



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 699 35 085 T2** 2007.08.23

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 484 338 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **699 35 085.9**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **04 007 617.6**

(96) Europäischer Anmeldetag: **02.12.1999**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **08.12.2004**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **07.02.2007**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **23.08.2007**

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: **C07K 14/475** (2006.01)

**A61K 38/18** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

(30) Unionspriorität:

<b>113296 P</b>	<b>22.12.1998</b>	<b>US</b>
<b>PCT/US99/05028</b>	<b>08.03.1999</b>	<b>WO</b>
<b>130232 P</b>	<b>21.04.1999</b>	<b>US</b>
<b>131445 P</b>	<b>28.04.1999</b>	<b>US</b>
<b>134287 P</b>	<b>14.05.1999</b>	<b>US</b>
<b>144758 P</b>	<b>20.07.1999</b>	<b>US</b>
<b>145698 P</b>	<b>26.07.1999</b>	<b>US</b>
<b>PCT/US99/21090</b>	<b>15.09.1999</b>	<b>WO</b>
<b>PCT/US99/21547</b>	<b>15.09.1999</b>	<b>WO</b>

(73) Patentinhaber:

**Genentech, Inc., South San Francisco, Calif., US**

(74) Vertreter:

**LEINWEBER & ZIMMERMANN, 80331 München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

**Ashkenazi, Avi J., San Mateo, CA 94402, US;  
Goddard, Audrey, San Francisco, CA 94131, US;  
Godowski, Paul J., Burlingame, CA 94010, US;  
Gurney, Austin L., Belmont, CA 94002, US;  
Marsters, Scot A., San Carlos, CA 94070, US;  
Napier, Mary A., Hillsborough, CA 94010, US; Pitti,  
Robert M., El Cerrito, CA 94530, US; Wood, William  
I., Hillsborough, CA 94010, US**

(54) Bezeichnung: **Verfahren und Zusammensetzung zur Hemmung des neoplastischen Zellwachstums**

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

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

## Beschreibung

### GEBIET DER ERFINDUNG

**[0001]** Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren und Zusammensetzungen zur Inhibierung von neoplastischem Zellwachstum. Insbesondere betrifft die vorliegende Erfindung Antitumorzusammensetzungen und Verfahren zur Behandlung von Tumoren. Die Erfindung betrifft ferner Screeningverfahren zur Identifikation von wachstumshemmenden Verbindungen, z.B. von Antitumor-Verbindungen.

### HINTERGRUND DER ERFINDUNG

**[0002]** Maligne Tumoren (Krebs) sind, nach Herzerkrankungen, die zweithäufigste Todesursache in den Vereinigten Staaten (Boring et al., CA Cancer J. Clin. 43, 7 (1993)).

**[0003]** Krebs ist gekennzeichnet durch das Anwachsen der Anzahl an anormalen, oder neoplastischen, Zellen, die aus einem normalen Gewebe stammen, das proliferiert, um eine Tumormasse zu bilden, durch den Befall benachbarter Gewebe durch diese neoplastischen Tumorzellen und durch die Bildung maligner Zellen, die sich schließlich über das Blut- oder Lymphsystem auf regionale Lymphknoten und auf entfernte Stellen ausbreiten (Metastasenbildung). Im Erkrankungszustand von Krebs proliferiert eine Zelle unter Bedingungen, unter denen normale Zellen nicht wachsen würden. Krebs manifestiert sich in zahlreichen verschiedenen Formen, die durch verschiedene Grade an Invasivität und Aggressivität gekennzeichnet sind.

**[0004]** Trotz jüngster Fortschritte im Bereich der Krebstherapie gibt es einen großen Bedarf an neuen therapeutischen Mitteln, die in der Lage sind, neoplastisches Zellwachstum zu inhibieren. Folglich ist es das Ziel der vorliegenden Erfindung, Verbindungen zu identifizieren, die in der Lage sind, das Wachstum neoplastischer Zellen wie Krebszellen zu inhibieren.

**[0005]** In der WO00/37284, WO00/68380 und WO 00/69884, die nach dem Einreichdatum veröffentlicht wurden, wird über die Identifizierung von Sequenzen berichtet, die der hierin beschriebenen PRO320 ähneln.

### ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

#### A. Ausführungsformen

**[0006]** Die Erfindung betrifft Mittel zur Behandlung von Tumoren, einschließlich Krebsarten, wie z.B. Brust-, Prostata-, Kolon-, Lungen-, Ovarial-, Nieren- und ZNS-Krebs, Leukämie, Melanom usw., in Säugetierpatienten, vorzugsweise Menschen.

**[0007]** Die vorliegende Erfindung betrifft Mittel zur Behandlung eines Tumors in einem Säugetier, welche eine therapeutisch wirksame Menge eines PRO320-Polypeptids oder eines Agonisten davon, wie in den Ansprüchen definiert, umfassen. Der Tumor ist vorzugsweise ein Krebs.

**[0008]** In einem weiteren Aspekt betrifft die Erfindung ein In-vitro-Verfahren zur Inhibierung des Wachstums einer Tumorzelle, umfassend das Aussetzen der Zelle gegenüber einer wirksamen Menge eines PRO320-Polypeptids oder eines Agonisten davon, wie in den Ansprüchen definiert. In einer bestimmten Ausführungsform ist der Agonist ein Anti-PRO320-Agonisten-Antikörper.

**[0009]** In einer Ausführungsform nutzt die Erfindung einen Anti-PRO320-Agonisten-Antikörper.

### KURZBESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

**[0010]** [Fig. 1](#) zeigt die Nucleotidsequenz (Seq.-ID Nr. 1) einer cDNA, die eine für Nativsequenz-PRO320 kodierende Nucleotidsequenz enthält, worin die Nucleotidsequenz (Seq.-ID Nr. 1) ein Klon ist, der hierin als DNA32284-1307 bezeichnet wird. Außerdem sind die Positionen der jeweiligen Start- und Stoppcodons fett und unterstrichen angezeigt.

**[0011]** [Fig. 2](#) zeigt die Aminosäuresequenz (Seq.-ID Nr. 2) eines Nativsequenz-PRO320-Polypeptids, die aus der Kodiersequenz der in [Fig. 1](#) gezeigten Seq.-ID Nr. 1 abgeleitet ist.

## DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

**[0012]** Die Bezeichnung „PRO320“-Polypeptid oder -Protein, sofern hierin verwendet, umfasst Native-sequenz-PRO320-Polypeptide und PRO320-Varianten (die hierin noch näher definiert werden). Das PRO320-Polypeptid kann aus zahlreichen verschiedenen Quellen isoliert werden, wie z.B. aus menschlichen Gewebetypen oder aus einer anderen Quelle, oder es kann mittels Rekombinations- und/oder Syntheseverfahren hergestellt werden.

**[0013]** Ein „Nativesequenz-PRO320“ umfasst ein Polypeptid mit derselben Aminosäuresequenz wie PRO320-Polypeptid, das aus der Natur stammt. Solch ein Nativesequenz-PRO320-Polypeptid kann aus der Natur isoliert werden oder kann mittels Rekombinations- und/oder Syntheseverfahren produziert werden. Die Bezeichnung „Nativesequenz“-PRO320 umfasst insbesondere natürlich vorkommende trunkierte oder sekretierte Formen (z.B. eine Sequenz einer extrazellulären Domäne), natürlich vorkommende Variantenformen (z.B. alternativ gespleißte Formen) und natürlich vorkommende Allelvarianten des PRO320-Polypeptids. In einer Ausführungsform der Erfindung ist das Nativesequenz-PRO320-Polypeptid ein reifes oder Vollängen-Native-sequenz-PRO320-Polypeptid, wie es in [Fig. 2](#) gezeigt ist (Seq.-ID Nr. 2). Es ist jedoch, auch wenn das in [Fig. 2](#) offenbarte PRO320-Polypeptid (Seq.-ID Nr. 2) als eines gezeigt ist, das mit dem hierin als Aminosäureposition 1 bezeichneten Methioninrest beginnt, ebenfalls denkbar und möglich, dass ein anderer Methioninrest, der stromauf oder stromab von Aminosäureposition 1 in [Fig. 2](#) (Seq.-ID Nr. 2) angeordnet ist, als Start-Aminosäurerest für das PRO320-Polypeptid verwendet werden kann.

**[0014]** Die „extrazelluläre Domäne“ oder „ECD“ eines hierin offenbarten Polypeptids bezieht sich auf eine Form des Polypeptids, die im Wesentlichen frei von den transmembranen und zytoplasmatischen Domänen ist. Üblicherweise weist eine Polypeptid-ECD weniger als etwa 1 % solcher transmembranen und/oder zytoplasmatischen Domänen, und vorzugsweise weniger als etwa 0,5 % solcher Domänen, auf. Es gilt zu verstehen, dass jegliche transmembrane Domäne(n), die für die Polypeptide der vorliegenden Erfindung identifiziert werden, gemäß Kriterien identifiziert werden, die auf dem Gebiet der Erfindung üblicherweise zur Identifizierung dieses Typs von hydrophober Domäne verwendet werden. Die exakten Grenzen einer transmembranen Domäne können variieren, sehr wahrscheinlich jedoch nicht um mehr als etwa 5 Aminosäuren an beiden Enden der Domäne, wie ursprünglich identifiziert und in den beiliegenden Figuren gezeigt. Als solche umfasst in einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung die extrazelluläre Domäne eines Polypeptids der vorliegenden Erfindung Aminosäuren 1 bis X der reifen Aminosäuresequenz, worin X für jede beliebige Aminosäure innerhalb von 5 Aminosäuren an beiden Seiten der Grenze der extrazellulären Domäne/transmembranen Domäne steht.

**[0015]** Die ungefähre Anordnung der „Signalpeptide“ der verschiedenen hierin offenbarten PRO-Polypeptide ist in den beiliegenden Figuren gezeigt. Es wird jedoch angemerkt, dass die C-terminale Grenze eines Signalpeptids variieren kann, jedoch sehr wahrscheinlich nicht mehr als um etwa 5 Aminosäuren an beiden Seiten der C-terminalen Grenze des Signalpeptids, wie sie anfänglich hierin identifiziert wird, worin die C-terminale Grenze des Signalpeptids gemäß den Kriterien identifiziert werden kann, die üblicherweise auf dem Gebiet der Erfindung zur Identifikation dieses Typs von Aminosäuresequenzelement verwendet werden (z.B. Nielsen et al., Prot. Eng. 10, 1-6 (1997), und von Heinje et al., Nucl. Acids. Res. 14, 4683-4690 (1986)). Darüber hinaus ist auch bekannt, dass, in manchen Fällen, Spaltung einer Signalsequenz von einem sekretierten Polypeptid nicht vollkommen gleichförmig geschieht, was zu mehr als einer sekretierten Spezies führt. Diese reifen Polypeptide, bei denen das Signalpeptid innerhalb von nicht mehr als etwa 5 Aminosäuren an jeder Seite der C-terminalen Grenze des Signalpeptids, wie hierin identifiziert, gespalten wird, und die dafür kodierenden Polynucleotide werden in der vorliegenden Erfindung betrachtet.

**[0016]** „PRO320-Polypeptidvariante“ bedeutet ein aktives PRO320-Polypeptid (das kein Native-sequenz-PRO320-Polypeptid ist), wie nachstehend definiert, mit zumindest etwa 80 % Aminosäuresequenzidentität mit der Aminosäuresequenz von (a) den Resten 1 oder etwa 22 bis 338 des in [Fig. 2](#) gezeigten PRO320-Polypeptids (Seq.-ID Nr. 2), (b) X bis 338 des in [Fig. 2](#) gezeigten PRO320-Polypeptids (Seq.-ID Nr. 2), worin X für jeden beliebigen Aminosäurerest von 17 bis 26 aus [Fig. 2](#) (Seq.-ID Nr. 2) steht, oder (c) einem anderen spezifisch abgeleiteten Fragment der in [Fig. 2](#) gezeigten Aminosäuresequenz (Seq.-ID Nr. 2).

**[0017]** Solche PRO320-Varianten umfassen beispielsweise PRO320-Polypeptide, in denen ein oder mehrere Aminosäurereste am N- oder C-Terminus sowie innerhalb einer oder mehrerer innen gelegenen Domänen der Nativesequenz hinzugefügt oder deletiert sind.

**[0018]** Üblicherweise weist eine PRO320-Variante zumindest etwa 80 % Aminosäuresequenzidentität, noch

bevorzugter zumindest etwa 81 % Aminosäuresequenzidentität, noch bevorzugter zumindest etwa 82 % Aminosäuresequenzidentität, noch bevorzugter zumindest etwa 83 % Aminosäuresequenzidentität, noch bevorzugter zumindest etwa 84 % Aminosäuresequenzidentität, noch bevorzugter zumindest etwa 85 % Aminosäuresequenzidentität, noch bevorzugter zumindest etwa 86 % Aminosäuresequenzidentität, noch bevorzugter zumindest etwa 87 % Aminosäuresequenzidentität, noch bevorzugter zumindest etwa 88 % Aminosäuresequenzidentität, noch bevorzugter zumindest etwa 89 % Aminosäuresequenzidentität, noch bevorzugter zumindest etwa 90 % Aminosäuresequenzidentität, noch bevorzugter zumindest etwa 91 % Aminosäuresequenzidentität, noch bevorzugter zumindest etwa 92 % Aminosäuresequenzidentität, noch bevorzugter zumindest etwa 93 % Aminosäuresequenzidentität, noch bevorzugter zumindest etwa 94 % Aminosäuresequenzidentität, noch bevorzugter zumindest etwa 95 % Aminosäuresequenzidentität, noch bevorzugter zumindest etwa 96 % Aminosäuresequenzidentität, noch bevorzugter zumindest etwa 97 % Aminosäuresequenzidentität, noch bevorzugter zumindest etwa 98 % Aminosäuresequenzidentität, und wiederum noch bevorzugter zumindest etwa 99 % Aminosäuresequenzidentität, mit (a) den Resten 1 oder etwa 22 bis 338 des in [Fig. 2](#) gezeigten PRO320-Polypeptids (Seq.-ID Nr. 2), (b) X bis 338 des in [Fig. 2](#) gezeigten PRO320-Polypeptids (Seq.-ID Nr. 2), worin X für jeden beliebigen Aminosäurerest von 17 bis 26 aus [Fig. 2](#) (Seq.-ID Nr. 2) steht, oder (c) einem anderen spezifisch abgeleiteten Fragment der in [Fig. 2](#) gezeigten Aminosäuresequenz (Seq.-ID Nr. 2) auf.

**[0019]** PRO320-Polypeptidvarianten umfassen nicht die native PRO320-Polypeptidsequenz. Üblicherweise weisen PRO320-Polypeptidvarianten eine Länge von zumindest etwa 10 Aminosäuren, häufig von zumindest etwa 20 Aminosäuren, noch häufiger von zumindest etwa 30 Aminosäuren, noch häufiger von zumindest etwa 40 Aminosäuren, noch häufiger von zumindest etwa 50 Aminosäuren, noch häufiger von zumindest etwa 60 Aminosäuren, noch häufiger von zumindest etwa 70 Aminosäuren, noch häufiger von zumindest etwa 80 Aminosäuren, noch häufiger von zumindest etwa 90 Aminosäuren, noch häufiger von zumindest etwa 100 Aminosäuren, noch häufiger von zumindest etwa 150 Aminosäuren, noch häufiger von zumindest etwa 200 Aminosäuren, noch häufiger von zumindest etwa 250 Aminosäuren, noch häufiger von zumindest etwa 300 Aminosäuren, oder mehr auf.

**[0020]** Wie nachstehend gezeigt stellt Tabelle 1 den vollständigen Quellcode für das ALIGN-2-Computerprogramm zum Sequenzvergleich bereit. Dieser Quellcode kann routinemäßig zur Verwendung an einem UNIX-Betriebssystem kompiliert werden, um das ALIGN-2-Sequenzvergleich-Computerprogramm bereitzustellen.

**[0021]** Darüber hinaus zeigen die Tabellen 2A-2D hypothetische Beispiele für die Verwendung des nachstehend beschriebenen Verfahrens zur Bestimmung der prozentuellen Aminosäuresequenzidentität (Tabellen 2A-2B) und der prozentuellen Nucleinsäuresequenzidentität (Tabellen 2C-2D) unter Einsatz des ALIGN-2-Sequenzvergleich-Computerprogramms, worin „PRO“ für die Aminosäuresequenz eines hypothetischen PRO320-Polypeptids von Interesse steht, „Vergleichsprotein“ für die Aminosäuresequenz eines Polypeptids steht, mit dem das „PRO“-Polypeptid von Interesse verglichen wird, „PRO-DNA“ für eine hypothetische PRO320-kodierende Nucleinsäuresequenz von Interesse steht, „Vergleichs-DNA“ für die Nucleotidsequenz eines Nucleinsäuremoleküls steht, mit dem das „PRO-DNA“-Nucleinsäuremolekül von Interesse verglichen wird, „X“, „Y“ und „Z“ jeweils für verschiedene hypothetische Aminosäurereste stehen und „N“, „L“ und „V“ jeweils für verschiedene hypothetische Nucleotide stehen.

Tabelle 1

```

/*
 *
 * C-C increased from 12 to 15
 * Z is average of EQ
 * B is average of ND
 * match with stop is _M; stop-stop = 0; J (joker) match = 0
 */
#define _M -8 /* value of a match with a stop */

int _day[26][26] = {
/* A */ { 2, 0, -2, 0, 0, -4, 1, -1, -1, 0, -1, -2, -1, 0, _M, 1, 0, -2, 1, 1, 0, 0, -6, 0, -3, 0},
/* B */ { 0, 3, -4, 3, 2, -5, 0, 1, -2, 0, 0, -3, -2, 2, _M, -1, 1, 0, 0, 0, 0, -2, -5, 0, -3, 1},
/* C */ {-2, -4, 15, -5, -5, -4, -3, -2, 0, -5, -6, -5, -4, _M, -3, -5, -4, 0, -2, 0, -2, -8, 0, 0, -5},
/* D */ { 0, 3, -5, 4, 3, -6, 1, 1, -2, 0, 0, -4, -3, 2, _M, -1, 2, -1, 0, 0, 0, -2, -7, 0, -4, 2},
/* E */ { 0, 2, -5, 3, 4, -5, 0, 1, -2, 0, 0, -3, -2, 1, _M, -1, 2, -1, 0, 0, 0, -2, -7, 0, -4, 3},
/* F */ {-4, -5, -4, -6, -5, 9, -5, -2, 1, 0, -5, 2, 0, -4, _M, -5, -5, -4, -3, -3, 0, -1, 0, 0, 7, -5},
/* G */ { 1, 0, -3, 1, 0, -5, 5, -2, -3, 0, -2, -4, -3, 0, _M, -1, -1, -3, 1, 0, 0, -1, -7, 0, -5, 0},
/* H */ {-1, 1, -3, 1, 1, -2, -2, 6, -2, 0, 0, -2, -2, 2, _M, 0, 3, 2, -1, -1, 0, -2, -3, 0, 0, 2},
/* I */ {-1, -2, -2, -2, 1, -3, -2, 5, 0, -2, 2, 2, -2, _M, -2, -2, -2, -1, 0, 0, 4, -5, 0, -1, -2},
/* J */ { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, _M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* K */ {-1, 0, -5, 0, 0, -5, -2, 0, -2, 0, 5, -3, 0, 1, _M, -1, 1, 3, 0, 0, 0, -2, -3, 0, -4, 0},
/* L */ {-2, -3, -6, -4, -3, 2, -4, -2, 2, 0, -3, 6, 4, -3, _M, -3, -2, -3, -3, -1, 0, 2, -2, 0, -1, -2},
/* M */ {-1, -2, -5, -3, -2, 0, -3, -2, 2, 0, 0, 4, 6, -2, _M, -2, -1, 0, -2, -1, 0, 2, -4, 0, -2, -1},
/* N */ { 0, 2, -4, 2, 1, -4, 0, 2, -2, 0, 1, -3, -2, 2, _M, -1, 1, 0, 1, 0, 0, -2, -4, 0, -2, 1},
/* O */ { _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, 0, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M},
/* P */ { 1, -1, -3, -1, -1, -5, -1, 0, -2, 0, -1, -3, -2, -1, _M, 6, 0, 0, 1, 0, 0, -1, -6, 0, -5, 0},
/* Q */ { 0, 1, -5, 2, 2, -5, -1, 3, -2, 0, 1, -2, -1, 1, _M, 0, 4, 1, -1, -1, 0, -2, -5, 0, -4, 3},
/* R */ {-2, 0, -4, -1, -1, -4, -3, 2, -2, 0, 3, -3, 0, 0, _M, 0, 1, 6, 0, -1, 0, -2, 2, 0, -4, 0},
/* S */ { 1, 0, 0, 0, 0, -3, 1, -1, -1, 0, 0, -3, -2, 1, _M, 1, -1, 0, 2, 1, 0, -1, -2, 0, -3, 0},
/* T */ { 1, 0, -2, 0, 0, -3, 0, -1, 0, 0, 0, -1, -1, 0, _M, 0, -1, -1, 1, 3, 0, 0, -5, 0, -3, 0},
/* U */ { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, _M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* V */ { 0, -2, -2, -2, -2, -1, -1, -2, 4, 0, -2, 2, 2, -2, _M, -1, -2, -2, -1, 0, 4, -6, 0, -2, -2},
/* W */ {-6, -5, -8, -7, -7, 0, -7, -3, -5, 0, -3, -2, -4, -4, _M, -6, -5, 2, -2, -5, 0, -6, 17, 0, 0, -6},
/* X */ { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, _M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* Y */ {-3, -3, 0, -4, -4, 7, -5, 0, -1, 0, -4, -1, -2, -2, _M, -5, -4, -4, -3, -3, 0, -2, 0, 0, 10, -4},
/* Z */ { 0, 1, -5, 2, 3, -5, 0, 2, -2, 0, 0, -2, -1, 1, _M, 0, 3, 0, 0, 0, 0, -2, -6, 0, -4, 4}
};

```

```

/*
 */
#include <stdio.h>
#include <ctype.h>

#define MAXJMP 16 /* max jumps in a diag */
#define MAXGAP 24 /* don't continue to penalize gaps larger than this */
#define JMPS 1024 /* max jmps in an path */
#define MX 4 /* save if there's at least MX-1 bases since last jmp */

#define DMAT 3 /* value of matching bases */
#define DMIS 0 /* penalty for mismatched bases */
#define DINS0 8 /* penalty for a gap */
#define DINS1 1 /* penalty per base */
#define PINS0 8 /* penalty for a gap */
#define PINS1 4 /* penalty per residue */

struct jmp {
    short n[MAXJMP]; /* size of jmp (neg for del) */
    unsigned short x[MAXJMP]; /* base no. of jmp in seq x */
}; /* limits seq to 2^16 -1 */

struct diag {
    int score; /* score at last jmp */
    long offset; /* offset of prev block */
    short ijmp; /* current jmp index */
    struct jmp jp; /* list of jmps */
};

struct path {
    int spc; /* number of leading spaces */
    short n[JMPS]; /* size of jmp (gap) */
    int x[JMPS]; /* loc of jmp (last elem before gap) */
};

char *ofile; /* output file name */
char *names[2]; /* seq names: getseqs() */
char *prog; /* prog name for err msgs */
char *seqs[2]; /* seqs: getseqs() */
int dmax; /* best diag: nw() */
int dmax0; /* final diag */
int dna; /* set if dna: main() */
int endgaps; /* set if penalizing end gaps */
int gapx, gapy; /* total gaps in seqs */
int len0, len1; /* seq lens */
int ngapx, ngapy; /* total size of gaps */
int smax; /* max score: nw() */
int *xbm; /* bitmap for matching */
long offset; /* current offset in jmp file */
struct diag *dx; /* holds diagonals */
struct path *pp[2]; /* holds path for seqs */

char *calloc(), *malloc(), *index(), *strcpy();
char *getseq(), *g_calloc();

```

```

/* Needleman-Wunsch alignment program
*
* usage: prog file1 file2
* where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.
* The sequences can be in upper- or lower-case and may contain ambiguity
* Any lines beginning with ';', '>' or '<' are ignored
* Max file length is 65535 (limited by unsigned short x in the jmp struct)
* A sequence with 1/3 or more of its elements ACGTU is assumed to be DNA
* Output is in the file "align.out"
*
* The program may create a tmp file in /tmp to hold info about traceback.
* Original version developed under BSD 4.3 on a vax 8650
*/
#include "nw.h"
#include "day.h"

static _dbval[26] = {
    1,14,2,13,0,0,4,11,0,0,12,0,3,15,0,0,0,5,6,8,8,7,9,0,10,0
};

static _pbval[26] = {
    1,2|(1<<('D'-'A'))|(1<<('N'-'A')), 4, 8, 16, 32, 64,
    128, 256, 0xFFFFFFFF, 1<<10, 1<<11, 1<<12, 1<<13, 1<<14,
    1<<15, 1<<16, 1<<17, 1<<18, 1<<19, 1<<20, 1<<21, 1<<22,
    1<<23, 1<<24, 1<<25|(1<<('E'-'A'))|(1<<('Q'-'A'))
};

main(ac, av)
int    ac;
char   *av[];
{
    prog = av[0];
    if (ac != 3) {
        fprintf(stderr, "usage: %s file1 file2\n", prog);
        fprintf(stderr, "where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.\n");
        fprintf(stderr, "The sequences can be in upper- or lower-case\n");
        fprintf(stderr, "Any lines beginning with ';', '>' or '<' are ignored\n");
        fprintf(stderr, "Output is in the file \"align.out\"\n");
        exit(1);
    }
    namex[0] = av[1];
    namex[1] = av[2];
    seqx[0] = getseq(namex[0], &len0);
    seqx[1] = getseq(namex[1], &len1);
    xbm = (dna)? _dbval : _pbval;

    endgaps = 0;          /* 1 to penalize endgaps */
    ofile = "align.out";  /* output file */

    nw();                /* fill in the matrix, get the possible jmps */
    readjmps();           /* get the actual jmps */
    print();              /* print stats, alignment */

    cleanup();           /* unlink any tmp files */
}

```

```

/* do the alignment, return best score: main()
 * dna: values in Fitch and Smith, PNAS, 80, 1382-1386, 1983
 * pro: PAM 250 values
 * When scores are equal, we prefer mismatches to any gap, prefer
 * a new gap to extending an ongoing gap, and prefer a gap in seqx
 * to a gap in seq y.
 */

nw()
{
    char          *px, *py;          /* seqs and ptrs */
    int           *ndely, *dely;     /* keep track of dely */
    int           ndelx, delx;       /* keep track of delx */
    int           *tmp;              /* for swapping row0, row1 */
    int           mis;               /* score for each type */
    int           ins0, ins1;        /* insertion penalties */
    register      id;                /* diagonal index */
    register      ij;                /* jmp index */
    register      *col0, *coll;      /* score for curr, last row */
    register      xx, yy;            /* index into seqs */

    dx = (struct diag *)g_calloc("to get diags", len0+len1+1, sizeof(struct diag));

    ndely = (int *)g_calloc("to get ndely", len1+1, sizeof(int));
    dely = (int *)g_calloc("to get dely", len1+1, sizeof(int));
    col0 = (int *)g_calloc("to get col0", len1+1, sizeof(int));
    coll = (int *)g_calloc("to get coll", len1+1, sizeof(int));
    ins0 = (dna)? DINS0 : PINS0;
    ins1 = (dna)? DINS1 : PINS1;

    smax = -10000;
    if (endgaps) {
        for (col0[0] = dely[0] = -ins0, yy = 1; yy <= len1; yy++) {
            col0[yy] = dely[yy] = col0[yy-1] - ins1;
            ndely[yy] = yy;
        }
        col0[0] = 0; /* Waterman Bull Math Biol 84 */
    }
    else
        for (yy = 1; yy <= len1; yy++)
            dely[yy] = -ins0;

    /* fill in match matrix
     */
    for (px = seqx[0], xx = 1; xx <= len0; px++, xx++) {
        /* initialize first entry in col
         */
        if (endgaps) {
            if (xx == 1)
                coll[0] = delx = -(ins0+ins1);
            else
                coll[0] = delx = col0[0] - ins1;
            ndelx = xx;
        }
        else {
            coll[0] = 0;
            delx = -ins0;
            ndelx = 0;
        }
    }
}

```

nw

Page 2 of nw.c



...NW

```

for (py = seqx[1], yy = 1; yy <= len1; py++, yy++) {
    mis = col0[yy-1];
    if (dna)
        mis += (xbm[*px-'A']&xbm[*py-'A'])? DMAT : DMIS;
    else
        mis += _day[*px-'A'][*py-'A'];

    /* update penalty for del in x seq;
     * favor new del over ongoing del
     * ignore MAXGAP if weighting endgaps
     */
    if (endgaps || ndely[yy] < MAXGAP) {
        if (col0[yy] - ins0 >= dely[yy]) {
            dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);
            ndely[yy] = 1;
        } else {
            dely[yy] -= ins1;
            ndely[yy]++;
        }
    } else {
        if (col0[yy] - (ins0+ins1) >= dely[yy]) {
            dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);
            ndely[yy] = 1;
        } else
            ndely[yy]++;
    }

    /* update penalty for del in y seq;
     * favor new del over ongoing del
     */
    if (endgaps || ndelx < MAXGAP) {
        if (col1[yy-1] - ins0 >= delx) {
            delx = col1[yy-1] - (ins0+ins1);
            ndelx = 1;
        } else {
            delx -= ins1;
            ndelx++;
        }
    } else {
        if (col1[yy-1] - (ins0+ins1) >= delx) {
            delx = col1[yy-1] - (ins0+ins1);
            ndelx = 1;
        } else
            ndelx++;
    }

    /* pick the maximum score; we're favoring
     * mis over any del and delx over dely
     */
}

```

...nw

```

id = xx - yy + len1 - 1;
if (mis >= delx && mis >= dely[yy])
    coll[yy] = mis;
else if (delx >= dely[yy]) {
    coll[yy] = delx;
    ij = dx[id].ijmp;
    if (dx[id].jp.n[0] && (!dna || (ndelx >= MAXJMP
    && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINS0)) {
        dx[id].ijmp++;
        if (++ij >= MAXJMP) {
            writejmps(id);
            ij = dx[id].ijmp = 0;
            dx[id].offset = offset;
            offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
        }
        dx[id].jp.n[ij] = ndelx;
        dx[id].jp.x[ij] = xx;
        dx[id].score = delx;
    }
} else {
    coll[yy] = dely[yy];
    ij = dx[id].ijmp;
    if (dx[id].jp.n[0] && (!dna || (ndely[yy] >= MAXJMP
    && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINS0)) {
        dx[id].ijmp++;
        if (++ij >= MAXJMP) {
            writejmps(id);
            ij = dx[id].ijmp = 0;
            dx[id].offset = offset;
            offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
        }
        dx[id].jp.n[ij] = ndely[yy];
        dx[id].jp.x[ij] = xx;
        dx[id].score = dely[yy];
    }
}
if (xx == ten0 && yy < len1) {
    /* last col
    */
    if (endgaps)
        coll[yy] -= ins0+ins1*(len1-yy);
    if (coll[yy] > smax) {
        smax = coll[yy];
        dmax = id;
    }
}
if (endgaps && xx < len0)
    coll[yy-1] -= ins0+ins1*(len0-xx);
if (coll[yy-1] > smax) {
    smax = coll[yy-1];
    dmax = id;
}
tmp = col0; col0 = coll; coll = tmp;
}
(void) free((char *)ndely);
(void) free((char *)dely);
(void) free((char *)col0);
(void) free((char *)coll);
}

```

Page 4 of nw.c

```

/*
 *
 * print() -- only routine visible outside this module
 *
 * static:
 * getmat() -- trace back best path, count matches: print()
 * pr_align() -- print alignment of described in array p[]: print()
 * dumpblock() -- dump a block of lines with numbers, stars: pr_align()
 * nums() -- put out a number line: dumpblock()
 * putline() -- put out a line (name, {num}, seq, {num}): dumpblock()
 * stars() -- put a line of stars: dumpblock()
 * stripname() -- strip any path and prefix from a seqname
 */

#include "nw.h"

#define SPC      3
#define P_LINE  256    /* maximum output line */
#define P_SPC    3      /* space between name or num and seq */

extern _day[26][26];
int      olen;          /* set output line length */
FILE     *fx;           /* output file */

print()
{
    int      lx, ly, firstgap, lastgap;    /* overlap */

    if ((fx = fopen(ofile, "w")) == 0) {
        fprintf(stderr, "%s: can't write %s\n", prog, ofile);
        cleanup(1);
    }
    fprintf(fx, "< first sequence: %s (length = %d)\n", namex[0], len0);
    fprintf(fx, "< second sequence: %s (length = %d)\n", namex[1], len1);
    olen = 60;
    lx = len0;
    ly = len1;
    firstgap = lastgap = 0;
    if (dmax < len1 - 1) { /* leading gap in x */
        pp[0].spc = firstgap = len1 - dmax - 1;
        ly -= pp[0].spc;
    }
    else if (dmax > len1 - 1) { /* leading gap in y */
        pp[1].spc = firstgap = dmax - (len1 - 1);
        lx -= pp[1].spc;
    }
    if (dmax0 < len0 - 1) { /* trailing gap in x */
        lastgap = len0 - dmax0 - 1;
        lx -= lastgap;
    }
    else if (dmax0 > len0 - 1) { /* trailing gap in y */
        lastgap = dmax0 - (len0 - 1);
        ly -= lastgap;
    }
    getmat(lx, ly, firstgap, lastgap);
    pr_align();
}

```

print

```

/*
 * trace back the best path, count matches
 */
static
getmat(lx, ly, firstgap, lastgap)                                getmat
int      lx, ly;          /* "core" (minus endgaps) */
int      firstgap, lastgap; /* leading trailing overlap */
{
    int      nm, i0, i1, siz0, siz1;
    char      outx[32];
    double    pct;
    register  n0, n1;
    register char *p0, *p1;

    /* get total matches, score
     */
    i0 = i1 = siz0 = siz1 = 0;
    p0 = seqx[0] + pp[1].spc;
    p1 = seqx[1] + pp[0].spc;
    n0 = pp[1].spc + 1;
    n1 = pp[0].spc + 1;

    nm = 0;
    while ( *p0 && *p1 ) {
        if (siz0) {
            p1++;
            n1++;
            siz0--;
        }
        else if (siz1) {
            p0++;
            n0++;
            siz1--;
        }
        else {
            if (xbm[*p0-'A']&xbm[*p1-'A'])
                nm++;
            if (n0++ == pp[0].x[i0])
                siz0 = pp[0].n[i0++];
            if (n1++ == pp[1].x[i1])
                siz1 = pp[1].n[i1++];
            p0++;
            p1++;
        }
    }

    /* pct homology:
     * if penalizing endgaps, base is the shorter seq
     * else, knock off overhangs and take shorter core
     */
    if (endgaps)
        lx = (len0 < len1)? len0 : len1;
    else
        lx = (lx < ly)? lx : ly;
    pct = 100.*(double)nm/(double)lx;
    fprintf(fx, "\n");
    fprintf(fx, "< %d match%s in an overlap of %d: %.2f percent similarity\n",
        nm, (nm == 1)? "" : "es", lx, pct);
}

```

```

fprintf(fx, "< gaps in first sequence: %d", gapx);
if (gapx) {
    (void) printf(outx, " (%d %s%s)",
        gapx, (dna)? "base": "residue", (gapx == 1)? "" : "s");
    fprintf(fx, "%s", outx);

    fprintf(fx, ", gaps in second sequence: %d", gapy);
    if (gapy) {
        (void) printf(outx, " (%d %s%s)",
            gapy, (dna)? "base": "residue", (gapy == 1)? "" : "s");
        fprintf(fx, "%s", outx);
    }
    if (dna)
        fprintf(fx,
            "\n<score: %d (match = %d, mismatch = %d, gap penalty = %d + %d per base)\n",
            smax, DMAT, DMIS, DINS0, DINS1);
    else
        fprintf(fx,
            "\n<score: %d (Dayhoff PAM 250 matrix, gap penalty = %d + %d per residue)\n",
            smax, PINS0, PINS1);
    if (endgaps)
        fprintf(fx,
            "< endgaps penalized. left endgap: %d %s%s, right endgap: %d %s%s\n",
            firstgap, (dna)? "base" : "residue", (firstgap == 1)? "" : "s",
            lastgap, (dna)? "base" : "residue", (lastgap == 1)? "" : "s");
    else
        fprintf(fx, "< endgaps not penalized\n");
}

static      nm;          /* matches in core -- for checking */
static      lmax;        /* lengths of stripped file names */
static      ij[2];       /* jmp index for a path */
static      nc[2];       /* number at start of current line */
static      ni[2];       /* current elem number -- for gapping */
static      siz[2];
static char *ps[2];      /* ptr to current element */
static char *po[2];      /* ptr to next output char slot */
static char out[2][P_LINE]; /* output line */
static char star[P_LINE]; /* set by stars() */

/*
 * print alignment of described in struct path pp[]
 */
static
pr_align0
{
    int      nm;          /* char count */
    int      more;
    register i;

    for (i = 0, lmax = 0; i < 2; i++) {
        nm = stripname(name[i]);
        if (nm > lmax)
            lmax = nm;

        nc[i] = 1;
        ni[i] = 1;
        siz[i] = ij[i] = 0;
        ps[i] = seqx[i];
        po[i] = out[i];
    }
}

```

...getmat

pr\_align

Page 3 of nwprint.c

```

for (nn = nm = 0, more = 1; more; ) {
    for (i = more = 0; i < 2; i++) {
        /*
         * do we have more of this sequence?
         */
        if (!*ps[i])
            continue;

        more++;

        if (pp[i].spc) { /* leading space */
            *po[i]++ = ' ';
            pp[i].spc--;
        }
        else if (siz[i]) { /* in a gap */
            *po[i]++ = '-';
            siz[i]--;
        }
        else { /* we're putting a seq element
            */
            *po[i] = *ps[i];
            if (islower(*ps[i]))
                *ps[i] = toupper(*ps[i]);
            po[i]++;
            ps[i]++;

            /*
             * are we at next gap for this seq?
             */
            if (ni[i] == pp[i].x[ij(i)]) {
                /*
                 * we need to merge all gaps
                 * at this location
                 */
                siz[i] = pp[i].n[ij(i)]++;
                while (ni[i] == pp[i].x[ij(i)])
                    siz[i] += pp[i].n[ij(i)]++;
            }
            ni[i]++;
        }
    }
    if (++nn == olen || !more && nn) {
        dumpblock();
        for (i = 0; i < 2; i++)
            po[i] = out[i];
        nn = 0;
    }
}

/*
 * dump a block of lines, including numbers, stars: pr_align()
 */
static
dumpblock()
{
    register i;

    for (i = 0; i < 2; i++)
        *po[i] = '\0';
}

```

...pr\_align

dumpblock

Page 4 of nwprint.c

...dumpblock

```

(void) putc('\n', fx);
for (i = 0; i < 2; i++) {
    if (*out[i] && (*out[i] != ' ' || *(po[i]) != ' ')) {
        if (i == 0)
            nums(i);
        if (i == 0 && *out[1])
            stars();
        putline(i);
        if (i == 0 && *out[1])
            fprintf(fx, star);
        if (i == 1)
            nums(i);
    }
}
}

```

```

/*
 * put out a number line: dumpblock()
 */

```

static

nums(ix)

nums

```

int    ix;    /* index in out[] holding seq line */
{
    char    nline[P_LINE];
    register i, j;
    register char *pn, *px, *py;

    for (pn = nline, i = 0; i < lmax + P_SPC; i++, pn++)
        *pn = ' ';
    for (i = nc[ix], py = out[ix]; *py; py++, pn++) {
        if (*py == ' ' || *py == '-')
            *pn = ' ';
        else {
            if (i % 10 == 0 || (i == 1 && nc[ix] != 1)) {
                j = (i < 0)? -i : i;
                for (px = pn; j /= 10, px--)
                    *px = j % 10 + '0';
                if (i < 0)
                    *px = '-';
            }
            else
                *pn = *py;
            i++;
        }
    }
    *pn = '\0';
    nc[ix] = i;
    for (pn = nline; *pn; pn++)
        (void) putc(*pn, fx);
    (void) putc('\n', fx);
}

```

```

/*
 * put out a line (name, {num}, seq: {num}): dumpblock()
 */

```

static

putline(ix)

putline

```

int    ix;
{

```

Page 5 of nwprint.c

...putline

```

int          i;
register char *px;

for (px = namex[ix], i = 0; *px && *px != '\0'; px++, i++)
    (void) putc(*px, fx);
for (; i < lmax + P_SPC; i++)
    (void) putc(' ', fx);

/* these count from 1:
 * ni[] is current element (from 1)
 * nc[] is number at start of current line
 */
for (px = out[ix]; *px; px++)
    (void) putc(*px & 0x7F, fx);
(void) putc('\n', fx);
}

/*
 * put a line of stars (seqs always in out[0], out[1]): dumpblock0
 */
static
stars()
{
    int          i;
    register char *p0, *p1, cx, *px;

    if (!*out[0] || (*out[0] == ' ' && *out[0] == '\0') ||
        !*out[1] || (*out[1] == ' ' && *out[1] == '\0'))
        return;
    px = star;
    for (i = lmax + P_SPC; i; i--)
        *px++ = ' ';

    for (p0 = out[0], p1 = out[1]; *p0 && *p1; p0++, p1++) {
        if (isalpha(*p0) && isalpha(*p1)) {
            if (xbin[*p0-'A'] & xbin[*p1-'A']) {
                cx = '*';
                nm++;
            }
            else if (!dna && day[*p0-'A'][*p1-'A'] > 0)
                cx = '.';
            else
                cx = ' ';
        }
        else
            cx = ' ';
        *px++ = cx;
    }
    *px++ = '\n';
    *px = '\0';
}

```

stars

Page 6 of nwprint.c



```

/*
 * strip path or prefix from pn, return len: pr_align()
 */
static
stripname(pn)
    char    *pn;    /* file name (may be path) */
{
    register char    *px, *py;

    py = 0;
    for (px = pn; *px; px++)
        if (*px == '/')
            py = px + 1;
    if (py)
        (void) strcpy(pn, py);
    return(strlen(pn));
}

```

stripname

```

/*
 * cleanup() -- cleanup any tmp file
 * getseq() -- read in seq, set dna, len, maxlen
 * g_calloc() -- calloc() with error checkin
 * readjimps() -- get the good jimps, from tmp file if necessary
 * writejimps() -- write a filled array of jimps to a tmp file: nw()
 */
#include "nw.h"
#include <sys/file.h>

char *jname = "/tmp/homgXXXXXX"; /* tmp file for jimps */
FILE *fj;

int cleanup(); /* cleanup tmp file */
long lseek();

/*
 * remove any tmp file if we blow
 */
cleanup(i)
    int i;
{
    if (fj)
        (void) unlink(jname);
    exit(i);
}

/*
 * read, return ptr to seq, set dna, len, maxlen
 * skip lines starting with ':', '<', or '>'
 * seq in upper or lower case
 */
char *
getseq(file, len)
    char *file; /* file name */
    int *len; /* seq len */
{
    char line[1024], *pseq;
    register char *px, *py;
    int natgc, tlen;
    FILE *fp;

    if ((fp = fopen(file, "r")) == 0) {
        fprintf(stderr, "%s: can't read %s\n", prog, file);
        exit(1);
    }
    tlen = natgc = 0;
    while (fgets(line, 1024, fp)) {
        if (*line == ':' || *line == '<' || *line == '>')
            continue;
        for (px = line; *px != '\n'; px++)
            if (isupper(*px) || islower(*px))
                tlen++;
    }
    if ((pseq = malloc((unsigned)(tlen+6))) == 0) {
        fprintf(stderr, "%s: malloc() failed to get %d bytes for %s\n", prog, tlen+6, file);
        exit(1);
    }
    pseq[0] = pseq[1] = pseq[2] = pseq[3] = '\0';
}

```

cleanup

getseq

...getseq

```

py = pseq + 4;
*len = tlen;
rewind(fp);

while (fgets(line, 1024, fp)) {
    if (*line == ';' || *line == '<' || *line == '>')
        continue;
    for (px = line; *px != '\n'; px++) {
        if (isupper(*px))
            *py++ = *px;
        else if (islower(*px))
            *py++ = toupper(*px);
        if (index("ATGCU", *(py-1)))
            natgc++;
    }
    *py++ = '\0';
    *py = '\0';
    (void) fclose(fp);
    dna = natgc > (tlen/3);
    return(pseq+4);
}

char *
g_calloc(msg, nx, sz)
char *msg; /* program calling routine */
int nx, sz; /* number and size of elements */
{
    char *px, *calloc();

    if ((px = calloc((unsigned)nx, (unsigned)sz)) == 0) {
        if (*msg) {
            fprintf(stderr, "%s: g_calloc() failed %s (n=%d, sz=%d)\n", prog, msg, nx, sz);
            exit(1);
        }
    }
    return(px);
}

/*
 * get final jmps from dx[] or tmp file, set pp[], reset dmax: main()
 */
readjmps()
{
    int fd = -1;
    int siz, i0, i1;
    register i, j, xx;

    if (!f) {
        (void) fclose(f);
        if ((fd = open(jname, O_RDONLY, 0)) < 0) {
            fprintf(stderr, "%s: can't open() %s\n", prog, jname);
            cleanup(1);
        }
    }
    for (i = i0 = i1 = 0, dmax0 = dmax, xx = len0; i++) {
        while (1) {
            for (j = dx[dmax].ijmp; j >= 0 && dx[dmax].jp.x[j] >= xx; j--)

```

g\_calloc

readjmps

Page 2 of nwsubr.c

...readjumps

```

    if (j < 0 && dx[dmax].offset && fj) {
        (void) lseek(fd, dx[dmax].offset, 0);
        (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].jp, sizeof(struct jmp));
        (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].offset, sizeof(dx[dmax].offset));
        dx[dmax].ijmp = MAXJMP-1;
    }
    else
        break;
}
if (i >= JMPS) {
    fprintf(stderr, "%s: too many gaps in alignment\n", prog);
    cleanup(1);
}
if (j >= 0) {
    siz = dx[dmax].jp.n[j];
    xx = dx[dmax].jp.x[j];
    dmax += siz;
    if (siz < 0) { /* gap in second seq */
        pp[1].n[i1] = -siz;
        xx += siz;

        /* id = xx - yy + len1 - 1
        */
        pp[1].x[i1] = xx - dmax + len1 - 1;
        gapy++;
        ngapy -= siz;
/* ignore MAXGAP when doing endgaps */
        siz = (-siz < MAXGAP || endgaps)? -siz : MAXGAP;
        i1++;
    }
    else if (siz > 0) { /* gap in first seq */
        pp[0].n[i0] = siz;
        pp[0].x[i0] = xx;
        gapx++;
        ngapx += siz;
/* ignore MAXGAP when doing endgaps */
        siz = (siz < MAXGAP || endgaps)? siz : MAXGAP;
        i0++;
    }
}
else
    break;
}

/* reverse the order of jumps
*/
for (j = 0, i0--; j < i0; j++, i0--) {
    i = pp[0].n[j]; pp[0].n[j] = pp[0].n[i0]; pp[0].n[i0] = i;
    i = pp[0].x[j]; pp[0].x[j] = pp[0].x[i0]; pp[0].x[i0] = i;
}
for (j = 0, i1--; j < i1; j++, i1--) {
    i = pp[1].n[j]; pp[1].n[j] = pp[1].n[i1]; pp[1].n[i1] = i;
    i = pp[1].x[j]; pp[1].x[j] = pp[1].x[i1]; pp[1].x[i1] = i;
}
if (fd >= 0)
    (void) close(fd);
if (fj) {
    (void) unlink(jname);
    fj = 0;
    offset = 0;
}
}

```

Page 3 of nwsubr.c

```

/*
 * write a filled jmp struct offset of the prev one (if any): nw()
 */
writejmps(ix)                                writejmps
{
    int ix;

    char *mktemp();

    if (!fj) {
        if (mktemp(jname) < 0) {
            fprintf(stderr, "%s: can't mktemp() %s\n", prog, jname);
            cleanup(1);
        }
        if ((fj = fopen(jname, "w")) == 0) {
            fprintf(stderr, "%s: can't write %s\n", prog, jname);
            exit(1);
        }
    }
    (void) fwrite((char *)&dx[ix].jp, sizeof(struct jmp), 1, fj);
    (void) fwrite((char *)&dx[ix].offset, sizeof(dx[ix].offset), 1, fj);
}

```

Page 4 of nwsubr.c

Tabelle 2A

PRO	XXXXXXXXXXXXXXXXXX	(Länge = 15 Aminosäuren)
Vergleichsprotein	XXXXXXYYYYYYYY	(Länge = 12 Aminosäuren)

% Aminosäuresequenzidentität =

(die Anzahl identisch übereinstimmender Aminosäurereste zwischen den zwei Polypeptidsequenzen wie durch ALIGN-2 bestimmt) dividiert durch (die Gesamtzahl an Aminosäureresten des PRO-Polypeptids) =

5 dividiert durch 15 = 33,3

Tabelle 2B

PRO	XXXXXXXXXX	(Länge = 10 Aminosäuren)
Vergleichsprotein	XXXXXYYYYYYZZYZ	(Länge = 15 Aminosäuren)

% Aminosäuresequenzidentität =

(die Anzahl identisch übereinstimmender Aminosäurereste zwischen den zwei Polypeptidsequenzen wie durch ALIGN-2 bestimmt) dividiert durch (die Gesamtzahl an Aminosäureresten des PRO-Polypeptids) = 5 dividiert durch 10 = 50 %

Tabelle 2C

PRO-DNA	NNNNNNNNNNNNNN	(Länge = 14 Nucleotide)
Vergleichs-DNA	NNNNNNLLLLLLLLLL	(Länge = 16 Nucleotide)

% Nucleinsäuresequenzidentität =

(die Anzahl identisch übereinstimmender Nucleotide zwischen den zwei Nucleinsäuresequenzen wie durch ALIGN-2 bestimmt) dividiert durch (die Gesamtzahl an Nucleotiden der PRO-DNA-Nucleinsäuresequenz) = 6 dividiert durch 14 = 42,9 %

Tabelle 2D

PRO-DNA	NNNNNNNNNNNNNN	(Länge = 12 Nucleotide)
Vergleichs-DNA	NNNNLLLLV	(Länge = 9 Nucleotide)

% Nucleinsäuresequenzidentität =

(die Anzahl identisch übereinstimmender Nucleotide zwischen den zwei Nucleinsäuresequenzen wie durch ALIGN-2 bestimmt) dividiert durch (die Gesamtzahl an Nucleotiden der PRO-DNA-Nucleinsäuresequenz) = 4 dividiert durch 12 = 33,3 %

**[0022]** „Prozent- (%) Aminosäuresequenzidentität“ in Bezug auf die hierin identifizierten PRO320-Polypeptidsequenzen ist als der Prozentsatz an Aminosäureresten in einer Kandidatensequenz definiert, die mit den Aminosäureresten in einer PRO320-Sequenz nach Abgleichen der Sequenzen und Einführen von Lücken, sofern zur Erreichung maximaler prozentueller Sequenzidentität erforderlich, und ohne Berücksichtigung irgendwelcher konservativer Substitutionen als Teil der Sequenzidentität identisch sind. Abgleichen zum Zwecke der Bestimmung der prozentuellen Aminosäuresequenzidentität kann auf verschiedene Arten erreicht werden, die innerhalb des Gebiets der Erfindung liegen, beispielsweise unter Verwendung von allgemein erhältlichen Computerprogrammen wie z.B. BLAST-, BLAST-2-, ALIGN-, ALIGN-2- oder Megalign-Software (DNASTAR). Fachleute können geeignete Parameter zur Messung von Abgleichung bestimmen, einschließlich sämtlicher Algorithmen, die erforderlich sind, um maximale Abgleichung über die volle Länge der zu vergleichenden Sequenzen zu erreichen. Für die vorliegenden Zwecke jedoch werden % Aminosäuresequenzidentitätswerte unter Verwendung des Computerprogramms zum Sequenzvergleich ALIGN-2 wie nachstehend beschrieben erhalten, worin der vollständige Quellcode für das ALIGN-2-Programm in Tabelle 1 bereitgestellt ist. Das ALIGN-2-Computerprogramm zum Sequenzvergleich wurde von Genentech, Inc., entworfen, und der in der nachstehenden Tabelle 1 gezeigte Quellcode wurde mit Benutzerunterlagen im U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559, eingereicht, wo er unter der U.S.-Copyright-Registrierungsnummer TXU510087 registriert ist. Das ALIGN-2-Programm ist über Genentech, Inc., South San Francisco, Kalifornien, öffentlich erhältlich oder kann aus dem in der nachstehenden Tabelle 1 bereitgestellten Quellcode kompiliert werden. Das ALIGN-2-Programm sollte zur Verwendung auf einem UNIX-Betriebssystem, vorzugsweise digital UNIX V4.0D, kompiliert werden. Alle Sequenzvergleichsparameter sind durch das ALIGN-2-Programm festgesetzt und variieren nicht.

**[0023]** Für die vorliegenden Zwecke wird die % Aminosäuresequenzidentität einer bestimmten Aminosäuresequenz A zu, mit oder gegen eine bestimmte Aminosäuresequenz B (was alternativ auch als eine bestimmte Aminosäuresequenz A beschrieben werden kann, die eine bestimmte % Aminosäuresequenzidentität zu, mit oder gegen eine bestimmte Aminosäuresequenz B hat oder umfasst) wie folgt berechnet:  
100 mal den Bruch X/Y

worin X die Anzahl an Aminosäureresten ist, die durch das Sequenzabgleichungsprogramm ALIGN-2 in dieser Abgleichung des Programms von A und B als identische Übereinstimmungen verzeichnet wurden, und Y die Gesamtanzahl an Aminosäureresten in B ist. Es wird verstanden werden, dass, sofern die Länge der Aminosäuresequenz A mit der Länge der Aminosäuresequenz B nicht übereinstimmt, die % Aminosäuresequenzidentität von A zu B nicht gleich der % Aminosäuresequenzidentität von B zu A ist. Als Beispiele für % Aminosäuresequenzidentitäts-Berechnungen zeigen Tabelle 2A und 2B, wie die % Aminosäuresequenzidentität der Aminosäuresequenz, die als „Vergleichsprotein“ bezeichnet wird, zur Aminosäuresequenz, die als „PRO“ bezeichnet wird, berechnet wird.

**[0024]** Außer spezifisch anders festgehalten, werden alle hierin verwendeten % Aminosäuresequenzidentitätswerte wie oben beschrieben unter Verwendung des ALIGN-2-Computerprogramms erhalten. % Aminosäuresequenzidentitätswerte können jedoch auch unter Verwendung des Sequenzvergleichsprogramms NCBI-BLAST2 (Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25, 3389-3402 (1997)) bestimmt werden. Das NCBI-BLAST2-Sequenzvergleichsprogramm kann von der Adresse <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> heruntergeladen werden. NCBI-BLAST2 verwendet mehrere Suchparameter, worin alle diese Suchparameter auf Standardwerte eingestellt sind, einschließlich beispielsweise unmask = yes, strand = all, expected occurrences = 10, minimum low complexity length = 15/5, multi-pass e-value = 0,01, constant for multi-pass = 25, dropoff for final gapped alignment = 25 und scoring matrix = BLOSUM62.

**[0025]** In Situationen, in denen NCBI-BLAST2 für Aminosäuresequenzvergleiche verwendet wird, wird die % Aminosäuresequenzidentität einer bestimmten Aminosäuresequenz A zu, mit oder gegen eine bestimmte Aminosäuresequenz B (was alternativ auch als eine bestimmte Aminosäuresequenz A beschrieben werden kann, die eine bestimmte % Aminosäuresequenzidentität zu, mit oder gegen eine bestimmte Aminosäuresequenz B hat oder umfasst) wie folgt berechnet:

100 mal den Bruch  $X/Y$

worin X für die Anzahl an Aminosäureresten steht, die als identische Übereinstimmungen des Sequenzabgleichungsprogramms NCBI-BLAST2 in der Programmabgleichung von A und B verzeichnet werden, und worin Y für die Gesamtzahl an Aminosäureresten in B steht. Es wird verständlich sein, dass, sofern die Länge von Aminosäuresequenz A nicht der Länge von Aminosäuresequenz B entspricht, die % Aminosäuresequenzidentität von A zu B nicht gleich der % Aminosäuresequenzidentität von B zu A ist.

**[0026]** Zusätzlich dazu kann die % Aminosäuresequenzidentität auch unter Verwendung des WU-BLAST-2-Computerprogramms bestimmt werden (Altschul et al., Methods in Enzymology 266, 460-480 (1996)). Die meisten der WU-BLAST-2-Suchparameter sind voreingestellte Werte. Jene, die keine voreingestellten Werte sind, d.h. einstellbare Parameter, werden mit den folgenden Werten gesetzt: overlap span = 1, overlap fraction = 0,125, word threshold (T) = 11 und scoring matrix = BLOSUM62. Für die Zwecke hierin wird ein %-Aminosäuresequenzidentitätswert bestimmt, indem (a) die Anzahl an übereinstimmenden identischen Aminosäureresten zwischen der Aminosäuresequenz des PRO-Polypeptids von Interesse mit einer Sequenz, die von nativem PRO-Polypeptid abgeleitet ist, und der Vergleichsaminosäuresequenz von Interesse (d.h. der Sequenz, mit der das PRO-Polypeptid von Interesse verglichen wird, das eine PRO-Polypeptidvariante sein kann), wie durch WU-BLAST-2 bestimmt, durch (b) die Gesamtzahl der Aminosäurereste des PRO-Polypeptids von Interesse dividiert wird. Beispielsweise bedeutet in der Aussage „ein Polypeptid, umfassend eine Aminosäuresequenz A, die zumindest 80 % Aminosäuresequenzidentität mit der Aminosäuresequenz B aufweist“, dass die Aminosäuresequenz A die Vergleichsaminosäuresequenz von Interesse und die Aminosäuresequenz B die Aminosäuresequenz des PRO-Polypeptids von Interesse ist.

**[0027]** „Isoliert“, sofern verwendet, um die verschiedenen, hierin offenbarten Polypeptide zu beschreiben, bezeichnet ein Polypeptid, das identifiziert und getrennt und/oder aus einer Komponente aus seiner natürlichen Umgebung gewonnen wurde. Vorzugsweise ist das isolierte Polypeptid frei von Verbindungen mit sämtlichen Komponenten, mit denen es in der Natur assoziiert ist. Verunreinigende Komponenten seiner natürlichen Umgebung sind Materialien, die typischerweise diagnostische oder therapeutische Verwendungen für das Polypeptid stören würden, und können Enzyme, Hormone und andere proteinartige oder nicht-proteinartige Gelöststoffe einbinden. In bevorzugten Ausführungsformen wird das Polypeptid (1) bis zu einem ausreichenden Grad durch Verwendung eines Zentrifugenröhrchensequenzierers gereinigt, um zumindest 15 Reste von N-terminaler oder innerer Aminosäuresequenz zu erhalten, oder (2) durch SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden oder reduzierenden Bedingungen mittels Coomassie-Blau- oder, vorzugsweise, Silberfärbung bis zur Homogenität gereinigt. Isoliertes Polypeptid schließt Polypeptid in situ innerhalb rekombinanter Zellen ein, da zumindest eine Komponente der natürlichen Umgebung von PRO320 nicht vorhanden ist. Üblicherweise wird isoliertes Polypeptid durch zumindest einen Reinigungsschritt hergestellt.

**[0028]** Die Bezeichnung „Antikörper“ wird im weitesten Sinn verwendet und deckt insbesondere beispielsweise einzelne monoklonale Anti-PRO320-Antikörper (einschließlich Agonisten-Antikörper), Anti-PRO320-Antikörperzusammensetzungen mit polyepitopischer Spezifität, einkettige Anti-PRO320-Antikörper und Fragmente von Anti-PRO320-Antikörpern ab (siehe unten). Die Bezeichnung „monoklonaler Antikörper“ wie hierin verwendet bezieht sich auf einen Antikörper, der aus einer Population von im Wesentlichen homogenen Antikörpern gewonnen wurde, d.h. dass die einzelnen Antikörper, aus denen die Population besteht, identisch sind, unter Ausnahme möglicher, natürlich vorkommender Mutationen, die in geringen Mengen vorhanden sein können.

**[0029]** Die Bezeichnung „epitopmarkiert“, wenn hierin verwendet, bezieht sich auf ein Hybridpolypeptid, das ein an ein „Markierungs-Polypeptid“ fusioniertes PRO320-Polypeptid umfasst. Das Markierungs-Polypeptid weist genug Reste auf, um ein Epitop bereitzustellen, gegen das ein Antikörper hergestellt werden kann, ist jedoch auch ausreichend kurz, dass es die Aktivität des Polypeptids, an das es fusioniert ist, nicht stört. Das Markierungs-Polypeptid ist vorzugsweise auch eher einmalig, sodass der Antikörper mit anderen Epitopen im Wesentlichen nicht kreuzreagiert. Geeignete Markierungs-Polypeptide haben im Allgemeinen zumindest sechs Aminosäurenreste und üblicherweise zwischen etwa 8 und 50 Aminosäurereste (vorzugsweise zwischen etwa 10 und 20 Aminosäurereste).

**[0030]** Wie hierin verwendet bezieht sich die Bezeichnung „Immunoadhäsion“ auf antikörperähnliche Moleküle, die die Bindungsspezifität eines heterologen Proteins (eines „Adhäsins“) mit den Effektorfunktionen von konstanten Immunglobulin-domänen kombinieren. Strukturell gesehen umfassen die Immunoadhäsine eine Fusion zwischen einer Aminosäuresequenz mit der erwünschten Bindungsspezifität, die sich von der Antigenerkennungs- und -bindungsstelle eines Antikörpers unterscheidet (d.h. „heterolog“ ist), und einer Immunglobulin-Konstantdomänensequenz. Der Adhäsinteil eines Immunoadhäsinsmoleküls ist typischerweise eine zusammenhängende Aminosäuresequenz, die zumindest die Bindungsstelle eines Rezeptors oder eines Liganden umfasst. Die Immunglobulin-Konstantdomänensequenz im Immunoadhäsion kann aus einem Immunglobulin wie z.B. IgG-1-, IgG-2-, IgG-3- oder IgG-4-Subtypen, IgA (einschließlich IgA-1 und IgA-2), IgE, IgD oder IgM erhalten werden.

**[0031]** „Aktiv“ oder „Aktivität“ für die Zwecke hierin bezieht sich auf Form(en) von PRO320, das/die eine biologische und/oder eine immunologische Aktivität von nativem oder natürlich auftretendem PRO320 in sich trägt/tragen, worin sich „biologische“ Aktivität auf eine biologische Funktion (entweder inhibitorisch oder stimulatorisch) bezieht, die durch ein natives oder natürlich vorkommendes PRO320 verursacht wird und nicht die Fähigkeit ist, die Produktion eines Antikörpers gegen ein antigenes Epitop zu induzieren, das von einem nativen oder natürlich vorkommenden PRO320 aufgewiesen wird, und eine „immunologische“ Aktivität bezieht sich auf die Fähigkeit, die Produktion eines Antikörpers gegen ein antigenes Epitop zu induzieren, das von einem nativen oder natürlich vorkommenden PRO320 aufgewiesen wird.

**[0032]** Die Bezeichnung „biologische Aktivität“ im Zusammenhang mit einem Antikörper oder einem anderen Agonisten, der durch die hierin offenbarten Screeningverfahren identifiziert werden kann (z.B. ein organisches oder anorganisches kleines Molekül, Peptid usw.), wird verwendet, um auf die Fähigkeit solcher Moleküle Bezug zu nehmen, eine oder mehrere der hierin in Verbindung mit der Definition einer „therapeutisch wirksamen Menge“ genannten Wirkungen hervorzurufen. In einer spezifischen Ausführungsform ist „biologische Aktivität“ die Fähigkeit, neoplastisches Zellwachstum oder Proliferation zu inhibieren. Eine bevorzugte biologische Aktivität ist Inhibierung, einschließlich Verlangsamung oder vollkommener Arretierung, des Wachstums einer Target-Tumor-(z.B. Krebs-)Zelle. Eine andere bevorzugte biologische Aktivität ist zytotaxische Aktivität, die zum Tod der Target-Tumor-(z.B. Krebs-)Zelle führt. Wiederum eine andere bevorzugte biologische Aktivität ist die Induktion von Apoptose einer Target-Tumor-(z.B. Krebs-)Zelle.

**[0033]** Die Bezeichnung „immunologische Aktivität“ bezieht sich auf immunologische Kreuzreaktivität mit zumindest einem Epitop eines PRO320-Polypeptids.

**[0034]** „Immunologische Kreuzreaktivität“, wie hierin verwendet, bedeutet, dass das Kandidaten-Polypeptid in der Lage ist, auf kompetitive Weise die qualitative biologische Aktivität eines PRO320-Polypeptids zu inhibieren, das diese Aktivität mit polyklonalen Antiseren, die gegen das bekannte aktive PRO320-Polypeptid gezüchtet werden, aufweist. Solche Antiseren werden auf herkömmliche Weise durch subkutanen Injizieren des bekannten aktiven Analogons in komplettem Freundschem Adjuvans beispielsweise in Ziegen oder Kaninchen, gefolgt von einer intraperitonealen oder subkutanen Booster-Injektion in inkomplettem Freundschem Adjuvans, gebildet. Die immunologische Kreuzreaktivität ist vorzugsweise „spezifisch“, was bedeutet, dass die Bindungsaffinität des identifizierten, immunologisch kreuzreaktiven Moleküls (z.B. Antikörpers) gegenüber



dem entsprechenden PRO320-Polypeptid signifikant höher (vorzugsweise zumindest etwa zweimal, noch bevorzugter zumindest etwa viermal, noch bevorzugter zumindest etwa sechsmal, am meisten bevorzugt zumindest etwa achtmal, höher) als die Bindungsaffinität dieses Moleküls zu jedem anderen bekannten, nativen Polypeptid ist.

**[0035]** „Tumor“, wie hierin verwendet, bezieht sich auf jegliches neoplastisches Wachstum und jegliche Proliferation, unabhängig davon, ob maligne oder benigne, und alle vorkarzinomatösen und karzinomatösen Zellen und Gewebe.

**[0036]** Die Bezeichnungen „Krebs“ und „karzinomatös“ beziehen sich auf oder beschreiben das physiologische Leiden in Säugetieren, das typischerweise durch ungeregeltes Zellwachstum charakterisiert ist. Beispiele für Krebs umfassen, sind jedoch nicht beschränkt auf, Karzinom, Lymphom, Blastom, Sarkom und Leukämie. Spezifischere Beispiele für solche Krebsarten umfassen Brustkrebs, Prostatakrebs, Kolonkrebs, Plattenepithelkarzinom, kleinzelliges Lungenkarzinom, nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom, Ovarialkarzinom, Zervixkarzinom, Magen-Darm-Krebs, Bauchspeicheldrüsenkrebs, Glioblastom, Leberkrebs, Blasenkrebs, Hepatom, Kolorektalkarzinom, Endometriumkarzinom, Speicheldrüsenkarzinom, Nierenkrebs, Vulvakarzinom, Schilddrüsenkrebs, Hepakarzinom und verschiedene Typen von Kopf- und Halskrebs.

**[0037]** „Behandlung“ ist eine Maßnahme, die mit der Intention gesetzt wird, die Entwicklung oder Veränderung der Pathologie einer Erkrankung zu unterbinden. Folglich bezieht sich „Behandlung“ sowohl auf therapeutische Behandlung als auch auf prophylaktische oder präventive Maßnahmen. Jene, die einer Behandlung bedürfen, umfassen sowohl jene, die bereits an der Erkrankung leiden, als auch jene, in denen es die Erkrankung zu unterbinden gilt. Im Fall einer Tumor-(z.B. Krebs-)Behandlung kann ein therapeutisches Mittel die Pathologie von Tumorzellen direkt reduzieren oder die Tumorzellen für eine Behandlung durch andere therapeutische Mittel, z.B. durch Strahlen- und/oder Chemotherapie, empfänglicher machen.

**[0038]** Die „Pathologie“ oder das „Krankheitsbild“ von Krebs umfasst sämtliche Phänomene, die das Wohlbefinden des Patienten beeinträchtigen. Dies umfasst, ohne Einschränkung, anormales oder unkontrollierbares Zellwachstum, Metastasenbildung, Störung der normalen Funktion benachbarter Zellen, Freisetzung von Zytokinen oder anderen Sekretionsprodukten in anormalen Konzentrationen, Suppression oder Verschlimmerung von entzündlichen oder immunologischen Reaktionen und dergleichen.

**[0039]** Eine „wirksame Menge“ eines hierin offenbarten Polypeptids oder eines Agonisten davon in Bezug auf die Inhibierung von neoplastischem Zellwachstum ist eine Menge, die in der Lage ist, das Wachstum von Target-Zellen in einem gewissen Ausmaß zu inhibieren. Die Bezeichnung umfasst eine Menge, die in der Lage ist, eine wachstumshemmende, zytostatische und/oder zytotoxische Wirkung und/oder Apoptose der Target-Zellen hervorzurufen. Eine „wirksame Menge“ eines PRO320-Polypeptids oder eines Agonisten davon für die Zwecke der Inhibierung von neoplastischem Zellwachstum kann empirisch und routinemäßig bestimmt werden.

**[0040]** Eine „therapeutisch wirksame Menge“ in Bezug auf die Behandlung von Tumor bezieht sich auf eine Menge, die in der Lage ist, eine oder mehrere der folgenden Wirkungen hervorzurufen: (1) Inhibierung von Tumorwachstum in einem gewissen Ausmaß, einschließlich Verlangsamung und vollständige Arretierung von Tumorwachstum; (2) Reduktion der Anzahl an Tumorzellen; (3) Reduktion der Tumorgroße; (4) Inhibierung (d.h. Reduktion, Verlangsamung oder vollständiges Anhalten) von Tumorzellinfiltration in periphere Organe; (5) Inhibierung (d.h. Reduktion, Verlangsamung oder vollständiges Anhalten) von Metastasenbildung; (6) Förderung der Anti-Tumor-Immunantwort, die zur Regression oder Abstoßung des Tumors führen kann, jedoch nicht muss; und/oder (7) Erleichterung in einem gewissen Ausmaß von einem oder mehreren Symptomen, die mit der Erkrankung assoziiert sind. Eine „therapeutisch wirksame Menge“ eines PRO320-Polypeptids oder eines Agonisten davon kann für die Zwecke einer Tumorbehandlung empirisch und routinemäßig bestimmt werden.

**[0041]** Eine „wachstumshemmende Menge“ eines PRO320-Polypeptids oder eines Agonisten davon ist eine Menge, die in der Lage ist, das Wachstum einer Zelle, insbesondere eines Tumors, z.B. einer Krebszelle, entweder in vitro oder in vivo, zu inhibieren. Eine „wachstumshemmende Menge“ eines PRO320-Polypeptids oder eines Agonisten davon kann zur Inhibierung von neoplastischem Zellwachstum empirisch und routinemäßig bestimmt werden.

**[0042]** Eine „zytotoxische Menge“ eines PRO320-Polypeptids oder eines Agonisten davon ist eine Menge, die in der Lage ist, die Zerstörung einer Zelle, insbesondere einer Tumor-, z.B. Krebs-, Zelle, entweder in vitro oder in vivo, zu verursachen. Eine „zytotoxische Menge“ eines PRO320-Polypeptids oder eines Agonisten davon

kann zur Inhibierung von neoplastischem Zellwachstum empirisch und routinemäßig bestimmt werden.

**[0043]** Die Bezeichnung „zytotoxisches Mittel“ wie hierin verwendet bezieht sich auf eine Substanz, die die Funktion von Zellen inhibiert oder unterbindet und/oder die Zerstörung von Zellen verursacht. Die Bezeichnung soll radioaktive Isotope (z.B.  $I^{131}$ ,  $I^{125}$ ,  $Y^{90}$  und  $Re^{186}$ ), chemotherapeutische Mittel und Toxine wie z.B. enzymatisch aktive Toxine, die aus Bakterien, Pilzen, Pflanzen oder Tieren stammen, oder Fragmente davon umfassen.

**[0044]** Ein „chemotherapeutisches Mittel“ ist eine chemische Verbindung, die bei der Behandlung von Tumoren, z.B. Krebs, nützlich ist. Beispiele für chemotherapeutische Mittel umfassen Adriamycin, Doxorubicin, Epirubicin, 5-Fluoruracil, Cytosinarabinosid („Ara-C“), Cyclophosphamid, Thiotepa, Busulfan, Cytosin, Taxoide, z.B. Paclitaxel (Taxol, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ) und Doxetaxel (Taxotere, Rhône-Poulenc Rorer, Antony, France), Taxotere, Methotrexat, Cisplatin, Melphalan, Vinblastin, Bleomycin, Etoposid, Ifosfamid, Mitomycin C, Mitoxantron, Vincristin, Vinorelbin, Carboplatin, Teniposid, Daunomycin, Carminomycin, Aminopterin, Dactinomycin, Mitomycin, Esperamicin (siehe US-Patent Nr. 4.675.187), Melphalan und andere verwandte Stickstofflos. Ebenfalls in diese Definition eingebunden sind hormonelle Mittel, die durch Regulieren oder Inhibieren von Hormonwirkung auf Tumoren wirken, wie z.B. Tamoxifen und Onapriston.

**[0045]** Ein „wachstumshemmendes Mittel“ bezieht sich bei Verwendung hierin auf eine Verbindung oder Zusammensetzung, die das Wachstum einer Zelle, insbesondere Tumor-, z.B. Krebs-, Zelle, entweder in vitro oder in vivo inhibiert. Demnach ist das wachstumshemmende Mittel eines, das den prozentuellen Anteil der Target-Zellen in S-Phase signifikant vermindert. Beispiele wachstumshemmender Mittel umfassen Mittel, die die Zellzyklusprogression (an einer Stelle, die nicht die S-Phase ist) blockieren, wie z.B. Mittel, die die G1-Arretierung und M-Phasen-Arretierung auslösen. Klassische M-Phasen-Blocker umfassen Vincas- (Vincristin- und Vinblastin-), Taxol- und Topo-II-Inhibitoren, wie z.B. Doxorubicin, Epirubicin, Daunorubicin, Etoposid und Bleomycin. Jene Mittel, die G1 arretieren, greifen auch auf die S-Phasen-Arretierung über, beispielsweise DNA-alkylierende Mittel, wie z.B. Tamoxifen, Prednison, Dacarbazin, Mechlorethamin, Cisplatin, Methotrexat, 5-Fluoruracil und Ara-C. Weitere Informationen finden sich in *The Molecular Basis of Cancer*, Mendelsohn & Israel (Hrsg.), Kapitel 1, mit dem Titel „Cell cycle regulation, oncogens, and antineoplastic drugs“ von Murakami et al., WB Saunders, Philadelphia (1995), insbesondere S. 13.

**[0046]** Die Bezeichnung „Cytokin“ ist ein allgemeiner Ausdruck für Proteine, die von einer Zellpopulation freigesetzt werden, die auf eine andere Zelle als intrazelluläre Vermittler wirken. Beispiele derartiger Cytokine sind Lymphokine, Monokine und herkömmliche Polypeptidhormone. Zu den Cytokinen gehören Wachstumshormon, wie z.B. menschliches Wachstumshormon, menschliches N-Methionyl-Wachstumshormon und Rinderwachstumshormon; Parathormon; Thyroxin; Insulin; Proinsulin; Relaxin; Prorelaxin; Glykoproteinhormone, wie z.B. follikelstimulierendes Hormon (FSH), thyroidstimulierendes Hormon (TSH) und luteinisierendes Hormon (LH); Leberwachstumsfaktor; Fibroblastenwachstumsfaktor; Prolactin; Plazentalaktogen; Tumornekrosefaktor- $\alpha$  und - $\beta$ ; Müller-Inhibierungs-Substanz; Maus-Gonadotropin-assoziiertes Peptid; Inhibin; Activin; Gefäßendothelwachstumsfaktor; Integrin; Thrombopoietin (TPO); Nervenwachstumsfaktoren, wie z.B. NGF- $\beta$ ; Blutplättchenwachstumsfaktor; transformierende Wachstumsfaktoren (TGFs), wie z.B. TGF- $\alpha$  und TGF- $\beta$ ; Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor-I und -II; Erythropoietin (EPO); osteoinduktive Faktoren; Interferone, wie z.B. Interferon- $\alpha$ , - $\beta$  und - $\gamma$ ; koloniestimulierende Faktoren (CSFs), wie z.B. Makrophagen-CSF (M-CSF); Granulozyten-Makrophagen-CSF (GM-CSF); und Granulozyten-CSF (G-CSF); Interleukine (ILs), wie z.B. IL-1, IL-1 $\alpha$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12; ein Tumornekrosefaktor, wie z.B. TNF- $\alpha$  oder TNF- $\beta$ ; und andere Polypeptidfaktoren, einschließlich LIF und kit-Ligand (KL). Wie hierin verwendet, umfasst der Ausdruck Cytokin Proteine aus natürlichen Quellen oder aus rekombinanter Zellkultur und biologisch aktive Entsprechungen der Cytokine nativer Sequenz.

**[0047]** Die Bezeichnung „Prodrug“ wie in dieser Anmeldung verwendet bezieht sich auf eine Vorläufer- oder Derivatform einer pharmazeutisch aktiven Substanz, die weniger zytotoxisch gegenüber Tumorzellen ist als der verwandte Wirkstoff und in der Lage ist, enzymatisch aktiviert oder zur aktiveren verwandten Form umgesetzt zu werden. Siehe z.B. Wilman, „Prodrugs in Cancer Chemotherapy“, *Biochemical Society Transactions* 14, 375-382, 615<sup>th</sup> Meeting Belfast (1986), und Stella et al., „Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery“, *Directed Drug Delivery*, Borchardt et al. (Hrsg.), Humana Press, 247-267 (1985). Die Prodrugs dieser Erfindung umfassen, sind jedoch nicht beschränkt auf, phosphathaltige Prodrugs, thiophosphathaltige Prodrugs, glykosylierte Prodrugs und gegebenenfalls substituiertes Phenylacetamid enthaltende Prodrugs, 5-Fluorcytosin- und andere 5-Fluoruridin-Prodrugs, die zu einer Prodrug-Form zur Verwendung in dieser Erfindung derivatisiert werden können; Beispiele hierfür umfassen jene chemotherapeutischen Mittel, die zuvor beschrieben wurden, sind jedoch nicht beschränkt darauf.

**[0048]** Die Bezeichnung „Agonist“ umfasst insbesondere Agonisten-Antikörper oder Agonisten-Fragmente, Fragmente oder Aminosäuresequenzvarianten von nativen PRO320-Polypeptiden, Peptide, kleine organische Moleküle und dergleichen. Verfahren zur Identifikation von Agonisten eines PRO320-Polypeptids können das Kontaktieren einer Tumorzelle mit einem Kandidaten-Agonisten und das Messen der Inhibierung von Tumorzellwachstum umfassen.

**[0049]** „Chronische“ Verabreichung bezieht sich im Gegensatz zu einem akuten Modus auf die Verabreichung des Mittels/der Mittel auf kontinuierliche Weise, um die anfängliche therapeutische Wirkung (Aktivität) über eine längere Zeitspanne aufrechtzuerhalten. „Diskontinuierliche“ Verabreichung ist eine Behandlung, die nicht in Serie ohne Unterbrechung erfolgt, sondern eher auf zyklische Weise durchgeführt wird.

**[0050]** „Säugetier“ für die Zwecke der Behandlung bezieht sich auf jedes beliebige Tier, das als Säugetier klassifiziert ist, einschließlich Mensch, Nutz- und Zuchttiere, Zoo-, Sport- und Haustiere, wie beispielsweise Hunde, Katzen, Rinder, Pferde, Schafe, Schweine, Ziegen, Kaninchen usw. Vorzugsweise ist das Säugetier ein Mensch.

**[0051]** Verabreichung „in Kombination mit“ einem oder mehreren therapeutischen Mitteln schließt simultane (gleichzeitige) und aufeinander folgende Verabreichung in jeder beliebigen Reihenfolge ein.

**[0052]** „Träger“ wie hierin verwendet schließen pharmazeutisch annehmbare Träger, Exzipienten oder Stabilisatoren ein, die gegenüber der Zelle oder dem Säugetier, die/das ihnen ausgesetzt wird, bei den verwendeten Dosierungen und Konzentrationen nichttoxisch sind. Häufig ist der physiologisch annehmbare Träger eine wässrige, pH-gepufferte Lösung. Beispiele für physiologisch annehmbare Träger umfassen Puffer wie z.B. Phosphat, Citrat und andere organische Säuren; Antioxidanzien einschließlich Ascorbinsäure; niedermolekulares Polypeptid (mit weniger als etwa 10 Resten); Proteine, wie z.B. Serumalbumin, Gelatine oder Immunglobuline; hydrophile Polymere wie z.B. Polyvinylpyrrolidon; Aminosäuren wie z.B. Glycin, Glutamin, Asparagin, Arginin oder Lysin; Monosaccharide, Disaccharide und andere Kohlenhydrate einschließlich Glucose, Manno- se oder Dextrine; Chelatbildner wie z.B. EDTA; Zuckeralkohole wie z.B. Mannit oder Sorbit; salzbildende Gegenionen wie z.B. Natrium; und/oder nichtionische Tenside wie z.B. TWEEN<sup>TM</sup>, Polyethylenglykol (PEG) und PLURONICS<sup>TM</sup>.

**[0053]** „Native Antikörper“ und „native Immunglobuline“ sind üblicherweise heterotetramere Glykoproteine mit etwa 150.000 Da, zusammengesetzt aus zwei identischen leichten (L) und zwei identischen schweren (H) Ketten. Jede leichte Kette ist an eine schwere Kette über eine kovalente Disulfidbindung gebunden, während die Anzahl der Disulfidbindungen unter den schweren Ketten verschiedener Immunglobulinisotypen variiert. Jede schwere und leichte Kette weist auch regelmäßig beabstandete Disulfidbrücken innerhalb der Ketten auf. Jede schwere Kette weist an einem Ende eine variable Domäne ( $V_H$ ) auf, der zahlreiche konstante Domänen folgen. Jede leichte Kette weist eine variable Domäne ( $V_L$ ) an einem Ende und eine konstante Domäne an ihrem anderen Ende auf; die konstante Domäne der leichten Kette ist mit der ersten konstanten Domäne der schweren Kette abgeglichen, und die variable Leichtkettendomäne ist mit der variablen Domäne der schweren Kette abgeglichen. Von bestimmten Aminosäureresten wird angenommen, dass sie eine Grenzfläche zwischen den variablen Domänen der leichten Kette und der schweren Kette bilden.

**[0054]** Die Bezeichnung „variabel“ bezieht sich auf die Tatsache, dass sich bestimmte Abschnitte der variablen Domänen unter den Antikörpern bezüglich ihrer Sequenz stark unterscheiden und bei Bindung und Spezifität von jedem bestimmten Antikörper für sein bestimmtes Antigen verwendet werden. Die Variabilität ist jedoch in den variablen Domänen von Antikörpern nicht gleichmäßig verteilt. Sie ist in drei Segmenten, die als komplementaritätsbestimmende Regionen (CDRs) bezeichnet werden, oder hypervariablen Regionen, sowohl in den variablen Leichtketten- als auch Schwereketten, konzentriert vorhanden. Die höher konservierten Abschnitte variabler Domänen werden als Gerüstregionen (FR) bezeichnet. Die variablen Domänen von nativen Schwer- und Leichtketten umfassen jeweils vier FR-Regionen, die weitgehend eine  $\beta$ -Faltblattkonfiguration annehmen, die über drei CDRs verbunden ist, die wiederum Schleifen bilden, die die  $\beta$ -Faltblattstruktur verbinden und in manchen Fällen einen Teil davon darstellen. Die CDRs in jeder Kette werden durch die FR in großer Nähe zusammengehalten und tragen gemeinsam mit den CDRs der anderen Kette zur Bildung der Antigen-Bindungsstelle von Antikörpern bei (siehe Kabat et al., NIH Publ. Nr. 91-3242, Bd. I, 647-669 (1991)). Die konstanten Domänen sind nicht direkt in die Bindung eines Antikörpers an ein Antigen eingebunden, tragen jedoch verschiedene Effektorfunktionen, wie die Teilnahme des Antikörpers an Antikörperabhängiger zellulärer Toxizität.

**[0055]** Die Bezeichnung „hypervariable Region“, wenn hierin verwendet, bezieht sich auf die Aminosäureres-

te eines Antikörpers, der für Antigen-Bindung verantwortlich ist. Die hypervariable Region umfasst Aminosäurereste aus einer „komplementaritätsbestimmenden Region“ oder „CDR“ (d.h. Reste 24-34 (L1), 50-56 (L2) und 89-97 (L3) in der variablen Leichtkettendomäne und 31-35 (H1), 50-65 (H2) und 95-102 (H3) in der variablen Schwereketten-domäne; Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5. Auflage, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)) und/oder Reste aus einer „hypervariablen Schleife“ (d.h. Reste 26-32 (L1), 50-52 (L2) und 91-96 (L3) in der variablen Leichtkettendomäne und 26-32 (H1), 53-55 (H2) und 96-101 (H3) in der variablen Schwereketten-domäne; Chothia & Lesk, J. Mol. Biol. 196, 901-917 (1987)). „Gerüst“- oder „FR“-Reste sind jene Reste der variablen Domäne, die nicht die Reste der hypervariablen Region wie hierin definiert sind.

**[0056]** „Antikörperfragmente“ umfassen einen Teil eines intakten Antikörpers, vorzugsweise die Antigen-Bindungs- oder variable Region des intakten Antikörpers. Beispiele für Antikörperfragmente umfassen Fab-, Fab'-, F(ab')<sub>2</sub>- und Fv-Fragmente; Diabodies; lineare Antikörper (Zapata et al., Protein Eng. 8(10), 1057-1062 (1995)); einkettige Antikörpermoleküle; und multispezifische Antikörper, die aus Antikörperfragmenten gebildet werden.

**[0057]** Papainverdau von Antikörpern produziert zwei identische Antigenbindungsfragmente, genannt „Fab“-Fragmente, jeweils mit einer einzelnen Antigen-Bindungsstelle und einem verbleibenden „Fc“-Fragment, eine Bezeichnung, die die Fähigkeit widerspiegelt, leicht zu kristallisieren. Pepsinbehandlung ergibt ein F(ab')<sub>2</sub>-Fragment, das zwei Antigen-kombinierende Stellen aufweist und dennoch zur Vernetzung von Antigen in der Lage ist.

**[0058]** „Fv“ ist das minimale Antikörperfragment, das eine vollständige Antigenerkennungs- und -bindungsstelle aufweist. Diese Region besteht aus einem Dimer einer variablen Schwer- und einer variablen Leichtketten-domäne in enger, nicht-kovalenter Assoziation. In dieser Konfiguration erfolgt eine Wechselwirkung zwischen den drei CDRs jeder variablen Domäne zur Definition einer Antigen-Bindungsstelle an der Oberfläche des V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>-Dimers. Gemeinsam verleihen die sechs CDRs dem Antikörper Antigen-Bindungsspezifität. Jedoch weist sogar eine einzelne variable Domäne (oder die Hälfte eines Fv, das nur drei CDRs umfasst, die für ein Antigen spezifisch sind) die Fähigkeit auf, Antigen zu erkennen und zu binden, dies jedoch bei einer geringeren Affinität als die gesamte Bindungsstelle.

**[0059]** Das Fab-Fragment enthält auch die konstante Domäne der leichten Kette und die erste konstante Domäne (CH1) der schweren Kette. Fab-Fragmente unterscheiden sich von Fab'-Fragmenten durch die Addition einiger weniger Reste am Carboxy-Terminus der Schwereketten-CH1-Domäne, einschließlich eines oder mehrerer Cysteine aus der Antikörper-Gelenksregion. Fab'-SH ist hierin die Bezeichnung für Fab', in dem der/die Cysteinrest(e) der konstanten Domänen eine freie Thiolgruppe aufweist/aufweisen. F(ab')<sub>2</sub>-Antikörperfragmente wurden ursprünglich als Paare von Fab'-Fragmenten produziert, die Gelenks-Cysteine zwischen sich aufwiesen. Auch andere chemische Bindungen sind für Antikörperfragmente bekannt.

**[0060]** Die „leichten Ketten“ von Antikörpern (Immunglobulinen) aus jeder beliebigen Wirbeltierspezies können einem von zwei eindeutig unterscheidbaren Typen, genannt kappa und lambda, basierend auf den Aminosäuresequenzen ihrer konstanten Domänen zugeordnet werden.

**[0061]** Je nach Aminosäuresequenz der konstanten Domäne ihrer schweren Ketten können Immunglobuline verschiedenen Klassen zugeordnet werden. Es gibt fünf Hauptklassen von Immunglobulinen: IgA, IgD, IgE, IgG und IgM, und mehrere von diesen können weiters in Unterklassen (Isotypen) unterteilt werden, z.B.: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA und IgA2.

**[0062]** Die Bezeichnung „monoklonaler Antikörper“ wie hierin verwendet bezieht sich auf einen Antikörper, der aus einer Population von im Wesentlichen homogenen Antikörpern gewonnen wurde, d.h. dass die einzelnen Antikörper, aus denen die Population besteht, identisch sind, unter Ausnahme möglicher, natürlich vorkommender Mutationen, die in geringen Mengen vorhanden sein können. Monoklonale Antikörper sind hochspezifisch, da sie gegen eine einzige antigene Stelle gerichtet sind. Darüber hinaus ist, im Gegensatz zu herkömmlichen (polyklonalen) Antikörperpräparaten, die typischerweise verschiedene Antikörper umfassen, die gegen verschiedene Determinanten (Epitope) gerichtet sind, jeder monoklonale Antikörper gegen eine einzige Determinante am Antigen gerichtet. Zusätzlich zu ihrer Spezifität weisen die monoklonalen Antikörper darin einen Vorteil auf, dass sie durch die Hybridomkultur synthetisiert werden, unkontaminiert von anderen Immunglobulinen. Das Adjektiv „monoklonal“ beschreibt die Eigenschaft des Antikörpers, aus einer im Wesentlichen homogenen Population von Antikörpern gewonnen worden zu sein, und ist nicht als ein Erfordernis zu verstehen, den Antikörper mittels eines bestimmten Verfahrens herzustellen. Beispielsweise können die monoklonalen Antikörper, die gemäß der vorliegenden Erfindung zu verwenden sind, mittels des Hybridomverfahrens her-

gestellt werden, das als erstes von Kohler et al., Nature 256, 495 (1975), beschrieben wurde, oder sie können durch DNA-Rekombinationsverfahren hergestellt werden (siehe z.B. das US-Patent Nr. 4.816.567). Die „monoklonalen Antikörper“ können auch unter Verwendung der beispielsweise in Clackson et al., Nature 352, 624-628 (1991), und Marks et al., J. Mol. Biol. 222, 581-597 (1991), beschriebenen Verfahren aus Phagenantikörper-Bibliotheken isoliert werden.

**[0063]** Die monoklonalen Antikörper hierin umfassen insbesondere „chimäre“ Antikörper (Immunglobuline), in denen ein Teil der schweren und/oder leichten Ketten mit den entsprechenden Sequenzen in Antikörpern, die von einer bestimmten Spezies abstammen oder zu einer bestimmten Antikörperklasse oder -subklasse gehören, identisch oder zu diesen homolog sind, während der Rest der Kette(n) mit den entsprechenden Sequenzen in Antikörpern, die von einer anderen Spezies abgeleitet sind oder zu einer anderen Antikörperklasse oder -subklasse gehören, identisch oder zu diesen homolog sind, sowie Fragmente solcher Antikörper, solange sie die erwünschte biologische Aktivität aufweisen (US-Patent Nr. 4.816.567; Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 6851-6855 (1984)).

**[0064]** „Humanisierte“ Formen von nicht-menschlichen (z.B. Maus-) Antikörpern sind chimäre Immunglobuline, Immunglobulinketten oder Fragmente davon (wie z.B. Fv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> oder andere Antigen-bindende Subsequenzen von Antikörpern), die eine Minimalsequenz enthalten, die von nicht-menschlichem Immunglobulin abstammt. Im Großteil der Fälle sind humanisierte Antikörper menschliche Immunglobuline (Rezipienten-Antikörper), in denen Reste aus einer CDR des Rezipienten durch Reste aus einer CDR einer nicht-menschlichen Spezies (Donor-Antikörper) wie z.B. Maus, Ratte oder Kaninchen mit der erwünschten Spezifität, Affinität und Kapazität ersetzt werden. In manchen Fällen werden Fv-FR-Reste des menschlichen Immunglobulins durch entsprechende nicht-menschliche Reste ersetzt. Darüber hinaus können humanisierte Antikörper Reste umfassen, die weder im Rezipientenantikörper noch in den importierten CDR- oder Gerüstsequenzen zu finden sind. Diese Modifikationen werden vollzogen, um Antikörperleistung weiter zu verfeinern und optimieren. Im Allgemeinen umfasst der humanisierte Antikörper im Wesentlichen alle von zumindest einer, vorzugsweise zwei, variablen Domäne(n), in der/denen alle oder im Wesentlichen alle der CDR-Regionen jenen eines nicht-menschlichen Immunglobulins entsprechen und alle oder im Wesentlichen alle der FR-Regionen jene einer menschlichen Immunglobulinsequenz sind. Der humanisierte Antikörper umfasst im Optimalfall auch zumindest einen Teil einer konstanten Immunglobulinregion (Fc), typischerweise jenen eines menschlichen Immunglobulins. Nähere Details sind in Jones et al., Nature 321, 522-525 (1986); Reichmann et al., Nature 332, 323-329 (1988); und Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2, 593-596 (1992), zu finden. Der humanisierte Antikörper umfasst einen PRIMATIZED™-Antikörper, worin die Antigen-Bindungsregion des Antikörpers aus einem Antikörper stammt, der durch Immunisieren von Makaken mit dem Antigen von Interesse produziert wird.

**[0065]** „Einkettige Fv“- oder „sFv“-Antikörperfragmente umfassen die V<sub>H</sub>- und V<sub>L</sub>-Domänen des Antikörpers, worin diese Domänen in einer einzigen Polypeptidkette vorhanden sind. Vorzugsweise umfasst das Fv-Polypeptid weiters einen Polypeptidlinker zwischen den V<sub>H</sub>- und V<sub>L</sub>-Domänen, was dem sFv die Möglichkeit gibt, die erwünschte Struktur für Antigenbindung zu bilden. Einen Überblick zum Thema sFv liefert Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, Bd. 113, Rosenberg & Moore (Hrsg.), Springer-Verlag, New York, 269-315 (1994).

**[0066]** Die Bezeichnung „Diabodies“ bezieht sich auf kleine Antikörperfragmente mit zwei Antigen-Bindungsstellen, worin die Fragmente eine variable Schwereketten-domäne (V<sub>H</sub>) verbunden mit einer variablen Leichtketten-domäne (V<sub>L</sub>) in derselben Polypeptidkette (V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>) umfassen. Unter Verwendung eines Linkers, der zu kurz ist, um Paarung zwischen den zwei Domänen an derselben Kette zu ermöglichen, werden die Domänen gezwungen, mit den komplementären Domänen einer anderen Kette Paare zu bilden und zwei Antigen-Bindungsstellen zu schaffen. Diabodies werden ausführlicher beispielsweise in der EP 404.097; der WO 93/11161; und in Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 6444-6448 (1993), beschrieben.

**[0067]** Ein „isolierter“ Antikörper ist einer, der identifiziert und aus einer Komponente seiner natürlichen Umgebung getrennt und/oder gewonnen wurde. Verunreinigende Komponenten seiner natürlichen Umgebung sind Materialien, die diagnostische oder therapeutische Verwendungen für den Antikörper stören würden und können Enzyme, Hormone und andere proteinhaltige oder nicht-proteinhaltige Gelöststoffe einbinden. In bevorzugten Ausführungsformen wird der Antikörper (1) zu einer Reinheit von über 95 Gew.-% des Antikörpers, bestimmt durch das Lowry-Verfahren, und am meisten bevorzugt zu einer Reinheit von über 99 Gew.-%, (2) zu einem ausreichenden Grad, um zumindest 15 Reste von N-terminaler oder innerer Aminosäuresequenz mittels eines Zentrifugenröhrchensequenzierers zu erhalten, oder (3) bis zur Homogenität mittels SDS-PAGE unter reduzierenden oder nichtreduzierenden Bedingungen mittels Coomassie-Blau- oder, vorzugsweise, Sil-

berfärbung gereinigt. Isolierter Antikörper schließt den Antikörper in situ innerhalb rekombinanter Zellen ein, da zumindest eine Komponente der natürlichen Umgebung des Antikörpers nicht vorhanden ist. Üblicherweise wird ein isolierter Antikörper jedoch durch zumindest einen Reinigungsschritt hergestellt.

**[0068]** Das Wort „Markierung“, sofern hierin verwendet, bezieht sich auf eine nachweisbare Verbindung oder Zusammensetzung, die direkt oder indirekt an den Antikörper konjugiert ist, um einen „markierten“ Antikörper zu bilden. Die Markierung kann durch sich selbst nachweisbar sein (z.B. Radioisotopmarkierungen oder fluoreszierende Markierungen) oder kann, im Fall einer enzymatischen Markierung, chemische Änderung einer Substratverbindung oder -zusammensetzung katalysieren, die wiederum nachweisbar ist. Die Markierung kann auch eine nicht-detektierbare Gruppierung sein, wie beispielsweise ein Toxin.

**[0069]** Unter „Festphase“ wird eine nichtwässrige Matrix verstanden, an die der Antikörper der vorliegenden Erfindung anhaften kann. Beispiele für Festphasen, die hierzu gehören, schließen jene ein, die teilweise oder vollständig aus Glas (z.B. Controlled Pore Glass), Polysacchariden (z.B. Agarose), Polyacrylamiden, Polystyrol, Polyvinylalkohol und Silikonen gebildet sind. In bestimmten Ausführungsformen, je nach Kontext, kann die Festphase den Well einer Testplatte umfassen, in anderen ist sie eine Reinigungssäule (z.B. eine Affinitätschromatographiesäule). Diese Bezeichnung umfasst auch eine diskontinuierliche Festphase aus einzelnen Teilchen, wie z.B. jene, die um US-Patent Nr. 4.275.149 beschrieben werden.

**[0070]** Ein „Liposom“ ist ein kleines Vesikel, das sich aus verschiedenen Typen an Lipiden, Phospholipiden und/oder Tensid zusammensetzt und zur Zufuhr eines Wirkstoffs (wie z.B. eines PRO320-Polypeptids oder Antikörpers dazu) zu einem Säugetier nützlich ist. Die Komponenten des Liposoms sind üblicherweise in einer zweischichtigen Formation angeordnet, ähnlich der Lipidanordnung biologischer Membranen.

**[0071]** Ein „kleines Molekül“ ist hierin als ein Molekül definiert, das ein Molekulargewicht von unter etwa 500 Da aufweist.

## II. Zusammensetzungen und Verfahren

### A. Volllängen-PRO320-Polypeptid

**[0072]** Die vorliegende Erfindung stellt neu identifizierte und isolierte Nucleotidsequenzen bereit, die für Polypeptide kodieren, die in der vorliegenden Anmeldung als PRO320 bezeichnet werden. Insbesondere wurden cDNAs, die für das PRO320-Polypeptid kodieren, identifiziert und isoliert, wie näher in den nachstehenden Beispielen offenbart wird.

**[0073]** Wie in den Beispielen nachstehend offenbart, wurden cDNA-Klone, die für PRO320-Polypeptid kodieren, bei der ATCC hinterlegt. Die tatsächlichen Nucleotidsequenzen dieser Klone können von Fachleuten durch Sequenzieren der hinterlegten Klone mittels Verfahren, die auf dem Gebiet der Erfindung Standard sind, leicht bestimmt werden. Die vorhergesagte Aminosäuresequenz kann aus den Nucleotidsequenzen mittels Standardverfahren bestimmt werden. Für das hierin beschriebene PRO320-Polypeptide und die dafür kodierende Nucleinsäure konnten die Anmelder das identifizieren, was als der Leseraster angenommen wird, wie er am besten mit der zu dem Zeitpunkt zur Verfügung stehenden Sequenzinformation identifizierbar war.

### B. PRO320-Polypeptidvarianten

**[0074]** Zusätzlich zu dem hierin beschriebenen Volllängen-Nativsequenz-PRO320-Polypeptid wird erwogen, dass PRO320-Varianten hergestellt werden können. PRO320-Varianten können durch Einführen geeigneter Nucleotidänderungen in die PRO320-DNA und/oder durch Synthese des erwünschten PRO320-Polypeptids hergestellt werden. Fachleuten wird bekannt sein, dass Aminosäureänderungen posttranslationale Prozesse des PRO320 verändern können, beispielsweise Änderung der Anzahl oder Position von Glykosylierungsstellen oder Ändern der Membranverankerungseigenschaften.

**[0075]** Variationen im nativen Volllängensequenz-PRO320 oder in verschiedenen Domänen des hierin beschriebenen PRO320 können gemacht werden, beispielsweise unter Verwendung aller Verfahren und Richtlinien für konservative und nicht-konservative Mutationen, die beispielsweise im US-Patent Nr. 5.364.934 beschrieben werden. Variationen können eine Substitution, Deletion oder Insertion von einem oder mehreren Codons sein, die für das PRO320 kodieren, die im Vergleich mit dem Nativsequenz-PRO320 zu einer Änderung der Aminosäuresequenz des PRO320 führen. Gegebenenfalls erfolgt diese Variation durch Substitution von zumindest einer Aminosäure mit jeder anderen Aminosäure in einer oder mehreren Domänen des PRO320.

Hilfestellung bei der Bestimmung, welcher Aminosäurerest insertiert, substituiert oder deletiert werden kann, ohne die erwünschte Aktivität negativ zu beeinflussen, kann durch Vergleichen der Sequenz des PRO320 mit jener von homologen bekannten Proteinmolekülen und durch Minimieren der Anzahl an Aminosäuresequenzänderungen in Regionen hoher Homologie gefunden werden. Aminosäuresubstitutionen können durch Ersetzen einer Aminosäure durch eine andere Aminosäure mit ähnlichen strukturellen und/oder chemischen Eigenschaften, beispielsweise durch Ersetzen eines Leucins mit einem Serin, d.h. durch konservative Aminosäureersetzungen, entstehen. Insertionen oder Deletionen können gegebenenfalls im Bereich von etwa 1 bis 5 Aminosäuren liegen. Die zugelassene Variation kann durch systematisches Durchführen von Insertionen, Deletionen oder Substitutionen von Aminosäuren in die Sequenz und Testen der resultierenden Varianten auf Aktivität, die die Vollängen- oder reife native Sequenz zeigt, bestimmt werden.

**[0076]** PRO320-Polypeptidfragmente werden hierin bereitgestellt. Solche Fragmente können am N-Terminus oder C-Terminus trunziert sein, oder ihnen können, beispielsweise im Vergleich zu einem Vollängennativprotein, innen gelegene Reste fehlen.

**[0077]** Bestimmten Fragmenten fehlen Aminosäurereste, die für eine erwünschte biologische Aktivität des PRO320-Polypeptids nicht essenziell sind.

**[0078]** PRO320-Fragmente können durch jede beliebige Anzahl an herkömmlichen Verfahren hergestellt werden. Erwünschte Peptidfragmente können chemisch synthetisiert werden. Ein alternativer Ansatz umfasst die Bildung von PRO320-Fragmenten durch enzymatischen Verdau, z.B. durch Behandlung des Proteins mit einem Enzym, das bekannt dafür ist, Proteine an Stellen zu spalten, die durch bestimmte Aminosäurereste definiert sind, oder durch Verdau der DNA mit geeigneten Restriktionsenzymen und Isolieren des erwünschten Fragments. Wiederum ein anderes, nützliches Verfahren umfasst das Isolieren und Amplifizieren eines DNA-Fragments, das für ein erwünschtes Polypeptidfragment kodiert, durch Polymerasekettenreaktion (PCR). Oligonucleotide, die die erwünschten Termini des DNA-Fragments definieren, werden an den 5'- und 3'-Primern in der PCR verwendet. Vorzugsweise teilen PRO320-Polypeptidfragmente zumindest eine biologische und/oder immunologische Aktivität mit dem nativen, in [Fig. 2](#) gezeigten PRO320-Polypeptid (Seq.-ID Nr. 2).

**[0079]** In besonderen Ausführungsformen sind konservative Substitutionen in Tabelle 3 unter der Überschrift „Bevorzugte Substitutionen“ gezeigt. Resultieren solche Substitutionen in einer Veränderung der biologischen Aktivität, so werden substanziellere Veränderungen, die in Tabelle 3 als „Beispielhafte Substitutionen“ bezeichnet sind oder wie nachstehend unter Verweis auf Aminosäureklassen noch näher beschrieben wird, eingeführt und die Produkte gescreent.

Ursprünglicher <u>Rest</u>	Beispielhafte <u>Substitutionen</u>	Bevorzugte <u>Substitutionen</u>
Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; lys; arg	gln
Asp (D)	glu	glu
Cys (C)	ser	ser
Gln (Q)	asn	asn
Glu (E)	asp	asp
Gly (G)	pro; ala	ala
His (H)	asn; gln; lys; arg	arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; Norleucin	leu
Leu (L)	Norleucin; ile; val; met; ala; phe	ile
Lys (K)	arg; gln; asn	arg
Met (M)	leu; phe; ile	leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	leu
Pro (P)	ala	ala
Ser (S)	thr	thr
Thr (T)	ser	ser
Trp (W)	tyr; phe	tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; Norleucin	leu

**[0080]** Wesentliche Modifikationen in Funktion oder immunologischer Identität des PRO320-Polypeptids erfolgen durch Selektieren von Substitutionen, die sich in ihrer Wirkung auf die Aufrechterhaltung (a) der Struktur der Polypeptidhauptkette im Bereich der Substitution, beispielsweise in Form einer Faltblatt- oder Helixkonformation, (b) der Ladung oder Hydrophobizität des Moleküls an der Target-Stelle oder (c) des Volumens der Seitenkette signifikant unterscheiden. Natürlich vorkommende Reste werden auf Grundlage gemeinsamer Seitenketteneigenschaften in die folgenden Gruppen aufgeteilt:

- (1) hydrophob: Norleucin, met, ala, val, leu, ile;
- (2) neutral hydrophil: cys, ser, thr;
- (3) sauer: asp, glu;
- (4) basisch: asn, gln, his, lys, arg;
- (5) Reste, die Kettenausrichtung beeinflussen: gly, pro; und
- (6) aromatisch: trp, tyr, phe.

**[0081]** Nicht-konservative Substitutionen erfordern den Austausch eines Mitglieds einer dieser Klassen gegen eine andere Klasse. Solche substituierten Reste können auch in die konservativen Substitutionsstellen oder, noch bevorzugter, in die verbleibenden (nicht-konservierten) Stellen eingeführt werden.



**[0082]** Die Variationen können unter Verwendung von auf dem Gebiet der Erfindung bekannten Verfahren, wie beispielsweise Oligonucleotid-vermittelte (ortsgerichtete) Mutagenese, Alaninscanning und PCR-Mutagenese, gebildet werden. Ortsgerichtete Mutagenese [Carter et al., Nucl. Acids Res. 13, 4331 (1986); Zoller et al., Nucl. Acids Res. 10, 6487 (1987)], Kassettenmutagenese [Wells et al., Gene 34, 315 (1985)], Restriktionsselektionsmutagenese [Wells et al., Philos. Trans. R. Soc. London SerA 317, 415 (1986)] oder andere bekannte Verfahren können an der klonierten DNA durchgeführt werden, um die PRO320-DNA-Variante zu bilden.

**[0083]** Scanning-Aminosäureanalyse kann auch verwendet werden, um eine oder mehrere Aminosäuren gemeinsam mit einer zusammenhängenden Sequenz zu identifizieren. Zu den bevorzugten Scanning-Aminosäuren zählen relativ kleine, neutrale Aminosäuren. Solche Aminosäuren schließen Alanin, Glycin, Serin und Cystein ein. Alanin ist typischerweise eine bevorzugte Scanning-Aminosäure in dieser Gruppe, da es die Seitenkette über den beta-Kohlenstoff hinaus eliminiert und weniger wahrscheinlich die Hauptkettenkonformation der Variante verändert [Cunningham & Wells, Science 244, 1081-1085 (1989)]. Typischerweise wird ebenso Alanin bevorzugt, da es die häufigste Aminosäure ist. Weiters wird es häufig sowohl an verborgenen als auch an freiliegenden Positionen gefunden [Creighton, The Proteins (W.H. Freeman & Co., N.Y.); Chothia, J. Mol. Biol. 150, 1 (1976)]. Ergibt Alaninsubstitution keine adäquaten Mengen an Varianten, so kann eine isoterische Aminosäure verwendet werden.

#### C. Modifikationen von PRO320

**[0084]** Kovalente Modifikationen von PRO320 sind in den Schutzzumfang dieser Erfindung eingebunden. Ein Typ von kovalenter Modifikation umfasst das Umsetzen gerichteter Aminosäurereste eines PRO320-Polypeptids mit einem organischen derivatisierenden Mittel, das in der Lage ist, mit ausgewählten Seitenketten oder den N- oder C-terminalen Resten des PRO320 zu reagieren. Derivatisierung mit bifunktionellen Mitteln ist nützlich, beispielsweise zum Vernetzen von PRO320 mit einer wasserunlöslichen Trägermatrix oder -oberfläche zur Verwendung im Verfahren zur Reinigung von Anti-PRO320-Antikörpern und umgekehrt. Üblicherweise verwendete Vernetzer umfassen z.B. 1,1-Bis(diazoacetyl)-2-phenylethan, Glutaraldehyd, N-Hydroxysuccinimidester, beispielsweise Ester mit 4-Azidosalicylsäure, homobifunktionelle Imidoester, einschließlich Disuccinimidylester, wie z.B. 3,3'-Dithiobis(succinimidylpropionat), bifunktionelle Maleinimide, wie z.B. Bis-N-maleinimido-1,8-octan, und Mittel wie z.B. Methyl-3-[(p-azidophenyl)dithio]propioimidat.

**[0085]** Andere Modifikationen umfassen Deamidierung von Glutaminyl- und Asparaginylnresten zu den entsprechenden Glutamyl- bzw. Aspartylresten, Hydroxylierung von Prolin und Lysin, Phosphorylierung von Hydroxygruppen von Seryl- oder Threonylnresten, Methylierung der  $\alpha$ -Aminogruppen von Lysin-, Arginin- und Histidin-Seitenketten [T.E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W.H. Freeman & Co., San Francisco, 79-86 (1983)], Acetylierung des N-terminalen Amins und Amidierung jeder beliebigen C-terminalen Carboxygruppe.

**[0086]** Eine andere Art kovalenter Modifikation des PRO320-Polypeptids, die in den Schutzzumfang dieser Erfindung fällt, umfasst das Ändern des nativen Glykosylierungsmusters des Polypeptids. „Ändern des nativen Glykosylierungsmusters“ bedeutet für die vorliegenden Zwecke die Deletion von einer oder mehreren Kohlenhydratgruppierungen, die in Nativsequenz-PRO320 zu finden sind (entweder durch Entfernen der zugrundeliegenden Glykosylierungsstelle oder durch Deletion der Glykosylierung durch chemische und/oder enzymatische Mittel), und/oder das Addieren einer oder mehrerer Glykosylierungsstellen, die im Nativsequenz-PRO320 nicht zu finden sind. Darüber hinaus bindet diese Bezeichnung auch qualitative Änderungen an der Glykosylierung der nativen Proteine ein, einschließlich einer Änderung der Beschaffenheit und der Anteile der verschiedenen vorhandenen Kohlenhydratgruppierungen.

**[0087]** Das Hinzufügen von Glykosylierungsstellen zum PRO320-Polypeptid kann durch Ändern der Aminosäuresequenz erfolgen. Die Änderung kann beispielsweise durch die Addition von oder die Substitution durch einen oder mehrere Serin- oder Threoninreste zum oder am Nativsequenz-PRO320 (für O-gebundene Glykosylierungsstellen) durchgeführt werden. Die PRO320-Aminosäuresequenz kann gegebenenfalls durch Änderungen auf DNA-Niveau geändert werden, insbesondere durch Mutation der DNA, die für das PRO320-Polypeptid kodiert, an präselektierten Basen, sodass Codons gebildet werden, die zu den erwünschten Aminosäuren translatieren.

**[0088]** Ein anderes Mittel zur Steigerung der Anzahl an Kohlenhydratgruppierungen am PRO320-Polypeptid ist chemisches oder enzymatisches Binden von Glykosiden an das Polypeptid. Solche Verfahren werden auf dem Gebiet der Erfindung, z.B. in der WO 87/05330, veröffentlicht am 11. September 1987, und in Aplin & Wriston, CRC Crit. Rev. Biochem., 259-306 (1981), beschrieben.

**[0089]** Das Entfernen von Kohlenhydratgruppierungen, die am PRO320-Polypeptid vorhanden sind, kann chemisch oder enzymatisch oder durch Mutationssubstitutionen von Codons, die für Aminosäurereste kodieren, die als Targets für Glykosylierung dienen, durchgeführt werden. Chemische Deglykosylierungsverfahren sind auf dem Gebiet der Erfindung bekannt und werden beispielsweise von Hakimuddin et al., Arch. Biochem. Biophys. 259, 52 (1987), und von Edge et al., Anal. Biochem. 118, 131 (1981), beschrieben. Enzymatische Spaltung von Kohlenhydratgruppierungen an Polypeptiden kann durch die Verwendung einer Vielzahl an Endo- und Exo-Glykosidasen erreicht werden, wie von Thotakura et al. in: Meth. Enzymol. 138, 350 (1987), beschrieben wird.

**[0090]** Eine andere Art von kovalenter Modifikation von PRO320 umfasst das Binden des PRO320-Polypeptids an eines einer Vielzahl nicht-proteinhaltiger Polymere, z.B. Polyethylenglykol (PEG), Polypropylenglykol oder Polyoxyalkylene, auf die Art und Weise, die in den US-Patenten Nr. 4.640.835; 4.496.689; 4.301.144; 4.670.417; 4.791.192 oder 4.179.337 beschrieben wird.

**[0091]** Das PRO320-Polypeptid der vorliegenden Erfindung kann auch auf eine Weise modifiziert werden, dass ein Hybridmolekül gebildet wird, das PRO320, fusioniert an ein anderes, heterologes Polypeptid oder eine andere, heterologe Aminosäuresequenz, umfasst.

**[0092]** In einer Ausführungsform umfasst solch ein Hybridmolekül eine Fusion des PRO320-Polypeptid mit einem Markierungspolypeptid, das ein Epitop bereitstellt, an das sich ein Anti-Markierungs-Antikörper selektiv binden kann. Die Epitopmarkierung wird im Allgemeinen an den Amino- oder Carboxyterminus des PRO320-Polypeptids platziert. Die Gegenwart solcher Epitop-markierten Formen des PRO320-Polypeptids kann unter Verwendung eines Antikörpers gegen das Markierungs-Polypeptid nachgewiesen werden. Die Bereitstellung der Epitopmarkierung ermöglicht es somit auch, dass das PRO320-Polypeptid leicht mittels Affinitätsreinigung unter Verwendung eines Anti-Markierungs-Antikörpers oder eines anderen Typs von Affinitätsmatrize, die sich an die Epitopmarkierung bindet, gereinigt werden kann. Verschiedene Markierungspolypeptide und ihre jeweiligen Antikörper sind auf dem Gebiet der Erfindung bekannt. Beispiele umfassen Poly-Histidin-(poly-his-) oder Poly-Histidin-Glycin-(poly-his-gly-)Markierungen; das flu-HA-Markierungspolypeptid und seinen Antikörper 12CA5 [Field et al., Mol. Cell. Biol. 8, 2159-2165 (1988)]; die c-myc-Markierung und die Antikörper 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 und 9E10 hierzu [Evan et al., Molecular and Cellular Biology 5, 3610-3616 (1985)]; und die Herpes-Simplex-Virus-Glykoprotein-D-(-gD-)Markierung und ihren Antikörper [Paborsky et al., Protein Engineering 3(6), 547-553 (1990)]. Andere Markierungspolypeptide umfassen das Flag-Peptid [Hopp et al., BioTechnology 6, 1204-1210 (1988)]; das KT3-Epitoppeptid [Martin et al., Science 255, 192-194 (1992)]; ein  $\alpha$ -Tubulinepitoppeptid [Skinner et al., J. Biol. Chem. 266, 15163-15166 (1991)]; und die T7-Gen-10-Proteinpeptidmarkierung [Lutz-Freyermuth et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 6393-6397 (1990)].

**[0093]** In einer alternativen Ausführungsform kann das Hybridmolekül eine Fusion des PRO320-Polypeptids mit einem Immunglobulin oder einer bestimmten Region eines Immunglobulins umfassen. Für eine zweiwertige Form des Hybridmoleküls (auch als ein „Immunoadhäsion“ bezeichnet) könnte solch eine Fusion zur Fc-Region eines IgG-Moleküls gebildet sein. Die Ig-Fusionen umfassen vorzugsweise die Substitution einer löslichen Form (deletierte oder inaktivierte Transmembrandomäne) eines PRO320-Polypeptids anstelle von zumindest einer variablen Region innerhalb eines Ig-Moleküls. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform umfasst die Immunglobulininfusion die Gelenks-, CH2- und CH3- oder die Gelenks-, CH1-, CH2- und CH3-Regionen eines IgG1-Moleküls. Für weitere Information zur Herstellung von Immunglobulininfusionen siehe auch US-Patent Nr. 5.428.130, ausgegeben am 27. Juni 1995.

#### D. Herstellung von PRO320

**[0094]** Die nachstehende Beschreibung betrifft vorrangig die Herstellung von PRO320 durch Kultivieren von Zellen, die mit einem PRO320-Nucleinsäure-hältigen Vektor transformiert oder transfiziert sind. Natürlich wird erwogen, dass alternative Verfahren, die auf dem Gebiet der Erfindung bekannt sind, zur Herstellung von PRO320 verwendet werden können. Beispielsweise kann die PRO320-Polypeptidsequenz oder Teile davon durch direkte Peptidsynthese unter Verwendung von Festphasenverfahren hergestellt werden [siehe z.B. Stewart et al., Solid-Phase Peptide Synthesis, W.H. Freeman Co., San Francisco, CA (1969); Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85, 2149-2154 (1963)]. In-vitro-Proteinsynthese kann unter Verwendung manueller oder automatisierter Verfahren durchgeführt werden. Automatisierte Synthese kann beispielsweise unter Verwendung eines Applied Biosystems Peptide Synthesizer (Foster City, CA) gemäß den Anweisungen des Herstellers erfolgen. Verschiedene Teile des PRO320-Polypeptids können separat chemisch synthetisiert und mittels chemischer oder enzymatischer Verfahren kombiniert werden, um das Vollängen-PRO320-Polypeptid zu bilden.

## 1. Isolation von für PRO320 kodierender DNA

**[0095]** DNA, die für PRO320 kodiert, kann aus einer cDNA-Bibliothek gewonnen werden, die aus Gewebe hergestellt wird, von dem angenommen wird, dass es die PRO320-mRNA aufweist und diese auf einem nachweisbaren Niveau exprimiert. Demgemäß kann menschliche PRO320-DNA leicht aus einer cDNA-Bibliothek gewonnen werden, die aus menschlichem Gewebe hergestellt wird, wie es auch in den Beispielen beschrieben ist. Das für PRO320 kodierende Gen kann auch aus einer genomischen Bibliothek oder mittels bekannter Syntheseverfahren (z.B. automatisierter Nucleinsäuresynthese) gewonnen werden.

**[0096]** Bibliotheken können mit Sonden (wie Antikörpern gegen das PRO320 oder Oligonucleotide mit zumindest etwa 20-80 Basen) gescreent werden, deren Zweck es ist, das Gen von Interesse oder das durch dieses Gen kodierte Protein zu identifizieren. Screening der cDNA- oder der genomischen Bibliothek mit der ausgewählten Sonde kann unter Verwendung von Standardverfahren durchgeführt werden, die z.B. in Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)), beschrieben sind. Ein alternatives Mittel zum Isolieren des für PRO320 kodierenden Gens ist die Verwendung der PCR-Methode [Sambrook et al., s.o.; Dieffenbach et al., *PCR Primer: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press (1995))].

**[0097]** Die nachstehenden Beispiele beschreiben Verfahren zum Screenen einer cDNA-Bibliothek. Die als Sonden ausgewählten Oligonucleotidsequenzen sollten eine ausreichende Länge aufweisen und ausreichend eindeutig sein, sodass falsche Positive minimiert werden. Das Oligonucleotid ist vorzugsweise so markiert, dass es durch Hybridisierung an DNA in der zu screenenden Bibliothek nachgewiesen werden kann. Markierungsverfahren sind auf dem Gebiet der Erfindung bekannt und umfassen die Verwendung von radioaktiven Markierungen wie z.B. von  $^{32}\text{P}$ -markiertem ATP, Biotinylierung oder Enzymmarkierung. Hybridisierungsbedingungen, einschließlich moderater Stringenz und hoher Stringenz, sind in Sambrook et al., s.o., beschrieben.

**[0098]** Sequenzen, die in solchen Bibliotheks-Screening-Verfahren identifiziert werden, können mit anderen bekannten Sequenzen, die in öffentlichen Datenbanken wie z.B. GenBank oder anderen privaten Sequenzdatenbanken hinterlegt und zugänglich sind, verglichen und abgeglichen werden. Sequenzidentität (entweder auf Niveau der Aminosäuren oder der Nucleotide) innerhalb definierter Regionen des Moleküls oder über die gesamte Vollängensequenz hinweg kann mittels auf dem Gebiet bekannter Verfahren und wie hierin beschrieben bestimmt werden.

**[0099]** Nucleinsäure mit Protein-kodierender Sequenz kann durch Screenen ausgewählter cDNA- oder genomischer Bibliotheken unter Verwendung der hierin zum ersten Mal offenbaren, abgeleiteten Aminosäuresequenz und, sofern erforderlich, unter Verwendung herkömmlicher Primerextensionsverfahren wie in Sambrook et al., s.o., beschrieben, um Vorläufer und Verarbeitungs-Zwischenprodukte von mRNA zu detektieren, die eventuell nicht in cDNA revers-transkribiert worden sind, gewonnen werden.

## 2. Selektion und Transformation von Wirtszellen

**[0100]** Wirtszellen werden mit Expressions- oder Kloniervektoren, die hierin zur PRO320-Produktion beschrieben werden, transfiziert oder transformiert und in herkömmlichem Nährmedium kultiviert, das zum Induzieren von Promotoren, zur Selektion von Transformanten oder Amplifikation der Gene, die für die erwünschten Sequenzen kodieren, geeignet modifiziert ist. Die Kulturbedingungen, wie z.B. Medium, Temperatur, pH und dergleichen, können von Fachleuten ohne übermäßiges Experimentieren ausgewählt werden. Im Allgemeinen können Prinzipien, Arbeitsvorschriften und praktische Techniken zur Maximierung der Produktivität von Zellkulturen in *Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach*, M. Butler (Hrsg.), IRL Press (1991), und in Sambrook et al., s.o., gefunden werden.

**[0101]** Verfahren zur eukaryotischen Zelltransfektion und prokaryotischen Zelltransformation sind durchschnittlichen Fachleuten bekannt, z.B.  $\text{CaCl}_2$ -Verfahren,  $\text{CaPO}_4$ -Verfahren, Liposom-vermitteltes Verfahren und Elektroporation. Je nach verwendeten Wirtszellen erfolgt die Transformation unter Verwendung von Standardverfahren, die für die entsprechenden Zellen geeignet sind. Die Calciumbehandlung mittels Calciumchlorid, wie in Sambrook et al., s.o., beschrieben, oder Elektroporation wird im Allgemeinen für Prokaryoten verwendet. Infektion mit *Agrobacterium tumefaciens* wird zur Transformation bestimmter Pflanzenzellen verwendet, wie Shaw et al., *Gene* 23, 315 (1983), und die WO 89/05859, veröffentlicht am 29. Juni 1989, beschreiben. Für Säugetierzellen ohne solche Zellwände kann das Calciumphosphat-Präzipitationsverfahren von Graham & van der Eb, *Virology* 52, 456-457 (1978), verwendet werden. Allgemeine Aspekte von Säugetierzellen-Wirtssystemtransfektionen werden im US-Patent Nr. 4.399.216 beschrieben. Transformationen in Hefe werden ty-

pischerweise gemäß dem Verfahren von Van Solingen et al., J. Bact. 130, 946 (1977), und Hsiao et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 76, 3829 (1979), durchgeführt. Es können jedoch auch andere Verfahren zum Einführen von DNA in Zellen, wie beispielsweise Kernmikroinjektion, Elektroporation, bakterielle Protoplastenfusion mit intakten Zellen, oder Polykationen, z.B. Polybren, Polyornithin, verwendet werden. Für verschiedene Verfahren zur Transformation von Säugetierzellen siehe Keown et al., Methods in Enzymology 185, 527-537 (1990), und Mansour et al., Nature 336, 348-352 (1988).

**[0102]** Geeignete Wirtszellen zum Klonieren oder Exprimieren der DNA in die bzw. den Vektoren hierin schließen Prokaryoten-, Hefe- oder höhere Eukaryotenzellen ein. Geeignete Prokaryoten umfassen, sind jedoch nicht beschränkt auf, Eubakterien, wie z.B. gram-negative oder gram-positive Organismen, beispielsweise Enterobacteriaceae wie z.B. *E. coli*. Verschiedene *E.-coli*-Stämme sind öffentlich erhältlich, wie z.B. *E.-coli*-K12-Stamm MM294 (ATCC 31.446); *E. coli* X1776 (ATCC 31.537); *E.-coli*-Stamm W3110 (ATCC 27.325) und K5 772 (ATCC 53.635). Andere geeignete prokaryotische Wirtszellen umfassen Enterobacteriaceae wie *Escherichia*, z.B. *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, z.B. *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, z.B. *Serratia marcescens*, und *Shigella* sowie Bacilli wie z.B. *B. subtilis* und *B. licheniformis* (z.B. *B. licheniformis* 41P, offenbart in DD 266.710, veröffentlicht am 12. April 1989), *Pseudomonas*, wie z.B. *P. aeruginosa*, und *Streptomyces*. Diese Beispiele stellen eine Veranschaulichung und keine Einschränkung dar. Stamm W3110 ist ein besonders bevorzugter Wirt oder Ausgangswirt, da er ein üblicher Wirtstamm für Fermentationen von Rekombinations-DNA-Produkten ist. Vorzugsweise sekretiert die Wirtszelle minimale Mengen an proteolytischen Enzymen. Beispielsweise kann Stamm W3110 modifiziert werden, um in den Genen, die für die zum Wirt endogenen Proteine kodieren, eine genetische Mutation zu bewirken, wobei Beispiele für solche Wirte *E. coli*-W3110-Stamm 1A2, der den vollständigen Genotyp *tonA* aufweist; *E.-coli*-W3110-Stamm 9E4, der den vollständigen Genotyp *tonA ptr3* aufweist; *E.-coli*-W3110-Stamm 27C7 (ATCC 55.244), der den vollständigen Genotyp *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac)169 degP ompT kan'* aufweist; *E.-coli*-W3110-Stamm 37D6, der den vollständigen Genotyp *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac)169 degP ompT rbs7ilvG kan'* aufweist; *E.-coli*-W3110-Stamm 40B4, der Stamm 37D6 mit einer nicht Kanamycin-resistenten *degP*-Deletionsmutation ist; und ein *E.-coli*-Stamm mit mutierter periplasmatischer Protease, offenbart im US-Patent Nr. 4.946.783, ausgegeben am 7. August 1990, sind. Alternativ dazu sind In-vitro-Klonierv Verfahren, z.B. PCR oder andere Nucleinsäure-Polymerasereaktionen, geeignet.

**[0103]** Zusätzlich zu Prokaryoten sind eukaryotische Mikroben wie beispielsweise Fadenpilze oder Hefe geeignete Klonier- oder Expressionswirte für PRO320-kodierende Vektoren. *Saccharomyces cerevisiae* ist ein üblicherweise verwendeter, niedereukaryotischer Wirtsmikroorganismus. Andere umfassen *Schizosaccharomyces pombe* (Beach & Nurse, Nature 290, 140 (1981); EP 139.383, veröffentlicht am 2. Mai 1985); *Kluyveromyces*-Wirte (US-Patent Nr. 4.943.529; Fleer et al., Bio/Technology 9, 968-975 (1991)) wie z.B. *K. lactis* (MW98-8C, CBS683, CBS4574; Louvencourt et al., J. Bacteriol. 154(2), 737-742 (1983)), *K. fragilis* (ATCC 12.424), *K. bulgaricus* (ATCC 16.045), *K. wickerhamii* (ATCC 24.178), *K. waltii* (ATCC 56.500), *K. drosophilum* (ATCC 36.906; Van den Berg et al., Bio/Technology 8, 135 (1990)), *K. thermotolerans* und *K. marxianus*; *Yarrowia* (EP 402.226); *Pichia pastoris* (EP 183.070; Sreekrishna et al., J. Basic Microbiol. 28, 265-278 (1988)); *Candida*; *Trichoderma reesia* (EP 244.234); *Neurospora crassa* (Case et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 5339-5363 (1979)); *Schwanniomyces* wie z.B. *Schwanniomyces occidentalis* (EP 394.538, veröffentlicht am 31. Oktober 1990); und Fadenpilze wie z.B. *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium* (WO 91/00357, veröffentlicht am 10. Januar 1991) und *Aspergillus*-Wirte wie z.B. *A. nidulans* (Ballance et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 112, 284-289 (1983); Tilburn et al., Gene 26, 205-221 (1983); Yelton et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 1470-1474 (1984)) und *A. niger* (Kelly & Hynes, EMBO J. 4, 475-479 (1985)). Methylotrrophe Hefen sind hierin geeignet und umfassen, sind jedoch nicht beschränkt auf, Hefe, die in der Lage ist, auf Methanol zu wachsen, ausgewählt aus den Gattungen von *Hansenula*, *Candida*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Torulopsis* und *Rhodotorula*. Eine Liste spezifischer Spezies, die für diese Klasse von Hefe beispielhaft sind, ist in C. Anthony, The Biochemistry of Methylotrrophs, 269 (1982), zu finden.

**[0104]** Geeignete Wirtszellen für die Expression von glykosyliertem PRO320 werden von multizellulären Organismen abgeleitet. Beispiele für Wirbellosenzellen umfassen Insektenzellen wie z.B. *Drosophila* S2 und *Spodoptera Sf9* sowie Pflanzenzellen. Beispiele für nützliche Säugetierwirtszelllinien umfassen Chinahamster-Eierstock- (CHO- und COS-Zellen. Spezifischere Beispiele umfassen Affennieren-CV1-Linie, transformiert durch SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); menschliche embryonale Nierenlinie (293 oder 293-Zellen, subkloniert zum Wachstum in Suspensionskultur, Graham et al., J. Gen Virol. 36, 59 (1977)); Chinahamster-Eierstockzellen/-DHFR (CHO, Urlaub & Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 4216 (1980)); Maus-Sertolizellen (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23, 243-251 (1980)); menschliche Lungenzellen (W138, ATCC CCL 75); menschliche Leberzellen (Hep G2, HB 8065); und Maus-Brusttumor (MMT 060562, ATCC CCL51). Es wird erachtet, dass die Auswahl der geeigneten Wirtszelle in den Bereich der Erfindung fällt.

## 3. Auswahl und Verwendung eines replizierbaren Vektors

**[0105]** Die Nucleinsäure (z.B. cDNA oder genomische DNA), die für PRO320 kodiert, kann zum Klonieren (Amplifikation der DNA) oder zur Expression in einen replizierbaren Vektor inseriert werden. Verschiedene Vektoren sind öffentlich erhältlich. Der Vektor kann beispielsweise in Form eines Plasmids, Cosmids, viralen Partikels oder Phagen vorliegen. Die geeignete Nucleinsäuresequenz kann in den Vektor mittels zahlreicher verschiedener Verfahren inseriert werden. Im Allgemeinen wird DNA in (eine) geeignete Restriktionsendonucleasestelle(n) mittels auf dem Gebiet der Erfindung bekannter Verfahren inseriert. Vektorkomponenten umfassen im Allgemeinen, sind jedoch nicht beschränkt auf, eine oder mehrere Signalsequenzen, einen Replikationsursprung, ein oder mehrere Markergene, ein Enhancer-Element, einen Promotor und eine Transkriptionsterminationssequenz. Bei der Konstruktion geeigneter Vektoren, die eine oder mehrere dieser Komponenten enthalten, werden herkömmliche Ligationsverfahren eingesetzt, die Fachleuten bekannt sind.

**[0106]** Das PRO320 kann rekombinant nicht nur direkt, sondern auch als ein Fusionspolypeptid mit einem heterologen Polypeptid hergestellt werden, das eine Signalsequenz oder ein anderes Polypeptid mit einer spezifischen Spaltungsstelle am N-Terminus des reifen Proteins oder Polypeptids sein kann. Im Allgemeinen kann die Signalsequenz eine Komponente des Vektors oder kann ein Teil der für PRO320 kodierenden DNA sein, die in den Vektor inseriert wird. Die Signalsequenz kann eine prokaryotische Signalsequenz, ausgewählt beispielsweise aus der aus alkalischer Phosphatase, Penicillinase, Ipp oder wärmestabilen Enterotoxin-II-Leadern bestehenden Gruppe, sein. Zur Hefeseekretion kann die Signalsequenz z.B. der Hefe-Invertaseleader, Alpha-Faktorleader (einschließlich *Saccharomyces*- und *Kluyveromyces*- $\alpha$ -Faktorleader, wobei Letzterer im US-Patent Nr. 5.010.182 beschrieben wird) oder Saure-Phosphataseleader, der *C.-albicans*-Glucoamylaseleader (EP 362.179, veröffentlicht am 4. April 1990) oder das in der WO 90/13646, veröffentlicht am 15. November 1990, beschriebene Signal sein. Zur Säugetierzellexpression können Säugetiersignalsequenzen verwendet werden, um Sekretion des Proteins zu steuern, wie beispielsweise Signalsequenzen aus sekretierten Polypeptiden derselben oder einer verwandten Spezies sowie virale Sekretionsleader.

**[0107]** Sowohl Expressions- als auch Kloniervektoren enthalten eine Nucleinsäuresequenz, die es ermöglicht, dass sich der Vektor in einer oder mehreren der sekretierten Wirtszellen repliziert. Solche Sequenzen sind für zahlreiche verschiedene Bakterien, Hefen und Viren bekannt. Der Replikationsursprung aus dem Plasmid pBR322 ist für die meisten gram-negativen Bakterien geeignet, der 2 $\mu$ -Plasmidursprung ist für Hefe geeignet, und verschiedene virale Ursprünge (SV40, Polyoma, Adenovirus, VSV oder BPV) sind für Kloniervektoren in Säugetierzellen nützlich.

**[0108]** Expressions- und Kloniervektoren enthalten typischerweise ein Selektionsgen, das auch als selektierbarer Marker bezeichnet wird. Typische Selektionsgene kodieren für Proteine, die (a) Resistenz gegenüber Antibiotika oder anderen Toxinen, z.B. Ampicillin, Neomycin, Methotrexat oder Tetracyclin, verleihen, (b) auxotrophe Mängel beheben oder (c) essenzielle Nährstoffe, die aus komplexem Medium nicht erhältlich sind, z.B. das für D-Alaninracemase für *Bacilli* kodierende Gen, zuführen.

**[0109]** Ein Beispiel für geeignete selektierbare Marker für Säugetierzellen sind jene, die die Identifikation von Zellen ermöglichen, die in der Lage sind, die für PRO320 kodierende Nucleinsäure aufzunehmen, wie z.B. DHFR oder Thymidinkinase. Eine geeignete Wirtszelle ist, sofern Wildtyp-DHFR verwendet wird, die CHO-Zelllinie, der DHFR-Aktivität fehlt und die wie von Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 4216 (1980), beschrieben hergestellt und vermehrt wird. Ein geeignetes Selektionsgen zur Verwendung in Hefe ist das *trp1*-Gen, das im Hefepiasmid YRp7 vorhanden ist [Stinchcomb et al., Nature 282, 39 (1979); Kingsman et al., Gene 7, 141 (1979); Tschemper et al., Gene 10, 157 (1980)]. Das *trp1*-Gen liefert einen Selektionsmarker für einen mutierten Hefestamm, dem die Fähigkeit fehlt, in Tryptophan zu wachsen, beispielsweise ATCC Nr. 44076 oder PEP4-1 [Jones, Genetics 85, 12 (1977)].

**[0110]** Expressions- und Kloniervektoren enthalten üblicherweise einen Promotor, der operabel an die für PRO320 kodierende Nucleinsäuresequenz gebunden ist, um mRNA-Synthese zu steuern. Promotoren, die durch zahlreiche verschiedene potenzielle Wirtszellen erkannt werden, sind bekannt. Promotoren, die zur Verwendung mit prokaryotischen Wirten geeignet sind, umfassen die  $\beta$ -Lactamase- und Lactose-Promotorsysteme [Chang et al., Nature 275, 615 (1978); Goeddel et al., Nature 281, 544 (1979)], alkalische Phosphatase, ein Tryptophan-(*trp*-)Promotorsystem [Goeddel, Nucleic Acids Res. 8, 4057 (1980); EP 36.776] und Hybridpromotoren wie z.B. den *tac*-Promotor [deBoer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 21-25 (1983)]. Promotoren zur Verwendung in bakteriellen Systemen enthalten auch eine Shine-Dalgarno-(S.D.-)Sequenz, die operabel an die für PRO320 kodierende DNA gebunden ist.

**[0111]** Beispiele für geeignete Promotorsequenzen zur Verwendung mit Hefewirten umfassen die Promotoren für 3-Phosphoglyceratkinase [Hitzeman et al., J. Biol. Chem. 255, 2073 (1980)] oder andere glykolytische Enzyme [Hess et al., J. Adv. Enzyme Reg. 7, 149 (1968); Holland, Biochemistry 17, 4900 (1978)] wie z.B. Enolase, Glyceraldehyd-3-phosphatdehydrogenase, Hexokinase, Pyruvatdecarboxylase, Phosphofructokinase, Glucose-6-phosphatisomerase, 3-Phosphoglyceratmutase, Pyruvatkinase, Triosephosphatisomerase, Phosphoglucoseisomerase und Glucokinase.

**[0112]** Andere Hefepromotoren, die induzierbare Promotoren sind und den zusätzlichen Vorteil haben, dass ihre Transkription durch Wachstumsbedingungen gesteuert wird, sind die Promotorregionen für Alkoholdehydrogenase 2, Isocytochrom C, saure Phosphatase, degradative Enzyme, die mit Stickstoffmetabolismus assoziiert sind, Metallothionein, Glyceraldehyd-3-phosphatdehydrogenase und Enzyme, die für Maltose- und Galactoseverwendung verantwortlich sind. Geeignete Vektoren und Promotoren zur Verwendung bei Hefeexpression werden näher in EP 73.657 beschrieben.

**[0113]** PRO320-Transkription aus Vektoren in Säugetier-Wirtszellen wird beispielsweise durch Promotoren gesteuert, die aus den Genomen von Viren wie z.B. Polyomavirus, Geflügelpockenvirus (UK 2.211.504, veröffentlicht am 5. Juli 1989), Adenovirus (wie z.B. Adenovirus 2), Rinderpapillomavirus, Vogel-Sarkomvirus, Zytomegalie-Virus, einem Retrovirus, Hepatitis-B-Virus und Affenvirus 40 (SV40), aus heterologen Säugetierpromotoren, z.B. dem Actinpromotor oder einem Immunglobulinpromotor, und aus Hitzeschock-Promotoren gewonnen werden, vorausgesetzt, solche Promotoren sind mit den Wirtszellsystemen kompatibel.

**[0114]** Transkription einer DNA, die für das PRO320 kodiert, durch höhere Eukaryoten kann durch Insertieren einer Enhancersequenz in den Vektor gesteigert werden. Enhancer sind cis-wirkende Elemente von DNA, üblicherweise etwa mit 10 bis 300 bp, die auf einen Promotor so wirken, dass seine Transkription gesteigert wird. Zahlreiche Enhancersequenzen sind aus Säugetiergenen bekannt (Globin, Elastase, Albumin,  $\alpha$ -Fetoprotein und Insulin). Typischerweise wird jedoch ein Enhancer aus einem eukaryotischen Zellvirus verwendet. Beispiele umfassen den SV40-Enhancer an der späten Seite des Replikationsursprungs (bpb 100-270), den frühen Zytomegalie-Virus-Promotorenhancer, den Polyoma-Enhancer an der späten Seite des Replikationsursprungs und Adenovirus-Enhancer. Der Enhancer kann in den Vektor an einer Position 5' oder 3' zur PRO320-Kodiersequenz gespleißt werden, wird jedoch vorzugsweise an einer Stelle 5' vom Promotor angeordnet.

**[0115]** Expressionsvektoren, die in eukaryotischen Wirtszellen (Hefe-, Pilz-, Insekten-, Pflanzen-, Tier-, Mensch- oder kernhaltige Zellen aus anderen multizellulären Organismen) verwendet werden, enthalten auch Sequenzen, die zum Abschluss von Transkription und zur Stabilisierung der mRNA erforderlich sind. Solche Sequenzen sind üblicherweise aus den untranslatierten 5'-, und gegebenenfalls 3'-, Regionen eukaryotischer oder viraler DNAs oder cDNAs erhältlich. Diese Regionen enthalten Nucleotidsegmente, die als polyadenylierte Fragmente im untranslatierten Abschnitt der für PRO320 kodierenden mRNA transkribiert werden.

**[0116]** Weitere Verfahren, Vektoren und Wirtszellen, die zur Adaption an die Synthese von PRO320 in rekombinanter Wirbeltierzellkultur geeignet sind, werden in Gething et al., Nature 293, 620-625 (1981); Mantei et al., Nature 281, 40-46 (1979); EP 117.060; und EP 117.058 beschrieben.

#### 4. Detektion von Genamplifikation/expression

**[0117]** Genamplifikation und/oder -expression kann basierend auf den hierin bereitgestellten Sequenzen in einer Probe direkt gemessen werden, z.B. durch herkömmliches Southern-Blotting, Northern-Blotting zur Quantifizierung der Transkription von mRNA [Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 5201-5205 (1980)], Dot-Blotting (DNA-Analyse) oder In-situ-Hybridisierung unter Verwendung einer geeigneten markierten Sonde. Alternativ dazu können Antikörper verwendet werden, die spezifische Duplices, einschließlich DNA-Duplices, RNA-Duplices und DNA-RNA-Hybridduplices oder DNA-Proteinduplices, erkennen. Die Antikörper wiederum können markiert sein, und der Test kann durchgeführt werden, wenn der Duplex an eine Oberfläche gebunden ist, sodass bei Bildung von Duplex an der Oberfläche die Gegenwart von Antikörper, der an den Duplex gebunden ist, nachgewiesen werden kann.

**[0118]** Genexpression kann alternativ dazu durch immunologische Verfahren, wie beispielsweise immunhistochemisches Färben von Zellen oder Gewebeschnitten und Tests von Zellkultur oder Körperflüssigkeiten, gemessen werden, um die Expression von Genprodukt direkt zu quantifizieren. Antikörper, die für immunhistochemisches Färben und/oder Testen von Probenflüssigkeiten nützlich sind, können entweder monoklonal oder polyklonal sein und können in jedem beliebigen Säugetier hergestellt werden. Auf einfache Weise können die Antikörper gegen ein Nativsequenz-PRO320-Polypeptid oder gegen ein synthetisches Peptid, basierend auf

den hierin bereitgestellten DNA-Sequenzen, oder gegen exogene Sequenz, fusioniert an PRO320-DNA und für ein spezifisches Antikörperepitop kodierend, hergestellt werden.

## 5. Reinigung von Polypeptid

**[0119]** Formen von PRO320 können aus Kulturmedium oder aus Wirtszelllysaten gewonnen werden. Sofern membrangebunden, kann es unter Verwendung einer geeigneten Tensidlösung (z.B. Triton-X 100) oder durch enzymatische Spaltung aus der Membran freigesetzt werden. Zellen, die zur Expression von PRO320 verwendet werden, können mittels verschiedener physikalischer oder chemischer Mittel, wie z.B. Gefrier-Auftau-Zyklieren, Beschallung, mechanischer Aufbruch oder Zellysemittel, aufgeschlossen werden.

**[0120]** Es kann erwünscht sein, PRO320 aus rekombinanten Zellproteinen oder Polypeptiden zu reinigen. Die folgenden Verfahren sind Beispiele für geeignete Reinigungsverfahren: Fraktionierung an einer Ionenaustauschsäule; Ethanol-fällung; Umkehrphasen-HPLC; Chromatographie an Siliciumdioxid oder an einem Kationenaustauschharz wie z.B. DEAE; Chromatofokussierung; SDS-PAGE; Ammoniumsulfatfällung; Gelfiltration unter Verwendung von beispielsweise Sephadex G-75; Protein-A-Sepharose-Säulen zur Entfernung von Verunreinigungen wie IgG; und Metallchelator-Säulen zur Bindung von Epitop-markierten Formen des PRO320. Verschiedene Verfahren von Proteinreinigung können verwendet werden, und solche Verfahren sind auf dem Gebiet der Erfindung bekannt und beispielsweise in Deutscher, Methods in Enzymology, 182 (1990); Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, Springer-Verlag, New York (1982), beschrieben. Der/Die ausgewählte(n) Reinigungsschritt(e) hängen beispielsweise von der Beschaffenheit des verwendeten Herstellungsverfahrens und dem bestimmten hergestellten PRO320 ab.

## E. Antikörper

**[0121]** Manche Wirkstoffkandidaten zur Verwendung in Zusammensetzungen und Verfahren der vorliegenden Erfindung sind Antikörper und Antikörperfragmente, die die biologische Aktivität eines PRO320-Polypeptids nachahmen.

### 1. Polyklonale Antikörper

**[0122]** Verfahren zur Herstellung von polyklonalen Antikörpern sind Fachleuten bekannt. Polyklonale Antikörper können in einem Säugetier, beispielsweise durch eine oder mehrere Injektionen eines immunisierenden Mittels und, sofern erwünscht, eines Adjuvans, gezüchtet werden. Typischerweise wird das immunisierende Mittel und/oder das Adjuvans dem Säugetier durch multiple subkutane oder intraperitoneale Injektionen injiziert. Das immunisierende Mittel kann das PRO320-Polypeptid oder ein Fusionsprotein davon umfassen. Es kann nützlich sein, das immunisierende Mittel an ein Protein zu konjugieren, das dafür bekannt ist, im zu immunisierenden Tier immunogen zu sein. Beispiele für solche immunogenen Proteine umfassen, sind jedoch nicht beschränkt auf, Schlüssellock-Napfschnecken-Hämocyanin, Serumalbumin, Rinderthyroglobulin und Sojabohnentrypsininhibitor. Beispiele für Adjuvanzen, die verwendet werden können, umfassen komplettes Freundsches Adjuvans und MPL-TDM-Adjuvans (Monophosphoryl-Lipid A, synthetisches Trehalosedicorynomycolat). Die Arbeitsvorschrift zur Immunisierung kann von Fachleuten ohne übermäßiges Experimentieren ausgewählt werden.

### 2. Monoklonale Antikörper

**[0123]** Die Antikörper können alternativ zu polyklonalen Antikörpern monoklonale Antikörper sein. Monoklonale Antikörper können unter Verwendung von Hybridomverfahren, wie beispielsweise jenen, die von Kohler & Milstein, Nature 356, 495 (1975), beschrieben werden, hergestellt werden. In einem Hybridomverfahren wird eine Maus, ein Hamster oder ein anderes geeignetes Wirttier typischerweise mit einem immunisierenden Mittel immunisiert, um Lymphozyten hervorzubringen, die Antikörper produzieren oder zu produzieren in der Lage sind, die sich spezifisch an das immunisierende Mittel binden. Alternativ dazu können die Lymphozyten in vitro immunisiert werden.

**[0124]** Das immunisierende Mittel umfasst typischerweise das PRO320-Polypeptid oder ein Fusionsprotein davon. Im Allgemeinen werden entweder Lymphozyten des peripheren Bluts („PBLs“), sofern Zellen menschlichen Ursprungs erwünscht sind, oder Milzzellen oder Lymphknotenzellen verwendet, sofern nicht-menschliche Säugetierquellen erwünscht sind. Die Lymphozyten werden dann mit einer sich unbegrenzt vermehrenden Zelllinie unter Verwendung eines geeigneten Fusionsmittels, wie z.B. Polyethylenglykol, fusioniert, um eine Hybridomzelle zu bilden [Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, 59-103

(1986)]. Sich unbegrenzt vermehrende Zelllinien sind üblicherweise transformierte Säugetierzellen, insbesondere Myelomzellen von Nagetieren, Rindern und Menschen. Üblicherweise werden Ratten- oder Mausmyelomzelllinien verwendet. Die Hybridomzellen können in einem geeigneten Kulturmedium kultiviert werden, das vorzugsweise eine oder mehrere Substanzen enthält, die das Wachstum oder Überleben der nicht fusionierten, sich unbegrenzt vermehrenden Zellen hemmen. Fehlt beispielsweise den Ausgangszellen das Enzym Hypoxanthinphosphoribosyltransferase (HGPRT oder HPRT), so umfasst das Kulturmedium für die Hybridome typischerweise Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin („HAT-Medium“), Substanzen, die das Wachstum von HGPRT-defizienten Zellen unterbindet.

**[0125]** Bevorzugte, sich unbegrenzt vermehrende Zelllinien sind jene, die wirksam fusionieren, die stabile hochgradige Expression von Antikörper durch die ausgewählten, Antikörper produzierenden Zellen fördern und die auf ein Medium wie beispielsweise HAT-Medium empfindlich sind. Noch bevorzugtere, sich unbegrenzt vermehrende Zelllinien sind Maus-Myelomlinien, die beispielsweise beim Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, Kalifornien, und bei der American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, erhalten werden können. Menschliche Myelom- und Maus-Mensch-Heteromyelomzelllinien wurden auch für die Herstellung von menschlichen monoklonalen Antikörpern beschrieben [Kozbor, J. Immunol. 133, 3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc., New York, 51-63 (1987)].

**[0126]** Das Kulturmedium, in dem die Hybridomzellen kultiviert werden, kann dann auf die Gegenwart von monoklonalen Antikörpern, die gegen PRO320 gerichtet sind, getestet werden. Vorzugsweise wird die Bindungsspezifität von monoklonalen Antikörpern, die durch die Hybridomzellen produziert werden, durch Immunfällung oder durch einen In-vitro-Bindungstest, wie beispielsweise Radioimmunttest (RIA) oder enzymgekoppelte Immunadsorptionsbestimmung (ELISA), bestimmt. Solche Verfahren und Tests sind auf dem Gebiet der Erfindung bekannt. Die Bindungsaffinität des monoklonalen Antikörpers kann beispielsweise durch die Scatchard-Analyse von Munson & Pollard, Anal. Biochem. 107, 220 (1980), bestimmt werden.

**[0127]** Nachdem die erwünschten Hybridomzellen identifiziert wurden, können die Klone durch Grenzverdünnungsverfahren subkloniert und mittels herkömmlicher Verfahren gezüchtet werden [Goding, s.o.]. Geeignete Kulturmedien für diesen Zweck umfassen beispielsweise Dulbecco's Modified Eagle's Medium und RPMI-1640-Medium. Alternativ dazu können die Hybridomzellen in vivo als Aszites in einem Säugetier gezüchtet werden.

**[0128]** Die monoklonalen Antikörper, die durch die Subklone sekretiert werden, können aus dem Kulturmedium oder der Ascitesflüssigkeit durch herkömmliche Immunglobulinreinigungsverfahren, wie beispielsweise Protein-A-Sepharose, Hydroxylapatitchromatographie, Gelelektrophorese, Dialyse oder Affinitätschromatographie, isoliert oder gereinigt werden.

**[0129]** Die monoklonalen Antikörper können auch durch DNA-Rekombinationsverfahren, wie jenen, die im US-Patent Nr. 4.816.567 beschrieben werden, hergestellt werden. DNA, die für die monoklonalen Antikörper der Erfindung kodiert, kann leicht isoliert und unter Verwendung herkömmlicher Verfahren (z.B. unter Verwendung von Oligonucleotidsonden, die in der Lage sind, sich spezifisch an Gene zu binden, die für die schweren und leichten Ketten von Maus-Antikörper kodieren) sequenziert werden. Die Hybridomzellen der Erfindung dienen als eine bevorzugte Quelle für solche DNA. Nachdem sie isoliert wurde, kann die DNA in Expressionsvektoren platziert werden, die dann in Wirtszellen wie beispielsweise Affen-COS-Zellen, Chinahamster-Eierstock-(CHO-)Zellen oder Myelomzellen transfiziert werden, die sonst kein Immunglobulinprotein produzieren, um die Synthese von monoklonalen Antikörpern in den rekombinanten Wirtszellen zu erreichen. Die DNA kann auch beispielsweise durch Substituieren der Kodiersequenz für menschliche Schwer- und Leichtketten-Konstantdomänen anstelle der homologen Maus-Sequenzen [US-Patent Nr. 4.816.567; Morrison et al., s.o.] oder durch kovalentes Binden der gesamten oder eines Teils der Kodiersequenz für ein Nicht-Immunglobulin-Polypeptid an die Immunglobulin-Kodiersequenz modifiziert werden. Solch ein Nicht-Immunglobulin-Polypeptid kann anstelle der konstanten Domänen eines Antikörpers der Erfindung oder anstelle der variablen Domänen einer Antigen-Bindungsstelle eines Antikörpers der Erfindung eingesetzt werden, um einen zweiwertigen Hybridantikörper zu bilden.

**[0130]** Die Antikörper können einwertige Antikörper sein. Verfahren zur Herstellung einwertiger Antikörper sind auf dem Gebiet der Erfindung bekannt. Beispielsweise umfasst ein Verfahren rekombinante Expression von Immunglobulin-Leichtkette und modifizierter Schwereketten. Die Schwereketten sind im Allgemeinen an einem beliebigen Punkt in der Fc-Region trunziert, sodass Schwereketten-Vernetzung unterbunden wird. Alternativ dazu werden die relevanten Cysteinreste durch einen anderen Aminosäurerest substituiert oder werden dele-



tiert, um Vernetzung zu unterbinden.

**[0131]** In-vitro-Verfahren sind auch zur Herstellung einwertiger Antikörper geeignet. Verdau von Antikörpern zur Produktion von Fragmenten davon, vorzugsweise Fab-Fragmenten, kann gemäß herkömmlichen Verfahren, die auf dem Gebiet der Erfindung bekannt sind, durchgeführt werden.

### 3. Menschliche und humanisierte Antikörper

**[0132]** Die Antikörper der Erfindung können weiters humanisierte Antikörper oder menschliche Antikörper umfassen. Humanisierte Formen von nicht-menschlichen (z.B. Maus-) Antikörpern sind chimäre Immunglobuline, Immunglobulinketten oder Fragmente davon (wie z.B. Fv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> oder andere Antigen-bindende Subsequenzen von Antikörpern), die eine Mindest-Sequenz, abgeleitet aus nicht-menschlichem Immunglobulin, enthalten. Humanisierte Antikörper umfassen menschliche Immunglobuline (Akzeptorantikörper), in denen Reste aus einer komplementaritätsbestimmenden Region (CDR) des Akzeptors durch Reste aus einer CDR einer nicht-menschlichen Spezies (Donorantikörper) wie Maus, Ratte oder Kaninchen mit der erwünschten Spezifität, Affinität und Kapazität ersetzt werden. In manchen Fällen werden Fv-Gerüstre des menschlichen Immunglobulins durch entsprechende nicht-menschliche Reste ersetzt. Humanisierte Antikörper können auch Reste umfassen, die weder im Akzeptorantikörper noch in den importierten CDR- oder Gerüstsequenzen zu finden sind. Im Allgemeinen umfasst der humanisierte Antikörper im Wesentlichen die gesamte von zumindest einer, und typischerweise zwei, variablen Domänen, in denen alle oder im Wesentlichen alle der CDR-Regionen jenen eines nicht-menschlichen Immunglobulins entsprechen und alle oder im Wesentlichen alle der FR-Regionen jene einer menschlichen Immunglobulin-Consensussequenz sind. Das humanisierte Antikörper umfasst im besten Fall auch zumindest einen Abschnitt einer konstanten Immunglobulinregion (Fc), typischerweise jenen eines menschlichen Immunglobulins [Jones et al., Nature 321, 522-525 (1986); Riechmann et al., Nature 332, 323-329 (1988); und Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2, 593-596 (1992)].

**[0133]** Verfahren zur Humanisierung nicht-menschlicher Antikörper sind auf dem Gebiet der Erfindung bekannt. Im Allgemeinen weist ein humanisierter Antikörper einen oder mehrere Aminosäurereste auf, die in ihn aus einer Quelle eingeführt wurden, die nicht-menschlich ist. Diese nicht-menschlichen Aminosäurereste werden oft als „Import“-Reste bezeichnet, die typischerweise aus einer variablen „Import“-Domäne genommen werden. Humanisierung kann im Wesentlichen gemäß dem Verfahren von Winter und Mitarbeiter [Jones et al., Nature 321, 522-525 (1986); Riechmann et al., Nature 332, 323-327 (1988); Verhoeyen et al., Science 239, 1534-1536 (1988)] durch Substituieren von Nagetier-CDRs- oder -CDR-Sequenzen anstelle der entsprechenden Sequenzen eines menschlichen Antikörpers durchgeführt werden. Demgemäß sind solche „humanisierten“ Antikörper Hybridantikörper (US-Patent Nr. 4.816.567), worin wesentlich weniger als eine intakte menschliche variable Domäne durch die entsprechende Sequenz aus einer nicht-menschlichen Spezies substituiert wurde. In der Praxis sind humanisierte Antikörper typischerweise menschliche Antikörper, in denen manche CDR-Reste und möglicherweise manche FR-Reste durch Reste aus analogen Stellen in Nagetierantikörpern ersetzt sind.

**[0134]** Menschliche Antikörper können auch unter Verwendung verschiedener Techniken, die auf dem Gebiet der Erfindung bekannt sind, einschließlich Phagendisplay-Bibliotheken [Hoogenboom & Winter, J. Mol. Biol. 227, 381 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol. 222, 581 (1991)] hergestellt werden. Die Verfahren von Cole et al. und Boerner et al. sind auch zur Herstellung von menschlichen monoklonalen Antikörpern geeignet [Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, S. 77 (1985), und Boerner et al., J. Immunol. 147(1), 86-95 (1991)]. Demähnlich können menschliche Antikörper durch Einführen menschlicher Immunglobulinloci in transgene Tiere, z.B. Mäuse, in denen die endogenen Immunglobulingene teilweise oder vollständig deaktiviert wurden, hergestellt werden. Bei Provokation wird menschliche Antikörperproduktion beobachtet, die jener in allen Aspekten sehr stark ähnlich ist, die in Menschen selbst beobachtet wurde, einschließlich Genueanordnung, Assemblierung und Antikörperrepertoire. Dieser Ansatz wird beispielsweise in den US-Patenten Nr. 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.661.016 und den folgenden wissenschaftlichen Publikationen beschrieben: Marks et al., Bio/Technology 10, 779-783 (1992); Lonberg et al., Nature 368, 856-859 (1994); Morrison, Nature 368, 812-813 (1994); Fishwild et al., Nature Biotechnology 14, 845-851 (1996); Neuberger, Nature Biotechnology 14, 826 (1996); Lonberg & Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13, 65-93 (1995).

### 4. Bispezifische Antikörper

**[0135]** Bispezifische Antikörper sind monoklonale, vorzugsweise menschliche oder humanisierte, Antikörper, die Bindungsspezifitäten für zumindest zwei verschiedene Antigene aufweisen. Im vorliegenden Fall ist eine

der Bindungsspezifitäten für das PRO320, die andere ist für jedes beliebige andere Antigen, und vorzugsweise für ein(en) Zelloberflächen-Protein oder -Rezeptor oder eine Rezeptoruntereinheit.

**[0136]** Verfahren zur Herstellung bispezifischer Antikörper sind auf dem Gebiet der Erfindung bekannt. Herkömmlicherweise basiert die rekombinante Produktion von bispezifischen Antikörpern auf der Co-Expression von zwei Immunglobulin-Schwerketten/Leichtketten-Paaren, worin die zwei schweren Ketten unterschiedliche Spezifitäten aufweisen [Milstein & Cuello, *Nature* 305, 537-539 (1983)]. Aufgrund der zufälligen Auswahl an Immunglobulinschwer- und -leichtketten produzieren diese Hybridome (Quadrome) ein potenzielles Gemisch von zehn verschiedenen Antikörpermolekülen, von denen nur eines die korrekte bispezifische Struktur aufweist. Die Reinigung des korrekten Moleküls erfolgt üblicherweise durch Affinitätschromatographieschritte. Ähnliche Verfahren sind in der WO 93/08829, veröffentlicht am 13. Mai 1993, und in Traunecker et al., *EMBO J.* 10, 3655-3659 (1991), offenbart.

**[0137]** Variable Antikörperdomänen mit den erwünschten Bindungsspezifitäten (Antikörper-Antigen-Kombinationsstellen) können an Immunglobulinkonstantdomänen-Sequenzen fusioniert werden. Die Fusion erfolgt vorzugsweise mit einer Immunglobulin-Schwerkettenkonstantdomäne, umfassend zumindest einen Teil der Gelenks-, CH2- und CH3-Regionen. Es wird bevorzugt, dass die erste Schwerketten-Konstantregion (CH1) die Stelle enthält, die für Leichtkettenbindung, vorhanden in zumindest einer der Fusionen, erforderlich ist. DNAs, die für die Immunglobulin-Schwerkettenfusionen und, sofern erwünscht, für die Immunglobulin-Leichtkette kodieren, werden in getrennte Expressionsvektoren inseriert und werden in geeignete Wirtsorganismen cotransfiziert. Für nähere Details zur Herstellung von bispezifischen Antikörpern siehe beispielsweise Suresh et al., *Methods in Enzymology* 121, 210 (1986).

**[0138]** Gemäß einem anderen Ansatz, der in der WO 96/27011 beschrieben wird, kann die Grenzfläche zwischen einem Paar von Antikörpermolekülen bearbeitet werden, um den Prozentsatz an Heterodimeren, die aus rekombinanter Zellkultur gewonnen werden, zu maximieren. Die bevorzugte Grenzfläche umfasst zumindest einen Teil der CH3-Region einer konstanten Antikörperdomäne. In diesem Verfahren werden eine oder mehr kurze Aminosäureseitenketten von der Grenzfläche des ersten Antikörpermoleküls durch längere Seitenketten (z.B. Tyrosin oder Tryptophan) ersetzt. Kompensations-„Hohlräume“ von identischer oder ähnlicher Größe wie die lange(n) Seitenkette(n) werden an der Grenzfläche des zweiten Antikörpermoleküls durch Ersetzen der langen Aminosäureseitenketten durch kürzere (z.B. Alanin oder Threonin) geschaffen. Dies liefert einen Mechanismus zur Steigerung der Ausbeute des Heterodimers im Vergleich zu unerwünschten Endprodukten wie beispielsweise Homodimeren.

**[0139]** Bispezifische Antikörper können als Vollängenantikörper oder Antikörperfragmente (z.B. bispezifische  $F(ab')_2$ -Antikörper) hergestellt werden. Verfahren zur Herstellung bispezifischer Antikörper aus Antikörperfragmenten wurden in der Literatur bereits beschrieben. Beispielsweise können bispezifische Antikörper unter Verwendung chemischer Bindung hergestellt werden. Brennan et al., *Science* 229, 81 (1985), beschreiben ein Verfahren, worin intakte Antikörper proteolytisch gespaltet werden, um  $F(ab')_2$ -Fragmente zu bilden. Diese Fragmente werden in Gegenwart des Dithiol-Komplexbildners Natriumarsenit reduziert, um vicinale Dithiole zu stabilisieren und intermolekulare Disulfidbildung zu unterbinden. Die gebildeten Fab'-Fragmente werden dann zu Thionitrobenzoat-(TNB-)Derivaten umgesetzt. Eines der Fab'-TNB-Derivate wird dann zum Fab'-Thiol durch Reduktion mit Mercaptoethylamin rekonvertiert und mit einer äquimolaren Menge des anderen Fab'-TNB-Derivats vermischt, um den bispezifischen Antikörper zu bilden. Die produzierten bispezifischen Antikörper können als Mittel für die selektive Immobilisierung von Enzymen verwendet werden.

**[0140]** Fab'-Fragmente können direkt aus *E. coli* gewonnen und chemisch gebunden werden, um bispezifische Antikörper zu bilden. Shalaby et al., *J. Exp. Med.* 175, 217-225 (1992), beschreiben die Produktion eines vollständig humanisierten bispezifischen  $F(ab')_2$ -Antikörper-Moleküls. Jedes Fab'-Fragment wurde separat aus *E. coli* sekretiert und gerichteter chemischer Bindung in vitro unterzogen, um den bispezifischen Antikörper zu bilden. Der so gebildete bispezifische Antikörper war in der Lage, sich an Zellen zu binden, die den ErbB2-Rezeptor überexprimierten, sowie an normale menschliche T-Zellen, und konnte die lytische Aktivität menschlicher zytotoxischer Lymphozyten gegen menschliche Brusttumortargets steigern.

**[0141]** Verschiedene Techniken zur Herstellung und Isolation bispezifischer Antikörperfragmente direkt aus rekombinanten Zellkulturen wurden auch beschrieben. Beispielsweise wurden bispezifische Antikörper unter Verwendung von Leucin-Zipper hergestellt. Kostelny et al., *J. Immunol.* 148(5), 1547-1553 (1992). Die Leucin-Zipper-Peptide aus den Fos- und Jun-Proteinen wurden an die Fab'-Abschnitte von zwei verschiedenen Antikörpern durch Genfusion gebunden. Die Antikörper-Homodimere wurden an der Gelenksregion reduziert, um Monomere zu bilden, und dann reoxidiert, um die Antikörper-Heterodimere zu bilden. Dieses Verfahren

kann auch zur Herstellung von Antikörper-Homodimeren verwendet werden. Die von Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 6444-6448 (1993), beschriebene „Diabody“-Technologie stellt einen alternativen Mechanismus zur Herstellung bispezifischer Antikörperfragmente bereit. Die Fragmente umfassen eine variable Schwereketten-domäne ( $V_H$ ), die über einen Linker an eine variable Leichtketten-domäne ( $V_L$ ) gebunden ist, der zu kurz ist, um Paarung zwischen den zwei Domänen an derselben Kette zu ermöglichen. Demgemäß werden die  $V_H$ - und  $V_L$ -Domänen eines Fragments gezwungen, Paare mit den komplementären  $V_L$ - und  $V_H$ -Domänen eines anderen Fragments zu bilden, wodurch zwei Antigen-Bindungsstellen gebildet werden. Auch eine andere Vorgehensweise zur Herstellung bispezifischer Antikörperfragmente durch die Verwendung von einkettigen Fv-(sFv-)Dimeren wurde bereits beschrieben. Siehe Gruber et al., J. Immunol. 152, 5368 (1994).

**[0142]** Antikörper mit mehr als zwei Wertigkeiten werden ebenfalls erwogen. Beispielsweise können trispezifische Antikörper hergestellt werden. Tutt et al., J. Immunol. 147, 60 (1991).

**[0143]** Beispielhafte bispezifische Antikörper können sich an zwei verschiedene Epitope an einem gegebenen PRO320-Polypeptid der vorliegenden Erfindung binden. Alternativ dazu kann ein Anti-PRO320-Polypeptidarm mit einem Arm kombiniert werden, der sich an ein Trigger-Molekül an einem Leukozyten wie beispielsweise ein T-Zellrezeptormolekül (z.B. CD2, CD3, CD28 oder B7) oder Fc-Rezeptoren für IgG (FcγR), wie z.B. FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) und FcγRIII (CD16), bindet, sodass zelluläre Abwehrmechanismen auf die Zelle fokussiert werden, die das bestimmte PRO320-Polypeptid exprimiert. Bispezifische Antikörper können auch verwendet werden, um zytotoxische Mittel zu Zellen zu lokalisieren, die ein bestimmtes PRO320-Polypeptid exprimieren. Diese Antikörper besitzen einen PRO320-Bindungsarm und einen Arm, der ein zytotoxisches Mittel oder einen Radionuclidchelatbildner bindet, wie z.B. EOTUBE, DPTA, DOTA oder TETA. Ein anderer bispezifischer Antikörper von Interesse bindet das PRO320-Polypeptid und bindet weiters Gewebefaktor (tissue factor, TF).

## 5. Heterokonjugierte Antikörper

**[0144]** Heterokonjugierte Antikörper liegen auch im Schutzzumfang der vorliegenden Erfindung. Heterokonjugierte Antikörper setzen sich aus zwei kovalent gebundenen Antikörpern zusammen. Solche Antikörper wurden beispielsweise vorgeschlagen, um Immunsystemzellen auf unerwünschte Zellen zu richten [US-Patent Nr. 4.676.980] sowie zur Behandlung von HIV-Infektion [WO 91/00360; WO 92/200373; EP 03089]. Es wird erwogen, dass die Antikörper in vitro unter Verwendung von Verfahren, die auf dem Gebiet der synthetischen Proteinchemie bekannt sind, hergestellt werden können, einschließlich jener, die Vernetzungsmittel einbinden. Beispielsweise können Immunotoxine unter Verwendung einer Disulfid-Austauschreaktion oder durch Bildung einer Thioetherbindung konstruiert werden. Beispiele für geeignete Reagenzien für diesen Zweck umfassen Iminothiolat und Methyl-4-mercaptobutyrimidat sowie jene Reagenzien, die beispielsweise im US-Patent Nr. 4.676.980 offenbart sind.

## 6. Effektorfunktionsbearbeitung

**[0145]** Es kann wünschenswert sein, den Antikörper der Erfindung hinsichtlich der Effektorfunktion zu modifizieren, um z.B. die Wirksamkeit des Antikörpers bei der Behandlung von Krebs zu steigern. Beispielsweise können ein oder mehrere Cysteinreste in die Fc-Region eingeführt werden, wodurch die Bildung von Disulfidbindungen zwischen den Ketten in dieser Region ermöglicht wird. Der so gebildete homodimere Antikörper kann verbesserte Internalisierungsfähigkeit und/oder gesteigertes komplementvermitteltes Zelltöten und antikörpervermittelte zelluläre Zytotoxizität (ADCC) aufweisen. Siehe Caron et al., J. Exp. Med. 176, 1191-1195 (1992), und Shopes, J. Immunol. 148, 2918-2922 (1992). Homodimere Antikörper mit gesteigerter Anti-Tumor-Aktivität können auch unter Verwendung heterobifunktioneller Vernetzer hergestellt werden, wie in Wolff et al., Cancer Research 53, 2560-2565 (1993), beschrieben wird. Alternativ dazu kann ein Antikörper so bearbeitet werden, dass er duale Fc-Regionen aufweist und dadurch über gesteigerte Komplementlyse- und ADCC-Fähigkeiten verfügen kann. Siehe Stevenson et al., Anti-Cancer Drug Design 3, 219-230 (1989).

## 7. Immunkonjugate

**[0146]** Die Erfindung betrifft auch Immunkonjugate, die einen Antikörper umfassen, der an ein zytotoxisches Mittel wie beispielsweise ein chemotherapeutisches Mittel, Toxin (z.B. ein enzymatisch aktives Toxin oder ein Toxin bakteriellen, pflanzlichen oder tierischen Ursprungs oder auch von Pilzen oder Fragmente davon) oder an ein radioaktives Isotop (d.h. ein Radiokonjugat) konjugiert ist.

**[0147]** Chemotherapeutische Mittel, die zur Herstellung solcher Immunkonjugate nützlich sind, wurden oben

beschrieben. Enzymatisch aktive Toxine und Fragmente davon, die verwendet werden können, umfassen Diphtherie-A-Kette, nichtbindende aktive Fragmente von Diphtherietoxin, Exotoxin-A-Kette (aus *Pseudomonas aeruginosa*), Ricin-A-Kette, Abrin-A-Kette, Modeccin-A-Kette, alpha-Sarcin, Aleurites-fordii-Proteine, Dianthin-Proteine, Phytolacca-america-Proteine (PAPI, PAPII und PAPS), Momordica-charantia-Inhibitor, Curcin, Crocin, Sapaonaria-officinalis-Inhibitor, Gelonin, Mitogellin, Restrictocin, Phenomycin, Enomycin und die Tricothecene. Zahlreiche verschiedene Radionuclide sind zur Herstellung von radiokonjugierten Antikörpern erhältlich. Beispiele umfassen  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{131}\text{In}$ ,  $^{90}\text{Y}$  und  $^{186}\text{Re}$ .

**[0148]** Konjugate des Antikörpers und des zytotoxischen Mittels werden unter Verwendung zahlreicher verschiedener bifunktioneller Proteinbindungsmittel wie z.B. N-Succinimidyl-3-(2-pyridyldithiol)propionat (SPDP), Iminothiolan (IT), bifunktionellen Derivaten von Imidoestern (wie z.B. Dimethyladipimidat-HCl), aktiver Ester (wie z.B. Disuccinimidylsuberat), Aldehyden (wie Glutaraldehyd), Bisazido-Verbindungen (wie z.B. Bis(p-azidobenzoyl)hexandiamin), Bisdiazonium-Derivaten (wie z.B. Bis(p-diazoniumbenzoyl)ethyldiamin), Diisocyanaten (wie Toluol-2,6-diisocyanat) und bis-aktiven Fluorverbindungen (wie z.B. 1,5-Difluor-2,4-dinitrobenzol) hergestellt. Beispielsweise kann ein Ricinimmunotoxin wie in Vitetta et al., Science 238, 1098 (1987), beschrieben hergestellt werden. C-14-markierte 1-Isothiocyanatobenzyl-3-methyldiethylentriaminpentaessigsäure (MX-DTPA) ist ein beispielhafter Chelatbildner zur Konjugation von Radionucleotid an den Antikörper. Siehe die WO 94/11026.

**[0149]** In einer anderen Ausführungsform kann der Antikörper an einen „Rezeptor“ (wie Streptavidin) zur Verwendung bei Tumor-Pretargeting konjugiert werden, worin das Antikörper-Rezeptor-Konjugat dem Patienten verabreicht wird, gefolgt von der Entfernung ungebundenen Konjugats aus dem Blutkreislauf unter Verwendung eines Klärungsmittels und der anschließenden Verabreichung eines „Liganden“ (z.B. Avidin), der an ein zytotoxisches Mittel (z.B. ein Radionucleotid) konjugiert ist.

#### 8. Immunoliposomen

**[0150]** Die hierin offenbarten Antikörper können auch als Immunoliposomen formuliert werden. Liposomen, die den Antikörper enthalten, werden durch auf dem Gebiet der Erfindung bekannte Verfahren hergestellt, wie sie beispielsweise in Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 3688 (1985); Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 4030 (1980); und den US-Patenten Nr. 4.485.045 und 4.544.545 beschrieben werden. Liposomen mit gesteigerter Zirkulationsdauer sind im US-Patent Nr. 5.013.556 offenbart.

**[0151]** Besonders nützliche Liposomen können durch das Umkehrphasenverdampfungsverfahren mit einer Lipidzusammensetzung, die Phosphatidylcholin, Cholesterin und PEG-derivatisiertes Phosphatidylethanolamin (PEG-PE) umfasst, hergestellt werden. Liposomen werden durch Filter von definierter Porengröße filtriert, um Liposomen mit dem erwünschten Durchmesser zu ergeben. Fab'-Fragmente des Antikörpers der vorliegenden Erfindung können an die Liposomen wie in Martin et al., J. Biol. Chem. 257, 286-288 (1982), beschrieben mittels einer Disulfid-Austauschreaktion konjugiert werden. Ein chemotherapeutisches Mittel (wie beispielsweise Doxorubicin) ist gegebenenfalls im Liposom enthalten. Siehe Gabizon et al., J. National Cancer Inst. 81(19), 1484 (1989).

F. Identifikation von Proteinen, die in der Lage sind, neoplastisches Zellwachstum oder Proliferation zu inhibieren

**[0152]** Die in der vorliegenden Anmeldung offenbarten Proteine wurden in einer Gruppe von 60 Tumorzelllinien getestet, die zur Zeit im experimentellen, Krankheits-orientierten In-vitro-Wirkstofffindungsscreen des National Cancer Institute (NCI) verwendet wird. Zweck dieses Screens ist die Identifikation von Molekülen, die zytotoxische und/oder zytostatische Aktivität gegen verschiedene Typen von Tumoren aufweisen. Das NCI screent mehr als 10.000 neue Moleküle jährlich (Monks et al., J. Natl. Cancer Inst. 83, 757-766 (1991); Boyd, Cancer: Princ. Pract. Oncol. Update 3(10), 1-12 (1989)). Die in dieser Studie verwendeten Tumorzelllinien wurden von Monks et al., s.o., beschrieben. Die Zelllinien, deren Wachstum durch die Proteine der vorliegenden Anmeldung signifikant reduziert wurde, sind in den Beispielen gesondert erwähnt.

**[0153]** Die Resultate zeigten, dass die getesteten Proteine zytostatische und, in manchen Fällen und Konzentrationen, zytotoxische Aktivitäten in zahlreichen verschiedenen Krebszelllinien zeigen und daher nützliche Kandidaten für Tumorthapie sind.

**[0154]** Andere zellbasierte Tests und Tiermodelle für Tumoren (z.B. Krebsarten) können auch verwendet werden, um die Erkenntnisse des NCI-Krebsscreens zu überprüfen und um die Beziehung zwischen dem hierin

identifizierten Protein und der Entwicklung und Pathogenese von neoplastischem Zellwachstum besser zu verstehen. Primäre Kulturen, die aus Tumoren von transgenen Tieren abstammen (nachstehend beschrieben), beispielsweise können hierin in den zellbasierten Tests verwendet werden, auch wenn stabile Zelllinien bevorzugt werden. Verfahren zur Ableitung kontinuierlicher Zelllinien aus transgenen Tieren sind auf dem Gebiet der Erfindung durchwegs bekannt (siehe z.B. Small et al., Mol. Cell. Biol. 5, 642-648 (1985)).

#### G. Tiermodelle

**[0155]** Zahlreiche verschiedene bekannte Tiermodelle können verwendet werden, um die Rolle der hierin identifizierten Moleküle bei der Entwicklung und Pathogenese von Tumoren besser zu verstehen und um die Wirksamkeit von therapeutischen Kandidatenmitteln, einschließlich Antikörper, und anderer Agonisten der nativen Polypeptide, einschließlich niedermolekularer Agonisten, zu testen. Die In-vivo-Beschaffenheit solcher Modelle macht sie besonders prognostisch für die Reaktionen in menschlichen Patienten. Tiermodelle von Tumoren und Krebsarten (z.B. Brustkrebs, Kolonkrebs, Prostatakrebs, Lungenkrebs usw.) umfassen sowohl nicht-rekombinante als auch rekombinante (transgene) Tiere. Nicht-rekombinante Tiermodelle umfassen beispielsweise Nagetiermodelle, z.B. murine Modelle. Solche Modelle können durch Einführen von Tumorzellen in syngenetische Mäuse unter Verwendung von Standardverfahren, z.B. von subkutaner Injektion, Schwanzveneninjektion, Milzimplantation, intraperitonealer Implantation, Implantation unter der Nierenkapsel oder Orthotin-Implantation, z.B. Kolonkrebszellen, die in Kolongewebe implantiert werden, gebildet werden (siehe z.B. die PCT-Veröffentlichung Nr. WO 97/33551, veröffentlicht am 18. September 1997).

**[0156]** Die wahrscheinlich in onkologischen Studien am häufigsten verwendete Tierspezies sind Mäuse mit Immunschwäche und insbesondere Nacktmäuse. Die Beobachtung, dass die Nacktmaus mit Hypo/Aplasie erfolgreich als Wirt für menschliche Tumor-Xenotransplantate eingesetzt werden könnte, führte zur weit verbreiteten Verwendung dieser Maus zu diesem Zweck. Das autosomale rezessive nu-Gen wurde in zahlreiche unterschiedliche kongene Stämme von Nacktmäusen eingeführt, einschließlich z.B. ASW, A/He, AKR, BALB/c, B10.LP, C17, C3H, C57BL, C57, CBA, DBA, DDD, 1/st, NC, NFR, NFS, NFS/N, NZB, NZC, NZW, P, RIII und SJL. Darüber hinaus wurde eine große Vielzahl an anderen Tieren mit vererbten immunologischen Defekten, die nicht Nacktmäuse waren, gezüchtet und als Rezipienten von Tumor-Xenotransplantaten verwendet. Nähere Details hierzu sind z.B. in: The Nude Mouse in Oncology Research, E. Boven & B. Winograd (Hrsg.), CRC Press Inc. (1991), zu finden.

**[0157]** Die in solche Tiere eingeführten Zellen können von bekannten Tumor/Krebszelllinien, wie z.B. von jeglichen oben genannten Tumorzelllinien, und beispielsweise von der B104-1-1-Zelllinie (stabile NIH-3T3-Zelllinie, transfiziert mit dem neu-Protoonkogen); ras-transfizierten NIH-3T3-Zellen; Caco-2 (ATCC HTB-37); einer menschlichen Kolon-Adenokarzinomzelllinie HT-29 von mäßig gut differenziertem Grad II (ATCC HTB-38) oder von anderen Tumoren und Krebsarten abstammen. Proben von Tumor- oder Krebszellen können unter Verwendung von Standardbedingungen, einschließlich Frieren und Lagern in flüssigem Stickstoff, aus Patienten im Rahmen eines chirurgischen Eingriffs gewonnen werden (Karmali et al., Br. J. Cancer 48, 689-696 (1983)).

**[0158]** Tumorzellen können in Tiere, wie z.B. Nacktmäuse, mittels zahlreicher verschiedener Verfahren eingeführt werden. Der subkutane (s.k.) Raum bei Mäusen ist für Tumorumplantation sehr gut geeignet. Tumoren können s.k. als feste Blöcke, in Form von Nadelbiopsien unter Verwendung eines Trokars oder als Zellsuspensionen transplantiert werden. Im Fall der Implantation eines festen Blocks oder mittels Trokars werden Tumorgewebefragmente mit geeigneter Größe in den s.k. Raum eingeführt. Zellsuspensionen werden frisch aus primären Tumoren oder stabilen Tumorzelllinien hergestellt und subkutan injiziert. Tumorzellen können auch als subdermale Implantate injiziert werden. Bei dieser Positionierung wird das Inokulum zwischen dem unteren Anteil des dermalen Bindegewebes und dem s.k. Gewebe platziert. Boven & Winograd (1991), s.o. Tiermodelle von Brustkrebs können beispielsweise durch Implantieren von Ratten-Neuroblastomzellen (aus denen das neu-Onkogen ursprünglich isoliert wurde) oder neu-transformierten NIH-3T3-Zellen in Nacktmäuse, im Wesentlichen wie von Drebin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 9129-9133 (1986), beschrieben, gebildet werden.

**[0159]** In ähnlicher Weise können Tiermodelle von Kolonkrebs durch Überführen von Kolonkrebszellen in Tiere, z.B. Nacktmäuse, gebildet werden, was um Auftreten von Tumoren in diesen Tieren führt. Ein orthotopisches Transplantationsmodell von menschlichem Kolonkrebs in Nacktmäusen wurde beispielsweise von Wang et al., Cancer Research 54, 4726-4728 (1994), und von Too et al., Cancer Research 55, 681-684 (1995), beschrieben. Dieses Modell basiert auf der so genannten „METAMOUSE“, die bei AntiCancer, Inc., San Diego, Kalifornien, erhältlich ist.

**[0160]** Tumoren, die in Tieren auftreten, können entfernt und in vitro kultiviert werden. Zellen aus den In-vitro-Kulturen können dann auf Tiere übertragen werden. Solche Tumoren können als Targets für weiteres Screening oder Wirkstoff-Screening dienen. Alternativ dazu können die aus der Übertragung resultierenden Tumoren isoliert werden, und RNA aus Zellen vor der Passage und Zellen, die nach einem oder mehreren Passage-Durchgängen isoliert werden, können auf differenzielle Expression von Genen von Interesse analysiert werden. Solche Passage-Verfahren können mit jeglichem bekannten Tumor oder jeglichen bekannten Krebszelllinien durchgeführt werden.

**[0161]** Meth A, CMS4, CMS5, CMS21 und WEHI-164 beispielsweise sind chemisch induzierte Fibrosarkomen von weiblichen BALB/c-Mäusen (DeLeo et al., J. Exp. Med. 146, 720 (1977)), die ein sehr gut steuerbares Modellsystem zur Untersuchung der krebsbekämpfenden Aktivitäten verschiedener Mittel bereitstellen (Palladino et al., J. Immunol. 138, 4023-4032 (1987)). Kurz zusammengefasst werden Tumorzellen in vitro in Zellkultur vermehrt. Vor der Injektion in die Tiere werden die Zelllinien gewaschen und in Puffer bei einer Zelldichte von etwa  $10 \times 10^6$  bis  $10 \times 10^7$  Zellen/ml suspendiert. Die Tiere werden dann subkutan mit 10 bis 100  $\mu$ l der Zellsuspension infiziert, was das Auftreten eines Tumors innerhalb von einer bis drei Wochen ermöglicht.

**[0162]** Darüber hinaus kann das Lewis-Lungen-(3LL)-Karzinom von Mäusen, das einer der am ausführlichsten untersuchten Versuchstumoren ist, als ein Versuchs-Tumormodell verwendet werden. Die Wirksamkeit in diesem Tumormodell wurde mit günstigen Wirkungen in der Behandlung menschlicher Patienten, deren Diagnose kleinzelliges Lungenkarzinom (SCCL) lautet, korreliert. Dieser Tumor kann in normale Mäuse durch Injektion von Tumorfragmenten aus einer erkrankten Maus oder von Zellen, die in Kultur gehalten werden, eingeführt werden (Zupi et al., Br. J. Cancer 41, Beilage 4, 309 (1980)), und Beweise zeigen, dass sich Tumoren sogar durch die Injektion einer einzelnen Zelle entwickeln können und dass ein sehr großer Anteil infizierter Tumorzellen überleben. Nähere Informationen zu diesem Tumormodell sind in Zacharski, Haemostasis 16, 300-320 (1986), zu finden.

**[0163]** Eine Art, die Wirksamkeit einer Testverbindung in einem Tiermodell auf einen implantierten Tumor zu bewerten, ist das Messen der Größe des Tumors vor und nach der Behandlung. Herkömmlicherweise wurde die Größe implantierter Tumoren mit einer Schublehre in zwei oder drei Dimensionen gemessen. Das auf zwei Dimensionen eingeschränkte Maß spiegelt die Größe des Tumors nicht exakt wider, und daher wird es üblicherweise unter Verwendung einer mathematischen Formel in das entsprechende Volumen umgerechnet. Das Messen von Tumorgößen führt jedoch nur zu sehr inexakten Resultaten. Die therapeutischen Wirkungen eines Wirkstoffkandidaten kann besser als behandlungsinduzierte Wachstumsverzögerung und spezifische Wachstumsverzögerung beschrieben werden. Eine andere wichtige Variable bei der Beschreibung von Tumorstadium ist die Zeit, die der Tumor braucht, um sein Volumen zu verdoppeln. Computerprogramme zur Berechnung und Beschreibung von Tumorstadium sind ebenfalls erhältlich, wie beispielsweise das Programm, über das Rygaard & Spang-Thomsen, Proc. 6th Int. Workshop on Immune-Deficient Animals, Wu & Sheng (Hrsg.), Basel, 301 (1989), berichteten. Es gilt jedoch anzumerken, dass Nekrose und Entzündungsreaktionen nach der Behandlung, zumindest anfänglich, tatsächlich zu einer Steigerung der Tumorstadium führen können. Daher müssen diese Veränderungen sorgfältig mittels einer Kombination aus einem morphometrischen Verfahren und einer Durchflusszytometrieanalyse beobachtet werden.

**[0164]** Rekombinante (transgene) Tiermodelle können durch das Einführen des kodierenden Abschnitts der hierin identifizierten Gene in das Genom von Tieren von Interesse unter Verwendung von Standardverfahren zur Bildung transgener Tiere gentechnisch verändert werden. Tiere, die als Target für transgene Manipulation dienen können, umfassen, ohne darauf beschränkt zu sein, Mäuse, Ratten, Kaninchen, Meerschweinchen, Schafe, Ziegen, Schweine und nicht-menschliche Primaten, z.B. Paviane, Schimpansen und Affen. Verfahren, die auf dem Gebiet der Erfindung bekannt sind, um ein Transgen in solche Tiere einzuführen, umfassen pronukleare Mikroinjektion (Hoppe & Wanger, US-Patent Nr. 4.873.191); Retrovirus-vermittelten Gentransfer in Keimlinien (z.B. Van der Putten et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 6148-615 (1985)); Gentransfer in embryonalen Stammzellen (Thompson et al., Cell 56, 313-321 (1989)); Elektroporation von Embryonen (Lo, Mol. Cell. Biol. 3, 1803-1814 (1983)); und Sperma-vermittelten Gentransfer (Lavitrano et al., Cell 57, 717-773 (1989)). Ein Überblick hierzu ist beispielsweise im US-Patent Nr. 4.736.866 zu finden.

**[0165]** Für den Zweck der vorliegenden Erfindung umfassen transgene Tiere jene, die das Transgen nur in einem Teil ihrer Zellen tragen („Mosaik-Tiere“). Das Transgen kann entweder als ein einzelnes Transgen oder in Concatameren, z.B. Kopf-an-Kopf- oder Kopf-an-Schwanz-Tandems, integriert werden. Selektives Einführen eines Transgens in einen bestimmten Zelltyp ist ebenfalls möglich, beispielsweise gemäß dem Verfahren von Lasko et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 6232-636 (1992).

**[0166]** Die Expression des Transgens in transgenen Tieren kann mittels Standardverfahren überwacht werden. Southern-Blot-Analyse oder PCR-Amplifikation beispielsweise kann verwendet werden, um die Integration des Transgens zu überprüfen. Das Niveau von mRNA-Expression kann anschließend unter Verwendung von Verfahren wie z.B. In-situ-Hybridisierung, Northern-Blot-Analyse, PCR oder Immunocytochemie analysiert werden. Die Tiere werden ferner auf Zeichen von Tumor- oder Krebsentwicklung untersucht.

**[0167]** Die Wirksamkeit von Antikörpern, die sich spezifisch an die hierin identifizierten Polypeptide und andere Wirkstoffkandidaten binden, kann auch bei der Behandlung von spontanen Tiertumoren getestet werden. Ein geeignetes Target für solche Studien ist das feline orale Plattenepithelkarzinom. Felines orales Plattenepithelkarzinom ist ein höchst invasiver, maligner Tumor, der die am häufigsten auftretende orale Malignität bei Katzen mit mehr als 60 % der oralen Tumoren, von denen bei dieser Spezies berichtet wird, darstellt. Dieser Tumor metastasiert nur selten in entfernte Stellen, wobei jedoch dieses seltene Vorkommen von Metastasen lediglich ein Resultat der kurzen Überlebensdauer von Katzen, die an diesem Tumor erkrankt sind, sein kann. Diese Tumoren können üblicherweise keinem chirurgischen Eingriff unterzogen werden, hauptsächlich aufgrund der Anatomie der felines Mundhöhle. Zur Zeit gibt es noch kein wirksames Behandlungsverfahren für diesen Tumor. Vor Aufnahme in diese Studie wird jede Katze einer vollständigen klinischen Untersuchung, einer Biopsie, unterzogen und wird mittels Computertomographie (CT) gescannt. Katzen, für die sublinguale orale Plattenepitheltumoren diagnostiziert werden, werden von der Studie ausgeschlossen. Die Zunge kann infolge eines solchen Tumors gelähmt werden, und auch wenn die Behandlung den Tumor abtötet, sind die Tiere nicht in der Lage, selbstständig ausreichend Nahrung aufzunehmen. Jede Katze wird wiederholt innerhalb eines längeren Zeitraums behandelt. Im Verlauf der Behandlungszeit werden täglich Photographien von den Tumoren gemacht, und auch bei jeder Nachuntersuchung wird gleich vorgegangen. Nach der Behandlung wird jede Katze einer weiteren CT unterzogen. CTs und Thorax-Radiogramme werden hiernach alle 8 Wochen ausgewertet. Die Daten werden auf Unterschiede bezogen auf das Überleben, die Reaktion und die Toxizität im Vergleich zu Kontrollgruppen evaluiert. Eine positive Reaktion kann einen Beweis für Tumorregression erfordern, vorzugsweise mit gleichzeitiger Verbesserung der Lebensqualität und/oder verlängerter Lebenserwartung.

**[0168]** Darüber hinaus können auch andere spontane Tiertumoren, wie z.B. Fibrosarkom, Adenokarzinom, Lymphom, Chondrom, Leiomyosarkom, von Hunden, Katzen und Pavianen getestet werden. Von diesen ist das Mammaadenokarzinom in Hunden und Katzen ein bevorzugtes Modell, da sein Auftreten und Verhalten jenen Karzinomen in Menschen sehr ähnlich sind. Die Verwendung dieses Modells ist jedoch durch das seltene Auftreten dieses Typs von Tumor in Tieren limitiert.

#### H. Screening-Tests für Wirkstoffkandidaten

**[0169]** Screening-Tests für Wirkstoffkandidaten werden entworfen, um Verbindungen zu identifizieren, die sich kompetitiv an den/die Rezeptor(en) der hierin identifizierten Polypeptide binden oder damit kompetitiv einen Komplex bilden oder auf andere Weise durch (einen) solche(n) Rezeptor(en) Signale abgeben. Solche Screening-Tests umfassen Tests, die auf Hochdurchsatzscreenen chemischer Bibliotheken anwendbar sind, was sie besonders geeignet zur Identifikation von niedermolekularen Wirkstoffkandidaten macht. Kleine Moleküle, die in Betracht gezogen werden, umfassen synthetische organische und anorganische Verbindungen, einschließlich Peptide, vorzugsweise löslicher Peptide, (Poly)peptid-Immunglobulininfusionen und, insbesondere, Antikörper, umfassend, ohne darauf eingeschränkt zu sein, poly- und monoklonale Antikörper und Antikörperfragmente, einkettige Antikörper, anti-idiotypische Antikörper und chimäre oder humanisierte Versionen solcher Antikörper oder Fragmente sowie menschliche Antikörper und Antikörperfragmente. Die Tests können in zahlreichen verschiedenen Formaten durchgeführt werden, einschließlich Protein-Protein-Bindungstests, biochemischer Screening-Tests, Immunotests und zellbasierter Tests, die auf dem Gebiet der Erfindung gut beschrieben sind.

**[0170]** Bei Bindungstests ist die stattfindende Wechselwirkung Bindung, und der gebildete Komplex kann isoliert oder im Reaktionsgemisch nachgewiesen werden. In einer bestimmten Ausführungsform wird ein Rezeptor eines Polypeptids, für den das hierin identifizierte Gen kodiert, oder der Wirkstoffkandidat an einer Festphase, z.B. an einer Mikrotiterplatte, durch kovalente oder nichtkovalente Bindung isoliert. Nichtkovalente Bindung erfolgt im Allgemeinen durch Beschichten der festen Oberfläche mit einer Lösung des Polypeptids und Trocknen. Alternativ dazu kann ein immobilisierter Antikörper, z.B. ein monoklonaler Antikörper, der für das zu immobilisierende Polypeptid spezifisch ist, verwendet werden, um es an einer festen Oberfläche zu verankern. Der Test wird durch Zusetzen der nicht-immobilisierten Komponente, die mit einer nachweisbaren Markierung markiert sein kann, zur immobilisierten Komponente, z.B. der beschichteten Oberfläche, die die verankerte Komponente enthält, durchgeführt. Sobald die Reaktion abgeschlossen ist, werden die nicht umgesetzten

Komponenten, z.B. durch Waschen, entfernt, und Komplexe, die an der festen Oberfläche verankert sind, werden detektiert. Trägt die ursprünglich nicht immobilisierte Komponente eine nachweisbare Markierung, so weist die Detektion von Markierung, die an der Oberfläche immobilisiert ist, darauf hin, dass es zu Komplexbildung gekommen ist. Trägt die ursprünglich nicht immobilisierte Komponente keine Markierung, so kann Komplexbildung beispielsweise unter Verwendung eines markierten Antikörpers, der sich spezifisch an den immobilisierten Komplex bindet, nachgewiesen werden.

**[0171]** Findet zwischen der Kandidatenverbindung und einem bestimmten Rezeptor Wechselwirkung statt, kommt es jedoch zu keiner Bindung zwischen den beiden, so kann ihre Wechselwirkung mit diesem Polypeptid mittels Verfahren getestet werden, die zur Detektion von Protein-Protein-Wechselwirkungen bekannt sind. Solche Tests umfassen herkömmliche Ansätze, wie z.B. Vernetzung, Co-Immunfällung und Co-Reinigung durch Gradienten oder Chromatographiesäulen. Darüber hinaus können Protein-Protein-Wechselwirkungen unter Verwendung eines Hefe-basierten genetischen Systems, das von Fields und Mitarbeitern beschrieben wird (Fields & Song, *Nature* (London) 340, 245-246 (1989); Chien et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 9578-9582 (1991)), wie von Chevray & Nathans (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 5789-5793 (1991)) offenbart, überwacht werden. Zahlreiche Transkriptionsaktivatoren, wie z.B. Hefe-GAL4, bestehen aus zwei physikalisch unterschiedlichen modularen Domänen, wobei eine als DNA-Bindungsdomäne wirkt, während die andere als Transkriptionsaktivierungsdomäne funktioniert. Das in den oben genannten Publikationen beschriebene Hefeexpressionssystem (im Allgemeinen als „Zwei-Hybrid-System“ bezeichnet) profitiert von dieser Eigenschaft und verwendet zwei Hybridproteine, eines, in dem das Targetprotein an die DNA-Bindungsdomäne von GAL4 fusioniert ist, und ein anderes, in dem Kandidaten-Aktivierungsproteine an die Aktivierungsdomäne fusioniert sind. Die Expression eines GAL1-lacZ-Reportergens unter der Steuerung eines GAL4-aktivierten Promotors hängt von der Wiederherstellung von GAL4-Aktivität über Protein-Protein-Wechselwirkung ab. Kolonien, die wechselwirkende Polypeptide enthalten, werden mit einem chromogenen Substrat für  $\beta$ -Galactosidase nachgewiesen. Ein vollständiges Set (MATCHMAKER™) zur Identifikation von Protein-Protein-Wechselwirkungen zwischen zwei spezifischen Proteinen unter Verwendung des Zwei-Hybrid-Verfahrens ist im Handel bei Clontech erhältlich. Dieses System kann auch erweitert werden, um Proteindomänen, die in spezifische Proteinwechselwirkungen eingebunden sind, zu kartieren sowie um Aminosäurereste, die für diese Wechselwirkungen maßgeblich sind, zu lokalisieren.

#### I. Pharmazeutische Zusammensetzungen

**[0172]** Die Polypeptide der vorliegenden Erfindung, Agonisten-Antikörper, die hierin identifizierte Proteine spezifisch binden, sowie andere Moleküle, die durch die hierin offenbarten Screening-Tests identifiziert werden, können zur Behandlung von Tumoren, einschließlich Krebs, in Form von pharmazeutischen Zusammensetzungen verabreicht werden.

**[0173]** Werden Antikörperfragmente verwendet, so wird das kleinste inhibierende Fragment, das sich spezifisch an die Bindungsdomäne des Targetproteins bindet, bevorzugt. Basierend auf den Sequenzen der variablen Regionen eines Antikörpers beispielsweise können Peptidmoleküle entworfen werden, die die Fähigkeit beibehalten, die Targetproteinsequenz zu binden. Solche Peptide können chemisch synthetisiert und/oder mittels DNA-Rekombinationsverfahren produziert werden (siehe z.B. Marasco et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 7889-7893(1993)).

**[0174]** Die Formulierung hierin kann, je nach Bedarf für die bestimmte zu behandelnde Indikation, auch mehr als eine aktive Verbindung enthalten, vorzugsweise jene mit komplementären Aktivitäten, die sich gegenseitig nicht negativ beeinflussen. Alternativ oder zusätzlich dazu kann die Zusammensetzung ein Mittel umfassen, das ihre Funktion verstärkt, wie z.B. ein zytotoxisches Mittel, ein Cytokin, ein chemotherapeutisches Mittel oder ein wachstumshemmendes Mittel. Solche Moleküle sind geeigneterweise in Kombination in Mengen vorhanden, die für den beabsichtigten Zweck wirksam sind.

**[0175]** Therapeutische Formulierungen der hierin identifizierten Polypeptide oder Agonisten davon werden zur Lagerung durch Vermischen des Wirkstoffs mit dem erwünschten Reinheitsgrad mit optionalen, pharmazeutisch annehmbaren Trägern, Arzneimittelträgern oder Stabilisatoren (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16. Auflage, A. Osol. (Hrsg.) (1980)) in Form von lyophilisierten Formulierungen oder wässrigen Lösungen hergestellt. Annehmbare Träger, Arzneimittelträger oder Stabilisatoren sind bei den verwendeten Dosierungen und Konzentrationen gegenüber Rezipienten nichttoxisch und umfassen Puffer wie z.B. Phosphat, Citrat und andere organische Säuren; Antioxidanzien, einschließlich Ascorbinsäure und Methionin; Konservierungsmittel (wie z.B. Octadecyldimethylbenzylammoniumchlorid; Hexamethoniumchlorid; Benzalkoniumchlorid, Benzethoniumchlorid; Phenol, Butyl- oder Benzylalkohol; Alkylparabene wie z.B. Methyl- oder Propylpara-



ben; Catechin, Resorcin; Cyclohexanol; 3-Pentanol; und m-Kresol); niedermolekulare Polypeptide (mit weniger als etwa 10 Resten); Proteine wie z.B. Serumalbumin, Gelatine oder Immunglobuline; hydrophile Polymere wie z.B. Polyvinylpyrrolidon; Aminosäuren wie Glycin, Glutamin, Asparagin, Histidin, Arginin oder Lysin; Monosaccharide, Disaccharide und andere Kohlenhydrate einschließlich Glucose, Mannose oder Dextrine; Chelatbildner wie EDTA; Zucker wie z.B. Saccharose, Mannit, Trehalose oder Sorbit; salzbildende Gegenionen wie Natrium; Metallkomplexe (z.B. Zn-Protein-Komplexe); und/oder nichtionische Tenside wie TWEEN<sup>TM</sup>, PLURONICS<sup>TM</sup> oder Polyethylenglykol (PEG).

**[0176]** Die Formulierung hierin kann, je nach Erfordernis für die bestimmte zu behandelnde Indikation, auch mehr als eine aktive Verbindung enthalten, vorzugsweise solche mit komplementären Aktivitäten, die sich gegenseitig nicht negativ beeinflussen. Alternativ oder zusätzlich dazu kann die Zusammensetzung ein zytotoxisches Mittel, Cytokin oder ein wachstumshemmendes Mittel umfassen. Solche Moleküle sind geeigneterweise in Kombination in Mengen, die für den beabsichtigten Zweck wirksam sind, vorhanden.

**[0177]** Die Wirkstoffe können auch in Mikrokapseln eingeschlossen sein, die beispielsweise durch Koazervierungsverfahren oder durch Grenzflächenpolymerisation hergestellt werden, beispielsweise Hydroxymethylcellulose bzw. Gelatine-Mikrokapseln und Poly(methylmethacrylat)-Mikrokapseln in kolloidalen Wirkstoffzufuhrsystemen (beispielsweise Liposomen, Albuminmikrokügelchen, Mikroemulsionen, Nanopartikeln und Nanokapseln), oder in Makroemulsionen. Solche Verfahren sind in Remington's Pharmaceutical Sciences, 16. Auflage, A. Osol (Hrsg.) (1980), offenbart.

**[0178]** Die zur In-vivo-Verabreichung zu verwendenden Formulierungen müssen steril sein. Dies kann leicht durch Filtration durch sterile Filtrationsmembranen vor oder nach Lyophilisierung und Rekonstitution erreicht werden.

**[0179]** Therapeutische Zusammensetzungen hierin werden im Allgemeinen in Behältnisse gegeben, die eine sterile Zugangsöffnung aufweisen, beispielsweise einen intravenösen Lösungsbeutel oder eine Phiole mit einem Septum, das mit einer subkutanen Injektionsnadel durchstoichen werden kann.

**[0180]** Es können Retardpräparate hergestellt werden. Geeignete Beispiele für Retardpräparate umfassen semipermeable Matrices aus festen hydrophoben Polymeren, die den Antikörper enthalten, wobei diese Matrices in Form von Formartikeln, z.B. Folien oder Mikrokapseln, vorliegen. Beispiele für Retard-Matrices umfassen Polyester, Hydrogele (beispielsweise Poly(2-hydroxyethylmethacrylat) oder Poly(vinylalkohol)), Polylactide (US-Patent Nr. 3.773.919), Copolymere aus L-Glutaminsäure und  $\gamma$ -Ethyl-L-glutamat, nicht-abbaubares Ethylenvinylacetat, abbaubare Milchsäure-Glykolsäure-Copolymere wie z.B. LUPRON DEPOT<sup>TM</sup> (injizierbare Mikrokügelchen, zusammengesetzt aus Milchsäure-Glykolsäure-Copolymer und Leuprolidacetat) und Poly-D-(-)-3-hydroxybuttersäure. Während Polymere wie Ethylenvinylacetat und Milchsäure-Glykolsäure die Freisetzung von Molekülen über mehr als 100 Tage hinweg ermöglichen, setzen bestimmte Hydrogele Proteine innerhalb von kürzeren Zeiträumen frei. Bleiben eingekapselte Antikörper länger im Körper zurück, so können sie infolge der Aussetzung gegenüber Feuchtigkeit bei 37 °C denaturieren oder aggregieren, was zu einem Verlust von biologischer Aktivität und möglichen Veränderungen der Immunogenität führt. Je nach eingebundenem Mechanismus können vernünftige Vorgehensweisen zur Stabilisierung entwickelt werden. Wird der Aggregationsmechanismus beispielsweise als intermolekulare S-S-Bindungsbildung über Thio-Disulfid-Wechselwirkung erkannt, so kann Stabilisierung durch Modifizieren von Sulfhydrylresten, Lyophilisieren aus sauren Lösungen, Steuern des Feuchtigkeitsgehalts, Verwenden geeigneter Additive und Entwickeln spezifischer Polymermatrixzusammensetzungen erzielt werden.

## J. Behandlungsverfahren

**[0181]** Es wird erwogen, dass die Polypeptide der vorliegenden Erfindung und ihre Agonisten, einschließlich Antikörper, Peptide und niedermolekularer Agonisten, verwendet werden können, um verschiedene Tumoren, z.B. Krebsarten, zu behandeln. Beispiele für Leiden oder Erkrankungen, die behandelt werden können, umfassen benigne oder maligne Tumoren (z.B. Nieren-, Leber-, Blasen-, Brust-, Magen-, Ovarial-, Kolorektal-, Prostata-, Bauchspeicheldrüsen-, Lungen-, Vulva-, Schilddrüsen- und hepatische Karzinome; Sarkome; Glioblastome; und verschiedene Kopf- und Halstumoren); Leukämiearten und Malignitäten an den Lymphorganen; andere Erkrankungen wie neuronale, gliale, Astrozyten-, Hypothalamus- und andere Drüsenstörungen, Makrophagen-, Epithel-, Stroma- und Blastozöl-Erkrankungen; und Entzündungs-, Gefäßbildungs- und Immunkrankheiten. Die Antitumormittel der vorliegenden Erfindung (einschließlich der hierin offenbarten Polypeptide und Agonisten, die ihre Aktivität nachahmen, z.B. Antikörper, Peptide und kleine organische Moleküle) werden einem Säugetier, vorzugsweise einem Menschen, gemäß bekannten Verfahren, wie z.B. durch intravenöse Ver-

abreichung in Form eines Bolus oder durch kontinuierliche Infusion über einen bestimmten Zeitraum hinweg oder durch intramuskuläre, intraperitoneale, intrazerebrspinale, intraokulare, intraarterielle, intraläsionale, subkutane, intraartikuläre, intrasynoviale, intrathekale, orale oder topische Verabreichung oder durch Inhalation, verabreicht.

**[0182]** Andere therapeutische Behandlungspläne können mit der Verabreichung der Antikrebsmittel der vorliegenden Erfindung kombiniert werden. Beispielsweise kann der mit solchen Antikrebsmitteln zu behandelnde Patient auch gleichzeitig Strahlentherapie unterzogen werden. Alternativ oder zusätzlich dazu kann dem Patienten ein chemotherapeutisches Mittel verabreicht werden. Präparate und Dosierungspläne für solche chemotherapeutischen Mittel können gemäß den Anweisungen des Herstellers oder laut empirischer Bestimmung durch den Facharzt verwendet werden. Herstellungs- und Dosierungspläne für solch eine Chemotherapie werden auch in *Chemotherapy Service*, M.C. Perry (Hrsg.), Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992), beschrieben. Das chemotherapeutische Mittel kann vor oder nach Verabreichung des Antitumormittels der vorliegenden Erfindung verabreicht werden oder kann auch gleichzeitig damit zugeführt werden. Die Antikrebsmittel der vorliegenden Erfindung können mit einer Anti-Östrogen-Verbindung wie Tamoxifen oder einem Anti-Progesteron wie Onapriston (siehe die EP 616.812) in für solche Moleküle bekannten Dosierungen kombiniert werden.

**[0183]** Es kann wünschenswert sein, auch Antikörper gegen Tumor-assoziierte Antigene zu verabreichen, wie beispielsweise Antikörper, die sich an ErbB2, EGFR, ErbB3, ErbB4 oder Gefäßendothelwachstumsfaktor (VEGF) binden. Alternativ oder zusätzlich dazu können zwei oder mehrere Antikörper, die dieselben oder zwei oder mehrere verschiedene Krebs-assoziierte Antigene binden, dem Patienten gleichzeitig verabreicht werden. Manchmal kann es von Nutzen sein, dem Patienten auch ein oder mehrere Cytokine zu verabreichen. In einer bevorzugten Ausführungsform werden die vorliegenden Antikrebsmittel zusammen mit einem wachstumshemmenden Mittel verabreicht. Das wachstumshemmende Mittel kann beispielsweise als erstes verabreicht werden, und hierauf folgt die Verabreichung eines Antikrebsmittels der vorliegenden Erfindung. Ebenfalls werden jedoch auch gleichzeitige Verabreichung oder Verabreichung des Antikrebsmittels der vorliegenden Erfindung als erstes in Betracht gezogen. Geeignete Dosierungen für das wachstumshemmende Mittel sind jene, die zur Zeit verwendet werden, und können aufgrund der kombinierten Wirkung (Synergie) des wachstumshemmenden Mittels und des vorliegenden Antikörpers reduziert werden.

**[0184]** Zur Prävention oder Behandlung von Erkrankung hängt die geeignete Dosierung eines Antitumormittels der vorliegenden Erfindung vom Typ der zu behandelnden Erkrankung, wie oben definiert, von Schwere und Verlauf der Erkrankung, davon, ob das Mittel zu präventiven oder therapeutischen Zwecken verabreicht wird, von der Anamnese des Patienten und seiner Reaktion auf das Mittel sowie vom Ermessen des behandelnden Arztes ab. Das Mittel wird dem Patienten geeigneterweise einmalig oder im Rahmen einer Reihe von Behandlungen verabreicht. Tierversuche liefern zuverlässige Hinweise auf die Festlegung wirksamer Dosen für die Therapie für Menschen. Das Umrechnen wirksamer Dosen von einer Spezies auf eine andere kann gemäß den Prinzipien erfolgen, die von J. Mordenti & W. Chappell, „The use of interspecies scaling in toxicokinetics“, in: *Toxicokinetics and New Drug Development*, Yacobi et al. (Hrsg.), Pergamon Press, New York, 42-96 (1989), dargelegt wurden.

**[0185]** Je nach Typ und Schwere der Erkrankung sind beispielsweise etwa 1 µg/kg bis 15 mg/kg (z.B. 0,1-20 mg/kg) des Antitumormittels eine anfängliche Kandidatendosierung zur Verabreichung an den Patienten entweder mittels einer oder mehrerer getrennter Verabreichungen oder mittels kontinuierlicher Infusion. Eine typische tägliche Dosierung kann, je nach den oben genannten Faktoren, im Bereich von etwa 1 µg/kg bis 100 mg/kg oder mehr liegen. Im Fall der wiederholten Verabreichung über mehrere Tage hinweg oder länger wird, je nach betreffendem Leiden, die Behandlung fortgesetzt, bis eine erwünschte Unterdrückung der Krankheitssymptome eintritt. Es können jedoch auch andere Dosierungspläne nützlich sein. Der Fortschritt dieser Therapie kann leicht mittels herkömmlicher Verfahren und Tests überwacht werden. Ein Leitfaden zu bestimmen Dosierungen und Verabreichungsverfahren ist in der Literatur zu finden; siehe beispielsweise die US-Patente Nr. 4.657.760; 5.206.344 oder 5.225.212. Es wird vorweggenommen, dass verschiedene Formulierungen für verschiedene Behandlungsverbindungen und verschiedene Erkrankungen wirksam sind, dass die Verabreichung, die auf ein Organ oder Gewebe abzielt, beispielsweise die Zufuhr des Wirkstoffs auf eine andere Weise erfordern kann als im Fall eines anderen Organs oder Gewebes.

#### K. Herstellungsartikel

**[0186]** In einer anderen Ausführungsform der Erfindung wird ein Herstellungsartikel, der Materialien enthält, die für die Diagnose oder Behandlung der oben beschriebenen Erkrankungen nützlich sind, bereitgestellt. Der Herstellungsartikel umfasst ein Behältnis und eine Markierung. Geeignete Behältnisse umfassen beispielsweise

se Flaschen, Phiolen, Spritzen und Teströhrchen. Die Behältnisse können aus zahlreichen verschiedenen Materialien wie z.B. Glas oder Kunststoff hergestellt sein. Das Behältnis enthält eine Zusammensetzung, die zur Diagnose oder Behandlung des Leidens wirksam ist, und kann eine sterile Zugangsöffnung aufweisen (beispielsweise kann das Behältnis ein intravenöser Lösungsbeutel oder eine Phiole mit einem Septum, das mit einer subkutanen Injektionsnadel durchstoßen werden kann, sein). Der Wirkstoff in der Zusammensetzung ist ein Antitumormittel der vorliegenden Erfindung. Die Markierung am Behältnis oder in Verbindung mit dem Behältnis gibt an, dass die Zusammensetzung zur Diagnose oder Behandlung der betreffenden Erkrankung verwendet wird. Der Herstellungsartikel kann ferner ein zweites Behältnis umfassen, das einen pharmazeutisch annehmbaren Puffer wie z.B. phosphatgepufferte Kochsalzlösung, Ringer-Lösung und Dextrose-Lösung umfasst. Weiters kann er andere Materialien umfassen, die aus wirtschaftlicher Sicht und aus der Sicht des Benutzers wünschenswert sind, einschließlich anderer Puffer, Verdünnungsmittel, Filter, Nadeln, Spritzen und Packungsbeilagen mit Bedienungsanleitungen.

**[0187]** Die folgenden Beispiele werden ausschließlich zur Veranschaulichung und in keiner Weise als Einschränkung des Schutzzumfangs der vorliegenden Erfindung bereitgestellt.

**[0188]** Alle in der vorliegenden Beschreibung zitierten Patente und Literaturverweise sind als Ganzes durch Verweis hierin aufgenommen.

## BEISPIELE

**[0189]** Im Handel erhältliche Reagenzien, auf die in den Beispielen verwiesen wird, wurden, außer anders angemerkt, gemäß den Vorschriften der Hersteller verwendet. Die Quelle jener Zellen, die in den folgenden Beispielen und in der gesamten Beschreibung durch ATCC-Zugriffsnummern identifiziert werden, ist die American Type Culture Collection, Manassas, VA.

## BEISPIEL 1

Screening von extrazellulärer Domänenhomologie zur Identifikation neuer Polypeptide und von cDNA, die dafür kodiert

**[0190]** Die extrazellulären Domänen-(ECD-)Sequenzen (einschließlich der Sekretionssignalsequenz, sofern vorhanden) aus etwa 950 bekannten sekretierten Proteinen aus der öffentlich zugänglichen Swiss-Prot-Datenbank wurden verwendet, um EST-Datenbasen zu durchsuchen. Die EST-Datenbanken umfassten öffentliche Datenbanken (z.B. Dayhoff, GenBank) und private Datenbanken (z.B. LIFESEQ™, Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA). Die Suche wurde unter Verwendung des Computerprogramms BLAST oder BLAST-2 (Altschul et al., Methods in Enzymology 266, 460-480 (1996)) in Form eines Vergleichs der ECD-Proteinsequenzen mit einer 6-Raster-Translation der EST-Sequenzen durchgeführt. Diese Vergleiche mit einem BLAST-Score von 70 (oder in manchen Fällen von 90) oder mehr, die nicht für bekannte Proteine kodierten, wurden gruppiert und mit dem Programm "phrap" (Phil Green, University of Washington, Seattle, WA) zu Consensus-DNA-Sequenzen assembliert.

**[0191]** Unter Verwendung dieses Homologie-Screens der extrazellulären Domänen wurden Consensus-DNA-Sequenzen in Bezug auf die anderen identifizierten EST-Sequenzen unter Verwendung von phrap angeordnet. Weiters wurden die erhaltenen Consensus-DNA-Sequenzen häufig (jedoch nicht immer) mittels Wiederholungszyklen von BLAST oder BLAST-2 und phrap verlängert, um die Consensus-Sequenz so weit wie möglich unter Verwendung der Quellen von zuvor erläuterten EST-Sequenzen zu verlängern.

**[0192]** Auf Grundlage der wie zuvor beschrieben erhaltenen Consensus-Sequenzen wurden Oligonucleotide anschließend synthetisiert und verwendet, um mittels PCR eine cDNA-Bibliothek zu identifizieren, die die Sequenz von Interesse enthielt, und wurden auch als Sonden eingesetzt, um einen Klon der Vollängen-Kodiersequenz für ein PRO-Polypeptid zu isolieren. Vorwärts- und Rückwärts-PCR-Primer weisen im Allgemeinen 20 bis 30 Nucleotide auf und sind oft so beschaffen, dass sie ein PCR-Produkt mit einer Länge von etwa 100-1.000 bp ergeben. Die Sondensequenzen weisen typischerweise eine Länge von 40-55 bp auf. In manchen Fällen werden zusätzliche Oligonucleotide synthetisiert, wenn die Consensussequenz länger als etwa 1-1,5 kbp ist. Um mehrere Bibliotheken auf einen Vollängenklon zu screenen, wurde DNA aus den Bibliotheken durch PCR-Amplifikation, wie von Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, beschrieben, mit dem PCR-Primerpaar gescreent. Eine positive Bibliothek wurde dann verwendet, um unter Verwendung des Sonden-Oligonucleotids und eines der Primerpaare Klone zu isolieren, die für das Gen von Interesse kodieren.

**[0193]** Die cDNA-Bibliotheken, die zur Isolation der cDNA-Klone verwendet wurden, wurden mittels herkömmlicher Verfahren unter Verwendung von im Handel erhältlichen Reagenzien wie jenen von Invitrogen, San Diego, CA, konstruiert. Die cDNA wurde mit Oligo-dT, das eine NotI-Stelle enthielt, geprimt, mit dem Blunt-Ende an hemikinasierte Sall-Adaptoren gebunden, mit NotI gespaltet, auf geeignete Weise durch Gelelektrophorese klassiert und in einer definierten Ausrichtung in einen geeigneten Kloniervektor (wie z.B. pRKB oder pRKD; pRK5B ist ein Vorläufer von pRK5D, der die SfiI-Stelle nicht enthält; siehe Holmes et al., Science 253, 1278-1280 (1991)) in den einmaligen XhoI- und NotI-Stellen kloniert.

## BEISPIEL 2

### Isolierung von cDNA-Klonen, die für menschliches PRO320 kodieren

**[0194]** Eine Consensus-DNA-Sequenz wurde in Bezug auf andere EST-Sequenzen unter Verwendung von phrap wie vorangehend in Beispiel 1 beschrieben assembliert. Diese Consensus-Sequenz wird hierin als DNA28739 bezeichnet. Basierend auf der DNA28739-Consensus-Sequenz wurden Oligonucleotide synthetisiert: 1) um durch PCR eine cDNA-Bibliothek zu identifizieren, die die Sequenz von Interesse enthält, und 2) zur Verwendung als Sonden, um einen Klon der Kodiersequenz voller Länge für PRO320 zu isolieren.

**[0195]** PCR-Primer (vorwärts und rückwärts) wurden synthetisiert:

Vorwärts-PCR-Primer:

5'-CCTCAGTGGCCACATGCTCATG-3' (Seq.-ID Nr. 3)

Rückwärts-PCR-Primer:

5'-GGCTGCACGTATGGCTATCCATAG-3' (Seq.-ID Nr. 4)

**[0196]** Darüber hinaus wurde eine synthetische Oligonucleotid-Hybridisierungssonde aus der Consensus-DNA28739-Sequenz konstruiert, die die folgende Nucleotidsequenz aufwies:

Hybridisierungssonde:

5'-GATAAACTGTCAGTACAGCTGTGAAGACACAGAAGAAGGGCCACAGTGCC-3' (Seq.-ID Nr. 5)

**[0197]** Um mehrere Bibliotheken auf eine Quelle eines Klons voller Länge zu screenen, wurde DNA aus den Bibliotheken mittels PCR-Amplifikation mit dem oben identifizierten PCR-Primerpaar gescreent. Eine positive Bibliothek wurde dann verwendet, um Klone, die für das PRO320-Gen kodieren, unter Verwendung des Sondenoligonucleotids und eines der PCR-Primer zu isolieren. RNA zur Konstruktion der cDNA-Bibliotheken wurde aus menschlichem fötalen Lungengewebe (LIB025) isoliert.

**[0198]** DNA-Sequenzieren der wie zuvor beschrieben isolierten Klone ergab die DNA-Sequenz voller Länge für DNA32284-1307 [Fig. 1, Seq.-ID Nr. 1]; und die abgeleitete Proteinsequenz für PRO320.

**[0199]** Die gesamte Kodiersequenz von DNA32284-1307 ist in Fig. 1 (Seq.-ID Nr. 1) gezeigt. Klon DNA32284-1307 enthält einen einzelnen offenen Leseraster mit einer eindeutigen Translationsstartstelle an Nucleotidpositionen 135-137 und endet mit dem Stoppcodon an Nucleotidpositionen 1149-1151 (Fig. 1). Der vorhergesagte Polypeptidvorläufer ist 338 Aminosäuren lang. Eine Analyse der in Fig. 2 gezeigten PRO320-Sequenz voller Länge (Seq.-ID Nr. 2) beweist die Gegenwart verschiedener wichtiger Polypeptiddomänen, worin die für diese wichtigen Polypeptiddomänen angegebenen Positionen etwa den oben beschriebenen entsprechen. Eine Analyse der in Fig. 2 gezeigten PRO320-Sequenz voller Länge (Seq.-ID Nr. 2) beweist die Gegenwart der folgenden Elemente: eines Signalpeptids von etwa Aminosäure 1 bis etwa Aminosäure 21; einer Amidierungsstelle von etwa Aminosäure 330 bis etwa Aminosäure 334; einer Asparaginsäure- und Asparaginhydroxylierungsstelle von etwa Aminosäure 109 bis etwa Aminosäure 121, von etwa Aminosäure 191 bis etwa Aminosäure 203 und von etwa Aminosäure 236 bis etwa Aminosäure 248; einer EGF-ähnlichen Domänen-Cysteinumstersignatur von etwa Aminosäure 80 bis etwa Aminosäure 91; von Calcium bindenden EGF-ähnlichen Domänen von etwa Aminosäure 103 bis etwa Aminosäure 125, von etwa Aminosäure 230 bis etwa Aminosäure 252 und von etwa Aminosäure 185 bis etwa Aminosäure 207. Klon DNA32284-1307 wurde am 11. März 1998 bei der ATCC hinterlegt und bekam die ATCC-Hinterlegungs-Nr. 209670 zugeteilt. Das in Fig. 2 gezeigte PRO320-Protein voller Länge weist ein geschätztes mittleres Molekulargewicht von etwa

37.143 Dalton und einen pI von etwa 8,92 auf.

### BEISPIEL 3

#### Verwendung von PRO320 als eine Hybridisierungssonde

**[0200]** Das folgende Verfahren beschreibt die Verwendung einer für PRO320 kodierenden Nucleotidsequenz als Hybridisierungssonde.

**[0201]** DNA, die die Kodiersequenz von Vollängen- oder reifem PRO320 (wie in [Fig. 1](#) gezeigt) oder ein Fragment davon umfasst, wird als eine Sonde zum Screenen auf homologe DNAs (wie jene, die für natürlich vorkommende Varianten von PRO320 kodieren) in cDNA-Bibliotheken aus menschlichem Gewebe oder genomischen Bibliotheken aus menschlichem Gewebe verwendet.

**[0202]** Hybridisieren und Waschen von Filtern, die eine Gruppe dieser Bibliotheks-DNAs enthalten, erfolgt unter den folgenden hochstringenten Bedingungen. Hybridisierung von radioaktiv markierter, von einem für PRO320-Polypeptid kodierenden Gen abgeleiteter Sonde an die Filter erfolgt in einer Lösung von 50 % Formamid, 5 × SSC, 0,1 % SDS, 0,1 % Natriumpyrophosphat, 50 mM Natriumphosphat, pH 6,8, 2 × Denhardts Lösung und 10 % Dextransulfat bei 42 °C 20 Stunden lang. Waschen der Filter erfolgt in einer wässrigen Lösung von 0,1 × SSC und 0,1 % SDS bei 42 °C.

**[0203]** DNAs mit einer erwünschten Sequenzidentität mit der DNA, die für Vollängen-Nativsequenz-PRO320 kodiert, kann dann unter Verwendung von herkömmlichen Verfahren, die auf dem Gebiet der Erfindung bekannt sind, identifiziert werden.

### BEISPIEL 4

#### Expression von PRO320 in E. coli

**[0204]** Dieses Beispiel veranschaulicht die Herstellung einer unglykosylierten Form von PRO320 durch rekombinante Expression in E. coli.

**[0205]** Die für PRO320 kodierende DNA-Sequenz wird anfänglich unter Verwendung von selektierten PCR-Primern amplifiziert. Die Primer sollten Restriktionsenzymstellen enthalten, die den Restriktionsenzymstellen am ausgewählten Expressionsvektor entsprechen. Zahlreiche verschiedene Expressionsvektoren können verwendet werden. Ein Beispiel für einen geeigneten Vektor ist pBR322 (abgeleitet von E. coli; siehe Bolivar et al., Gene 2, 95 (1977)), der Gene für Ampicillin- und Tetracyclinresistenz enthält. Der Vektor wird mit Restriktionsenzym verdaut und dephosphoryliert. Die PCR-amplifizierten Sequenzen werden dann in den Vektor ligiert. Der Vektor umfasst vorzugsweise Sequenzen, die für ein antibiotisches Resistenzgen kodieren, einen trp-Promotor, einen Polyhis-Leader (einschließlich der ersten sechs STII-Codons, Polyhis-Sequenz und Enterokinase-Spaltungsstelle), die PRO320-Kodierregion, λ-Transkriptionsterminator und ein argU-Gen.

**[0206]** Das Ligationsgemisch wird dann verwendet, um einen ausgewählten E.-coli-Stamm unter Verwendung der in Sambrook et al., s.o., beschriebenen Verfahren zu transformieren. Transformanten werden durch ihrer Fähigkeit identifiziert, auf LB-Platten zu wachsen, und Antibiotika-resistente Kolonien werden dann ausgewählt. Plasmid-DNA kann isoliert und durch Restriktionsanalyse und DNA-Sequenzieren bestätigt werden.

**[0207]** Ausgewählte Klone können über Nacht in flüssigem Kulturmedium wie beispielsweise LB-Nährmedium, ergänzt mit Antibiotika, gezüchtet werden. Die Übernacht-Kultur kann in weiterer Folge verwendet werden, um eine Kultur größeren Ausmaßes zu inokulieren. Die Zellen werden dann bis zu einer erwünschten optischen Dichte gezüchtet, währenddessen der Expressionspromotor aktiviert wird.

**[0208]** Nach dem Kultivieren der Zellen über mehrere weitere Stunden hinweg können die Zellen durch Zentrifugation geerntet werden. Das durch die Zentrifugation erhaltene Zellpellet kann unter Verwendung verschiedener, auf dem Gebiet der Erfindung bekannter Mittel solubilisiert werden, und das solubilisierter PRO320-Protein kann dann unter Verwendung einer Metallchelatlösung unter Bedingungen, die die feste Bindung des Proteins ermöglichen, gereinigt werden.

**[0209]** PRO320 kann in E. coli in einer poly-His-markierten Form unter Verwendung des folgenden Verfahrens exprimiert werden. Die für PRO320 kodierende DNA wird anfänglich unter Verwendung selektierter

PCR-Primer amplifiziert. Die Primer enthalten Restriktionsenzymstellen, die den Restriktionsenzymstellen am ausgewählten Expressionsvektor entsprechen, sowie andere nützliche Sequenzen, die für wirksame und zuverlässige Translationsinitiation, rasche Reinigung an einer Metallchelatabbildungssäule und proteolytische Entfernung mit Enterokinase sorgen. Die PCR-amplifizierten, poly-His-markierten Sequenzen werden dann in einen Expressionsvektor ligiert, der verwendet wird, um einen E.-coli-Wirt, basierend auf Stamm 52 (W3110 fuhA(tonA) lon galE rpoHts(htpRts) clpP(lacIq)), zu transformieren. Transformanten werden zuerst in LB, das 50 mg/ml Carbenicillin enthält, bei 30 °C unter Schütteln gezüchtet, bis eine O.D.<sub>600</sub> von 3-5 erreicht ist. Kulturen werden dann 50- bis 100fach in CRAP-Medium (hergestellt durch Vermischen von 3,57 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,71 g Natriumcitrat·2H<sub>2</sub>O, 1,07 g KCl, 5,36 g Difco Hefeextrakt, 5,36 g Sheffield-Hycase SF in 500 ml Wasser sowie 110 mM MPOS, pH 7,3, 0,55 % (Gew./Vol.) Glucose und 7 mM MgSO<sub>4</sub>) verdünnt und etwa 20-30 Stunden lang bei 30 °C unter Schütteln gezüchtet.

**[0210]** Proben werden dann entnommen, um Expression durch SDS-PAGE-Analyse zu überprüfen, und der Hauptteil der Kultur wird zentrifugiert, um die Zellen zu pelletieren. Zellpellets werden bis zur Reinigung und Neufaltung eingefroren.

**[0211]** E.-coli-Paste aus 0,5- bis 1-1-Fermentationen (6-10 g Pellets) wird in 10 Volumina (Gew./Vol.) in 7 M Guanidin, 20 mM Tris, pH 8 (Puffer) resuspendiert. Festes Natriumsulfit und Natriumtetrathiosulfat werden zugesetzt, um Endkonzentrationen von 0,1 M bzw. 0,02 M zu erreichen, und die Lösung wird über Nacht bei 4 °C gerührt. Dieser Schritt führt zu einem denaturierten Protein, in dem alle Cysteinreste durch Sulfitolisierung blockiert sind. Die Lösung wird bei 40.000 U/min in einer Beckman-Ultrazentrifuge 30 min lang zentrifugiert. Der Überstand wird mit 3-5 Volumina Metallchelatsäulenpuffer (6 M Guanidin, 20 mM Tris, pH 7,4) verdünnt und durch 0,22-µm-Filter zur Klärung filtriert. Der geklärte Extrakt wird auf eine 5-ml-Qiagen-Ni-NTA-Metallchelatsäule geladen, die in Metallchelatsäulepuffer äquilibriert wurde. Die Säule wird mit zusätzlichem Puffer gewaschen, der 50 mM Imidazol (Calbiochem, Utrol-Gütegrad), pH 7,4, enthält. Das Protein wird mit Puffer, der 250 mM Imidazol enthält, eluiert. Die das erwünschte Protein enthaltenden Fraktionen werden gesammelt und bei 4 °C gelagert. Die Proteinkonzentration wird durch sein Absorptionsvermögen bei 280 nm unter Verwendung des berechneten Extinktionskoeffizienten basierend auf seiner Aminosäuresequenz geschätzt.

**[0212]** Die Proteine werden durch Verdünnen der Probe langsam in frisch hergestellten Neufaltungspuffer, der aus 20 mM Tris, pH 8,6, 0,3 M NaCl, 2,5 M Harnstoff, 5 mM Cystein, 20 mM Glycin und 1 mM EDTA besteht, neu gefaltet. Neufaltungsvolumina werden so ausgewählt, dass die Endproteinkonzentration zwischen 50 und 100 µg/ml liegt. Die Neufaltungslösung wird sanft bei 4 °C 12-36 Stunden lang gerührt. Die Neufaltungsreaktion wird durch den Zusatz von TFA zu einer Endkonzentration von 0,4 % (pH etwa 3) gequencht. Vor weiterer Reinigung des Proteins wird die Lösung durch ein 0,22-µm-Filter filtriert, und Acetonitril wird zur Erreichung einer 2-10%igen Endkonzentration zugesetzt. Das neugefaltete Protein wird an einer Poros-R1/H-Umkehrphasensäule unter Verwendung eines mobilen Puffers von 0,1 % TFA mittels Elution mit einem Acetonitril-Gradienten von 10 bis 80 % chromatographiert. Aliquoten von Fraktionen mit A280-Absorption werden an SDS-Polyacrylamidgelen analysiert, und Fraktionen, die homogenes neugefaltetes Protein enthalten, werden gesammelt. Im Allgemeinen werden die korrekt gefalteten Spezies der meisten Proteine bei den niedrigsten Konzentrationen von Acetonitril eluiert, da diese Spezies mit ihrem hydrophoben Inneren am kompaktesten und vor Wechselwirkung mit dem Umkehrphasenharz geschützt sind. Aggregierte Spezies werden üblicherweise bei höheren Acetonitrilkonzentrationen eluiert. Zusätzlich zum Auflösen fehlgefalteter Formen von Proteinen aus der erwünschten Form entfernt der Umkehrphasenschritt auch Endotoxin aus den Proben.

**[0213]** Fraktionen, die das erwünschte gefaltete PRO320-Polypeptid enthalten, werden gesammelt, und das Acetonitril wird unter Verwendung eines sanften Stickstoffstroms, der auf die Lösung gerichtet ist, entfernt. Proteine werden in 20 mM Hepes, pH 6,8, mit 0,14 M Natriumchlorid und 4 % Mannit durch Dialyse oder durch Gelfiltration unter Verwendung von G25-Superfine-Harzen (Pharmacia), äquilibriert im Formulierungspuffer, formuliert und steril filtriert.

**[0214]** In der WO00/37638 wurden Polypeptide durch das obige Verfahren erfolgreich in poly-His-markierter Form in E. coli expimiert.

## BEISPIEL 5

### Expression von PRO320 in Säugetierzellen

**[0215]** Dieses Beispiel veranschaulicht die Herstellung einer potenziell glykosylierten Form von PRO320 durch rekombinante Expression in Säugetierzellen.

**[0216]** Der Vektor pRK5 (siehe die EP 307.247, veröffentlicht am 15. März 1989) wird als der Expressionsvektor verwendet. Gegebenenfalls wird die PRO320-DNA in pRK5 mit ausgewählten Restriktionsenzymen ligiert, um Insertion der PRO320-DNA zu ermöglichen, und zwar unter Verwendung von Ligationsverfahren, wie sie in Sambrook et al., s.o., beschrieben werden. Der resultierende Vektor wird als pRK5-PRO320 bezeichnet.

**[0217]** In einer Ausführungsform können die ausgewählten Wirtszellen 293-Zellen sein. Menschliche 293-Zellen (ATCC CCL 1573) werden bis zur Konfluenz in Gewebekulturplatten in Medium wie z.B. DMEM, ergänzt mit fötalem Kälberserum und gegebenenfalls Nährstoffkomponenten und/oder Antibiotika, gezüchtet. Etwa 10 µg pRK5-PRO320-DNA werden mit etwa 1 µg DNA, die für das VA-RNA-Gen kodiert [Thimmappaya et al., Cell 31, 543 (1982)], vermischt und in 500 µl von 1 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, 0,227 M CaCl<sub>2</sub> aufgelöst. Zu diesem Gemisch werden 500 µl von 50 mM HEPES (pH 7,35), 280 mM NaCl, 1,5 mM NaPO<sub>4</sub> zugetropft, und ein Niederschlag wird 10 min lang bei 25 °C bilden gelassen. Der Niederschlag wird suspendiert, zu den 293-Zellen zugesetzt und etwa vier Stunden lang bei 37 °C absetzen gelassen. Das Kulturmedium wird abgesaugt, und 2 ml von 20 % Glycerin in PBS werden 30 Sekunden lang zugesetzt. Die 293-Zellen werden dann mit serumfreiem Medium gewaschen, frisches Medium wird zugesetzt, und die Zellen werden etwa 5 Tage lang inkubiert.

**[0218]** Etwa 24 Stunden nach den Transfektionen wird das Kulturmedium entfernt und durch Kulturmedium (alleine) oder Kulturmedium, das 200 µCi/ml <sup>35</sup>S-Cystein und 200 µCi/ml <sup>35</sup>S-Methionin enthält, ersetzt. Nach einer 12-stündigen Inkubation wird das konditionierte Medium gesammelt, an einem Zentrifugenfilter eingeeengt und auf ein 15%iges SDS-Gel geladen. Das bearbeitete Gel kann getrocknet werden, und ein Film kann damit eine ausgewählte Zeitspanne lang belichtet werden, um die Gegenwart von PRO320-Polypeptid aufzuzeigen. Die Kulturen, die transfizierte Zellen enthalten, können weiterer Inkubation (in serumfreiem Medium) unterzogen werden, und das Medium wird in ausgewählten Biotests getestet.

**[0219]** In einem alternativen Verfahren kann PRO320 in 293-Zellen unter Verwendung des Dextransulfatverfahrens, das von Somparyrac et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 12, 7575 (1981), beschrieben wird, vorübergehend eingeführt werden. 293-Zellen werden in einem Zentrifugenkolben bis zu maximaler Dichte gezüchtet, und 700 µg pRK5-PRO320-DNA werden zugesetzt. Die Zellen werden zuerst aus dem Zentrifugenkolben durch Zentrifugieren eingeeengt und mit PBS gewaschen. Das DNA-Dextran-Präzipitat wird am Zellpellet vier Stunden lang inkubiert. Die Zellen werden mit 20 % Glycerin 90 Sekunden lang behandelt, mit Gewebekulturmedium gewaschen und neuerlich in den Zentrifugenkolben, der Gewebekulturmedium, 5 µg/ml Rinderinsulin und 0,1 µg/ml Rindertransferrin enthält, eingeführt. Nach etwa vier Tagen wird das konditionierte Medium zentrifugiert und filtriert; um Zellen und Zelltrümmer zu entfernen. Die Probe, die exprimiertes PRO320 enthält, kann dann eingeeengt und mittels jedes beliebigen Verfahrens wie z.B. Dialyse und/oder Säulenchromatographie gereinigt werden.

**[0220]** In einer anderen Ausführungsform kann PRO320 in CHO-Zellen exprimiert werden. Das pRK5-PRO320 kann unter Verwendung bekannter Reagenzien wie beispielsweise CaPO<sub>4</sub> oder DEAE-Dextran in CHO-Zellen transfiziert werden. Wie zuvor beschrieben können die Zellkulturen inkubiert und das Medium durch Kulturmedium (alleine) oder Medium, das eine radioaktive Markierung wie z.B. <sup>35</sup>S-Methionin enthält, ersetzt werden. Nach Bestimmen der Gegenwart eines PRO320-Polypeptids kann das Kulturmedium durch serumfreies Medium ersetzt werden. Vorzugsweise werden die Kulturen etwa 6 Tage lang inkubiert, und dann wird das konditionierte Medium geerntet. Das das exprimierte PRO320-Polypeptid enthaltende Medium kann dann konzentriert und durch jedes ausgewählte Verfahren gereinigt werden.

**[0221]** Epitop-markiertes PRO320 kann auch in Wirts-CHO-Zellen exprimiert werden. Das PRO320 kann aus dem pRK5-Vektor subkloniert werden. Das Subklon-Insert kann PCR unterzogen werden, um in Raster mit einer ausgewählten Epitopmarkierung wie beispielsweise einer poly-his-Markierung in einen Baculovirus-Expressionsvektor zu fusionieren. Das poly-His-markierte PRO320-Insert kann dann in einen SV40-gesteuerten Vektor subkloniert werden, der einen Selektionsmarker wie z.B. DHFR zur Selektion stabiler Klone enthält. Schließlich können die CHO-Zellen (wie zuvor beschrieben) mit dem SV40-gesteuerten Vektor transfiziert werden. Es kann eine Markierung wie zuvor beschrieben angebracht werden, um Expression zu überprüfen. Das Kulturmedium, das das exprimierte poly-His-markierte PRO320 enthält, kann dann eingeeengt und durch jedes ausgewählte Verfahren wie z.B. durch Ni<sup>2+</sup>-Chelataffinitätschromatographie gereinigt werden.

**[0222]** PRO320 kann auch in CHO- und/oder COS-Zellen durch ein Verfahren zur vorübergehenden Expression oder in CHO-Zellen durch ein anderes Verfahren zur stabilen Expression exprimiert werden.

**[0223]** Stabile Expression in CHO-Zellen wird unter Verwendung des folgenden Verfahrens durchgeführt. Die Proteine werden als ein IgG-Konstrukt (Immunoadhäsion) exprimiert, in dem die Kodiersequenzen für die lösli-

chen Formen (z.B. extrazelluläre Domänen) der jeweiligen Proteine an eine IgG1-Konstantregionensequenz, die die Gelenks-, CH2 und CH2-Domänen enthält, fusioniert werden, und/oder als eine poly-His-markierte Form.

**[0224]** Nach PCR-Amplifikation werden die jeweiligen DNAs in einem CHO-Expressionsvektor unter Verwendung herkömmlicher Verfahren wie in Ausubel et al., Current Protocols of Molecular Biology, Unit 3.16, John Wiley & Sons (1997), beschrieben subkloniert. CHO-Expressionsvektoren werden so konstruiert, dass sie kompatible Restriktionsstellen 5' und 3' der DNA von Interesse aufweisen, um leichtes Verschieben von cDNAs zu ermöglichen. Der Vektor, der für Expression in CHO-Zellen verwendet wird, ist wie in Lucas et al., Nucl. Acids Res. 24(9), 1774-1779 (1996), beschrieben und verwendet den frühen SV40-Promotor/Enhancer, um Expression der cDNA von Interesse und von Dihydrofolatreductase (DHFR) zu steuern. DHFR-Expression ermöglicht Selektion für stabile Aufrechterhaltung des Plasmids nach erfolgter Transfektion.

**[0225]** 12 µg der erwünschten Plasmid-DNA werden in etwa 10 Millionen CHO-Zellen unter Verwendung von im Handel erhältlichen Transfektionsreagenzien Superfect® (Qiagen), Dosper® oder Fugene® (Boehringer Mannheim) eingeführt. Die Zellen werden wie in Lucas et al., s.o., beschrieben gezüchtet. Etwa  $3 \times 10^{-7}$  Zellen werde in einer Ampulle für weitere Züchtung und Herstellung wie nachstehend beschrieben eingefroren.

**[0226]** Die die Plasmid-DNA enthaltenden Ampullen werden durch Platzieren in ein Wasserbad aufgetaut und durch Verwirbeln vermischt. Die Inhalte werden in ein Zentrifugenröhrchen pipettiert, das 10 ml Medium enthält, und werden bei 1.000 U/min 5 Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt, und die Zellen werden in 10 ml selektivem Medium (0,2-µm-filtriertes PS20 mit 5 % 0,2-µm-diafiltriertes fötales Rinderserum) resuspendiert. Die Zellen werden dann in einer 100-ml-Zentrifuge, die 90 ml selektives Medium enthält, aliquotiert. Nach 1-2 Tagen werden die Zellen in eine 250-ml-Zentrifuge, gefüllt mit 150 ml selektivem Wachstumsmedium, übertragen und bei 37 °C inkubiert. Nach weiteren 2-3 Tagen werden 250-ml-, 500-ml- und 2.000-ml-Zentrifugen mit  $3 \times 10^5$  Zellen/ml beimpft. Das Zellmedium wird durch frisches Medium durch Zentrifugieren und Resuspension in Produktionsmedium ausgetauscht. Obwohl jedes geeignete CHO-Medium verwendet werden kann, kann hier ein Produktionsmedium, das im US-Patent Nr. 5.122.469, ausgegeben am 16. Juni 1992, beschrieben wird, verwendet werden. Eine 3-l-Produktionszentrifuge wird bei einer Konzentration von  $1,2 \times 10^6$  Zellen/ml beimpft. An Tag 0 werden die Zellanzahl und der pH bestimmt. An Tag 1 werden der Zentrifuge Proben entnommen, und Hindurchperlenlassen von filtrierter Luft wird durchgeführt. An Tag 2 werden der Zentrifuge Proben entnommen, die Temperatur wird auf 33 °C geändert, und 30 ml von 500 g/l Glucose und 0,6 ml von 10%igem Antischaummittel (z.B. 35%ige Polydimethylsiloxanemulsion, Dow Corning 365 Medical Grade Emulsion) werden genommen. Im Laufe der Produktion wird der pH sofern erforderlich eingestellt, um ihn auf etwa 7,2 zu halten. Nach 10 Tagen, oder sobald die Lebensfähigkeit auf unter 70 abgefallen ist, wird die Zellkultur durch Zentrifugieren und Filtrieren durch ein 0,22-µm-Filter geerntet. Das Filtrat wurde entweder bei 4 °C gelagert oder sofort auf Säulen zur Reinigung geladen.

**[0227]** Für die poly-His-markierten Konstrukte wurden die Proteine unter Verwendung einer Ni<sup>2+</sup>-NTA-Säule (Qiagen) gereinigt. Vor der Reinigung wird Imidazol zu dem konditionierten Medium zu einer Konzentration von 5 mM zugesetzt. Das konditionierte Medium wird auf eine 6-ml-Ni<sup>2+</sup>-NTA-Säule, äquilibriert in 20 mM Hepes-Puffer, pH 7,4, der 0,3 M NaCl und 5 mM Imidazol enthält, bei einer Durchflussgeschwindigkeit von 4-5 ml/min bei 4 °C gepumpt. Nach dem Laden wird die Säule mit zusätzlichem Äquilibrierungspuffer gewaschen, und das Protein wird mit Äquilibrierungspuffer, der 0,25 M Imidazol enthält, eluiert. Das hochgereinigte Protein wird daraufhin in einen Lagerungspuffer, der 10 mM Hepes, 0,14 M NaCl und 4 % Mannit, pH 6,8, enthält, mit einer 25-ml-G25-Superfine-Säule (Pharmacia) entsalzt und bei -80 °C gelagert.

**[0228]** (Fc-hältige) Immunoadhäsion-Konstrukte werden aus dem konditionierten Medium wie folgt gereinigt. Das konditionierte Medium wird auf eine 5-ml-Protein-A-Säule (Pharmacia) gepumpt, die in 20 mM Na-Phosphatpuffer, pH 6,8, äquilibriert wurde. Nach dem Laden wird die Säule ausführlich mit Äquilibrierungspuffer gewaschen, bevor mit 100 mM Zitronensäure, pH 3,5, eluiert wird. Das eluierte Protein wird unverzüglich durch Sammeln von 1-ml-Fractionen in Röhrchen, die 275 µl von 1 M Tris-Puffer, pH 9, enthält, neutralisiert. Das hochgereinigte Protein wird daraufhin in Ladepuffer wie zuvor für die poly-His-markierten Proteine beschrieben entsalzt. Die Homogenität wird durch SDS-Polyacrylamidgele und durch Sequenzieren N-terminaler Aminosäuren durch Edman-Abbau bewertet.

**[0229]** PRO320 wurde durch das oben beschriebene Verfahren stabil in CHO-Zellen exprimiert. Außerdem wurden in der WO 00/37638 Polypeptide durch das Verfahren für vorübergehende Expression in CHO-Zellen exprimiert.



## BEISPIEL 6

## Expression von PRO320 in Hefe

**[0230]** Das folgende Verfahren beschreibt rekombinante Expression von PRO320 in Hefe.

**[0231]** Zuerst werden Hefe-Expressionsvektoren zur intrazellulären Produktion oder Sekretion von PRO320 aus dem ADH2/GAPDH-Promotor konstruiert. DNA, die für PRO320 und den Promotor kodiert, wird in geeignete Restriktionsenzymstellen im selektierten Plasmid inseriert, um intrazelluläre Expression von PRO320 zu steuern. Zur Sekretion kann für PRO320 kodierende DNA zusammen mit DNA, die für den ADH2/GAPDH-Promotor, ein natives PRO320-Signalpeptid oder ein anderes Säugetier-Signalpeptid kodiert, oder beispielsweise einer Hefe- $\alpha$ -Faktor- oder -Invertase-Sekretionssignal/Leadersequenz und Linkersequenzen (sofern erforderlich) zur Expression von PRO320 in das selektierte Plasmid kloniert werden.

**[0232]** Hefezellen, wie z.B. Hefestamm AB110, können dann mit den zuvor beschriebenen Expressionsplasmiden transformiert und in ausgewähltem Fermentationsmedium kultiviert werden. Die Überstände transformierter Hefe können durch Fällern mit 10 % Trichloressigsäure und durch Trennen durch SDS-PAGE, gefolgt von Färben der Gele mit Coomassie-Blaufärbung, analysiert werden.

**[0233]** Rekombinantes PRO320 kann daraufhin isoliert und durch Entfernen der Hefezellen aus dem Fermentationsmedium durch Zentrifugieren und anschließendes Einengen des Mediums unter Verwendung ausgewählter Patronenfilter gereinigt werden. Das PRO320-hältige Konzentrat kann weiters unter Verwendung ausgewählter Säulenchromatographieharze gereinigt werden.

## BEISPIEL 7

## Expression von PRO320 in mit Baculovirus infizierten Insektenzellen

**[0234]** Das folgende Verfahren beschreibt rekombinante Expression in mit Baculovirus infizierten Insektenzellen.

**[0235]** Die für PRO320 kodierende Sequenz wird stromauf einer Epitopmarkierung, die in einem Baculovirus-Expressionsvektor enthalten ist, fusioniert. Solche Epitop-Markierungen umfassen poly-His-Markierungen und Immunglobulinmarkierungen (wie Fc-Regionen von IgG). Zahlreiche verschiedene Plasmide können verwendet werden, einschließlich Plasmiden, die aus im Handel erhältlichen Plasmiden wie z.B. pVL1393 (Novagen) stammen. Kurz zusammengefasst wird die für PRO320 kodierende Sequenz oder der erwünschte Abschnitt der Kodiersequenz von PRO320 (wie z.B. die Sequenz, die für die extrazelluläre Domäne eines Transmembranproteins kodiert, oder die Sequenz, die für das reife Protein kodiert, sofern das Protein extrazellulär ist) durch PCR mit Primern, die zu den 5'- und 3'-Regionen komplementär sind, amplifiziert. Der 5'-Primer kann flankierende (selektierte) Restriktionsenzymstellen inkorporieren. Das Produkt wird dann mit jenen ausgewählten Restriktionsenzymen verdaut und in den Expressionsvektor subkloniert.

**[0236]** Rekombinantes Baculovirus wird durch Co-Transfektion des obigen Plasmids und BaculoGold™-Virus-DNA (PharMingen) in Spodoptera-frugiperda-(„Sf9“-)-Zellen (ATCC CRL 1711) unter Verwendung von Lipofectin (im Handel bei GIBCO-BRL erhältlich) hergestellt. Nach 4-5 Tagen Inkubation bei 28 °C werden die freigesetzten Viren geerntet und zur weiteren Amplifikation verwendet. Virale Infektion und Proteinexpression werden wie von O'Reilley et al., Baculovirus expression vectors: A Laboratory Manual, Oxford: Oxford University Press (1994), beschrieben durchgeführt.

**[0237]** Exprimiertes poly-His-markiertes PRO320 kann dann, beispielsweise durch  $\text{Ni}^{2+}$ -Chelataffinitätschromatographie, wie folgt gereinigt werden. Extrakte werden aus rekombinanten, virusinfizierten Sf9-Zellen wie von Rupert et al., Nature 362, 175-179 (1993), beschrieben hergestellt. Kurz zusammengefasst werden Sf9-Zellen gewaschen, in Beschallungspuffer (25 ml Hepes, pH 7,9; 12,5 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 0,1 mM EDTA; 10 % Glycerin, 0,1 % NP-40; 0,4 M KCl) resuspendiert und zweimal 20 Sekunden lang auf Eis beschallt. Die beschallten Produkte werden durch Zentrifugation geklärt, und der Überstand wird 50fach in Ladepuffer (50 mM Phosphat, 300 mM NaCl, 10 Glycerin, pH 7,8) verdünnt und durch ein 0,45- $\mu\text{m}$ -Filter filtriert. Eine  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Agarosesäule (im Handel bei Qiagen erhältlich) wird mit einem Bettvolumen von 5 ml hergestellt, mit 25 ml Wasser gewaschen und mit 25 ml Ladepuffer äquilibriert. Der filtrierte Zellextrakt wird auf die Säule bei 0,5 ml pro Minute geladen. Die Säule wird mit Ladepuffer zu  $A_{280}$ -Basislinie gewaschen, ein Punkt, an dem Fraktionssammlung gestartet wird. Als Nächstes wird die Säule mit einem sekundären Waschpuffer (50 mM Phosphat; 300 mM

NaCl, 10 % Glycerin, pH 6,0) gewaschen, der nicht spezifisch gebundenes Protein eluiert. Nach neuerlichem Erreichen der  $A_{280}$ -Basislinie wird die Säule mit einem 0- bis 500-mM-Imidazolgradienten im sekundären Waschpuffer entwickelt. 1-ml-Fractionen werden gesammelt und durch SDS-PAGE und Silberfärbung oder Western-Blot mit  $Ni^{2+}$ -NTA konjugiert an alkalische Phosphatase (Qiagen) analysiert. Fractionen, die das eluierte His<sub>10</sub>-markierte PRO320 enthalten, werden gesammelt und gegen Ladebuffer dialysiert.

**[0238]** Alternativ dazu kann Reinigung des IgG-markierten (oder Fc-markierten) PRO320 unter Verwendung bekannter Chromatographieverfahren, einschließlich beispielsweise Protein-A- oder Protein-G-Säulenchromatographie, durchgeführt werden.

**[0239]** Nach PCR-Amplifikation werden die jeweiligen Kodiersequenzen in einen Baculovirus-Expressionsvektor (pb.PH.IgG für IgG-Fusionen und pb.PH.His.c für poly-His-markierte Proteine) subkloniert, und der Vektor und Baculogold®-Baculovirus-DNA (Pharmingen) werden in 105 Spodoptera-frugiperda- („Sf9-“) Zellen (ATCC CRL 1711) unter Verwendung von Lipofectin (Gibco BRL) co-transfiziert. pb.PH.IgG und pb.PH.His sind Modifikationen des im Handel erhältlichen Baculovirus-Expressionsvektors pVL1393 (Pharmingen) mit modifizierten Polylinkerregionen, die die His- oder Fc-Markierungssequenzen einbinden. Die Zellen werden in Hinks TNM-FH-Medium, ergänzt mit 10 % FBS (Hyclone), gezüchtet. Die Zellen werden 5 Tage lang bei 28 °C inkubiert. Der Überstand wird geerntet und daraufhin für die erste virale Amplifikation durch Infizieren von Sf9-Zellen in Hinks TNM-FH-Medium, ergänzt mit 10 % FBS, bei einer ungefähren Infektionsmultiplizität (MOI) von 10 verwendet. Die Zellen werden 3 Tage lang bei 28 °C inkubiert. Der Überstand wird geerntet, und die Expression der Konstrukte im Baculovirus-Expressionsvektor wird durch Chargenbindung von 1 ml Überstand an 25 ml  $Ni^{2+}$ -NTA-Perlen (QIAGEN) für Histidin-markierte Proteine oder Protein-A-SepharoseCL-4B-Perlen (Pharmacia) für IgG-markierte Proteine bestimmt, gefolgt von SDS-PAGE-Analyse, die einen Vergleich mit einer bekannten Konzentration von Proteinstandard mittels Coomassie-Blaufärbung anstellt.

**[0240]** Der Überstand aus der ersten viralen Amplifikation wird verwendet, um eine Zentrifugenkultur (500 ml) von Sf9-Zellen, die auf ESF-921-Medium (Expression Systems LLC) bei einer ungefähren MOI von 0,1 gezüchtet wurden, zu infizieren. Die Zellen wurden 3 Tage lang bei 28 °C inkubiert. Der Überstand wird geerntet und filtriert. Chargenbindung und SDS-PAGE-Analyse werden, sofern erforderlich, wiederholt, bis Expression der Zentrifugenkultur bestätigt wird.

**[0241]** Das konditionierte Medium aus den transfizierten Zellen (0,5 bis 3 l) wird durch Zentrifugation geerntet, um die Zellen zu entfernen, und durch 0,22-µm-Filter filtriert.

**[0242]** Für die poly-His-markierten Konstrukte wird das Proteinkonstrukt unter Verwendung einer  $Ni^{2+}$ -NTA-Säule (Qiagen) gereinigt. Vor der Reinigung wird Imidazol zum konditionierten Medium in einer Konzentration von 5 mM zugesetzt. Das konditionierte Medium wird auf eine 6-ml- $Ni^{2+}$ -NTA-Säule, die in 20 mM Hepes-Puffer, pH 7,4, der 0,3 M NaCl und 5 mM Imidazol enthält, äquilibriert wurde, bei einer Durchflusgeschwindigkeit von 4-5 ml/min bei 4 °C gepumpt. Nach dem Laden wird die Säule mit zusätzlichem Äquilibriumspuffer gewaschen, und das Protein wird mit Äquilibriumspuffer, der 0,25 M Imidazol enthält, eluiert. Das hochgereinigte Protein wird daraufhin in einen Lagerungspuffer, der 10 mM Hepes, 0,14 M NaCl und 4 % Mannit, pH 6,8, enthält, mit einer 25-ml-G25-Superfine-Säule (Pharmacia) entsalzt und bei -80 °C gelagert.

**[0243]** (Fc-hältige) Immunoadhäsion-Konstrukte von Proteinen werden aus dem konditionierten Medium wie folgt gereinigt. Das konditionierte Medium wird auf eine 5-ml-Protein-A-Säule (Pharmacia) gepumpt, die davor in 20 mM Na-Phosphatpuffer, pH 6,8, äquilibriert wurde. Nach dem Laden wird die Säule ausführlich mit Äquilibriumspuffer gewaschen, bevor Elution mit 100 mM Zitronensäure, pH 3,5, stattfindet. Das eluierte Protein wird unmittelbar durch Abnehmen von 1-ml-Fractionen in Röhrchen, die 275 µl von 1 M Tris-Puffer, pH 9, enthalten, neutralisiert. Das hochgereinigte Protein wird daraufhin in Lagerungspuffer, wie zuvor für die poly-His-markierten Proteine beschrieben, entsalzt. Die Homogenität der Proteine wird durch SDS-Polyacrylamidgel(-PEG-)Elektrophorese und durch Sequenzieren N-terminaler Aminosäure mittels Edman-Abbau überprüft.

**[0244]** In der WO 00/37638 wurden Polypeptide in Baculovirus-infizierten Sf9-Insektenzellen exprimiert.

**[0245]** Alternativ dazu kann ein modifiziertes Baculovirus-Verfahren verwendet werden, das High-5-Zellen inkorporiert. In diesem Verfahren wird die für die erwünschte Sequenz kodierende DNA mit geeigneten Systemen, wie z.B. Pfu (Stratagene), amplifiziert oder stromauf einer Epitopmarkierung (5' davon), die innerhalb eines Baculovirus-Expressionsvektors enthalten ist, fusioniert. Solche Epitopmarkierungen umfassen poly-His-Markierungen und Immunglobulinmarkierungen (wie Fc-Regionen von IgG). Zahlreiche Plasmide kön-

nen verwendet werden, einschließlich Plasmide, die von handelsüblichen Plasmiden wie z.B. pIE1-1 (Novagen) abstammen. Die pIE1-1- und pIE1-2-Vektoren sind zur konstitutiven Expression rekombinanter Proteine aus dem Baculovirus-*ie1*-Promotor in stabil transformierten Insektenzellen (1) entworfen. Die Plasmide unterscheiden sich nur in der Ausrichtung der mehrfachen Klonierungsstellen und enthalten alle Promotorsequenzen, die dafür bekannt sind, dass sie für *ie1*-vermittelte Genexpression in nicht infizierten Insektenzellen wichtig sind, sowie das *hr5*-Enhancerelement. pIE1-1 und pIE1-2 umfassen die Translationsinitiationsstelle und können verwendet werden, um Fusionsproteine zu produzieren. Kurz zusammengefasst wird die erwünschte Sequenz oder der erwünschte Abschnitt der Sequenz (wie z.B. der Sequenz, die für die extrazelluläre Domäne eines transmembranen Proteins kodiert) mittels PCR mit Primern, die zu den 5'- und 3'-Regionen komplementär sind, amplifiziert. Der 5'-Primer kann flankierende (selektierte) Restriktionsenzymstellen inkorporieren. Das Produkt wird dann mit jenen selektierten Restriktionsenzymen verdaut und in den Expressionsvektor subkloniert. Derivate von pIE1-1 beispielsweise können die Fc-Region von menschlichem IgG (pb.PH.IgG) oder eine 8-Histidin-(pb.PH.His)Markierung stromab der erwünschten Sequenz (3' davon) umfassen. Vorzugsweise wird das Vektorkonstrukt zur Bestätigung sequenziert.

**[0246]** High-5-Zellen werden bis zu einer Konfluenz von 50 % unter den Bedingungen: 27 °C, kein CO<sub>2</sub>, kein Pen/Strep; gezüchtet. Für jede 150-mm-Platte werden 30 µg von pIE-basiertem Vektor, der die Sequenz enthält, mit 1 ml Ex-Cell-Medium (Medium: Ex-Cell 401 + 1/100 L-Glu JRH Biosciences Nr. 14401-78P (Anmerkung: dieses Medium ist lichtempfindlich)) vermischt, und in einem separaten Röhrchen werden 100 µl CellFectin (CellFECTIN (GibcoBRL Nr. 10362-010) (durch Zentrifugieren vermischt)) mit 1 ml Ex-Cell-Medium vermischt. Die zwei Lösungen werden vereinigt und bei Raumtemperatur 15 min lang inkubieren gelassen. 8 ml von Ex-Cell-Medium werden zu 2 ml von DNA/CellFECTIN-Gemisch zugesetzt, und dies wird auf High-5-Zellen aufgeschichtet, die davor einmal mit Ex-Cell-Medium gewaschen wurden. Die Platte wird dann in Dunkelheit 1 h lang bei Raumtemperatur inkubiert. Das DNA/CellFECTIN-Gemisch wird anschließend abgesaugt, und die Zellen werden einmal mit Ex-Cell gewaschen, um überschüssiges CellFECTIN zu entfernen, 30 ml frisches Ex-Cell-Medium werden zugesetzt, und die Zellen werden 3 Tage lang bei 28 °C inkubiert. Der Überstand wird geerntet; und die Expression der Sequenz im Baculovirus-Expressionsvektor wird durch Chargenbindung von 1 ml Überstand an 25 ml von Ni<sup>2+</sup>-NTA-Perlen (QIAGEN) für Histidin-markierte Proteine oder Protein-A-Sepharose-CL-4B-Perlen (Pharmacia) für IgG-markierte Proteine bestimmt, gefolgt von SDS-PAGE-Analyse, die einen Vergleich mit einer bekannten Konzentration von Proteinstandard mittels Coomassie-Blaufärbung anstellt.

**[0247]** Das konditionierte Medium aus den transfizierten Zellen (0,5 bis 3 l) wird mittels Zentrifugation geerntet, um die Zellen zu entfernen, und durch 0,22-µm-Filter filtriert. Für die poly-His-markierten Konstrukte wird das Protein, das die Sequenz umfasst, unter Verwendung einer Ni<sup>2+</sup>-NTA-Säule (Qiagen) gereinigt. Vor der Reinigung wird Imidazol zum konditionierten Medium auf eine Konzentration von 5 mM zugesetzt. Das konditionierte Medium wird auf eine 6-ml-Ni<sup>2+</sup>-NTA-Säule, die in 20 mM Hepes-Puffer, pH 7,4, der 0,3 M NaCl und 5 mM Imidazol enthält, äquilibriert ist, bei einer Durchflussgeschwindigkeit von 4-5 ml/min bei 48 °C gepumpt. Nach dem Laden wird die Säule mit zusätzlichem Äquilibrationpuffer gewaschen, und das Protein wird mit Äquilibrationpuffer, der 0,25 M Imidazol enthält, eluiert. Das hochgereinigte Protein wird daraufhin in einen Lagerungspuffer, der 10 mM Hepes, 0,14 M NaCl und 4 % Mannit, pH 6,8, enthält, mit einer 25-ml-G25-Superfine-Säule (Pharmacia) entsalzt und bei -80 °C gelagert.

**[0248]** (Fc-hältige) Immunoadhäsion-Konstrukte von Proteinen werden aus dem konditionierten Medium wie folgt gereinigt. Das konditionierte Medium wird auf eine 5-ml-Protein-A-Säule (Pharmacia) gepumpt, die in 20 mM Na-Phosphatpuffer, pH 6,8, äquilibriert wurde. Nach dem Laden wird die Säule ausführlich mit Äquilibrationpuffer gewaschen, bevor mit 100 mM Zitronensäure, pH 3,5, eluiert wird. Das eluierte Protein wird unverzüglich durch Sammeln von 1-ml-Fraktionen in Röhrchen, die 275 ml von 1 M Tris-Puffer, pH 9, enthält, neutralisiert. Das hochgereinigte Protein wird daraufhin in Lagerungspuffer, wie zuvor für die poly-His-markierten Proteine beschrieben, entsalzt. Die Homogenität der Sequenz wird durch SDS-Polyacrylamidgele und durch Sequenzieren N-terminaler Aminosäuren durch Edman-Abbau und andere analytische Verfahren, je nach Bedarf und Wunsch, bewertet.

**[0249]** In der WO 00/37638 wurden Polypeptide unter Verwendung des oben beschriebenen Baculovirus-Verfahrens unter Verwendung von High-5-Zellen exprimiert.

## BEISPIEL 8

### Herstellung von Antikörpern, die PRO0320 binden

**[0250]** Dieses Beispiel veranschaulicht die Herstellung monoklonaler Antikörper, die sich spezifisch an

PRO320 binden können.

**[0251]** Verfahren zur Herstellung der monoklonalen Antikörper sind auf dem Gebiet der Erfindung bekannt und werden beispielsweise in Goding, s.o., beschrieben. Immunogene, die verwendet werden können, umfassen gereinigtes PRO320, Fusionsproteine, die PRO320 enthalten, und Zellen, die rekombinantes PRO320 an der Zelloberfläche exprimieren. Die Auswahl des Immunogens können Fachleute ohne übermäßiges Experimentieren treffen.

**[0252]** Mäuse, wie z.B. Balb/c, werden mit dem PRO320-Immunogen immunisiert, das in komplettem Freund-schem Adjuvans emulgiert und subkutan oder intraperitoneal in einer Menge von 1 bis 100 µg injiziert wird. Alternativ dazu wird das Immunogen in MPL-TDM-Adjuvans (Ribi Immunochemical Research, Hamilton, MT) emulgiert und in die Fußballen der Hinterläufe der Tiere injiziert. Die immunisierten Mäuse werden dann 10 bis 12 Tage später mit zusätzlichem Immunogen, das im ausgewählten Adjuvans emulgiert ist, geboostet. Hier-nach können die Mäuse auch für mehrere Wochen mit zusätzlichen Immunisierungsinjektionen geboostet werden. Serumproben können den Mäusen durch retroorbitale Blutabnahme zum Testen mittels ELISA-Tests zur Detektion von Anti-PRO320-Antikörpern in periodischen Abständen entnommen werden.

**[0253]** Nachdem ein geeigneter Antikörpertiter nachgewiesen wurde, kann den Tieren mit „positiven“ Antikörperwerten eine letzte intravenöse Injektion von PRO320 verabreicht werden. Drei oder vier Tage später werden die Mäuse getötet und die Milzzellen geerntet. Die Milzzellen werden dann an eine selektierte Mausmyelom-zelllinie wie z.B. P3X63AgU.1, die bei der ATCC, Nr. CRL 1597, erhältlich ist, (unter Verwendung von 35 % Polyethylenglykol) fusioniert. Die Fusionen bilden Hybridomzellen, die dann in 96-Well-Gewebekulturplatten, welche HAT- (Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin) Medium enthalten, ausplattiert werden, um Proliferati-on von nicht-fusionierten Zellen, Myelomhybriden und Milzzellhybriden zu hemmen.

**[0254]** Die Hybridomzellen werden in einem ELISA auf Reaktivität gegen PRO320 gescreent. Bestimmung von „positiven“ Hybridomzellen, die die erwünschten monoklonalen Antikörper gegen PRO320 sekretieren, liegt im Bereich der Erfindung.

**[0255]** Die positiven Hybridomzellen können intraperitoneal in syngenetische Balb/c-Mäuse injiziert werden, um Ascites zu produzieren, die die monoklonalen Anti-PRO320-Antikörper enthalten. Alternativ dazu können die Hybridomzellen in Gewebekulturkolben oder Rollflaschen gezüchtet werden. Reinigung der monoklonalen Antikörper, die in Ascites produziert werden, kann unter Verwendung von Ammoniumsulfatfällung, gefolgt von Gelausschlusschromatographie, erfolgen. Alternativ dazu kann Affinitätschromatographie basierend auf Bin-dung von Antikörper an Protein A oder Protein G verwendet werden.

## BEISPIEL 9

### Reinigung von PRO320-Polypeptiden unter Verwendung spezifischer Antikörper

**[0256]** Native oder rekombinante PRO320-Polypeptide können mittels zahlreicher verschiedener Verfahren zur Proteinreinigung, die auf dem Gebiet der Erfindung Standard sind, gereinigt werden. Beispielsweise wird pro-PRO320-Polypeptid, reifes PRO320-Polypeptid oder prä-PRO320-Polypeptid mittels Immunaффinitätschro-matographie unter Verwendung von Antikörpern, die für das PRO320-Polypeptid von Interesse spezifisch sind, gereinigt. Im Allgemeinen wird eine Immunaффinitätssäule durch kovalentes Binden des Anti-PRO320-Polypep-tidantikörpers an ein aktiviertes Chromatographieharz konstruiert.

**[0257]** Polyklonale Immunglobuline werden aus Immunsereen entweder durch Fällung mit Ammoniumsulfat oder durch Reinigung an immobilisiertem Protein A (Pharmacia LKB Biotechnology, Piscataway, N.J.) herge-stellt. Demähnlich werden monoklonale Antikörper aus Maus-Ascitesflüssigkeit durch Ammoniumsulfatfällung oder durch Chromatographie an immobilisiertem Protein A hergestellt. Teilweise gereinigtes Immunglobulin wird kovalent an ein Chromatographieharz wie z.B. CnBr-aktivierte SEPHAROSE™ (Pharmacia LKB Biotech-nology) gebunden. Der Antikörper wird an das Harz gebunden, das Harz wird blockiert, und das Derivat-harz wird gemäß den Anweisungen des Herstellers gewaschen.

**[0258]** Solch eine Immunaффinitätssäule wird zur Reinigung von PRO320-Polypeptid durch Herstellung einer Fraktion von Zellen, die PRO320-Polypeptid in einer löslichen Form enthält, verwendet. Dieses Präparat wird durch Solubilisierung der ganzen Zelle oder einer subzellulären Fraktion, die durch differenzielles Zentrifugie-ren durch den Zusatz von Detergens oder mittels anderer Verfahren, die auf dem Gebiet der Erfindung bekannt sind, erhalten wurde, abgeleitet. Alternativ dazu kann lösliches PRO320-Polypeptid, das eine Signalsequenz

enthält, in nützlicher Menge in das Medium sekretiert werden, in dem die Zellen gezüchtet werden.

**[0259]** Ein lösliches PRO320 Polypeptid enthaltendes Präparat wird über eine Immunaффinitätssäule geführt, und die Säule wird unter Bedingungen gewaschen, die die präferenzielle Absorption von PRO320-Polypeptid ermöglichen (z.B. Puffer mit hoher Ionenstärke in Gegenwart von Detergens). Dann wird die Säule unter Bedingungen eluiert, die Antikörper/PRO320-Polypeptid-Bindung aufbrechen (z.B. ein Puffer mit niedrigem pH wie etwa pH 2-3 oder eine hohe Konzentration eines Chaotrops wie z.B. Harnstoff oder Thiocyanation), und das PRO320-Polypeptid wird gesammelt.

## BEISPIEL 10

### Wirkstoff-Screenen

**[0260]** Diese Erfindung ist besonders nützlich zum Screenen von Verbindungen unter Verwendung von PRO320-Polypeptiden oder Bindungsfragmenten davon im Rahmen eines von zahlreichen verschiedenen Screeningverfahren. Das PRO320-Polypeptid oder -Fragment, das in solch einem Test verwendet wird, kann entweder frei in Lösung, fixiert an einen festen Träger, an einer Zelloberfläche getragen oder intrazellulär angeordnet sein. Ein Verfahren zum Wirkstoff-Screenen verwendet eukaryotische oder prokaryotische Wirtszellen, die mit rekombinanten Nucleinsäuren, die das PRO320-Polypeptid oder -Fragment exprimieren, stabil transformiert sind. Wirkstoffe werden gegen solche transformierten Zellen in Konkurrenzbindungstests gescreent. Solche Zellen, entweder in lebensfähiger oder in fixierter Form, können für herkömmliche Bindungstests verwendet werden. Es kann beispielsweise die Bildung von Komplexen zwischen einem PRO320-Polypeptid oder einem -Fragment und dem zu testenden Mittel gemessen werden. Alternativ dazu kann die Abnahme von Komplexbildung zwischen dem PRO320-Polypeptid und seiner Targetzelle oder seinen Targetrezeptoren untersucht werden, die durch das zu testende Mittel verursacht wird.

**[0261]** Somit stellt die vorliegende Erfindung Verfahren zum Screenen auf Wirkstoffe oder auf beliebige andere Mittel bereit, die mit PRO320-Polypeptid assoziierte Erkrankungen oder Leiden beeinflussen können. Diese Verfahren umfassen das Kontaktieren solch eines Mittels mit einem PRO320-Polypeptid oder Fragment davon und das Testen (i) auf die Gegenwart eines Komplexes zwischen dem Mittel und dem PRO320-Polypeptid oder -Fragment oder (ii) auf die Gegenwart eines Komplexes zwischen dem PRO320-Polypeptid oder -Fragment und der Zelle mittels auf dem Gebiet der Erfindung bekannter Verfahren. In solchen Konkurrenzbindungstests wird das PRO320-Polypeptid oder -Fragment typischerweise markiert. Nach geeigneter Inkubation wird das freie PRO320-Polypeptid oder -Fragment von dem, das in gebundener Form vorliegt, getrennt, und die Menge an freier oder nicht komplexierter Markierung stellt ein Maß für die Fähigkeit des bestimmten Mittels dar, sich an PRO320-Polypeptid zu binden oder den PRO320-Polypeptid/Zell-Komplex zu stören.

**[0262]** Ein anderes Verfahren zum Wirkstoff-Screenen sorgt für Screenen mit hohem Durchsatz von Verbindungen mit geeigneter Bindungsaffinität an ein Polypeptid und wird in der WO 84/03564, veröffentlicht am 13. September 1984, detailliert beschrieben. Kurz zusammengefasst wird eine große Anzahl an verschiedenen kleinen Peptid-Testverbindungen an einem festen Substrat, wie z.B. an Kunststoffstiften oder einer anderen Oberfläche, synthetisiert. Angewandt auf ein PRO320-Polypeptid, werden Peptidtestverbindungen mit PRO320-Polypeptid umgesetzt und gewaschen. Gebundenes PRO320-Polypeptid wird mittels auf dem Gebiet der Erfindung bekannter Verfahren nachgewiesen. Gereinigtes PRO320-Polypeptid kann zur Verwendung in den zuvor genannten Wirkstoff-Screening-Verfahren auch direkt auf Platten beschichtet werden. Darüber hinaus können nicht-neutralisierende Antikörper verwendet werden, um das Peptid einzufangen und es am festen Träger zu immobilisieren.

**[0263]** Diese Erfindung erwägt auch die Verwendung von kompetitiven Wirkstoff-Screeningtests, in denen neutralisierende Antikörper, die in der Lage sind, ein PRO320-Polypeptid zu binden, spezifisch mit einer Testverbindung um Bindung an das PRO320-Polypeptid oder Fragmente davon konkurrieren. Auf diese Weise können die Antikörper verwendet werden, um die Gegenwart jedes beliebigen Peptids nachzuweisen, das mit einem PRO320-Polypeptid eine oder mehrere antigene Determinanten gemeinsam hat.

## BEISPIEL 11

### Rationales Wirkstoffdesign

**[0264]** Das Ziel von rationalem Wirkstoffdesign ist die Herstellung struktureller Analoga von biologisch aktivem Polypeptid von Interesse (z.B. von einem PRO320-Polypeptid) oder von kleinen Molekülen, mit denen sie

wechselwirken, z.B. Agonisten, Antagonisten oder Inhibitoren. Jedes dieser Beispiele kann verwendet werden, um Wirkstoffe zu entwerfen, die aktivere oder stabilere Formen des PRO320-Polypeptids sind oder die die Funktion des PRO320-Polypeptids in vivo verstärken oder stören oder die die Funktion des PRO320-Polypeptids in vivo verstärken oder stören (vgl. Hodgson, Bio/Technology 9, 19-21 (1991)).

**[0265]** In einem Ansatz wird die dreidimensionale Struktur des PRO320-Polypeptids oder eines PRO320-Polypeptid-Inhibitor-Komplexes durch Röntgenkristallographie, durch Computermodellierung oder, was am häufigsten vorkommt, durch eine Kombination der zwei Ansätze bestimmt. Sowohl die Form als auch die Ladungen des PRO320-Polypeptids müssen bestimmt werden, um die Struktur erkennen zu können und um (eine) aktive Stelle(n) des Moleküls zu identifizieren. Weniger häufig können nützliche Informationen hinsichtlich der Struktur des PRO320-Polypeptids durch Modellieren auf Grundlage der Struktur homologer Proteine gewonnen werden. In beiden Fällen wird relevante strukturelle Information verwendet, um analoge PRO320-Polypeptid-ähnliche Moleküle zu entwerfen oder um wirksame Inhibitoren zu identifizieren. Nützliche Beispiele für rationales Wirkstoffdesign können Moleküle umfassen, die verbesserte Aktivität oder Stabilität aufweisen, wie von Braxton & Wells, Biochemistry 31, 7796-7801 (1992), gezeigt wird, oder die als Inhibitoren, Agonisten oder Antagonisten von nativen Peptiden wirken, wie von Athauda et al., J. Biochem. 113, 742-746 (1993), gezeigt wird.

**[0266]** Auch ist es möglich, einen Target-spezifischen Antikörper zu isolieren, der wie zuvor beschrieben durch funktionelle Tests selektiert wird, und dann seine Kristallstruktur aufzuklären. Dieser Ansatz ergibt im Prinzip ein Pharmakor, auf Grundlage dessen Wirkstoffdesign vollzogen werden kann. Es ist möglich, Proteinkristallographie ganz zu umgehen, indem anti-idiotypische Antikörper (anti-ids) zu einem funktionellen, pharmakologisch aktiven Antikörper gebildet werden. Es wird erwartet, dass, als ein Spiegelbild eines Spiegelbildes, die Bindungsstelle der anti-ids analog zu dem Originalrezeptor ist. Der anti-id könnte dann verwendet werden, um Peptide aus Banken chemisch oder biologisch hergestellter Peptide zu identifizieren und zu isolieren. Die isolierten Peptide würden dann als der Pharmakor wirken.

**[0267]** Durch die vorliegende Erfindung können ausreichende Mengen des PRO320-Polypeptids verfügbar gemacht werden, um solche analytischen Studien wie z.B. Röntgenkristallographie durchzuführen. Darüber hinaus liefert die Kenntnis der hierin bereitgestellten PRO320-Polypeptid-Aminosäuresequenz einen Leitfaden für jene, die Computermodellierungsverfahren anstelle von oder zusätzlich zu Röntgenkristallographie verwenden.

## BEISPIEL 12

### In-vitro-Antitumortest

**[0268]** Die antiproliferative Aktivität der PRO320-Polypeptide wurde im experimentellen, Erkrankungs-orientierten Antikrebswirkstofffindungs-In-vitro-Test des National Cancer Institute (NCI) unter Verwendung eines Sulforhodamin-B-(SRB-)Farbstoff-Bindungstests, im Wesentlichen wie von Skehan et al., J. Natl. Cancer Inst. 82, 1107-1112 (1990), beschrieben, bestimmt. Die 60 Tumorzelllinien, die in dieser Studie verwendet wurden („das NCI-Panel“), sowie Bedingungen für ihre Aufrechterhaltung und Kultur in vitro wurden von Monks et al., J. Natl. Cancer Inst. 83, 757-766 (1991), beschrieben. Der Zweck dieses Screens ist es, die Zytotoxizität und/oder zytostatische Aktivität der Testverbindungen gegen verschiedene Tumortypen zu evaluieren (Monks et al., s.o.; Boyd, Cancer: Princ. Pract. Oncol. Update 3(10), 1-12 (1989)).

**[0269]** Zellen aus etwa 60 menschlichen Tumorzelllinien wurden mit Trypsin/EDTA (Gibco) geerntet, einmal gewaschen, in IMEM resuspendiert, und ihre Lebensfähigkeit wurde bestimmt. Die Zellsuspensionen wurden mittels Pipette (100 µl Volumen) in separate 96-Well-Mikrotiterplatten zugesetzt. Die Zelldichte für die 6-Tages-Inkubation war geringer als jene für die 2-Tages-Inkubation, um übermäßiges Wachstum zu vermeiden. Inokulaten wurde eine Präinkubationszeit von 24 h bei 37 °C zur Stabilisierung zuerkannt. Verdünnungen in einer Konzentration, die das Zweifache der beabsichtigten Testkonzentration betrug, wurden zum Zeitpunkt Null in 100-µl-Aliquoten zu den Mikrotiterplattenwells zugesetzt (1:2-Verdünnung). Testverbindungen wurden bei fünf Verdünnungen in halben dekadisch-logarithmischen Schritten (1.000- bis 100.000fach) evaluiert. Inkubationen fanden zwei Tage lang und sechs Tage lang in einer 5%igen CO<sub>2</sub>-Atmosphäre und bei 100 % Feuchtigkeit statt.

**[0270]** Nach der Inkubation wurde das Medium entfernt, und die Zellen wurden in 0,1 ml 10%iger Trichloressigsäure bei 40 °C fixiert. Die Platten wurden fünfmal mit entionisiertem Wasser gespült, getrocknet, 30 min lang mit 0,1 ml von 0,4%igem Sulforhodamin-B-Farbstoff (Sigma), aufgelöst in 1 % Essigsäure, gefärbt, viermal mit 1 %er Essigsäure gespült, um ungebundenen Farbstoff zu entfernen, getrocknet, und der Farbstoff

wurde fünf Minuten lang mit 0,1 ml von 10 mM Tris-Base [Tris(hydroxymethyl)aminomethan], pH 10,5, extrahiert. Die Absorption (OD) von Sulforhodamin B bei 492 nm wurde unter Verwendung eines 96-Well-Mikrotiterplattenlesers, der eine Schnittstelle zu einem Computer aufweist, gemessen.

**[0271]** Eine Testprobe wird als positiv betrachtet, wenn sie zumindest 40 % Wachstumsinhibierungswirkung bei einer oder mehreren Konzentrationen zeigt. Die Resultate sind in der folgenden Tabelle 4 gezeigt, in der die Abkürzungen für den Tumorzelltyp wie folgt belegt sind:

NSCL = nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom; ZNS = Zentralnervensystem

Tabelle 4

<u>Verbindung</u>	<u>Tumorzelltyp</u>	<u>Bezeichnung</u>
PRO320	Leukämie	CCRF-CEM; RPMI-8226
PRO320	NSCL	HOP62; NCI H322M
PRO320	Kolon	HCT-116
PRO320	Nieren	SN12C
PRO320	Brust	MDA-N
PRO320	Ovarien	OVCAR-3
PRO320	Melanom	MALME-3M

Hinterlegung von Material

**[0272]** Die folgenden Materialien wurden bei der American Type Culture Collection, 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209, USA, (ATCC) hinterlegt:

<u>Material</u>	<u>ATCC-Hinterlegungsnr.</u>	<u>Hinterlegungsdatum</u>
DNA32284-1307	209670	11. März 1998

**[0273]** Diese Hinterlegung erfolgte gemäß den Vorschriften des Budapester Vertrages über die internationale Anerkennung der Hinterlegung von Mikroorganismen für die Zwecke von Patentverfahren und den darunter gültigen Bestimmungen (Budapester Vertrag). Dies sichert die Erhaltung einer lebensfähigen Kultur der Hinterlegung 30 Jahre lang ab dem Zeitpunkt der Hinterlegung. Die Hinterlegungen werden von der ATCC gemäß den Bestimmungen des Budapester Vertrages und gemäß einem Abkommen zwischen Genentech, Inc., und ATCC verfügbar gemacht, das permanente und uneingeschränkte Verfügbarkeit der Nachkommenschaft der Kultur der Hinterlegung für die Öffentlichkeit bei Ausgabe des betreffenden US-Patents oder bei Offenlegung für die Öffentlichkeit entweder der US- oder einer ausländischen Patentanmeldung, je nachdem, was zuerst kommt, garantiert und das die Verfügbarkeit der Nachkommenschaft für jemanden, der durch den Präsident des Patentamtes der Vereinigten Staaten hierzu gemäß 35 USC § 122 und den dazu gültigen Bestimmungen (einschließlich 37 CFR § 1.14 unter besonderem Verweis auf 886 OG 638) befugt ist, sicherstellt.

**[0274]** Der Abtretungsempfänger der vorliegenden Anmeldung hat sich einverstanden erklärt, dass, sofern eine Kultur der hinterlegten Materialien, die unter geeigneten Bedingungen kultiviert wurde, sterben oder verloren gehen oder zerstört werden sollte, die Materialien unverzüglich nach Benachrichtigung durch neue derselben Art ersetzt werden. Verfügbarkeit des hinterlegten Materials ist nicht als eine Lizenz zur Ausführung der Erfindung in Widerspruch mit den unter der Behörde einer beliebigen Regierung gemäß ihrer Patentgesetze garantierten Rechte zu verstehen.

**[0275]** Die obige schriftliche Beschreibung wird als ausreichend erachtet, um Fachleuten die Möglichkeit zu geben, die Erfindung durchzuführen. Die vorliegende Erfindung soll in ihrem Schutzzumfang durch das hinterlegte Konstrukt nicht als eingeschränkt gelten, da die hinterlegte Ausführungsform einzig als Veranschaulichung bestimmter Aspekte der Erfindung zu verstehen ist, und andere Konstrukte, die funktionell äquivalent sind, liegen innerhalb des Schutzzumfangs dieser Erfindung, wie er in den Ansprüchen definiert ist. Die Hinterlegung des hierin offenbarten Materials stellt weder ein Eingeständnis dar, dass die hierin enthaltene schriftliche Beschreibung inadäquat sei, die praktische Durchführung irgendeines Aspektes der Erfindung, einschließ-

lich der besten Ausführungsform davon, zu ermöglichen, noch ist sie als eine Einschränkung des Schutzzumfangs der Ansprüche zu den spezifischen Veranschaulichungen, die sie darstellt, zu verstehen. Schließlich werden Fachleuten auf Grundlage der obigen Beschreibung verschiedene Modifikationen, zusätzlich zu jenen, die hierin gezeigt und beschrieben wurden, ersichtlich sein und liegen ebenfalls im Schutzzumfang der beiliegenden Ansprüche.

# Sequenzprotokoll

<110> Genentech, Inc.

<120> VERFAHREN UND ZUSAMMENSETZUNGEN ZUR INHIBIERUNG VON  
NEOPLASTISCHEM ZELLWACHSTUM

<130> P2834R1PCT

<140> EP04007617.6

<141> 02.12.1999

<150> EP99960644.5

<151> 02.12.1999

<150> PCT/US/99/28565

<151> 02.12.1999

<150> US 60/113.296

<151> 22.12.1998

<150> PCT/US/99/05028

<151> 08.03.1999

<150> US 60/130.232

<151> 21.04.1999

<150> US 60/131.445

<151> 28.04.1999

<150> US 60/134.287

<151> 14.05.1999

<150> US 60/144.758

<151> 20.07.1999

<150> US 60/145.698

<151> 26.07.1999

<150> PCT/US99/21090

<151> 15.09.1999

<150> PCT/US99/21547

<151> 15.09.1999

<160> 5

<210> 1

<211> 2260

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> unsicher

<222> 2009, 2026, 2033, 2055, 2074, 2078, 2086



&lt;223&gt; unbekannte Base

&lt;400&gt; 1

cggacgcgtg ggtgcgagtg gagcggagga cccgagcggc tgaggagaga 50  
 ggaggcggcg gcttagctgc tacgggggtcc ggccggcgcc ctcccaggg 100  
 gggctcagga ggaggaagga ggaccctgc gagaatgcct ctgccctgga 150  
  
 gccctgcgtc cccgctgctg ctctcctggg tggcaggtgg tttcggaac 200  
 gcggccagtg caaggcatca cgggttgta gcatcgccac gtcagcctgg 250  
 ggtctgtcac tatggaacta aactggcctg ctgctacggc tggagaagaa 300  
 acagcaaggg agtctgtgaa gctacatgcg aacctggatg taagtttggt 350  
 gagtgcgtgg gaccaaaca atgcagatgc tttccaggat acaccgggaa 400  
 aacctgcagt caagatgtga atgagtgtgg aatgaaaccc cggccatgcc 450  
 aacacagatg tgtgaataca cacggaagct acaagtgcct ttgcctcagt 500  
 gggccacatgc tcatgccaga tgctacgtgt gtgaactcta ggacatgtgc 550  
 catgataaac tgtcagtaca gctgtgaaga cacagaagaa gggccacagt 600  
 gcctgtgtcc atcctcagga ctccgcctgg ccccaaatgg aagagactgt 650  
 ctagatattg atgaatgtgc ctctggtaaa gtcatctgtc cctacaatcg 700  
 aagatgtgtg aacacatttg gaagctacta ctgcaaagt cacattgggt 750  
 tcgaactgca atatatcagt ggacgatatg actgtataga tataaatgaa 800  
 tgtactatgg atagccatac gtgcagccac catgccaat gcttcaatac 850  
 ccaaggggtcc ttcaagtgt aatgcaagca gggatataaa ggcaatggac 900  
 ttcggtgttc tgctatccct gaaaattctg tgaaggaagt cctcagagca 950  
 cctggtacca tcaaagacag aatcaagaag ttgcttgctc aaaaaaacag 1000  
 catgaaaaag aaggcaaaaa ttaaaaatgt taccacagaa cccaccagga 1050  
 ctctacccc taaggtgaac ttgcagccct tcaactatga agagatagtt 1100  
 tccagagggc ggaactctca tggaggtaaa aaagggaatg aagagaaatg 1150  
 aaagaggggc ttgaggatga gaaaagagaa gagaaagccc tgaagaatga 1200  
 catagaggag cgaagcctgc gaggagatgt gtttttccct aaggtgaatg 1250  
 aagcaggtga attcggcctg attctgggtcc aaaggaaagc gctaacttcc 1300  
 aaactggaac ataaagattt aaatatctcg gttgactgca gcttcaatca 1350  
 tgggatctgt gactggaaac aggatagaga agatgatttt gactggaatc 1400

ctgctgatcg agataatgct attggcttct atatggcagt tccggccttg 1450  
gcaggtcaca agaaagacat tggccgattg aaacttctcc tacctgacct 1500  
gcaaccccaa agcaacttct gtttgcctct tgattaccgg ctggccggag 1550  
acaaagtcgg gaaacttcga gtgtttgtga aaaacagtaa caatgccttg 1600  
gcatgggaga agaccacgag tgaggatgaa aagtggaaga cagggaaaat 1650  
tcagttgtat caaggaactg atgctaccaa aagcatcatt tttgaagcag 1700  
aacgtggcaa gggcaaaacc ggcgaaatcg cagtggatgg cgtcttgctt 1750

gtttcaggct tatgtccaga tagcctttta tctgtggatg actgaatggt 1800  
actatcttta tatttgactt tgtatgtcag ttccctgggt ttttgatat 1850  
tgcacatag gacctctggc attttagaat tactagctga aaaattgtaa 1900  
tgtaccaaca gaaatattat tgtaagatgc ctttcttgta taagatatgc 1950  
caatatattgc tttaaataatc atatcactgt atcttctcag tcatttctga 2000  
atctttccnc attatattat aaaatntgga aangtcagtt tatctccct 2050  
cctcngtata tctgatttgt atangtangt tgatgngctt ctctctacaa 2100  
catttctaga aaatagaaaa aaaagcacag agaaatgttt aactgtttga 2150  
ctcttatgat acttcttgga aactatgaca tcaaagatag acttttgctt 2200  
aagtggctta gctgggtctt tcatagccaa acttgtatat ttaattcttt 2250  
gtaataataa 2260

<210> 2

<211> 338

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met	Pro	Leu	Pro	Trp	Ser	Leu	Ala	Leu	Pro	Leu	Leu	Leu	Ser	Trp
1				5					10					15
Val	Ala	Gly	Gly	Phe	Gly	Asn	Ala	Ala	Ser	Ala	Arg	His	His	Gly
				20					25					30
Leu	Leu	Ala	Ser	Ala	Arg	Gln	Pro	Gly	Val	Cys	His	Tyr	Gly	Thr
				35					40					45
Lys	Leu	Ala	Cys	Cys	Tyr	Gly	Trp	Arg	Arg	Asn	Ser	Lys	Gly	Val
				50					55					60

Cys Glu Ala Thr Cys Glu Pro Gly Cys Lys Phe Gly Glu Cys Val	65	70	75
Gly Pro Asn Lys Cys Arg Cys Phe Pro Gly Tyr Thr Gly Lys Thr	80	85	90
Cys Ser Gln Asp Val Asn Glu Cys Gly Met Lys Pro Arg Pro Cys	95	100	105
Gln His Arg Cys Val Asn Thr His Gly Ser Tyr Lys Cys Phe Cys	110	115	120
Leu Ser Gly His Met Leu Met Pro Asp Ala Thr Cys Val Asn Ser	125	130	135
Arg Thr Cys Ala Met Ile Asn Cys Gln Tyr Ser Cys Glu Asp Thr	140	145	150
Glu Glu Gly Pro Gln Cys Leu Cys Pro Ser Ser Gly Leu Arg Leu	155	160	165
Ala Pro Asn Gly Arg Asp Cys Leu Asp Ile Asp Glu Cys Ala Ser	170	175	180
Gly Lys Val Ile Cys Pro Tyr Asn Arg Arg Cys Val Asn Thr Phe	185	190	195
Gly Ser Tyr Tyr Cys Lys Cys His Ile Gly Phe Glu Leu Gln Tyr	200	205	210
Ile Ser Gly Arg Tyr Asp Cys Ile Asp Ile Asn Glu Cys Thr Met	215	220	225
Asp Ser His Thr Cys Ser His His Ala Asn Cys Phe Asn Thr Gln	230	235	240
Gly Ser Phe Lys Cys Lys Cys Lys Gln Gly Tyr Lys Gly Asn Gly	245	250	255
Leu Arg Cys Ser Ala Ile Pro Glu Asn Ser Val Lys Glu Val Leu	260	265	270
Arg Ala Pro Gly Thr Ile Lys Asp Arg Ile Lys Lys Leu Leu Ala	275	280	285
His Lys Asn Ser Met Lys Lys Lys Ala Lys Ile Lys Asn Val Thr	290	295	300
Pro Glu Pro Thr Arg Thr Pro Thr Pro Lys Val Asn Leu Gln Pro	305	310	315
Phe Asn Tyr Glu Glu Ile Val Ser Arg Gly Gly Asn Ser His Gly	320	325	330
Gly Lys Lys Gly Asn Glu Glu Lys	335	338	

<210> 3  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Synthetische Oligonucleotidsende

<400> 3  
 cctcagtggc cacatgctca tg 22

<210> 4  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Synthetische Oligonucleotidsende

<400> 4  
 ggctgcacgt atggctatcc atag 24

<210> 5  
 <211> 50  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Synthetische Oligonucleotidsende

<400> 5  
 gataaactgt cagtacagct gtgaagacac agaagaaggc ccacagtgcc 50

### Patentansprüche

1. Verwendung eines Mittels zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Tumoren in einem Säugetier, worin das Mittel ein Polypeptid ist, das zumindest 80 % Aminosäuresequenzidentität über die volle Länge von entweder:

- (i) der in [Fig. 2](#) gezeigten Aminosäuresequenz der Reste 1 oder x bis 338 (Seq.-ID Nr. 2), worin x jeder beliebige Aminosäurerest von 17 bis 26 ist, oder
- (ii) einem Fragment der in [Fig. 6](#) gezeigten Aminosäuresequenz aufweist, worin das Polypeptid eine Länge von zumindest 10 Aminosäuren aufweist und in vitro antiproliferative Aktivität gegen Tumorzellen aufweist.

2. Verwendung nach Anspruch 1, worin der Tumor ein Krebs ist.

3. Verwendung nach Anspruch 2, worin der Krebs aus der aus Brustkrebs, Ovarialkrebs, Nierenkrebs, Kolorektalkrebs, Gebärmutterkrebs, Prostatakrebs, Lungenkrebs, Blasenkrebs, Krebs des Zentralnervensystems, Melanom und Leukämie bestehenden Gruppe ausgewählt ist.

4. Verwendung nach einem der vorangehenden Ansprüche, worin sich das Identitätsniveau auf zumindest 90 % beläuft.

5. Verwendung nach Anspruch 4, worin sich das Identitätsniveau auf zumindest 95 % beläuft.

6. Verwendung nach Anspruch 5, worin das Polypeptid die in [Fig. 2](#) gezeigte Aminosäuresequenz der Reste 1 oder x bis 338 (Seq.-ID Nr. 2) aufweist, worin x jeder beliebige Aminosäurerest von 17 bis 26 ist.

7. Verwendung nach einem der vorangehenden Ansprüche, worin x 22 ist.
8. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 5 und 7, worin das Polypeptid eine Länge von zumindest 50 Aminosäuren aufweist.
9. Verwendung nach Anspruch 8, worin das Polypeptid eine Länge von zumindest 100 Aminosäuren aufweist.
10. Verwendung nach Anspruch 8, worin das Polypeptid eine Länge von zumindest 150 Aminosäuren aufweist.
11. Verwendung nach Anspruch 8, worin das Polypeptid eine Länge von zumindest 200 Aminosäuren aufweist.
12. Verwendung nach einem der vorangehenden Ansprüche, worin das Medikament zusätzlich ein weiteres wachstumshemmendes Mittel, zytotoxisches Mittel oder chemotherapeutisches Mittel umfasst.
13. Verwendung nach einem der vorangehenden Ansprüche, worin das Säugetier ein Mensch ist.
14. In-vitro-Verfahren zur Inhibierung des Wachstums einer Tumorzelle, umfassend das Aussetzen der Tumorzelle gegenüber einer wirksamen Menge eines Mittels, wie es in einem der Ansprüche 1 bis 11 definiert ist.
15. Verfahren nach Anspruch 14, worin der Tumor wie in Anspruch 2 oder Anspruch 3 definiert ist.

Es folgen 2 Blatt Zeichnungen

CGGACGCGTGGTGCGAGTGGAGCGGAGGACCCGAGCGGCTGAGGAGAGAGGAGGCGCGGCTTAGCTGCTACGG  
GGTCCGGCCGGCGCCCTCCCGAGGGGGGCTCAGGAGGAGGAAGGAGGACCGTGCGAGAATGCCCTCTGCCCTGGA  
GCCTTGCGCTCCCGCTGCTGCTCTCTGGTGGCAGGTGGTTTCGGGAACGCGGCCAGTGC AAGGCATCAGCGGT  
TGTTAGCATCGGCACGTGACGCTGGGCTCTGTCTACTATGGAACATAAATGGCCCTGCTCTACGGCTGGAGAAGAA  
ACAGCAAGGGAGTCTGTGAAGCTACATGCGAACCTGGATGTAAGTTTGGTGAGTGGCTGGGACCAAACTAATGCA  
GATGCTTTCCAGGATAACACCGGAAAAACCTGCAGTCAAGATGTGAATGAGTGTGGAATGAAACCCCGGCCATGCC  
AACACAGATGTGTGAATACACACGGAAGCTACAAGTGCTTTTGCCTCAGTGGCCACATGCTCATGCCAGATGCTA  
CGTGTGTGAAGCTTAGGACATGTGCCATGATAAACTGTCACTACAGCTGTGAAGACACAGAGAAGGGCCACAGT  
GCCTGTGCTCATCTCAGGACTCCGCTCGCCCAATGGAAGAGACTGTCTAGATATTGATGAATGTGCCCTCTG  
GTAAAGTCATCTGTCCCTACAATCGAAGATGTGTGAACACTTTGGAAGCTACTACTGCGAAATGTCAATGGTT  
TCGAAGTGC AATATATCAGTGGACGATATGACTGTATAGATATAAATGAATGTACTATGGATAGCCATACGTGCA  
GCCACCATGCCAATTGCTTCAATACCAAGGGTCTTCAAGTGTAATGCAGCAGGGATATTAAGGCAATGGAC  
TTCGGTGTCTGTCTATCCCTGAAAATCTGTGAAGGAAGTCTCAGAGCACTGGTACCATCAAAGACAGAATCA  
AGAAGTTGCTTGCTCACAAAAACAGCATGAAGAAAGGCAAAAATTAATAATGTATCCCCAGAACCCACAGGA  
CTCTACCCCTGAAGTGAACCTGCAGCCCTCAACTATGAAGAGATAGTTTCCAGAGGCGGGAACTCTCATGGAG  
GTAAAAAAGGGAATGAAGAGAAATGAAGAGGGGCTTGAGGATGAGAAAAGAGAAGAGAAGGCCCTGAAGAATGA  
CATAGAGGAGCGAAGCCTGCGAGGAGATGTGTTTTCCCTTAAGGTGAATGAAGCAGGTGAATTCGGCCCTGATTC  
GGTCCAAAGGAAGCGCTAACTTCCAACCTGGAACATAAAGATTTAAATATCTCGGTACGTCGACCTCAATCA  
TGGGATCTGTGACTGGAAACAGGATAGAGAAGATGATTTGACTGGAATCTGCTGATCGAGATAATGCTATTGG  
CTTCTATATGGCAGTTCCGGCCTTGGCAGGTCAACAAGAAAGACATTGGCCGATTGAAACTTCTCCTACCTGACCT  
GCACCCCAAAGCAACTCTGTGTTGCTCTTTGATTACCGGCTGGCCGGAGACAAAGTCCGGAAACTTCGAGTGT  
TGTGAAAAACAGTAAACAATGCCCTGGCATGGGAGAGCCACGAGTGAGGATGAAAGTGGAAACAGGGAAT  
TCAGTTGTATCAAGGAACTGTAGCTACCAAAGCATCATTTTGAAGCAGACACTGGCAAGGCAAAACCGGCGA  
AATCGCAGTGGATGGCGTCTTGCTTGTTTCAGGCTTATGTCCAGATAGCCTTTTATCTGTGATGACTGAATGTT  
ACTATCTTTATATTGACTTTGTATGTCACTTCCCTGGTTTTTGTATATGTCATCAGAGGCTCTGGCATTTT  
AGAATTACTAGCTGAAAAATTTGTAATGTACCAACAGAAATATTGTAAGATGCCTTCTGTATTAAGATATGC  
CAATATTGTCTTTAATATCATCATCTGATCATCTCTCAGTCACTTCTGAATCTTTCCNCAITATATATATAAAAT  
NTGGAAANGTCAGTTTATCTCCCTCCTCNGTATATCTGATTGTATANGTANGTTGATGNGCTTCTCTACAA  
CATTTCTGAAAAATAGAAAAAAAGCAAGAGAAATGTTTAAGTCTTTGACTCTTATGATACCTCTTGGAACCTA  
TGACATCAAGAGATAGACTTTTGCCTAAGTGGCTTAGCTGGTCTTTCATAGCCAACTTGATATTTAATCTTT  
GTAATAATAA

FIGUR 2

Signalpeptid:	Aminosäuren 1-21
Amidierungsstelle:	Aminosäuren 330-334
Asparaginsäure- und Asparaginhydroxylierungsstellen:	Aminosäuren 109-121; 191-203; 236-248
EGF-ähnliche Domänen-Cysteinustersignatur:	Aminosäuren 80-91
Calcium bindende EGF-ähnliche Domänen:	Aminosäuren 103-125; 230-252; 185-207

MPLPWSLALPLLLSWVAGGFGNAASARHHGLLASARQPGVCHYGTKLACCYGWRRNSKGVCEATCEPGCKFGECV  
 GPNKCRCFPGYTGKTCSQDVNECGMKPRPCOHRVCVNTHGSKYKCFCLSGHMLMPDATCVNSRTCAMINQYSCEDT  
 EEGPQCLCPSSGLRLAPNGRDCLDIDECASGKVICPYNRRVCVNTFGSYCKCHIGFELQYISGRYDCIDINECTM  
 DSHTCSHHANCFNTQGSFKCKCKQGYKGNGLRCSAIPENSVKVLRAPGTIKDRIKKLLAHKNSMKKKAKIKNVT  
 PEPTRTPTPKVNLQPFNYEEIVSRGGNSHGGKKGNEEK