



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 694 32 511 T2 2004.04.29**

(12)

## Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 0 659 883 B1

(21) Deutsches Aktenzeichen: 694 32 511.2

(96) Europäisches Aktenzeichen: 94 118 524.1

(96) Europäischer Anmeldetag: 24.11.1994

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 28.06.1995

(97) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung beim EPA: 16.04.2003

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 29.04.2004

(51) Int Cl.<sup>7</sup>: **C12N 15/12**

C07K 14/47, C07K 16/18, A61K 38/17,  
C12P 21/08, A61K 39/395, G01N 33/68

(30) Unionspriorität:

31580693 24.11.1993 JP

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

(73) Patentinhaber:

Ono Pharmaceutical Co. Ltd., Osaka, JP

(72) Erfinder:

Tajima, Hisao, Shimamotocho, Osaka, JP;  
Kitagawa, Koichiro, Shimamotocho, Osaka, JP;  
Ohno, Hiroyuki, Shimamotocho, Osaka, JP

(74) Vertreter:

Henkel, Feiler & Hänel, 81675 München

(54) Bezeichnung: Protein p140 und dafür kodierende DNS

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

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

## Beschreibung

### Zusammenfassung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein neues Polypeptid, das Protein p140, das ein am Signalübertragungssystem von Insulin beteiligtes Schlüsselprotein ist; Verfahren zur Herstellung desselben; das Polypeptid codierende DNA; einen von der DNA abgeleiteten Vektor; mit dem Vektor transformierte Wirtszellen; einen Antikörper des Polypeptids; eine das Peptid oder den Antikörper enthaltende pharmazeutische Zusammensetzung; ein Mittel zur Prophylaxe und/oder Behandlung von Diabetes, das dadurch gekennzeichnet ist, dass es das Polypeptid enthält, und Screeningverfahren für das Prophylaxe- und/oder Behandlungsmittel.

### Hintergrund der Erfindung

[0002] Diabetes, eine anomale Stoffwechselerkrankung, wird durch einen Defekt im Mechanismus des Glucosestoffwechsels ausgelöst.

[0003] Unter normalen Bedingungen erfolgt der Glucosestoffwechsel wie folgt: Kohlehydrate, die in Form von Nahrung aufgenommen werden, werden im Darm vor der Absorption in das Kreislaufsystem zu Glucose verdaut. Pankreas- $\beta$ -Zellen reagieren auf eine Zunahme des Blutglucosespiegels durch Ausschüttung von Insulin, was wiederum die peripheren Zielgewebe (Muskeln und Leber) dazu stimuliert, den Blutglucosespiegel zu verringern, indem die Gewebeabsorption der Blutglucose verstärkt wird und anschließend eine Umwandlung in Glykogen zur Speicherung erfolgt.

[0004] In Abhängigkeit von den verursachenden Faktoren wird Diabetes in zwei Hauptkategorien klassifiziert: insulinabhängiger Diabetes mellitus (IDDM) und insulinunabhängiger Diabetes mellitus (NIDDM). IDDM (Typ-I-Diabetes) ist ein pathologischer Zustand, bei dem Insulin nicht ausgeschüttet wird oder auch bei einer Ausschüttung durch Pankreas- $\beta$ -Zellen als Reaktion auf eine durch Nahrungsaufnahme ausgelöste Zunahme des Blutglucosespiegels unzureichend ist. Es ist bekannt, dass die Zerstörung von  $\beta$ -Zellen der Langerhans-Inseln IDDM auslöst. Die derzeitige Therapie verwendet eine Insulinergänzung aus exogenen Quellen.

[0005] NIDDM (Typ-II-Diabetes) ist ein pathologischer Zustand, bei dem der Rückkopplungsmechanismus peripherer Gewebe funktionsgestört ist und hinsichtlich der Verringerung des Blutglucosespiegels unwirksam ist, obwohl im Lebendsystem eine normale Insulinausschüttung erfolgt. In den Vereinigten Staaten von Amerika gilt NIDDM als häufige Erkrankung; 5% der Bevölkerung eines Alters von mehr als 40 Jahren leiden an NIDDM. Die an dieser Erkrankung beteiligten verursachenden Faktoren sind noch aufzuklären.

### Verwandte Gebiete

[0006] Die Aufklärung der Ätiologie von NIDDM, d. h. die Aufklärung des insulininduzierten Glucoseaufnahmemechanismus in peripheren Gewebezellen ist jedoch unklar, da die derzeitigen Kenntnisse des Informationsübertragungsmechanismus von Insulin beschränkt und nicht fest begründet sind.

[0007] Von den Langerhans-Inseln ausgeschüttetes Insulin bindet an Insulinrezeptoren an der Zellmembran von peripheren Gewebezellen. Im Hinblick auf die Informationsübertragung nach der Bindung sind die Theorie der Phosphorylasekaskade und die Theorie des sekundären Botenstoffs die derzeitigen Forschungsschwerpunkte.

[0008] Diese zwei Theorien lassen sich kurz folgendermaßen erklären:

#### Theorie der Phosphorylasekaskade:

[0009] Wenn Insulin an die  $\alpha$ -Untereinheit des Insulinrezeptors bindet, löst die an der inneren Zellmembran vorhandene  $\beta$ -Untereinheit eine Phosphorylierung, die von der Aktivierung der Tyrosinkinasestelle im Rezeptor begleitet wird, aus. Die Phosphorylierung von Substraten durch das letztere Enzym ergibt drei unterschiedliche Proteine. Eines besteht aus 1235 Aminosäuren und besitzt ein Molekulargewicht von 185 kD, was dem Insulinrezeptorsubstrat 1 (IRS-1) entspricht. Bei der Tyrosinphosphorylierung von IRS-1 bindet die Phosphorylase von Phosphatidylinosit, PI1-Kinase, an den Komplex und aktiviert diesen. Mit der Informationsübertragung in Verbindung stehende Ereignisse nach der Bindung, die die Lokalisierung des Glucosetransporters in der Membran und die Membranerregung betreffen, müssen noch festgestellt werden. Neben IRS-1 wurde das Vorhandensein von zwei Proteinsubstraten (Shc und PTP-1C) bestätigt. Jedoch wurden der folgende Mechanismus bzw. die folgenden Mechanismen noch nicht vollständig geklärt.

#### Theorie des sekundären Botenstoffs:

[0010] Wenn Insulin an den Insulinrezeptor bindet, wird Phospholipase C spezifisch aktiviert, wobei Phospha-

tidylinositglykan (PIG) abgebaut wird, wobei Inositglykan (IG) und Diacylglycerin (DAG) durch Hydrolyse gebildet werden. Obwohl berichtet wurde, dass IG verschiedene insulinähnliche Wirkungen zeigt, muss die typische Glucoseaufnahmewirkung noch aufgezeigt werden.

[0011] Wenn jedoch Proteinkinase C durch DAG aktiviert wird, wird bekanntlich die Lokalisierung von Proteinkinase C in der Zellmembran gefördert. Dies impliziert, dass DAG aufeinanderfolgend innere Membranproteine phosphoryliert, wobei schließlich die Glucoseaufnahme ausgelöst wird. Diese Verflechtung bleibt jedoch bisher unklar.

[0012] Obwohl die zwei unterschiedlichen Denkrichtungen bisher vorherrschend sind, können die mit der Informationsübertragung verbundenen Anfangsstufen der Ereignisse nach der Bindung nur teilweise durch eine der beiden Theorien erklärt werden.

[0013] Gemäß Copper et al., 1988, wird das Hormon Amylin von b-Pankreaszellen, die ähnlich denen sind, die Insulin ausschütten, wenn Hyperglykämie vorherrscht, freigesetzt. Auf der Grundlage ihrer Erkenntnisse, dass Amylin die Wirkung von Insulin hemmte, zeigten sie auf, dass das Hormon als Insulinantagonist verwendet werden könnte. Ein Folgebericht im Jahr 1991 gibt an, dass die übermäßige Verwendung von Amylin bei transgenen Mäusen NIDDM auslöst. Jedoch ist die Beziehung zwischen Amylin und der Insulininformationsübertragung bis heute ungeklärt.

#### Mittel zur Lösung der Probleme

[0014] Die Erfinder der vorliegenden Erfindung konzentrieren sich auf die auf Insulin antagonistisch wirkenden Eigenschaften von Amylin. Durch beständige Forschungsaktivitäten, die hinsichtlich der Wirkungen von Amylin auf das Insulininformationsübertragungssystem durchgeführt wurden, identifizierten die Erfinder zunächst die Hemmstelle von Amylin bei der Regulierung des Insulininformationsübertragungssystems, und sie entdeckten die mit diesem Phänomen in Verbindung stehenden Schlüsselproteine, das phosphorylierte Protein 140 und 70 (pp140 und pp70). Die vorliegende Erfindung enthüllt klar die Strukturen der Proteine (DNA-Basensequenzen und Aminosequenzen) und die Aufklärung ihrer Wirkungsweisen, wodurch das bisher mangelhaft erklärte Phänomen der Insulininformationsübertragung vervollständigt wird.

#### Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0015] **Fig. 1** zeigt die Wirkungen von Vitamin K<sub>5</sub> (VK<sub>5</sub>) auf den Blutglucosegehalt in Streptozotocin(STZ)-induzierten diabetischen Ratten.

[0016] **Fig. 2** zeigt die Wirkungen von Vitamin K<sub>5</sub> (VK<sub>5</sub>) auf den Neutralfettgehalt in Blut von Streptozotocin(STZ)-induzierten diabetischen Ratten.

[0017] **Fig. 3** zeigt die Wirkungen von Vitamin K<sub>5</sub> (VK<sub>5</sub>) auf den Blutcholesteringehalt in Streptozotocin(STZ)-induzierten diabetischen Ratten.

[0018] **Fig. 4** zeigt das Hydrophobieprofil für das Polypeptidprotein p140 in der vorliegenden Erfindung.

[0019] **Fig. 5** zeigt den pUCSRaML2-Vektor.

#### Offenbarung der Erfindung

[0020] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Polypeptid Protein p140 mit der in SEQ ID No: 1 angegebenen Aminosäuresequenz in im wesentlichen gereinigter Form. Ferner werden DNAs mit Codierung für das Polypeptid ebenfalls von der vorliegenden Erfindung umfasst. In konkreterer Form ausgedrückt sind diese DNAs diejenigen mit der in SEQ ID No. 2 und 3 angegebenen Nucleotidsequenz.

[0021] Ferner betrifft die vorliegende Erfindung ein Mittel zur Prophylaxe und/oder Behandlung von Diabetes, das dadurch gekennzeichnet ist, dass es ein Polypeptid Protein p140 als Wirkstoff enthält, und die Screeningverfahren für das Mittel zur Prophylaxe und/oder Behandlung.

[0022] Die vorliegende Erfindung umfasst speziell:

- (1) Polypeptide, die aus der Aminosäuresequenz bzw. den Aminosäuresequenzen, die in SEQ ID No. 1 angegeben sind, aufgebaut sind;
- (2) DNAs, die die in SEQ ID No. 2 angegebenen Basesequenzen besitzen;
- (3) DNAs, die die in SEQ ID No. 3 angegebenen Basesequenzen besitzen;
- (4) ein Mittel zur Prophylaxe und/oder Behandlung von Diabetes, das dadurch gekennzeichnet ist, dass es ein Polypeptid Protein p140 als Wirkstoff enthält; und
- (5) ein Verfahren zum Screenen des Mittels zur Prophylaxe und/oder Behandlung von Diabetes, das durch die Verwendung von Protein p140 gekennzeichnet ist.

[0023] Bei einer Verabreichung von Amylin (0,1 mg/kg, i.p., t.i.d.) an gesunde Ratten während 7 Tagen wird eine dramatische Abnahme in den beiden Punkten der Insulinrezeptorpopulation und der ausgeschütteten In-

sulinmenge beobachtet. Diese Beobachtungen werden begleitet von Abnahmen in den beiden Punkten der Glucosetransporter-4 (Glut 4)-Menge und der synthetisierten Glykogenmenge (weniger als 50% Abnahme im Vergleich zu der der Kontrollgruppe) mit einer 1,7-fachen Zunahme des Blutglucosegehalts. Ferner wurde in Experimenten unter Verwendung von L6-Zellen (ATCC-Stamm Nr. CRL-1458) von Rattenskelettmuskelmyoblasten eine verringerte Glucoseaufnahme in den Zellen bei Amylinverabreichung beobachtet.

[0024] Als nächstes wurden Veränderungen der insulininduzierten Tyrosinphosphorylierungskaskade in mit Amylin behandelten Skelettmuskelmyoblasten untersucht, indem der Anti-Phosphotyrosin-Antikörper mit dem Western-Blotting-Verfahren verwendet wurde. Beispielsweise war, wenn L6-Zellen mit Insulin in den Experimenten inkubiert wurden, die Tyrosinphosphorylierung verstärkt. Eine Vorbehandlung mit Amylin unter ähnlichen Bedingungen bestätigte jedoch das Vorhandensein von zwei unterschiedlichen Proteinen, die die Phosphorylierung hemmten. Diese Proteine werden im folgenden als pp140 und pp70 entsprechend ihrem jeweiligen Molekulargewicht bezeichnet. Ferner werden die Vorläufer dieser Proteine vor der Phosphorylierung jedoch im folgenden als p140 bzw. p70 bezeichnet.

[0025] Die Erfinder der vorliegenden Erfindung stellten pp140 und pp70 her und isolierten und reinigten diese, bevor sie deren partielle Aminosäuresequenzen bestimmten. Beim Vergleichen von Ähnlichkeiten der Aminosäuresequenzen mit zuvor dokumentierten Sequenzen von Polypeptiden in Swiss Plot Release 2.0 fällt pp70 mit dem zuvor bekannten glucoseregulierten Protein 70 zusammen. Die Ergebnisse postulieren jedoch, dass pp140 ein völlig unbekanntes neues Protein ist. Daher isolierten die Erfinder der vorliegenden Erfindung mRNA von p140 aus den Rattenskelettmuskelmyoblasten und sie konstruierten die cDNA unter Verwendung der isolierten mRNA von p140, bevor sie die gesamte Basesequenz und vollständige Aminosäuresequenz des Proteins bestimmten. Die Ergebnisse vervollständigen daher die vorliegende Erfindung, indem sie ein vollständig neues Polypeptid und die dieses Polypeptid codierende gesamte DNA-Kette erfolgreich enthalten.

[0026] Aus den obigen Erkenntnissen ist klar, dass Amylin die Phosphorylierung von p140 und p70 zu pp140 bzw. pp70 hemmen kann. Im Gegensatz dazu wird, wenn angenommen wird, dass Amylin den Prozess von der Insulinrezeptorbindung bis zur Glucoseaufnahme unterdrückt, nahegelegt, dass die Phosphorylierung von p140 und p70 unter Bildung von pp140 und pp70 eine wichtige Rolle im Glucoseaufnahmemechanismus von Zellen spielen kann.

[0027] Die Erfinder der vorliegenden Erfindung versuchten den Wirkungsmechanismus bzw. die Wirkungsmechanismen von p140 und p70 daher aufzuklären.

[0028] Wenn Rattenskelettmuskelmyoblasten (Ratten-L6-Zellen) in insulinergänzten Kulturen inkubiert wurden, wurde das Auftreten einer pp140-Bande am Tag 3 mit einer pp140-Produktion am Tag 9 konstant beobachtet. In etwa dem gleichen Abstand (Tag 3) wurde das Auftreten von Glut 4 in ähnlicher Weise mit einer allmählichen Zunahme der Ratten-L6-Zellteilung beobachtet. Ferner wurde in einem ähnlichen Kultursystem am Tag 7 die Bildung mehrerer Kerne von Rattenskelettmuskelmyoblasten mit anschließender Teilung unter Bildung der Muskelzellen beobachtet. Im Falle von pp70 erschienen die Zellen am Tag 7 und behielten das Diri- gieren der Produktion des Proteins bis zum Tag 14 bei.

[0029] Bei der Überprüfung der Lokalisierung von pp140 in den Zellen fand sich jedoch, wenn Insulin zu nicht-serumbehandelten L6-Zellen gegeben wurde, das Protein 10 min nach der Kultur in der Mikrosommemembran (MM) des Cytoplasmas in der Zelle. Das pp140 verschwand danach. Ferner wurde pp140 in der permeablen Membran (PM) der Zellen fruestens 1 ~ 2 h nach der Kultur beobachtet. Aufgrund dieser Erkenntnisse wird postuliert, dass pp140 im Zellcytoplasma unmittelbar nach der Insulinbehandlung synthetisiert wurde und dieses Protein anschließend zur permeablen Membran (PM) 1 ~ 2 h danach übertragen wurde. Ferner wurde, wenn die Lokalisierung von pp70 in L6-Zellen mit einem ähnlichen experimentellen Ansatz untersucht wurde, pp70 zunächst in der MM unmittelbar nach dem Starten der Kultur lokalisiert, es zeigte einen Spitzenwert der phosphorylierten Menge 10 min nach der Kultur und es erreichte allmählich nicht-erfassbaren Werte 3 h nach der Kultur. Ferner war pp70 unmittelbar nach dem Starten der Kultur ebenfalls im Kern lokalisiert und der Proteingehalt nahm allmählich zu, wobei ein Spitzenwert 3 h nach der Kultur registriert wurde. Aufgrund der obigen Proteinlokalisierungsmuster existiert pp70 in Abwesenheit von Insulin in der MM, und dieses Protein wird innerhalb von 3 h nach einer Insulinbehandlung zur Kernfraktion bewegt.

[0030] Auf der Grundlage der obigen Ergebnisse kann der Informationsübertragungsmechanismus von pp140 wie folgt postuliert werden. Kurz gesagt wird, wenn Insulin an den Rezeptor bindet, der letztere durch Autophosphorylierung aktiviert. Die Information durchläuft dann verschiedene Aktivierungsstufen über die Phosphorylierung von Proteinphosphorylasen, wobei anschließend p140 zu pp140 phosphoryliert wird. Das aktivierte pp140 ist auf der permeablen Membran(PM)oberfläche lokalisiert, bevor p70 phosphoryliert wird, nachdem verschiedenen Proteinphosphorylierungsprozesse gleichzeitig durchgeführt wurden. Das phosphorylierte pp70 ist aktiviert und wird dann in den Kern bewegt, wobei es anschließend biologische Aktivitäten durch die Glut-4-Expression im Kern auslöst. Auf der Grundlage dieser Information wird das im Cytoplasma produzierte Glut 4 daher mobilisiert, wobei es sich auf der permeablen Membran(PM)oberfläche lokalisiert, um schließlich die Glucoseaufnahme auszulösen.

[0031] Der obige Informationsübertragungsmechanismus macht Nachfolgeexperimente nötig, um einen kon-

kreten Beweis des Phänomens zu Recht zu erbringen. Auf jeden Fall kann nun gefolgert werden, dass die Aktivierung von p140 eine essentielle Stufe ist, die zum Auslösen der Glucoseaufnahme in Zellen und zu einer anschließenden Hypoglykämie im Kreislaufsystem erforderlich ist.

[0032] So wird ein Verfahren zur Prophylaxe und/oder Behandlung von Diabetes, insbesondere insulinunabhängigem Diabetes mellitus (NIDDM) beschrieben, das durch Tyrosinphosphorylierung von Protein p140 gekennzeichnet ist.

[0033] Ferner wird ein Mittel zur Prophylaxe und/oder Behandlung von Diabetes, insbesondere insulinunabhängigem Diabetes mellitus (NIDDM) beschrieben, das durch Tyrosinphosphorylierung von Protein p140 gekennzeichnet ist. Das Verfahren und das Mittel zur Prophylaxe und/oder Behandlung von Diabetes, das durch Tyrosinphosphorylierung von Protein p140 gekennzeichnet ist, umfasst alle oder die gesamten Verfahren und Mittel zur Prophylaxe und/oder Behandlung von Diabetes auf der Grundlage des Hauptwirkmechanismus, der Tyrosinphosphorylierung von Protein p140 umfasst.

[0034] Ferner sind Zellen, die Protein p140 am Tyrosin phosphorylieren nicht nur auf Skelettmuskelmyoblasten (Ratten-L6-Zellen) beschränkt, sondern sie umfassen auch alle anderen Zellen, die die Phosphorylierung positiv anregen. Insgesamt umfassen Zellen, bei denen bestätigt wurde, dass sie die Phosphorylierung zeigen, Ratten-FaO-Hepatocyten, humane A673-Muskelzellen und HepG2-Hepatocyten.

[0035] Organe außer Muskeln und Leber, wie Herz, Gehirn, Milz, Lungen, Nieren, Hoden, Plazenta und Pankreas, zeigten wiederholt Auftreten von p140 mRNA gemäß der vorliegenden Erfindung. Ohne lediglich auf Muskeln und Leber beschränkt zu sein, können die Wirkungen der Tyrosinphosphorylierung daher weit durch das Lebendesystem ausstrahlen. Aufgrund dieser Erkenntnis ist daher der Wirkungsmechanismus der vorliegenden Erfindung nicht auf Muskel- und Leberzellen beschränkt, sondern er umfasst auch die Herz-, Gehirn-, Milz-, Lungen-, Nieren-, Hoden-, Plazenta- und Pankreaszellen.

[0036] Wenn das Polypeptid der vorliegenden Erfindung mit Aminosäuresequenzen bereits bekannter Polypeptide, die mit dem Swiss Prot Release 2.0 aufgezeichnet wurden, verglichen wurde, wurden Kandidaten mit einer vollständigen ganzen Sequenz, die der des Polypeptids ähnlich war, nicht identifiziert. Ferner wurde keine einzelne cDNA des vollständigen gesamten Polypeptids der vorliegenden Erfindung mit Codierung für die früher dokumentierten Nucleotidsequenzen, die in GenBank Release 70 aufgezeichnet waren, lokalisiert. Es wurde daher bestätigt, dass das Peptid der vorliegenden Erfindung ein vollständig neues Protein ist.

[0037] Des weiteren wurden Epithelzellkinase (Eck) und etwa 40 Identität erkannt, wenn die Ergebnisse mit Aminosäuresequenzen von Polypeptiden, die bereits in Swiss Prot Release 2.0 dokumentiert sind, verglichen wurden. Daher wurde postuliert, dass ein neues Protein der vorliegenden Erfindung zur Eck-Familie gehört.

[0038] In der vorliegenden Erfindung umfasst ein Polypeptid der SEQ. ID NO: 1 in im wesentlichen gereinigter Form im allgemeinen das Polypeptid in einer Produktion, in der mehr als 90%, beispielsweise 95%, 98% oder 99% des Polypeptids in der Produktion das der SEQ. ID NO: 1 sind.

[0039] Ein Polypeptidhomologon der SEQ. ID NO: 1 ist im allgemeinen zu mindestens 70%, zweckmäßigerweise mindestens 80 oder 90 und vorzugsweise mindestens 95% homolog zu dem Polypeptid der SEQ. ID NO: 1 über eine Region von mindestens 20, vorzugsweise mindestens 30, beispielsweise 40, 60 oder 100 oder mehr fortlaufenden Aminosäuren.

[0040] Im allgemeinen besitzen Fragmente der SEQ. ID NO: 1 oder von deren Homologa eine Länge von mindestens 10, vorzugsweise mindestens 15, beispielsweise 20, 25, 30, 40, 50 oder 60 Aminosäuren.

[0041] Eine DNA mit der Fähigkeit zur selektiven Hybridisierung mit der DNA der SEQ. ID NO: 2 oder 2 ist im allgemeinen mindestens 70%, zweckmäßigerweise mindestens 80 oder 90% und vorzugsweise mindestens 95% homolog zu der DNA der SEQ. ID NO: 2 oder 3 über einen Bereich von mindestens 20, vorzugsweise mindestens 30, beispielsweise 40, 60 oder 100 oder mehr fortlaufenden Nucleotiden.

[0042] Fragmente der DNA der SEQ. ID NO: 2 oder 3 besitzen eine Länge von mindestens 10, vorzugsweise mindestens 15, beispielsweise 20, 25, 30 oder 40 Nucleotiden.

[0043] In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung erfolgt die Bereitstellung von Replikations- und Expressionsvektoren, die DNA gemäß der Erfindung umfassen. Die Vektoren können beispielsweise Plasmid-, Virus- oder Phagenvektoren sein, die mit einem Replikationsursprung, optional einem Promotor zur Expression der DNA und optional einem Regulator des Promotors ausgestattet sind. Der Vektor kann ein oder mehrere selektierbare bzw. selektionsfähige Markergene, beispielsweise ein Ampicillinresistenzgen, enthalten. Der Vektor kann *in vitro*, beispielsweise zur Produktion von der DNA entsprechender RNA, oder zur Transfektion oder Transformation einer Wirtszelle verwendet werden.

[0044] In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung erfolgt die Bereitstellung von Wirtszellen, die mit den Vektoren zur Replikation und Expression von DNA gemäß der Erfindung, die die DNA der SEQ. ID NO: 2 oder 3 oder das offene Leseraster derselben umfassen, transformiert oder transfiziert sind. Die Zellen werden so gewählt, dass sie mit dem Vektor kompatibel sind, und sie können beispielsweise Bakterien-, Hefe-, Insekten- oder Säugetierzellen sein.

[0045] In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung erfolgt die Bereitstellung eines Verfahrens zur Produktion eines Polypeptids, das das Kultivieren von Wirtszellen der vorliegenden Erfindung unter zur Expressi-

on eines Polypeptids der Erfindung wirksamen Bedingungen umfasst. Vorzugsweise wird ein derartiges Verfahren ferner unter Bedingungen durchgeführt, bei denen das Polypeptid der Erfindung exprimiert und dann von den Wirtszellen produziert wird.

[0046] DNA gemäß der Erfindung kann auch in die im vorhergehenden beschriebenen Vektoren in Antisense-Orientierung eingeführt werden, um die Produktion von Antisense-RNA zu ermöglichen. Antisense-RNA kann ebenfalls durch Synthesemaßnahmen produziert werden. Eine derartige Antisense-RNA kann in einem Verfahren zur Steuerung der Konzentrationen eines Polypeptids der Erfindung in einer Zelle verwendet werden.

[0047] Durch die Erfindung erfolgt auch die Bereitstellung von monoklonalen oder polyklonalen Antikörpern gegenüber einem Polypeptid gemäß der Erfindung. Durch die Erfindung erfolgt ferner die Bereitstellung eines Verfahrens zur Produktion von monoklonalen oder polyklonalen Antikörpern gegen die Polypeptide der Erfindung. Monoklonale Antikörper können durch herkömmliche Hybridomtechnologie unter Verwendung eines Polypeptids der Erfindung oder eines Fragments desselben als Immunogen hergestellt werden. Polyklonale Antikörper können auch durch herkömmliche Maßnahmen, die das Impfen eines Wirtstiers, beispielsweise einer Ratte oder eines Kaninchens, mit einem Polypeptid der Erfindung und das Gewinnen des Immunserums umfassen, hergestellt werden.

[0048] Durch die vorliegende Erfindung erfolgt auch die Bereitstellung von pharmazeutischen Zusammensetzungen, die ein Polypeptid der Erfindung oder einen Antikörper desselben in Verbindung mit einem pharmazeutisch akzeptablen Verdünnungsmittel und/oder Träger enthalten.

[0049] Wie bekannt ist, sind eine bis sechs Arten eines Codons, das eine Aminosäure codiert, bekannt (beispielsweise eine Codonart für Met und sechs Codonarten für Leu). Daher kann die Nucleotidsequenz von DNA verändert werden, um das Polypeptid mit der gleichen Aminosäuresequenz zu codieren.

[0050] Die in (2) angegebene DNA ist die Ausführungsform der in (2) angegebenen DNA und sie ist die Sequenz in der natürlichen Form.

[0051] Die in (3) angegebene DNA gibt die in (2) spezifizierte DNA mit einer Nichttranslationsregion an.

[0052] Die DNA mit einer in SEQ. ID NO: 3 angegebenen Nucleotidsequenz kann nach den folgenden Verfahren hergestellt werden, d. h.:

- (i) durch Isolieren von mRNA aus einer Zelllinie, die das Polypeptid der vorliegenden Erfindung produziert (beispielsweise Rattenskelettmuskelmyoblasten-L6-Zellen),
- (ii) durch Herstellen eines ersten Strangs (einsträngige DNA) aus auf diese Weise erhaltener mRNA und anschließendes Herstellen eines zweiten Strangs (doppelsträngige DNA) (Synthese von cDNA),
- (iii) durch Einführen der auf diese Weise erhaltenen cDNA in einen geeigneten Plasmidvektor,
- (iv) durch Transformieren von Wirtszellen mit der auf diese Weise erhaltenen rekombinanten DNA (Herstellen der cDNA-Bibliothek),
- (v) durch randomisiertes Klonieren in großem Maßstab der auf diese Weise erhaltenen cDNA-Bibliothek und anschließendes Sequenzieren von durchschnittlich 300 Basen vom 5'-Ende jedes Klons, und
- (vi) durch Sequenzieren der vollständigen Länge eines Klons, der eine neue Basesequenz aufweist.

[0053] Genauer gesagt kann Stufe (i) gemäß dem Verfahren von H. Okayama et al. (Beschreibung in Methods in Enzymology, 154, 3 (1987)) unter Verwendung von L6-Zellen von Rattenskelettmuskelmyoblasten, die sich in der logarithmischen Wachstumsphase befinden, durchgeführt werden. Beispiele für Zellen, die das Polypeptid der vorliegenden Erfindung erzeugen, sind Zellen von Ratten oder Menschen von Muskeln, Leber, Herz, Hirn, Milz, Lungen, Nieren, Hoden, Plazenta oder Pankreas, und vorzugsweise sind es Rattenskelettmuskelmyoblasten-L6-Zellen (ATCC-Stamm Nr. CRL-1458), Rattenleber-FaO-Zellen, humane Muskel-A673-Zellen oder humane Leber-HepG2-Zellen. Die Stufen (ii), (iii) und (iv) sind eine Reihe von Stufen zur Herstellung einer cDNA-Bibliothek, und sie können gemäß dem Verfahren von Gubler & Hoffman (Gene, Band 25, S. 263, 1983) mit leichter Modifizierung durchgeführt werden. Als Beispiele für den in Stufe (iii) verwendeten Plasmidvektor sind viele Vektoren, die in einem E. coli-Stamm (beispielsweise pBR 322) und in *Bacillus subtilis* (beispielsweise pUB 110) funktional sind, bekannt, und pGEM-3Zf(+) (3 199 bp, hergestellt von Promega Corp.), das in E. coli funktional ist, kann vorzugsweise verwendet werden. Als Beispiele für den in Stufe (iv) verwendeten Wirt sind bereits viele Zellen bekannt. Beliebige Zellen können verwendet werden, und DH5-kompetente Zellen, die gemäß dem in Gene, Band 96, S. 23, 1990, beschriebenen Verfahren hergestellt wurden, können vorzugsweise verwendet werden. Das Klonieren in Stufe (v) kann durch als solche bekannte Verfahren durchgeführt werden und das Sequenzieren kann gemäß dem Verfahren von Maxam-Gilbert oder dem Dideoxyterminationsverfahren durchgeführt werden. Die Stufe (vi) kann gemäß dem in Molecular Cloning (Autor J. Sambrook, E. F. Fritsch und T. Maniatis, verlegt bei Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) beschriebenen Verfahren durchgeführt werden.

[0054] Als folgende Stufe ist es notwendig, zu überprüfen, ob die auf diese Weise erhaltene DNA richtig für das zu produzierende Protein codiert oder nicht. Die Prüfung erfordert:

- (i) die Umwandlung der DNA-Sequenz in die Aminosäuresequenz in einem möglichen Raster,

(ii) die Bestätigung, dass die auf diese Weise erhaltene DNA die gesamte oder nahezu die gesamte Länge der intakten mRNA umfasst. Diese Bestätigung kann nach der hier im vorhergehenden beschriebenen Stufe (vi) und wirksam zwischen der Stufe (v) und der Stufe (vi) durchgeführt werden.

[0055] Die Stufe (II) kann mittels Northern-Analyse durchgeführt werden.

[0056] Sobald die in SEQ. ID NO: 2 und 3 angegebenen Nucleotidsequenzen bestimmt sind, kann die DNA der vorliegenden Erfindung durch chemische Synthese, durch das PCR-Verfahren oder durch Hybridisierung unter Verwendung eines Fragments der DNA der vorliegenden Erfindung als Sonde erhalten werden. Ferner kann die DNA der vorliegenden Erfindung in einer gewünschten Menge durch Transformation eines geeigneten Wirts mit einer Vektor-DNA, in die eine DNA der vorliegenden Erfindung insertiert ist, und anschließendes Kultivieren der Transformante erhalten werden.

[0057] Die Polypeptide der vorliegenden Erfindung (die in SEQ. ID NO: 1 angegeben sind) können hergestellt werden durch:

- (1) Isolieren und Reinigen aus einem Organismus oder einer kultivierten Zelle,
- (2) chemische Synthese oder
- (3) unter Verwendung biotechnologischer Fertigkeiten, vorzugsweise das in (3) beschriebene Verfahren.

[0058] Beispiele für ein Expressionssystem, wenn ein Polypeptid unter Verwendung biotechnologischer Fertigkeiten hergestellt wird, sind beispielsweise das Expressionssystem von Bakterien, Hefe, Insektenzellen und Säugetierzellen.

[0059] Beispielsweise kann die Expression in E. coli durch Anfügen des Initiationscodons (ATG) an das 5'-Ende einer DNA mit Codierung für eine Nucleotidsequenz, die in SEQ. ID NO: 3 angegeben ist, Verbinden der auf diese Weise erhaltenen DNA mit der stromabwärtigen Seite eines geeigneten Promotors (beispielsweise trp-Promotor, lac-Promotor,  $\lambda p_l$ -Promotor, T7-Promotor und dergleichen) und das anschließende Insertieren derselben in einen Vektor (beispielsweise pBR322, pUC18, pUC19 und dergleichen), der in einem E. coli-Stamm funktional ist, wobei ein Expressionsvektor hergestellt wird, durchgeführt werden. Danach kann ein E. coli-Stamm (beispielsweise E. coli-DH1-Stamm, E. coli-JM109-Stamm, E. coli-HB101-Stamm und dergleichen), der mit dem auf diese Weise erhaltenen Expressionsvektor transformiert ist, in einem geeigneten Medium unter Bildung des gewünschten Polypeptids kultiviert werden. Wenn ein Signalpeptid eines Bakteriums (beispielsweise das Signalpeptid von pel B) verwendet wird, kann das gewünschte Polypeptid auch in das Periplasma sezerniert werden. Ferner kann ein Fusionsprotein mit einem anderen Polypeptid ebenfalls ohne weiteres hergestellt werden.

[0060] Ferner kann die Expression in einer Säugetierzelle durch beispielsweise Insertieren der in SEQ. ID NO: 3 angegebenen DNA stromabwärts eines geeigneten Promotors (beispielsweise SV40-Promotor, LTR-Promotor, Metallothioneinpromotor und dergleichen) in einem geeigneten Vektor (beispielsweise Retrovirusvektor, Papillomavirusvektor, Vaccinia-virusvektor, SV40-Vektor und dergleichen) unter Bildung eines Expressionsvektors und Transformieren einer geeigneten Säugetierzelle (beispielsweise Affen-COS-7-Zelle, Chinesische-Hamster-CHO-Zelle, Maus-L-Zelle und dergleichen) mit dem auf diese Weise erhaltenen Expressionsvektor und anschließendes Kultivieren der Transformante in einem geeigneten Medium unter Bildung eines gewünschten Polypeptids in dem Kulturmedium durchgeführt werden. Das auf diese Weise erhaltene Polypeptid kann nach herkömmlichen biochemischen Verfahren isoliert und gereinigt werden.

[0061] Das Protein der vorliegenden Erfindung umfasst die Reaktionsprodukte des phosphorylierten und/oder an eine Zuckerkette gebundenen Proteins. Kurz gesagt, enthält die vorliegende Erfindung p140-gebundene Polysaccharidketten und Tyrosinphosphoryliertes p140 (pp140), die sich in p140-Polypeptiden finden.

#### Wirkungen der Erfindung

[0062] Es wird postuliert, dass das Protein p140 den im vorhergehenden genannten Wirkungsmechanismus besitzt. Das Protein-p140-Polypeptid der vorliegenden Erfindung kann daher nicht nur hyperglykämische Zustände verbessern, wenn es alleine verwendet wird, sondern es kann auch zur Prophylaxe und/oder Behandlung von Diabetes, insbesondere insulinunabhängigem Diabetes mellitus (NIDDM) verwendet werden.

[0063] Ferner können polyklonale oder monoklonale Antikörper gegen das Protein-p140-Polypeptid der vorliegenden Erfindung bei der Bestimmung der Menge des Polypeptids im Organismus verwendet werden und dadurch zum Zwecke der Untersuchung der Beziehung zwischen dem Polypeptid und Krankheiten oder zum Zwecke der Diagnose von Krankheiten und dergleichen verwendet werden. Ein polyklonaler und monoklonaler Antikörper desselben kann nach herkömmlichen Verfahren unter Verwendung des Polypeptids oder Fragments desselben als Antigen hergestellt werden.

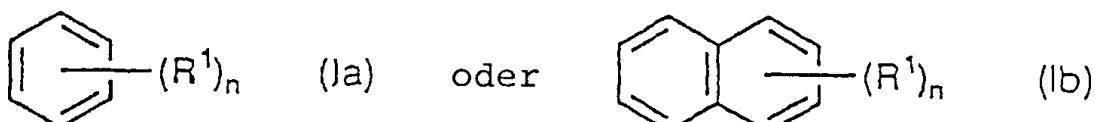
[0064] Die DNA der vorliegenden Erfindung kann als wichtiges und wesentliches Templat bei der Herstellung des Polypeptids der vorliegenden Erfindung verwendet werden, wobei dieses verschiedene Verwendungsmöglichkeiten für die Diagnose und Behandlung von Genkrankheiten besitzen sollte (die Behandlung von Gen-

defektkrankheiten und die Behandlung durch Hemmen der Expression des Polypeptids durch Antisense-DNA (RNA) und dergleichen). Ferner kann Genom-DNA unter Verwendung der DNA der vorliegenden Erfindung als Sonde isoliert werden. In ähnlicher Weise ist es möglich, Gene mit hoher Homologie zur DNA der vorliegenden Erfindung bei Menschen oder die anderer Arten zu isolieren.

[0065] Ferner wird ein Mittel zur Prophylaxe und/oder Behandlung von Diabetes, das dadurch gekennzeichnet ist, dass es eine Verbindung, die eine Tyrosinphosphorylierung von Protein p140 durchführen kann, als Wirkstoff enthält, beschrieben.

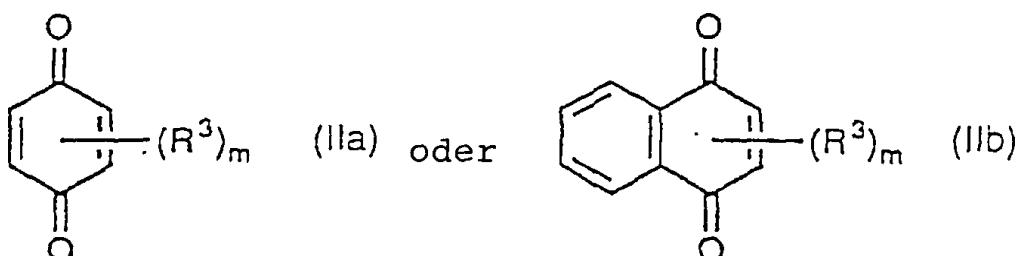
[0066] Alles in allem umfassen tyrosinphosphorylierte Protein-p140-Produkte nicht nur die derzeit erkannten Substanzen, die diese Aktivitäten besitzen, sondern auch alle Substanzen, bei denen erkannt wird, dass sie diese Aktivitäten besitzen. Derzeit ist beispielsweise für die folgenden Verbindungen bestätigt, dass sie die Aktivität der Tyrosinphosphorylierung aufweisen:

(1) die Benzol- oder Naphthalinderivate der Formel (I)



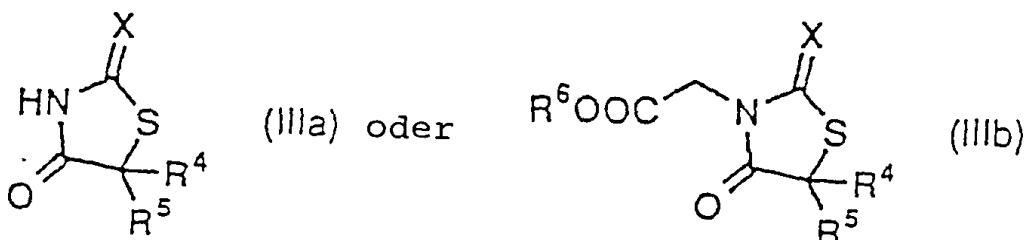
worin R<sup>1</sup> von n Arten jeweils unabhängig voneinander ein Wasserstoffatom, C<sub>1-4</sub>-Alkyl, Hydroxy, Amino oder COOR<sup>2</sup> (worin R<sup>2</sup> ein Wasserstoffatom oder C<sub>1-4</sub>-Alkyl ist) bedeutet, n 1-3 ist, und nicht-toxische Salze derselben und nicht-toxische Säureadditionssalze derselben,

(2) die Benzochinon- oder Naphthochinonderivate der Formel (II)



worin R<sup>3</sup> von m Arten jeweils unabhängig voneinander ein Wasserstoffatom, C<sub>1-12</sub>-Alkyl, C<sub>1-9</sub>-Alkoxy, C<sub>1-9</sub>-Alkylthio, Hydroxy, Halogen, Phenyl oder halogensubstituiertes Phenyl bedeutet, m 1-4 ist,

(3) die Rhodanin- oder Thiazolidinderivate der Formel (III)



worin X ein Sauerstoff- oder Schwefelatom ist, R<sup>4</sup> und R<sup>5</sup> jeweils unabhängig voneinander ein Wasserstoffatom, Phenyl oder mit C<sub>1-9</sub>-Alkyl, C<sub>1-8</sub>-Alkoxy, einem Halogenatom oder einer Nitrogruppe substituiertes Phenyl bedeuten oder R<sup>9</sup> und R<sup>5</sup> zusammengenommen für Benzyliden, mit C<sub>1-4</sub>-Alkyl, C<sub>1-8</sub>-Alkoxy, einem Halogenatom oder einer Nitrogruppe substituiertes Benzyliden oder β-Methylcinnamilden stehen, R<sup>6</sup> ein Wasserstoffatom oder C<sub>1-9</sub>-Alkyl bedeutet,

und nicht-toxische Salze derselben und nicht-toxische Säureadditionssalze derselben.

[0067] Genauer gesagt, umfassen die Verbindungen der Formel (I) 4-Amino-2-hydroxybenzoësäure, 4-Amino-1-naphthol, 4-Amino-2-naphthol, 1-Aminonaphthalin, 1,4-Dihydroxynaphthalin, 4-Amino-2-methyl-1-naphthol (im folgenden als Vitamin K<sub>5</sub> abgekürzt), 1,4-Dihydroxy-2-naphthensäure und dergleichen.

[0068] Die Verbindungen der Formel (II) umfassen 2-Methyl-1,4-benzochinon, 2,6-Di-tert.-butyl-1,4-benzochinon, 2,6-Dibrom-1,4-benzochinon, 2,3,4,5-Tetrafluor-1,4-benzochinon, 1,4-Naphthochinon, 2-Methyl-1,4-naphthochinon (im folgenden als Vitamin K<sub>3</sub> abgekürzt), 2-Hydroxy-3-methyl-1,4-naphthochinon, 2-(3,7-Dimethyloctyl)-3-hydroxy-1,4-naphthochinon, 2-Methoxy-3-methyl-1,4-naphthochinon, 2-Hydroxy-1,4-naphthochinon, 3-(4-Chlorphenyl)-2-hydroxy-1,4-naphthochinon, 2-Propylthio-1,4-naphthochinon und dergleichen.

[0069] Die Verbindungen der Formel (III) umfassen 5-Phenylrhodanin, 5-Phenyl-1,3-thiazolidin-2,4-dion,

5-Benzylidenrhodanin, 5-Benzyliden-1,3-thiazolidin-2,4-dion, 5,5-Diphenylrhodanin, 5,5-Diphenyl-1,3-thiazolidin-2,4-dion, 5-(4-Isoamyoxybenzyliden)rhodanin, 5-(4-Isoamyoxybenzyliden)-1,3-thiazolidin-2,4-dien, 5-( $\beta$ -Methylcinnamyliden)rhodanin-3-essigsäure und dergleichen und nicht-toxische Salze derselben und nicht-toxische Säureadditionssalze derselben.

[0070] Hierbei sind die geeigneten nicht-toxischen Salze beispielsweise Salze eines Alkalimetalls (beispielsweise Kalium, Natrium und dergleichen), Salze eines Erdalkalimetalls (beispielsweise Calcium, Magnesium und dergleichen), Ammoniumsalze, Salze eines pharmazeutisch akzeptablen organischen Amins (beispielsweise Tetramethylammonium, Triethylamin, Methylamin, Dimethylamin, Cyclopentylamin, Benzylamin, Phenethylamin, Piperidin, Monoethanolamin, Diethanolamin, Tris(hydroxymethyl)amin, Lysin, Arginin, N-Methyl-D-glucamin und dergleichen).

[0071] Hierbei umfassen die geeigneten Säureadditionssalze die Salze mit anorganischen Säuren, wie Salzsäure, Bromwasserstoffsaure, Schwefelsäure, Phosphorsäure und Salpetersäure, und die Salze mit organischen Säuren, wie Essigsäure, Trifluoressigsäure, Milchsäure, Weinsäure, Oxalsäure, Fumarsäure, Maleinsäure, Benzolsulfonsäure, Toluolsulfonsäure, Isethionsäure, Glucuronsäure und Gluconsäure.

[0072] Die Verbindungen der Formeln (I), (II) und (III) sind als solche bekannt oder sie können unter Verwendung von anderen Ausgangsmaterialien ohne weiteres durch als solche bekannte Verfahren hergestellt werden.

[0073] Wenn die verwendeten Substanzen einer Tyrosinphosphorylierung unterzogen werden, verbessern diese Mittel nicht nur die von Diabetes stammenden hyperglykämischen Zustände, sondern sie sind auch zur Behandlung und/oder Prophylaxe von Diabetes, insbesondere insulinunabhängigen Diabetes mellitus (NIDDM) verwendbar.

[0074] Es wurde bestätigt, dass die Toxizität der verschiedenen Wirkstoffe und Salze derselben sehr gering ist. Daher können die verschiedenen Wirkstoffe und Säureadditionssalze derselben als sicher und zur pharmazeutischen Verwendung geeignet angesehen werden.

[0075] Für den im vorhergehenden beschriebenen Zweck können das Polypeptid, die einzelnen Wirkstoffe und Säureadditionssalze derselben normalerweise systemisch oder partiell, üblicherweise durch orale oder parenterale Verabreichung verabreicht werden.

[0076] Die zu verabreichenden Dosismengen bestimmen sich in Abhängigkeit von beispielsweise Alter, Körpergewicht, den Symptomen, der gewünschten therapeutischen Wirkung, dem Verabreichungsweg und der Dauer der Behandlung. Beim erwachsenen Menschen betragen die Dosismengen pro Person pro Dosis bei oraler Verabreichung bis zu mehrere Male pro Tag zwischen 10  $\mu$ g und 1000 mg und bei parenteraler Verabreichung bis zu mehrere Male pro Tag und bei kontinuierlicher intravenöser Verabreichung zwischen 1 und 24 h pro Tag zwischen 10  $\mu$ g und 100 mg.

[0077] Wie im vorhergehenden angegeben, hängen die zu verwendenden Dosismengen von verschiedenen Bedingungen ab. Daher können Fälle auftreten, bei denen niedrigere oder größere Dosismengen als die im vorhergehenden angegebenen Bereiche verwendet werden können.

[0078] Bei der Verabreichung der Verbindungen der vorliegenden Erfindung können diese als feste Zusammensetzungen, flüssige Zusammensetzungen oder andere Zusammensetzungen zur oralen Verabreichung, als Injektionen, Einreibungen oder Suppositorien zur parenteralen Verabreichung verwendet werden.

[0079] Feste Zusammensetzungen zur oralen Verabreichung umfassen Presstabletten, Pillen, Kapseln, dispergierbare Pulver und Granulate. Kapseln umfassen harte Kapseln und weiche Kapseln.

[0080] Bei derartigen Zusammensetzungen werden eine oder mehrere der aktiven Verbindungen mit mindestens einem inerten Verdünnungsmittel (wie Lactose, Mannit, Glucose, Hydroxypropylcellulose, mikrokristalline Cellulose, Stärke, Polyvinylpyrrolidon, Magnesiummetasilicataluminat) gemischt. Die Zusammensetzungen können auch, wie es normale Praxis ist, weitere Substanzen neben den inerten Verdünnungsmitteln umfassen: beispielsweise Gleitmittel (wie Magnesiumstearat), den Zerfall fördernde Mittel (wie Cellulosecalciumglykolat), Stabilisierungsmittel (wie Lactose) und eine Auflösung unterstützende Mittel (wie Glutaminsäure, Asparginäsäure).

[0081] Die Tabletten oder Pillen können, falls gewünscht, mit einem Film aus gastrischem oder enterischem Material (wie Zucker, Gelatine, Hydroxypropylcellulose oder Hydroxypropylmethylcellulosephthalat) überzogen oder mit mehr als zwei Filmen überzogen werden. Ein Überzug kann die Aufnahme in Kapseln aus absorbierbaren Materialien, wie Gelatine, umfassen.

[0082] Flüssige Zusammensetzungen zur oralen Verabreichung umfassen pharmazeutisch akzeptable Lösungen, Emulsionen, Suspensionen, Sirupe und Elixiere. Bei derartigen Zusammensetzungen sind eine oder mehrere der aktiven Verbindungen in einem inerten Verdünnungsmittel bzw. inerten Verdünnungsmitteln, die üblicherweise einschlägig verwendet werden (beispielsweise gereinigtes Wasser, Ethanol) enthalten. Neben inerten Verdünnungsmitteln können derartige Zusammensetzungen auch Hilfsstoffe (wie Benetzungsmittel, Suspendiermittel), Süßungsmittel, Aromastoffe, Duftstoffe und Konservierungsmittel umfassen.

[0083] Andere Zusammensetzungen zur oralen Verabreichung umfassen Sprayzusammensetzungen, die nach bekannten Verfahren hergestellt werden können und die eine oder mehrere der aktiven Verbindungen

umfassen. Sprayzusammensetzungen können neben inerten Verdünnungsmitteln weitere Substanzen umfassen: beispielsweise Stabilisierungsmittel (wie Natriumsulfat), isotonische Puffer (wie Natriumchlorid, Natriumcitrat, Citronensäure). Zur Herstellung derartiger Sprayzusammensetzungen kann beispielsweise das im US-Patent Nr. 2 868 691 oder 3 095 355 beschriebene Verfahren verwendet werden.

[0084] Injektionen zur parenteralen Verabreichung umfassen sterile, wässrige oder nicht-wässrige Lösungen, Suspensionen und Emulsionen. In derartigen Zusammensetzungen sind eine oder mehrere aktive Verbindungen mit mindestens einem inerten wässrigen Verdünnungsmittel (wie destilliertes Wasser zu Injektionszwecken, physiologische Salzlösung) oder inerten nichtwässrigen Verdünnungsmittel (wie Propylenglykol, Polyethylenglykol, Olivenöl, Ethanol, POLYSORBATE 80 (registriertes Warenzeichen)) gemischt.

[0085] Injektionen können neben inerten Verdünnungsmitteln weitere Materialien umfassen: beispielsweise Konservierungsmittel, Feuchthaltemittel, Emulgatoren, Dispergiermittel, Stabilisierungsmittel (wie Lactose) und eine Auflösung fördernde Mittel (wie Glutaminsäure, Asparginsäure).

[0086] Sie können beispielsweise durch Filtration durch ein Bakterienrückhaltefilter, durch Einarbeiten von Sterilisationsmitteln in die Zusammensetzungen oder durch Bestrahlung sterilisiert werden. Sie können auch in Form steriler fester Zusammensetzungen durch beispielsweise Gefriertrocknen hergestellt werden, die dann in steriles Wasser oder einem anderen sterilen Verdünnungsmittel bzw. anderen sterilen Verdünnungsmitteln zu Injektionszwecken unmittelbar vor der Verwendung gelöst werden können.

[0087] Andere Zusammensetzungen zur parenteralen Verabreichung umfassen Flüssigkeiten zur äußeren Anwendung und endermische Einreibungen, Salben, Suppositorien und Pessare, die eine oder mehrere der aktiven Verbindungen umfassen und nach als solche bekannten Verfahren hergestellt werden können.

#### Beispiel

[0088] Die folgenden Beispiele erläutern die vorliegende Erfindung, ohne diese jedoch zu beschränken.

#### Beispiel 1

##### Reinigungsverfahren für pp140

[0089] Unter Verwendung von Zellschalen ( $225 \text{ cm}^2$ ) wurden Ratten-L6-Zellen 7–10 Tage lang in einer 5%- $\text{CO}_2$ -Atmosphäre bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Das Kulturmedium wurde in Abständen von 3 Tagen mit dem nach Dulbecco modifizierten Eagle-Medium (das 10 Rinderfetusserum (BFS) enthielt) ersetzt. 2 h nach der Behandlung der aus Skelettmuskelmyoblasten entwickelten Muskelzellen mit serumfreiem Medium wurden  $500 \mu\text{M}$  Vanadinsäure (Vanadat) zu der Kultur gegeben und weitere 10 min lang inkubiert. Die Zellen wurden dann in Tris-Puffer ( $400 \mu\text{M}$  Vanadat mit Proteaseinhibitor) suspendiert, lysiert und zentrifugiert, bevor der Überstand isoliert wurde.

[0090] Der Überstand wurde mit Octa(ethylenglykol)ether (C12E8) auf eine Endkonzentration von 0,1% eingestellt, bevor er über eine Millipore-Membran filtriert wurde. Ein Protein-G-Sepharosegel, an das Anti-phosphotyrosin-Antikörper gebunden waren, wurde mit der filtrierten Probe gefüllt. Das tyrosinphosphorylierte Protein (pp140) adsorbierte an dem Gel. Nach dem Spülen der Säule mit 25 mM Trispuffer wurde pp140 mit 10 mM Phenylphosphat eluiert. Das Eluat wurde mit Centricon 30 eingeengt, bevor pp140 durch das Acetonfällerverfahren gefällt wurde.

#### Beispiel 2

##### Tyrosinphosphorylierung von p140 in verschiedenen Geweben

[0091] Unter Verwendung des nach Dulbecco modifizierten Eagle-Medium (das 10% BFS enthielt) wurden verschiedene Zellen ( $1 \times 10^5$  Zellen/Schale) unter einer 5%- $\text{CO}_2$ -Atmosphäre 5–8 Tage lang bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Die Zellen waren Skelettmuskelzellen, die sich aus Skelettmuskelmyoblasten differenziert hatten. Die differenzierten Zellen, die zuvor 4 h lang in serumfreiem, nach Dulbecco modifiziertem Eagle-Medium behandelt wurden, wurden mit und ohne Amylin ( $100 \mu\text{M}$ ) inkubiert, bevor sie weitere 24 h lang inkubiert wurden. Kulturen wurden mit Insulin ( $100 \text{ nM}$ ) behandelt und danach über einen festen Zeitraum (10 oder 60 min) inkubiert.

[0092] Nach dem Spülen der Kulturen mit eiskaltem Phosphatpuffer wurden die Zellen mit Phosphatpuffer, der 0,5% Octa(ethylenglykol)ether ( $\text{C}_{12}\text{E}_8$ ) enthielt, lysiert. Das pp140 wurde durch Sepharoperlen, an die Phosphotyrosin-Antikörper (Transformation Corp.) gebunden war, gewonnen, bevor es mit Phenylphosphat und Western-Blotting-Verfahren eluiert bzw. erfasst wurde. Der Bandengehalt von pp140 wurde mittels eines Densitometers unter Verwendung von gereinigtem pp140 als Standard bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 angegeben.

TABELLE 1  
Wirkungen der p140-Tyrosinphosphorylierung auf verschiedene Gewebe

	Ratten		Mensch	
	L6	FaO	A678	HepG2
Kontrolle	300	100	300	250
Insulin 10 min	2400	2000	2500	2100
Insulin 60 min	1000	1400	1900	1200
Insulin mit zugesetztem Amylin 10 min	180	300	350	300
Insulin mit zugesetztem Amylin 60 min	200	100	1000	300

[0093] In Tabelle 1 wurden die Kulturen 24 h vor der Zugabe von Insulin (100 nM) mit Amylin (100 pM) behandelt.

#### Beobachtung

[0094] Das Auftreten von pp140, das innerhalb von 10 min beobachtet wurde, wenn Ratten-L6-Zellen mit Insulin inkubiert wurden, wurde durch eine Amylinbehandlung antagonistisch beeinflusst. Außerdem wurde dieses Phänomen in ähnlicher Weise bei Rattenhepatocyten, FaO-Zellen, erkannt. Ferner ist dieses Phänomen nicht nur auf Ratten begrenzt. Bei humanen Muskelzellen (A673-Zellen) und Hepatocyten (HepG2-Zellen) wurde das Phänomen in ähnlicher Weise erkannt. Es wird postuliert, dass Amylin eine bestimmte Stufe oder bestimmte Verfahren, bevor die p140-Phosphorylierung durch das Phosphorylierungssignal von Insulin ausgelöst wird, unterdrückt.

#### Beispiel 3

##### Wirkungen verschiedener Testverbindungen auf die p140-Phosphorylierung

[0095] Ratten-L6-Zellen ( $1 \times 10^5$  Zellen/Schale) wurden in dem nach Dulbecco modifizierten Eagle-Medium (das 10% BFS enthielt) 8 Tage lang unter einer 5%-CO<sub>2</sub>-Atmosphäre bei 37°C inkubiert. Die verwendeten Zellen waren aus Skelettmuskelmyoblasten differenzierte Muskelzellen. Nach der Behandlung der differenzierten Skelettmuskelzellen in serumfreiem, nach Dulbecco modifiziertem Eagle-Medium während 4 h wurden verschiedene Testverbindungen (10 mM, mit Ausnahme von Insulin, 1 mM) zugegeben, bevor die Kulturen über einen festen Zeitraum weiter inkubiert wurden.

[0096] Nach dem Spülen der Kulturen mit eiskaltem Phosphatpuffer wurden die Zellen mit Phosphatpuffer, der 0,5% Octa(ethylenglykol)ether (C<sub>12</sub>E<sub>8</sub>) enthielt, lysiert. Das pp140 wurde durch Cephaloperlen, an die Phosphotyrosinantikörper (Transformation Corp.) gebunden war, gewonnen, bevor es mit Phenylphosphat und Western-Blotting-Verfahren eluiert bzw. erfasst wurde. Der Bandengehalt von pp140 wurde mittels eines Densitometers unter Verwendung von gereinigtem pp140 als Standard bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 angegeben.

TABELLE 2  
Wirkungen der p140-Tyrosinphosphorylierung auf verschiedene Testverbindungen

Verbindung	Menge des tyrosinphosphorylierten p140 (Kopie/Zelle)			
	0	3	10	60 (min)
Vitamin K <sub>3</sub>	350	3650	1800	750
Vitamin K <sub>5</sub>	400	3850	2850	1600
5-Phenylrhodanin	350	1600	1250	650
5-Benzylidenrhodanin	400	2650	1900	1350
4-(4-Isoamyloxybenzyliden)-rhodanin	400	3200	2250	1600
Insulin (positive Kontrolle)	350	1850	2600	1650

## Beispiel 4

## Verstärkungswirkung auf die Glucoseaufnahme

[0097] Ratten-L6-Zellen ( $1 \times 10^5$  Zellen/Schale) wurden in nach Dulbecco modifiziertem Eagle-Medium (das 10% BFS enthielt) 8 Tage lang unter einer 5%-CO<sub>2</sub>-Atmosphäre bei 37°C inkubiert. Die verwendeten Zellen waren aus Skelettmuskelmyoblasten differenzierte Skelettmuskelzellen. Nach einer 2-stündigen Behandlung der differenzierten Skelettmuskelzellen in serumfreiem, nach Dulbecco modifiziertem Eagle-Medium wurden verschiedene Testverbindungen (10 mM, mit Ausnahme von Insulin, 1 mM) zugegeben, bevor die Kulturen über einen festen Zeitraum von 2 h weiter inkubiert wurden. Die Kulturen wurden danach 20 min lang mit Krebs-Ringer-Phosphatpuffer (pH-Wert: 7,4) behandelt und dann mit 5 mM <sup>3</sup>H-2-Desoxyglucose (0,05 mCi/ml) inkubiert. 3 min nach Beginn der Inkubation wurde der aufgenommene Radioaktivitätsgehalt in den Zellen mit einem Flüssigszintillationszähler bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 angegeben.

TABELLE 3  
Verstärkungswirkung auf die Glucoseaufnahme

Verbindung	Wirkung auf die Glucoseaufnahme (pmol/mg Protein/min)
Kontrolle	22,6
Vitamin K <sub>3</sub>	60,9
Vitamin K <sub>5</sub>	67,5
5-Phenylrhodanin	76,8
5-Benzylidenrhodanin	84,2
5-(4-Isoamyloxybenzyliden)-rhodanin	98,4
Insulin (positive Kontrolle)	106,8

## Beobachtung

[0098] Von allen Verbindungen, die die p140-Phosphorylierung förderten, wurde festgestellt, dass sie eine Glucoseaufnahmewirkung aktivierten (Tabelle 2 und 3).

Beispiel 5

Wirkungen von Vitamin K<sub>5</sub> auf Diabetes

[0099] Das Diabetes-Modell unter Verwendung von Streptozotocin (STZ) wurde in männlichen Wistar-Ratten (STZ-Ratten) etabliert.

[0100] Nach der Verabreichung verschiedener intraperitonealer (i.p.) Tagesdosierungen von Vitamin K<sub>5</sub> während 3 aufeinanderfolgenden Tagen an STZ-Ratten (eine Verabreichung pro Tag) wurden der Gehalt von Glucose, Neutralfett und Cholesterin im Blut bestimmt. Entsprechend erhielten STZ- und normale Ratten Vehikel (physiologische Kochsalzlösung) mit identischen Tagesraten und identischer Dauer verabreicht, bevor ähnliche Blutindizes, die im vorhergehenden genannt wurden, bestimmt wurden. Außerdem wurden Ratten, die subkutan (s.c.) Insulin (8 U/kg) pro Tag (eine Verabreichung pro Tag) während 3 aufeinanderfolgenden Tagen verabreicht erhielten, als positive Kontrollen verwendet. Die Ergebnisse sind in **Fig. 1** bis 3 angegeben.

Beobachtungen

[0101] Die Verabreichung von Vitamin K<sub>5</sub> während 3 aufeinanderfolgenden Tagen löste eine Erholung von den Änderungen, die bei allen Blutindizes bei Ratten gefunden wurden, d. h. dem Gehalt an Glucose, Neutralfett und Cholesterin, aus.

Beispiel 6

Analyse der partiellen Aminosäuresequenz von pp140

[0102] In Beispiel 1 gereinigtes pp140 wurde durch Elektrophorese isoliert, anschließend in einer PVDF-Membran transkribiert, mit Trypsin behandelt und ferner mittels Flüssigchromatographie isoliert. Das auf diese Weise isolierte pp140-Fragment wurde dann unter Verwendung des automatischen Gasphasenproteinsequenzierers Modell 470A/PTH Analyzer Modell 120A (ABI oder Applied Biosystem Inc. Corp., USA) und des intensiv angewandten Edman-Abbauverfahrens sequenziert, bevor dessen partielle Aminosäuresequenz bestimmt wurde. Die Sequenz ist in der Sequenztabelle 5 bis 7 angegeben.

Beispiel 7

Partielle Aminosäuresequenzierung von pp140 durch das Polymerasekettenreaktions(PCR)verfahren

[0103] Unter Verwendung intensiv verwendeter Verfahren wurden verschiedene Primer von den auf diese Weise isolierten partiellen Aminosäurefragmenten abgeleitet und deren jeweilige Kombinationen durchgeführt, bevor das PCR-Verfahren angewandt wurde. Die Ergebnisse zeigten ein spezifisches amplifiziertes Fragment mit einer ungefähren Länge von 400 bp.

Beispiel 8

Isolierung und Reinigung von mRNA

[0104] Während der logarithmischen Wachstumsphase wurde mRNA aus  $3 \times 10^7$  Muskelmyoblasten-L6-Zellen (ATCC-Stamm Nr. CRL-1458) gemäß dem Verfahren von Okayama et al. (Methods in Enzymology, 154, 3 (1987)) isoliert.

[0105] Kurz gesagt, wurde nach der Lyse der Zellen mit 5,5 M GTC-Lösung (5,5 M Guanidinthiocyanat, 25 mM Natriumcitrat und 0,5 % Natriumlaurylsarcosin) das Lysat über eine Cäsiumtrifluoracetatlösung (Dichte: 1,51) geschichtet und das Zelllysat mit 120 000 x g 20 h zentrifugiert und danach die gesamte RNA im Pellet gewonnen. Die RNA-Probe wurde zweimal über eine oligo-dT-Cellulose-Säule gegeben, bevor durch Reinigung 106 µg poly(A)<sup>+</sup>RNA gewonnen wurden.

Beispiel 9

Gewebeverteilung von p140-mRNA

[0106] Aus verschiedenen Geweben wurde poly(A)<sup>+</sup>RNA gemäß den von Beispiel 8 ähnlichen Verfahren gereinigt. Die jeweiligen aus Gewebe stammenden poly(A)<sup>+</sup>RNA-Proben (jede Probe: 2 µg) wurden einer Agarosegelektrophorese unterzogen und anschließend durch ein Filter geschickt. Das offene Leseraster von 2 kb

wurde markiert und als innere Kontrolle verwendet, bevor eine normale Hybridisierung erfolgen konnte. Eine Autoradiographie wurde an der spezifisch gebundenen Sonde durchgeführt und sie wurde mittels densitometrischen Analysen mit einem Imaginganalysator verwendet. Wenn das Auftreten von  $\beta$ -ActinmRNA in den verschiedenen Geweben als 100 angenommen wurde, sind der relative Gehalt von p140 in Geweben in Tabelle 4 angegeben.

TABELLE 4  
Gewebeverteilung von p140-mRNA

	Ratte	Mensch
Herz	100	100
Hirn	240	60
Milz	70	-
Lunge	210	100
Leber	130	100
Muskeln	40	130
Nieren	130	40
Hoden	320	-
Plazenta	-	220
Pankreas	-	330

(-) : Bedeutet nicht durchgeführte Experimente

#### Beobachtung

[0107] Die Prüfung der gesamten untersuchten verschiedenen Gewebe zeigt das Auftreten von mRNA, deren Wirkungen doch über einen großen Bereich von Geweben ausstrahlen. Ein hohes Auftreten von mRNA findet sich speziell im Pankreas des Menschen.

#### Beispiel 10

##### Erstellen der cDNA-Bibliothek

[0108] Eine cDNA-Bibliothek wurde gemäß dem modifizierten Verfahren von Gubler und Hoffman (Gene, 25, 263 (1983)) erstellt.

[0109] Aus der in Beispiel 2 abgeleiteten poly(A)<sup>+</sup>RNA (5  $\mu$ g) wurde mit dem Enzym der reversen Transkription ein erster Strang konstruiert und anschließend ein zweiter Strang mit EcoRI-Adaptorligation transformiert, bevor überschüssige Adaptoren und Primer durch Gelfiltrationssäulenchromatographie (Sephadex S-500HR-Säule; Pharmacia Corp.) entfernt wurden. Die verbliebenen 1620 ng der cDNA-Fraktion wurden anschließend gewonnen.

[0110] Die obigen Konstruktionsverfahren für eine cDNA-Bibliothek wurden mit einem  $\lambda$ gt-10-Klonierungssystemkit (Amersham Corp.) durchgeführt.

[0111] Als nächstes wurden der  $\lambda$ gt-10-Phage (Amersham Corp.) und der  $\lambda$ ZAPII-Phage (Stratagene Corp.) an den EcoRI-behandelten Armen zu einer mittleren Länge von 1,8 kb legiert. Eine Phagen-cDNA-Bibliothek einer unabhängigen Zahl von  $3 \times 10^5$  wurde erstellt.

#### Beispiel 11

##### Klonierung und Sequenzierung

[0112] Auf der Basis der in Beispiel 10 erstellten Phagen-DNA-Bibliothek wurden Klone zu etwa  $1 \times 10^5$

Plaques/Platte dupliziert. Die in Beispiel 7 geernteten Fragmente von etwa 400 bp wurden als Sonden eingesetzt, bevor ein Durchmustern durchgeführt wurde. Bei den positiven Kontrollen wurde eine Subklonierung langer Stränge der Inserts an der EcoRI-Stelle des Plasmidvektors pGEM-3Zf(+) (3199 bp; Promega Corp.) festgestellt. Eine Sequenzierung wurde mit T7 oder SP6 als Primer durchgeführt.

[0113] Die DNA-Sequenzierung wurde auf der Basis des Didesoxyterminatorverfahrens gemäß dem Cyclosequenzierungsverfahren unter Verwendung eines fluoreszierenden Diterminators (ABI, USA) durchgeführt. Ferner wurde das Lesen der Sequenz mit einem DNA-Sequenzierer (Modell 373A; ABI, USA) durchgeführt.

[0114] Auf diese Weise wurden Nucleotidsequenzen von im Mittel 300 Basen, ausgehend von der 5'- oder der 3'-Seite des jeweiligen Klons, festgestellt.

### Beispiel 12

#### Partielle Sequenzanalyse

[0115] Wenn die Nucleotidsequenz von Beispiel 11 einer Homologierecherche mit allen in einer bereits registrierten Datenbank (GenBank und EMBL) gespeicherten Nucleotidsequenzen mit dem FASTA-Programm von Lipman und Pearson unterworfen wurden, wurden die sequenzierten Klone als Klone, die neue Sequenzen enthielten, identifiziert. Die Nucleotidsequenzen des identifizierten Klons wurden in Aminosäuresequenzen auf der Basis von drei möglichen konstruierten Rastern umgewandelt.

[0116] Ferner wurden in den Aminosäuresequenzen auch neue Aminosäuresequenzen entdeckt.

[0117] Jedoch umfasst der cDNA-Klon, der kloniert wurde, nicht zwangsläufig die gesamte Länge der mRNA. In diesem Fall ist es sehr unwahrscheinlich, dass der Klon den N-Terminus der Aminosäuresequenz enthält.

[0118] Daher wurde Northern-Analyse verwendet, um zu bestimmen, ob die gesamte Länge des ermittelten Klons vollständig war. Mit anderen Worten, wurde die poly(A)<sup>+</sup>RNA, die durch die Verfahrensmaßnahmen von Beispiel 8 → Beispiel 9 durch Elektrophorese isoliert wurde, auf eine Nylonmembran geblottet. Wenn das subklonierte cDNA-Insert als Sonde hybridisiert wurde, wurde eine einzelne Bande an der Position von etwa 4400 bp beobachtet. Da die Größe der Klone etwa 2200 bp betrug, wurde eine PCR an der 5'- und 3'-Seite durchgeführt, um die gesamte Länge der cDNA mit den 3'-RACE (BRL Corp.)-System- und 5'-RACE (CLONTECH Corp.)-Systemkits zu lesen.

### Beispiel 13

#### Bestimmen der Sequenz und des offenen Leserasters der gesamten Länge der cDNR

[0119] Ein Random Sequencing der gesamten Länge der cDNA-Sequenz wurde gemäß dem Verfahren von Sambrook et al. (Molecular Cloning: Hrsg. J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press) durchgeführt.

[0120] Kurz gesagt, wurde ein Plasmid aus dem Klon gewonnen und das isolierte cDNA-Insert dann gereinigt, bevor eine Ligation und Fragmentierung durchgeführt wurde. Das Ende des DNA-Fragments wurde ferner durch T4-Polymerase geglättet und DNA-Fragmente einer Länge von etwa 400 bp wurden mittels Agaroseelektrophorese gewonnen. Die auf diese Weise erhaltenen DNA-Fragmente wurden in die SmaI-Seite eines Plasmidvektors und von pGEM-3Zf(+) (3199 bp; Promega Corp.) kloniert, bevor die Transformation in E. coli erfolgte. 80 Kolonien wurden willkürlich entnommen und die Plasmid-DNAs wurden gereinigt, bevor eine DNA-Sequenzierung dieser 20 Plasmide (die cDNA-Fragmente als Inserts besaßen) erfolgte. Die DNA-Sequenzierung und das Lesen der Sequenz wurde gemäß dem in Beispiel 11 beschriebenen Verfahren durchgeführt. Sequenzdaten der cDNA-Fragmente wurden zu den Verknüpfungssequenzen mit dem DNA-Sequenzprogramm von DNASIS konstruiert. Ruf diese Weise wurde die in SEQ. ID NO: 3 angegebene Basissequenz konstruiert. Aus Sequenzdaten der gesamten Länge der cDNA wurde das offene Leseraster (ORF) bestimmt. Die Aminosäuresequenz wurde ferner translatiert und die auf diese Weise ermittelte Sequenz ist in SEQ. NO: 1 angegeben. Eines der Raster besitzt das ORF von 2993 bp, das annähernd 3000 bp der gesamten ORF-Länge der Eck-Familie entspricht. Daher wird postuliert, dass das Polypeptid der vorliegenden Erfindung eine Gesamtlänge von 2993 bp besitzt.

[0121] Aufgrund von dessen Hydrophobie wurde ferner postuliert, dass das Protein p140 ein typisches Typ-I-Membranprotein ist (Fig. 4 markiert die Zone mit entweder hoher (+) oder niedriger (-) Hydrophobie).

[0122] Insgesamt ist das p140-Polypeptid ein typisches Membranprotein mit 993 Aminosäuren und die Länge von dessen ORF beträgt 2982 bp. Ferner ist das geschätzte Molekulargewicht des p140-Polypeptids 109 8b0 Da und 140 kD, wenn dieses aufgrund der Bindungen von dessen Polysaccharidkette abgeschätzt wurde.

### Beispiel 14

## Konstruktion eines Plasmidvektors zur Verwendung zur Herstellung eines Expressionsvektors

[0123] Als Expressionsvektor wurde ein Derivat von pUC-SRaML-1 (dieser Vektor und die Herstellung desselben sind in der europäischen Patentveröffentlichung Nr. 559428 offenbart) verwendet. Dieses Derivat wurde so konstruiert, dass zwei Fragmentarten, die im folgenden angegeben sind:

Fragment T7 5' GTAATACGACTCACTATAGGGGAGAGCT 3'  
(SEQ ID NO: 8)  
3' ACGTCATTATGCTGAGTGATATCCCCTC 5'  
(SEQ ID NO: 9)

zwischen Pstl und Sacl bzw.

Fragment SP6 5' CTTAGTCTATAGTGTACCTAAATCGTGGGTAC 3'  
(SEQ ID NO: 10)  
3' AGATATCACAGTGGATTAGCAC 5'  
(SEQ ID NO: 11)

zwischen der Spel- und Kpnl-Stelle an der Multiklonierungsstelle insertiert wurden.

[0124] Der pUC-SRaML1-Vektor wurde mit PstI und SacI verdaut und der entstandene Verdau wurde einer Agarosegelektrophorese unterzogen, wobei ein Fragment von etwa 4,1 kbp hergestellt und gewonnen wurde und anschließend die Phosphorsäuregruppe des 5'-Endes durch eine BAP (bakterielle alkalische Phosphatase)-Behandlung entfernt wurde. Das phosphorylierte DNA-Fragment T7 wurde mit dem auf diese Weise hergestellten Fragment von etwa 4,1 kbp aus pUC-SRaML1 ligiert, um eine Ringform herzustellen. Der erhaltene Vektor wurde ferner mit Spel und KpnI verdaut und der erhaltene Verdau wurde einer Agarosegelektrophorese unterzogen, wobei ein Fragment von etwa 4,1 kbp hergestellt und gewonnen wurde und danach die Phosphorsäuregruppe des 5'-Endes durch eine BAP (bakterielle alkalische Phosphatase)-Behandlung entfernt wurde. Das phosphorylierte DNA-Fragment SP6 wurde mit dem auf diese Weise hergestellten Fragment von etwa 4,1 kbp ligiert, wobei eine Ringform gebildet wurde. Der auf diese Weise konstruierte Plasmidvektor erhielt die Bezeichnung pUC-SRaML2 (siehe **Fig. 3**).

### Beispiel 15

## Konstruktion eines Expressionsvektors

[0125] Die Primer X, Y und YH, die mit Ratten-p140-cDNA hybridisieren, wurden synthetisiert. Die Sequenzen der Primer X, Y und YH sind die folgenden:

## Primer X

5' - A ATA TAG TCG ACC ACC ATG GAG AAC CCC TAC GTT GGG CGA GCG A -3'  
(SEQ ID NO: 12)

## Primer Y

S' - CGG CGG ACT AGT TCA GAC CTG CAC GGG CAG TGT CTG G -3'  
(SEQ ID NO: 13)

## Primer YH

5' - GCC GCC ACT AGT TCA GTG GTG GTG GTG GAC CTG CAC GGG  
CAG TGT CTG G -3'

(SEQ ID NO: 14)

[0126] Das Plasmid, das cDNA von p140 enthält, wurde einer PCR unter Verwendung der auf diese Weise synthetisierten Oligonucleotide X und Y als Template unterzogen. Das auf diese Weise erhaltene PCR-Fragment enthält eine an der 5'-Seite des Initiationscodons positionierte Sequenz, die einer einem Fachmann bekannten Cozac-Sequenz entspricht, und cDNA, die für ein aus dem p140-Protein bestehendes Proteinmolekül codiert. Das PCR-Fragment wurde mit Sall-Spel verdaut und der erhaltene Verdau wurde abgetrennt und gereinigt und dann in die Sall-Spel-Stelle des in Beispiel 14 hergestellten pUC-SRaML2 insertiert, wobei ein Expressionsvektor pUC-SRaML2-p140-A erhalten wurde.

[0127] Ferner wurde das cDNA von p140 enthaltende Plasmid einer PCR unter Verwendung der synthetisierten Oligonucleotide X und YH als Template unterzogen. Das auf diese Weise erhaltene PCR-Fragment enthält eine an der 5'-Seite des Initiationscodons positionierte Sequenz, die der einem Fachmann bekannten Cozac-Sequenz entspricht, und cDNA, die für ein Protein, das aus dem p140-Protein und sechs weiteren Histidin (His)-Resten, die an dessen C-Terminus gebunden sind, besteht, codiert. Das PCR-Fragment wurde mit Sall-Spel verdaut und der erhaltene Verdau wurde abgetrennt und gereinigt und dann in die Sall-Spel-Stelle des in Beispiel 14 hergestellten pUC-SRaML2 inseriert, wobei ein Expressionsvektor pUC-SRaML2-p140-B erhalten wurde.

[0128] Ferner wurden die Primer Z und ZH synthetisiert. Die Sequenzen der Primer Z und ZH sind die folgenden (Diese wurden an das aminotermrale Ende der Transmembranregion in cDNA angefügt):

## Primer Z

5' - CGG CGG ACT AGT TCA TGA GCC TCT TTC ACT CGT GGT CTC AAA CT -3'

(SEQ ID NO: 15)

## Primer ZH

5' - GCC GCC ACT AGT TCA GTG GTG GTG GTG GTG TGA GCC TCT TTC

ACT CGT GGT CTC AAA CT -3'

(SEQ ID NO: 16)

[0129] Das cDNA von p140 enthaltende Plasmid wurde einer PCR unter Verwendung der auf diese Weise synthetisierten Oligonucleotide X und Z als Template unterzogen. Das auf diese Weise erhaltene PCR-Fragment enthält eine an der 5'-Seite des Initiationscodons positionierte Sequenz, die der einem Fachmann bekannten Cozac-Sequenz entspricht, und cDNA, die für ein Polypeptid, das aus dem extrazellulären Teil des p140-Proteins besteht, codiert. Das PCR-Fragment wurde mit Sall und NotI verdaut und der erhaltene Verdau wurde abgetrennt und gereinigt und dann in die Sall-Spel-Stelle des in Beispiel 14 hergestellten pUC-SRaML2 insertiert, wobei ein Expressionsvektor pUC-SRaML2-p140-C erhalten wurde.

[0130] Ferner wurde das cDNA von p140 enthaltende Plasmid einer PCR unter Verwendung der synthetisierten Oligonucleotide X und ZH als Template unterzogen. Das auf diese Weise erhaltene PCR-Fragment enthält eine an der 5'-Seite des Initiationscodons positionierte Sequenz, die der einem Fachmann bekannten Cozac-Sequenz entspricht, und cDNA, die für ein Polypeptid, das aus dem extrazellulären Teil des p140-Proteins und sechs weiteren Histidin (His)-Resten, die an dessen C-Terminus gebunden sind, besteht, codiert. Das PCR-Fragment wurde mit Sa-II-Spel verdaut und der erhaltene Verdau wurde abgetrennt und gereinigt und dann in die Sall-Spel-Stelle des in Beispiel 14 hergestellten pUC-SRaML2 insertiert, wobei ein Expressionsvektor pUC-SRaML2-p140-D erhalten wurde.

[0131] Jedes der auf diese Weise konstruierten Plasmide pUC-SRaML2-p140-A, pUC-SRaML2-p140-B, pUC-SRaML2-p140-C und pUC-SRaML2-p140-D wurden in einen E. coli-Stamm DH5 transfiziert, aus einer 100-ml-Kultur der gebildeten Transformante gewonnen und dann zweimal mittels CsCl-Dichtegradientenzrifugation gereinigt.

## Beispiel 16

## Expression in COS-Zellen

[0132] Jede der Plasmid-DNA-Zubereitungen pUC-SRaML2, pUC-SRaML2-p140-A, pUC-SRaML2-p140-B, pUC-SRaML2-p140-C und pUC-SRaML2-p140-D wurde mittels des Diethylaminoethyl(DEAE)-Dextranverfahrens (J. Immunology, 136, 4291 (1986)) in COS-7-Zellen (Cell, 23, 175 (1981)) eingeführt.

[0133] Das heißt, etwa  $1,8 \times 10^6$  COS-7-Zellen wurden in einen Kolben eines Fassungsvermögens von 225 cm<sup>2</sup> (hergestellt von Corning) zusammen mit 50 ml eines flüssigen Kulturmediums (nach Dulbecco modifiziertes MEM-Medium, das mit 10% entkomplementiertem Rinderfetusserum ergänzt war) überimpft. Nach der Inkubation in einem Kohlendioxidinkubator (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) über Nacht und der anschließenden Entfernung des Kulturüberstands wurden 12 ml eines DNA-Cocktails (nach Dulbecco modifiziertes MEM-Medium, das mit 15 µg jeder Plasmid-DNA, 50 mM Tris-HCl-Puffer (pH-Wert 7,4) und 400 µg/ml DEAE-Dextran ergänzt war) zu jedem Kolben gegeben und eine Kultur während 3 h bei 37°C in einer Atmosphäre von 5% CO<sub>2</sub> durchgeführt. Danach wurde der DNA-Cocktail durch 15 ml einer Chloroquinlösung (nach Dulbecco modifiziertes MEM-Medium, das mit 150 µM Chloroquin und 7% entkomplementiertem Rinderfetusserum ergänzt war) ersetzt und anschließend wurde weitere 3 h kultiviert.

[0134] Nach dem Entfernen der Chloroquinlösung wurde das im vorhergehenden genannte flüssige Kulturmedium (50 ml) zu jedem der erhaltenen Kolben gegeben, die dann bei 37°C in einer Atmosphäre von 5% CO<sub>2</sub> 72 h lang inkubiert wurden, wobei ein Wachstum der Zellen in jedem Kolben in nahezu Einzelschichtform festgestellt wurde. Nach dem Entfernen des Kulturüberstands wurden die Zellen in jedem Kolben mit einem serumfreien flüssigen Kulturmedium (Handelsbezeichnung SFM-101, bei Nissui Pharmaceutical Co., Ltd. erhältlich) gewaschen und dann mit 75 ml des gleichen serumfreien flüssigen Kulturmediums versetzt und die Kultur wurde weitere 72 h lang fortgesetzt. Danach wurden die erhaltenen Kulturüberstände gewonnen und die Zellen, wie in Beispiel 1 angegeben, lysiert. Diese Überstände und Zelllysate wurden zur Entfernung von Zellabfällen durch ein Membranfilter (Handelsbezeichnung STERIVEX-GS, bei Millipore Corp. erhältlich) filtriert. Die auf diese Weise erhaltenen Kulturüberstandsproben wurden zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert. Die Zelllysate der COS-Zellen, die mit einem Plasmid, das die pUC-SRaML2-p140-A- und pUC-SRaML2-p140-B-Inserte enthielt, transformiert wurden, sollten exprimierte reife Proteineinheiten von Polypeptiden, die dem p140-Protein entsprechen, enthalten. Und Kulturüberstände von COS-Zellen, die mit einem Plasmid, das die pUC-SRaML2-p140-C- und pUC-SRaML2-p140-D-Inserte enthielt, transformiert wurden, sollten sezernierte Polypeptide, die dem extrazellulären Teil des p140-Proteins entsprechen, enthalten.

## Beispiel 17

## Bestätigung der Expression

[0135] Eine Portion von 2 ml der einzelnen in Beispiel 16 erhaltenen Kulturüberstände von transformierten COS-Zellen wurde unter Verwendung eines Zentrifugenkonzentrationsfilters (Handelsbezeichnung Centri-con-10, bei Millipore Corp. erhältlich) auf ein Volumen von 100 ml eingeengt. Eine Portion von 1 µl der einzelnen auf diese Weise eingeengten Proben wurde mit dem gleichen Volumen eines Ladepuffers (0,125 M Tris-HCl-Puffer (pH-Wert 6,8), 4% Natriumdodecylsulfat und 30% Glycerin) zur Verwendung für SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelektrophorese) gemischt, und das Gemisch wurde 3 min lang bei 90°C behandelt und dann einer SDS-PAGE unterzogen.

[0136] Im Falle der pUC-SRaML2-p140-B- und pUC-SRaML2-p140-D-Proteine mit am C-Terminus der Proteine eingeführtem His-Hexamer wurden nicht nur deren entsprechende Zelllysate und COS-Zellkulturüberstände, sondern auch deren gereinigte Produkte der SDS-PAGE-Analyse unterzogen.

[0137] Die Reinigung des Proteins wurde mittels Metallchelataffinitätschromatographie (Biotechnology, 9, 273 (1991)) unter Verwendung der Funktion von His zur Bildung von komplexen Verbindungen mit verschiedenen Übergangsmetallionen durchgeführt. Das heißt, ein Kulturüberstand (350 ml) oder von COS-Zellen erhaltene Zelllysate (100 ml) wurden mit einer wässrigen Natriumchloridlösung in einer derartigen Menge gemischt, dass die Endkonzentration des Salzes 1 M betrug und das erhaltene Gemisch wurde auf eine mit 4 ml einer chelatbildenden Sepharose mit gebundenem Zink (Handelsbezeichnung Chelating Sepharose Fast-Flow, von Pharmacia erhältlich) gepackte Säule appliziert, um das Protein am Harz zu adsorbieren. Die Säule wurde mit 50 mM Phosphatpuffer (pH-Wert 7,0), der eine 1 M wässrige Natriumchloridlösung (40 ml) enthielt, gewaschen, und das in der Säule zurückgehaltene Protein wurde mit 50 mM Phosphatpuffer (pH-Wert 7,0), der eine 1 M wässrige Natriumchloridlösung und 0,4 M Imidazol enthielt, eluiert. Danach wurde das erhaltene Eluat auf ein Volumen von 100 µl eingeengt, und eine Portion der eingeengten Probe wurde einer SDS-PAGE-Analyse unterzogen.

[0138] Die SDS-PAGE-Analyse wurde unter Verwendung eines SDS-10/20-Gradienten-Gels durchgeführt,

und ein Produkt, das einem Molekulargewicht von p140 entspricht, wurde in aus COS-Zellen, die mit pUC-SRαML2-p140-A und -p140-B transfiziert waren, hergestellten Proben nachgewiesen. Ferner wurde ein Polypeptid, das dem Molekulargewicht des extrazellulären Teils von p140 entspricht, in unbehandelten und gereinigten Überständen, nicht den Zelllysaten, die aus mit pUC-SRαML2-p140-C und -p140-D transfizierten COS-Zellen hergestellt waren, nachgewiesen.

Formulierungsbeispiel 1

[0139] Die folgenden Komponenten wurden gemäß einem herkömmlichen Verfahren gemischt und ausgestanzt, wobei 100 Tabletten, die jeweils 5 mg des Wirkstoffs enthielten, erhalten wurden.

Vitamin K <sub>5</sub>	500,0 mg
Carboxymethylcellulosecalcium	200,0 mg
Magnesiumstearat	100,0 mg
mikrokristalline Cellulose	9,2 mg.

## SEQUENZPROTOKOLL

## (1) ALLGEMEINE ANGABEN:

## (i) ANMELDER:

- (A) NAME: Ono Pharmaceutical Co., Ltd.
- (B) STRASSE: 1-5, Doshomachi 2-chome
- (C) STADT: Chuo-ku, Osaka-shi
- (D) STAAT: Osaka
- (E) LAND: JAPAN
- (F) POSTLEITZAHL (ZIP): 541
- (G) Telefon: (06)222-5551
- (H) TELEFAX: (06)222-5706

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Neues Polypeptid Protein p140 und dafür codierende DNAs.

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 16

## (iv) COMPUTERLESBARE FORM:

- (A) ART DES MEDIUMS: Diskette
- (B) COMPUTER: IBM-PC-kompatibel
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release 1.0, Version 1.25 (EPO)

## (2) ANGABEN FÜR SEQ ID No: 1

## (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 993 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

## (vi) HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Ratte
- (F) GEWEBEART: Skelettmuskelmyoblast
- (H) ZELLINIE: L6

(xi) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO:1:

Met Glu Asn Pro Tyr Val Gly Arg Ala Arg Ala Ala Ala Glu Arg Ala  
 1 5 10 15

Ala Ala Glu Ala Thr Asn Ser Leu Ser Ile Leu Val Arg Pro Thr Ser  
 20 25 30

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

His Pro Glu Ser Gly Trp Glu Glu Val Ser Ala Tyr Asp Glu Ala Met  
 50 55 60

## DE 694 32 511 T2 2004.04.29

Asn	Pro	Ile	Arg	Thr	Tyr	Gln	Val	Cys	Asn	Val	Arg	Glu	Ser	Ser	Gln
65					70				75						80
Asn	Asn	Trp	Leu	Arg	Thr	Gly	Phe	Ile	Trp	Arg	Arg	Glu	Val	Gln	Arg
					85				90						95
Val	Tyr	Val	Glu	Leu	Lys	Phe	Thr	Val	Arg	Asp	Cys	Asn	Ser	Ile	Pro
					100			105						110	
Asn	Ile	Pro	Gly	Ser	Cys	Lys	Glu	Thr	Phe	Asn	Leu	Phe	Tyr	Tyr	Glu
					115			120						125	
Ala	Asp	Ser	Asp	Val	Ala	Ser	Ala	Ser	Ser	Pro	Phe	Trp	Met	Glu	Asn
					130			135						140	
Pro	Tyr	Val	Lys	Val	Asp	Thr	Ile	Ala	Pro	Asp	Glu	Ser	Phe	Ser	Arg
					145			150			155				160
Leu	Asp	Ala	Gly	Arg	Val	Asn	Thr	Lys	Val	Arg	Ser	Phe	Gly	Pro	Leu
					165			170						175	
Ser	Lys	Ala	Gly	Phe	Tyr	Leu	Ala	Phe	Gln	Asp	Gln	Gly	Ala	Cys	Met
					180			185						190	
Ser	Leu	Ile	Ser	Val	Arg	Ala	Phe	Tyr	Lys	Lys	Cys	Ala	Ser	Thr	Thr
					195			200						205	
Ala	Gly	Phe	Ala	Leu	Phe	Pro	Glu	Thr	Leu	Thr	Gly	Ala	Glu	Pro	Thr
					210			215			220				
Ser	Leu	Val	Ile	Ala	Pro	Gly	Thr	Cys	Ile	Ala	Asn	Ala	Val	Glu	Val
					225			230			235				240
Ser	Val	Pro	Leu	Lys	Leu	Tyr	Cys	Asn	Gly	Asp	Gly	Glu	Trp	Met	Val
					245			250						255	
Pro	Val	Gly	Ala	Cys	Thr	Cys	Ala	Thr	Gly	His	Glu	Pro	Ala	Ala	Lys
					260			265						270	
Glu	Thr	Gln	Cys	Arg	Ala	Cys	Pro	Pro	Gly	Ser	Tyr	Lys	Ala	Lys	Gln
					275			280						285	
Gly	Glu	Gly	Pro	Cys	Leu	Pro	Cys	Pro	Pro	Asn	Ser	Arg	Thr	Thr	Ser
					290			295						300	
Pro	Ala	Ala	Ser	Ile	Cys	Thr	Cys	His	Asn	Asn	Phe	Tyr	Arg	Ala	Asp
					305			310			315				320
Ser	Asp	Thr	Ala	Asp	Ser	Ala	Cys	Thr	Thr	Val	Pro	Ser	Pro	Pro	Arg
					325			330						335	
Gly	Val	Ile	Ser	Asn	Val	Asn	Glu	Thr	Ser	Leu	Ile	Leu	Glu	Trp	Ser
					340			345						350	
Glu	Pro	Arg	Asp	Leu	Gly	Gly	Arg	Asp	Asp	Leu	Leu	Tyr	Asn	Val	Ile
					355			360						365	

## DE 694 32 511 T2 2004.04.29

Cys Lys Lys Cys Arg Gly Ser Ser Gly Ala Gly Gly Pro Ala Thr Cys  
 370 375 380  
 Ser Arg Cys Asp Asp Asn Val Glu Phe Glu Pro Arg Gln Leu Gly Leu  
 385 390 395 400  
 Thr Glu Arg Arg Val His Ile Ser His Leu Leu Ala His Thr Arg Tyr  
 405 410 415  
 Thr Phe Glu Val Gln Ala Val Asn Gly Val Ser Gly Lys Ser Pro Leu  
 420 425 430  
 Pro Pro Arg Tyr Ala Ala Val Asn Ile Thr Thr Asn Gln Ala Ala Pro  
 435 440 445  
 Ser Glu Val Pro Thr Leu His Leu His Ser Ser Ser Gly Ser Ser Leu  
 450 455 460  
 Thr Leu Ser Trp Ala Pro Pro Glu Arg Pro Asn Gly Val Ile Leu Asp  
 465 470 475 480  
 Tyr Glu Met Lys Tyr Phe Glu Lys Ser Lys Gly Ile Ala Ser Thr Val  
 485 490 495  
 Thr Ser Gln Lys Asn Ser Val Gln Leu Asp Gly Leu Gln Pro Asp Ala  
 500 505 510  
 Arg Tyr Val Val Gln Val Arg Ala Arg Thr Val Ala Gly Tyr Gly Gln  
 515 520 525  
 Tyr Ser Arg Pro Ala Glu Phe Glu Thr Thr Ser Glu Arg Gly Ser Gly  
 530 535 540  
 Ala Gln Gln Leu Gln Glu Gln Leu Pro Leu Ile Val Gly Ser Thr Val  
 545 550 555 560  
 Ala Gly Phe Val Phe Met Val Val Val Val Ile Ala Leu Val Cys  
 565 570 575  
 Leu Arg Lys Gln Arg Gln Gly Pro Asp Ala Glu Tyr Thr Glu Lys Leu  
 580 585 590  
 Gln Gln Tyr Val Ala Pro Arg Met Lys Val Tyr Ile Asp Pro Phe Thr  
 595 600 605  
 Tyr Glu Asp Pro Asn Glu Ala Val Arg Glu Phe Ala Lys Glu Ile Asp  
 610 615 620  
 Val Ser Cys Val Lys Ile Glu Glu Val Ile Gly Ala Gly Glu Phe Gly  
 625 630 635 640  
 Glu Val Cys Arg Gly Arg Leu Lys Leu Pro Gly Arg Arg Glu Val Phe  
 645 650 655  
 Val Ala Ile Lys Thr Leu Lys Val Gly Tyr Thr Glu Arg Gln Arg Arg  
 660 665 670

## DE 694 32 511 T2 2004.04.29

Asp	Phe	Leu	Ser	Glu	Ala	Ser	Ile	Met	Gly	Gln	Phe	Asp	His	Pro	Asn
675							680					685			
Ile	Ile	Arg	Leu	Glu	Gly	Val	Val	Thr	Lys	Ser	Arg	Pro	Val	Met	Ile
690						695					700				
Leu	Thr	Glu	Phe	Met	Glu	Asn	Cys	Ala	Leu	Asp	Ser	Phe	Leu	Arg	Leu
705					710					715				720	
Asn	Asp	Gly	Gln	Phe	Thr	Val	Ile	Gln	Leu	Val	Gly	Met	Leu	Arg	Gly
					725					730			735		
Ile	Ala	Ala	Gly	Met	Lys	Tyr	Leu	Ser	Glu	Met	Asn	Tyr	Val	His	Arg
					740					745			750		
Asp	Leu	Ala	Ala	Arg	Asn	Ile	Leu	Val	Asn	Ser	Asn	Leu	Val	Cys	Lys
					755					760			765		
Val	Ser	Asp	Phe	Gly	Leu	Ser	Arg	Phe	Leu	Glu	Asp	Asp	Pro	Ser	Asp
					770					775			780		
Pro	Thr	Tyr	Thr	Ser	Ser	Leu	Gly	Gly	Lys	Ile	Pro	Ile	Arg	Trp	Thr
					790					795			800		
Ala	Pro	Glu	Ala	Ile	Asp	Tyr	Arg	Lys	Phe	Thr	Ser	Ala	Ser	Asp	Val
					805					810			815		
Trp	Ser	Tyr	Gly	Ile	Val	Met	Trp	Glu	Val	Met	Ser	Tyr	Gly	Glu	Arg
					820					825			830		
Pro	Tyr	Trp	Asp	Met	Ser	Asn	Gln	Asp	Val	Ile	Asn	Ala	Val	Glu	Gln
					835					840			845		
Asp	Tyr	Arg	Leu	Pro	Pro	Pro	Met	Asp	Cys	Pro	Ala	Ala	Leu	His	Gln
					850					855			860		
Leu	Met	Leu	Asp	Cys	Trp	Val	Arg	Asp	Arg	Asn	Leu	Arg	Pro	Lys	Phe
					865					870			875		880
Ser	Gln	Ile	Val	Asn	Thr	Leu	Asp	Lys	Leu	Ile	Arg	Asn	Ala	Ala	Ser
					885					890			895		
Leu	Lys	Val	Ile	Ala	Ser	Ala	Pro	Ser	Gly	Met	Ser	Gln	Pro	Leu	Leu
					900					905			910		
Asp	Arg	Thr	Val	Pro	Asp	Tyr	Thr	Thr	Phe	Thr	Thr	Val	Gly	Asp	Trp
					915					920			925		
Leu	Asp	Ala	Ile	Lys	Met	Gly	Arg	Tyr	Lys	Glu	Ser	Phe	Val	Gly	Ala
					930					935			940		
Gly	Phe	Ala	Ser	Phe	Asp	Leu	Val	Ala	Gln	Met	Thr	Ala	Glu	Asp	Leu
					945					950			955		960
Leu	Arg	Ile	Gly	Val	Thr	Leu	Ala	Gly	His	Gln	Lys	Lys	Ile	Leu	Ser
					965					970			975		

Ser Ile Gln Asp Met Arg Leu Gln Met Asn Gln Thr Leu Pro Val Gln  
 980 985 990

Val

(2) ANGABEN FÜR SEQ ID NO: 2:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
  - (A) LÄNGE: 2982 Basenpaare
  - (B) ART: Nucleinsäure
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA zu mRNA
- (vi) HERKUNFT:
  - (A) ORGANISMUS: Ratte
  - (F) GEWEBEART: Skelettmuskelmyoblast
  - (H) ZELLINIE: L6
- (xi) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO: 2:

ATGGAGAACCC	CCTACGTTGG	GCGAGCGAGA	GCAGCAGCGG	AGCGAGCAGC	GGCAGAACCC	60
ACGAATTCACT	TATCGATCCT	GGTTCGGCC	ACCTCTGAAG	GTTCAGAAT	CGATAGTGAA	120
TTCGTGGAGC	TGGCATGGAC	ATCTCATCCA	GAGAGTGGGT	GGGAAGAAGT	GAGCGCCTAC	180
GATGAAGCCA	TGAATCCTAT	CCGCACGTAT	CAGGTGTGTA	ACGTGCGCGA	GTCCAGCCAG	240
AACAACTGGC	TGCGGACCGG	TTTCATCTGG	CGGCGGGAAG	TCCAGCGCGT	CTACGTGGAG	300
CTGAAGTTTA	CCGTGAGAGA	TTGCAACAGC	ATCCCCAACCA	TCCCTGGCTC	CTGCAAGGAA	360
CTTCAACC	TTTTTTACTA	CGAGGCTGAT	AGCGATGTGG	CGTCAGCCTC	CTCTCCCTTC	420
GATGGAGA	ACCCCTACGT	GAAAGTGGAC	ACCATTGCGC	CAGATGAGAG	CTTCTCGCGG	480
CTAGACGCTG	GGCGCGTTAA	CACCAAAGTG	CGCAGCTTCG	GGCCGCTTTC	CAAAGCCGGC	540
TTCTACTTGG	CCTTCCAGGA	CCAGGGTGCC	TGCATGTCAC	TCATCTCTGT	GCGCGCCTTC	600
TACAAGAAAGT	GTGCATCCAC	CACTGCAGGC	TTCGCACTCT	TCCCCGAGAC	CCTCACGGGG	660
GCTGAGCCCA	CTTCGCTGGT	CATTGCCCT	GGCACCTGCA	TCGCTAACGC	TGTGGAGGTG	720
TCTGTACCGC	TCAAGCTCTA	CTGCAATGGC	GACGGGGAGT	GGATGGTGCC	CGTTGGTGCC	780
TGCACCTGCG	CTACTGGCCA	TGAGCCAGCC	GCCAAGGAGA	CCCAGTGCG	CGCCTGTCCC	840
CCTGGGAGCT	ACAAGGCAAA	GCAAGGAGAG	GGGCCCTGCC	TCCCCGTGCC	CCCCAATAGC	900
CGCACCAACCT	CGCCGGCTGC	CAGCATCTGC	ACCTGTCACA	ATAATTCTA	CCGCGCAGAC	960

TCAGACACAG CGGACAGCGC CTGCACCACG GTGCCGTCTC	CCCCCCGGGG TGTGATCTCC	1020
AATGTGAATG AGACCTCGCT GATCCTCGAG TGGAGTGAGC CCCGGGACCT TGGCGGACGA		1080
GATGACCTCC TTTATAATGT TATCTGTAAG AAGTGCCGTG GCAGCTCTGG GGCTGGAGGT		1140
CCGGCGACCT GTTCACGCTG TGATGACAAC GTGGAGTTCG AGCCCCGACA GCTGGGCCTG		1200
ACCGAGCGCC GGGTCCACAT CAGCCACCTG TTGGCCCACA CCCGCTACAC CTTTGAGGTG		1260
CAGGCTGTCA ACGGCGTCTC TGGCAAAAGC CCTTGCCGC CCCGCTATGC AGCTGTGAAT		1320
ATCACCAACCA ACCAGGCCGC CCCATCAGAA GTGCCTACGC TCCACTTGCA CAGCAGTTCA		1380
GGGAGCAGCC TGACCCTGTC CTGGGCACCC CCGGAGCGGC CTAACGGAGT CATTTGGAC		1440
ATGAGATGA AGTACTTTGA GAAGAGTAAA GGCATCGCCT CCACTGTCAC CAGCCAGAAG		1500
ACTCTGTAC AACTGGACGG ACTGCAGCCC GACGCCCGCT ATGTAGTTCA GGTCCGGCT		1560
GCACAGTAG CAGGTTACGG ACAGTATAGC CGCCCAGCTG AGTTTGAGAC CACGAGTGAA		1620
AGAGGCTCAG GGGCCCAGCA GCTTCAAGAG CAGCTTCCCC TAATTGTGGG ATCCACCGTA		1680
GCTGGCTTG TCTTCATGGT GGTCGTCGTG GTCATTGCTC TTGTCTGCCT CAGGAAGCAG		1740
CGCCAGGGCC CTGATGCAGA ATACACGGAG AAGTTGCAGC AATACGTTGC CCCCAGGATG		1800
AAAGTTTACA TTGACCCCTT TACCTACGAG GATCCAATG AGGCCGTCCG AGAGTTGCC		1860
AAGGAGATCG ATGTGTCTG CGTCAAGATC GAGGAGGTGA TTGGAGCTGG GGAGTTTGGG		1920
GAAGTGTGCC GGGGTCGGCT GAAACTGCCG GGCGGCCGGG AGGTGTTCGT GGCCATCAAG		1980
ACACTGAAGG TGGGATACAC GGAGAGGCAG CGGCGGGACT TCCTGAGTGA GGCTTCATC		2040
GGGTCAAT TTGACCATCC AAATATAATC CGTCTAGAGG GCGTGGTCAC CAAAAGTCGT		2100
AGTCATGA TCCTCACTGA GTTCATGGAG AACTGTGCCCT TGGACTCCTT CCTACGGCTC		2160
AATGACGGGC AGTTCACAGT CATCCAGCTT GTGGGCATGT TGCCTGGCAT TGCTGCCGGC		2220
ATGAAGTACT TGTCTGAGAT GAACTACGTG CACCGTGACC TCGCTGCCCG CAACATCCTT		2280
GTCAACAGTA ACTTGGTCTG CAAAGTATCT GACTTTGGC TCTCCCGCTT CCTGGAGGAC		2340
GACCCCTCAG ACCCCACCTA CACCAAGCTCC CTGGGTGGGA AGATCCCTAT CCGTTGGACC		2400
GCCCCAGAGG CCATAGACTA TCGGAAGTTC ACGTCTGCCA GCGATGTCTG GAGCTACGGG		2460
ATCGTCATGT GGGAGGTCAT GAGCTACGGA GAGCGACCAT ACTGGGACAT GAGCAACCAG		2520
GATGTCATCA ATGCCGTAGA GCAAGACTAT CGGTTACCAAC CCCCCATGGA CTGCCAGCG		2580
GCGCTGCACC AGCTCATGCT GGAAGTGTGG GTGCCAGCG GGAACCTCAG GCCCAAGTTC		2640

TCCCCAAATCG TCAACACGCT AGACAAGCTT ATCCGCAATG CTGCCAGCCT CAAGGTCATC	2700
GCCAGTGCCT CATCTGGCAT GTCCCAGCCC CTCCTAGACC GCACGGTCCC AGATTATACTG	2760
ACCTTCACGA CGGTGGCGA CTGGCTAGAT GCCATCAAGA TGGGGAGGTA TAAAGAGAGC	2820
TTCGTCGGTG CGGGTTTGCT CTCCTTGAC CTGGTGGCCC AGATGACTGC AGAAGATCTG	2880
CTAAGGATCG GGGTCACTTT GGCCGGCCAC CAGAAGAAGA TCCTCAGCAG TATCCAGGAC	2940
ATGCGGCTGC AGATGAACCA GACACTGCCCT GTGCAGGTCT GA	2982

## (2) ANGABEN FÜR SEQ ID NO: 3:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
- (A) LÄNGE: 4027 Basenpaare
  - (B) ART: Nucleinsäure
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA zu RNA

- (vi) HERKUNFT:
- (A) ORGANISMUS: Ratte
  - (F) GEWEBEART: Skelettmuskelmyoblast
  - (H) ZELLINIE: L6

(xi) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO: 3:

GAAAAATGAA GATCTATAACC GACAGCAGAT CAGTGGCTGC CTGGGGCAAA GTTGGAGGGA	60
CATGTTATTT TGATTGTGAT GACATAATAC ATGCAAACAC GGCTAACCT CTCAAAGCAT	120
ACACCTTATAC ATGTGCAGCT TGGTATACAT AAATTATCCA TTACAAAATC ATGAGAAAGC	180
TATCACCCT ATGAAGCACC ACTCACAGTA TGTGAATCTC CACCCCCCTT CCACTGCTGA	240
GACACAGAAA TCCTAGACTG GATGGAGAAC CCCTACGTTG GGCGAGCGAG AGCAGCAGCG	300
GAGCGAGCAG CGGCAGAAC CACGAATTCA CTATCGATCC TGGTTGGCC CACCTCTGAA	360
GGTTCCAGAA TCGATAGTGA ATTCTGGAG CTGGCATGGA CATCTCATCC AGAGAGTGGG	420
TGGGAAGAAC TGAGCGCTA CGATGAAGCC ATGAATCCTA TCCGCACGTA TCAGGTGTGT	480
AACGTGCGCG AGTCCAGCCA GAACAACTGG CTGCGGACCG GTTTCATCTG GCGGCGGGAA	540
GTCCAGCGCG TCTACGTGGA GCTGAAGTTT ACCGTGAGAG ATTGCAACAG CATCCCCAAC	600
ATCCCTGGCT CCTGCAAGGA AACCTTCAAC CTTTTTACT ACGAGGCTGA TAGCGATGTG	660
GCGTCAGCCT CCTCTCCCTT CTGGATGGAG AACCCCTACG TGAAAGTGGAA CACCATTGCG	720
CCAGATGAGA GCTTCTCGCG GCTAGACGCT GGGCGCGTTA ACACCAAAGT GCGCAGCTTC	780

## DE 694 32 511 T2 2004.04.29

GGGCCGCTTT	CCAAAGCCGG	CTTCTACTTG	GCCTTCCAGG	ACCAGGGTGC	CTGCATGTCA	840
CTCATCTCTG	TGCGCGCCTT	CTACAAGAAG	TGTGCATCCA	CCACTGCAGG	CTTCGCACTC	900
TTCCCCGAGA	CCCTCACGGG	GGCTGAGCCC	ACTTCGCTGG	TCATTGCCCC	TGGCACCTGC	960
ATCGCTAACG	CTGTGGAGGT	GTCTGTACCG	CTCAAGCTCT	ACTGCAATGG	CGACGGGGAG	1020
TGGATGGTGC	CCGTTGGTGC	CTGCACCTGC	GCTACTGGCC	ATGAGCCAGC	CGCCAAGGAG	1080
ACCCAGTGCC	GCGCCTGTCC	CCCTGGGAGC	TACAAGGCAA	AGCAAGGAGA	GGGGCCCTGC	1140
CTCCCCTGTC	CCCCCAATAG	CCGCACCAACC	TCGCCGGCTG	CCAGCATTCTG	CACCTGTACAC	1200
AATAATTCT	ACCGCGCAGA	CTCAGACACA	GCGGACAGCG	CCTGCACCCAC	GGTGCCGTCT	1260
CCCCCCCAGG	GTGTGATCTC	CAATGTGAAT	GAGACCTCGC	TGATCCCTCGA	GTGGAGTGAG	1320
)CCCCGGGACC	TTGGCGGACG	AGATGACCTC	CTTTATAATG	TTATCTGTAA	GAAGTGCCGT	1380
GGCAGCTCTG	GGGCTGGAGG	TCCGGCGACC	TGTTCACGCT	GTGATGACAA	CGTGGAGTTC	1440
GAGCCCCGAC	AGCTGGGCCT	GACCGAGCGC	CGGGTCCACA	TCAGCCACCT	GTTGGCCCAC	1500
ACCCGCTACA	CCTTGAGGT	GCAGGCTGTC	AACGGCGTCT	CTGGCAAAAG	CCCTTGCCG	1560
CCCCGCTATG	CAGCTGTGAA	TATCACCACC	AACCAGGCCG	CCCCATCAGA	AGTGCCTACG	1620
CTCCACTTGC	ACAGCAGTTC	AGGGAGCAGC	CTGACCCCTGT	CCTGGGCACC	CCCAGGAGCGG	1680
CCTAACGGAG	TCATCTTGGA	CTATGAGATG	AAGTACTTTG	AGAAGAGTAA	AGGCATCGCC	1740
TCCACTGTCA	CCAGCCAGAA	GAACCTCTGA	CAACTGGACG	GAUTGCAGCC	CGACGCCCGC	1800
TATGTAGTTC	AGGTCCGGGC	TCGCACAGTA	GCAGGTTACG	GACAGTATAG	CCGCCAGCT	1860
GAGTTTGAGA	CCACGAGTGA	AAGAGGCTCA	GGGGCCCAGC	AGCTTCAAGA	GCAGCTTCCC	1920
CTAATTGTGG	GATCCACCGT	AGCTGGCTTT	GTCTTCATGG	TGGTCGTGCGT	GGTCATTGCT	1980
CTTGTCTGCC	TCAGGAAGCA	GCGCCAGGGC	CCTGATGCAG	AATACACGGA	GAAGTTGCAG	2040
CAATACGTTG	CCCCCAGGAT	GAAAGTTAC	ATTGACCCCT	TTACCTACGA	GGATCCCAAT	2100
GAGGCCGTCC	GAGAGTTCGC	CAAGGAGATC	GATGTGTCT	GCGTCAAGAT	CGAGGAGGTG	2160
ATTGGAGCTG	GGGAGTTGG	GGAAGTGTGC	CGGGGTCGGC	TGAAACTGCC	CGGCCGCCGG	2220
GAGGTGTTCG	TGGCCATCAA	GACACTGAAG	GTGGGATACA	CGGAGAGGCA	CGGGCGGGAC	2280
TTCCTGAGTG	AGGCTTCCAT	CATGGGTCAA	TTTGACCATC	CAAATATAAT	CCGTCTAGAG	2340
GGCGTGGTCA	CCAAAAGTCG	TCCAGTCATG	ATCCTCACTG	AGTTCATGGA	GAACGTGCC	2400
CTGGACTCCT	TCCTACGGCT	CAATGACGGG	CAGTTCACAG	TCATCCAGCT	TGTGGGCATG	2460

TTGCGTGGCA TTGCTGCCGG CATGAAGTAC TTGTCTGAGA TGAACATACGT GCACCGTGAC	2520
CTCGCTGCCCG CAAACATCCT TGTCAACAGT AACTTGGTCT GCAAAGTATC TGACTTTGGG	2580
CTCTCCCGCT TCCTGGAGGA CGACCCCTCA GACCCCACCT ACACCAGCTC CCTGGGTGGG	2640
AAGATCCCTA TCCGTTGGAC CGCCCCAGAG GCCATAGACT ATCGGAAGTT CACGTCTGCC	2700
AGCGATGTCT GGAGCTACGG GATCGTCATG TGGGAGGTCA TGAGCTACGG AGAGCGACCA	2760
TACTGGGACA TGAGCAACCA GGATGTCATC AATGCCGTAG AGCAAGACTA TCGGTTACCA	2820
CCCCCCATGG ACTGCCAGC GGCGCTGCAC CAGCTCATGC TGGACTGTTG GGTGCGGGAC	2880
CGGAACCTCA GGCCCAAGTT CTCCCAAATC GTCAACACGC TAGACAAGCT TATCCGCAAT	2940
GCTGCCAGCC TCAAGGTCA CGCCAGTGCC CCATCTGGCA TGTCCCAGCC CCTCCTAGAC	3000
CGCACGGTCC CAGATTATAC GACCTTCACG ACGGTGGGCG ACTGGCTAGA TGCCATCAAG	3060
ATGGGGAGGT ATAAAGAGAG CTTCGTCGGT GCGGGTTTG CCTCCTTGA CCTGGTGGCC	3120
CAGATGACTG CAGAAGATCT GCTAAGGATC GGGGTCACTT TGGCCGGCCA CCAGAAGAAG	3180
ATCCTCAGCA GTATCCAGGA CATGCGGCTG CAGATGAACC AGACACTGCC CGTGCAGGTC	3240
TGACGCTCAG CTCCAGCGAG GGGCGTGGCC CCCCCGGACT GCACAAAGGAT TCTGACCAGC	3300
CAGCTGGACT TTTGGATACC TGGCCTTGG CTGTGGCCCA GAAGACAGAA GTTCGGGGGA	3360
GAACCCTAGC TGTGACTTCT CCAAGCCTGT GCTCCCTCCC AGGAAGTGTG CCCCCAAACCT	3420
CTTCATATTG AAGATGGATT AGAAGAGGGG GTGATATCCC CTCCCCAGAT GCCTCAGGGC	3480
CCAGGCCTGC CTGCTCTCCA GTCGGGGATC TTCACAACTC AGATTGGTT GTGCTTCAGT	3540
AGTGGAGGTC CTGGTAGGGT CGGGTGGGGA TAAGCCTGGG TTCTTCAGGC CCCAGCCCTG	3600
GCAGGGGTCT GACCCCAGCA GGTAAGCAGA GAGTACTCCC TCCCCAGGAA GTGGAGGAGG	3660
GGACTCTGGG AATGGGGAAA TATGGTGCCC CATCCTGAAG CCAGCTGGTA CCTCCAGTT	3720
GCACAGGGAC TTGTTGGGG CTGAGGGCCC TGCCTACCCCT TGGTGCTGTC ATAAAAGGGC	3780
AGGCAGGGAGC GGGCTGAGAA ACAGCCTGTG CCTCCCAGAG ACTGACTCAG AGAGCCAGAG	3840
ACGTGTGTGT GTGTGTGTGT GTGTGTGTGT GTGTGTGAAA GACGGGGGTG	3900
GGGTATGTAT GCGTGTGTTG TGCACATGCT TGCCTGCACA GAGAGCATGA GTGTGTACAA	3960
GCTTAGCCCT GTGCCCTGTA GTGGGGCCAG CTGGGCAGAC AGCGAAATAA AAGGCAATAA	4020
GTTGAAA	4027

## (2) ANGABEN FÜR SEQ ID NO: 4:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
  - (A) LÄNGE: 4027 Basenpaare
  - (B) ART: Nucleinsäure
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA zu RNA
- (vi) HERKUNFT:
  - (A) ORGANISMUS: Ratte
  - (F) GEWEBEART: Skelettmuskelmyoblast
  - (H) ZELLINIE: L6
- (ix) MERKMAL:
  - (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
  - (B) POSITION: 262..3243
  - (C) IDENTIFIZIERUNGSVERFAHREN: Durch Ähnlichkeit mit einem anderen Muster
- (xi) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO: 4:

GAAAAATGAA GATCTATACC GACAGCAGAT CAGTGGCTGC CTGGGGCAAA GTTGGAGGGA	60
CATGTTATTT TGATTGTGAT GACATAATAC ATGCAAACAC GGCTAACCT CTCAAAGCAT	120
ACACTTATAC ATGTGCAGCT TGGTATACAT AAATTATCCA TTACAAAACT ATGAGAAAGC	180
TATCACCACAT ATGAAGCACC ACTCACAGTA TGTGAATCTC CACCCCCCTT CCACTGCTGA	240
GACACAGAAA TCCTAGACTG G ATG GAG AAC CCC TAC GTT GGG CGA GCG AGA	291
Met Glu Asn Pro Tyr Val Gly Arg Ala Arg	
1 5 10	
GCA GCA GCG GAG CGA GCA GCG GCA GAA GCC ACG AAT TCA CTA TCG ATC	339
Ala Ala Ala Glu Arg Ala Ala Glu Ala Thr Asn Ser Leu Ser Ile	
15 20 25	
CTG GTT CGG CCC ACC TCT GAA GGT TCC AGA ATC GAT AGT GAA TTC GTG	387
Leu Val Arg Pro Thr Ser Glu Gly Ser Arg Ile Asp Ser Glu Phe Val	
30 35 40	
GAG CTG GCA TGG ACA TCT CAT CCA GAG AGT GGG TGG GAA GAA GTG AGC	435
Glu Leu Ala Trp Thr Ser His Pro Glu Ser Gly Trp Glu Glu Val Ser	
45 50 55	
GCC TAC GAT GAA GCC ATG AAT CCT ATC CGC ACG TAT CAG GTG TGT AAC	483
Ala Tyr Asp Glu Ala Met Asn Pro Ile Arg Thr Tyr Gln Val Cys Asn	
60 65 70	
GTG CGC GAG TCC AGC CAG AAC TGG CTG CGG ACC GGT TTC ATC TGG	531
Val Arg Glu Ser Ser Gln Asn Asn Trp Leu Arg Thr Gly Phe Ile Trp	
75 80 85 90	
CGG CGG GAA GTC CAG CGC GTC TAC GTG GAG CTG AAG TTT ACC GTG AGA	579
Arg Arg Glu Val Gln Arg Val Tyr Val Glu Leu Lys Phe Thr Val Arg	
95 100 105	

## DE 694 32 511 T2 2004.04.29

GAT TGC AAC AGC ATC CCC AAC ATC CCT GGC TCC TGC AAG GAA ACC TTC	627
Asp Cys Asn Ser Ile Pro Asn Ile Pro Gly Ser Cys Lys Glu Thr Phe	
110 115 120	
AAC CTT TTT TAC TAC GAG GCT GAT AGC GAT GTG GCG TCA GCC TCC TCT	675
Asn Leu Phe Tyr Tyr Glu Ala Asp Ser Asp Val Ala Ser Ala Ser Ser	
125 130 135	
CCC TTC TGG ATG GAG AAC CCC TAC GTG AAA GTG GAC ACC ATT GCG CCA	723
Pro Phe Trp Met Glu Asn Pro Tyr Val Lys Val Asp Thr Ile Ala Pro	
140 145 150	
GAT GAG AGC TTC TCG CGG CTA GAC GCT GGG CGC GTT AAC ACC AAA GTG	771
Asp Glu Ser Phe Ser Arg Leu Asp Ala Gly Arg Val Asn Thr Lys Val	
155 160 165 170	
CGC AGC TTC GGG CCG CTT TCC AAA GCC GGC TTC TAC TTG GCC TTC CAG	819
Arg Ser Phe Gly Pro Leu Ser Lys Ala Gly Phe Tyr Leu Ala Phe Gln	
175 180 185	
GAC CAG GGT GCC TGC ATG TCA CTC ATC TCT GTG CGC GCC TTC TAC AAG	867
Asp Gln Gly Ala Cys Met Ser Leu Ile Ser Val Arg Ala Phe Tyr Lys	
190 195 200	
AAG TGT GCA TCC ACC ACT GCA GGC TTC GCA CTC TTC CCC GAG ACC CTC	915
Lys Cys Ala Ser Thr Thr Ala Gly Phe Ala Leu Phe Pro Glu Thr Leu	
205 210 215	
ACG GGG GCT GAG CCC ACT TCG CTG GTC ATT GCC CCT GGC ACC TGC ATC	963
Thr Gly Ala Glu Pro Thr Ser Leu Val Ile Ala Pro Gly Thr Cys Ile	
220 225 230	
GCT AAC GCT GTG GAG GTG TCT GTA CCG CTC AAG CTC TAC TGC AAT GGC	1011
Ala Asn Ala Val Glu Val Ser Val Pro Leu Lys Leu Tyr Cys Asn Gly	
235 240 245 250	
GAC GGG GAG TGG ATG GTG CCC GTT GGT GCC TGC ACC TGC GCT ACT GGC	1059
Asp Gly Glu Trp Met Val Pro Val Gly Ala Cys Thr Cys Ala Thr Gly	
255 260 265	
CAT GAG CCA GCC GCC AAG GAG ACC CAG TGC CGC GCC TGT CCC CCT GGG	1107
His Glu Pro Ala Ala Lys Glu Thr Gln Cys Arg Ala Cys Pro Pro Gly	
270 275 280	
AGC TAC AAG GCA AAG CAA GGA GAG GGG CCC TGC CTC CCC TGT CCC CCC	1155
Ser Tyr Lys Ala Lys Gln Gly Glu Gly Pro Cys Leu Pro Cys Pro Pro	
285 290 295	
AAT AGC CGC ACC ACC TCG CCG GCT GCC AGC ATC TGC ACC TGT CAC AAT	1203
Asn Ser Arg Thr Thr Ser Pro Ala Ala Ser Ile Cys Thr Cys His Asn	
300 305 310	
AAT TTC TAC CGC GCA GAC TCA GAC ACA GCG GAC AGC GCC TGC ACC ACG	1251
Asn Phe Tyr Arg Ala Asp Ser Asp Thr Ala Asp Ser Ala Cys Thr Thr	
315 320 325 330	

## DE 694 32 511 T2 2004.04.29

GTG CCG TCT CCC CCC CGG GGT GTG ATC TCC AAT GTG AAT GAG ACC TCG	1299
Val Pro Ser Pro Pro Arg Gly Val Ile Ser Asn Val Asn Glu Thr Ser	
335 340 345	
CTG ATC CTC GAG TGG AGT GAG CCC CGG GAC CTT GGC GGA CGA GAT GAC	1347
Leu Ile Leu Glu Trp Ser Glu Pro Arg Asp Leu Gly Gly Arg Asp Asp	
350 355 360	
CTC CTT TAT AAT GTT ATC TGT AAG AAG TGC CGT GGC AGC TCT GGG GCT	1395
Leu Leu Tyr Asn Val Ile Cys Lys Cys Arg Gly Ser Ser Gly Ala	
365 370 375	
GGA GGT CCG GCG ACC TGT TCA CGC TGT GAT GAC AAC GTG GAG TTC GAG	1443
Gly Gly Pro Ala Thr Cys Ser Arg Cys Asp Asp Asn Val Glu Phe Glu	
380 385 390	
) CCC CGA CAG CTG GGC CTG ACC GAG CGC CGG GTC CAC ATC AGC CAC CTG	1491
Pro Arg Gln Leu Gly Leu Thr Glu Arg Arg Val His Ile Ser His Leu	
395 400 405 410	
TTG GCC CAC ACC CGC TAC ACC TTT GAG GTG CAG GCT GTC AAC GGC GTC	1539
Leu Ala His Thr Arg Tyr Thr Phe Glu Val Gln Ala Val Asn Gly Val	
415 420 425	
TCT GGC AAA AGC CCT TTG CCG CCC CGC TAT GCA GCT GTG AAT ATC ACC	1587
Ser Gly Lys Ser Pro Leu Pro Pro Arg Tyr Ala Ala Val Asn Ile Thr	
430 435 440	
ACC AAC CAG GCC GCC CCA TCA GAA GTG CCT ACG CTC CAC TTG CAC AGC	1635
Thr Asn Gln Ala Ala Pro Ser Glu Val Pro Thr Leu His Leu His Ser	
445 450 455	
AGT TCA GGG AGC AGC CTG ACC CTG TCC TGG GCA CCC CCG GAG CGG CCT	1683
Ser Ser Gly Ser Ser Leu Thr Leu Ser Trp Ala Pro Pro Glu Arg Pro	
460 465 470	
) AAC GGA GTC ATC TTG GAC TAT GAG ATG AAG TAC TTT GAG AAG AGT AAA	1731
Asn Gly Val Ile Leu Asp Tyr Glu Met Lys Tyr Phe Glu Lys Ser Lys	
475 480 485 490	
GGC ATC GCC TCC ACT GTC ACC AGC CAG AAG AAC TCT GTA CAA CTG GAC	1779
Gly Ile Ala Ser Thr Val Thr Ser Gln Lys Asn Ser Val Gln Leu Asp	
495 500 505	
GGA CTG CAG CCC GAC GCC CGC TAT GTA GTT CAG GTC CGG GCT CGC ACA	1827
Gly Leu Gln Pro Asp Ala Arg Tyr Val Val Gln Val Arg Ala Arg Thr	
510 515 520	
GTA GCA GGT TAC GGA CAG TAT AGC CGC CCA GCT GAG TTT GAG ACC ACG	1875
Val Ala Gly Tyr Gly Gln Tyr Ser Arg Pro Ala Glu Phe Glu Thr Thr	
525 530 535	
AGT GAA AGA GGC TCA GGG GCC CAG CAG CTT CAA GAG CAG CTT CCC CTA	1923
Ser Glu Arg Gly Ser Gly Ala Gln Gln Leu Gln Glu Gln Leu Pro Leu	
540 545 550	

## DE 694 32 511 T2 2004.04.29

ATT GTG GGA TCC ACC GTA GCT GGC TTT GTC TTC ATG GTG GTC GTC GTG Ile Val Gly Ser Thr Val Ala Gly Phe Val Phe Met Val Val Val Val 555 560 565 570	1971
GTC ATT GCT CTT GTC TGC CTC AGG AAG CAG CGC CAG GGC CCT GAT GCA Val Ile Ala Leu Val Cys Leu Arg Lys Gln Arg Gln Gly Pro Asp Ala 575 580 585	2019
GAA TAC ACG GAG AAG TTG CAG CAA TAC GTT GCC CCC AGG ATG AAA GTT Glu Tyr Thr Glu Lys Leu Gln Tyr Val Ala Pro Arg Met Lys Val 590 595 600	2067
TAC ATT GAC CCC TTT ACC TAC GAG GAT CCC AAT GAG GCC GTC CGA GAG Tyr Ile Asp Pro Phe Thr Tyr Glu Asp Pro Asn Glu Ala Val Arg Glu 605 610 615	2115
TTC GCC AAG GAG ATC GAT GTG TCC TGC GTC AAG ATC GAG GAG GTG ATT Phe Ala Lys Glu Ile Asp Val Ser Cys Val Lys Ile Glu Glu Val Ile 620 625 630	2163
GGA GCT GGG GAG TTT GGG GAA GTG TGC CGG GGT CGG CTG AAA CTG CCC Gly Ala Gly Glu Phe Gly Glu Val Cys Arg Gly Arg Leu Lys Leu Pro 635 640 645 650	2211
GGC CGC CGG GAG GTG TTC GTG GCC ATC AAG ACA CTG AAG GTG GGA TAC Gly Arg Arg Glu Val Phe Val Ala Ile Lys Thr Leu Lys Val Gly Tyr 655 660 665	2259
ACG GAG AGG CAG CGG CGG GAC TTC CTG AGT GAG GCT TCC ATC ATG GGT Thr Glu Arg Gln Arg Arg Asp Phe Leu Ser Glu Ala Ser Ile Met Gly 670 675 680	2307
CAA TTT GAC CAT CCA AAT ATA ATC CGT CTA GAG GGC GTG GTC ACC AAA Gln Phe Asp His Pro Asn Ile Ile Arg Leu Glu Gly Val Val Thr Lys 685 690 695	2355
AGT CGT CCA GTC ATG ATC CTC ACT GAG TTC ATG GAG AAC TGT GCC CTG Ser Arg Pro Val Met Ile Leu Thr Glu Phe Met Glu Asn Cys Ala Leu 700 705 710	2403
GAC TCC TTC CTA CGG CTC AAT GAC GGG CAG TTC ACA GTC ATC CAG CTT Asp Ser Phe Leu Arg Leu Asn Asp Gly Gln Phe Thr Val Ile Gln Leu 715 720 725 730	2451
GTG GGC ATG TTG CGT GGC ATT GCT GCC GGC ATG AAG TAC TTG TCT GAG Val Gly Met Leu Arg Gly Ile Ala Ala Gly Met Lys Tyr Leu Ser Glu 735 740 745	2499
ATG AAC TAC GTG CAC CGT GAC CTC GCT GCC CGC AAC ATC CTT GTC AAC Met Asn Tyr Val His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Ile Leu Val Asn 750 755 760	2547
AGT AAC TTG GTC TGC AAA GTA TCT GAC TTT GGG CTC TCC CGC TTC CTG Ser Asn Leu Val Cys Lys Val Ser Asp Phe Gly Leu Ser Arg Phe Leu 765 770 775	2595

## DE 694 32 511 T2 2004.04.29

GAG GAC GAC CCC TCA GAC CCC ACC TAC ACC AGC TCC CTG GGT GGG AAG Glu Asp Asp Pro Ser Asp Pro Thr Tyr Thr Ser Ser Leu Gly Gly Lys 780 . 785 . 790	2643
ATC CCT ATC CGT TGG ACC GCC CCA GAG GCC ATA GAC TAT CGG AAG TTC Ile Pro Ile Arg Trp Thr Ala Pro Glu Ala Ile Asp Tyr Arg Lys Phe 795 . 800 . 805 . 810	2691
ACG TCT GCC AGC GAT GTC TGG AGC TAC GGG ATC GTC ATG TGG GAG GTC Thr Ser Ala Ser Asp Val Trp Ser Tyr Gly Ile Val Met Trp Glu Val 815 . 820 . 825	2739
ATG AGC TAC GGA GAG CGA CCA TAC TGG GAC ATG AGC AAC CAG GAT GTC Met Ser Tyr Gly Glu Arg Pro Tyr Trp Asp Met Ser Asn Gln Asp Val 830 . 835 . 840	2787
ATC AAT GCC GTA GAG CAA GAC TAT CGG TTA CCA CCC CCC ATG GAC TGC Ile Asn Ala Val Glu Gln Asp Tyr Arg Leu Pro Pro Pro Met Asp Cys 845 . 850 . 855	2835
CCA GCG GCG CTG CAC CAG CTC ATG CTG GAC TGT TGG GTG CGG GAC CGG Pro Ala Ala Leu His Gln Leu Met Leu Asp Cys Trp Val Arg Asp Arg 860 . 865 . 870	2883
AAC CTC AGG CCC AAG TTC TCC CAA ATC GTC AAC ACG CTA GAC AAG CTT Asn Leu Arg Pro Lys Phe Ser Gln Ile Val Asn Thr Leu Asp Lys Leu 875 . 880 . 885 . 890	2931
ATC CGC AAT GCT GCC AGC CTC AAG GTC ATC GCC AGT GCC CCA TCT GGC Ile Arg Asn Ala Ala Ser Leu Lys Val Ile Ala Ser Ala Pro Ser Gly 895 . 900 . 905	2979
ATG TCC CAG CCC CTC CTA GAC CGC ACG GTC CCA GAT TAT ACG ACC TTC Met Ser Gln Pro Leu Leu Asp Arg Thr Val Pro Asp Tyr Thr Thr Phe 910 . 915 . 920	3027
ACG ACG GTG GGC GAC TGG CTA GAT GCC ATC AAG ATG GGG AGG TAT AAA Thr Thr Val Gly Asp Trp Leu Asp Ala Ile Lys Met Gly Arg Tyr Lys 925 . 930 . 935	3075
GAG AGC TTC GTC GGT GCG GGT TTT GCC TCC TTT GAC CTG GTG GCC CAG Glu Ser Phe Val Gly Ala Gly Phe Ala Ser Phe Asp Leu Val Ala Gln 940 . 945 . 950	3123
ATG ACT GCA GAA GAT CTG CTA AGG ATC GGG GTC ACT TTG GCC GGC CAC Met Thr Ala Glu Asp Leu Leu Arg Ile Gly Val Thr Leu Ala Gly His 955 . 960 . 965 . 970	3171
CAG AAG AAG ATC CTC AGC AGT ATC CAG GAC ATG CGG CTG CAG ATG AAC Gln Lys Lys Ile Leu Ser Ser Ile Gln Asp Met Arg Leu Gln Met Asn 975 . 980 . 985	3219
CAG ACA CTG CCC GTG CAG GTC TGACGCTCAG CTCCAGCGAG GGGCGTGGCC Gln Thr Leu Pro Val Gln Val 990	3270

CCCCGGGACT GCACAAGGAT TCTGACCAGC CAGCTGGACT TTTGGATACC TGGCCTTG	3330
CTGTGGCCCA GAAGACAGAA GTTCGGGGGA GAACCCTAGC TGTGACTTCT CCAAGCCTGT	3390
GCTCCCTCCC AGGAAGTGTG CCCCACACCT CTTCATATTG AAGATGGATT AGAACAGGGG	3450
GTGATATCCC CTCCCCAGAT GCCTCAGGGC CCAGGCCTGC CTGCTCTCCA GTCGGGGATC	3510
TTCACAACTC AGATTTGGTT GTGCTTCAGT AGTGGAGGTC CTGGTAGGGT CGGGTGGGGA	3570
TAAGCCTGGG TTCTTCAGGC CCCAGCCCTG GCAGGGGTCT GACCCCAGCA GTAAACAGA	3630
GAGTACTCCC TCCCCAGGAA GTGGAGGAGG GGACTCTGGG AATGGGGAAA TATGGTGC	3690
CATCCTGAAG CCAGCTGGTA CCTCCAGTTT GCACAGGGAC TTGTTGGGG CTGAGGGCCC	3750
TGCCTACCCCT TGGTGCTGTC ATAAAAGGGC AGGCAGGAGC GGGCTGAGAA ACAGCCTGTG	3810
CCTCCCAGAG ACTGACTCAG AGAGCCAGAG ACGTGTGTGT GTGTGTGTGT GTGTGTGT	3870
GTGTGTGTGT GTGTGTGAAA GACGGGGGTG GGGTATGTAT GCGTGTGTTG TGCACATGCT	3930
TGCCTGCACA GAGAGCATGA GTGTGTACAA GCTTAGCCCT GTGCCCTGTA GTGGGGCCAG	3990
CTGGGCAGAC AGCGAAATAA AAGGCAATAA GTTGAAA	4027

## (2) ANGABEN FÜR SEQ ID No: 5:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:  
 (A) LÄNGE: 11 Aminosäuren  
 (B) ART: Aminosäure  
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

- ) (vi) HERKUNFT:  
 (A) ORGANISMUS: Ratte  
 (F) GEWEBEART: Skelettmuskelmyoblast  
 (H) ZELLINIE: L6

(xi) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO: 5:

Val Ile Gly Ala Gly Glu Phe Gly Glu Val Cys  
 1 5 10

## (2) ANGABEN FÜR SEQ ID No: 6:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:  
 (A) LÄNGE: 10 Aminosäuren  
 (B) ART: Aminosäure  
 (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(vi) HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Ratte
- (F) GEWEBEART: Skelettmuskelmyoblast
- (H) ZELLINIE: L6

(xi) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO: 6:

Asn Ile Leu Val Asn Ser Asn Leu Val Cys  
1 5 10

(2) ANGABEN FÜR SEQ ID No: 7:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 5 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(vi) HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Ratte
- (F) GEWEBEART: Skelettmuskelmyoblast
- (H) ZELLINIE: L6

(xi) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO: 7:

Val Glu Gln Asp Tyr  
1 5

(2) ANGABEN FÜR SEQ ID No: 8:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 28 Basenpaare
- (B) ART: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: (synthetische) DNA

(xi) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO: 8:

GTAATACGAC TCACTATAGG GGAGAGCT

(2) ANGABEN FÜR SEQ ID No: 9:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 28 Basenpaare
- (B) ART: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: (synthetische) DNA

(xi) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO: 9:

CTCCCCCTATA GTGAGTCGTA TTACTGCA

(2) ANGABEN FÜR SEQ ID No: 10:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 32 Basenpaare
- (B) ART: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: (synthetische) DNA

(xi) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO: 10:

CTAGTCTATA GTGTCACCTA AATCGTGGGT AC

(2) ANGABEN FÜR SEQ ID No: 11:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 23 Basenpaare
- (B) ART: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: (synthetische) DNA

(xi) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO: 11:

CACGATTTAG GTGACACTAT AGA

(2) ANGABEN FÜR SEQ ID No: 12:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 44 Basenpaare
- (B) ART: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: (synthetische) DNA

(xi) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO: 12:

AATATAGTCG ACCACCATGG AGAACCCCTA CGTTGGGCGA GCGA

(2) ANGABEN FÜR SEQ ID No: 13:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 37 Basenpaare
- (B) ART: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: (synthetische) DNA

(xi) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO: 13:

CGGCAGACTA GTTCAGACCT GCACGGCAG TGTCTGG

(2) ANGABEN FÜR SEQ ID No: 14:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 55 Basenpaare
- (B) ART: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: (synthetische) DNA

(xi) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO: 14:

GCCGCCACTA GTTCAGTGGT GGTGGTGGTG GTGGACCTGC ACGGGCAGTG TCTGG

(2) ANGABEN FÜR SEQ ID No: 15:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 44 Basenpaare
- (B) ART: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: (synthetische) DNA

(xi) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO: 15:

CGGCAGACTA GTTCATGAGC CTCTTCACT CGTGGTCTCA AACT

(2) ANGABEN FÜR SEQ ID No: 16:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 62 Basenpaare
- (B) ART: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: (synthetische) DNA

(xi) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO: 16:

GCCGCCACTA GTTCAGTGGT GGTGGTGGTG GTGTGAGCCT CTTTCACTCG TGGTCTCAAA

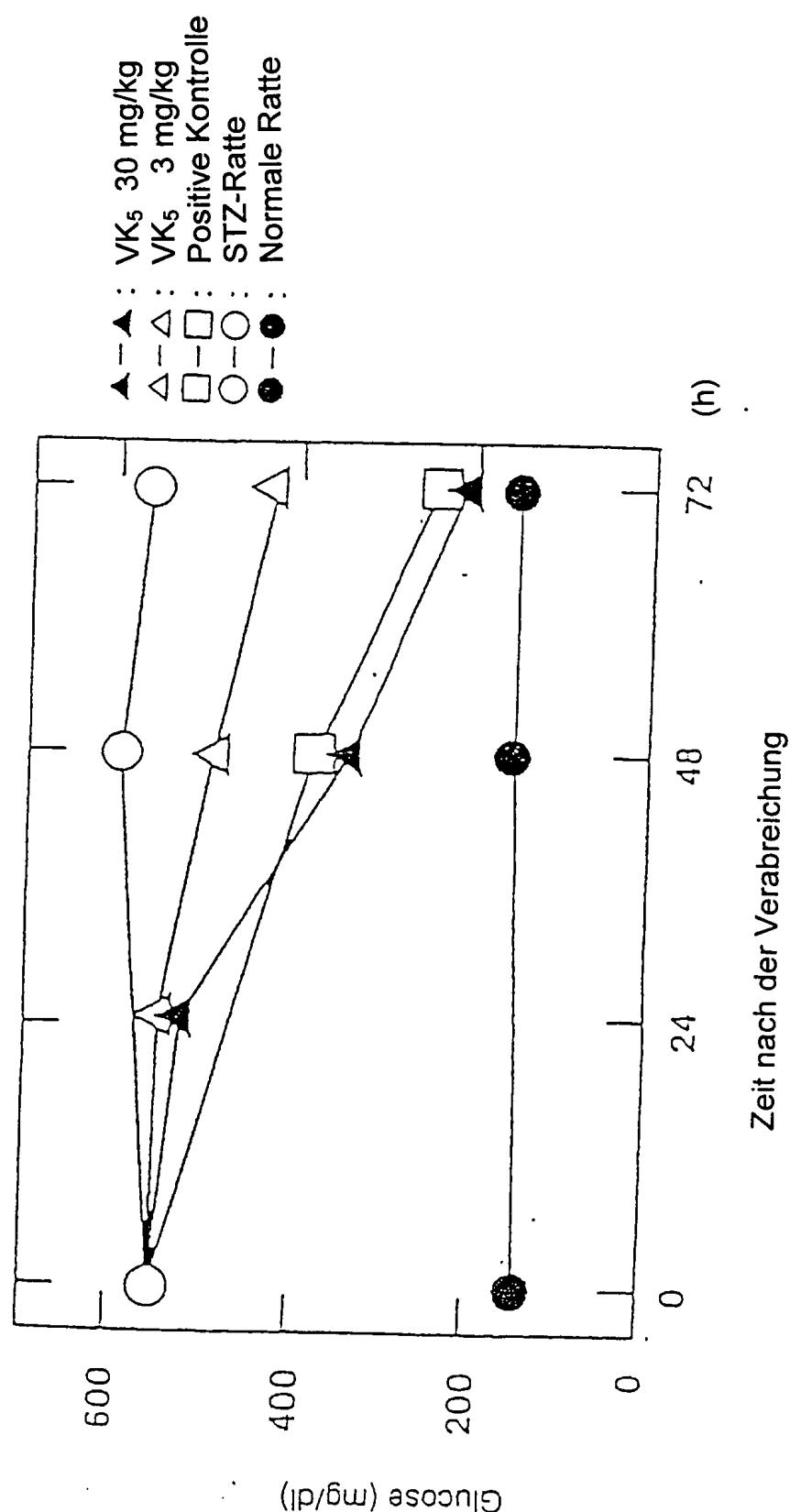
CT

**Patentansprüche**

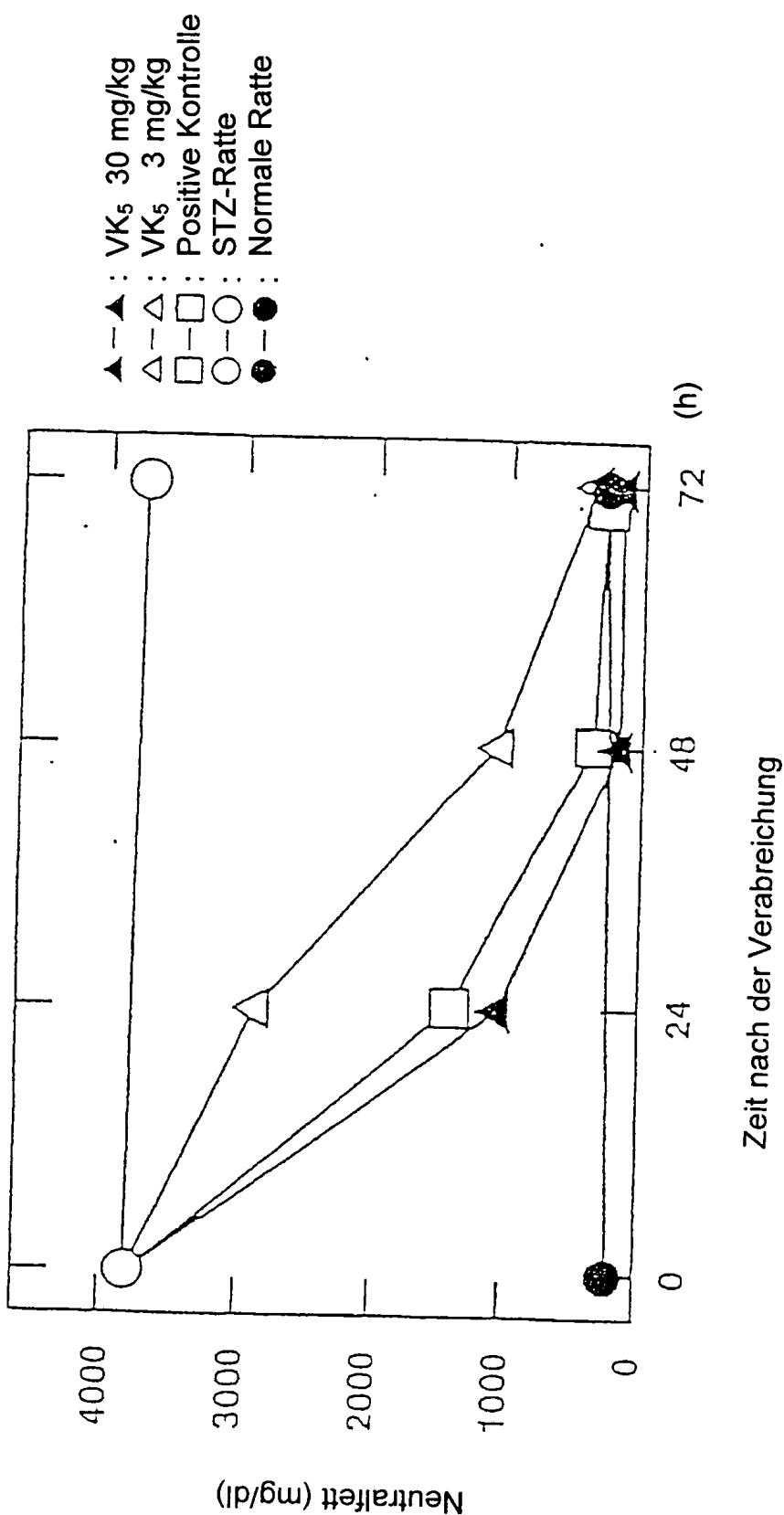
1. Polypeptid des Proteins p140 mit der in SEQ ID NO: 1 angegebenen Aminosäuresequenz in im wesentlichen gereinigter Form.
2. DNA mit Codierung für ein Polypeptid nach Anspruch 1 mit der in SEQ ID NO: 2 angegebenen Nucleotidsequenz.
3. DNA mit Codierung für ein Polypeptid nach Anspruch 1 mit der in SEQ ID NO: 3 angegebenen Nucleotidsequenz.
4. Replikations- und Expressionsvektor, der DNA nach einem der Ansprüche 2 oder 3 umfasst.
5. Mit einem Replikations- und Expressionsvektor nach Anspruch 4 transformierte oder transfizierte Wirtszellen.
6. Verfahren zur Herstellung eines Polypeptids durch Züchten von Wirtszellen nach Anspruch 5 unter Bedingungen, die die Expression eines Polypeptids nach Anspruch 1 bewirken.
7. Monoklonaler oder polyklonaler Antikörper zu einem Polypeptid nach Anspruch 1.
8. Pharmazeutische Zusammensetzung, die ein Polypeptid nach Anspruch 1 oder einen Antikörper nach Anspruch 7 in Verbindung mit einem pharmazeutisch akzeptablen Verdünnungsmittel und/oder Träger enthält.
9. Mittel zur Verhinderung und/oder Behandlung von Diabetes, das ein Polypeptid nach Anspruch 1 enthält.
10. Verwendung eines Polypeptids nach Anspruch 1 zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Verhinderung oder Behandlung von Diabetes.
11. Verfahren zum Screenen eines Mittels zur Verhinderung und/oder Behandlung von Diabetes, wobei das Verfahren durch die Verwendung von Protein p140 gemäß Patentanspruch 1 gekennzeichnet ist.

Es folgen 5 Blatt Zeichnungen

Figure 1



Figur 2



Figur 3

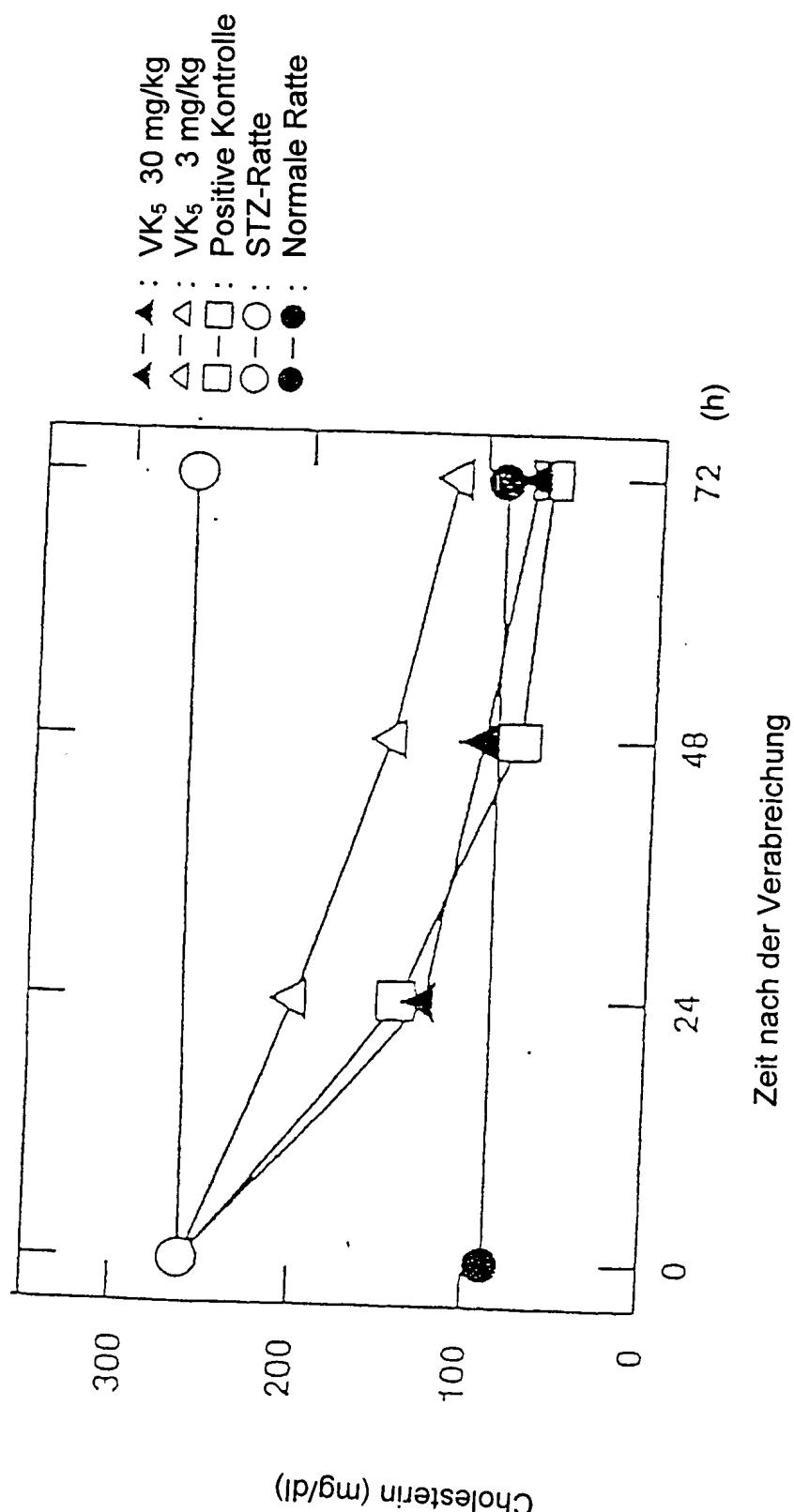
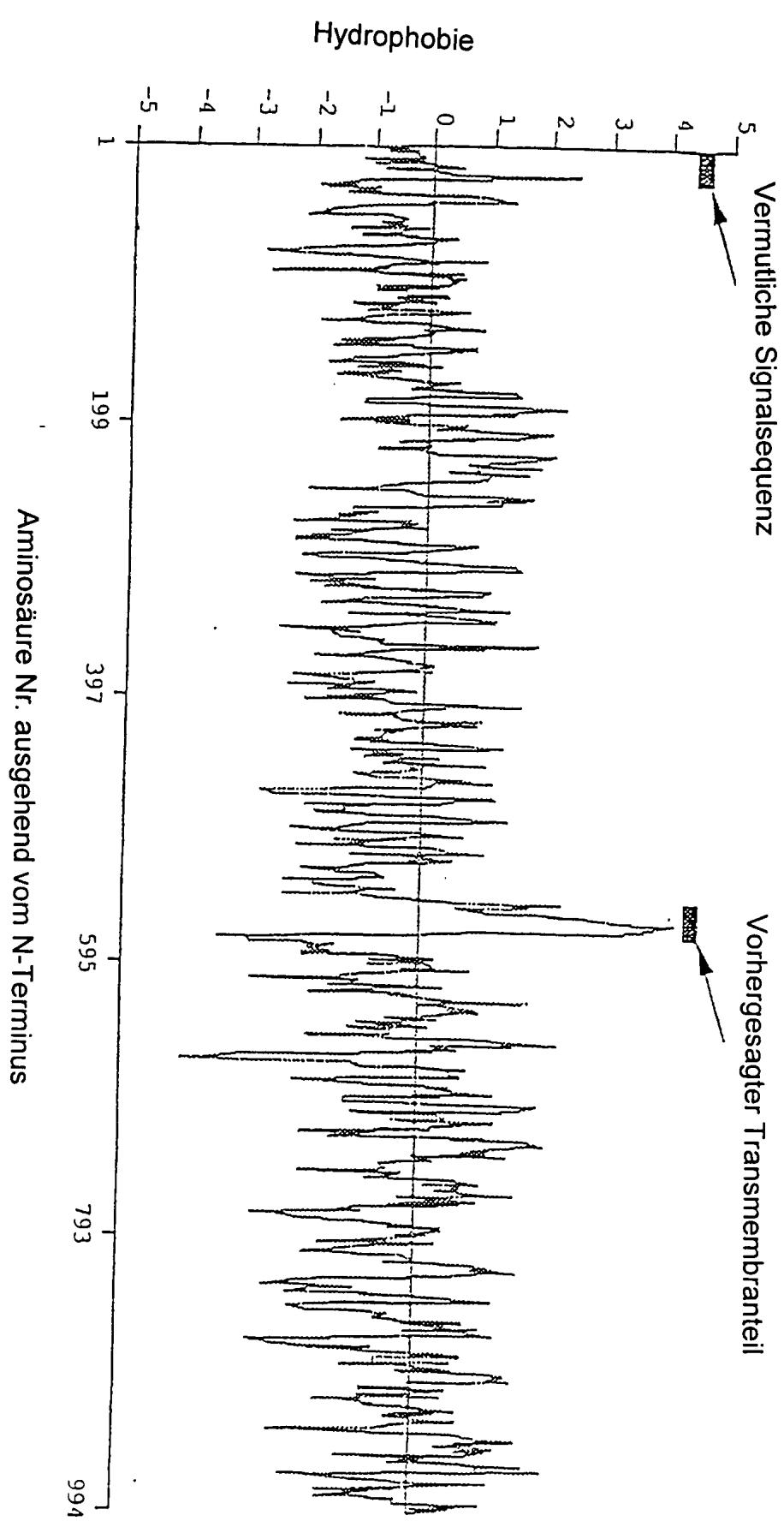


Figure 4



Figur 5

