ggcggaccgc tatcaggaca tagcgttggc taccctgat attgctgaag 6634
agcttgccgc cgaatgggct gaccgcttcc tcgtgcttta cggtatcgcc gctcccgatt 6694
cgcagcgcat cgccttctat cgccttcttg acgagttctt ctgagcggga ctctggggtt 6754
cgaaatgacc gaccaagcga cgcccaacct gccatcacga tggccgcaat aaaatatctt 6814
tattttcatt acatctgtgt gttggttttt tgtgtgaatc gatagcgata aggatccgcg 6874
tatggtgcac tctcagtaca atctgctctg atgccgcata gttaagccag ccccgacacc 6934
cgccaacacc cgtgacgcgc ccctgacggg cttgtctgct cccggcatcc gcttacagac 6994
aagctgtgac cgtctccggg agctgcatgt gtcagagggt ttcaccgtca tcaccgaaac 7054
gcgcgagacg aaagggcctc gtgatacgcc tatttttata ggttaatgtc atgataataa 7114

tggttttcta gacgtcaggt ggcacttttc ggggaaatgt gcgcggaacc cctattttgtt 7174
tattttttcta aatacattca aatatgtatc cgctcatgag acaataaccc tgataaatgc 7234
ttcaataata ttgaaaaagg aagagtatga gtattcaaca tttocgtgtc gcccttattc 7294
cctttttttgc ggcatttttgc cttcctgttt ttgtcaccac agaaacgctg gtgaaagtaa 7354
aagatgctga agatcagttg ggtgcacgag tgggttacat cgaactggat ctcaacagcg 7414
gtaagatcct tgagagtttt cgtcccggaag aacgttttcc aatgatgagc actttttaaag 7474
ttctgctatg tggcgcggtg ttatcccgta ttgacgccgg gcaagagcaa ctcggtcgcc 7534
gcatacacta ttctcagaat gacttggttg agtactcacc agtcacagaa aagcatctta 7594
cggatggcat gacagtaaga gaattatgca gtgctgccat aacctgagt gataaactg 7654
cggccaactt acttctgaca acgatcggag gaccgaagga gctaaccgct tttttgcaca 7714
acatggggga tcatgtaact cgccttgatc gttgggaacc ggagctgaat gaagccatac 7774
caaacgacga gcgtgacacc acgatgcctg tagcaatggc aacaacgttg cgcaactat 7834
taactggcga actacttact ctgcttccc ggcaacaatt aatagactgg atggaggcgg 7894
ataaagttgc aggaccactt ctgcgtcgg cccttcggc tggctggttt attgctgata 7954
aatctggagc cggtagcgt ggtctcgcg gtatcattgc agcactggg ocagatggta 8014
agccctcccg tatcgtagtt atctacacga cggggagtca ggcaactatg gatgaacgaa 8074
atagacagat cgctgagata ggtgcctcac tgattaagca ttggtaactg tcagaccaag 8134
tttactcata tatacttttag attgatttaa aacttcattt ttaattttaa aggatctagg 8194
tgaagatcct ttttgataat ctcatgacca aaatccctta acgtgagttt tcgttccact 8254
gagcgtcaga ccccgtagaa aagatcaaag gatcttcttg agatcctttt tttctgcgcg 8314
taatctgctg cttgcaaaca aaaaaaccac cgctaccagc ggtggtttgt ttgccggatc 8374
aagagctacc aactcttttt ccgaaggtaa ctggcttcag cagagcgag ataccaaata 8434
ctgtccttct agtgtagcc tagttaggcc accacttcaa gaactctgta gcaccgccta 8494
catacctcgc tctgctaata ctgttaccag tggctgctgc cagtggcgat aagtcgtgtc 8554

ttaccgggtt ggactcaaga cgatagttac cggataaggc gcagcggtcg ggctgaacgg 8614
ggggttcgtg cacacagccc agcttggagc gaacgaccta caccgaactg agatacctac 8674
agcgtgagct atgagaaaagc gccacgcttc ccgaagggag aaaggcggac aggtatccgg 8734
taagcggcag ggtcgggaaca ggagagcgca cgagggagct tccaggggga aacgcctggc 8794
atctttatag tctgtcggg ttctgccacc tctgacttga gcgtcgattt tt 8846

<210> 19

<211> 473

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Plasmid pIRES hNgR hp75

<400> 19

Met Lys Arg Ala Ser Ala Gly Gly Ser Arg Leu Leu Ala Trp Val Leu
1 5 10 15

Trp Leu Gln Ala Trp Gln Val Ala Ala Pro Cys Pro Gly Ala Cys Val
20 25 30

Cys Tyr Asn Glu Pro Lys Val Thr Thr Ser Cys Pro Gln Gln Gly Leu
35 40 45

Gln Ala Val Pro Val Gly Ile Pro Ala Ala Ser Gln Arg Ile Phe Leu
50 55 60

His Gly Asn Arg Ile Ser His Val Pro Ala Ala Ser Phe Arg Ala Cys
65 70 75 80

Arg Asn Leu Thr Ile Leu Trp Leu His Ser Asn Val Leu Ala Arg Ile
85 90 95

Asp Ala Ala Ala Phe Thr Gly Leu Ala Leu Leu Glu Gln Leu Asp Leu
100 105 110

Ser Asp Asn Ala Gln Leu Arg Ser Val Asp Pro Ala Thr Phe His Gly
115 120 125

Leu Gly Arg Leu His Thr Leu His Leu Asp Arg Cys Gly Leu Gln Glu
130 135 140

Leu Gly Pro Gly Leu Phe Arg Gly Leu Ala Ala Leu Gln Tyr Leu Tyr
145 150 155 160

Leu Gln Asp Asn Ala Leu Gln Ala Leu Pro Asp Asp Thr Phe Arg Asp
165 170 175

Leu Gly Asn Leu Thr His Leu Phe Leu His Gly Asn Arg Ile Ser Ser
180 185 190

Val Pro Glu Arg Ala Phe Arg Gly Leu His Ser Leu Asp Arg Leu Leu
195 200 205

Leu His Gln Asn Arg Val Ala His Val His Pro His Ala Phe Arg Asp
210 215 220

Leu Gly Arg Leu Met Thr Leu Tyr Leu Phe Ala Asn Asn Leu Ser Ala
225 230 235 240

Leu Pro Thr Glu Ala Leu Ala Pro Leu Arg Ala Leu Gln Tyr Leu Arg
245 250 255

Leu Asn Asp Asn Pro Trp Val Cys Asp Cys Arg Ala Arg Pro Leu Trp
260 265 270

Ala Trp Leu Gln Lys Phe Arg Gly Ser Ser Ser Glu Val Pro Cys Ser
275 280 285

Leu Pro Gln Arg Leu Ala Gly Arg Asp Leu Lys Arg Leu Ala Ala Asn
290 295 300

Asp Leu Gln Gly Cys Ala Val Ala Thr Gly Pro Tyr His Pro Ile Trp
305 310 315 320

Thr Gly Arg Ala Thr Asp Glu Glu Pro Leu Gly Leu Pro Lys Cys Cys
325 330 335

Gln Pro Asp Ala Ala Asp Lys Ala Ser Val Leu Glu Pro Gly Arg Pro
340 345 350

Ala Ser Ala Gly Asn Ala Leu Lys Gly Arg Val Pro Pro Gly Asp Ser
355 360 365

Pro Pro Gly Asn Gly Ser Gly Pro Arg His Ile Asn Asp Ser Pro Phe
370 375 380

Gly Thr Leu Pro Gly Ser Ala Glu Pro Pro Leu Thr Ala Val Arg Pro
385 390 395 400

Glu Gly Ser Glu Pro Pro Gly Phe Pro Thr Ser Gly Pro Arg Arg Arg
405 410 415

Pro Gly Cys Ser Arg Lys Asn Arg Thr Arg Ser His Cys Arg Leu Gly
420 425 430

Gln Ala Gly Ser Gly Gly Gly Gly Thr Gly Asp Ser Glu Gly Ser Gly
435 440 445

Ala Leu Pro Ser Leu Thr Cys Ser Leu Thr Pro Leu Gly Leu Ala Leu
450 455 460

Val Leu Trp Thr Val Leu Gly Pro Cys
465 470

<210> 20

<211> 427

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Plasmid pIRES hNgR hp75

<400> 20

Met Gly Ala Gly Ala Thr Gly Arg Ala Met Asp Gly Pro Arg Leu Leu
1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Leu Gly Val Ser Leu Gly Gly Ala Lys Glu Ala Cys
20 25 30

Pro Thr Gly Leu Tyr Thr His Ser Gly Glu Cys Cys Lys Ala Cys Asn
35 40 45

Leu Gly Glu Gly Val Ala Gln Pro Cys Gly Ala Asn Gln Thr Val Cys
50 55 60

Glu Pro Cys Leu Asp Ser Val Thr Phe Ser Asp Val Val Ser Ala Thr
65 70 75 80

Glu Pro Cys Lys Pro Cys Thr Glu Cys Val Gly Leu Gln Ser Met Ser
85 90 95

Ala Pro Cys Val Glu Ala Asp Asp Ala Val Cys Arg Cys Ala Tyr Gly
100 105 110

Tyr Tyr Gln Asp Glu Thr Thr Gly Arg Cys Glu Ala Cys Arg Val Cys
115 120 125

Glu Ala Gly Ser Gly Leu Val Phe Ser Cys Gln Asp Lys Gln Asn Thr
130 135 140

Val Cys Glu Glu Cys Pro Asp Gly Thr Tyr Ser Asp Glu Ala Asn His
145 150 155 160

Val Asp Pro Cys Leu Pro Cys Thr Val Cys Glu Asp Thr Glu Arg Gln
165 170 175

Leu Arg Glu Cys Thr Arg Trp Ala Asp Ala Glu Cys Glu Glu Ile Pro
180 185 190

Gly Arg Trp Ile Thr Arg Ser Thr Pro Pro Glu Gly Ser Asp Ser Thr
195 200 205

Ala Pro Ser Thr Gln Glu Pro Glu Ala Pro Pro Glu Gln Asp Leu Ile
210 215 220

Ala Ser Thr Val Ala Gly Val Val Thr Thr Val Met Gly Ser Ser Gln
225 230 235 240

Pro Val Val Thr Arg Gly Thr Thr Asp Asn Leu Ile Pro Val Tyr Cys
245 250 255

Ser Ile Leu Ala Ala Val Val Val Gly Leu Val Ala Tyr Ile Ala Phe
260 265 270

Lys Arg Trp Asn Ser Cys Lys Gln Asn Lys Gln Gly Ala Asn Ser Arg
275 280 285

Pro Val Asn Gln Thr Pro Pro Pro Glu Gly Glu Lys Leu His Ser Asp
290 295 300

Ser Gly Ile Ser Val Asp Ser Gln Ser Leu His Asp Gln Gln Pro His
305 310 315 320

Thr Gln Thr Ala Ser Gly Gln Ala Leu Lys Gly Asp Gly Gly Leu Tyr
325 330 335

Ser Ser Leu Pro Pro Ala Lys Arg Glu Glu Val Glu Lys Leu Leu Asn
340 345 350

Gly Ser Ala Gly Asp Thr Trp Arg His Leu Ala Gly Glu Leu Gly Tyr
355 360 365

Gln Pro Glu His Ile Asp Ser Phe Thr His Glu Ala Cys Pro Val Arg
370 375 380

Ala Leu Leu Ala Ser Trp Ala Thr Gln Asp Ser Ala Thr Leu Asp Ala
385 390 395 400

Leu Leu Ala Ala Leu Arg Arg Ile Gln Arg Ala Asp Leu Val Glu Ser
405 410 415

Leu Cys Ser Glu Ser Thr Ala Thr Ser Pro Val
420 425

<210> 21

<211> 6482

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> plasmid pcDNA4(mycHis)A hRhoA wt

<220>

<221> CDS

<222> (1058)..(1636)

<223> human RhoA sequence

<400> 21

```

gatctcccga tcccctatgg tcgactctca gtacaatctg ctctgatgcc gcatagttaa      60
gccagtatct gctccctgct tgtgtgttgg aggtcgctga gtagtgcgcg agcaaaattt      120
aagctacaac aaggcaaggc ttgaccgaca attgcatgaa gaatctgctt agggtttaggc      180
gttttgcgct gcttcgcgat gtacggggcca gatatacgcg ttgacattga ttattgacta      240
gttattaata gtaatcaatt acgggggtcat tagttcatag cccatatatg gagttccgcg      300
ttacataact tacggtaaat ggcccgcttg gctgaccgcc caacgacccc cgccattga      360
cgtcaataat gacgtatggt cccatagtaa cgccaatagg gactttccat tgacgtcaat      420
gggtggacta tttacggtaa actgcccact tggcagtaca tcaagtgtat catatgccaa      480
gtacgccccc tattgacgtc aatgacggta aatggcccg ctaggcattat gcccagtaca      540
tgaccttatg ggactttcct acttggcagt acatctacgt attagtcato gctattacca      600
tggtgatgcg gttttggcag tacatcaatg ggcgtggata gcggtttgac tcacggggat      660
ttccaagtct ccacccatt gacgtcaatg ggagtttggt ttggcaccaa aatcaacggg      720
actttccaaa atgtcgtaac aactccgccc cattgacgca aatgggcggg aggcgtgtac      780
ggtgggaggt ctatataagc agagctctct ggctaactag agaaccact gcttactggc      840
ttatcgaaat taatacgact cactataggg agaccaagc tggctagtta agcttggtac      900
cgagctcgga tcactagtc cagtgtggtg gaattcggca cgaggctcgt tagtccacgg      960
tctggtcttc agctacccgc cttcgtctcc gagtttgcca ctgcgggacc ggcgtccccg     1020
gcgcgaagag gctggactcg gattcgttgc ctgagca atg gct gcc atc cgg aag      1075
Met Ala Ala Ile Arg Lys
1                               5
aaa ctg gtg att gtt ggt gat gga gcc tgt gga aag aca tgc ttg ctc      1123

```


tttttcattt atctataatt tacctaagat tacaaatcag aagtcacatt gctaccagta 1776

tttagaagcc aactatgatt attaacgatg tccaaccggt ctggcccacc agggtccttt 1836

tgacactgct ctaacagccc tcctctgcac tcccacctga cacaccaggc gctaattcaa 1896

ggaatttctt aacttcttgc ttctttctag aaagagaaac agttggtaac ttttgtgaat 1956

taggctgtaa ctactttata actaacatgt cctgcctatt atctgtcagc tgcaaggtag 2016

tctggtagt caccacttca gggctttact ccgtaacaga ttttgttggc atagctctgg 2076

gggtggcagt tttttgaaaa tgggctcaac cagaaaagcc caagttcatg cagctgtggc 2136

agagttacag ttctgtggtt tcatgttagt taccttatag ttactgtgta attagtcca 2196

cttaatgtat gttacaaaa ataaatatat ctacccaga ctagatgtag tttttttgt 2256

ataattggat ttctaatac tgcacacctc aaagaaagtg tattggtttt ttaaaaaaga 2316

aagtgtattt ggaaataaag tcagatggaa aattcaaaaa aaaaaaaaaa aaaactcgag 2376

tctagagggc ccttcgaaca aaaactcatc tcagaagagg atctgaatat gcataccggt 2436

catcatcacc atcaccattg agtttaaacc cgctgatcag cctcgactgt gccttctagt 2496

tgccagccat ctgttgtttg cccctcccc gtgccttcct tgaccctgga aggtgccact 2556

ccactgtcc tttcctaata aaatgaggaa attgcacgc attgtctgag taggtgtcat 2616

tctattctgg ggggtgggtt ggggcaggac agcaagggg aggattggga agacaatagc 2676

aggcatgctg gggatgcggt gggctctatg gcttctgagg cggaagaac cagctggggc 2736

tctaggggtt atccccacgc gccctgtagc ggcgcattaa gcgcggcggg tgtggtggtt 2796

acgcgcagcg tgaccgctac acttgccagc gccctagcgc ccgctccttt cgctttcttc 2856

ccttcctttc tcgccacgtt cgccggcttt cccgtcaag ctctaaatcg gggcatccct 2916

ttaggggtcc gatttagtgc ttacggcac ctgcaccca aaaaacttga ttagggtagt 2976

ggttcacgta gtgggccatc gccctgatag acggtttttc gccctttgac gttggagtcc 3036

acgttcttta atagtggact cttgttccaa actggaacaa cactcaaccc tatctcggtc 3096

tattcttttg atttataag gattttgggg atttcggcct attgggttaa aaatgagctg 3156

atttaacaaa aatttaacgc gaattaattc tgtggaatgt gtgtcagtta ggggtgtggaa 3216
agtccccagg ctccccaggc aggcagaagt atgcaaagca tgcattctcaa ttagtcagca 3276
accagggtgtg gaaagtcccc aggcctccca gcaggcagaa gtatgcaaag catgcattctc 3336
aattagtcag caaccatagt cccgccccta actccgccca tcccggccct aactccgcc 3396
agttccgccc attctccgcc ccatggctga ctaatTTTTT ttatttatgc agaggccgag 3456
gccgcctctg cctctgagct attccagaag tagtgaggag gctTTTTTgg aggcctaggc 3516
TTTTgcaaaa agctccggg agcttgata tccattttcg gatctgatca gcacgtgttg 3576
acaattaatc atcgcatag tatatcgga tagtataata cgacaagggt aggaactaaa 3636
ccatggccaa gttgaccagt gccgttcgg tgcaccgc gcgcgacgtc gccggagcgg 3696
tcgagttctg gaccgacgg ctgggttct cccgggactt cgtggaggac gacttcgccg 3756
gtgtgggtccg ggacgacgtg accctgttca tcagcgcggt ccaggaccag gtggtgccgg 3816
acaacaccct ggcctgggtg tgggtgcgcg gcctggacga gctgtacgcc gagtggtcgg 3876
aggtcgtgtc cacgaacttc cgggacgcct cggggccggc catgaccgag atcggcgagc 3936
agccgtgggg gcgggagttc gccctgcgcg accgggccgg caactgcgtg cacttcgtgg 3996
cggaggagca ggactgacac gtgctacgag atttcgattc caccgccgcc ttctatgaaa 4056
ggttgggctt cggaatcgtt ttccgggacg ccggctggat gatcctccag cgcggggatc 4116
tcatgtgtga gttcttcgcc caccacaact tgtttattgc agcttataat ggttacaaat 4176
aaagcaatag catcacaaat ttcacaaata aagcattttt ttactgcat tctagttgtg 4236
gtttgtccaa actcatcaat gtattttatc atgtotgtat accgtcgacc tctagctaga 4296
gcttggcgta atcatggtca tagctgtttc ctgtgtgaaa ttgttatccg ctcaaatc 4356
cacacaacat acgagccgga agcataaagt gtaaagcctg ggggtgcctaa tgagtgagct 4416
aactcacatt aattgcgttg cgctcactgc ccgctttcca gtcgggaaac ctgtcgtgcc 4476
agctgcatta atgaatcggc caacgcgcgg ggagaggcgg tttgcgtatt gggcgctctt 4536
ccgcttcctc gctcactgac tcgctgcgct cggctcgttcg gctgcggcga gcggtatcag 4596

ctcactcaaa ggcggttaata cggttatcca cagaatcagg ggataacgca ggaaagaaca 4656

tgtgagcaaa aggccagcaa aaggccagga accgtaaaaa ggccgcgttg ctggcgtttt 4716

tccataggct ccgccccct gacgagcatc acaaaaatcg acgctcaagt cagaggtggc 4776

gaaacccgac aggactataa agataccagg cgtttcccc tggaagctcc ctcgtgcgct 4836

ctcctgttcc gaccctgccg cttaccggat acctgtccgc ctttctccct tcgggaagcg 4896

tggcgctttc tcaatgctca cgctgtaggt atctcagttc ggtgtaggtc gttcgtcca 4956

agctgggctg tgtgcacgaa ccccccgttc agcccgaccg ctgcgctta tccggttaact 5016

atcgtcttga gtccaaccg gtaagacacg acttatcgcc actggcagca gccactggta 5076

acaggattag cagagcgagg tatgtaggcg gtgctacaga gttcttgaag tggtagccta 5136

actacggcta cactagaagg acagtatttg gtatctgcgc tctgctgaag ccagttacct 5196

tcggaaaaag agttggtagc tcttgatccg gcaaacaaac caccgctggg agcgggtggt 5256

tttttgtttg caagcagcag attacgcgca gaaaaaagg atctcaagaa gatcctttga 5316

tcttttctac ggggtctgac gctcagtgga acgaaaactc acgttaaggg attttgggtca 5376

tgagattatc aaaaaggatc ttcacctaga tccttttaaa ttaaaaatga agttttaaat 5436

caatctaaag tatatatgag taaacttggg ctgacagtta ccaatgctta atcagtgagg 5496

cacctatctc agcgatctgt ctatttcgtt catccatagt tgcctgactc cccgtcgtgt 5556

agataactac gatacgggag ggcttaccat ctggccccag tgctgcaatg ataccgcgag 5616

acccacgctc accgggtcca gatttatcag caataaacca gccagccgga agggccgagc 5676

gcagaagtgg tcttgcaact ttatccgcct ccatccagtc tattaattgt tgccgggaag 5736

ctagagtaag tagttcgcca gttaatagtt tgcgcaacgt tggtgccatt gctacaggca 5796

tcgtggtgtc acgctcgtcg tttggtatgg cttcattcag ctccgggtcc caacgatcaa 5856

ggcgagttac atgatcccc atgttggtgca aaaaagcggg tagctccttc ggtcctccga 5916

tcgttgctcag aagtaagttg gccgcagtgt tatcactcat ggttatggca gcaactgcata 5976

attctcttac tgtcatgcc a tccgtaagat gcttttctgt gactggtgag tactcaacca 6036

agtcattctg agaatagtgt atgcggcgac cgagttgctc ttgcccggcg tcaatacggg 6096
ataataccgc gccacatagc agaactttaa aagtgtcat cattggaaaa cgttcttcgg 6156
ggcgaaaact ctcaaggatc ttaccgctgt tgagatccag ttcgatgtaa cccactcgtg 6216
cacccaactg atcttcagca tcttttactt tcaccagcgt ttctgggtga gcaaaaacag 6276
gaaggcaaaa tgccgcaaaa aagggaataa gggcgacacg gaaatgttga atactcatac 6336
tcttcctttt tcaatattat tgaagcattt atcagggtta ttgtctcatg agcggataca 6396
tatttgaatg tatttagaaa aataaacaaa taggggttcc gcgcacattt ccccgaaaag 6456
tgccacctga cgtcgacgga tcggga 6482

<210> 22

<211> 193

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> plasmid pcDNA4 (mycHis)A hRhoA wt

<400> 22

Met Ala Ala Ile Arg Lys Lys Leu Val Ile Val Gly Asp Gly Ala Cys
1 5 10 15

Gly Lys Thr Cys Leu Leu Ile Val Phe Ser Lys Asp Gln Phe Pro Glu
20 25 30

Val Tyr Val Pro Thr Val Phe Glu Asn Tyr Val Ala Asp Ile Glu Val
35 40 45

Asp Gly Lys Gln Val Glu Leu Ala Leu Trp Asp Thr Ala Gly Gln Glu
50 55 60

Asp Tyr Asp Arg Leu Arg Pro Leu Ser Tyr Pro Asp Thr Asp Val Ile
65 70 75 80

Leu Met Cys Phe Ser Ile Asp Ser Pro Asp Ser Leu Glu Asn Ile Pro
85 90 95

Glu Lys Trp Thr Pro Glu Val Lys His Phe Cys Pro Asn Val Pro Ile
100 105 110

Ile Leu Val Gly Asn Lys Lys Asp Leu Arg Asn Asp Glu His Thr Arg
115 120 125

Arg Glu Leu Ala Lys Met Lys Gln Glu Pro Val Lys Pro Glu Glu Gly
130 135 140

Arg Asp Met Ala Asn Arg Ile Gly Ala Phe Gly Tyr Met Glu Cys Ser
145 150 155 160

Ala Lys Thr Lys Asp Gly Val Arg Glu Val Phe Glu Met Ala Thr Arg
165 170 175

Ala Ala Leu Gln Ala Arg Arg Gly Lys Lys Lys Ser Gly Cys Leu Val
180 185 190

Leu

<210> 23

<211> 6853

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Plasmid pcDNA3 hRhoA wt

<220>

<221> CDS

<222> (127)..(705)

<223> human RhoA sequence

<400> 23

aattcggcac gaggctcgtt agtccacggt ctggtcttca gctacccgcc ttcgtctccg 60

agtttgcgac tcgcgaccg gcgtccccgg cgcaagagg ctggactcgg attcgttgcc 120

tgagca atg gct gcc atc cgg aag aaa ctg gtg att gtt ggt gat gga 168
 Met Ala Ala Ile Arg Lys Lys Leu Val Ile Val Gly Asp Gly
 1 5 10

gcc tgt gga aag aca tgc ttg ctc ata gtc ttc agc aag gac cag ttc 216
 Ala Cys Gly Lys Thr Cys Leu Leu Ile Val Phe Ser Lys Asp Gln Phe
 15 20 25 30

cca gag gtg tat gtg ccc aca gtg ttt gag aac tat gtg gca gat atc 264
 Pro Glu Val Tyr Val Pro Thr Val Phe Glu Asn Tyr Val Ala Asp Ile
 35 40 45

gag gtg gat gga aag cag gta gag ttg gct ttg tgg gac aca gct ggg 312
 Glu Val Asp Gly Lys Gln Val Glu Leu Ala Leu Trp Asp Thr Ala Gly
 50 55 60

cag gaa gat tat gat cgc ctg agg ccc ctc tcc tac cca gat acc gat 360
 Gln Glu Asp Tyr Asp Arg Leu Arg Pro Leu Ser Tyr Pro Asp Thr Asp
 65 70 75

gtt ata ctg atg tgt ttt tcc atc gac agc cct gat agt tta gaa aac 408
 Val Ile Leu Met Cys Phe Ser Ile Asp Ser Pro Asp Ser Leu Glu Asn
 80 85 90

atc cca gaa aag tgg acc cca gaa gtc aag cat ttc tgt ccc aac gtg 456
 Ile Pro Glu Lys Trp Thr Pro Glu Val Lys His Phe Cys Pro Asn Val
 95 100 105 110

ccc atc atc ctg gtt ggg aat aag aag gat ctt cgg aat gat gag cac 504

Pro Ile Ile Leu Val Gly Asn Lys Lys Asp Leu Arg Asn Asp Glu His	
115 120 125	
aca agg cgg gag cta gcc aag atg aag cag gag ccg gtg aaa cct gaa	552
Thr Arg Arg Glu Leu Ala Lys Met Lys Gln Glu Pro Val Lys Pro Glu	
130 135 140	
gaa ggc aga gat atg gca aac agg att ggc gct ttt ggg tac atg gag	600
Glu Gly Arg Asp Met Ala Asn Arg Ile Gly Ala Phe Gly Tyr Met Glu	
145 150 155	
tgt tca gca aag acc aaa gat gga gtg aga gag gtt ttt gaa atg gct	648
Cys Ser Ala Lys Thr Lys Asp Gly Val Arg Glu Val Phe Glu Met Ala	
160 165 170	
acg aga gct gct ctg caa gct aga cgt ggg aag aaa aaa tct ggg tgc	696
Thr Arg Ala Ala Leu Gln Ala Arg Arg Gly Lys Lys Lys Ser Gly Cys	
175 180 185 190	
ctt gtc ttg tgaaaccttg ctgcaagcac agcccttatg cggttaattt	745
Leu Val Leu	
tgaagtgctg tttattaatc ttagtgtatg attactggcc tttttcattt atctataatt	805
tacctaagat tacaaatcag aagtcattct gctaccagta tttagaagcc aactatgatt	865
attaacgatg tccaaccctg ctggcccacc agggctcctt tgacactgct ctaacagccc	925
tcctctgcac tcccacctga cacaccaggc gctaattcaa ggaatttctt aacttcttgc	985
ttcttttctag aaagagaaac agttggtaac ttttgtgaat taggctgtaa ctactttata	1045
actaacatgt cctgcctatt atctgtcagc tgcaaggtag tctgggtgagt caccacttca	1105
gggctttact ccgtaacaga ttttgttggc atagctctgg ggtgggcagt tttttgaaaa	1165
tgggctcaac cagaaaagcc caagttcatg cagctgtggc agagttacag ttctgtgggt	1225
tcatgttagt taccttatag ttactgtgta attagtcca cttaatgtat gttacaaaaa	1285
ataaatatat ctaccccgaga ctatgttagt ttttttttgt ataattggat ttcttaatac	1345
tgtcatcctc aaagaaagtg tattgggtttt ttaaaaaaga aagtgtatgt ggaaataaag	1405
tcagatggaa aattcaaaaa aaaaaaaaaa aaaactcgag catgcatcta gagggcccta	1465
ttctatagtg tcacctaaat gctagagctc gctgatcagc ctgactgtg ccttctagtt	1525

gccagccatc tgttgtttgc cctcccccg tgccttcctt gacctggaa ggtgccactc 1585
ccactgtcct ttcctaataa aatgaggaaa ttgcatcgca ttgtctgagt aggtgtcatt 1645
ctattctggg ggggtgggtg gggcaggaca gcaaggggga ggattgggaa gacaatagca 1705
ggcatgctgg ggatgcggtg ggctctatgg cttctgaggc ggaaagaacc agctggggct 1765
ctagggggta tccccacgcg cctgtagcg gcgcattaag cgcggggggt gtggtggta 1825
cgcgacgct gaccgctaca cttgccagcg cctagcgcc cgctccttc gctttcttc 1885
cttcctttct cgccacgttc gccggcttc cccgtcaagc tctaaatcgg ggcatccctt 1945
tagggttccg atttagtgct ttacggcacc tcgaccccaa aaaacttgat tagggtgatg 2005
gttcacgtag tgggccatcg ccctgataga cggtttttcg ccctttgacg ttggagtcca 2065
cgttctttaa tagtgactc ttgttccaaa ctggaacaac actcaaccct atctcggctt 2125
attcttttga tttataaggg attttgggga tttcggccta ttggttaaaa aatgagctga 2185
tttaacaaaa atttaacgcg aattaattct gtggaatgtg tgtcagttag ggtgtggaaa 2245
gtccccaggc tccccaggca ggcagaagta tgcaaagcat gcatctcaat tagtcagcaa 2305
ccagggtgtg aaagtcccca ggctccccag caggcagaag tatgcaaagc atgcatctca 2365
attagtcagc aaccatagtc ccgcccctaa ctccgcccac cccgccccta actccgccc 2425
gttcgcccac ttctccgccc catggctgac taattttttt tatttatgca gaggccgagg 2485
ccgcctctgc ctctgagcta ttccagaagt agtgaggagg ctttttttga ggcctaggct 2545
tttgcaaaaa gctcccgga gcttgatat ccattttcgg atctgatcaa gagacaggat 2605
gaggatcggt tcgcatgatt gaacaagatg gattgcacgc aggttctccg gccgcttggg 2665
tgagagggct attcggctat gactgggcac aacagacaat cggtgctct gatgcgcgcg 2725
tgttcgggt gtcagcgag gggcgcccg ttctttttgt caagaccgac ctgtccggtg 2785
ccctgaatga actgcaggac gaggcagcgc ggctatcgtg gctggccacg acgggcgttc 2845
cttgccgagc tgtgctcgac gttgtcactg aagcgggaag ggactggctg ctattgggcg 2905
aagtgcggg gcaggatctc ctgtcatctc accttgctcc tgccgagaaa gtatccatca 2965

tggtgatgc aatgcggcgg ctgcatacgc ttgatccggc tacctgcca ttcgaccacc 3025
aagcgaaca tcgcatcgag cgagcacgta ctcggatgga agccggtctt gtcgatcagg 3085
atgatctgga cgaagagcat caggggctcg cgccagccga actgttcgcc aggetcaagg 3145
cgcgcatgcc cgacggcgag gatctcgtcg tgacccatgg cgatgcctgc ttgccgaata 3205
tcatggtgga aaatggccgc ttttctggat tcatcgactg tggccggctg ggtgtggcgg 3265
accgctatca ggacatagcg ttggctaccc gtgatattgc tgaagagctt ggcggcgaat 3325
gggctgaccg ctctctctg ctttacggta tcgccgctcc cgattcgag cgcatcgct 3385
tctatcgct tcttgacgag ttcttctgag cgggactctg gggttcgaaa tgaccgacca 3445
agcgacgccc aacctgccat cagcagattt cgattccacc gccgccttct atgaaagggt 3505
gggcttcgga atcgttttcc gggacgccgg ctggatgac ctccagcgcg gggatctcat 3565
gctggagttc ttgccccacc ccaacttgtt tattgcagct tataatgggt acaaataaag 3625
caatagcatc acaaatttca caaataaagc atttttttca ctgcattcta gttgtggttt 3685
gtccaaactc atcaatgtat cttatcatgt ctgtataccg tcgacctota gctagagctt 3745
ggcgtaatca tggatcatgc tgtttcctgt gtgaaattgt tatccgctca caattccaca 3805
caacatacga gccggaagca taaagtgtaa agcctggggg gcctaagag tgagctaact 3865
cacattaatt gcgttgcgct cactgcccgc tttccagtcg ggaaacctgt cgtgccagct 3925
gcattaatga atcggccaac gcgcggggag aggcgggttg cgtattgggc gctcttcgc 3985
ttcctcgctc actgactcg tgcgctcggc cgttcggctg cggcgagcgg tatcagctca 4045
ctcaaaggcg gtaatacggc tatccacaga atcaggggat aacgcaggaa agaacatgtg 4105
agcaaaaggc cagcaaaagg ccaggaaccg taaaaaggcc gcgttgctgg cgtttttcca 4165
taggctccgc cccctgacg agcatcacia aaatcgacgc tcaagtcaga ggtggcgaaa 4225
cccgacagga ctataaagat accaggcggt tccccctgga agctccctcg tgcgctctcc 4285
tgttccgacc ctgcgcctta ccggatacct gtccgccttt ctcccttcgg gaagcggtggc 4345
gctttctcaa tgctcacgct gtaggtatct cagttcgggt taggtcgttc gctccaagct 4405

gggctgtgtg cacgaacccc ccgttcagcc cgaccgctgc gccttatccg gtaactatcg 4465
tcttgagtcc aacccggtaa gacacgactt atcgccactg gcagcagcca ctggtaacag 4525
gattagcaga gcgaggtatg taggcggtgc tacagagttc ttgaagtggg ggcctaacta 4585
cggctacact agaaggacag tatttggtat ctgcgctctg ctgaagccag ttaccttcgg 4645
aaaaagagtt ggtagctctt gatccggcaa acaaaccacc gctggtagcg gtgggtttttt 4705
tgtttgcaag cagcagatta cgcgcagaaa aaaaggatct caagaagatc ctttgatctt 4765
ttctacgggg tctgacgctc agtggaacga aaactcacgt taagggattt tggatcatgag 4825
attatcaaaa aggatcttca cctagatcct tttaaattaa aaatgaagtt ttaaataaat 4885
ctaaagtata tatgagtaaa cttgggtctga cagttaccaa tgcttaatca gtgaggcacc 4945
tatctcagcg atctgtctat ttcgttcatc catagttgcc tgactccccg tcgtgtagat 5005
aactacgata cgggaggggt taccatctgg cccagtgct gcaatgatac cgcgagacc 5065
acgctcaccg gctccagatt tatcagcaat aaaccagcca gccggaaggg ccgagcgag 5125
aagtggtoct gcaactttat ccgcctccat ccagtctatt aattgttgcc gggaagctag 5185
agtaagtagt tcgccagtta atagtttgcg caacgttggt gccattgcta caggcatcgt 5245
ggtgtcacgc tcgtcgtttg gtatggcttc attcagctcc ggttcccaac gatcaaggcg 5305
agttacatga tccccatgt tgtgcaaaaa agcgggttagc tccttcggtc ctccgatcgt 5365
tgtcagaagt aagtggccg cagtgttatc actcatggtt atggcagcac tgcataattc 5425
tcttactgtc atgccatccg taagatgctt ttctgtgact ggtgagtact caaccaagtc 5485
attctgagaa tagtgtatgc ggcgaccgag ttgctcttgc ccggcgtcaa tacgggataa 5545
taccgcgcca catagcagaa ctttaaaagt gctcatcatt ggaaaacgtt cttcggggcg 5605
aaaactctca aggatcttac cgctgttgag atccagttcg atgtaacca ctogtgcacc 5665
caactgatct tcagcatctt ttactttcac cagcgtttct gggtgagcaa aaacaggaag 5725
gcaaaatgcc gcaaaaaagg gaataagggc gacacggaaa tgttgaatac tcatactctt 5785
cctttttcaa tattattgaa gcatttatca gggttattgt ctcatgagcg gatacatatt 5845

tgaatgtatt tagaaaaata aacaaatagg ggttcgcgc acatttcccc gaaaagtgcc 5905
acctgacgtc gacggatcgg gagatctccc gatcccctat ggtcgactct cagtacaatc 5965
tgctctgatg ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtgtt ggaggtcgct 6025
gagtagtgcg cgagcaaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg 6085
aagaatctgc ttagggttag gcgttttgcg ctgcttcgcg atgtacgggc cagatatacg 6145
cggtgacatt gattattgac tagttattaa tagtaatcaa ttacggggtc attagttcat 6205
agcccatata tggagttccg cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg 6265
cccaacgacc cccgcccatt gacgtcaata atgacgtatg tccccatagt aacgccaata 6325
gggactttcc attgacgtca atgggtggac tatttacggt aaactgcca cttggcagta 6385
catcaagtgt atcatatgcc aagtacgccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc 6445
gcctggcatt atgoccagta catgacctta tgggactttc ctacttggca gtacatctac 6505
gtattagtca tcgctattac catggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga 6565
tagcggtttg actcacgggg atttccaagt ctccaccca ttgacgtcaa tgggagtttg 6625
ttttggcacc aaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgta acaactcgc ccattgacg 6685
caaatgggcg gtaggcgtgt acgggtggag gtctatataa gcagagctct ctggctaact 6745
agagaacca ctgcttactg gcttatcgaa attaatacga ctactatag ggagacccaa 6805
gcttgggtacc gagctcgat ccactagtaa cggccgccag tgtgctgg 6853

<210> 24

<211> 193

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Plasmid pcDNA3 hRhoA wt

<400> 24

Met Ala Ala Ile Arg Lys Lys Leu Val Ile Val Gly Asp Gly Ala Cys
1 5 10 15

Gly Lys Thr Cys Leu Leu Ile Val Phe Ser Lys Asp Gln Phe Pro Glu
20 25 30

Val Tyr Val Pro Thr Val Phe Glu Asn Tyr Val Ala Asp Ile Glu Val
35 40 45

Asp Gly Lys Gln Val Glu Leu Ala Leu Trp Asp Thr Ala Gly Gln Glu
50 55 60

Asp Tyr Asp Arg Leu Arg Pro Leu Ser Tyr Pro Asp Thr Asp Val Ile
65 70 75 80

Leu Met Cys Phe Ser Ile Asp Ser Pro Asp Ser Leu Glu Asn Ile Pro
85 90 95

Glu Lys Trp Thr Pro Glu Val Lys His Phe Cys Pro Asn Val Pro Ile
100 105 110

Ile Leu Val Gly Asn Lys Lys Asp Leu Arg Asn Asp Glu His Thr Arg
115 120 125

Arg Glu Leu Ala Lys Met Lys Gln Glu Pro Val Lys Pro Glu Glu Gly
130 135 140

Arg Asp Met Ala Asn Arg Ile Gly Ala Phe Gly Tyr Met Glu Cys Ser
145 150 155 160

Ala Lys Thr Lys Asp Gly Val Arg Glu Val Phe Glu Met Ala Thr Arg
165 170 175

Ala Ala Leu Gln Ala Arg Arg Gly Lys Lys Lys Ser Gly Cys Leu Val
180 185 190

Leu

<210> 25

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR Primer RAGE_SE

<400> 25

ccgaattccg gaagcaggat ggcagccg

28

<210> 26

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR Primer RAGE_AS

<400> 26

ccctcgagcc cctcaaggcc ctcagtacta ct

32

<210> 27

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR Primer N-SE A

<400> 27

agtaacggcc gccagtgtgc tggaattcgg a

31

<210> 28

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR Primer C-SE B

<400> 28

ccggtaccac ctgcagttgg cccctcctcg cc

32

<210> 29

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR Primer hNogo HindIII

<400> 29

ccaagcttat gaagagggcg tccgctggag ggag

34

<210> 30

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR Primer hNogo EcoRI-TM

<400> 30

ccgaattcta gggcacctga gccttctgag tcacc

35

<210> 31

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptide 5

<400> 31

Asp Gly Lys Pro Leu Val Pro Asn Glu Lys Gly Val Ser Val Lys Glu

1 5 10 15

Gln Thr Arg Arg His Pro Glu Thr Gly Leu Phe Thr Leu Gln

20 25 30

<210> 32

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptide 6

<400> 32

Thr Leu Gln Ser Glu Leu Met Val Thr Pro Ala Arg Gly Gly Asp Pro
1 5 10 15

Arg Pro Thr Phe Ser Cys Ser Phe Ser Pro Gly Leu Pro Arg
20 25 30

<210> 33

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptide 7

<400> 33

Leu Pro Arg His Arg Ala Leu Arg Thr Ala Pro Ile Gln Pro Arg Val
1 5 10 15

Trp Glu Pro Val Pro Leu Glu Glu Val Gln Leu Val Val Glu
20 25 30

<210> 34

<211> 256

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> N-terminally truncated sRAGE comprising amino acids 102-331 of human RAGE

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (231)..(250)

<223> myc tag

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(230)

<223> amino acids 102 to 331 of human sRAGE

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (251)..(260)

<223> his tag

<400> 34

Met	Asn	Arg	Asn	Gly	Lys	Glu	Thr	Lys	Ser	Asn	Tyr	Arg	Val	Arg	Val
1				5				10					15		

Tyr Gln Ile Pro Gly Lys Pro Glu Ile Val Asp Ser Ala Ser Glu Leu

20	25	30
Thr Ala Gly Val Pro Asn Lys Val Gly Thr Cys Val Ser Glu Gly Ser		
35	40	45
Tyr Pro Ala Gly Thr Leu Ser Trp His Leu Asp Gly Lys Pro Leu Val		
50	55	60
Pro Asn Glu Lys Gly Val Ser Val Lys Glu Gln Thr Arg Arg His Pro		
65	70	75
Glu Thr Gly Leu Phe Thr Leu Gln Ser Glu Leu Met Val Thr Pro Ala		
85	90	95
Arg Gly Gly Asp Pro Arg Pro Thr Phe Ser Cys Ser Phe Ser Pro Gly		
100	105	110
Leu Pro Arg His Arg Ala Leu Arg Thr Ala Pro Ile Gln Pro Arg Val		
115	120	125
Trp Glu Pro Val Pro Leu Glu Glu Val Gln Leu Val Val Glu Pro Glu		
130	135	140
Gly Gly Ala Val Ala Pro Gly Gly Thr Val Thr Leu Thr Cys Glu Val		
145	150	155
Pro Ala Gln Pro Ser Pro Gln Ile His Trp Met Lys Asp Gly Val Pro		
165	170	175
Leu Pro Leu Pro Pro Ser Pro Val Leu Ile Leu Pro Glu Ile Gly Pro		
180	185	190
Gln Asp Gln Gly Thr Tyr Ser Cys Val Ala Thr His Ser Ser His Gly		
195	200	205
Pro Gln Glu Ser Arg Ala Val Ser Ile Ser Ile Ile Glu Pro Gly Glu		

210 215 220

Glu Gly Pro Thr Ala Gly Ala Arg Gly Gly Pro Glu Gln Lys Leu Ile
225 230 235 240

Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His
245 250 255

<210> 35

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR Primer

<400> 35
cgaagcttga tgaacaggaa tggaaaggag accaag

36

<210> 36

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR Primer

<400> 36
tcctcgagca cctgcagttg gccctcctc gcct

34

<210> 37

<211> 358

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> sRAGE comprising amino acids1-331 of human RAGE

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (353)..(358)

<223> His tag

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (332)..(352)

<223> Myc tag

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(331)

<223> sRAGE

<400> 37

Met	Ala	Ala	Gly	Thr	Ala	Val	Gly	Ala	Trp	Val	Leu	Val	Leu	Ser	Leu
1				5					10					15	

Trp Gly Ala Val Val Gly Ala Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu
20 25 30

Pro Leu Val Leu Lys Cys Lys Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg
35 40 45

Leu Glu Trp Lys Leu Asn Thr Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu
50 55 60

Ser Pro Gln Gly Gly Gly Pro Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro
65 70 75 80

Asn Gly Ser Leu Phe Leu Pro Ala Val Gly Ile Gln Asp Glu Gly Ile
85 90 95

Phe Arg Cys Gln Ala Met Asn Arg Asn Gly Lys Glu Thr Lys Ser Asn
100 105 110

Tyr Arg Val Arg Val Tyr Gln Ile Pro Gly Lys Pro Glu Ile Val Asp
115 120 125

Ser Ala Ser Glu Leu Thr Ala Gly Val Pro Asn Lys Val Gly Thr Cys
130 135 140

Val Ser Glu Gly Ser Tyr Pro Ala Gly Thr Leu Ser Trp His Leu Asp
145 150 155 160

Gly Lys Pro Leu Val Pro Asn Glu Lys Gly Val Ser Val Lys Glu Gln
165 170 175

Thr Arg Arg His Pro Glu Thr Gly Leu Phe Thr Leu Gln Ser Glu Leu
180 185 190

Met Val Thr Pro Ala Arg Gly Gly Asp Pro Arg Pro Thr Phe Ser Cys
195 200 205

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

Ile Gln Pro Arg Val Trp Glu Pro Val Pro Leu Glu Glu Val Gln Leu
225 230 235 240

Val Val Glu Pro Glu Gly Gly Ala Val Ala Pro Gly Gly Thr Val Thr
245 250 255

Leu Thr Cys Glu Val Pro Ala Gln Pro Ser Pro Gln Ile His Trp Met
260 265 270

Lys Asp Gly Val Pro Leu Pro Leu Pro Pro Ser Pro Val Leu Ile Leu
275 280 285

Pro Glu Ile Gly Pro Gln Asp Gln Gly Thr Tyr Ser Cys Val Ala Thr
290 295 300

His Ser Ser His Gly Pro Gln Glu Ser Arg Ala Val Ser Ile Ser Ile
305 310 315 320

Ile Glu Pro Gly Glu Glu Gly Pro Thr Ala Gly Gly Thr Lys Leu Gly
325 330 335

Pro Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp
340 345 350

His His His His His His
355