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

(10) **DE 692 31 223 T3** 2008.01.17

(12) Übersetzung der geänderten europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 577 752 B2**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **692 31 223.4**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US92/02317**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **92 910 478.4**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1992/017497**
(86) PCT-Anmeldetag: **23.03.1992**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **15.10.1992**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **12.01.1994**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **05.07.2000**
(97) Veröffentlichungstag des geänderten Patents beim EPA: **11.07.2007**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **17.01.2008**

(51) Int Cl.[8]: ***C12N 15/12*** (2006.01)
C12N 15/10 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
C12P 21/08 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

677211	**29.03.1991**	**US**
810782	**19.12.1991**	**US**

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

(73) Patentinhaber:
Genentech, Inc., South San Francisco, Calif., US

(74) Vertreter:
LEINWEBER & ZIMMERMANN, 80331 München

(72) Erfinder:
LEE, James, San Bruno, US; HOLMES, E., William, Pacifica, US; WOOD, I., William, San Mateo, US

(54) Bezeichnung: **MENSCHLICHE PF4A REZEPTOREN UND IHRE VERWENDUNG**

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

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft das Gebiet der Untersuchung von Blutplättchen- bzw. Thromhozyten-Faktor-4-Überfamilien-Mitgliedern (nachstehend kurz als „PF4A" bezeichnet) und die Herstellung von Agonisten für und Antagonisten gegen die Mitglieder dieser Familie.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0002] Während Interleukin-8 anfänglich als chemische Lockstoffe für Neutrophile identifiziert wurde und bekanntermaßen einen Rezeptor auf Neutrophilen band[3-10], zeigt es zusätzlich eine Reihe von entzündungsfördernden Aktivitäten wie etwa die Stimulierung von Degranulation und die Aufwärtsregulierung des Zelladhäsionsmoleküls MAC-1 und des Komplementrezeptors CR1[1]. IL-8 kann auch die Hemmung der Haftung von Neutrophilen an aktivierten Endothelzellen vermitteln.[2]

[0003] IL-8 ist ein Mitglied einer Familie von zehn oder mehr entzündungsfördernden Zytokinen mit einem MG von etwa 10.000[1]. Diese größere Familie von Proteinen wird als Thrombozyten-Faktor-4-Überfamilie bezeichnet (Wolpe et al., FASEB J. 3, 2565-73 (1989)). Einige Mitglieder der Thrombozyten-Faktor-4-Überfamilie, im Allgemeinen die als CXC-Peptide bezeichnete Untergruppe (einschließlich IL-8), besitzt Neutrophil-Agonisten-Aktivität, z.B. NAP-2, MIP-2, Thrombozyten-Faktor 4 und NAP-3 (IMGSA/gro). Andere Mitglieder dieser Familie, die C-C-Peptide, sind keine Neutrophil-Agonisten. „PF4A" ist in der Folge das Kürzel für die PF4-Überfamilie.

[0004] Es ist ein Ziel der vorliegenden Erfindung, Rezeptoren für die PF4A-Überfamilie (nachstehend „PF4AR" genannt) zu identifizieren.

[0005] Ein weiteres Ziel ist es, DNA zu erhalten, die für diese Rezeptoren kodiert oder daran hybridisiert, und die Rezeptoren in Wirtszellen zu exprimieren.

[0006] Ein weiteres Ziel der Erfindung ist die Bereitstellung von Isolaten von PF4AR für diagnostische und therapeutische Zwecke.

[0007] Ein zusätzliches Ziel besteht darin, DNA zu erhalten, die für Varianten solcher Rezeptoren kodiert, und solche Varianten in Rekombinations-Zellkultur zu produzieren.

[0008] Diese und weitere Ziele der Erfindung ergeben sich aus der gesamten Beschreibung.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0009] In einem ersten Aspekt bietet die Erfindung ein isoliertes PF4AR-Polypeptid mit zumindest 85 % Sequenzhomologie mit der translatierten Aminosäuresequenz aus **Fig.** 2, 4 oder 5.

[0010] In einem weiteren Aspekt wird ein isoliertes PF4AR-Polypeptid bereitgestellt, in dem die Nukleinsäure, die für das PF4AR-Polypeptid kodiert, mit dem Komplement der Nukleinsäure, die für das Polypeptid aus **Fig.** 4 oder 5 kodiert, unter sehr rauen Bedingungen hybridisiert.

[0011] In einem weiteren Aspekt bietet die Erfindung eine Zusammensetzung, die den PF4AR umfasst, der frei von kontaminierenden Polypeptiden jener Tierspezies ist, von welcher der PF4AR stammt.

[0012] Der PF4AR oder Fragmente davon (die auch durch chemische Verfahren synthetisiert sein können) werden (durch Rekombinations-Expression oder kovalente in vitro-Verfahren) an ein immunogenes Polypeptid fusioniert, und dieses Fusionspolypeptid dient seinerseits dazu, ein Tier zu immunisieren, um Antikörper gegen ein PF4AR-Epitop zu bilden. Anti-PF4AR-Antikörper werden aus dem Serum immunisierter Tiere gewonnen. Alternativ dazu werden monoklonale Antikörper in herkömmlicher Weise aus Zellen des immunisierten Tieres gewonnen.

[0013] Anti-PF4AR-Antikörper eignen sich besonders zur Diagnose (in vitro oder in vivo) oder – wenn sie auf einer unlöslichen Matrix immobilisiert sind – zur Reinigung des PF4AR.

[0014] Substitutions-, Deletions- oder Insertionsvarianten des PF4AR werden durch in vitro- oder Rekombinationsverfahren hergestellt und hinsichtlich Immun-Kreuzreaktivität mit dem PF4AR und hinsichtlich

PF4AR-Antagonisten- oder -Agonisten-Aktivität gescreent.

[0015] Der PF4AR wird auch in vitro derivatisiert, um immobilisierten PF4AR und markierten PF4AR herzustellen, insbesondere zur Diagnose von PF4AR oder seiner Antikörper oder zur Affinitätsreinigung von PF4AR-Antikörpern.

[0016] Der PF4AR, seine Derivate oder seine Antikörper werden in physiologisch annehmbare Vehikel formuliert, die insbesondere der therapeutischen Verwendung dienen. Solche Vehikel umfassen PF4AR-Retard-Formulierungen.

[0017] In weiteren Aspekten bietet die Erfindung ein isoliertes Nukleinsäuremolekül, das für den PF4AR (markiert oder unmarkiert) kodiert, und eine Nukleinsäuresequenz, die komplementär zur einer für den PF4AR kodierenden Nukleinsäuresequenz ist oder unter geeigneten Bedingungen damit hybridisiert.

[0018] Außerdem bietet die Erfindung einen replizierbaren Vektor, der das für den PF4AR kodierende Nukleinsäuremolekül umfasst und operabel mit Kontrollsequenzen verbunden ist, die von einem mit dem Vektor transformierten Wirt erkannt werden; mit dem Vektor transformierte Wirtszellen; sowie ein Verfahren zur Verwendung eines Nukleinsäuremoleküls, das für den PF4AR kodiert, um Produktion des PF4AR zu bewirken, umfassend das Exprimieren des Nukleinsäuremoleküls in einer Kultur der transformierten Wirtszellen und das Gewinnen des PF4AR aus der Wirtszellenkultur. Die Nukleinsäuresequenz eignet sich auch für Hybridisierungssassays auf PF4AR-Nukleinsäure. Die Rekombinations-Wirtszellen eignen sich besonders zur Untersuchung geeigneter PF4A-Mitglieder.

[0019] In weiteren Ausführungsformen bietet die Erfindung ein Verfahren zur Produktion von PF4AR, umfassend das Insertieren eines Transkriptionsmodulations-Elements in die DNA einer Zelle, welche die für den PF4AR kodierende Nukleinsäure enthält, in ausreichender Nähe und Ausrichtung zur PF4AR-Nukleinsäure, um die Transkription von DNA, die für einen biologisch aktiven PF4AR kodiert, zu beeinflussen oder zu zerstören, wobei ein optionaler weiterer Schritt das Kultivieren der Zelle umfasst, die das Transkriptionsmodulations-Element und die PF4AR-Nukleinsäure enthält.

KURZE BESCHREIBUNG DER ABBILDUNGEN

[0020] **Fig.** 1 zeigt die Bindung mit hoher Affinität von IL-8 an COS-Zellen, die mit dem Klon pRK5B.il8r1.1 transfiziert wurden. a) Kompetition mit unmarkiertem IL-8 oder fMLP. b) Scatchard-Analyse der IL-8-Kompetitionsdaten; scheinbare Kd = 3,6 nM, Mittelwert von 820.000 Bindungsstellen/Zelle. Ähnliche Kompetitionen mit Human-Neutrophilen ergab eine Kd = 1,1 nM, 31.000 Bindungsstellen/Zelle.

[0021] Die **Fig.** 2a-2c (SEQ.-ID Nr. 1) (nachstehend kollektiv als **Fig.** 2 bezeichnet) zeigen die Aminosäure- und Nukleotidsequenzen des IL-8-Rezeptor-cDNA-Inserts des Klons pRK5B.il8r1.1. Die 7 vermeintlichen Transmembran-Domänen sind dargestellt. Es gibt 4 extrazelluläre Segmente und 4 intrazelluläre Segmente, die jeweils durch eine der Transmembran-Domänen getrennt sind. Die extrazellulären Segmente sind etwa durch die Reste 1-39, 99-111, 134-154, 175-203 und 265-290 begrenzt. Der IL-8-Rezeptor enthält 3 potenzielle N-gebundene Glykosylierungsstellen in der ersten extrazellulären Region und 3 weitere in der dritten extrazellulären Schleife.

[0022] Fig. 3a zeigt die Durchflusszytometrie-Bestimmung der intrazellulären Ca^{++}-Response transfizierter Human-IL-8- und -fMLP-Rezeptoren auf ihre Liganden. Human-Embryonieren-293-Zellen wurden durch Elektroporation[19] mit IL-8-Rezeptor-(Klon pRK5B.il8r1.1), fMLP-Rezeptor-(Human-fMLP-Rezeptor-cDNA[3] im Vektor pRK5) oder Vektor-(pRK5B[18]) DNA transfiziert. Nach 2 Tagen wurden die Zellen mit 2 µM Indo-1-acetoxymethylester in RPMI-Medium 30 min lang bei 37°C beladen. Intrazelluläres Ca^{++} wurde mit einem Coulter 753-Durchflusszytometer unter Verwendung des Verhältnisses zwischen der Fluoreszenz bei 405 und bei 525 nm gemessen.[23]

[0023] Fig. 3b zeigt den Prozentsatz an Zellen über 400 nM Ca_i^{++} für den Zeitraum nach der Zugabe von IL-8 (etwa 15 s nach Beginn jedes Durchlaufs).

[0024] Die **Fig.** 4 (SEQ.-ID Nr. 2) und 5 (SEQ.-ID Nr. 3) zeigen die DNA und mutmaßliche Polypeptidsequenzen für zwei zusätzliche PF4AR-Mitglieder, die mittels Sondierung von Lambda-Bibliotheken aus einer Monozyten-ähnlichen Human-Zelllinie (HL-60) und Human-PBLs unter Einsatz eines großen Fragments der IL-8-Rezeptur-DNA identifiziert wurden.

AUSFÜHRLICHE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0025] Die Anmelder isolierten durch Expressionsklonierung cDNA, die für den Human-Neutrophil-IL-8-Rezeptor, zusammen mit zwei anderen homologen Rezeptoren, kodiert. Die Aminosäuresequenz zeigt, dass der IL-8-Rezeptor ein Mitglied der G-Protein-gebundenen Rezeptorfamilie mit deutlicher Ähnlichkeit (29 % Aminosäureidentität) zu den Human-Neutrophil-Rezeptoren für die chemischen Lockstoffe f-Met-Leu-Phe[3] und C5a[4] ist. Obwohl die IL-8-Rezeptorsequenz das Human-Homolog der identifizierten Isoform des Kaninchen-f-Met-Leu-Phe-Rezeptors sein kann[5], zeigen die Anmelder, dass beim Transfizieren in Säugetierzellen dieser Rezeptorklon IL-8 hochaffine Bindung verleiht und vorübergehende Ca^{++}-Mobilisierung als Reaktion auf IL-8 ohne Bindung oder Reaktion auf f-Met-Leu-Phe hervorruft.

[0026] Eine COS-Zellen-Expressionsklonierungsstrategie[6,7] diente zum Isolieren von Klonen, die für den IL-8-Rezeptor kodieren. Eine cDNA-Bibliothek aus Human-Neutrophil-mRNA im Säugetier-Expressionsvektor pRK5B wurde in COS-7-Zellen als Pools von 2.500 Klonen transfiziert, und die Zellen wurden auf Bindung von ^{125}I-IL-8 gescreent. Ein positiver Pool aus den ersten 58 Transfektionen wurde in kleinere Pools unterteilt, bis ein reiner Klon (pRK5B.il8r1.1) erhalten wurde. **Fig.** 1 stellt die Kompetition der ^{125}I-IL-8-Bindung mit nichtmarkiertem IL-8 an COS-Zellen dar, die mit dem isolierten Klon transfiziert wurden. Eine Analyse dieser Daten liefert eine Kd von 3,6 nM für die IL-8-Bindung, was innerhalb des Bereichs von 0,8 bis 4 nM liegt, über den betreffend die IL-8-Bindung an Human-Neutrophile berichtet wurde.[8-10] Es liegt keine Kompetition der IL-8-Bindung mit dem chemotaktischen Peptid f-Met-Leu-Phe (fMLP) vor.

[0027] Die DNA-Sequenz des isolierten cDNA-Klons (**Fig.** 2) enthält einen einzelnen langen offenen Leserahmen, der mit einem Methioninrest beginnt, der dem für eine Translations-Initiationsstelle erwarteten Konsens entspricht.[11] Dieser offene Leserahmen kodiert für ein Protein mit 350 Aminosäuren (translatiertes M_r von 39,5 kD). Die Aminosäuresequenzen haben mehrere Merkmale mit den G-Protein-gebundenen Rezeptoren der Rhodopsin-Überfamilie gemeinsam, einschließlich 7 hydrophober Domänen, die vermutlich die Zellmembran und N-gebundene Glykosylierungsstellen in der Nähe des N-Terminus überspannen[12] (siehe unten).

[0028] Die kodierte Aminosäuresequenz ähnelt am stärksten einer kürzlich klonierten Sequenz für den Kaninchen-fMLP-Rezeptor.[5] Die Ähnlichkeit ist ausreichend stark (insgesamt 79 % Aminosäureidentität mit mehreren Abschnitten von mehr als 20 angrenzenden Aminosäure-Übereinstimmungen), dass diese zwei Sequenzen genauso gut Spezieshomologe des gleichen Rezeptors sein könnten. Der Human-fMLP-Rezeptor wurde ebenfalls kloniert[3]; er weist nur 26 % Aminosäureidentität mit dem Kaninchen-fMLP-Rezeptor (und 29 % Identität mit dem hier präsentierten Human-IL-8-Rezeptor) auf. Die beträchtliche Divergenz zwischen den Kaninchen- und den Human-fMIP-Rezeptor-Aminosäuresequenzen führte auf der Gebiet zur – heute als möglicherweise falsch angesehenen – Annahme, dass selbige zwei Isoformen des fMLP-Rezeptors sein könnten.[5] Neutrophile reagieren auf die chemischen Lockstoffe IL-8 und fMLP mit einer raschen und vorübergehenden Zunahme der intrazellulären freien Ca^{++}-Konzentration.[1,13] Um die Identifizierung des hier isolierten Klons als IL-8-Rezeptor zu verifizieren, bestimmten die Anmelder die intrazelluläre Ca^{++}-Response transfizierter Zellen auf zugegebenes IL-8 sowie fMLP. Es wurden parallele Experimente mit transfiziertem Human-fMLP-Rezeptor oder mit dem Expressionsvektor als Vergleiche durchgeführt. Durchflusszytometrie-Analyse zeigt eine deutliche vorübergehende Zunahme an intrazellulärem Ca^{++} für den transfizierten IL-8-Rezeptor als Reaktion auf IL-8. Keine Response wird auf fMLP festgestellt. Mit dem Human-fMLP-Rezeptor transfizierte Zellen hingegen reagieren auf fMLP, aber nicht auf IL-8. Keinerlei Reaktion auf die chemischen Lockstoffe wird bei Vektortransfizierten Zellen beobachtet. Man kann erwarten, dass nur eine Untergruppe der Zellen in diesen Experimenten reagiert, da die Transfektionseffizienz auf 15-25 % geschätzt wird. Auch Bindungsversuche[14] konnten keine Bindung von ^{3}H-fMLP an den exprimierten IL-8-Rezeptor oder von ^{125}I-IL-8 an den exprimierten Human-fMLP-Rezeptor zeigen. Diese Experimente belegen deutlich die Spezifität der zwei Rezeptoren für ihre jeweiligen Liganden; dies ist ein Ergebnis, das man aufgrund der mangelnden Bindungskompetition zwischen IL-8 und fMLP für Neutrophile erwarten konnte.[1] Diese Ergebnisse zeigen auch, dass die klonierten Rezeptoren als Reaktion auf die Ligandenbindung durch Sekundärbotschaft-Signalisierung funktionieren.

[0029] Blot-Hybridisierung der klonierten IL-8-Rezeptor-cDNA an Human-Neutrophil-mRNA zeigt starke Banden von 2,4 und 3,0 kb sowie eine schwächere Bande bei 3,5 kb. Obwohl es aus den in **Fig.** 2 dargelegten DNA-Sequenzdaten offenkundig ist, dass der Rezeptor eine lange untranslatierte 3'-Region aufweist, sind weitere Arbeiten erforderlich, um zu ermitteln, ob die Vielzahl an RNA-Banden auf die Polyadenylierungsstellen zurückzuführen ist. Keine Hybridisierung an mRNA wurde bei U266- oder Jurkat-Zelllinien detektiert, die aus den B-Zellen und T-Zellen stammten. Man konnte auch keine Hybridisierung bei mRNA aus der Monozyten-Zelllinie U937 beobachten, obwohl es Berichte aber ein geringes Ausmaß an IL-8-Bindung an diese Zellen gibt.[9,10] Die Ausrichtung der Rezeptorsequenzen mit den drei neutrophilen chemischen Lockstoffen IL-8, fMLP[3]

und C5a[4] zeigt, dass sie eine Unterfamilie der G-Protein-gebundenen Rezeptoren mit 29-34 % Aminosäureidentität bilden. Diese Unterfamilie besitzt im Vergleich zu anderen C-Protein-gebundenen Rezeptoren wie etwa den β-Adrenergen-[12] oder Muscarin-Acetylcholin-Rezeptoren[15] eine kurze dritte intrazelluläre Schleife. Diese Schleife enthält Determinanten, die zumindest teilweise für die Bindung von G-Proteinen an die Rezeptoren verantwortlich sind.[12] Die intrazelluläre C-terminale Region des IL-8-Rezeptors ähnelt zwar jener der fMLP- und C5a-Rezeptoren nicht sehr, bewahrt aber eine hohe Zahl an Serin- und Threoninresten, die als Phosphorylierungsstellen dienen können. Wie beim C5a-Rezeptor beobachtet, besitzt die N-terminale extrazelluläre Region für den IL-8-Rezeptor mehrere saure Reste Diese können die Bindung von IL-8 unterstützen, das relativ basisch ist (pH ~ 9,5).

I. Definitionen

[0030] Im Allgemeinen entsprechen die folgenden Termini oder Phrasen in der vorliegenden Beschreibung, den Beispielen und den Patentansprüchen den nachstehend angeführten Definitionen:
Der Ausdruck „PF4AR" ist als Polypeptid mit qualitativer biologischer Aktivität definiert, die es mit den Polypeptiden aus **Fig.** 2, 4 oder 5 gemeinsam hat. Gegebenenfalls besitzt PF4AR zumindest 30 %, üblicherweise 75 %, Aminosäuresequenz-Identität mit den Polypeptiden aus **Fig.** 2, 4 oder 5. PF4AR schließt den Kaninchen-fMLP-Rezeptor[5], den Human-fMLP-Rezeptor[3] und den Human-C5a-Rezeptor[1] aus.

[0031] Identität oder Homologie in Bezug auf einen PF4AR ist hierin als Prozentsatz von Aminosäureresten in der Kandidatensequenz definiert, die mit den Resten aus **Fig.** 2, 4 oder 5 identisch sind, nachdem die Sequenzen ausgerichtet und im Bedarfsfall Lücken eingeführt wurden, um die maximale prozentuelle Homologie zu erzielen, wobei nicht davon ausgegangen wird, dass konservative Substitutionen Restidentität darstellen. Keine N- oder C-terminalen Extensionen, Deletionen oder Insertionen sollen so ausgelegt werden, dass sie die Identität oder Homologie verringern.

[0032] Die qualitative biologische Aktivität von PF4AR ist folgendermaßen definiert: (1) als immunologische Kreuzreaktivität mit zumindest einem Epitop eines der in den **Fig.** 2, 4 oder 5 dargestellten Polypeptids; (2) als Fähigkeit, sich spezifisch an ein Mitglied der PF4-Überfamilie zu binden; oder (3) als Effektor oder funktionelle Aktivität der Polypeptide aus **Fig.** 2, 4 oder 5, wie sie in der Natur vorgefunden werden, einschließlich ihrer Fähigkeit, sich an Liganden oder andere Überfamilienmitglieder zu binden.

[0033] „Immunologisch kreuzreaktiv" bedeutet hierin, dass der Polypeptidkandidat zur kompetitiven Hemmung der Bindung eines PF4AR an polyklonale Antikörper oder Antiseren gegen einen PF4AR fähig ist. Solche Antikörper und Antiseren werden in herkömmlicher Weise durch Injizieren, beispielsweise subkutan, des bekannten nativen PF4AR in vollständigem Freund-Adjuvans in ein Tier, wie z.B. eine Ziege oder ein Kaninchen, gefolgt von intraperitonealer oder subkutaner Auffrischungsinjektion in unvollständigem Freund-Adjuvans, produziert.

[0034] Der Ausdruck PF4AR umfasst hierin auch Polypeptide mit den in den **Fig.** 2, 4 oder 5 beschriebenen Aminosäuresequenzen, Aminosäuresequenz-Varianten solcher Aminosäuresequenzen, Glykosylierungsvarianten der Polypeptide und kovalente Modifikationen der Polypeptide. Sie alle sind nachstehend ausführlich beschrieben.

[0035] „Isolierte(s)" PF4AR-Nukleinsäure oder Polypeptid ist ein(e) PF4AR-Nukleinsäure oder Polypeptid, die/das identifiziert und von zumindest einer Verunreinigung (Nukleinsäure bzw. Polypeptid) befreit ist, mit dem sie/es in der Natur üblicherweise assoziiert ist, z.B. von der tierischen oder menschlichen Quelle der PF4AR-Nukleinsäure oder des PF4AR-Polypeptids. In bevorzugten Ausführungsformen ist der PF4AR in Bezug auf Proteine seiner Ursprungsspezies auf pharmazeutisch annehmbare Reinheitswerte isoliert. In bevorzugten Ausführungsformen ist das PF4AR-Protein auf folgende Werte gereinigt: (1) auf mehr als 95 Gew.-% Protein (ermittelt durch das Lowry-Verfahren), am bevorzugtesten auf mehr als 99 Gew.-%, (2) auf einen Grad, der ausreicht, um zumindest 15 Reste N-terminaler oder interner Aminosäuresequenz durch einen (zum Einreichdatum im Handel erhältlichen) Aminosäuresequencer zu erhalten, oder (3) auf Hamogenität durch herkömmliche nichtreduzierende SDS-PAGE unter Einsatz von Coomassieblau oder vorzugsweise Silberfärbung. Isolierter PF4AR enthält PF4AR in situ mit rekombinierten Zellen, da in diesem Fall zumindest eine Komponente der natürlichen PF4AR-Umgebung nicht vorhanden ist. Isolierter PF4AR umfasst PF4AR aus einer Spezies in Rekombinations-Zellkultur einer weiteren Spezies, da der Rezeptor in solchen Fällen keine Quellenpolypeptide aufweist. Üblicherweise wird jedoch isolierter Rezeptor mittels zumindest eines Reinigungsschritts gewonnen.

[0036] Isolierte PF4AR-Nukleinsure umfasst Nukleinsäure, die identifiziert und zumindest von einer verunreinigenden Nukleinsäure getrennt wurde, mit der sie üblicherweise in der natürlichen Quelle der Rezeptor-Nukleinsäure assoziiert ist. Isolierte PF4AR-Nukleinsäure ist somit in mehr als einer Form oder Umgebung vorhanden, in der sie in der Natur vorgefunden wird. Isolierte, für Rezeptor kodierende Nukleinsäure umfasst jedoch PF4AR-Nukleinsäure in normalerweise den Rezeptor exprimierenden Zellen, wo die Nukleinsäure an einer chromosomalen Position angeordnet ist, die sich von jener natürlicher Zellen unterscheidet, oder ansonsten von einer anderen DNA-Sequenz flankiert wird als von der in der Natur vorkommenden.

[0037] Die Nukleinsäure oder das Polypeptid kann für diagnostische oder Sondierungszwecke markiert werden; hier kommt ein Marker zur Anwendung, der weiter unten bei der Diskussion diagnostischer Assays beschrieben und definiert ist.

[0038] PF4AR-„Nukleinsäure" ist als RNA oder DNA definiert, die mehr als 10 Basen enthält und für eine Polypeptidsequenz aus **Fig.** 2, 4 oder 5 kodiert, zu einer Nukleinsäuresequenz aus **Fig.** 2, 4 oder 5 komplementar ist, an eine solche Nukleinsäure hybridisiert und unter wenig rauen Bedingungen stabil gebunden bleibt, oder für ein Polypeptid kodiert, das zumindest 30 %, vorzugsweise zumindest 75 %, insbesondere zumindest 85 %, Sequenzidentität mit der translatierten Aminosäuresequenz aus **Fig.** 2, 4 oder 5 oder einem Fragment davon aufweist. Vorzugsweise enthält die DNA, die an die Nukleinsäure aus **Fig.** 2, 4 oder 5 hybridisiert, zumindest 20, noch bevorzugter 40, insbesondere 60, Basen. Am bevorzugtesten enthält die hybridisierende DNA oder RNA 45 oder sogar noch bevorzugter 90 Basen. Eine derartige hybridisierende oder komplementäre Nukleinsäure ist allerdings auch dadurch definiert, dass sie im Vergleich zu beliebigen anderen Nukleinsäuren nach denn Stand der Technik neuartig ist, auch gegenüber jener, die für Nukleinsäure kodiert, unter wenig rauen Bedingungen daran hybridisiert oder dazu komplementär ist, welche für Kaninchen-fMLP-Rezeptor[5], Human-fMLP-Rezeptor oder gegebenenfalls den IL-8-Rezeptor gemäß Murphy et al. (s.o.) kodiert.

[0039] „Sehr raue Bedingungen" sehen hierin Folgendes vor: (1) geringe Ionenstärke und hohe Temperatur beim Waschen, beispielsweise 0,015 M NaCl/0,0015 M Natriumcitrat/0,1 % $NaDodSO_4$ bei 50°C; (2) während der Hybridisierung Verwendung von 50 Vol.-% Formamid mit 0,1 % Rinderserumalbumin/0,1 % Ficoll/0,1 % Polyvinylpyrrolidon/50 mM Natriumphosphat-Puffer bei pH 6,5 mit 750 mM NaCl, 75 mM Natriumcitrat bei 42°C; oder (3) Hybridisierung mit 50 % Formamid, 5 × SSC (0,75 M NaCl, 0,075 M Natriumcitrat), 50 mM Natriumphosphat (pH 6,8), 0,1 % Natriumpyrophosphat, 5 × Denhardt-Lösung, ultraschallbehandelter Lachssperma-DNA (50 µg/ml), 0,1 % SDS und 10 % Dextransulfat bei 42°C, wobei die Waschungen bei 42°C in 0,2 × SSC und 0,1 % SDS erfolgen. Wenig raue Bedingungen sind in Beispiel 2 erklärt.

[0040] Der Ausdruck „Kontrollsequenzen" bezieht sich auf DNA-Sequenzen, die zur Expression einer operabel verbundenen Kodiersequenz in einem bestimmten Wirtsorganismus erforderlich sind. Die Kontrollsequenzen, die z.B. für Prokaryoten geeignet sind, enthalten einen Promotor, gegebenenfalls eine Operatorsequenz und eine Ribosomen-Bindungsstelle. Es ist bekannt, dass eukaryotische Zellen Promotoren, Polyadenylierungssignale und Enhancer verwenden.

[0041] Nukleinsäure ist „operabel verbunden", wenn sie in funktionelle Beziehung zu einer anderen Nukleinsäuresequenz gesetzt wird. Beispielsweise ist DNA für eine Präsequenz oder einen Sekretionsleader mit DNA für ein Polypeptid operabel verbunden, wenn sie als Präprotein exprimiert wird, das an der Sekretion des Polypeptids beteiligt ist; ein Promotor oder Enhancer ist mit einer Kodiersequenz operabel verbunden, wenn er die Transkription der Sequenz beeinflusst; oder eine Ribosomen-Bindungsstelle ist mit einer Kodiersequenz operabel verbunden, wenn sie so positioniert ist, dass sie die Translation erleichtert. Im Allgemeinen bedeutet „operabel verbunden", dass die gebundenen DNA-Sequenzen zusammenhängend und – im Fall eines sekretorischen Leaders – zusammenhängend und in Lesephase angeordnet sind. Enhancer müssen jedoch nicht zusammen, hängend sein. Die Verbindung erfolgt durch Ligation an geeigneten Restriktionsstellen. Wenn solche Stellen nicht existieren, werden synthetische Oligonukleotid-Adapter oder Linker gemäß herkömmlichen Verfahren eingesetzt.

[0042] Die hierin verwendeten Ausgangsplasmide sind im Handel erhältlich, uneingeschränkt für die Öffentlichkeit zugänglich oder können aus verfügbaren Plasmiden unter Einsatz veröffentlichter Techniken konstruiert werden. Darüber hinaus sind gleichwertige Plasmide auf dem Gebiet bekannt und sind für Fachleute offenkundig. Verfahren zur Restriktionsenzym-Spaltung, Gewinnung oder Isolierung von DNA, Hybridisierungsanalyse und Ligation sind konventionell und heute Fachleuten auf dem Gebiet allgemein bekannt.

[0043] „Gewinnung" oder „Isolierung" eines bestimmten DNA-Fragments aus einer Restriktionsspaltlösung bezieht sich auf Folgendes: Trennung der Spaltlösung auf Polyacrylamid- oder Agarosegel durch Elektropho-

rese, Identifizierung des Fragments von Interesse durch Vergleich seiner Mobilität mit jener von Marker-DNA-Fragmenten mit bekanntem Molekulargewicht, Entfernung des das gewünschte Fragment enthaltenden Gelabschnitts und Trennung von Gel und DNA. Diese Vorgangsweise ist allgemein bekannt. Siehe beispielsweise Lawn et al., Nucleic Acids Res. 9, 6103-6114 (1981), und Goeddel et al., Nucleic Acids Res. 8, 4057 (1980).

II. Geeignete Verfahren zur Durchführung der Erfindung

1. Herstellung von nativem PF4AR und Varianten

A. Isolierung von für PF4AR kodierender DNA

[0044] Die für den PF4AR kodierende DNA kann aus einer cDNA-Bibliothek aus Gewebe erhalten werden, von dem man annimmt, dass es die PF4AR-mRNA enthält, im Allgemeinen HL60- oder PBL-Bibliotheken. Das PF4AR-Gen kann aus aus einer genomischen Bibliothek erhalten werden. Bibliotheken werden mit Sonden gescreent, die dazu geeignet sind, das Gen von Interesse oder das davon kodierte Protein zu identifizieren. Die Anmelder beschrieben die gesamte cDNA für den IL-8-Rezeptor und zwei homologe Rezeptoren. Für diese Familie von Rezeptoren kodierende Nukleinsäure wird unter Einsatz von Sonden mit Oligonukleotidsequenzen aus den Rezeptorgensequenzen der **Fig.** 2, 4 oder 5 unter wenig rauen Bedingungen aus genomischen DNA- oder neutrophilen cDNA-Bibliotheken problemlos gewonnen. Diese Sonden enthalten üblicherweise etwa 500 oder mehr Basen. Da die Sonden perfekt an die drei als Beispiel erwähnte DNAs hybridisieren, ist es nicht notwendig, degenerierte Sequenzen enthaltende Sondenpools zu verwenden. Das Screenen mit den Sonden zur Identifizierung der Rezeptoren der **Fig.** 2, 4 oder 5 ist wirkungsvoller, wenn es unter rauen Bedingungen erfolgt.

[0045] Man nimmt an, dass andere PF4ARs als jene der **Fig.** 2, 4 oder 5 bestehen und Regionen mit Homologie zu den als Beispiele angeführten Rezeptoren enthalten. Somit können Sonden mit den Sequenzen der in den **Fig.** 2, 4 oder 5 gezeigten DNAs dazu dienen, auch diese Rezeptoren zu screenen. Die besten Sondenkandidaten sind lange Sequenzen (mehr als etwa 100 Basen), die Sequenzen darstellen, die unter den drei angeführten Humanrezeptoren hochgradig homolog sind. IL-8-cDNA, die für die IL-8-Reste 15-34, 78-94, 176-193. 264-282 und 299-312 kodiert (und vergleichbare Sonden aus anderen Rezeptoren der IL-8R-Familie) eignen sich besonders zum Sondieren auf IL-8-Rezeptor-DNA. Sonden, die sich für den Rezeptor aus **Fig.** 4 eignen (und isolierte Proteine, die für den Rezeptor aus **Fig.** 5 charakteristisch sind), sind durch Sequenzen dargestellt, welche die Reste 1-48, 77-92, 107-137, 156-177, 189-226, 239-257 und 271-315 umfassen. Homologe Sonden und Reste des Rezeptors aus **Fig.** 4 sind ebenfalls geeignet, d.h. die Reste 1-35, 64-78, 94-124, 143-164, 176-197, 219-239 und 251-295. cDNAs, die cDNA umfassen, die für die folgenden Regionen der Polypeptide aus **Fig.** 2, 4 oder 5 kodiert, eignen sich zum Sondieren hinsichtlich anderer Rezeptoren: 92-106, 57-72, 138-154, 314-329 und 57-154.

[0046] Im Allgemeinen identifiziert man zunächst eine Zelle, die zur spezifischen Bindung fähig ist oder durch eine bestimmte PF4A aktiviert wird, typischerweise durch in vitro-Bioassays und gegebenenfalls durch Zellbindungsanalyse unter Einsatz der markierten PF4A. Durch dieses Verfahren identifizierte Zellen (einige sind bereits für einzelne PF4As bekannt) exprimieren daher einen Rezeptor für diese PF4A. Eine cDNA-Bibliothek wird aus solchen Zellen gewonnen und unter Verwendung der Rezeptorsonden gescreent; dabei kommen Verfahren zur Anwendung, die an sich bekannt sind. In diesem Fahl ist es jedoch vorzuziehen, wenig raue Bedingungen auszuwählen (wie z.B. jene von Beispiel 2) und dann die resultierenden positiven Klone auf Homologie zu den Rezeptoren der **Fig.** 2, 4 oder 5 zu analysieren. Im Allgemeinen weisen Human-PF4AR-Kandidaten mehr als etwa 30 % Aminosäuresequenz-Homologie zu den Rezeptoren aus **Fig.** 2, 4 oder 5 und eine ähnliche Transmembran-Schleifenstruktur auf.

[0047] Es werden dann Assays durchgeführt, um zu bestätigen, dass die hybridisierenden Gene voller Länge der gewünschte PF4AR sind. Der Kandidat wird einfach in einen Expressionsvektor insertiert und in eine Wirtszelle transformiert, die sich üblicherweise nicht an den PF4A-Ligandenkandidat bindet. Transformanten, die sich die Fähigkeit aneignen, den Liganden zu binden, tragen daher das gewünschte Rezeptorgen. In Beispiel 2 wird dargelegt, dass zwei zusätzliche homologe Polypeptidsequenzen, die PR4ARs darstellen, unter Verwendung von für die Reste 23-314 kodierender IL-8R-DNA identifiziert werden, obwohl die jeweilige Sonde nicht als entscheidend angesehen wird.

[0048] Eine alternative Möglichkeit zum Isolieren von Genen, die für zusätzliche PF4ARs kodieren, ist die Verwendung von Polymerase-Kettenreaktions-(PCR-)Methodologie (US-A-4.683.195; Erlich (Hrsg.), PCR Technology, 1989) zur Amplifikation der Ziel-DNA oder RNA, wie z.B. in Kapitel 14 von Sambrook et al., so., be-

schrieben. Dieses Verfahren erfordert die Verwendung von Oligonukleotid-Primern, die vermutlich an PF4AR hybridisieren und problemlos aus den Rezeptor-cDNAs aus **Fig.** 2, 4 oder 5 selektiert werden. Strategien zur Selektion von Oligonukleotid-Primern sind oben beschrieben.

[0049] cDNA-Bibliotheken können aus verschiedenen Geweben gescreent werden, vorzugsweise aus Säugetier-PBL-, Monozyten-, Plazenta-, Föten-, Hirn- und Karzinomzelllinien, um DNA zu erhalten, die für die Rezeptoren aus **Fig.** 2, 4 oder 5 oder homologe Rezepturen kodiert. Am bevorzugtesten werden Human- oder Kaninchen-Plazenta-, Föten-, Hirn- und Karzinomzelllinien-cDNA-Bibliotheken mit markierten Oligonukleotidsonden gescreent.

[0050] Ein weiteres Verfahren zur Gewinnung des Gens von Interesse ist seine chemische Synthese unter Anwendung eines der von Engels et al. (Angew. Chem. Int. Ed, Engl. 28, 716-734 (1989)) beschriebenen Verfahren. Zu diesen Verfahren zählen Triester-, Phosphit-, Phosphoramidit- und H-Phosphonat-Verfahren, typischerweise unter Einsatz von Oligonukleotidsynthese auf festen Trägern. Diese Verfahren können angewandt werden, wenn die gesamte Aminosäure- oder Nukleinsäuresequenz des Gens bekannt ist oder die Sequenz der Nukleinsäure, die komplementär zum Kodierstrang ist, verfügbar ist. Wenn die gewünschte Aminosäuresequenz bekannt ist, kann man potenzielle Nukleinsäuresequenzen unter Verwendung bekannter und bevorzugter Kodierreste für jeden Aminosäurerest eruieren.

B. Aminosäuresequenz-Varianten des PF4AR

[0051] Aminosäuresequenz-Varianten des PF4AR werden durch Vornehmen geeigneter Nukleotid-Veränderungen in der PF4AR-DNA oder durch in vitro-Synthese des gewünschten PF4AR-Polypeptids hergestellt. Zu solchen Varianten zählen beispielsweise Deletionen aus oder Insertionen oder Substitutionen von Resten innerhalb der für die Rezeptoren aus **Fig.** 2, 4 oder 5 gezeigten Aminosäuresequenz. Jede Kombination von Deletion, Insertion und Substitution kann vorgenommen werden, um das Endkonstrukt zu bilden, vorausgesetzt es besitzt die gewünschten Eigenschaften.

[0052] Die Aminosäure-Veränderungen können auch die posttranslationale Verarbeitung des PF4AR modifizieren, z.B. die Zahl oder Position von Glykosylierungsstellen oder durch Änderung seiner Memhran-Verankerungs-Eigenschaften. Aus dem Schutzumfang der Erfindung sind PF4AR-Varianten oder -Polypeptidsequenzen ausgeschlossen, die gegenüber dem Stand der Technik keine Neuerung darstellen.

[0053] Bei der Konstruktion von Aminosäuresequenz-Varianten von PF4ARs hängen die Position der Mutationsstelle und die Beschaffenheit der Mutation von der bzw. den zu modifizierenden PF4AR-Eigenschaft(en) ab. Die Mutationsstellen können einzeln oder in Serie modifiziert werden, z.B. durch (1) Substituieren zunächst mit konservativen Aminosäure-Selektionen und dann mit radikaleren Selektionen (je nach den erzielten Ergebnissen), (2) Deletieren des Zielrests oder (3) Insertieren von Resten der gleichen oder einer anderen Klasse, neben der lokalisierten Stelle, oder durch eine Kombination der Optionen 1-3.

[0054] Ein brauchbares Verfahren zur Identifizierung bestimmter Reste oder Regionen des PF4AR-Polypeptids, die bevorzugte Positionen für die Mutagenese sind, wird als „Alanin-Scanning-Mutagenese" bezeichnet und wurde von Cunningham und Wells (Science 244, 1081-1085 (1989)) beschrieben. Hier wird ein Rest oder eine Gruppe von Zielresten identifiziert (z.B. geladene Reste wie etwa arg, asp, his, lys und glu) und durch eine neutrale oder negativ geladene Aminosäure (am bevorzugtesten Alanin oder Polyalanin) ersetzt, um die Wechselwirkung der Aminosäuren mit der wässrigen Umgebung innerhalb oder außerhalb der Zelle zu beeinflussen. Diese Domänen, die gegenüber den Substitutionen funktionelle Sensitivität aufweisen, werden durch Einführung weiterer oder anderer Varianten an den oder anstelle der Substitutionsstellen verfeinert. Während somit die Stelle zur Einführung einer Aminosäuresequenz-Variation vorbestimmt ist, muss die Beschaffenheit der Mutation an sich nicht vorbestimmt sein. Zur Optimierung der Leistungsfähigkeit einer Mutation an einer bestimmten Stelle kann beispielsweise ala-Scanning oder Radom-Mutagenese am Zielcodon oder an der Zielregion durchgeführt werden, wobei die exprimierten PF4AR-Varianten auf die optimale Kombination der gewünschten Aktivität gescreent werden.

[0055] Im Allgemeinen sind die für Änderungen bevorzugten Regionen des PF4AR-Moleküls nicht-hydrophile Regionen oder nicht hochgradig konservierte Regionen. Solche Regionen sind jene, in denen Sequenzen von 5 oder mehr Resten an den homologen Positionen im Kaninchen-fMLP-Rezeptor, Human-fMLP-Rezeptor, Human-C5a-Rezeptor und in den Rezeptoren aus **Fig.** 3, 4 und 5 nicht nennenswert konserviert sind.

[0056] PF4AR-Varianten wiesen zumindest biologische Aktivität der Stammsequenz auf, z.B. Liganden-Bin-

dungsaktivität oder antigene Aktivität. Antigen aktiver PF4AR ist ein Polypeptid, das sich mit Affinität von zumindest etwa 10^{-9}/Mol an einen Antikörper gegen eine natürlich vorkommende PF4AR-Sequenz bindet. Üblicherweise bindet sich das Polypeptid mit einer Affinität von zumindest etwa 10^{-8}/Mol. Am bevorzugtesten ist der antigen aktive PF4AR ein Polypeptid, das sich an einen Antikörper gegen den Rezeptor in seiner nativen Konformation bindet, wobei sich „native Konformation" im Allgemeinen auf den natürlich vorkommenden Rezeptor bezieht, der nicht durch Chaotrope, Wärme oder eine andere Behandlung, welche die dreidimensionale Struktur des Rezeptors wesentlich modifiziert, denaturiert wurde (dies kann z.B. durch Migration auf nichtreduzierenden, nicht-denaturierenden Größenklassierungsgelen bestimmt werden). Ein Antikörper zur Bestimmung antigener Aktivität ist polyklonaler Kaninchen-Antikörper, der durch Formulieren des nativen Nicht-Kaninchen-Rezeptors in vollständigem Freund-Adjuvans, subkutanes Injizieren der Formulierung und Auffrischen der Immunreaktion durch intraperitoneale Injektion der Formulierung, bis der Titer von Anti-Rezeptor-Antikörper einen Plateauwert erreicht, gebildet wird.

[0057] Eine Gruppe von Varianten sind Deletionsmutanten oder Fragmente der Sequenzen aus **Fig.** 2, 4, 5 oder anderer PF4ARs. Im Allgemeinen sind die Fragmente jene, welche die extrazellulären Regionen der Rezepturen darstellen (diese Rezeptoren sind insofern anders als die meisten anderen, als sie vermutlich eine Vielzahl hydrophober Transmembran-Domänen enthalten, die durch hydrophile Sequenzen getrennt sind, die vermutlich Schleifen in das Ektoplasma bilden). Von besonderem Interesse ist die N-terminale extrazelluläre Region, die saure Aminosäurereste enthält. Jede Sequenz jedoch, die zur Bildung eines Antikörpers fähig ist, der mit dem intakten Rezeptor kreuzreagiert, oder die sich an ein Mitglied der PF4-Überfamilie bindet, ist geeignet. Diese Fragmente enthalten typischerweise eine konsekutive Sequenz von zumindest etwa 5 (üblicherweise zumindest etwa 10) Resten.

[0058] Aminosäuresequenz-Deletionen reichen im Allgemeinen von etwa 1 bis 30 Resten, noch bevorzugter von etwa 1 bis 10 Resten, und sind typischerweise zusammenhängend. Deletionen können in Regionen geringer Homologie unter den Rezeptoren aus **Fig.** 2, 4 und 5 eingeführt werden, um die biologische Aktivität der Rezeptoren signifikanter zu modifizieren als mit anderswo erfolgten Deletionen. Die Anzahl konsekutiver Deletionen wird so gewählt, dass die Tertiärstruktur des PF4AR in der betroffenen Domäne, z.B. in β-Faltblatt oder in der α-Helix, konserviert wird.

[0059] Aminosäuresequenz-Insertionen umfassen Amino- und/oder Carboxyl-terminale Fusionen, deren Länge von einem Rest bis zu Polypeptiden mit hunderten oder mehr Resten reicht, sowie Intrasequenz-Insertionen einzelner oder mehrerer Aminosäurereste. Intrasequenz-Insertionen (d.h. Insertionen innerhalb der PF4AR-Sequenz) können im Allgemeinen von etwa 1 bis 10, noch bevorzugter 1 bis 5, am bevorzugtesten 1 bis 3, Resten reichen.

[0060] Insertionsvarianten des PF4AR oder seiner extrazellulärer Segmente sind z.B. die Fusion an den N- oder C-Terminus des PF4AR immunogener Polypeptide, z.B. bakterieller Polypeptide wie etwa β-Lactamase oder eines Enzyms, für das der E. coli trp-Lokus kodiert, oder Hefeprotein, und C-terminale Fusionen mit Proteinen mit langer Halbwertszeit wie etwa konstante Immunglobulin-Regionen (oder andere Immunglobulin-Regionen), Albumin oder Ferritin (siehe WO 89/02922, veröffentlicht am 6. April 1989).

[0061] Eine weitere Gruppe von Varianten sind Aminosäure-Substitutionsvarianten. Diese Varianten weisen zumindest einen aus dem PF4AR-Molekül entfernten Aminosäurerest und einen an seiner Stelle insertierten anderen Rest auf. Die Stellen von größtem Interesse für die Substitutionsmutagenese sind Stellen, die als aktive Stelle(n) des PF4AR identifiziert wurden, und Stellen, an denen die Aminosäuren im PF4AR aus verschiedenen Spezies hinsichtlich des Seitenkettenvolumens, der Ladung und/oder der Hydrophobie deutlich unterschiedlich sind.

[0062] Andere Stellen von Interesse sind jene, an denen bestimmte Reste der PF4ARs aus **Fig.** 2, 4 und 5 identisch sind. Diese Positionen können für die biologische Aktivität des PF4AR von Bedeutung sein. Diese Stellen, insbesondere jene, die in eine Sequenz von zumindest drei anderen identisch konservierten Stellen fallen, sind in relativ konservativer Weise substituiert. Solche konservativen Substitutionen sind in Tabelle 1 unter der Überschrift der bevorzugten Substitutionen angeführt. Wenn solche Substitutionen zu einer Änderung der biologischen Aktivität führen, werden substanziellere Veränderungen, die in Tabelle 1 als Substitutionsbeispiele angeführt und weiter unten in Bezug auf Aminosäureklassen näher beschrieben sind, eingeführt und die Produkte gescreent.

Tabelle 1

Ursprünglicher Rest	Substitutionsbeispiele	Bevorzugte Substitutionen
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	pro
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	leu
Pro (P)	gly	gly
Ser (S)	thr	thr
Thr (T)	ser	ser
Trp (W)	tyr	tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; Norleucin	leu

[0063] Substanzielle Modifikationen der Funktion oder immunologischen Identität des PF4AR werden durch die Wahl von Substitutionen erreicht, die sich in ihrem Einfluss auf die Beibehaltung (a) der Struktur des Polypeptidgerüsts im Substitutionsbereich, z.B. als Faltblatt- oder Helixkonformation, (b) der Ladung oder Hydrophobie des Moleküls an der Zielstelle oder (c) des Volumens der Seitenkette beträchtlich unterscheiden. Natürlich vorkommende Reste werden auf der Grundlage gemeinsamer Seitenketten-Eigenschaften in folgende Gruppen unterteilt:

(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, welche die Kettenorientierung beeinflussen: gly, pro; und
(6) aromatisch: trp, tyr, phe.

[0064] Nicht-konservative Substitutionen sehen vor, dass ein Vertreter einer dieser Klassen gegen einen anderen ausgetauscht wird. Solche substituierten Reste können in Regionen des PF4AR, die mit anderen PF4ARs homolog sind, oder noch bevorzugter in die nicht-homologen Regionen des Moleküls eingeführt werden.

[0065] Jeder Cysteinrest, der nicht an der Beibehaltung der richtigen Konformation des PF4AR beteiligt ist, kann im Allgemeinen durch Serin substituiert werden, um die Oxidationsstabilität des Moleküls zu verbessern und Fehlvernetzungen zu verhindern.

[0066] DNA, die für Aminosäuresequenz-Varianten des PF4AR kodiert, wird durch eine Vielzahl auf dem Gebiet bekannter Verfahren hergestellt. Zu diesen Verfahren zählen u.a. die Isolierung aus natürlicher Quelle (im Fall natürlich vorkommender Aminosäuresequenz-Varianten) oder die Herstellung durch Oligonukleotid-vermittelte (oder stellengerichtete) Mutagenese, PCR-Mutagenese und Kassettenmutagenese einer vorher hergestellten Variante oder einer Nicht-Varianten-Version des PF4AR. Diese Techniken können PF4AR-Nukleinsäure (DNA oder RNA) oder Nukleinsäure, die zur PF4AR-Nukleinsäure komplementär ist, verwenden.

[0067] Oligonukleotid-vermittelte Mutagenese ist ein bevorzugtes Verfahren zur Erzeugung von Substitutions-, Deletions- und Insertionsvarianten von PF4AR-DNA. Diese Technik ist auf dem Gebiet allgemein bekannt, siehe z.B. Adelman et al., DNA 2, 183 (1983). Zusammenfassend gesagt wird die PF4AR-DNA durch Hybridisieren eines Oligonukleotids, das für die gewünschte Mutation kodiert, an ein DNA-Templat verändert, wobei das Templat die einstrangige Form eines Plasmids oder Bakteriophagen ist, das/der die unveränderte oder native DNA-Sequenz des PF4AR enthält. Nach der Hybridisierung dient eine DNA-Polymerase dazu, einen gesamten zweiten komplementären Strang des Templats zu synthetisieren, das somit den Oligonukleo-

tid-Primer aufweist und für die ausgewählte Änderung in der PF4AR-DNA kodiert.

[0068] Im Allgemeinen werden Oligonukleotide mit einer Länge von zumindest 25 Nukleotiden verwendet. Ein optimales Oligonukleotid besetzt 12 bis 15 Nukleotide, die auf beiden Seiten des Nukleotids/der Nukleotide, das/die für die Mutation kodiert/kodieren, vollständig komplementär zum Templat ist. Dies stellt sicher, dass das Oligonukleotid richtig an das einstrangige DNA-Templatmolekül hybridisiert. Die Oligonukleotide werden mittels auf dem Gebiet bekannter Techniken problemlos synthetisiert; siehe z.B. Crea et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 5765 (1978)).

[0069] Einstrangiges DNA-Templat kann auch durch Denaturieren von doppelstrangiger Plasmid-DNA (oder einer anderen DNA) mittels Standardverfahren erzeugt werden.

[0070] Zur Änderung der nativen DNA-Sequenz (beispielsweise zwecks Herstellung von Aminosäuresequenz-Varianten) wird das Oligonukleotid an das einstrangige Templat unter geeigneten Hybridisierungsbedingungen hybridisiert. Ein DNA-polymerisieriendes Enzym, üblicherweise das Klenow-Fragment von DNA-Polymerase I, wird dann zugesetzt, um den komplementären Strang des Templats unter Einsatz des Oligonukleotids als Syntheseprimer zu synthetisieren. Ein Heteroduplex-Molekül wird so gebildet, dass ein Strang der DNA für die mutierte Form des PF4AR kodiert und der andere Strang (das ursprüngliche Templat) für die native, nicht veränderte Sequenz des PF4AR kodiert. Dieses Heteroduplex-Molekül wird dann in eine geeignete Wirtszelle transformiert, üblicherweise eine prokaryotische Zelle wie etwa E. coli JM101, Die Zellen werden auf Agaroseplatten aufgebracht und mittels des mit ^{32}P-Phosphat radiomarkierten Oligonukleotid-Primers gescreent, um jene Bakterienkolonien zu identifizieren, welche die mutierte DNA enthalten. Die mutierte Region wird dann entfernt und zur Proteinproduktion in einen geeigneten Vektor eingesetzt, im Allgemeinen einen Expressionsvektor jener Art, die typischerweise bei der Transformation eines geeigneten Wirts zum Einsatz kommt.

[0071] Das oben beschriebene Verfahren kann solcherart modifiziert werden, dass ein Homoduplex-Mulekül geschaffen wird, in dem beide Stränge des Plasmids die Mutation(en) enthalten. Die Modifikationen sind wie folgt: das einstrangige Oligonukleotid wird wie oben an das einstrangige Templat anneliert. Ein Gemisch dreier Desoxyribonukleotide, Desoxyriboadenosin (dATP), Desoxyribogluanosin (dGTP) und Desoxyribothymidin (dTTP), wird mit einem modifizierten Thiodesoxyribocytosin namens dCTP-(aS) (erhältlich bei der Amersham Corporation) kombiniert. Dieses Gemisch wird dem Templat-Oligunukleotid-Komplex zugesetzt. Nach Zugabe von DNA-Polymerase zu diesem Gemisch wird ein DNA-Strang, der mit dem Templat mit Ausnahme der mutierten Basen identisch ist, erzeugt. Außerdem enthält dieser neue DNA-Strang dCTP-(aS) anstelle von dCTP, was dazu dient, ihn vor Restriktions-Endonuklease-Spaltung zu schützen. Nachdem der Templatstrang des doppelstrangigen Heteroduplex mit einem geeigneten Restriktionsenzym genickt wurde, kann der Templatstrang mit ExoIII-Nuklease oder einer anderen geeigneten Nuklease nach der Region, welche die zu mutagenisierende(n) Stelle(n) enthält, gespalten werden. Die Reaktion wird dann abgebrochen, um ein Molekül zurückzulassen, das nur teilweise einstrangig ist. Ein vollständiger doppelstrangiger DNA-Homoduplex wird dann unter Verwendung von DNA-Polymerase in Gegenwart aller vier Desoxyribonukleotid-Triphosphate, ATP und DNA-Ligase gebildet. Dieses Homoduplex-Molekül kann dann in eine geeignete Wirtszelle, wie etwa E. coli JM101, transformiert werden, wie oben beschrieben.

[0072] DNA, die für PF4AR-Mutanten an mehr als einer Stelle kodiert, kann auf unterschiedliche Weise erzeugt werden. Wenn die Aminosäuren in der Polypeptidkette nahe beieinander liegen, können sie unter Verwendung eines Oligonukleotids, das für alle gewünschten Aminosäuresubstitutionen kodiert, gleichzeitig mutiert werden. Wenn allerdings die Aminosäuren in einer gewissen Entfernung voneinander angeordnet sind (durch mehr als 10 Aminosäuren voneinander getrennt), ist es schwieriger, ein einziges Oligonukleotid herzustellen, das für alle gewünschten Änderungen kodiert. Stattdessen kommt eines von zwei alternativen Verfahren zur Anwendung.

[0073] Beim ersten Verfahren wird ein eigenes Oligonukleotid für jede zu substituierende Aminosäure gebildet. Die Oligonukleotide werden dann gleichzeitig an die einstrangige Templat-DNA anneliert, und der zweite Strang der ausgehend vom Templat synthetisierten DNA kodiert für alle gewünschten Aminosäuresubstitutionen.

[0074] Das alternative Verfahren umfasst zwei oder mehr Mutagenese-Runden, um die gewünschte Mutante zu erzeugen. Die erste Runde ist so wie bei Einzelmutanten: DNA der Wildform wird als Templat verwendet, ein Oligonukleotid, das für die erste(n) Aminosäuresubstitution(en) kodiert, wird an dieses Templat anneliert, und dann wird das Heteroduplex-DNA-Molekül erzeugt. Die zweite Mutagenese-Runde verwendet die in der ersten Mutagenese-Runde produzierte mutierte DNA als Templat. Somit enthält dieses Templat bereits eine

oder mehrere Substitutionen. Das Oligonukleotid, das für die zusätzliche(n) gewünschte(n) Aminosäuresubstitution(en) kodiert, wird dann an dieses Templat anneliert, und der resultierende DNA-Strang kodiert nun für Mutationen aus der ersten und der zweiten Mutagenese-Runde. Diese resultierende DNA kann als Templat in einer dritten Mutagenese-Runde verwendet werden usw.

[0075] PCR-Mutagenese eignet sich auch zur Herstellung von Aminosäurevarianten des PF4AR. Zwar bezieht sich die folgende Diskussion auf DNA, doch ist zu beachten, dass sich die Technik auch auf RNA anwenden lässt. Die PCR-Technik bezieht sich im Allgemeinen auf die folgende Vorgangsweise (Erlich, s.o., Kapitel von R. Higuchi, S. 61-70): wenn geringe Mengen an Templat-DNA als Ausgangsmaterial in einer PCR verwendet werden, können Primer, die sich hinsichtlich der Sequenz geringfügig von der entsprechenden Region in der Templat-DNA unterscheiden, dazu dienen, relativ große Mengen eines spezifischen DNA-Fragments zu erzeugen, das sich nur an den Positionen, an denen sich die Primer vom Templat unterscheiden, von der Templatsequenz unterscheidet. Zur Einführung einer Mutation in Plasmid-DNA wird einer der Primer so gewählt, dass er die Position der Mutation überlappt und die Mutation enthält; die Sequenz des anderen Primers muss mit einem Sequenzabschnitt des gegenüberliegenden Strangs des Plasmids identisch sein, doch diese Sequenz kann sich an einer beliebigen Stelle entlang der Plasmid-DNA befinden. Es ist jedoch vorzuziehen, dass die Sequenz des zweiten Primers innerhalb von 200 Nukleotiden von jener des ersten liegt, sodass am Ende die gesamte amplifizierte DNA-Region (von Primern begrenzt) leicht sequenziert werden kann. Die PCR-Amplifizierung unter Einsatz eines Primerpaars wie des gerade oben beschriebenen führt zur einer Population von DNA-Fragmenten, die sich an der Position der Mutation, die durch den Primer spezifiziert wird, und möglicherweise an anderen Positionen unterscheiden, da das Templatkopieren etwas fehleranfällig ist.

[0076] Wenn das Verhältnis zwischen Templat- und Produktmaterial extrem niedrig ist, enthält die überwiegende Mehrheit von Produkt-DNA-Fragmenten die gewünschte(n) Mutation(en). Dieses Produktmaterial wird dazu verwendet, die entsprechende Region im Plasmid, das als PCR-Templat diente, mittels herkömmlicher DNA-Techniken zu ersetzen. Mutationen an getrennten Positionen können entweder mittels einer zweiten Primermutante oder unter Durchführung einer zweiten PCR mit unterschiedlichen Primermutanten und gleichzeitiges Ligieren der zwei resultierenden PCR-Fragmente an das Vektorfragment in einer Drei- oder Mehrweg-Ligation gleichzeitig eingeführt werden.

[0077] Ein weiteres Verfahren zur Herstellung von Varianten, nämlich Kassettenmutagenese, basiert auf der von Wells et al. (Gene 34, 315 (1985)) beschriebenen Technik.

C. Insertion von DNA in ein Kloniervehikel

[0078] Die cDNA oder genomische DNA, die für nativen PF4AR oder eine Variante davon kodiert, wird in einen replizierbaren Vektor zur weiteren Klonierung (Amplifizierung der DNA) oder Expression insertiert. Viele Vektoren stehen zur Verfügung, wobei die Auswahl des geeigneten Vektors von folgenden Faktoren abhängt: (1) ob er für DNA-Amplifizierung oder DNA-Expression verwendet werden kann, (2) der Größe der in den Vektor zu insertierenden DNA, und (3) der mit dem Vektor zu transformierenden Wirtszelle. Jeder Vektor enthält verschiedene Komponenten, die von seiner Funktion (Amplifikation oder Expression von DNA) und der Wirtszelle, für die er kompatibel ist, abhängen. Die Vektorkomponenten enthalten im Allgmeinen u.a. eine oder mehrere der folgenden Bestandteile: eine Signalsequenz, einen Replikationsursprung, eines oder mehrere Markergene, ein Enhancerelement, einen Promotor und eine Transkriptions-Terminationssequenz.

(i) Signalsequenz-Komponente

[0079] Im Allgemeinen kann eine Signalsequenz eine Komponente des Vektors oder ein Teil der in den Vektor insertierten PF4AR-DNA sein. Die native Pro-PF4AR-DNA ist auf die Zelloberfläche in den erfindungsgemäßen Rekombinations-Zellen gerichtet, enthält aber kein konventionelles Signal, und es wird während der posttranslationalen Verarbeitung des Polypeptids während der Membraninsertion des PF4AR kein N-terminales Polypeptid abgespalten.

(ii) Replikationsprsprungs-Komponente

[0080] Sowohl Expressions- als auch Kloniervektoren enthalten eine Nukleinsäuresequenz, die es dem Vektor ermöglicht, sich in einer oder mehreren ausgewählten Wirtszellen zu replizieren. Im Allgemeinen ist in Kloniervektoren diese Sequenz eine, die es dem Vektor ermöglicht, sich unabhängig von der chromosomalen Wirts-DNA zu replizieren, und Replikationsursprünge oder sich autonom replizierende Sequenzen enthält. Solche Sequenzen sind für eine Vielzahl von Bakterien, Hefe und Viren bekannt. Der Replikationsursprung aus

dem Plasmid pBR322 eignet sich für die meisten gramnegativen Bakterien, der 2µ-Plasmidursprung eignet sich für Hefe, und verschiedene virale Ursprünge (SV40, Polyom-, Adenovirus, VSV oder BPV) eignen sich zum Klonieren von Vektoren in Säugetierzellen. Im Allgemeinen wird die Replikationsursprungs-Komponente für Säugetier-Expressionvektoren nicht benötigt (der SV40-Ursprung kann typischerweise nur deswegen verwendet werden, weil er den frühen Promotor enthält).

[0081] Die meisten Expressionsvektoren sind „Shuttle"-Vektoren, d.h. sie sind in zumindest einer Klasse von Organismen zur Replikation fähig, können aber zur Expression auch in einen anderen Organismus transfiziert werden. Beispielsweise wird ein Vektor in E. coli kloniert, und dann wird der gleiche Vektor zwecks Expression in Hefe- oder Säugetierzellen transfiziert, obwohl er nicht in der Lage ist, sich unabhängig vom Wirtszellen-Chromosom zu replizieren.

[0082] DNA kann auch durch Insertion in das Wirtgenom amplifiziert werden. Dies erfolgt unter Verwendung von Bacillus-Spezies als Wirte, beispielsweise durch Vorsehen einer DNA-Sequenz im Vektor, die zu einer Sequenz in genomischer Bacillus-DNA komplementär ist. Die Transfektion von Bacillus mit diesem Vektor führt zur homologen Rekombination mit dem Genom und Insertion der PF4AR-DNA. Die Gewinnung genomischer DNA, die für PF4AR kodiert, ist jedoch komplexer als jene eines exogen replizierten Vektors, da zum Herausspalten der PF4AR-DNA Restriktionsenzym-Spaltung erforderlich ist.

(iii) Selektionsgen-Komponente

[0083] Expressions- und Kloniervektoren sollten ein Selektionsgen enthalten, das auch als selektierbarer Marker bezeichnet wird. Dieses Gen kodiert für ein Protein, das für das Überleben oder Wachstum transformierter Wirtszellen, die in selektivem Kulturmedium gezüchtet werden, notwendig ist. Wirtszellen, die nicht mit dem Vektor transformiert sind, der das Selektionsgen enthält, überleben in Kulturmedium nicht. Typische Selektionsgene kodieren für Proteine, die (a) Resistenz gegenüber Antibiotika oder anderen Toxinen verleihen, z.B. Ampicillin, Neomycin, Methotrexat oer Tetracyclin, (b) auxotrophe Defizienzen komplementieren oder (c) wesentliche Nährstoffe zuleiten, die von komplexen Medien nicht zur Verfügung gestellt werden, z.B. das für D-Alanin-Racemase kodierende Gen für Bacilli.

[0084] Ein Beispiel für ein Selektionsschema verwendet ein Arzneimittel zum Stoppen der Vermehrung einer Wirtszelle. Jene Zellen, die erfolgreich mit einen heterologen Gen transformiert wurden, exprimieren ein Protein, das Arzneimittelresistenz verleiht, und überleben daher das Selektionsverfahren. Beispiele für solche dominante Selektion arbeiten mit den Arzneimitteln Neomycin (Southern et al., J. Molec. Appl. Genet. 1, 327 (1982)), Mycophenolsäure (Mulligan et al., Science 209, 1422 (1980)) oder Hygromycin (Sugden et al., Mol. Cell. Biol. 5, 410-413 (1985)). Die drei obigen Beispiele setzen bakterielle Gene unter eukaryotischer Kontrolle ein, um Resistenz gegenüber dem geeigneten Arzneimittel G418 oder Neomycin (Geneticin), xgpt (Mycophenolsäure) bzw. Hygromycin zu verleihen.

[0085] Ein weiteres Beispiel für geeignete selektierbare Marker für Säugetierzellen sind jene, welche die Identifizierung von Zellen ermöglichen, die kompetent sind, die PF4AR-Nukleinsäure aufzunehmen, z.B. Dihydrofolat-Reductase (DHFR) oder Thymidin-Kinase. Die Säugetierzellen-Transformanten werden unter Selektionsdruck gesetzt, dem einzig die Transformanten aufgrund der Tatsache, dass sie den Marker aufgenommen haben, standhalten können. Der Selektionsdruck wird angelegt, indem die Transformanten unter Bedingungen kultiviert werden, unter denen die Konzentration des Selektionsmittels im Medium nacheinander verändert wird, was zur Amplifikation des Selektionsgens und der für den PF4AR kodierenden DNA führt. Die Amplifikation ist der Prozess, durch den Gene, an denen bei der Produktion eines für das Wachstum entscheidenden Proteins größerer Bedarf besteht, innerhalb der Chromosome aufeinanderfolgender Generationen von Rekombinations-Zellen in Tandem wiederholt werden. Größere Mengen des PF4AR werden ausgehend von der amplifizierten DNA synthetisiert.

[0086] Beispielsweise werden mit dem DHFR-Selektionsgen transformierte Zellen zunächst durch Kultivieren aller Transformanten in einem Kulturmedium, das Methotrexat (Mtx), einen kompetitiven Antagonisten von DHFR, enthält, identifiziert. Eine geeignete Wirtszelle bei Verwendung von DHFR der Wildform ist die China-Hamstereierstock-(CHO-)Zelllinie mit DHFR-Aktivitätsdefizienz, die gemäß dem Verfahren von Urlaub und Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 4216 (1980), präpariert und vermehrt wird. Die transformierten Zellen werden dann größeren Methotrexat-Mengen ausgesetzt. Dies führt zur Synthese mehrerer Kopien des DHFR-Gens und gleichzeitig mehrerer Kopien einer anderen DNA, welche die Expressionsvektoren umfasst, z.B. der für den PF4AR kodierenden DNA. Dieses Amplifikationsverfahren kann mit jedem ansonsten geeigneten Wirt angewandt werden, z.B. ATCC Nr. CCL61 CHO-K1, trotz der Gegenwart von endogener DHFR,

wenn beispielsweise eine DHFR-Genmutante, die gegenüber Mtx hochresistent ist, verwendet wird (EP-A-117.060). Alternativ dazu können Wirtszellen (insbesondere Wirte der Wildform, die endogene DHFR enthalten), die mit für PF4AR kodierenden DNA-Sequenzen, DHFR-Protein der Wildform oder einem anderen selektierbaren Marker wie etwa Aminoglykosid-3'-Phosphotransferase (APH) transformiert oder co-transformiert wurden durch Zellvermehrung in Medien ausgewählt werden, die ein Selektionsmittel für den selektierbaren Marker, wie etwa ein Aminoglykosid-Antibiotikum, z.B. Kanamycin, Neomycin oder G418, enthalten (siehe US-A-4.965.199).

[0087] Ein geeignetes Selektionsgen zur Verwendung in Hefe ist das trp1-Gen, das im Hefeplasmid Yrp7 liegt (Stinchcomb et al., Nature 282, 39 (1979); Kingsman et al., Gene 7, 141 (1979); oder Tschemper et al., Gene 10, 157 (1980)). Das trp1-Gen bietet einen Selektionsmarker für einen Mutantenstamm von Hefe ohne Fähigkeit, sich in Tryptophan zu vermehren, z.B. ATCC Nr. 44076 oder PEP4-1 (Jones, Genetics 85, 12 (1977)). Die Gegenwart der trp1-Läsion im Hefe-Wirtszellengenom liefert dann eine wirksame Umgebung zur Detektion von Transformation durch Wachstum in Abwesenheit von Tryptophan. In ähnlicher Weise werden Leu2-defiziente Hefestämme (ATCC 20.622 oder 38.626) durch bekannte Plasmide, die das Leu2-Gen tragen, komplementiert.

(iv) Promotor-Komponente

[0088] Expressionsvektoren enthalten üblicherweise einen Promotor, der vom Wirtorganismus erkannt und mit der PF4AR-Nukleinsäure operabel verbunden wird. Promotoren sind untranslatierte Sequenzen, die sich stromauf (5') vom Startcodon eines Struktur-Gens (im Allgemeinen innerhalb von etwa 100 bis 1000 bp) befinden und die Transkription und Translation einer bestimmten Nukleinsäuresequenz wie etwa PF4AR steuern, mit der sie operabel verbunden sind. Solche Promotoren fallen typischerweise in zwei Klassen: induzierbar und konstitutiv. Induzierbare Promotoren sind Promotoren, die erhöhte Transkription von DNA unter ihrer Steuerung als Reaktion auf eine Änderung der Kulturbedingungen einleiten, z.B. die Gegenwart oder Abwesenheit eines Nährstoffs oder eine Temperaturänderung. Derzeit sind zahlreiche Promotoren allgemein bekannt, die von einer Vielzahl potenzieller Wirtszellen erkannt werden. Diese Promotoren werden mit für den PF4AR kodierender DNA operabel verbunden, indem der Promotor mittels Restriktionsenzym-Spaltung aus der DNA-Quelle entfernt und die isolierte Promotorsequenz in den Vektor insertiert wird. Sowohl die native PF4AR-Promotorsequenz als auch zahlreiche heterologe Promotoren können zur Lenkung der Amplifikation und/oder Expression der PF4AR-DNA verwendet werden. Heterologe Promotoren sind jedoch vorzuziehen, da sie im Allgemeinen stärkere Transkription und höhere Ausbeuten an exprimiertem PF4AR ermöglichen als nativer PF4AR-Promotor.

[0089] Promotoren, die sich zur Verwendung mit prokaryotischen Wirten eignen, sind z.B. β-Lactamase- und Lactose-Promotorsysteme (Chang et al., Nature 275, 615 (1978); und Goeddel et. al., Nature 281, 544 (1979)), Alkalische Phosphatase, ein Tryptophan-(trp-)Promotorsystem (Goeddel, Nucleic Acids Res. 8, 4057 (1980) und EP-A-36.776) und Hybridpromotoren wie etwa der tac-Promotor (DeBoer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 21-25 (1983)). Andere bekannte bakterielle Promotoren kommen allerdings auch in Frage. Ihre Nukleotidsequenzen wurden veröffentlicht, sodass sie Fachleute auf dem Gebiet mit für den PF4AR kodierender DNA operabel ligieren können (Siebenlist et al., Cell 20, 269 (1980)), wobei hier Linker oder Adaptoren zur Versorgung allenfalls erforderlicher Restriktionsstellen verwendet werden. Promotoren für bakterielle Systeme enthalten im Allgemeinen eine Shine-Dalgarno-(S.D.-)Sequenz, die mit der für den PF4AR kodierenden DNA operabel verbunden ist.

[0090] Geeignete Promotorsequenzen für Hefewirte sind z.B. die Promotoren für 3-Phosphoglycerat-Kinase (Hitzeman et al., J. Biol. Chem. 255, 2073 (1980)) oder andere glykolytische Enzyme (Hess et al., J. Adv. Enzyme Reg. 7, 149 (1968); und Holland, Biochemistry 17, 4900 (1978)), wie z.B. Enolase, Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, Hexokinase, Pyruvat-Decarboxylase, Phosphofructokinase, Glucose-6-phosphat-Isomerase, 3-Phosphoglycerat-Mutase, Pyruvat-Kinase, Triosephosphat-Isomerase, Phosphoglucose-Isomerase und Glucokinase.

[0091] Andere Hefe-Promotoren, die induzierbare Promotoren mit dem zusätzlichen Vorteil der anhand der Wachstumsbedingungen gesteuerten Transkription sind, sind die Promotorregionen für Alkohol-Dehydrogenase 2, Isocytochrom C, saure Phosphatase, Abbauenzyme, die mit dem Stickstoff-Stoffwechsel assoziiert sind, Metallothionein, Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase und Enzyme, die für die Maltose- und Galactose-Nutzung verantwortlich sind. Geeignete Vektoren und Promotoren für die Hefeexpression werden von Hitzeman et al., EP-A-73.657, im Detail besprochen. Hefe-Enhancer kommen ebenfalls zur Verwendung mit Hefepromotoren in Frage.

[0092] Promotorsequenzen sind für Eukaryoten bekannt. Praktisch alle eukaryotischen Gene besitzen eine AT-reiche Region, die sich etwa 25 bis 30 Basen stromauf von der Stelle der Transkriptionsinitiation befindet. Eine weitere Sequenz 70 bis 80 Basen stromauf vom Transkriptionsstart zahlreicher Gene ist eine CX-CAAT-Region, worin X ein beliebiges Nukleotid sein kann. Am 3'-Ende der meisten eukaryotischen Gene liegt eine AATAAA-Sequenz, die das Signal für die Additoin des Poly A-Schwanzes an das 3'-Ende der Kodiersequenz sein kann. Alle diese Sequenzen werden günstigerweise in Säugetier-Expressionsvektoren insertiert.

[0093] Die PF4AR-Transkription ausgehend von Vektoren in Säugetier-Wirtszellen wird von Promotoren gesteuert, die aus den Genomen von Viren, wie z.B. Polyomvirus, Epithelioma contagiosum-Virus (GB-A-2.211.504, veröffentlicht am 5. Juli 1989), Adenovirus (z.B. Adenovirus 2), Rinder-Papillom-Virus, Vögel-Sarkom-Virus, Cytomegalievirus, Retroviren, Hepatitis B-Virus und am bevorzugtesten Affenvirus 40 (SV40), aus heterologen Säugetier-Promotoren, z.B. dem Actin-Promotor oder einem Immunglobulin-Promotor, aus Hitzeschock-Promotoren und aus dem Promotor, der normalerweise mit der PF4AR-Sequenz assoziiert ist, erhalten werden, soferne solche Promotoren mit den Wirtszellsystemen kompatibel sind.

[0094] Die frühen und späten Promotoren des SV40-Virus werden günstigerweise als SV40-Restriktionsfragment enthalten, das auch den viralen SV40-Replikationsursprung enthält. Fiers et al., Nature 273, 113 (1978); Mulligan und Berg, Science 209, 1422-1427 (1980); Pavlakis et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 7398-7402 (1981). Der unmittelbare frühe Promotor des Human-Cytomegalievirus wird günstigerweise als HindIII E-Restriktionsfragment erhalten. Greenaway et al., Gene 18, 355-360 (1982). Ein System zum Exprimieren von DNA in Säugetierwirten unter Einsatz des Rinder-Papillom-Virus als Vektor ist in der US-A-4.419.446 geoffenbart. Eine Modifikation dieses Systems ist in der US-A-4.601.978 beschrieben. Siehe auch Gray et al., Nature 295, 503-508 (1982), betreffend die Expression von cDNA, die für Immuninterferon in Affenzellen kodiert; Reges et al., Nature 297, 598-601 (1982), betreffend die Expression von Human-β-Interferon-cDNA in Mäusezellen unter der Steuerung eines Thymidin-Kinase-Promotors aus Herpes simplex-Virus; Canaani und Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 5166-5170 (1982), betreffend die Expression des Human-Interferon-β1-Gens in kultivierten Mäuse- und Kaninchenzellen; und Gorman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 6777-6781 (1982), betreffend die Expression von bakteriellen CAT-Sequenzen in CV-1-Affennierenzellen, Hühnerembryo-Fibroblasten, China-Hamster-Eierstockzellen, HeLa-Zellen und Mäuse-NIH-3T3-Zellen unter Verwendung der langen terminalen Rous-Sarkom-Virus-Wiederholung als Promotor.

(v) Enhancerelement-Komponente

[0095] Die Transkription von für den PF4AR gemäß der Erfindung kodierender DNA durch höhere Eukaryoten wird oft durch Insertieren einer Enhancersequenz in den Vektor verstärkt. Enhancer sind cis-wirkende Elemente der DNA von üblicherweise etwa 10-300 bp, die auf einen Promotor einwirken, um seine Transkription zu verstärken. Enhancer sind relativ orientierungs- und positionsunabhängig und wurden 5' (Laimins et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 993 (1981)) und 3' (Lusky et al., Mol. Cell Biol, 3, 1108 (1983)) von der Transkriptionseinheit, innerhalb eines Introns (Banerji et al, Cell 33, 729 (1983)) sowie innerhalb der Kodiersequenz selbst (Osborne et al., Mol. Cell Biol. 4, 1293 (1984)) lokalisiert. Viele Enhancersequenzen sind nun aus Säugetier-Genen bekannt (Globin, Elastase, Albumin, α-Fetoprotein und Insulin). Typischerweise verwendet man jedoch einen Enhancer aus einem eurkaryotischen Zellvirus. Beispiele sind der SV40-Enhancer auf der späten Seite des Replikationsursprungs (bp 100-270), der frühe Cytomegalievirus-Promotor-Enhancer, der Polyom-Enhancer auf der späten Seite des Replikationsursprungs und Adenovirus-Enhancer. Siehe auch Yaniv, Nature 297, 17-18 (1982), betreffend verstärkende Elemente zur Aktivierung eukaryotischer Promotoren. Der Enhancer kann in den Vektor an einer Position 5' oder 3' von der PF4AR-DNA gespleißt sein, liegt aber vorzugsweise an einer Stelle 5' vorn Promotor.

(vi) Transkriptionsterminations-Komponente

[0096] In eukaryotischen Wirtszellen verwendete Expressionsvektoren (Hefe-, Pilz, Insekten-, Pflanzen-, Tier-, Human- oder kernhältige Zellen aus anderen mehrzelligen Organismen) enthalten auch Sequenzen, die für die Termination der Transkription und die Stabilisierung der mRNA verantwortlich sind. Solche Sequenzen sind üblicherweise in den untranslatierten 5'- und 3'-Regionen eukaryotischer oder viraler DNAs oder cDNAs enthalten. Diese Regionen enthalten Nukleotidsegmente, die als polyadenylierte Fragmente im untranslatierten Abschnitt der für den PF4AR kodierenden mRNA transkribiert werden. Die untranslatierten 3'-Regionen enthalten auch Transkriptionsterminations-Stellen.

[0097] Geeignete Vektoren, die eine oder mehrer der oben angeführten Komponenten und die gewünschten Kodier- und Kontrollsequenzen enthalten, werden durch herkömmliche Ligationstechniken konstruiert. Isolierte

Plasmide oder DNA-Fragmente werden gespalten, zurechtgeschnitten und in der gewünschten Form religiert, um die erforderlichen Plasmide zu erzeugen.

[0098] Zur Analyse zwecks Bestätigung korrekter Sequenzen in den konstruierten Plasmiden werden die Ligationsgemische dazu verwendet, E. coli K12-Stamm 294 (ATCC 31.446) zu transformieren, und erfolgreiche Transformanten im Bedarfsfall anhand von Ampicillin- oder Tetracyclin-Resistenz selektiert. Plasmide werden aus den Transformanten gewonnen, durch Restriktions-Endonuklease-Spaltung analysiert und/oder nach dem Verfahren von Messing et al., Nucleic Acids Res. 9, 309 (1981), oder dem Verfahren von Maxam et al., Methods in Enzymology 65, 499 (1980), sequenziert.

[0099] Besonders geeignet für die Durchführung der Erfindung sind Expressionsvektoren, die für vorübergehende Expression in Säugetierzellen von für den PF4AR kodierender DNA sorgen. Im Allgemeinen umfasst die vorübergehende Expression die Verwendung eines Expressionsvektors, der sich wirksam in einer Wirtszelle replizieren kann, sodass die Wirtszelle viele Kopien des Expressionsvektors akkumuliert und ihrerseits große Mengen eines gewünschten Polypeptids synthetisiert, für das der Expressionsvektor kodiert. Vorübergehende Expressionssysteme, umfassend einen geeigneten Expressionsvektor und eine Wirtszelle, ermöglichen die problemlose positive Identifizierung von Polypeptiden, für die klonierte DNA kodiert, sowie das rasche Screenen solcher Polypeptide auf gewünschte biologische oder physiologische Eigenschaften. Somit eignen sich vorübergehende Expressionssysteme besonders für die Erfindung, um Analoge und Varianten der PF4ARs zu identifizieren, die PF4AR-ähnliche Aktivität aufweisen.

[0100] Andere Verfahren, Vektoren und Wirtszellen, die sich zur Anpassung an die Synthese des PF4AR in Rekombinations-Wirbeltierzellkultur eignen, werden von Gething et al., Nature 293, 620-625 (1981); Mantei et al., Nature 281, 40-46 (1979); Levinson et al. EP-A-117.060; und in der EP-A-117.058 beschrieben. Ein besonders nützliches Plasmid für die Säugetierzellkultur-Expression des PF4AR ist pRK5 (EP-A-307.247).

D. Selektion und Transformation von Wirtszellen

[0101] Geeignete Wirtszellen zum Klonieren oder Exprimieren der Vektoren sind Prokaryoten-, Hefe- oder höhere Eukaryotenzellen (s.o.). Zu geeigneten Prokaryoten zählen Eubakterien, z.B. gramnegative oder grampositive Organismen wie etwa E. coli, Bazillen, z.B. B. subtilis, Pseudomonas-Spezies, z.B. P. aeruginosa, Salmonella tymphimurium oder Serratia marcescens. Ein bevorzugter E. coli-Klonierwirt ist E. coli 294 (ATCC 31.446), obwohl andere Stämme wie etwa E. coli B, E. coli χ 1776 (ATCC 31.537) und E. coli W3110 (ATCC 27.325) ebenfalls in Frage kommen. Diese Beispiele sind lediglich veranschaulichend und nicht einschränkend. Vorzugsweise sollte die Wirtszelle minimale Mengen proteolytischer Enzyme sekretieren. Alternativ dazu eignen sich in vitro-Klonierverfahren, z.B. PCR oder andere Nukleinsäure-Polymerase-Reaktionen.

[0102] Zusätzlich zu Prokaryoten sind eukaryotische Mikroben wie etwa Fadenpilze oder Hefe geeignete Wirte für PF4AR-DNA enthaltende Vektoren. Saccharomyces cerevisiae, d.h. gemeine Backhefe, ist der am häufigsten verwendete der niederen eukaryotischen Wirtsmikroorganismen. Einige andere Gattungen, Spezies und Stimme stehen jedoch auch zur Verfügung und kommen hierin in Frage, z.B. S. pombe (Betich und Nurse, Nature 290, 140 (1981)), Kluyveromyces lactis (Louvencourt et al., J. Bacteriol. 737 (1983)), Yarrowia (EP-A-402.226), Pichia pastoris (EP-A-183.070), Trichoderma reesia (EP-A-244.234), Neurospora crassa (Case et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 5259-5263 (1979)) und Aspergillus-Wirte wie etwa 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 und Hynes, EMBO J. 4, 475-479 (1985)).

[0103] Geeignete Wirtszellen für die Expression von glykosyliertem PF4AR-Polypeptid stammen aus mehrzelligen Organismen. Solche Wirtszellen sind zu komplexen Verarbeitungs- und Glykosylierungsaktivitäten fähig. Im Prinzip kommt jede höhere eukaryotische Zellkultur in Frage, ob aus Wirbeltier- oder Wirbellosenkultur. Beispiele für Zellen aus wirbellosen Organismen sind Pflanzen- und Insektenzellen. Zahlreiche bakulovirale Stimme und Varianten und entsprechende permissive Insektenwirtszellen aus Wirten wie z.B. Spodoptera frugiperda (Raupe), Aedes aegypti (Mücke), Aedes Albopictus (Mücke), Drosophila melanogaster (Fruchtfliege) und Bombyx mori-Wirtszellen wurden identifiziert. Siehe z.B. Luckow et al., Bio/Technology 6, 47-55 (1988); Miller et al., "Genetic Engineering", Setlow, J.K. et al., 8, 277-279 (Plenum Publishing, 1986), und Maeda et al., Nature 315, 592-594 (1985). Eine Vielzahl solcher viraler Stämme ist frei verfügbar, z.B. die L-1-Variante von Autographa californica NPV und der Bm-5-Stamm von Bombyx mori NPV, wobei solche Viren erfindungsgemäß als Virus verwendet werden können, insbesondere zur Transfektion von Spodoptera frugiperda-Zellen. Pflanzenzellenkulturen von Baumwolle, Mais, Kartoffeln, Sojabohnen, Petunia, Tomaten und Tabak können

auch als Wirte verwendet werden. Typischerweise werden Pflanzenzellen durch Inkubation mit gewissen Stimmen des Bakterium Agrobacterium tumefaciens transfiziert, das zuvor manipuliert wurde, um die PF4AR-DNA zu enthalten. Während der Inkubation der Pflanzenzellkultur mit A. tumefaciens wird die für PF4AR kodierende DNA auf den Pflanzenzellwirt übertragen, sodass er transfiziert wird und unter geeigneten Bedingungen die PF4AR-DNA exprimiert. Außerdem stehen mit Pflanzenzellen kompatible Kontroll- und Signalsequenzen zur Verfügung, z.B. der Nopalin-Synthase-Promotor und Polyadenylierungs-Signalsequenzen. Depicker et al., J. Mol. Appl. Gen. 1, 561 (1982). Darüber hinaus können DNA-Segmente, die aus der stromauf gelegenen Region des T-DNA 780-Gens isoliert wurden, steigende Transkriptionsmengen von Pflanzen-exprimierbaren Genen in rekombinierte DNA enthaltendem Pflanzengewebe aktivieren. Siehe EP-A-321.196, veröffentlicht am 21. Juni 1989.

[0104] Die größte Aufmerksamkeit richtete sich aber auf Wirbeltierzellen, wobei die Vermehrung solcher Zellen in Kultur (Gewebekultur) in den vergangenen Jahren zu einem Routineverfahren wurde (Tissue Culture, Academic Press, Kruse und Patterson (Hrsg.; 1973)). Beispiele für geeignete Säugetierwirt-Zelllinien sind die Affennieren-CV1-Linie, transformiere mit SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); die Humanembryonen-Nierenlinie (293 oder 293-Zellen, die zwecks Wachstum in Suspensionskultur subkloniert wurden; Graham et al., J. Gen. Virol. 36, 59 (1977)); Babyhamster-Nierenzellen (BHK, ATCC CCL 10); China-Hamster-Eierstockzellen/-DHFR (CHO; Urlaub und Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 4216 (1980)); Mäuse-Sertolizellen (TM4; Mather, Biol. Reprod. 23, 243-251 (1980)); Affennierenzellen (CV1; ATCC CCL 70); afrikanische Meerkatzen-Nierenzellen (VERO-76; ATCC CRL 1587); Human-Zervikalkarzinomzellen (HELA; ATCC, CCL 2); Hundenierenzellen (MDCK; ATCC CCL 34); Büffelratten-Leberzellen (BRL 3A; ATCC CRL 1442); menschliche Lungenzellen (W138; ATCC CCL 75); menschliche Leberzellen (Hep G2; HB 8065); Mäuse-Brusttumor (MMT 060562; ATCC CCL51); TRI-Zellen (Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383, 44-68 (1982)); MRC 5-Zellen; FS4-Zellen; und eine Humanhepatom-Zelllinie (Hep G2). Bevorzugte Wirtszellen sind Human-Eembryo-293- und China-Hamstereierstock-Zellen.

[0105] Wirtszellen werden mit den oben beschriebenen Expressions- oer Kloniervektoren der Erfindung transfiziert und vorzugsweise transformiert sowie in herkömmlichem Nährstoffmedien kultiviert, das entsprechend modifiziert wurde, um Promotoren zu induzieren, Transformanten zu selektieren oder die für die gewünschten Sequenzen kodierenden Gene zu amplifizieren.

[0106] Die Transfektion bezieht sich auf die Aufnahme eines Expressionsvektors durch eine Wirtszelle – ob nun Kodiersequenzen exprimiert werden oder nicht. Es sind Fachleuten auf dem Gebiet zahlreiche Transfektionsverfahren bekannt, z.B. $CaPO_4$ und Elektroporation. Die Transfektion ist im Allgemeinen erfolgreich, wenn irgendeine Indikation der Funktionsweise dieses Vektors innerhalb der Wirtszelle zu erkennen ist.

[0107] Transformation bezieht sich auf das Einführen von DNA in einen Organismus, so dass die DNA replizierbar ist – entweder als extrachromosomales Element oder durch chromosomale Integration. Je nach der verwendeten Wirtszelle erfolgt die Transformation nach auf solche Zellen abgestimmten Standardtechniken. Die Calciumbehandlung unter Verwendung von Calciumchlorid (beschrieben in Abschnitt 1.82 von Sambrook et al., s.o.) wird im Allgemeinen für Prokaryoten oder andere Zellen verwendet, die substanzielle Zellwandbarrieren aufweisen. Die Infektion mit Agrobacterium tumefaciens dient zur Transformation bestimmter Pflanzenzellen (beschrieben von Shaw et al., Gene 23, 315 (1983), und WO 89/05859, veröffentlicht am 29. Juni 1989). Für Säugetierzellen ohne solche Zellwände ist das Calciumphosphat-Fällungsverfahren (beschrieben in den Abschnitten 16.30-16.37 von Sambrook et al., s.o.) vorzuziehen. Allgemeine Aspekte der Säugetierzellen-Wirtsystem-Transformationen wurden von Axel in US-A-4.399.216 vom 16. August 1983 erörtert. Transformationen in Hefe erfolgen typischerweise 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). Andere Verfahren zum Einführen von DNA in Zellen, wie z.B. durch Kerninjektion, Elektroporation oder Protoplastenfusion, kommen allerdings auch in Frage.

E. Kultivieren der Wirtszellen

[0108] Prokaryotische Zellen zur Produktion des erfindungsgemäßen PF4AR-Polypeptids werden gemäß dem allgemein von Sambrook et al., s.o., beschriebenen Verfahren in geeigneten Medien kultiviert.

[0109] Die Säugetierwirtszellen zur Produktion des erfindungsgemäßem PF4AR können in einer Vielzahl an Medien kultiviert werden. im Handel erhältliche Medien wie etwa Ham's F10 (Sigma), Minimal Essential Medium (MEM; Sigma), RPMI-1640 (Sigma) und Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Sigma) kommen zum Kultivieren von Wirtszellen in Frage. Außerdem können die von Ham und Wallace, Meth. Enz. 58, 44

(1979), Barnes und Sato, Anal. Biochem. 102, 255 (1980), in den US-A-4.767.704; 4.657.866; 4.927.762; oder 4.560.655; WO 90/03430; WO 87/00195; oder US-Patent Re. 30.985 beschriebenen Medien als Kulturmedien für die Wirtszellen verwendet werden. Beliebige dieser Medien können gegebenenfalls mit Hormonen und/oder anderen Wachstumsfaktoren (z.B. Insulin, Transferrin oder Epidermis-Wachstumsfaktor), Salzen (z.B. Natriumchlorid, Calcium, Magnesium und Phosphat), Puffern (z.B. HEPES), Nukleosiden (z.B. Adenosin und Thymidin), Antibiotika (z.B. dem Arzneimittel Gentamycin ™), Spurenelementen (als anorganische Verbindungen definiert, die üblicherweise in Endkonzentrationen im mikromolaren Bereich vorhanden sind) und Glucose oder einer äquivalenten Energiequelle ergänzt werden. Andere allenfalls erforderliche Ergänzungsstoffe können in geeigneten Konzentrationen vorhanden sein, die Fachleuten auf dem Gebiet bekannt sind. Die Kulturbedingungen, z.B. Temperatur, pH-Wert und dergleichen, sind jene, die für die zur Expression ausgewählten Wirtszelle gelten und Fachleuten auf dem Gebiet bekannt sind.

[0110] Die hierin erwähnten Wirtszellen umfassen Zellen in in vitro-Kultur sowie Zellen, die sich in einem Wirtstier befinden.

[0111] Es ist ferner möglich, dass der erfindungsgemäße PF4AR durch homologe Rekombination oder mittels Rekombinations-Produktionsverfahren unter Verwendung von Kontrollelementen produziert wird, die in Zellen eingeführt werden, die bereits für den PF4AR kodierende DNA enthalten. Beispielsweise wird ein wirksames Promotor/Enhancer-Element, ein Suppressor oder ein exogenes Transkriptions-modulierendes Element in das Genom der beabsichtigten Wirtszelle so insertiert, dass die Nähe und Orientierung ausreichen, um die Transkription von für den gewünschten PF4AR kodierender DNA zu beeinflussen. Das Kontrollelement kodiert nicht für den PF4AR der Erfindung, aber die DNA ist im Wirtszellengenom vorhanden. Als nächstes screent man auf Zellen, die den PF4AR der Erfindung produzieren oder gegebenenfalls für erhöhte oder verringerte Expressionsmengen sorgen.

F. Detektieren von Gen-Amplifikation/Expression

[0112] Gen-Amplifikation und/oder -Expression kann direkt in einer Probe gemessen werden, z.B. durch herkömmliches Southern Blotting, Northern Blutting zwecks Quantifizierung der Transkription von mRNA (Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 5201-5205 (1980)), Dot Blotting (DNA-Analyse) oder in situ-Hybridisierung unter Einsatz einer entsprechend markierten Sonde auf der Basis der hierin bereitgestellten Sequenzen. Verschiedene Marker können verwendet werden, am häufigsten Radioisotope, insbesondere ^{32}P. Andere Techniken kommen aber auch in Frage, z.B. die Verwndung von Biotinmodifizierten Nukleotiden für die Einsetzung in ein Polynukleotid. Das Biotin dient dann als Stelle zur Bindung an Avidin oder Antikörper, die mit einer Vielzahl solcher Marker markiert sein können, z.B. mit Radionukliden, Fluoreszenzmitteln, Enzymen oder dergleichen. Alternativ dazu können Antikörper verwendet werden, die spezifische Duplices erkennen, z.B. DNA-Duplices, RNA-Duplices sowie DNA-RNA-Hybridduplices oder DNA-Protein-Duplices. Die Antikörper können ihrerseits markiert sein und der Assay durchgeführt werden, wenn sich der Duplex an eine Oberfläche bindet, so dass bei Bildung des Duplex an der Oberfläche die Gegenwart von an den Duplex gebundenem Antikörper delektiert werden kann.

[0113] Alternativ dazu kann die Gen-Expression mittels immunologischer Methoden gemessen werden, z.B. durch immunohistochemische Einfärbung von Gewebeabschnitten und Assays von Zellkulturen oder Körperflüssigkeiten zwecks direkter Quantifizierung der Expression des Genprodukts. Mit immunohistochemischen Einfärbungsverfahren wird eine Zellprobe typischerweise durch Dehydratation und Fixierung hergestellt, gefolgt von Reaktion mit markierten Antikörpern, die für das gebundene Genprodukt spezifisch sind, worin die Markierungen üblicherweise visuell detektierbar sind, z.B. Enzym-, Fluoreszenz- oder Lumineszenz-Markierungen und dergleichen. Ein besonders empfindliches und hierin geeignetes Einfärbungsverfahren ist das von Hsu et al., Am. J. Clin. Path. 75, 734-738 (1980), beschriebene.

[0114] Antikörper, die sich zum immunohistochemischen Einfärben und/oder für Assays von Probenflüssigkeiten eignen, können entweder monoklonal oder polyklonal sein und in jedem beliebigen Säugetier gebildet werden. Günstigerweise können die Antikörper gegen ein natives PF4AR-Pulypeptid oder ein synthetisches Peptid auf der Basis der hierin bereitgestellten DNA-Sequenzen gebildet werden (siehe nachstehendes Kapitel 4).

G. Reinigung des PF4AR-Polypeptids

[0115] PF4AR wird durch Solubilisieren von Zellmembran in Detergens aus den Kulturzellen gewonnen.

[0116] Wenn ein Human-PF4AR in einer Rekombinations-Zelle nicht-menschlichen Ursprungs exprimiert wird, ist der PF4AR vollkommen frei von Proteinen oder Polypeptiden menschlichen Ursprungs. Es ist jedoch notwendig, den PF4AR von Rekombinations-Zellproteinen oder Polypeptiden zu reinigen, um Präparate zu erhalten, die im Wesentlichen homogen in Bezug auf den PF4AR sind. In einem ersten Schritt werden die Zellen zentrifugiert, um sie von Kulturmedium abzutrennen. Die Membran und lösliche Proteinfraktionen werden dabei getrennt. Der PF4AR kann anschließend aus der Membranfraktion des Kulturlysats mittels Solubilisierung mit Detergenzien gereinigt werden, gefolgt von geeigneten Reinigungsverfahren: Fraktionierung auf Immunaffinitäts- oder Ionenaustauschsäulen; Ethanolfällung; RP-HPLC; Chromatographie auf Kieselsäure oder einem Kationenaustauschharz wie etwa DEAE; Chromatofokussierung; SDS-PAGE; Ammoniumsulfatfällung; Gelfiltration unter Einsatz von z.B. Sephadex G-75; hydrophobe Affinitätsharze und Ligandenaffinität unter Verwendung der geeigneten, auf einer Matrix immobilisierten PF4A.

[0117] PF4AR-Varianten, worin Reste deletiert, insertiert oder substituiert wurden, werden in gleicher Weise wie der native PF4AR gewonnen, wobei alle größeren Veränderungen der Eigenschaften infolge der Variation berücksichtigt werden. Beispielsweise erleichtert die Bildung einer PF4AR-Fusion mit einem anderen Protein oder Polypeptid, z.B. einem bakteriellen oder viralen Antigen, die Reinigung; eine Immunaffinitätssäule, die Antikörper gegen das Antigen enthält, kann zur Adsorption der Fusion dienen. Immunaffinitätssäulen wie etwa eine polyklonale Kaninchen-Anti-PF4AR-Säule können dazu verwendet werden, die PF4AR-Variante zu absorbieren, indem sie an zumindest ein verbleibendes Immunepitop gebunden wird. Ein Protease-Inhibitor wie etwa Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) kann auch dazu dienen, proteolytischen Abbau während der Reinigung zu hemmen, und Antibiotika können vorhanden sein, um das Wachstum zusätzlicher Kontaminanten zu verhindern. Fachleuten auf dem Gebiet ist klar, dass für nativen PF4AR geeignete Reinigungsverfahren möglicherweise modifiziert werden müssen, um die Änderungen in der Beschaffenheit des PF4AR oder seiner Varianten nach Expression in Rekombinations-Zellkultur zu berücksichtigen.

H. Kovalente Modifikationen von PF4AR-Polypeptiden

[0118] Kovalente Modifikationen von PF4AR-Polypeptiden sind im Schutzumfang der Erfindung enthalten. Sowohl native PF4ARs als auch Aminosäuresequenz-Varianten des PF4AR können kovalent modifiziert werden. Kovalente Modifikationen des PF4AR, seiner Fragmente oder Antikörper werden in das Molekül eingeführt, indem die Aminosäure-Ziel-Teste des PF4AR, seiner Fragmente oder eines Antikörpers mit einem organischen Derivatisierungsmittel umgesetzt werden, das zur Reaktion mit. ausgewählten Seitenketten der N- oder C-terminalen Reste fähig ist. Am häufigsten werden PF4AR und seine Antikörper kovalent an detektierbare Gruppen gebunden, die in der Diagnose verwendet werden, z.B. Enzyme, Radioisotope, Spinmarker, Antigene, fluoreszierende oder chemolumineszierende Gruppen und dergleichen.

[0119] Cysteinylreste werden am häufigsten mit α-Halogenacetaten (und entsprechenden Aminen), z.B. Chloressigsäure oder Chloracetamid, umgesetzt, um Carboxymethyl- oder Carboxyamidomethyl-Derivate zu ergeben. Cysteinylreste werden auch durch Reaktion mit Bromtrifluoraceton, α-Brom-β-(5-imidazol)propionsäure, Chloracetylphosphat, N-Alkylmaleimiden, 3-Nitro-2-pyridyldisulfid, Methyl-2-pyridyldisuifid, p-Chlormercuribenzoat, 2-Chlormercuri-4-nitrophenol oder Chlor-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol derivatisiert.

[0120] Histidylreste werden durch Reaktion mit Diethylpyrocarbonat bei pH 5,5-7,0 derivatisiert, da dieses Mittel relativ spezifisch für die Histidyl-Seitenkette ist. p-Bromphenacylbromid ist auch geeignet; die Reaktion erfolgt vorzugsweise in 0,1 M Natriumcacodylat bei pH 6,0.

[0121] Lysinyl- und aminoterminale Reste werden mit Bernsteinsäure- oder anderen Carbonsäureanhydriden umgesetzt. Die Derivatisierung bewirkt die Ladungsumkehr der Lysinylreste. Andere geeignete Reagenzien zur Derivatisierung von α-Amino-hältigen Resten sind Imidoester, wie z.B. Methylpicolinimidat; Pyridoxalphosphat; Pyridoxal; Chlorborhydrid; Trinitrobenzolsulfonsäure; O-Methylisoharnstoff; 2,4-Pentandion; und die mit Transaminase katalysierte Reaktion mit Glyoxylat.

[0122] Arginylreste werden durch Reaktion mit einem oder mehreren konventionellen Reagenzien modifiziert, z.B. Phenylglyoxal, 2,3-Butandion, 1,2-Cyclohexandion und Ninhydrin. Die Derivatisierung von Argininresten erfordert, dass die Reaktion aufgrund des hohen pK_a der funktionellen Guanidingruppe unter alkalischen Bedingungen stattfindet. Außerdem können diese Reagenzien mit den Gruppen von Lysin sowie mit der Arginin-ε-Aminogruppe reagieren.

[0123] Die spezifische Modifikation von Tyrosylresten kann mit besonderem Augenmerk auf die Einführung spektraler Marker in Tyrosylreste durch Reaktion mit aromatischen Diazoniumverbindungen oder Tetranitrome-

than erfolgen. Am häufigsten werden N-Acetylimidizol und Tetranitromethan dazu verwendet, O-Acetyltyrosylspezies bzw. 3-Nitroderivate zu bilden. Tyrosylreste werden unter Einsatz von ^{125}I oder ^{131}I iodiert, um markierte Proteine zur Verwendung im Radioimmunassay herzustellen, wofür das oben beschriebene Chloramin T-Verfahren geeignet ist.

[0124] Carboxyl-Seitengruppen (Asparagyl oder Glutamyl) werden selektiv durch Reaktion mit Carbodiimiden modifiziert (R'-N=C=N-R'), worin R und R' unterschiedliche Alkylgruppen sind, z.B. 1-Cyclohexyl-3-(2-morpholinyl-4-ethyl)carbodiimid oder 1-Ethyl-3-(4-azonia-4,4-dimethylpentyl)carbodiimid. Außerdem werden Asparagyl- und Glutamylreste durch Reaktion mit Ammoniumionen in Asparaginyl- und Glutaminylreste übergeführt.

[0125] Die Derivatisierung mit bifunktionellen Mitteln eignet sich zum Vernetzen von PF4AR, seiner Fragmente oder Antikörper an eine wasserlösliche Trägermatrix oder Oberfläche für Verfahren zur Reinigung von Anti-PF4AR-Antikörpern und umgekehrt. Immobilisierter PF4AR wird auch zum Screenen auf PF4-Überfamilienmitglieder, an die sich der Rezeptor bindet, verwendet. Übliche Vernetzungsmittel sind z.B. 1,1-Bis(diazoacetyl)-2-phenylethan, Glutaraldehyd, N-Hydroxysuccinmidester, z.B. Ester mit 4-Azidosalicylsäure, homobifunktionelle Imidoester, z.B. Disuccinimdylester wie etwa 3,3'-Dithiobis(succinimidylpropionat) und bifunktionelle Maleimide wie etwa Bis-N-maleimido-1,8-octan. Derivatisierungsmittel wie etwa Methyl-3-[(p-azidophenyl)dithio]propioimidat liefern photoaktivierbare Zwischenprodukte, die zur Bildung von Vernetzungen in Gegenwart von Licht fähig sind. Alternativ dazu werden reaktive wasserlösliche Matrizen wie etwa Bromcyan-aktivierte Kohlenhydrate und die in den US-A-3.969.287; 3.691.016; 4.195.128; 4.247.642; 4.229.537; und 4.330.440 geoffenbarten reaktiven Substrate zur Proteinimmobilisierung verwendet.

[0126] Glutaminyl- und Asparaginylreste werden häufig zu den entsprechenden Glutamyl- bzw. Asparagylresten deamidiert. Alternativ dazu werden diese Reste unter schwach sauren Bedingungen deamidiert. Beide Formen dieser Reste sind im Schutzumfang der Erfindung enthalten.

[0127] Andere Modifikationen sind die Hydroxylierung von Prolin und Lysin, die Phosphorylierung von Hydroxylgruppen von Seryl- oder Threonylresten, die Methylierung der α-Aminogruppen von Lysin-, Arginin- und Histidin-Seitenketten (T.E. Creighton, "Proteins: Structure and Molecular Properties", W.H. Freeman & Co., San Franscisco, S. 79-86 (1983)), die Acetylierung des N-terminalen Amins und die Amidierung C-terminaler Carboxylgruppen.

[0128] Eine weitere Art kovalenter Modifikation des β-8-Pulypeptids gemäß der Erfindung umfasst die Änderung des nativen Glykosylierungsmusters des Polypeptids. Unter Änderung versteht man das Deletieren einer oder mehrer Kohlenhydratgruppen im nativen Rezeptor und/oder das Hinzufügen einer oder mehrerer Glykosylierungsstellen, die im nativen Rezeptor nicht vorhanden sind.

[0129] Die Glykosylierung von Polypeptiden ist typischerweise entweder N-gebunden oder O-gebunden. N-gebunden bezieht sich auf die Anbindung der Kohlenhydratgruppe an der Seitenkette eines Asparaginrests. Die Tripeptidsequenzen Asparagin-X-Serin und Asparagin-X-Threonin, worin X eine beliebige Aminosäure außer Prolin ist, sind die Erkennungssequenzen für die enzymatische Bindung der Kohlenhydratgruppe an die Asparagin-Seitenkette. Somit erzeugt die Gegenwart einer dieser Tripeptidsequenzen in einem Polypeptid eine potenzielle Glykosylierungsstelle. O-gebundene Glykosylierung ist die Anbindung einer der Zucker N-Acetylgalactosamin, Galactose oder Xylose an eine Hydroxyaminosäure, am häufigsten Seren oder Threonin, obwohl sich auch 5-Hydroxyprolin oder 5-Hydroxylysin eignen. Wie oben erwähnt, enthält der OL-8-Rezeptor 6 mutmaßliche N-gebundene Glykosylierungsstellen.

[0130] Die Hinzufügung von Glykosylierungsstellen im PF4AR-Polypeptid erfolgt günstigerweise durch Veränderung der Aminosäuresequenz, so dass sie eine oder mehrere der oben beschriebenen Tripeptidsequenzen enthält (für N-gebundene Glykosylierungsstellen). Die Veränderung kann auch durch Addition von oder Substitution durch einen oder mehrere Serin- oder Threoninreste an die bzw. in der nativen PF4AR-sequenz erfolgen (für O-gebundene Glykosylierungsstellen). Aus praktischen Gründen wird die PF4AR-Aminosäuresequenz vorzugsweise durch Veränderungen auf DNA-Ebene modifiziert, insbesondere durch Mutieren der für das PF4AR-Polypeptid kodierenden DNA an vorbestimmten Basen, so dass Codons erzeugt werden, die in die gewünschten Aminosäuren translatiert werden. Die DNA-Mutation(en) kann/können unter Anwendung jener Verfahren durchgeführt werden, die oben unter der Überschrift „Aminosäuresequenz-Varianten des PF4AR-Polypeptids" beschrieben sind.

[0131] Ein weiteres Mittel zur Erhöhung der Anzahl an Kohlenhydratgruppen auf dem PF4AR-Polypeptid ist die chemische oder enzymatische Bindung von Glykosiden an das Polypeptid. Diese Techniken sind insofern

vorteilhaft, als sie keine Produktion des Polypeptids in einer Wirtszelle erfordern, die Glykosylierungskapazität für die N- und O-gebundene Glykosylierung aufweist. je nach dem ausgewählten Anbindungsmodus kann/können der/die Zucker an (a) Arginin und Histidin, (b) freie Carboxylgruppen, (c) freie Sulfhydrylgruppen, wie z.B. jene von Cystein, (d) freie Hydroxylgruppen, wie z.B. jene von Serin, Threonin oder Hydroxyprolin, (e) aromatische Reste, wie z.B. jene von Phenylalanin, Tyrosin oder Tryptophan oder (f) die Amidgruppe von Glutamin gebunden werden. Diese Verfahren sind in der WO 87/05330 (veröffentlicht am 11. September 1987) und bei Aplin und Wriston (CRC Crit. Rev. Biochem., 259-306 (1981)) beschrieben.

[0132] Die Entfernung von auf dem nativen PF4AR-Polypeptid vorhandenen Kohlenhydratgruppen kann chemisch oder enzymatisch erfolgen. Die chemische Deglykosylierung erfordert den Kontakt des Polypeptids mit der Verbindung Trifluormethansulfonsäure oder einer gleichwertigen Verbindung. Diese Behandlung führt zur Abspaltung der meisten oder aller Zucker mit Ausnahme des Verknüpfungszuckers (N-Acetylglucosamin oder N-Acetylgalactosamin), während das Polypeptid intakt bleibt. Die chemische Deglykosylierung wird von Hakimuddin et al. (Arch. Bioch. Biophys. 259, 52 (1987)) und Edge et al. (Anal. Biochem. 118, 131 (1981)) beschrieben. Die enzymatische Abspaltung von Kohlenhydratgruppen auf Polypeptiden kann durch Verwendung einer Vielzahl an Endo- oder Exoglykosidasen erreicht werden (siehe Thotakura et al., Meth. Enzymol. 138: 350 (1987)).

[0133] Die Glykosylierung an potenziellen Glykosylierungsstellen kann durch Verwendung der Verbindung Tunicamycin verhindert werden, wie von Duskin et al. (J. Biol. Chem. 257, 3105 (1982)) beschrieben. Tunicamycin blockiert die Bildung von Protein-N-glykosid-Bindungen.

[0134] Der PF4AR kann auch in Mikrokapseln, die durch Coacervationstechniken oder durch Grenzflächenpolymerisation (beispielsweise Hydroxymethylcellulose oder Gelatine-Mikrokapsen und Poly(methylmethacrylat)-Mikrokapsen) hergestellt werden, in kolloidalen Arzneimittel-Zufuhrsystemen (beispielsweise Liposomen, Albumin-Mikrokügelchen, Mikroemulsionen, Nanopartikeln und Nanokapseln) oder in Makroemulsionen eingeschlossen sein. Solche Techniken sind in "Remington's Pharmaceutical Sciences", 16. Auflage, A. Osol. (Hrsg.; 1980), geoffenbart.

[0135] PF4AR-Präparate eignen sich auch zur Erzeugung von Antikörpern, zur Einsatz als Standards in Assays auf den PF4AR (z.B. durch Markieren des PF4AR zur Verwendung als Standard in einem Radioimmunassay, Enzymbindungs-Immunassay oder Radiorezeptorassay), in Affinitätsreinigungs-Verfahren und in kompetitiven Rezeptorbindungs-Assays (bei Markierung mit radioaktivem Iod, Enzymen, Fluorophoren, Spinmarkern und dergleichen).

[0136] Da es oft schwierig ist, im Vorhinein die Eigenschaften einer PF4AR-Variante vorherzusagen, ist zu beachten, dass Screenen der gewonnenen Variante erforderlich Ist, um die optimale Variante auszuwählen. Beispielsweise wird eine Veränderung der immunologischen Beschaffenheit des PF4AR-Moleküls, z.B. die Affinität für einen bestimmten Antikörper, mittels eines kompetitiven Immunassays gemessen. Die Variante wird auf Veränderungen hinsichtlich der Suppression oder Verstärkung ihrer Aktivität im Vergleich zur Aktivität, die man im gleichen Assay für nativen PF4AR beobachtet, getestet. Andere potenzielle Modifikationen von Protein- oder Polypeptid-Eigenschaften, wie z.B. Redox- oder thermische Stabilität, Hydrophobie, Empfindlichkeit für proteolytischen Abbau oder die Tendenz, mit Trägern oder zu Multimeren zu aggregieren, werden durch auf dem Gebiet bekannte Verfahren untersucht.

3. Therapeutische Zusammensetzungen und Verabreichung von PF4AR

[0137] Therapeutische Formulierungen von PF4AR (einschließlich seiner PF4AR-Bindungsfragmente) oder Antikörper dagegen werden auf die Lagerung vorbereitet, indem PF4AR mit dem gewünschten Reinheitsgrad mit optionalen physiologisch annehmbaren Trägern, Exzipienten oder Stabilisatoren (Remington's Pharmaceutical Sciences, s.o.) in Form von lyophilisierten Kuchen oder wässrigen Lösungen vermischt wird. Geeignete Träger, Exzipienten oder Stabilisatoren sind für Rezipienten bei den gewählten Dosierungen und Konzentrationen nicht-toxisch; Beispiele sind Puffer wie etwa Phosphat, Citrat und andere organische Säuren; Antioxidantien wie etwa Ascorbinsäure; niedermolekulare Polypeptide (weniger als etwa 10 Reste); Proteine wie etwa Serumalbumin, Gelatine oder Immunglobuline; hydrophile Polymere wie etwa Polyvinylpyrrolidon; Aminosäuren wie etwa Glycin, Glutamin, Asparagin, Arginin oder Lysin; Monosaccharide, Disaccharide und andere Kohlenhydrate wie etwa Glucose, Mannose oder Dextrine; Chelatbildner wie etwa EDTA; Zuckeralkohole wie etwa Mannit oder Sorbit; salzbildende Gegenionen wie etwa Natrium; und/oder nicht-ionogene Tenside wie etwa Tween, Pluronics oder Polyethylenglykol (PEG).

[0138] Der PF4AR oder Antikörper zur in vivo-Verabreichung muss steril sein. Dies erfolgt am besten durch Filtration durch sterile Filtrationsmembranen vor oder während der Lyophilisierung und Rekonstitution. Der PF4AR wird üblicherweise in lyophilisierter Form oder in Lösung gelagert.

[0139] Therapeutischer PF4AR oder Antikörperzusammensetzungen werden im Allgemeinen in einen Behälter mit einer sterilen Zugangsöffnung eingebracht, z.B. eine Beutel mit intravenöser Lösung oder ein Fläschchen mit einem Stopfen, der mit einer Nadel zur hypodermalen Injektion durchbohrt werden kann.

[0140] Die Art der PF4AR- oder Antikörper-Verabreichung entpricht bekannten Verfahren, z.B. Injektion oder Infusion in intravenöser, intraperitonealer, intrazerebraler, intramuskulärer, intraokularer, intraarterieller oder intraläsionaler Form oder durch Retard-Systeme (später erörtert).

[0141] Geeignete Beispiele für Retard-Präparate sind halbdurchlässige Polymermatrices in der Gestalt von Formteilen, wie z.B. Filmen oder Mikrokapsen. Retard-Matrices sind Polyester, Hydrogele, Polylactide (US-A-3.773.919, EP-A-58.481), Copolymere von L-Glutaminsäure und γ-Ethyl-1-glutamat (Sidman et al., Biopolymers 22, 547-556 (1983)), Poly- (2-hydroxyethylmethacrylat) (Langer et al., J. Biome. Mater. Res. 15, 167-277 (1981)) und Langer, Chem. Tech. 12, 98-105 (1982)), Ethylenvinylacetat (Langer et al., s.o.) oder Poly-D-(-)-3-hydroxybuttersäure (EP-A-133.988). Retard-PF4AR- oder -Antikörper-Zusammensetzungen enthalten auch liposomal eingeschlossenene PF4AR oder Antikörper. PF4AR oder Antikörper enthaltende Liposome werden durch an sich bekannte Verfahren hergestellt: DFA-3.218.121; Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 3688-3692 (1985); Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 4030-4034 (1980); EP-A-52.322; EP-A-36.676; EP-A-88.046; EP-A-143.949; EP-A-142.641; JP-A-83.118008; die US-A-4.485.045 und 4.544.545; und EP-A-102.324. Üblicherweise sind die Liposome klein (etwa 200-800 Ångstrom) und unilamellar, worin der Lipidgehalt mehr als etwa 30 Mol-% Cholesterin beträgt und der ausgewählte Anteil auf die optimale PF4AR- oder Antikörper-Therapie abgestimmt ist.

[0142] Eine wirksame Menge an therapeutisch zu verwendendem PF4AR- oder Antikörper hängt beispielsweise von den Therapiezielen, der Verabreichungsweise und dem Zustand des Patienten ab. Demzufolge ist es notwendig, dass der Therapeut die Dosierung titriert und die Verabreichungsweise je nach Patient modifiziert, um die optimale therapeutische Wirkung zu erzielen. Typischerweise verabreicht der Kliniker den PF4AR oder Antikörper, bis eine Dosierung erreicht ist, mit der die gewünschte Wirkung erzielt werden kann. Der Therapiefortschritt kann mittels herkömmlicher Assays problemlos beobachtet werden.

4. PF4AR-Antikörper-Herstellung

[0143] Polyklonale Antikörper gegen den PF4AR werden im Allgemeinen durch mehrere subkutane (sc) oder intraperitoneale (ip) Injektionen des PF4AR und eines Adjuvans in Tieren gebildet. Die Immunisierung mit Rekombinations-Zellen, die mit dem PF4AR transformiert wurden (z.B. mit huPF4AR transformierte Mäuse- oder CHO-Zellen), kann zufrieden stellende Ergebnisse erzielen, oder es kann sich als sinnvoll herausstellen, den PF4AR zu trennen und ihn oder ein Fragment, das die Ziel-Aminosäuresequenz enthält, an ein Protein zu binden, das in der zu immunisierenden Spezies immunogen ist, z.B. Napfschnecken-Hämocyanin, Serumalbumin, Rinder-Thyroglobulin oder Sojabohnen-Trypsinhemmer unter Verwendung eines bifunktionellen oder derivatisierenden Mittels wie etwa Maleimidobenzoylsulfosuccinimidester (Konjugation über Cysteinreste), N-Hydroxysuccinimid (über Lysinreste), Glutaraldehyd, Bernsteinsäureanhydrid, $SOCl_2$ oder $R^1N=C=NR$, worin R und R^1 unterschiedliche Alkylgruppen sind.

[0144] Tiere werden üblicherweise gegen die Zellen oder immunogenen Konjugate oder Derivate immunisiert, indem 1 mg oder 1 µg PF4AR mit vollständigem Freund-Adjuvans kombiniert und die Lösung intradermal an mehreren Stellen injiziert wird. Einen Monat später erhalten die Tiere mit 1/5 bis 1/10 der ursprünglichen Menge an Konjugat in vollständigem Freund-Adjuvans eine Auffrischung durch sc-Injektion an mehreren Stellen. 7 bis 14 Tage später wird den Tieren Blut abgenommen, und das Serum wird auf Anti-PF4AR-Titer getestet. Die Tiere erhalten eine Auffrischung, bis der Titer abflacht. Vorzugsweise wird das Tier mit dem Konjugat des gleichen PF4AR aufgefrischt, der jedoch an ein anderes Protein und/oder über einen anderen Vernetzer konjugiert ist. Konjugate können auch in Rekombinations-Zellkultur als Proteinfusionen gebildet werden. Aggregationsmittel wie etwa Alaun dienen zur Verstärkung der Immunreaktion.

[0145] Eine weitere Möglichkeit ist die Verwendung kombinatorischer variabler Domänen-Bibliotheken und Screeningmethoden zur Identifizierung der gewünschten Anti-PF4AR-Antikörper.

[0146] Monoklonale Antikörper werden durch Gewinnen von Milzzellen aus immunisierten Tieren und Immor-

talisieren der Zellen in herkömmlicher Weise, z.B. durch Fusionieren mit Myelomzellen oder durch Epstein-Barr-(EB-)Virustransformation und Screening auf Klone, die den gewünschten Antikörper exprimieren, erzeugt.

[0147] Der monoklonale Antikörper ist vorzugsweise für jedes Ziel-PF4AR-Polypeptid spezifisch und kreuzreagiert nicht mit Kaninchen-fMLP-Rezeptor[5], Human-fMLP-Rezeptor, Human-C5a-Rezeptor, dem IL-8-Rezeptor niedriger Affinität oder anderen Mitgliedern der PF4AR-Familie. Für den Rezeptor aus **Fig.** 2, 4 oder 5 spezifische Antikörper werden bevorzugt. Der Antikörper wird so gewählt, dass er entweder agonistisch oder antagonistisch ist oder keine Auswirkung auf die Aktivität eines PF4-Überfamilienmitglieds, sich an den Rezeptor zu binden oder ihn zu aktivieren, hat.

[0148] Murphy et al. (s.o.) beschreiben einen Rezeptor mit einem hohen Grad an Homologie mit dem Rezeptor aus **Fig.** 2. Murphy et al. charakterisierten ihren Rezeptor in Rekombinations-Oozyten als Rezeptur für IL-8 „niedriger Affiniität" und geringer Kapazität, sich an MBSA zu binden – sie legen also nahe, dass er bei der IL-8- und biologischen MGSA-Aktivität in vivo eine untergeordnete Rolle spielt. Die Studien der Anmelder zeigten jedoch, dass der Rezeptor von Murphy et al. IL-8-Affinität aufweist, die genauso hoch oder höher als jene des Rezeptors aus **Fig.** 2 ist, und dass er auch hohe Affinität (etwa 1-10 nM) für MGSA aufweist. Somit erfordert der Antagonismus der IL8- und/oder MGSA-Reaktion von Lymphoidzellen wahrscheinlich, dass beide Rezeptoren gehemmt oder blockiert sind. Beispielsweise sollte man einen IL-8-Antagonisten-Antikörper auswählen, der sich an ein Epitop des Rezeptors aus **Fig.** 2 bindet, das er mit dem Rezeptor von Murphy et al. gemeinsam hat. Dies könnte durch Routine-Screeningverfahren erfolgen. Beispielsweise können die Antikörper-Kandidaten auf ihre Fähigkeit getestet werden, mit markiertem IL-8 um die Bindung an Zellen zu konkurrieren, die den Rezeptor aus **Fig.** 2 tragen, und dann könnte die gleiche Studie mit den Rezeptor von Murphy et al. tragenden Zellen durchgeführt werden. Antikörper, die IL-8-Aktivierung oder die Bindung an beide Zellen hemmen, werden dann als therapeutische Kandidaten ausgewählt. Antikörper, die zwischen dem Rezeptor aus **Fig.** 2 und jenem von Murphy et al. unterscheiden können und sich nur an den einen oder den anderen binden, eignen sich zur Diagnose. Der Rezeptor aus **Fig.** 2 bindet sich im Gegensatz zum Rezeptor von Murphy et al. schlecht an MGSA.

5. Verwendungszwecke von PF4AR, seiner Nukleinsäure und seiner Antikörper

[0149] Die für den PF4AR kodierende Nukleinsäure kann als diagnostisches Instrument für gewebespezifische Typisierung verwendet werden. Solche Vorgangsweisen sind z.B. in situ-Hybridisierung sowie Northern- und Southern-Blotting, wobei eine PCR-Analyse zur Bestimmung dienen kann, ob DNA und/oder RNA, die für den PF4AR kodiert/kodieren, im/in den untersuchten Zelltyp(en) vorhanden ist/sind. Diese Rezeptoren sind typischerweise diagnostisch für PBL oder monozytische Zellen.

[0150] Isoliertes PF4AR-Polypetid kann in quantitativen diagnostischen Assays als Standard herangezogen werden, mit dem Proben, z.B. aus PBL oder monozytischen Zellen, die unbekannte Mengen an PF4AR enthalten, verglichen werden können. Rekombinations-Zellen, die den IL-8-Rezeptor exprimieren, können in Assays auf PF4A-Liganden in gleicher Weise verwendet werden, wie etwa Neutrophile in IL-8-Assays zum Einsatz kommen. Die PF4AR-Polypeptide, Fragmente oder Zellen (als solche oder derivatisiert) eignen sich als Immunogene zur Erzeugung von Antikörpern gegen PF4AR, zur Reinigung solcher Antikörper aus Aszites oder Rekombinations-Zellkullturmedien oder zur Verwendung als kompetitive Antagonisten für Überfamilien-Liganden, z.B. IL-8.

[0151] Die PF4ARs eignen sich zum Screenen auf Aminosäuresequenz- oder andere Varianten von PF4-Überfamilienmitgliedern. Beispielsweise wird eine Bank von IL-8-Aminosäuresequenz-Variantenkandidaten durch stellengerichtete Mutagenese produziert. Sie werden in Konkurrenz mit markiertem nativen IL-8 um Zellen, die den IL-8-Rezeptor aus **Fig.** 2 tragen, inkubiert, um agonistische oder antagonistische IL-8-Varianten zu identifizieren. Bindung oder Zellaktivierung sind geeignete Assay-Endpunkte. Alternativ dazu wird der Rezeptor in zellfreier Form gewonnen und die Bindung von IL-8 und Kandidatenvarianten getestet.

[0152] PF4AR-Antikörper eignen sich für diagnostische Assays auf PF4AR-Expression in spezifischen Zellen oder Geweben, worin die Antikörper in gleicher Weise wie der oben beschriebene PF4AR markiert und/oder auf einer unlöslichen Matrix immobilisiert werden. PF4AR-Antikörper eignen sich auch zur Affinitätsreinigung des PF4AR aus Rekombinations-Zellkultur oder natürlichen Quellen. Die PF4AR-Antikörper, die nicht detektierbar mit anderen PF4ARs kreuzreagieren, können dazu dienen, jeden PF4AR zu reinigen, der frei von anderen homologen Rezeptoren ist. PF4AR-Antikörper, die PF4-Antagonisten sind, kommen als entzündungshemmende Mittel oder zur Behandlung anderer PF4-Überfamilien-vermittelter Störungen in Frage.

[0153] Geeignete diagnostische Assays für den PF4AR und seine Antikörper sind an sich allgemein bekannt. Zu solchen Assays zählen kompetitive und Sandwich-Assays sowie sterische Hinderungsassays. Kompetitive und Sandwich-Verfahren verwenden einen Phasentrennschritt als integralen Bestandteil, während sterische Hinderungsassays in einem einzigen Reaktionsgemisch erfolgen. im Grunde genommen werden die gleichen Vorgangsweisen für den Assay auf PF4AR und auf den PF4AR bindende Substanzen angewandt, obwohl bestimmte Verfahren je nach dem Molekulargewicht der untersuchten Substanz bevorzugt werden. Daher wird die zu testende Substanz hierin als Analyt bezeichnet – ungeachtet ihres Status als Antigen oder Antikörper; Proteine, die den Analyten binden, werden als Bindungspartner bezeichnet – ob sie nun Antikörper, Zelloberflächenrezeptoren oder Antigene sind.

[0154] Analytische Methoden für den PF4AR oder seine Antikörper verwenden alle einen oder mehrere der folgenden Reagenzien: markiertes Analytenanalog, immobilisiertes Analytenanalog, markierten Bindungspartner, immobilisierten Bindungspartner und sterische Konjugate. Die markierten Reagenzien sind auch als „Tracer" bekannt.

[0155] Der verwendete Marker (eignet sich auch zur Markierung von PF4AR-Nukleinsäure zur Verwendung als Sonde) ist eine beliebige detektierbare Funktionalität, welche die Bindung von Analyt und seinem Bindungspartner nicht beeinträchtigt. Zahlreiche Marker kommen für die Verwendung im Immunassay in Frage, z.B. Gruppen, die direkt detektierbar sind wie etwa fluorochrome, chemolumineszierende und radioaktive Marker, sowie Gruppen wie etwa Enzyme, die zur Detektion umgesetzt oder derivatisiert werden müssen. Beispiele für solche Marker sind die Radioisotope ^{32}P, ^{14}C, ^{125}I, ^{3}H und ^{131}I, Fluorophore wie etwa Seltenerdchelate oder oder Fluorescein und seine Derivate, Rhodamin und seine Derivate, Dansyl, Umbelliferon, Luceriferasen, z.B. Leuchtkäfer-Luciferase und bakterielle Luciferase (US-A-4.737.456), Luciferin, 2,3-Dihydrophthalazindione, Meerrettich-Peroxidase (HRP), alkalische Phosphatase, β-Galactosidase, Glucoamylase, Lysozym, Saccharid-Oxidasen, z.B. Glucose-Oxidase, Galactose-Oxidase und Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase, heterozyklische Oxidasen wie etwa Uricase und Xanthin-Oxidase, gekoppelt mit einem Enzym, das Wasserstoffperoxid verwendet, um einen Farbstoffvorläufer wie etwa HRP, zu oxidieren, Lactoperoxidase oder Mikroperoxidase, Biotin/Avidin, Spinmarker, Bakteriophagen-Marker, stabile freie Radikale und dergleichen.

[0156] Konventionelle Verfahren stehen zur Verfügung, um diese Marker kovalent an Proteine oder Polypeptide zu binden. Beispielsweise können Haftvermittler wie etwa Dialdehyde, Carbodiimide, Dimaleimide, Bisimidate, bis-diazotiertes Benzidin und dergleichen verwendet werden, um die Antikörper mit den oben beschriebenen fluoreszierenden, chemolumineszierenden und Enzymmarkern zu markieren. Siehe z.B. US-A-3.940.475 (Fluorimetrie) und 3.645.090 (Enzyme); Hunter et al., Nature 144, 945 (1962); David et al., Biochemistry 13, 1014-1021 (1974); Pain et al., J. Immunol. Methods 40, 219-230 (1981); und Nygren, J. Histochem. and Cytochem. 30, 407-412 (1982). Bevorzugte Marker sind hierin Enzyme wie etwa Meerrettich-Peroxidase und alkalische Phosphatase.

[0157] Die Konjugation eines solchen Markers, einschließlich der Enzyme, an den Antikörper ist ein Standard-Manipulationsvorgang für Fachleute auf dem Gebiet von Immunassays. Siehe z.B. O'Sullivan et al., „Methods for the Preparation of Enzyme-antibody Conjugates for Use in Enzyme Immunoassay", in "Methods in Enzymology", J.J. Langone und H. Van Vunakis (Hrsg.), Bd. 73 (Academic Press, New York, New York, 1981), S. 147-166. Solche Bindungsverfahren eignen sich zur Verwendung für PF4AR oder seine Antikörper, die alle proteinartig sind.

[0158] Die Immobilisierung von Reagenzien ist für bestimmte Assayverfahren erforderlich. Die Immobilisierung erfordert die Trennung des Bindungspartners von jedem Analyten, der frei in Lösung bleibt. Dies erfolgt üblicherweise durch Insolubilisieren des Bindungspartners oder Analytenanalogs vor dem Assay, z.B. durch Adsorption an eine wasserunlösliche Matrix oder Oberfläche (Bennich et al., US-A-3.720.760), durch kovalente Bindung (z.B. unter Einsatz von Glutaraldehyd-Vernetzung) oder durch Insolubilisieren des Partners oder Analaogs im Nachhinein, z.B. durch Immunfällung.

[0159] Andere Assayverfahren, die als kompetitive oder Sandwich-Assays bekannt sind, werden auf dem Gebiet der kommerziellen Diagnostik in großem Umfang angewandt.

[0160] Kompetitive Assays basieren auf der Fähigkeit eines Traceranalogs, mit dem Testproben-Analyten um eine begrenzte Anzahl an Bindungsstellen auf einen gemeinsamen Bindungspartner zu konkurrieren. Der Bindungspartner wird im Allgemeinen vor oder nach der Kompetition insolubilisiert, und dann werden der Tracer und der an den Bindungspartner gebundene Analyt vom ungebundenen Tracer und Analyten abgetrennt. Diese Trennung erfolgt durch Dekantieren (wenn der Bindungspatner vorinsolubilisiert wurde) oder durch Zentri-

fugieren (wenn der Bindungspartner nach der kompetitiven Reaktion gefällt wurde). Die Menge des Testproben-Analyten ist umgekehrt proportional zur Menge an gebundenem Tracer (gemessen anhand der Menge an Markersubstanz). Dosis-Response-Kurven mit bekannten Mengen an Analyt werden erstellt und mit den Testergebnissen verglichen, um die Menge an in der Testprobe vorhandenem Analyten quantitativ zu bestimmen. Diese Assays werden ELISA-Systeme genannt, wenn Enzyme als detektierbare Marker verwendet werden.

[0161] Eine weitere Art von kompetitivem Assay, ein so genannter „homogener" Assay, erfordert keine Phasentrennung. Hier wird ein Konjugat eines Enzyms mit dem Analyten hergestellt und so eingesetzt, dass die Gegenwart des Anti-Analyten die Enzymaktivität modifiziert, wenn sich der Anti-Analyt an den Analyten bindet. In diesem Fall werden der PF4AR oder seine immunologisch aktiven Fragmente mit einer bifunktionellen organischen Brücke an ein Enzym wie etwa Peroxidase konjugiert. Konjugate werden zur Verwendung mit Anti-PF4AR selektiert, sodass die Bindung des Anti-PF4AR die Enzymaktivität des Markers hemmt oder potenziert. Dieses Verfahren wird häufig unter dem Namen EMIT durchgeführt.

[0162] Sterische Konjugate werden in sterischen Hinderungsverfahren für homogene Assays verwendet. Diese Konjugate werden durch kovalente Bindung eines niedermolekularen Haptens an einen kleinen Analyten synthetisiert, sodass Antikörper gegen Hapten im Wesentlichen nicht in der Lage ist, das Konjugat zur gleichen Zeit wie Anti-Analyt zu binden. Gemäß diesem Assayverfahren bindet der in der Testprobe vorhandene Analyt Anti-Analyt, wodurch Anti-Hapten das Konjugat binden kann und sich eine Änderung in der Beschaffenheit des Konjugat-Haptens ergibt, z.B. eine Änderung der Fluoreszenz, wenn das Nagten ein Fluorophor ist.

[0163] Sandwich-Assays eignen sich besonders zur Bestimmung von PF4AR oder PF4AR-Antikörpern. In konsekutiven Sandwich-Assays wird ein immobilisierter Bindungspartner dazu verwendet, Testproben-Analyt zu adsorbieren; die Testprobe wird z.B. durch Waschen entfernt, der gebundene Analyt dazu verwendet, markierten Bindungspartner zu adsorbieren, und das gebundene Material dann vom restlichen Tracer abgetrennt. Die Menge an gebundenem Tracer ist direkt proportional zum Testproben-Analyt. In „simultanen" Sandwich-Assays wird die Testprobe vor der Zugabe des markierten Bindungs-Partners nicht abgetrennt. Ein konsekutiver Sandwich-Assay unter Einsatz von monoklonalem Anti-PF4AR-Antikörper als ein Antikörper und polyklonalem Anti-PF4AR-Antikörper als zweiter Antikörper eignet sich zum Testen von Proben auf PF4AR-Aktivität.

[0164] Dies sind lediglich Beispiele für diagnostische Assays für PF4AR und Antikörper. Andere Methoden können heute oder in der Zukunft für die Bestimmung dieser Analyten entwickelt werden und sind im Schutzumfang der Erfindung enthalten, z.B. die oben beschriebenen Bioassays.

[0165] Man nimmt an, dass die in **Fig.** 4 und 5 dargelegten Polypeptide Rezeptoren für unterschiedliche und bis jetzt unbestimmte Mitglieder der PF4-Überfamilie darstellen (umfassend sowohl C-C- als auch CXC-Unterfamilien). Wie der IL8-Rezeptor aus **Fig.** 2 sind sie Mitglieder der an G-Protein gekoppelten Überfamilie und weisen stärkere Ähnlichkeit mit dem IL-8-Rezeptor auf als andere Rezeptoren. In Vorversuchen reagieren diese Rezeptoren tragende Rekombinations-Zellen nicht auf Rantes, MCP1, IL-8 oder MGSA, obwohl letzten Endes gezeigt werden kann, dass sie andere Mitglieder der PF4-Überfamilie oder derzeit unbekannte Liganden binden. Ob sich nun die Polypeptide aus **Fig.** 4 oder 5 an Mitglieder der PF4-Überfamilie binden oder nicht, eignen sich jedenfalls die Polypeptide zur Bildung von Antikörpern für Diagnosezwecke bei der Bestimmung der Gewebeverteilung der Rezeptoren und somit als immunhistochemisches Diagnoseinstrument für solche Gewebe, insbesondere als Diagnostikum für monozytische Zellen oder PBLs, da bekannt ist, dass solche Zellen die Rezeptoren aus **Fig.** 4 und 5 exprimieren. Sobald jene Mitglieder der PF4-Überfamilie identifiziert sind, die sich an diese Rezeptoren binden, können die Rezeptoren zur Diagnose der Gegenwart der identifizierten Mitglieder oder zur Reinigung in spezifischen Affinitätsverfahren herangezogen werden. Die DNA aus **Fig.** 4 und 5 kommt auch für die Diagnose der Gegenwart von DNA oder RNA in Frage, die für den IL-8-Rezeptor kodiert, wenn wenig raue Bedingungen herrschen.

[0166] Die folgenden Beispiele dienen lediglich der Veranschaulichung und sind nicht einschränkend.

BEISPIEL 1

[0167] Um den Klon pRK5B.il8r1.1 zu erhalten, wurde eine cDNA[16]-Bibliothek von 1.000.000 Klonen aus neutrophiler Human-mRNA[17] im Vektor pRK5B unter Einsatz von bstXI-Linkern konstruiert. Die cDNA wird in abgestumpfter Form produziert. Hemi-Kinase-bstXI-Linker werden an die cDNA ligiert, und die Linker werden in den PRK5B-Vektor ligiert, der mit bstXI gespalten worden war, mit Phosphatase behandelt und das lange Vektorfragment isoliert. PRK5B ist ein Derivat von PRK5[18], das einen Cytomegalievirus-Promotor enthält, gefolgt

von einer 5'-Intron, einer bstXI-Klonierstelle und einem frühen SV40-Polyadenylierungssignal, obwohl zu beachten ist, dass jeder Säugetierzellen-Expressionsvektor in Frage kommt. 58 Pools von jeweils 2500 Klonen wurden durch Elektroporation[19] von 20 µg DNA in 3.750.000 Zellen, nämlich COS-7-Zellen, transfiziert. Nach 2tägiger Vermehrung in 150-mm-Schalen in Medium (50:50::Ham's F12:DMEM) mit 10 % Kalbsfötenserum wurde ^{125}I-IL-8-Bindung durchgeführt. Gereinigtes Human-IL-8 mit 72 Aminosäuren in E. coli[20] wurde durch das Lactoperoxidase-Verfahren[21] mit etwa 1100 Ci/mMol markiert und war zu zumindest 85 % bindungsfähig. Die Schalen wurden zweimal mit Phosphat-gepufferter Salzlösung ausgewaschen und das Binden mit 8 ml Wachstumsmedium pro Schale durchgeführt, das etwa 2,5 % Kalbsfötenserum und etwa 0,5 nM ^{125}I-IL-8 enthielt. Nach 2 Stunden bei 37°C wurden die Platten dreimal mit Phosphat-gepufferter Salzslöung ausgespült, ihr Boden ausgeschnitten[22] und autoradiografiert. Jeder positive Pool mit 2.500 cDNA-Klonen wurde anschließend in Pools von 800 Klonen unterteilt, und jeder davon wurde transfiziert und untersucht. Jeder positive Pool wurde seinerseits in Pools von 185, 30 und schließlich einem einzigen Klon oder mehrere einzelne Klone unterteilt, bis einzelne positive Klone identifiziert wurden, um das reine Isolat zu erhalten. Da nur ein Teil jedes Pools zur Transfektion herangezogen wurde, war es nicht erforderlich, Klone aus den Transformanten zu bewahren.

[0168] Die Bindungskompetition erfolgte mit elektroporierten COS-7-Zellen nach eintägiger Expression in 6-Napf-Schalen (etwa 175.000 Zellen/Schale). Die Bindung wurde mit radioiodiertem IL-8 der Wildform in Bindungsmedium (Ca^{2+} und Mg^{2+}-freies Hanks, gepuffert mit 25 nM Hepes und ergänzt mit 0,5 % BSA) bei 4°C etwa 2 h lang durchgeführt. Die Näpfe wurden dann gewaschen und die Zellen mit Trypsin geerntet und gezählt. Keine spezifische Bindung wurde in parallelen Näpfen festgestellt, die Zellen enthielten, die mit DNA aus dem Vektor pRK5B transfiziert waren. Neutrophil-Bindung wurde gemäß dem beschriebenen Verfahren[22] durchgeführt, jedoch 2 h lang bei 4°C.

BEISPIEL 2

[0169] Bestehende λgt10-cDNA-Bibliotheken aus der Human-Zelllinie HL60 und aus menschlichen Peripherblutlymphozyten wurden bei wenig rauen Bedingungen mit einer Sonde aus der Kodierregion des klonierten Human-IL-8-Rezeptors hoher Affinität (**Fig.** 2) gescreent. Die Sonde war das 874 bp-PstI/NcoI-Fragment des die Kodierregion für die Aminosäuren 23-314 enthaltenden Rezeptors. Die Hybridisierung erfolgte in 20 Formamid, 4 × SSC, 50 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 7, 0,2 g/l ultraschallbehandelter Lachssperma-DNA, 5 × Denharts, 10 % Dextransulfat, bei 42°C mit einer Waschung mit 1 × SSC, 0,1 % SDS, bei 50°C, Einige Flecken (je zwei) mit variierender Intensität (etwa 60) wurden ausgewählt, plaque-gereinigt, in Plasmidvektoren subkloniert und sequenziert. Das Nukleinsäure-Sequenzieren begann mit der Selektion von Flecken mit der (höchsten Intensität. Es wurde für einen bestimmten Fleck (Phagen) eine ausreichend lange Sequenz erhalten, um zu ermitteln, oh Hinweise auf Struktur- oder Sequenzhomologie mit dem IL-8-Rezeptor bestanden. Wenn dies der Fall war, wurde der Rest des Gens ermittelt (falls erforderlich) und zur Gänze sequenziert. Um zu vermeiden, dass Sequenzen zur Gänze hybridisierten, wurde die Sequenz dann dazu verwendet, die Stammsammlung von IL-8-Rezeptor-DNA-Hybridisierungsklonen unter sehr rauen Bedingungen zu sondieren, um andere Flecken, die das gleiche Hybridisierungsgen enthielten, zu identifizieren und zu verwerfen. Diese Technik war bei der Verringerung der Sequenzierlast sehr wirkungsvoll. Beispielsweise wurde ein Klon von etwa 1/3 der anfänglichen 60 Klone repräsentiert, und mit diesem Resultat alleine konnte der negative Screen den Aufwand in Bezug auf das Sequenzieren der Klone beträchtlich verringern.

[0170] Aus diesem Screen wurden zwei neue Gensequenzen identifiziert, die eindeutig mit dem IL-8-Rezeptur in Verbindung standen. Die Kodierregion für ein neues Gen war zwischen zwei Klonen (8rr.20 und 8rr.15) aufgeteilt. Die kombinierte Sequenz dieses Gens (8rr.20.15) ist in **Fig.** 4 dargestellt. Die vorllständige Kodierregion für das zweite Gen befindet sich auf Klon 8rr.9 (**Fig.** 5). Die vorhergesagte Aminosäuresequenz von 8rr.20.15 ist zu 34 % mit der IL-8-Rezeptorsequenz hoher und mit jener niedriger Affinität identisch. Die Sequenz von 8rr.9 ist zu 36 % bzw. 38 % mit der IL-8-Rezeptorsequenz hoher bzw. niedriger Affinität identisch (siehe W.E. Holmes et al., Science 253, 1278 (1991); und P.M. Murphy et al., Science 253, 1280 (1991)). Die Aminosäuresequenzen von 8rr.20.15 und 8rr.9 sind zu 31 % identisch. Die Verwendung dieser Sonde unter wenig rauen Bedingungen führte zu keiner detektierbaren Hybridisierung an die fMLP-Rezeptorgene, die man in diesen Bibliotheken erwartete.

Literaturhinweise

1. Oppenheim, J.J. et al., Annu. Rev. Immunol., 9:617-648 (1991).
2. Gimbrone, M.A.Jr. et al., Science, 246:1601-3 (1989).
3. Boulay, F. et al., Biochem. Biophys. Res. Comm., 168:1103-1109 (1990).
4. Gerard, N.P. & Gerard, C., Nature, 349:614-617 (1991).

5. Thomas, K.M., Pyun, H.Y. & Navarro, J., J. Biol. Chem., 265:20061-20064 (1990).
6. Sims, J.E. et al., Science, 241:585-589 (1988).
7. D'Andrea, A.D., Lodish, H.F. & Wong, G.G., Cell, 57:277-285 (1989).
8. Samanta, A.K., Oppenheim, J.J. & Matsushima, K., J. Exp. Med., 169:1185-1189 (1989).
9. Besemer, J., Hujber, A. & Kuhn, B., J. Biol. Chem., 264:17409-17415 (1989).
10. Grob, P.M. et al. J. Biol. Chem., 265:8311-8316 (1990).
11. Kozak, M., Nucleic Acid Res., 12:857-872 (1984).
12. Dixon, R.A.F., Sigal, I.S. & Strader, C.D., Cold Spring Har. Sym. Quant. Biol., 53:487-497 (1988).
13. Korchak, H.M. et al., J. Biol Chem., 259:4076-4082 (1984).
14. Tennenberg, S.D., Zemlan, F.P. & Solomkin J.S., J. Immunol., 141:3937-3944 (1988).
15. Ramachandran, J. et al., BioEssays, 10:54-57 (1989).
16. Gubler, U. & Hoffman, B.J. Gene, 25, 263-269, (1983).
17. Chirgwin, J.J. et al. Biochem., 18:5294-5299 (1979).
18. EP 307,247.
19. Gearing, D.P. et al. EMBO J., 8:3667-3676 (1989).
20. Hebert, C.A. et al. J. Immunol., 145:3033-3040 (1991).
21. Morrison M. & Bayse, G.S., Biochem., 9:2995-3000 (1970).
22. Pacholczyk, T., Blakely, R.D. & Amara, S.G., BioTechnicues, 9:556-558 (1990).
23. Grynkiewicz, G., Poenie, M. & Tsien, R.Y., J. Biol. Chem., 260:3440-3450 (1985).

SEQUENZAUFLISTUNG

(1) ALLGEMEINE INFORMATIONEN.

(i) ANMELDER: GENENTECH, INC

(ii) TITEL DER ERFINDUNG: Human-PF4A-Rezeptoren und ihre Verwendung

(iii) ANZAHL AN SEQUENZEN: 3

(iv) KORRESPONDENZADRESSE:

(A) ADRESSAT: Genentech, Inc.

(B) STRASSE: 460 Point San Bruno Blvd.

(C) STADT: South San Francisco

(D) BUNDESSTAAT: Kalifornien

(E) LAND: USA

(F) POSTLEITZAHL: 94080

(v) COMPUTERLESBARE FORM:

(A) ART DES MEDIUMS: 5,25-Zoll-Diskette, 360 kB

(B) COMPUTER: IBM PC-kompatibel

(C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS

(D) SOFTWARE: Patin (Genentech)

(vi) AKTUELLE ANMELDUNGSDATEN:

(A) ANMELDUNGSNUMMER:

(B) ANMELDUNGSDATUM: 23. März 1992

(C) KLASSIFIKATION:

(vii) PRIORITÄTSANMELDUNGSDATEN:

(A) ANMELDUNGSNUMMER: 07/677211

(B) ANMELDUNGSDATUM: 19. Dezember 1991

(viii) INFORMATIONEN BETREFFEND ANWALT/VERTRETER:

(A) NAME: Hensley, Max D.

(B) REGISTRIERUNGSNUMMER: 27.043

(C) GESCHÄFTS-/AKTENZAHL: 706P1

(ix) INFORMATIONEN BETREFFEND TELEKOMMUNIKATION:

(A) TELEFON: 001-415-266-1994

(B) TELEFAX: 001-415-952-9881

(C) TELEX: 910-371-7168

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID Nr. 1:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 1933 Basen

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANGEIGENSCHAFT: einfach

(D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID Nr. 1:

```
CCTGGCCGGT GCTTCAGTTA GATCAAACCA TTGCTGAAAC TGAAGAGGAC 50

    ATG TCA AAT ATT ACA GAT CCA CAG ATG TGG GAT TTT 86
    Met Ser Asn Ile Thr Asp Pro Gln Met Trp Asp Phe
      1               5                  10

GAT GAT CTA AAT TTC ACT GGC ATG CCA CCT GCA GAT GAA 125
Asp Asp Leu Asn Phe Thr Gly Met Pro Pro Ala Asp Glu
         15                  20                  25
```

```
GAT TAC AGC CCC TGT ATG CTA GAA ACT GAG ACA CTC AAC 164
Asp Tyr Ser Pro Cys Met Leu Glu Thr Glu Thr Leu Asn
                30                  35

AAG TAT GTT GTG ATC ATC GCC TAT GCC CTA GTG TTC CTG 203
Lys Tyr Val Val Ile Ile Ala Tyr Ala Leu Val Phe Leu
     40                  45                  50

CTG AGC CTG CTG GGA AAC TCC CTG GTG ATG CTG GTC ATC 242
Leu Ser Leu Leu Gly Asn Ser Leu Val Met Leu Val Ile
            55                  60

TTA TAC AGC AGG GTC GGC CGC TCC GTC ACT GAT GTC TAC 281
Leu Tyr Ser Arg Val Gly Arg Ser Val Thr Asp Val Tyr
 65                  70                  75

CTG CTG AAC CTG GCC TTG GCC GAC CTA CTC TTT GCC CTG 320
Leu Leu Asn Leu Ala Leu Ala Asp Leu Leu Phe Ala Leu
         80                  85                  90

ACC TTG CCC ATC TGG GCC GCC TCC AAG GTG AAT GGC TGG 359
Thr Leu Pro Ile Trp Ala Ala Ser Lys Val Asn Gly Trp
                95                  100

ATT TTT GGC ACA TTC CTG TGC AAG GTG GTC TCA CTC CTG 398
Ile Phe Gly Thr Phe Leu Cys Lys Val Val Ser Leu Leu
    105                 110                 115

AAG GAA GTC AAC TTC TAC AGT GGC ATC CTG CTG TTG GCC 437
Lys Glu Val Asn Phe Tyr Ser Gly Ile Leu Leu Leu Ala
            120                 125

TGC ATC AGT GTG GAC CGT TAC CTG GCC ATT GTC CAT GCC 476
Cys Ile Ser Val Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Val His Ala
130                 135                 140

ACA CGC ACA CTG ACC CAG AAG CGT CAC TTG GTC AAG TTT 515
Thr Arg Thr Leu Thr Gln Lys Arg His Leu Val Lys Phe
        145                 150                 155

GTT TGT CTT GGC TGC TGG GGA CTG TCT ATG AAT CTG TCC 554
Val Cys Leu Gly Cys Trp Gly Leu Ser Met Asn Leu Ser
                160                 165

CTG CCC TTC TTC CTT TTC CGC CAG GCT TAC CAT CCA AAC 593
Leu Pro Phe Phe Leu Phe Arg Gln Ala Tyr His Pro Asn
    170                 175                 180

AAT TCC AGT CCA GTT TGC TAT GAG GTC CTG GGA AAT GAC 632
Asn Ser Ser Pro Val Cys Tyr Glu Val Leu Gly Asn Asp
            185                 190

ACA GCA AAA TGG CGG ATG GTG TTG CGG ATC CTG CCT CAC 671
Thr Ala Lys Trp Arg Met Val Leu Arg Ile Leu Pro His
195                 200                 205

ACC TTT GGC TTC ATC GTG CCG CTG TTT GTC ATG CTG TTC 710
Thr Phe Gly Phe Ile Val Pro Leu Phe Val Met Leu Phe
        210                 215                 220

TGC TAT GGA TTC ACC CTG CGT ACA CTG TTT AAG GCC CAC 749
Cys Tyr Gly Phe Thr Leu Arg Thr Leu Phe Lys Ala His
                225                 230

ATG GGG CAG AAG CAC CGA GCC ATG AGG GTC ATC TTT GCT 788
Met Gly Gln Lys His Arg Ala Met Arg Val Ile Phe Ala
    235                 240                 245
```

```
GTC GTC CTC ATC TTC CTG CTT TGC TGG CTG CCC TAC AAC 827
Val Val Leu Ile Phe Leu Leu Cys Trp Leu Pro Tyr Asn
            250                 255

CTG GTC CTG CTG GCA GAC ACC CTC ATG AGG ACC CAG GTG 866
Leu Val Leu Leu Ala Asp Thr Leu Met Arg Thr Gln Val
260                 265                 270

ATC CAG GAG ACC TGT GAG CGC CGC AAC AAC ATC GGC CGG 905
Ile Gln Glu Thr Cys Glu Arg Arg Asn Asn Ile Gly Arg
        275                 280                 285

GCC CTG GAT GCC ACT GAG ATT CTG GGA TTT CTC CAT AGC 944
Ala Leu Asp Ala Thr Glu Ile Leu Gly Phe Leu His Ser
                290                 295

TGC CTC AAC CCC ATC ATC TAC GCC TTC ATC GGC CAA AAT 983
Cys Leu Asn Pro Ile Ile Tyr Ala Phe Ile Gly Gln Asn
    300                 305                 310

TTT CGC CAT GGA TTC CTC AAG ATC CTG GCT ATG CAT GGC 1022
Phe Arg His Gly Phe Leu Lys Ile Leu Ala Met His Gly
            315                 320

CTG GTC AGC AAG GAG TTC TTG GCA CGT CAT CGT GTT ACC 1061
Leu Val Ser Lys Glu Phe Leu Ala Arg His Arg Val Thr
325                 330                 335

TCC TAC ACT TCT TCG TCT GTC AAT GTC TCT TCC AAC CTC  1100
Ser Tyr Thr Ser Ser Ser Val Asn Val Ser Ser Asn Leu
        340                 345                 350

TGAAAACCAT CGATGAAGGA ATATCTCTTC TCAGAAGGAA AGAATAACCA 1150

ACACCCTGAG GTTGTGTGTG GAAGGTGATC TGGCTCTGGA CAGGCACTAT 1200

CTGGGTTTTG GGGGGACGCT ATAGGATGTG GGGAAGTTAG GAACTGGTGT 1250

CTTCAGGGGC CACACCAACC TTCTGAGGAG CTGTTGAGGT ACCTCCAAGG 1300

ACCGGCCTTT GCACCTCCAT GGAAACGAAG CACCATCATT CCCGTTGAAC 1350

GTCACATCTT TAACCCACTA ACTGGCTAAT TAGCATGGCC ACATCTGAGC 1400

CCCGAATCTG ACATTAGATG AGAGAACAGG GCTGAAGCTG TGTCCTCATG 1450

AGGGCTGGAT GCTCTCGTTG ACCCTCACAG GAGCATCTCC TCAACTCTGA 1500

GTGTTAAGCG TTGAGCCACC AAGCTGGTGG CTCTGTGTGC TCTGATCCGA 1550

GCTCAGGGGG GTGGTTTTCC CATCTCAGGT GTGTTGCAGT GTCTGCTGGA 1600

GACATTGAGG CAGGCACTGC CAAAACATCA ACCTGCCAGC TGGCCTTGTG 1650

AGGAGCTGGA AACACATGTT CCCCTTGGGG GTGGTGGATG AACAAAGAGA 1700
```

```
AAGAGGGTTT GGAAGCCAGA TCTATGCCAC AAGAACCCCC TTTACCCCCA 1750

TGACCAACAT CGCAGACACA TGTGCTGGCC ACCTGCTGAG CCCCAAGTGG 1800

AACGAGACAA GCAGCCCTTA GCCCTTCCCC TCTGCAGCTT CCAGGCTGGC 1850

GTGCAGCATC AGCATCCCTA GAAAGCCATG TGCAGCCACC AGTCCATTGG 1900

GCAGGCAGAT GTTCCTAATA AAGCTTCTGT TCC 1933
```

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID Nr. 2:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 1737 Basen

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANGEIGENSCHAFT: einfach

(D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID Nr. 2:

```
GAATTCCAGT GTGCTGGCGG CGCGGCGCAA AGTGACGCCG AGGGCCTGAG 5(

TGCTCCAGTA GCCACCGCAT CTGGAGAACC AGCGGTTACC ATG GAG 96
                                               Met Glu
                                                 1

GGG ATC AGT ATA TAC ACT TCA GAT AAC TAC ACC GAG GAA 135
Gly Ile Ser Ile Tyr Thr Ser Asp Asn Tyr Thr Glu Glu
          5                  10                  15

ATG GGC TCA GGG GAC TAT GAC TCC ATG AAG GAA CCC TGT 174
Met Gly Ser Gly Asp Tyr Asp Ser Met Lys Glu Pro Cys
                 20                  25

TTC CGT GAA GAA AAT GCT AAT TTC AAT AAA ATC TTC CTG 213
Phe Arg Glu Glu Asn Ala Asn Phe Asn Lys Ile Phe Leu
     30                  35                  40

CCC ACC ATC TAC TCC ATC ATC TTC TTA ACT GGC ATT GTG 252
Pro Thr Ile Tyr Ser Ile Ile Phe Leu Thr Gly Ile Val
             45                  50

GGC AAT GGA TTG GTC ATC CTG GTC ATG GGT TAC CAG AAG 291
Gly Asn Gly Leu Val Ile Leu Val Met Gly Tyr Gln Lys
 55                  60                  65

AAA CTG AGA AGC ATG ACG GAC AAG TAC AGG CTG CAC CTG 330
Lys Leu Arg Ser Met Thr Asp Lys Tyr Arg Leu His Leu
         70                  75                  80

TCA GTG GCC GAC CTC CTC TTT GTC ATC ACG CTT CCC TTC 369
Ser Val Ala Asp Leu Leu Phe Val Ile Thr Leu Pro Phe
                 85                  90
```

```
TGG GCA GTT GAT GCC GTG GCA AAC TGG TAC TTT GGG AAC 408
Trp Ala Val Asp Ala Val Ala Asn Trp Tyr Phe Gly Asn
 95                  100                 105

TTC CTA TGC AAG GCA GTC CAT GTC ATC TAC ACA GTC AAC 447
Phe Leu Cys Lys Ala Val His Val Ile Tyr Thr Val Asn

CTC TAC AGC AGT GTC CTC ATC CTG GCC TTC ATC AGT CTG 486
Leu Tyr Ser Ser Val Leu Ile Leu Ala Phe Ile Ser Leu
120                 125                 130

GAC CGC TAC CTG GCC ATC GTC CAC GCC ACC AAC AGT CAG 525
Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Val His Ala Thr Asn Ser Gln
        135                 140                 145

AGG CCA AGG AAG CTG TTG GCT GAA AAG GTG GTC TAT GTT 564
Arg Pro Arg Lys Leu Leu Ala Glu Lys Val Val Tyr Val
            150                 155

GGC GTC TGG ATC CCT GCC CTC CTG CTG ACT ATT CCC GAC 603
Gly Val Trp Ile Pro Ala Leu Leu Leu Thr Ile Pro Asp
    160                 165                 170

TTC ATC TTT GCC AAC GTC AGT GAG GCA GAT GAC AGA TAT 642
Phe Ile Phe Ala Asn Val Ser Glu Ala Asp Asp Arg Tyr
            175                 180

ATC TGT GAC CGC TTC TAC CCC AAT GAC TTG TGG GTG GTT 681
Ile Cys Asp Arg Phe Tyr Pro Asn Asp Leu Trp Val Val
185                 190                 195

GTG TTC CAG TTT CAG CAC ATC ATG GTT GGC CTT ATC CTG 720
Val Phe Gln Phe Gln His Ile Met Val Gly Leu Ile Leu
        200                 205                 210

CCT GGT ATT GTC ATC CTG TCC TGC TAT TGC ATT ATC ATC 759
Pro Gly Ile Val Ile Leu Ser Cys Tyr Cys Ile Ile Ile
                215                 220

TCC AAG CTG TCA CAC TCC AAG GGC CAC CAG AAG CGC AAG 798
Ser Lys Leu Ser His Ser Lys Gly His Gln Lys Arg Lys
    225                 230                 235

GCC CTC AAG ACC ACA GTC ATC CTC ATC CTG GCT TTC TTC 837
Ala Leu Lys Thr Thr Val Ile Leu Ile Leu Ala Phe Phe
            240                 245

GCC TGT TGG CTG CCT TAC TAC ATT GGG ATC AGC ATC GAC 876
Ala Cys Trp Leu Pro Tyr Tyr Ile Gly Ile Ser Ile Asp
250                 255                 260

TCC TTC ATC CTC CTG GAA ATC ATC AAG CAA GGG TGT GAG 915
Ser Phe Ile Leu Leu Glu Ile Ile Lys Gln Gly Cys Glu
        265                 270                 275

TTT GAG AAC ACT GTG CAC AAG TGG ATT TCC ATC ACC GAG 954
Phe Glu Asn Thr Val His Lys Trp Ile Ser Ile Thr Glu
                280                 285

GCC CTA GCT TTC TTC CAC TGT TGT CTG AAC CCC ATC CTC 993
Ala Leu Ala Phe Phe His Cys Cys Leu Asn Pro Ile Leu
    290                 295                 300

TAT GCT TTC CTT GGA GCC AAA TTT AAA ACC TCT GCC CAG 1032
Tyr Ala Phe Leu Gly Ala Lys Phe Lys Thr Ser Ala Gln
            305                 310

CAC GCA CTC ACC TCT GTG AGC AGA GGG TCC AGC CTC AAG 1071
His Ala Leu Thr Ser Val Ser Arg Gly Ser Ser Leu Lys
315                 320                 325
```

```
ATC CTC TCC AAA GGA AAG CGA GGT GGA CAT TCA TCT GTT 1110
Ile Leu Ser Lys Gly Lys Arg Gly Gly His Ser Ser Val

TCC ACT GAG TCT GAG TCT TCA AGT TTT CAC TCC AGC TAAC 1150
Ser Thr Glu Ser Glu Ser Ser Ser Phe His Ser Ser
                345                 350     352

ACAGATGTAA AAGACTTTTT TTTATACGAT AAATAACTTT TTTTTAAGTT 1200

ACACATTTTT CAGATATAAA AGACTGACCA ATATTGTACA GTTTTTATTG 1250

CTTGTTGGAT TTTTGTCTTG TGTTTCTTTA GTTTTTGTGA AGTTTAATTG 1300

ACTTATTTAT ATAAATTTTT TTTGTTTCAT ATTGATGTGT GTCTAGGCAG 1350

GACCTGTGGC CAAGTTCTTA GTTGCTGTAT GTCTCGTGGT AGGACTGTAG 1400

AAAAGGGAAC TGAACATTCC AGAGCGTGTA GTGAATCACG TAAAGCTAGA 1450

AATGATCCCC AGCTGTTTAT GCATAGATAA TCTCTCCATT CCCGTGGAAC 1500

GTTTTTCCTG TTCTTAAGAC GTGATTTTGC TGTAGAAGAT GGCACTTATA 1550

ACCAAAGCCC AAAGTGGTAT AGAAATGCTG GTTTTTCAGT TTTCAGGAGT 1600

GGGTTGATTT CAGCACCTAC AGTGTACAGT CTTGTATTAA GTTGTTAATA 1650

AAAGTACATG TTAAACTTAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA 1700

AAAAAAAAAA AAAGCGGCCG CCAGCACACT GGAATTC 1737
```

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ.-ID Nr. 3:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 1679 Basen

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANGEIGENSCHAFT: einfach

(D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID Nr. 3:

```
GAATTCCAGT GTGCTGGCGG CCGCCCAGTG TGCTGGCGGC GGCAGTTGAG 50

GGAAAGGACA GAGGTTATGA GTGCCTGCAA GAGTGGCAGC CTGGAGTAGA 100

GAAAACACTA AAGGTGGAGT CAAAAGACCT GAGTTCAAGT CCCAGCTCTG 150

CCACTGGTTA GCTGTGGGAT CTCGGAAAAG ACCCAGTGAA AAAAAAAAAA 200
```

```
AAAGTGATGA GTTGTGAGGC AGGTCGCGGC CCTACTGCCT CAGGAGACGA 250

TGCGCAGCTC ATTTGCTTAA ATTTGCAGCT GACGGCTGCC ACCTCTCTAG 300

AGGCACCTGG CGGGGAGCCT CTCAACATAA GACAGTGACC AGTCTGGTGA 350

CTCACAGCCG GCACAGCC ATG AAC TAC CCG CTA ACG CTG GAA 392
                     Met Asn Tyr Pro Leu Thr Leu Glu
                       1               5

ATG GAC CTC GAG AAC CTG GAG GAC CTG TTC TGG GAA CTG 431
Met Asp Leu Glu Asn Leu Glu Asp Leu Phe Trp Glu Leu
     10                  15                  20

GAC AGA TTG GAC AAC TAT AAC GAC ACC TCC CTG GTG GAA 470
Asp Arg Leu Asp Asn Tyr Asn Asp Thr Ser Leu Val Glu
               25                  30

AAT CAT CTC TGC CCT GCC ACA GAG GGG CCC CTC ATG GCC 509
Asn His Leu Cys Pro Ala Thr Glu Gly Pro Leu Met Ala
 35                  40                  45

TCC TTC AAG GCC GTG TTC GTG CCC GTG GCC TAC AGC CTC 548
Ser Phe Lys Ala Val Phe Val Pro Val Ala Tyr Ser Leu
         50                  55                  60

ATC TTC CTC CTG GGC GTG ATC GGC AAC GTC CTG GTG CTG 587
Ile Phe Leu Leu Gly Val Ile Gly Asn Val Leu Val Leu
                 65                  70

GTG ATC CTG GAG CGG CAC CGG CAG ACA CGC AGT TCC ACG 626
Val Ile Leu Glu Arg His Arg Gln Thr Arg Ser Ser Thr
     75                  80                  85

GAG ACC TTC CTG TTC CAC CTG GCC GTG GCC GAC CTC CTG 665
Glu Thr Phe Leu Phe His Leu Ala Val Ala Asp Leu Leu
               90                  95

CTG GTC TTC ATC TTG CCC TTT GCC GTG GCC GAG GGC TCT 704
Leu Val Phe Ile Leu Pro Phe Ala Val Ala Glu Gly Ser
100                 105                 110

GTG GGC TGG GTC CTG GGG ACC TTC CTC TGC AAA ACT GTG 743
Val Gly Trp Val Leu Gly Thr Phe Leu Cys Lys Thr Val
         115                 120                 125

ATT GCC CTG CAC AAA GTC AAC TTC TAC TGC AGC AGC CTG 782
Ile Ala Leu His Lys Val Asn Phe Tyr Cys Ser Ser Leu
                 130                 135

CTC CTG GCC TGC ATC GCC GTG GAC CGC TAC CTG GCC ATT 821
Leu Leu Ala Cys Ile Ala Val Asp Arg Tyr Leu Ala Ile
    140                 145                 150

GTC CAC GCC GTC CAT GCC TAC CGC CAC CGC CGC CTC CTC 860
Val His Ala Val His Ala Tyr Arg His Arg Arg Leu Leu
             155                 160

TCC ATC CAC ATC ACC TGT GGG ACC ATC TGG CTG GTG GGC 899
Ser Ile His Ile Thr Cys Gly Thr Ile Trp Leu Val Gly
165                 170                 175

TTC CTC CTT GCC TTG CCA GAG ATT CTC TTC GCC AAA GTC 938
Phe Leu Leu Ala Leu Pro Glu Ile Leu Phe Ala Lys Val
         180                 185                 190
```

```
AGC CAA GGC CAT CAC AAC AAC TCC CTG CCA CGT TGC ACC 977
Ser Gln Gly His His Asn Asn Ser Leu Pro Arg Cys Thr

                195                 200

TTC TCC CAA GAG AAC CAA GCA GAA ACG CAT GCC TGG TTC 1016
Phe Ser Gln Glu Asn Gln Ala Glu Thr His Ala Trp Phe
    205                 210                 215

ACC TCC CGA TTC CTC TAC CAT GTG GCG GGA TTC CTG CTG 1055
Thr Ser Arg Phe Leu Tyr His Val Ala Gly Phe Leu Leu
            220                 225

CCC ATG CTG GTG ATG GGC TGG TGC TAC GTG GGG GTA GTG 1094
Pro Met Leu Val Met Gly Trp Cys Tyr Val Gly Val Val
230                 235                 240

CAC AGG TTG CGC CAG GCC CAG CGG CGC CCT CAG CGG CAG 1133
His Arg Leu Arg Gln Ala Gln Arg Arg Pro Gln Arg Gln
        245                 250                 255

AAG GCA GTC AGG GTG GCC ATC CTG GTG ACA AGC ATC TTC 1172
Lys Ala Val Arg Val Ala Ile Leu Val Thr Ser Ile Phe
                260                 265

TTC CTC TGC TGG TCA CCC TAC CAC ATC GTC ATC TTC CTG 1211
Phe Leu Cys Trp Ser Pro Tyr His Ile Val Ile Phe Leu
    270                 275                 280

GAC ACC CTG GCG AGG CTG AAG GCC GTG GAC AAT ACC TGC 1250
Asp Thr Leu Ala Arg Leu Lys Ala Val Asp Asn Thr Cys
            285                 290

AAG CTG AAT GGC TCT CTC CCC GTG GCC ATC ACC ATG TGT 1289
Lys Leu Asn Gly Ser Leu Pro Val Ala Ile Thr Met Cys
295                 300                 305

GAG TTC CTG GGC CTG GCC CAC TGC TGC CTC AAC CCC ATG 1328
Glu Phe Leu Gly Leu Ala His Cys Cys Leu Asn Pro Met
        310                 315                 320

CTC TAC ACT TTC GCC GGC GTG AAG TTC CGC AGT GAC CTG 1367
Leu Tyr Thr Phe Ala Gly Val Lys Phe Arg Ser Asp Leu
                325                 330

TCG CGG CTC CTG ACG AAG CTG GGC TGT ACC GGC CCT GCC 1406
Ser Arg Leu Leu Thr Lys Leu Gly Cys Thr Gly Pro Ala
    335                 340                 345

TCC CTG TGC CAG CTC TTC CCT AGC TGG CGC AGG AGC AGT 1445
Ser Leu Cys Gln Leu Phe Pro Ser Trp Arg Arg Ser Ser
            350                 355

CTC TCT GAG TCA GAG AAT GCC ACC TCT CTC ACC ACG TTC TA 1486
Leu Ser Glu Ser Glu Asn Ala Thr Ser Leu Thr Thr Phe
360                 365                 370     372

GGTC CCAGTGTCCC CTTTTATTGC TGCTTTTCCT TGGGGCAGGC 1530

AGTGATGCTG GATGCTCCTT CCAACAGGAG CTGGGATCCT AAGGGCTCAC 1580

CGTGGCTAAG AGTGTCCTAG GAGTATCCTC ATTTGGGGTA GCTAGAGGAA 1630

CCAACCCCCA TTTCTAGAAC ATCCCGCGGC CGCCAGCACA CTGGAATTC 1679
```

Patentansprüche

1. Isoliertes Blutplättchen-Faktor-4-Überfamilien-Rezeptor-(PF4AR-)Polypeptid mit zumindest 85%iger Aminosäuresequenz-Homologie mit der translatierten Aminosäuresequenz aus **Fig.** 2.

2. PF4AR-Polypeptid nach Anspruch 1, welches das Polypeptid aus **Fig.** 2 umfasst.

3. Isoliertes Polypeptid, welches das PF4AR-Polypeptid nach einem der vorangegangenen Ansprüche an ein Polypeptid fusioniert umfasst, das zum PF4AR-Polypeptid heterolog ist.

4. PF4AR-Polypeptid nach einem der vorangegangenen Ansprüche, worin das Polypeptid IL-8 bindet, ohne sich an f-Met-Leu-Phe zu binden oder darauf anzusprechen.

5. PF4AR-Polypeptid nach einem der vorangegangenen Ansprüche, das ein humanes ist.

6. Isoliertes Nucleinsäuremolekül, das eine Nucleinsäuresequenz umfasst, die für das PF4AR-Polypeptid nach einem der Ansprüche 1 bis 5 kodiert.

7. Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 6, das DNA ist und die in **Fig.** 2 gezeigte translatierte DNA-Sequenz aufweist.

8. Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 6 oder Anspruch 7, das weiters einen Promotor umfasst, der an die für das PF4AR-Polypeptid kodierende Nucleinsäuresequenz operabel gebunden ist.

9. Expressionsvektor, der die Nucleinsäuresequenz nach einem der Ansprüche 6 bis 7 operabel an Kontrollsequenzen gebunden umfasst, die von einer mit dem Vektor transformierten Wirtszelle erkannt werden.

10. Mit dem Vektor nach Anspruch 9 transformierte Wirtszelle.

11. Verfahren zur Verwendung eines Nucleinsäuremoleküls, das eine für das PF4AR-Polypeptid nach einem der Ansprüche 1 bis 5 kodierende Nucleinsäuresequenz enthält, umfassend das Exprimieren des Nucleinsäuremoleküls in einer kultivierten Wirtszelle, die mit einem Vektor transformiert ist, der die Nucleinsäuresequenz umfasst, die für das PF4AR-Polypeptid kodiert und an Kontrollsequenzen operabel gebunden ist, die von der mit dem Vektor transformierten Wirtszelle erkannt werden, wodurch das PF4AR-Polypeptid produziert wird, sowie das Gewinnen des PF4AR-Polypeptids aus der Wirtszelle.

12. Verfahren nach Anspruch 11, worin das PF4AR-Polypeptid aus den Wirtszellmembranen gewonnen wird.

13. Monoklonaler Antikörper, der fähig ist, das PF4AR-Polypeptid nach Anspruch 1 spezifisch zu binden.

14. Monoklonaler Antikörper, der fähig ist, das PF4AR-Polypeptid aus **Fig.** 2 spezifisch zu binden.

15. Monoklonaler Antikörper nach Anspruch 14, der fähig ist, eine N-terminale extrazelluläre Region des PF4AR-Polypeptids spezifisch zu binden.

16. Zusammensetzung, die den monoklonalen Antikörper nach einem der Ansprüche 13 bis 15 und einen pharmazeutisch annehmbaren Träger umfasst.

17. Monoklonaler Antikörper nach einem der Ansprüche 13 bis 15 zur Verwendung bei der Therapie oder Diagnose.

18. Isoliertes Blutplättchen-Faktor-4-Überfamilien-Rezeptor-(PF4AR-)Polypeptid mit zumindest 85%iger Aminosäuresequenz-Homologie mit der translatierten Aminosäuresequenz aus **Fig.** 4 oder **Fig.** 5.

19. Isoliertes PF4AR-Polypeptid, worin die Nucleinsäure, die für das PF4AR-Polypeptid kodiert, unter hochstringenten Bedingungen mit dem Komplement der für das Polypeptid aus **Fig.** 4 oder 5 kodierenden Nucleinsäure hybridisiert.

20. Isoliertes PF4AR-Polypeptid, das eine Aminosäuresequenz mit einer Länge von zumindest 10 Resten umfasst, die in einer extrazellulären Region des Polypeptids aus **Fig.** 4 oder 5 enthalten ist und fähig ist, einen Antikörper hervorzubringen, der mit dem Polypeptid aus **Fig.** 4 oder 5 kreuzreagiert.

21. PF4AR-Polypeptid nach Anspruch 20, worin die extrazelluläre Region die N-terminale extrazelluläre Region aus **Fig.** 4 oder 5 ist.

22. Isoliertes Polypeptid, welches das PF4AR-Polypeptid nach einem der Ansprüche 18 bis 21 an ein Polypeptid fusioniert umfasst, das zum PF4AR-Polypeptid heterolog ist.

23. Isoliertes Nucleinsäuremolekül, das eine Nucleinsäuresequenz umfasst, die für das PF4AR-Polypeptid nach einem der Ansprüche 18 bis 22 kodiert.

24. Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 23, das DNA ist und die in **Fig.** 4 oder **Fig.** 5 gezeigte translatierte DNA-Sequenz aufweist.

25. Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 23 oder Anspruch 24, das weiters einen Promotor umfasst, der an die für das PF4AR-Polypeptid kodierende Nucleinsäuresequenz operabel gebunden ist.

26. Expressionsvektor, der die Nucleinsäuresequenz nach einem der Ansprüche 23 bis 25 operabel an Kontrollsequenzen gebunden umfasst, die von einer mit dem Vektor transformierten Wirtszelle erkannt werden.

27. Mit dem Vektor nach Anspruch 26 transformierte Wirtszelle.

28. Verfahren zur Verwendung eines Nucleinsäuremoleküls, das eine für das PF4AR-Polypeptid nach einem der Ansprüche 18 bis 22 kodierende Nucleinsäuresequenz enthält, umfassend das Exprimieren des Nucleinsäuremoleküls in einer kultivierten Wirtszelle, die mit einem Vektor transformiert ist, der die Nucleinsäuresequenz umfasst, die für das PF4AR-Polypeptid kodiert und an Kontrollsequenzen operabel gebunden ist, die von der mit dem Vektor transformierten Wirtszelle erkannt werden, wodurch das PF4AR-Polypeptid produziert wird, sowie das Gewinnen des PF4AR-Polypeptids aus der Wirtszelle.

29. Verfahren nach Anspruch 28, worin das PF4AR-Polypeptid aus den Wirtszellmembranen gewonnen wird.

30. Monoklonaler Antikörper, der fähig ist, das PF4AR-Polypeptid nach einem der Ansprüche 18 bis 21 spezifisch zu binden.

31. Monoklonaler Antikörper nach Anspruch 30, der fähig ist, eine N-terminale extrazelluläre Region des PF4AR-Polypeptids spezifisch zu binden.

32. Monoklonaler Antikörper nach Anspruch 30 oder 31, der fähig ist, das PF4AR-Polypeptid aus **Fig.** 4 spezifisch zu binden.

Es folgen 28 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

FIG. 1a

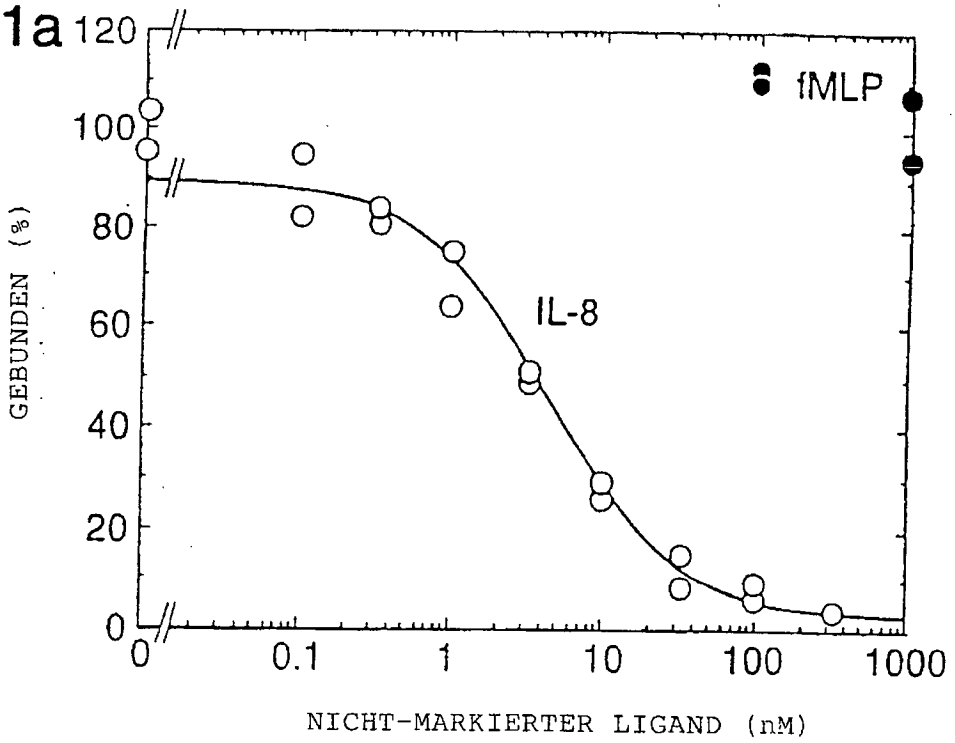
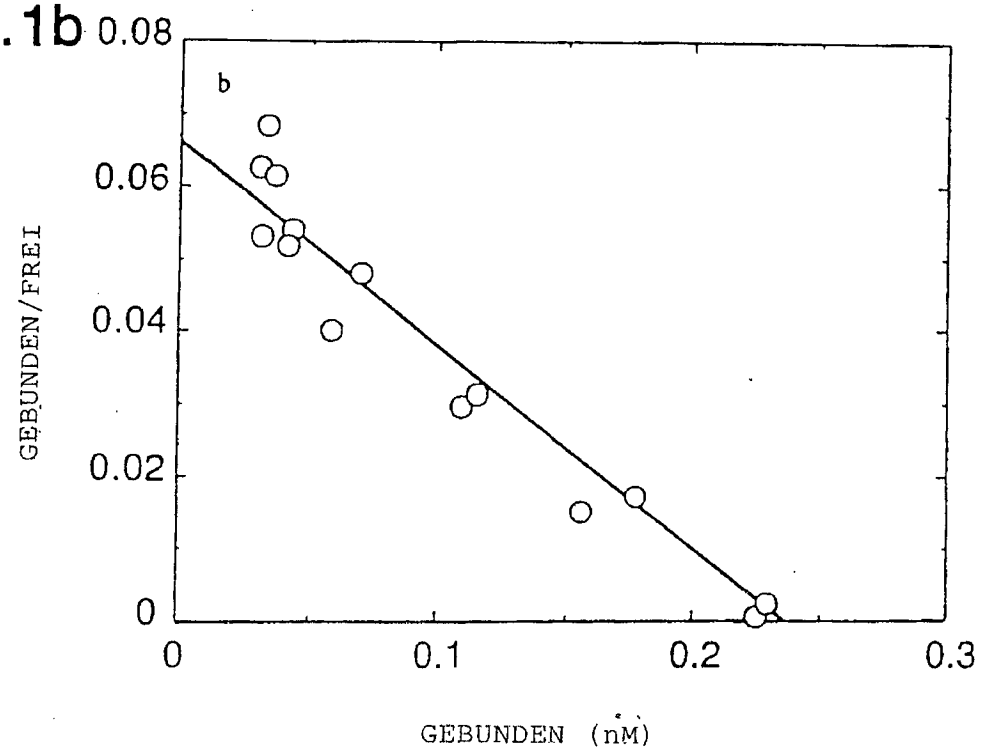


FIG. 1b



```
CCTGGCCGGT GCTTCAGTTA GATCAAACCA TTGCTGAAAC TGAAGAGGAC 50

     ATG TCA AAT ATT ACA GAT CCA CAG ATG TGG GAT TTT 86
     Met Ser Asn Ile Thr Asp Pro Gln Met Trp Asp Phe
       1               5                  10

GAT GAT CTA AAT TTC ACT GGC ATG CCA CCT GCA GAT GAA 125
Asp Asp Leu Asn Phe Thr Gly Met Pro Pro Ala Asp Glu
         15                  20                  25

GAT TAC AGC CCC TGT ATG CTA GAA ACT GAG ACA CTC AAC 164
Asp Tyr Ser Pro Cys Met Leu Glu Thr Glu Thr Leu Asn
                30                  35

AAG TAT GTT GTG ATC ATC GCC TAT GCC CTA GTG TTC CTG 203
Lys Tyr Val Val Ile Ile Ala Tyr Ala Leu Val Phe Leu
     40                  45                  50
```

FIG.2A-1

TM1

```
CTG AGC CTG CTG GGA AAC TCC CTG GTG ATG CTG GTC ATC 242
Leu Ser Leu Leu Gly Asn Ser Leu Val Met Leu Val Ile
                55                  60

TTA TAC AGC AGG GTC GGC CGC TCC GTC ACT GAT GTC TAC 281
Leu Tyr Ser Arg Val Gly Arg Ser Val Thr Asp Val Tyr
 65                  70                  75

                                        TM2
CTG CTG AAC CTG GCC TTG GCC GAC CTA CTC TTT GCC CTG 320
Leu Leu Asn Leu Ala Leu Ala Asp Leu Leu Phe Ala Leu
          80                  85                  90

ACC TTG CCC ATC TGG GCC GCC TCC AAG GTG AAT GGC TGG 359
Thr Leu Pro Ile Trp Ala Ala Ser Lys Val Asn Gly Trp
                95                  100
```

FIG.2A-2

```
ATT TTT GGC ACA TTC CTG TGC AAG GTG GTC TCA CTC CTG 398
Ile Phe Gly Thr Phe Leu Cys Lys Val Val Ser Leu Leu
    105                 110                 115
                                TM3
AAG GAA GTC AAC TTC TAC AGT GGC ATC CTG CTG TTG GCC 437
Lys Glu Val Asn Phe Tyr Ser Gly Ile Leu Leu Leu Ala
            120                 125

TGC ATC AGT GTG GAC CGT TAC CTG GCC ATT GTC CAT GCC 476
Cys Ile Ser Val Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Val His Ala
130                 135                 140

ACA CGC ACA CTG ACC CAG AAG CGT CAC TTG GTC AAG TTT 515
Thr Arg Thr Leu Thr Gln Lys Arg His Leu Val Lys Phe
        145                 150                 155
                                                TM4
GTT TGT CTT GGC TGC TGG GGA CTG TCT ATG AAT CTG TCC 554
Val Cys Leu Gly Cys Trp Gly Leu Ser Met Asn Leu Ser
                160                 165
```

FIG.2A-3

```
CTG CCC TTC TTC CTT TTC CGC CAG GCT TAC CAT CCA AAC 593
Leu Pro Phe Phe Leu Phe Arg Gln Ala Tyr His Pro Asn
    170                 175                 180

AAT TCC AGT CCA GTT TGC TAT GAG GTC CTG GGA AAT GAC 632
Asn Ser Ser Pro Val Cys Tyr Glu Val Leu Gly Asn Asp
            185                 190

ACA GCA AAA TGG CGG ATG GTG TTG CGG ATC CTG CCT CAC 671
Thr Ala Lys Trp Arg Met Val Leu Arg Ile Leu Pro His
195                 200                 205
                                    TM5
ACC TTT GGC TTC ATC GTG CCG CTG TTT GTC ATG CTG TTC 710
Thr Phe Gly Phe Ile Val Pro Leu Phe Val Met Leu Phe
        210                 215                 220
```

FIG.2B-1

```
TGC TAT GGA TTC ACC CTG CGT ACA CTG TTT AAG GCC CAC 749
Cys Tyr Gly Phe Thr Leu Arg Thr Leu Phe Lys Ala His
                    225                 230

ATG GGG CAG AAG CAC CGA GCC ATG AGG GTC ATC TTT GCT 788
Met Gly Gln Lys His Arg Ala Met Arg Val Ile Phe Ala
    235                 240                 245
                                      TM6
GTC GTC CTC ATC TTC CTG CTT TGC TGG CTG CCC TAC AAC 827
Val Val Leu Ile Phe Leu Leu Cys Trp Leu Pro Tyr Asn
                250                 255

CTG GTC CTG CTG GCA GAC ACC CTC ATG AGG ACC CAG GTG 866
Leu Val Leu Leu Ala Asp Thr Leu Met Arg Thr Gln Val
260                 265                 270

ATC CAG GAG ACC TGT GAG CGC CGC AAC AAC ATC GGC CGG 905
Ile Gln Glu Thr Cys Glu Arg Arg Asn Asn Ile Gly Arg
        275                 280                 285
```

FIG.2B-2

```
GCC CTG GAT GCC ACT GAG ATT CTG GGA TTT CTC CAT AGC 944
Ala Leu Asp Ala Thr Glu Ile Leu Gly Phe Leu His Ser
                    290                 295

                          TM7
TGC CTC AAC CCC ATC ATC TAC GCC TTC ATC GGC CAA AAT 983
Cys Leu Asn Pro Ile Ile Tyr Ala Phe Ile Gly Gln Asn
    300                 305                 310

TTT CGC CAT GGA TTC CTC AAG ATC CTG GCT ATG CAT GGC 1022
Phe Arg His Gly Phe Leu Lys Ile Leu Ala Met His Gly
            315                 320

CTG GTC AGC AAG GAG TTC TTG GCA CGT CAT CGT GTT ACC 1061
Leu Val Ser Lys Glu Phe Leu Ala Arg His Arg Val Thr
325                 330                 335

TCC TAC ACT TCT TCG TCT GTC AAT GTC TCT TCC AAC CTC  1100
Ser Tyr Thr Ser Ser Ser Val Asn Val Ser Ser Asn Leu
        340                 345                 350
```

FIG.2B-3

TGAAAACCAT CGATGAAGGA ATATCTCTTC TCAGAAGGAA AGAATAACCA 1150

ACACCCTGAG GTTGTGTGTG GAAGGTGATC TGGCTCTGGA CAGGCACTAT 1200

CTGGGTTTTG GGGGGACGCT ATAGGATGTG GGGAAGTTAG GAACTGGTGT 1250

CTTCAGGGGC CACACCAACC TTCTGAGGAG CTGTTGAGGT ACCTCCAAGG 1300

ACCGGCCTTT GCACCTCCAT GGAAACGAAG CACCATCATT CCCGTTGAAC 1350

GTCACATCTT TAACCCACTA ACTGGCTAAT TAGCATGGCC ACATCTGAGC 1400

CCCGAATCTG ACATTAGATG AGAGAACAGG GCTGAAGCTG TGTCCTCATG 1450

FIG.2C-1

AGGGCTGGAT GCTCTCGTTG ACCCTCACAG GAGCATCTCC TCAACTCTGA 1500

GTGTTAAGCG TTGAGCCACC AAGCTGGTGG CTCTGTGTGC TCTGATCCGA 1550

GCTCAGGGGG GTGGTTTTCC CATCTCAGGT GTGTTGCAGT GTCTGCTGGA 1600

GACATTGAGG CAGGCACTGC CAAAACATCA ACCTGCCAGC TGGCCTTGTG 1650

AGGAGCTGGA AACACATGTT CCCCTTGGGG GTGGTGGATG AACAAAGAGA 1700

AAGAGGGTTT GGAAGCCAGA TCTATGCCAC AAGAACCCCC TTTACCCCCA 1750

FIG.2C-2

DE 692 31 223 T3 2008.01.17

TGACCAACAT CGCAGACACA TGTGCTGGCC ACCTGCTGAG CCCCAAGTGG 1800

AACGAGACAA GCAGCCCTTA GCCCTTCCCC TCTGCAGCTT CCAGGCTGGC 1850

GTGCAGCATC AGCATCCCTA GAAAGCCATG TGCAGCCACC AGTCCATTGG 1900

GCAGGCAGAT GTTCCTAATA AAGCTTCTGT TCC 1933

FIG.2C-3

DE 692 31 223 T3 2008.01.17

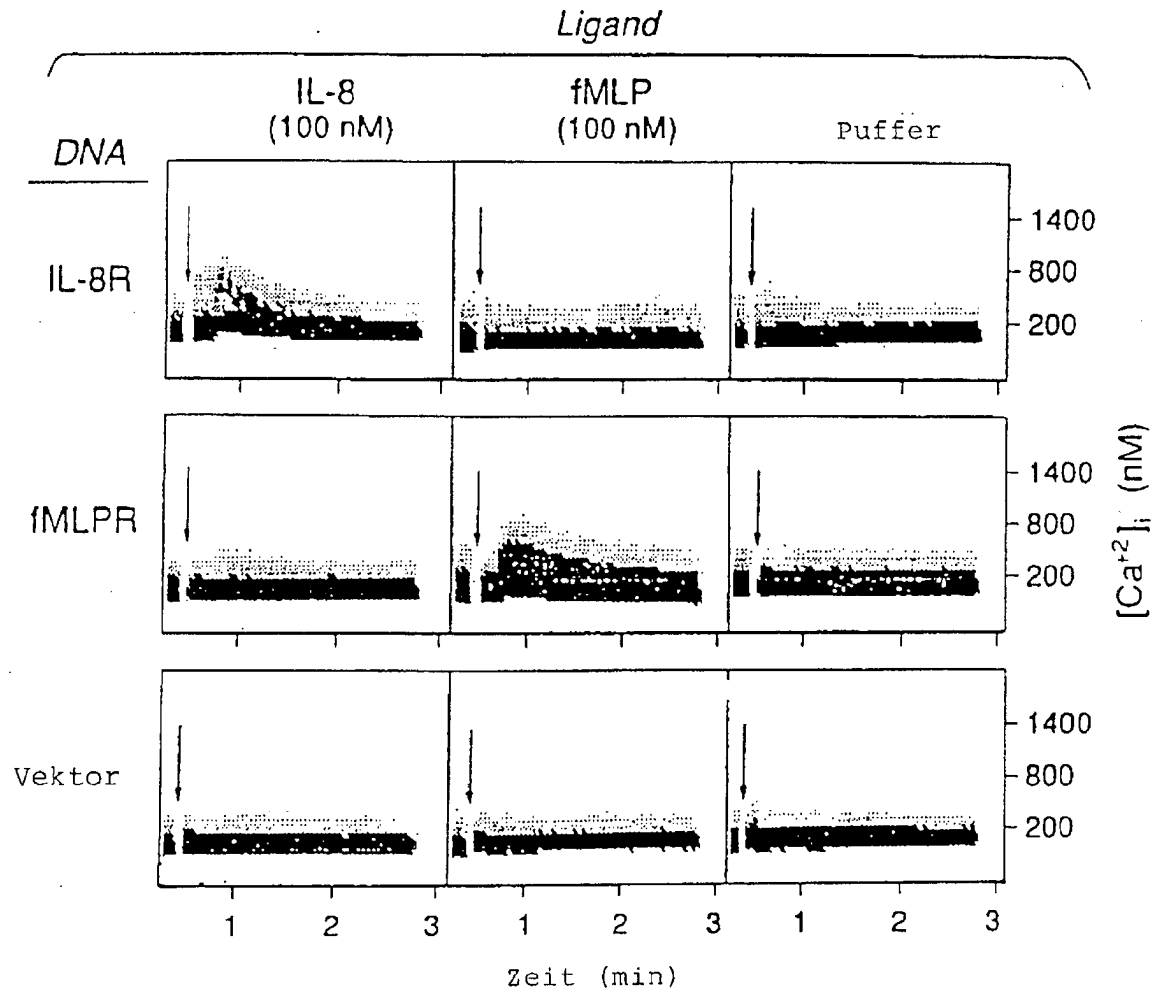

Ligand
IL-8
(100 nM)
fMLP
(100 nM)
Puffer
DNA
IL-8R
fMLPR
Vektor
1400
800
200
[Ca+2]i (nM)
1
2
3
Zeit (min)

FIG.3a

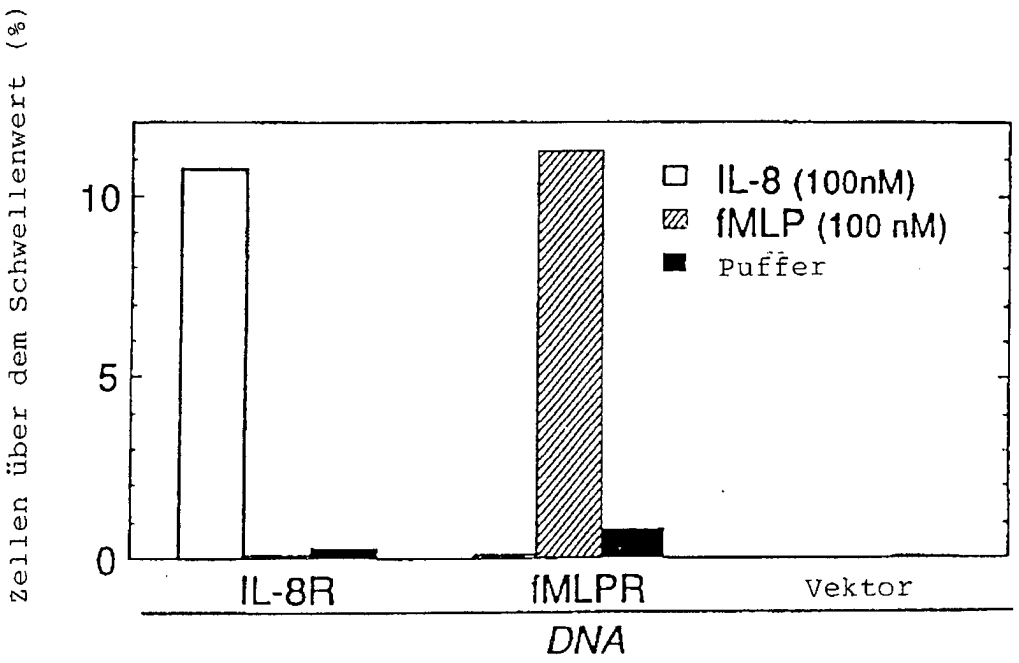

Zellen über dem Schwellenwert (%)
10
5
0
IL-8 (100nM)
fMLP (100 nM)
Puffer
IL-8R
fMLPR
Vektor
DNA

FIG.3b

```
GAATTCCAGT GTGCTGGCGG CGCGGCGCAA AGTGACGCCG AGGGCCTGAG 50


TGCTCCAGTA GCCACCGCAT CTGGAGAACC AGCGGTTACC ATG GAG 96
                                           Met Glu
                                             1

GGG ATC AGT ATA TAC ACT TCA GAT AAC TAC ACC GAG GAA 135
Gly Ile Ser Ile Tyr Thr Ser Asp Asn Tyr Thr Glu Glu
          5                  10                  15

ATG GGC TCA GGG GAC TAT GAC TCC ATG AAG GAA CCC TGT 174
Met Gly Ser Gly Asp Tyr Asp Ser Met Lys Glu Pro Cys
                  20                  25

TTC CGT GAA GAA AAT GCT AAT TTC AAT AAA ATC TTC CTG 213
Phe Arg Glu Glu Asn Ala Asn Phe Asn Lys Ile Phe Leu
     30                  35                  40

CCC ACC ATC TAC TCC ATC ATC TTC TTA ACT GGC ATT GTG 252
Pro Thr Ile Tyr Ser Ile Ile Phe Leu Thr Gly Ile Val
                45                  50
```

FIG.4A-1

```
GGC AAT GGA TTG GTC ATC CTG GTC ATG GGT TAC CAG AAG 291
Gly Asn Gly Leu Val Ile Leu Val Met Gly Tyr Gln Lys
 55                  60                  65

AAA CTG AGA AGC ATG ACG GAC AAG TAC AGG CTG CAC CTG 330
Lys Leu Arg Ser Met Thr Asp Lys Tyr Arg Leu His Leu
         70                  75                  80

TCA GTG GCC GAC CTC CTC TTT GTC ATC ACG CTT CCC TTC 369
Ser Val Ala Asp Leu Leu Phe Val Ile Thr Leu Pro Phe
                 85                  90

TGG GCA GTT GAT GCC GTG GCA AAC TGG TAC TTT GGG AAC 408
Trp Ala Val Asp Ala Val Ala Asn Trp Tyr Phe Gly Asn
     95                  100                 105
```

FIG.4A-2

```
TTC CTA TGC AAG GCA GTC CAT GTC ATC TAC ACA GTC AAC 447
Phe Leu Cys Lys Ala Val His Val Ile Tyr Thr Val Asn
            110                 115

CTC TAC AGC AGT GTC CTC ATC CTG GCC TTC ATC AGT CTG 486
Leu Tyr Ser Ser Val Leu Ile Leu Ala Phe Ile Ser Leu
120                 125                 130

GAC CGC TAC CTG GCC ATC GTC CAC GCC ACC AAC AGT CAG 525
Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Val His Ala Thr Asn Ser Gln
        135                 140                 145

AGG CCA AGG AAG CTG TTG GCT GAA AAG GTG GTC TAT GTT 564
Arg Pro Arg Lys Leu Leu Ala Glu Lys Val Val Tyr Val
                150                 155

GGC GTC TGG ATC CCT GCC CTC CTG CTG ACT ATT CCC GAC 603
Gly Val Trp Ile Pro Ala Leu Leu Leu Thr Ile Pro Asp
    160                 165                 170
```

FIG.4A-3

```
TTC ATC TTT GCC AAC GTC AGT GAG GCA GAT GAC AGA TAT 642
Phe Ile Phe Ala Asn Val Ser Glu Ala Asp Asp Arg Tyr
            175                 180

ATC TGT GAC CGC TTC TAC CCC AAT GAC TTG TGG GTG GTT 681
Ile Cys Asp Arg Phe Tyr Pro Asn Asp Leu Trp Val Val
185                 190                 195

GTG TTC CAG TTT CAG CAC ATC ATG GTT GGC CTT ATC CTG 720
Val Phe Gln Phe Gln His Ile Met Val Gly Leu Ile Leu
        200                 205                 210

CCT GGT ATT GTC ATC CTG TCC TGC TAT TGC ATT ATC ATC 759
Pro Gly Ile Val Ile Leu Ser Cys Tyr Cys Ile Ile Ile
                215                 220

TCC AAG CTG TCA CAC TCC AAG GGC CAC CAG AAG CGC AAG 798
Ser Lys Leu Ser His Ser Lys Gly His Gln Lys Arg Lys
    225                 230                 235
```

FIG.4B-1

DE 692 31 223 T3 2008.01.17

```
GCC CTC AAG ACC ACA GTC ATC CTC ATC CTG GCT TTC TTC 837
Ala Leu Lys Thr Thr Val Ile Leu Ile Leu Ala Phe Phe
            240                 245

GCC TGT TGG CTG CCT TAC TAC ATT GGG ATC AGC ATC GAC 876
Ala Cys Trp Leu Pro Tyr Tyr Ile Gly Ile Ser Ile Asp
250                 255                 260

TCC TTC ATC CTC CTG GAA ATC ATC AAG CAA GGG TGT GAG 915
Ser Phe Ile Leu Leu Glu Ile Ile Lys Gln Gly Cys Glu
        265                 270                 275

TTT GAG AAC ACT GTG CAC AAG TGG ATT TCC ATC ACC GAG 954
Phe Glu Asn Thr Val His Lys Trp Ile Ser Ile Thr Glu
                280                 285

GCC CTA GCT TTC TTC CAC TGT TGT CTG AAC CCC ATC CTC 993
Ala Leu Ala Phe Phe His Cys Cys Leu Asn Pro Ile Leu
    290                 295                 300
```

FIG.4B-2

DE 692 31 223 T3 2008.01.17

```
TAT GCT TTC CTT GGA GCC AAA TTT AAA ACC TCT GCC CAG 1032
Tyr Ala Phe Leu Gly Ala Lys Phe Lys Thr Ser Ala Gln
            305                 310

CAC GCA CTC ACC TCT GTG AGC AGA GGG TCC AGC CTC AAG 1071
His Ala Leu Thr Ser Val Ser Arg Gly Ser Ser Leu Lys
315                 320                 325

ATC CTC TCC AAA GGA AAG CGA GGT GGA CAT TCA TCT GTT 1110
Ile Leu Ser Lys Gly Lys Arg Gly Gly His Ser Ser Val
        330                 335                 340

TCC ACT GAG TCT GAG TCT TCA AGT TTT CAC TCC AGC TAAC 1150
Ser Thr Glu Ser Glu Ser Ser Ser Phe His Ser Ser
                345                 350     352

ACAGATGTAA AAGACTTTTT TTTATACGAT AAATAACTTT TTTTTAAGTT 1200
```

FIG.4B-3

ACACATTTTT CAGATATAAA AGACTGACCA ATATTGTACA GTTTTTATTG 1250

CTTGTTGGAT TTTTGTCTTG TGTTTCTTTA GTTTTTGTGA AGTTTAATTG 1300

ACTTATTTAT ATAAATTTTT TTTGTTTCAT ATTGATGTGT GTCTAGGCAG 1350

GACCTGTGGC CAAGTTCTTA GTTGCTGTAT GTCTCGTGGT AGGACTGTAG 1400

AAAAGGGAAC TGAACATTCC AGAGCGTGTA GTGAATCACG TAAAGCTAGA 1450

AATGATCCCC AGCTGTTTAT GCATAGATAA TCTCTCCATT CCCGTGGAAC 1500

FIG.4C-1

GTTTTTCCTG TTCTTAAGAC GTGATTTTGC TGTAGAAGAT GGCACTTATA 1550

ACCAAAGCCC AAAGTGGTAT AGAAATGCTG GTTTTTCAGT TTTCAGGAGT 1600

GGGTTGATTT CAGCACCTAC AGTGTACAGT CTTGTATTAA GTTGTTAATA 1650

AAAGTACATG TTAAACTTAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA 1700

AAAAAAAAAA AAAGCGGCCG CCAGCACACT GGAATTC 1737

FIG.4C-2

GAATTCCAGT GTGCTGGCGG CCGCCCAGTG TGCTGGCGGC GGCAGTTGAG 50

GGAAAGGACA GAGGTTATGA GTGCCTGCAA GAGTGGCAGC CTGGAGTAGA 100

GAAAACACTA AAGGTGGAGT CAAAAGACCT GAGTTCAAGT CCCAGCTCTG 150

CCACTGGTTA GCTGTGGGAT CTCGGAAAAG ACCCAGTGAA AAAAAAAAAA 200

AAAGTGATGA GTTGTGAGGC AGGTCGCGGC CCTACTGCCT CAGGAGACGA 250

TGCGCAGCTC ATTTGCTTAA ATTTGCAGCT GACGGCTGCC ACCTCTCTAG 300

FIG.5A-1

```
AGGCACCTGG CGGGGAGCCT CTCAACATAA GACAGTGACC AGTCTGGTGA 350


CTCACAGCCG GCACAGCC ATG AAC TAC CCG CTA ACG CTG GAA 392
                    Met Asn Tyr Pro Leu Thr Leu Glu
                      1               5

ATG GAC CTC GAG AAC CTG GAG GAC CTG TTC TGG GAA CTG 431
Met Asp Leu Glu Asn Leu Glu Asp Leu Phe Trp Glu Leu
     10                  15                  20

GAC AGA TTG GAC AAC TAT AAC GAC ACC TCC CTG GTG GAA 470
Asp Arg Leu Asp Asn Tyr Asn Asp Thr Ser Leu Val Glu
               25                  30

AAT CAT CTC TGC CCT GCC ACA GAG GGG CCC CTC ATG GCC 509
Asn His Leu Cys Pro Ala Thr Glu Gly Pro Leu Met Ala
 35                  40                  45
```

FIG.5A-2

```
TCC TTC AAG GCC GTG TTC GTG CCC GTG GCC TAC AGC CTC 548
Ser Phe Lys Ala Val Phe Val Pro Val Ala Tyr Ser Leu
          50                  55                  60

ATC TTC CTC CTG GGC GTG ATC GGC AAC GTC CTG GTG CTG 587
Ile Phe Leu Leu Gly Val Ile Gly Asn Val Leu Val Leu
                  65                  70

GTG ATC CTG GAG CGG CAC CGG CAG ACA CGC AGT TCC ACG 626
Val Ile Leu Glu Arg His Arg Gln Thr Arg Ser Ser Thr
     75                  80                  85

GAG ACC TTC CTG TTC CAC CTG GCC GTG GCC GAC CTC CTG 665
Glu Thr Phe Leu Phe His Leu Ala Val Ala Asp Leu Leu
             90                  95

CTG GTC TTC ATC TTG CCC TTT GCC GTG GCC GAG GGC TCT 704
Leu Val Phe Ile Leu Pro Phe Ala Val Ala Glu Gly Ser
100                 105                 110
```

FIG.5A-3

DE 692 31 223 T3 2008.01.17

```
GTG GGC TGG GTC CTG GGG ACC TTC CTC TGC AAA ACT GTG 743
Val Gly Trp Val Leu Gly Thr Phe Leu Cys Lys Thr Val
        115                 120                 125

ATT GCC CTG CAC AAA GTC AAC TTC TAC TGC AGC AGC CTG 782
Ile Ala Leu His Lys Val Asn Phe Tyr Cys Ser Ser Leu
                130                 135

CTC CTG GCC TGC ATC GCC GTG GAC CGC TAC CTG GCC ATT 821
Leu Leu Ala Cys Ile Ala Val Asp Arg Tyr Leu Ala Ile
    140                 145                 150

GTC CAC GCC GTC CAT GCC TAC CGC CAC CGC CGC CTC CTC 860
Val His Ala Val His Ala Tyr Arg His Arg Arg Leu Leu
            155                 160

TCC ATC CAC ATC ACC TGT GGG ACC ATC TGG CTG GTG GGC 899
Ser Ile His Ile Thr Cys Gly Thr Ile Trp Leu Val Gly
165                 170                 175
```

FIG.5B-1

DE 692 31 223 T3 2008.01.17

```
TTC CTC CTT GCC TTG CCA GAG ATT CTC TTC GCC AAA GTC 938
Phe Leu Leu Ala Leu Pro Glu Ile Leu Phe Ala Lys Val
        180                 185                 190

AGC CAA GGC CAT CAC AAC AAC TCC CTG CCA CGT TGC ACC 977
Ser Gln Gly His His Asn Asn Ser Leu Pro Arg Cys Thr
                195                 200

TTC TCC CAA GAG AAC CAA GCA GAA ACG CAT GCC TGG TTC 1016
Phe Ser Gln Glu Asn Gln Ala Glu Thr His Ala Trp Phe
    205                 210                 215

ACC TCC CGA TTC CTC TAC CAT GTG GCG GGA TTC CTG CTG 1055
Thr Ser Arg Phe Leu Tyr His Val Ala Gly Phe Leu Leu
            220                 225

CCC ATG CTG GTG ATG GGC TGG TGC TAC GTG GGG GTA GTG 1094
Pro Met Leu Val Met Gly Trp Cys Tyr Val Gly Val Val
230                 235                 240
```

FIG.5B-2

DE 692 31 223 T3 2008.01.17

```
CAC AGG TTG CGC CAG GCC CAG CGG CGC CCT CAG CGG CAG 1133
His Arg Leu Arg Gln Ala Gln Arg Arg Pro Gln Arg Gln
        245                 250                 255

AAG GCA GTC AGG GTG GCC ATC CTG GTG ACA AGC ATC TTC 1172
Lys Ala Val Arg Val Ala Ile Leu Val Thr Ser Ile Phe
                260                 265

TTC CTC TGC TGG TCA CCC TAC CAC ATC GTC ATC TTC CTG 1211
Phe Leu Cys Trp Ser Pro Tyr His Ile Val Ile Phe Leu
    270                 275                 280

GAC ACC CTG GCG AGG CTG AAG GCC GTG GAC AAT ACC TGC 1250
Asp Thr Leu Ala Arg Leu Lys Ala Val Asp Asn Thr Cys
            285                 290
```

FIG.5B-3

DE 692 31 223 T3 2008.01.17

FIG.5C-1

```
AAG CTG AAT GGC TCT CTC CCC GTG GCC ATC ACC ATG TGT 1289
Lys Leu Asn Gly Ser Leu Pro Val Ala Ile Thr Met Cys
295                 300                 305

GAG TTC CTG GGC CTG GCC CAC TGC TGC CTC AAC CCC ATG 1328
Glu Phe Leu Gly Leu Ala His Cys Cys Leu Asn Pro Met
        310                 315                 320

CTC TAC ACT TTC GCC GGC GTG AAG TTC CGC AGT GAC CTG 1367
Leu Tyr Thr Phe Ala Gly Val Lys Phe Arg Ser Asp Leu
                325                 330

TCG CGG CTC CTG ACG AAG CTG GGC TGT ACC GGC CCT GCC 1406
Ser Arg Leu Leu Thr Lys Leu Gly Cys Thr Gly Pro Ala
    335                 340                 345

TCC CTG TGC CAG CTC TTC CCT AGC TGG CGC AGG AGC AGT 1445
Ser Leu Cys Gln Leu Phe Pro Ser Trp Arg Arg Ser Ser
            350                 355
```


DE 692 31 223 T3 2008.01.17

```
CTC TCT GAG TCA GAG AAT GCC ACC TCT CTC ACC ACG TTC TA 1486
Leu Ser Glu Ser Glu Asn Ala Thr Ser Leu Thr Thr Phe
360                 365                 370     372

GGTC CCAGTGTCCC CTTTTATTGC TGCTTTTCCT TGGGGCAGGC 1530


AGTGATGCTG GATGCTCCTT CCAACAGGAG CTGGGATCCT AAGGGCTCAC 1580


CGTGGCTAAG AGTGTCCTAG GAGTATCCTC ATTTGGGGTA GCTAGAGGAA 1630


CCAACCCCCA TTTCTAGAAC ATCCCGCGGC CGCCAGCACA CTGGAATTC 1679
```

FIG.5C-2