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

(10) **DE 694 33 648 T2** 2005.02.17

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 777 494 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **694 33 648.3**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US94/09484**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **94 927 207.4**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 96/005856**
(86) PCT-Anmeldetag: **23.08.1994**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **29.02.1996**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **11.06.1997**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **24.03.2004**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **17.02.2005**

(51) Int Cl.[7]: **A61K 38/19**
C07K 14/52, C12N 1/21, C12N 5/10, C12N 15/19, C12N 15/70, C12N 15/85

(73) Patentinhaber:
Human Genome Sciences, Inc., Rockville, Md., US

(74) Vertreter:
Vossius & Partner, 81675 München

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

(72) Erfinder:
LI, Haodong, Gaithersburg, US; ADAMS, Mark D., North Potomac, US

(54) Bezeichnung: **MENSCHLICHE CHEMOKIN-POLYPEPTIDE**

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

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

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft neu identifizierte Polynucleotide, Polypeptide, die durch solche Polynucleotide codiert werden, die Verwendung solcher Polynucleotide und Polypeptide sowie die Herstellung solcher Polynucleotide und Polypeptide. Insbesondere ist das Polypeptid der vorliegenden Erfindung ein menschliches Chemokin-beta-4, das nachstehend manchmal „Ckβ-4" genannt wird und das als „das Chemokin-Polypeptid" bezeichnet wird. Außerdem betrifft die Erfindung die Hemmung der Wirkung eines solchen Polypeptids.

[0002] Die Chemokine stellen eine ständig wachsende Superfamilie von kleinen sekretierten Cytokinen dar, die strukturell und funktionell verwandt sind. Alle Chemokine zeigen auf der Aminosäureebene eine Homologie von 25 bis 75% und enthalten räumlich konservierte Cysteinreste, wie das auch bei den Polypeptiden der vorliegenden Erfindung der Fall ist. Mitglieder des „C-X-C-Astes" (gemäß der Position der ersten zwei Cysteinreste im konservierten Motiv), auch bekannt als die Familie Neutrophile-aktivierendes Peptid (NAP)/IL-8, zeigen hauptsächlich durch ihre Wirkung auf die Neutrophilen eine entzündungsfördernde Aktivität (z. B. IL-8 und NAP-2), wohingegen Mitglieder der „C-C-Ast"-Familie bestimmte mononukleäre Zellen anzuziehen scheinen. Die Mitglieder des „C-C-Astes" umfassen PF4, MIPs, MCPs und das Chemokin-Polypeptid der vorliegenden Erfindung.

[0003] Dieser Chemokin-Familie wurden zahlreiche biologische Aktivitäten zugeschrieben. Die Makrophagen-Entzündungsproteine 1α und 1β sind für bestimmte Lymphocyten-Populationen und Monocyten chemotaktisch (Schall, T. J., Cytokine 3: 165 (1991)), während MCP-1 als eine Substanz beschrieben wurde, die spezifisch Monocyten chemisch anzieht (Matsushima, K., et al., J. Exp. Med. 169: 1485 (1989)). Die gemeinsame Funktion dieser Chemokin-Familie besteht in ihrer Fähigkeit, die chemotaktische Migration bestimmter Gruppen von Zellen zu stimulieren, z. B. von Immunzellen (Leukocyten) und Fibroblasten. Diese Chemokine sind auch in der Lage, bestimmte Zellen in dieser Familie zu aktivieren. Der Stand der Technik umfasst auch US 5278287, welches das Cytokin JE und seine Verwendung betrifft.

[0004] Die Immunzellen, die auf die Chemokine ansprechen, weisen in vivo eine große Zahl von Funktionen auf, weshalb ihre Regulation durch solche Chemokine bei der Behandlung von Krankheiten eine wichtige Rolle spielt.

[0005] Z. B. zerstören Eosinophile Parasiten, wodurch eine parasitische Infektion abgeschwächt wird. Außerdem sind Eosinophile für die chronische Entzündung der Atemwege des Respirationstrakts verantwortlich. Makrophagen sind in Wirbeltieren für die Unterdrückung der Tumorbildung verantwortlich. Weiterhin setzen Basophile Histamin frei, das bei der allergischen Entzündung eine wichtige Rolle spielen kann. Demgemäß bietet die Förderung und Hemmung solcher Zellen ein breites therapeutisches Anwendungsgebiet.

[0006] Gemäß einem Aspekt der vorliegenden Erfindung werden ein neues Polypeptid, bei dem es sich um Ckβ-4 handelt, und außerdem Fragmente, Analoga und Derivate davon bereitgestellt. Die Polypeptide der vorliegenden Erfindung stammen vom Menschen.

[0007] Gemäß einem anderen Aspekt der vorliegenden Erfindung werden Polynucleotide (DNA oder RNA) bereitgestellt, die solche Polypeptide codieren.

[0008] Gemäß einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung wird ein Verfahren zur Herstellung solcher Polypeptide durch rekombinante Techniken bereitgestellt.

[0009] Gemäß einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung wird ein Verfahren bereitgestellt, wobei solche Polypeptide oder Polynucleotide, die solche Polypeptide codieren, für therapeutische Zwecke genutzt werden, z. B. zur Behandlung solider Tumoren, chronischer Infektionen, von Autoimmunkrankheiten, Psoriasis, Asthma, Allergie, zur Regulation der Hämatopoese und zur Förderung der Wundheilung.

[0010] Gemäß einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung werden Antikörper gegen solche Polypeptide bereitgestellt.

[0011] Gemäß einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung werden Antagonisten/Inhibitoren solcher Polypeptide bereitgestellt, die eingesetzt werden können, um die Wirkung solcher Polypeptide zu hemmen, z. B. bei der Behandlung von Autoimmunkrankheiten, chronischen entzündlichen und infektiösen Krankheiten, Histamin-vermittelten allergischen Reaktionen, eines Prostaglandin-unabhängigen Fiebers, einer Knochen-

markstörung, Silikose, Sarkoidose, eines Hypereosinophilie-Syndroms und einer Lungenentzündung.

[0012] Diese und andere Aspekte der vorliegenden Erfindung sollten für den Fachmann aus den vorliegenden Angaben ersichtlich sein.

[0013] Die folgenden Zeichnungen dienen der Erläuterung der Ausführungsformen der Erfindung und sollen in keiner Weise den Umfang der Erfindung einschränken, der in den Patentansprüchen enthalten ist.

[0014] **Fig.** 1 zeigt die cDNA-Sequenz und die entsprechende abgeleitete Aminosäuresequenz von Ckβ-4. Die ersten 24 Aminosäuren stellen die abgeleitete Leader-Sequenz von Ckβ-4 dar, so dass das mutmaßliche reife Polypeptid 72 Aminosäuren umfasst. Hierbei wird die herkömmliche Ein-Buchstaben-Abkürzung für Aminosäuren verwendet.

[0015] **Fig.** 2 zeigt die Aminosäuresequenz-Homologie zwischen Ckβ-4 und dem reifen Peptid von Eotaxin (unten).

[0016] Gemäß einem Aspekt der vorliegenden Erfindung werden isolierte Nucleinsäuren (Polynucleotide) bereitgestellt, die das reife Ckβ-4-Polypeptid codieren, das die abgeleitete Aminosäuresequenz von **Fig.** 1 aufweist, oder die das reife Polypeptid codieren, das durch die cDNA des Clons codiert wird, der mit der ATCC-Hinterlegungsnummer 75848 am 29. Juli 1994 hinterlegt wurde.

[0017] Das Polynucleotid, das Ckβ-4 codiert, wurde in einer von einer menschlichen Gallenblase stammenden cDNA-Bank entdeckt. Ckβ-4 ist mit der Chemokin-Familie strukturell verwandt. Es enthält ein offenes Leseraster, das ein Protein von 116 Aminosäureresten codiert, von denen etwa die ersten 24 Aminosäurereste die mutmaßliche Leader-Sequenz darstellen, so dass das reife Protein 92 Aminosäuren umfasst. Das Protein zeigt den höchsten Homologiegrad zu Eotaxin, wobei über die gesamte codierende Sequenz eine Identität von 20% und eine Ähnlichkeit von 37 vorliegt. Außerdem besteht ein wichtiger Punkt darin, dass in den Polypeptiden der vorliegenden Erfindung die in Chemokinen vorliegenden vier örtlich konservierten Cysteinreste zu finden sind.

[0018] Die Polynucleotide der vorliegenden Erfindung können in Form von RNA oder in Form von DNA vorliegen, wobei die DNA eine cDNA, genomische DNA und synthetische DNA umfasst. Die DNA kann doppelsträngig oder einzelsträngig sein, und wenn sie einzelsträngig ist, kann es sich um den codierenden Strang oder um den nicht-codierenden (Antisense-) Strang handeln. Die codierende Sequenz, die die reifen Polypeptide codiert, kann mit der codierenden Sequenz, die in den **Fig.** 1 und 2 dargestellt ist, oder mit der Sequenz der hinterlegten Clone identisch sein, oder sie kann eine andere codierende Sequenz darstellen, wobei eine solche codierende Sequenz als Folge der Redundanz oder Degeneration des genetischen Codes die gleichen reifen Polypeptide wie die DNA der **Fig.** 1 und 2 oder die hinterlegten cDNAs codiert.

[0019] Die Polynucleotide, welche die reifen Polypeptide der **Fig.** 1 oder die reifen Polypeptide codieren, die durch die hinterlegte cDNA codiert werden, können Folgendes umfassen: nur die codierende Sequenz für das reife Polypeptid; die codierende Sequenz für das reife Polypeptid und eine weitere codierende Sequenz, z. B. eine Leader- oder sekretorische Sequenz oder eine Proprotein-Sequenz; die codierende Sequenz für das reife Polypeptid (und gegebenenfalls eine weitere codierende Sequenz) und eine nicht-codierende Sequenz, wie Introns oder nicht-codierende Sequenzen, die 5' und/oder 3' der codierenden Sequenz für die reifen Polypeptide liegen.

[0020] Somit bedeutet der Begriff „Polynucleotid, das ein Polypeptid codiert" ein Polynucleotid, das nur eine codierende Sequenz für das Polypeptid umfasst, und außerdem ein Polynucleotid, das eine weitere codierende und/oder nicht-codierende Sequenz umfasst.

[0021] Die vorliegende Erfindung betrifft weiterhin Varianten der vorstehend beschriebenen Polynucleotide, die Fragmente, Analoga und Derivate des Polypeptids mit der abgeleiteten Aminosäuresequenz der **Fig.** 1 oder des Polypeptids codieren, das durch die cDNA des hinterlegten Clons codiert wird. Die Variante der Polynucleotide kann eine natürlich vorkommende allele Variante der Polynucleotide oder eine nicht-natürlich vorkommende Variante der Polynucleotide sein.

[0022] Somit umfasst die vorliegende Erfindung Polynucleotide, die die gleichen reifen Polypeptide wie in **Fig.** 1 dargestellt oder die gleichen reifen Polypeptide codieren, die durch die cDNA der hinterlegten Clone codiert werden, sowie Varianten solcher Polynucleotide, wobei die Varianten ein Fragment, Derivat oder Analo-

gon des Polypeptids von **Fig.** 1 oder der Polypeptide codieren, die durch die cDNA des hinterlegten Clons codiert werden. Solche Nucleotidvarianten umfassen Deletionsvarianten, Substitutionsvarianten und Additions- oder Insertionsvarianten.

[0023] Wie vorstehend angegeben können die Polynucleotide eine codierende Sequenz aufweisen, die eine natürlich vorkommende allele Variante der in **Fig.** 1 dargestellten codierenden Sequenz oder der codierenden Sequenz des hinterlegten Clons ist. Wie dem Fachmann bekannt ist, ist eine allele Variante eine andere Form einer Polynucleotidsequenz, die eine Substitution, Deletion oder Addition eines oder mehrerer Nucleotide aufweisen kann, durch welche die Funktion des codierten Polypeptids jedoch nicht wesentlich verändert wird.

[0024] Außerdem umfasst die vorliegende Erfindung Polynucleotide, in denen die codierende Sequenz für die reifen Polypeptide im gleichen Leseraster mit einer Polynucleotidsequenz fusioniert sein kann, welche die Expression und Sekretion eines Polypeptids aus einer Wirtszelle fördert, z. B. mit einer Leader-Sequenz, die als eine sekretorische Sequenz zur Steuerung des Transports eines Polypeptids aus der Zelle fungiert. Das Polypeptid, das eine Leader-Sequenz aufweist, ist ein Präprotein, wobei die Leader-Sequenz durch die Wirtszelle abgespalten werden kann, so dass die reife Form des Polypeptids entsteht. Die Polynucleotide können auch ein Proprotein codieren, wobei es sich um das reife Protein plus zusätzliche 5'-Aminosäurereste handelt. Ein reifes Protein, das eine Prosequenz aufweist, ist ein Proprotein, wobei es sich um eine inaktive Form des Proteins handelt. Sobald die Prosequenz abgespalten ist, bleibt ein aktives reifes Protein zurück.

[0025] Somit kann z. B. das Polynucleotid der vorliegenden Erfindung ein reifes Protein oder ein Protein mit einer Prosequenz codieren, oder es kann ein Protein codieren, das sowohl eine Prosequenz als auch eine Präsequenz (Leader-Sequenz) aufweist.

[0026] Bei den Polynucleotiden der vorliegenden Erfindung kann die codierende Sequenz auch im Raster mit einer Markersequenz fusioniert sein, welche die Reinigung der Polypeptide der vorliegenden Erfindung möglich macht. Die Markersequenz kann im Fall eines bakteriellen Wirts eine durch einen pQE-9-Vektor bereitgestellte Hexa-Histidin-Markierung sein, wodurch eine Reinigung der reifen Polypeptide, die mit dem Marker fusioniert sind, möglich gemacht wird, oder die Markersequenz kann z. B. eine Hämagglutinin-(HA-)Markierung sein, wenn ein Säugerwirt verwendet wird, z. B. COS-7-Zellen. Die HA-Markierung entspricht einem Epitop, das vom Influenza-Hämagglutinin-Protein hergeleitet ist (Wilson, I., et al., Cell 37: 767 (1984)).

[0027] Die vorliegende Erfindung betrifft weiterhin Polynucleotide, die mit den vorstehend beschriebenen Sequenzen hybridisieren, wenn zwischen den Sequenzen eine Identität von mindestens 50% und vorzugsweise 70% vorliegt. Die vorliegende Erfindung betrifft insbesondere Polynucleotide, die mit den vorstehende beschriebenen Polynucleotiden unter stringenten Bedingungen hybridisieren. Der hier verwendete Begriff „stringente Bedingungen" bedeutet, dass die Hybridisierung nur dann erfolgt, wenn zwischen den Sequenzen eine Identität von mindestens 95% und vorzugsweise mindestens 97% vorliegt. Die Polynucleotide, die mit den vorstehend beschriebenen Polynucleotiden in einer bevorzugten Ausführungsform hybridisieren, codieren Polypeptide, die im Wesentlichen noch die gleiche biologische Funktion oder Aktivität wie das reife Polypeptid besitzen, das durch die cDNA der **Fig.** 1 oder die hinterlegte cDNA codiert wird.

[0028] Die hier angesprochene(n) Hinterlegungen) wird (werden) unter den Bestimmungen des Budapester Vertrags über die internationale Anerkennung der Hinterlegung von Mikroorganismen zum Zwecke von Patentverfahren gehalten. Diese Hinterlegungen werden lediglich zur Erleichterung für den Fachmann bereitgestellt und sind kein Eingeständnis dafür, dass eine Hinterlegung unter 35 USC §112 erforderlich ist. Die Sequenz der Polynucleotide, die in den hinterlegten Materialien enthalten ist, und außerdem die Aminosäuresequenz der hierdurch codierten Polypeptide sind hier durch Bezugnahme eingeschlossen und dienen im Fall eines Konflikts mit den hier angegebenen Beschreibungen von Sequenzen als Kontrolle. Für die Herstellung, Verwendung oder den Verkauf der hinterlegten Materialien kann eine Lizenz erforderlich sein, hierdurch wird jedoch keine solche Lizenz bewilligt.

[0029] Die vorliegende Erfindung betrifft ferner Chemokin-Polypeptide, die die abgeleiteten Aminosäuresequenz der **Fig.** 1 aufweisen, oder ein Chemokin-Polypeptid, welches die Aminosäuresequenz besitzt, die durch die hinterlegte cDNA codiert wird, und außerdem Fragmente, Analoga und Derivate solcher Polypeptide.

[0030] Wenn die Begriffe „Fragment", „Derivat" und „Analogon" die Polypeptide der **Fig.** 1 oder die durch die hinterlegte cDNA codierten Polypeptide betreffen, bedeuten sie Polypeptide, die im Wesentlichen noch die gleiche biologische Funktion oder Aktivität wie diese Polypeptide besitzen. Somit umfasst ein Analogon ein Proprotein, das durch Abspaltung des Proprotein-Anteils aktiviert werden kann, so dass ein aktives reifes Po-

lypeptid hergestellt wird.

[0031] Die Chemokin-Polypeptide der vorliegenden Erfindung können rekombinante Polypeptide, natürliche Polypeptide oder synthetische Polypeptide sein, vorzugsweise handelt es sich um rekombinante Polypeptide.

[0032] Das Fragment, Derivat oder Analogon der Polypeptide der **Fig.** 1 oder der durch die hinterlegte cDNA codierten Polypeptide kann (i) eines sein, in dem einer oder mehrere der Aminosäurereste mit einem konservierten oder nicht-konservierten Aminosäurerest (vorzugsweise mit einem konservierten Aminosäurerest) substituiert ist bzw. sind, wobei ein solcher substituierter Aminosäurerest durch den genetischen Code codiert sein kann, dies jedoch nicht der Fall sein muss, oder (ii) eines sein, in dem einer oder mehrere der Aminosäurereste eine Substituentengruppe umfasst, oder (iii) eines sein, in dem das reife Polypeptid mit einer anderen Verbindung fusioniert ist, z. B. einer Verbindung, mit der die Halbwertszeit des Polypeptids verlängert wird (z. B. Polyethylenglykol), oder (iv) eines sein, in dem die zusätzlichen Aminosäuren mit dem reifen Polypeptid fusioniert sind, z. B. eine Leader- oder sekretorische Sequenz oder eine Sequenz, die zur Reinigung des reifen Polypeptids verwendet wird, oder eine Proprotein-Sequenz. Man kann davon ausgehen, dass solche Fragmente, Derivate und Analoga in dem Umfang dessen liegen, der für den Fachmann aus den hier vorliegenden Angaben ersichtlich ist.

[0033] Die Polypeptide und Polynucleotide der vorliegenden Erfindung werden vorzugsweise in einer isolierten Form bereitgestellt und sind vorzugsweise bis zur Homogenität gereinigt.

[0034] Der Begriff „isoliert" bedeutet, dass das Material aus seiner ursprünglichen Umgebung entfernt ist (z. B. aus der natürlichen Umgebung, wenn es in der Natur vorkommt). Z. B. ist ein natürlich vorkommendes Polynucleotid oder Polypeptid, das in einem lebenden Tier vorliegt, nicht isoliert, dagegen ist das gleiche Polynucleotid oder Polypeptid isoliert, wenn es von einigen oder allen der gleichzeitig vorliegenden Stoffe in dem natürlichen System getrennt ist. Solche Polynucleotide können Teil eines Vektors sein, und/oder solche Polynucleotide oder Polypeptide können Teil einer Zusammensetzung sein, und sie können immer noch isoliert sein, da ein solcher Vektor oder eine solche Zusammensetzung nicht Teil seiner natürlichen Umgebung ist.

[0035] Die vorliegende Erfindung betrifft außerdem Vektoren, die Polynucleotide der vorliegenden Erfindung umfassen, Wirtszellen, die mit Vektoren der Erfindung genetisch verändert sind, und die Herstellung von Polypeptiden der Erfindung durch rekombinante Techniken.

[0036] Wirtszellen werden mit den Vektoren der vorliegenden Erfindung genetisch verändert (transduziert, transformiert oder transfiziert), hierbei kann es sich z. B. um einen Clonierungsvektor oder einen Expressionsvektor handeln. Der Vektor kann z. B. in Form eines Plasmids, eines Viruspartikels, eines Phagen usw. vorliegen. Die veränderten Wirtszellen können in herkömmlichen Nährmedien gezüchtet werden, die so modifiziert sind, dass sie für die Aktivierung von Promotoren, die Selektion von Transformanten oder die Amplifikation des Ckβ-4-Gens geeignet sind. Die Kulturbedingungen, z. B. die Temperatur, der pH-Wert und dergleichen, sind die gleichen, die früher verwendet wurden, als die Wirtszelle für die Expression selektiert wurde, und sie sind für den Fachmann ersichtlich.

[0037] Die Polynucleotide der vorliegenden Erfindung können für die Herstellung von Polypeptiden durch rekombinante Verfahren eingesetzt werden. Hierzu kann das Polynucleotid z. B. in einen von verschiedenen Expressionsvektoren für die Expression eines Polypeptids eingefügt werden. Solche Vektoren umfassen chromosomale, nicht-chromosomale und synthetische DNA-Sequenzen, z. B. Derivate von SV40; bakterielle Plasmide; Phagen-DNA; Baculovirus; Hefeplasmide; Vektoren, hergeleitet von Kombinationen aus Plasmiden und Phagen-DNA, Virus-DNA, wie Vaccinia, Adenovirus, Geflügelpocken-Virus und Pseudorabies. Jedoch kann auch jeder beliebige andere Vektor eingesetzt werden, so lange er in dem Wirt replizierbar und lebensfähig ist.

[0038] Die geeignete DNA-Sequenz kann durch verschiedene Verfahren in den Vektor eingefügt werden. Im Allgemeinen wird die DNA-Sequenz in eine geeignete Restriktionsendonuclease-Stelle(n) durch Verfahren eingefügt, die dem Fachmann bekannt sind. Solche Verfahren und auch andere Methoden sind dem Fachmann im Allgemeinen bekannt.

[0039] Die DNA-Sequenz im Expressionsvektor ist mit einer geeigneten Expressionskontrollsequenz(en) (Promotor) funktionell verbunden, wodurch die mRNA-Synthese gesteuert wird. Als repräsentative Beispiele solcher Promotoren können die Folgenden erwähnt werden: LTR oder SV40-Promotor, der lac- oder trp-Promotor von E. coli, der P_L-Promotor des Lambda-Phagen und andere Promotoren, von denen bekannt ist, dass sie die Expression von Genen in prokaryotischen oder eukaryotischen Zellen oder ihrer Viren steuern. Der Ex-

pressionsvektor enthält auch eine Ribosomenbindungsstelle für die Initiation der Translation und einen Transkriptions-Terminator. Der Vektor kann weiterhin geeignete Sequenzen für die Amplifikation der Expression umfassen.

[0040] Außerdem enthalten die Expressionsvektoren vorzugsweise ein oder mehrere selektierbare Markergene, wodurch ein phänotypisches Merkmal für die Selektion transformierter Wirtszellen bereitgestellt wird, z. B. Dihydrofolat-Reduktase oder Neomycin-Resistenz für eine eukaryotische Zellkultur, oder z. B. eine Tetracyclin- oder Ampicillin-Resistenz in E. coli.

[0041] Der Vektor, der die geeignete DNA-Sequenz wie vorstehend beschrieben enthält, und ein geeigneter Promotor oder Kontrollsequenz können dazu verwendet werden, einen geeigneten Wirt zu transformieren, so dass der Wirt in die Lage versetzt wird, das Protein zu exprimieren.

[0042] Als repräsentative Beispiele von geeigneten Wirten können die Folgenden erwähnt werden: Bakterienzellen, z. B. E. coli, Streptomyces, Salmonella typhimurium; Pilzzellen, z. B. Hefen; Insektenzellen, z. B. Drosophila und Sf9; tierische Zellen, z. B. CHO, COS oder Bowes-Melanom; Pflanzenzellen, usw.. Der Fachmann kann anhand der hier gemachten Angaben einen geeigneten Wirt auswählen.

[0043] Insbesondere umfasst die vorliegende Erfindung auch rekombinante Konstrukte, die eine oder mehrere der Sequenzen enthalten, die vorstehend ausführlich beschrieben sind. Die Konstrukte umfassen einen Vektor, z. B. ein Plasmid oder einen viralen Vektor, in den eine erfindungsgemäße Sequenz in einer Vorwärts- oder Umkehr-Orientierung eingefügt wurde. In einem bevorzugten Aspekt dieser Ausführungsform enthält das Konstrukt außerdem regulatorische Sequenzen, umfassend z. B. einen Promotor, die mit der Sequenz funktionell verbunden sind. Eine große Zahl geeigneter Vektoren und Promotoren sind dem Fachmann bekannt und im Handel verfügbar. Die folgenden Vektoren werden als Beispiel genannt. Bakteriell: pQE70, pQE60, pQE-9 (Qiagen), pBS, pD10, Phagescript, psiX174, pbluescript SK, pbsks, pNH8A, pNH16a, pNH18A, pNH46A (Stratagene); ptrc99a, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5 (Pharmacia). Eukaryotisch: pWLNEO, pSV2CAT, pOG44, pXT1, pSG (Stratagene), pSVK3, pBPV, pMSG, pSVL (Pharmacia). Jedoch kann auch jedes beliebige andere Plasmid oder jeder beliebige andere Vektor eingesetzt werden, so lange sie in dem Wirt replizierbar und lebensfähig sind.

[0044] Promotorregionen können aus einem beliebigen gewünschten Gen unter Verwendung von CAT-(Chloramphenicol-Transferase-)Vektoren oder anderen Vektoren mit selektierbaren Markern ausgewählt werden. Zwei geeignete Vektoren sind pKK232-8 und pCM7. Besonders erwähnte bakterielle Promotoren umfassen lacI, lacZ, T3, T7, gpt, Lambda-P_R, P_L und trp. Eukaryotische Promotoren umfassen die Folgenden: den unmittelbaren frühen Promotor des CMV, HSV Thymidinkinase, frühe und späte SV40, LTRs aus Retrovirus und Metallothionein-I der Maus. Der Fachmann kann den geeigneten Vektor oder Promotor auswählen.

[0045] In einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung Wirtszellen, die die vorstehend beschriebenen Konstrukte enthalten. Die Wirtszelle kann eine höhere eukaryotische Zelle, z. B. eine Säugerzelle, oder eine niedrigere eukaryotische Zelle, z. B. eine Hefezelle, oder die Wirtszelle kann eine prokaryotische Zelle sein, z. B. eine Bakterienzelle. Die Einführung des Konstrukts in die Wirtszelle kann durch eine Calciumphosphat-Transfektion, DEAE-Dextranvermittelte Transfektion oder Elektroporation erfolgen (Davis, L., Dibner, M., Battey, I., Basic Methods in Molecular Biology (1986)).

[0046] Die Konstrukte in den Wirtszellen können in herkömmlicher Art eingesetzt werden, so dass das durch die rekombinante Sequenz codierte Genprodukt erzeugt wird. Andererseits können die Polypeptide der Erfindung auch durch herkömmliche Peptidsynthesizer synthetisch produziert werden.

[0047] Die reifen Proteine können in Säugerzellen, Hefen, Bakterien oder anderen Zellen unter der Kontrolle geeigneter Promotoren exprimiert werden. Außerdem können zur Herstellung solcher Proteine zellfreie Translationssysteme eingesetzt werden, wobei RNAs verwendet werden, die von den DNA-Konstrukten der vorliegenden Erfindung hergeleitet sind. Geeignete Clonierungs- und Expressionsvektoren für die Verwendung bei prokaryotischen und eukaryotischen Wirten werden von Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. Aufl., Cold Spring Harbor, N. Y., (1989), beschrieben, dessen Beschreibung hier durch Bezugnahme eingeschlossen ist.

[0048] Die Transkription der DNA, die die Polypeptide der vorliegenden Erfindung codiert, durch höhere Eukaryoten wird gesteigert, indem eine Enhacer-Sequenz in den Vektor eingefügt wird. Enhancer sind cis-wirkende DNA-Elemente mit üblicherweise etwa 10 bis 300 bp, die auf einen Promotor so einwirken, dass seine Tran-

skription gesteigert wird. Beispiele umfassen den SV40-Enhancer auf der späten Seite des Replikationsursprungs bp 100 bis 270, einen Cytomegalovirus frühen Promotor-Enhancer, den Polyoma-Enhancer auf der späten Seite des Replikationsursprungs und Adenovirus-Enhancer.

[0049] Im Allgemeinen umfassen rekombinante Expressionsvektoren Replikationsursprünge und selektierbare Marker, die eine Transformation der Wirtszelle erlauben, z. B. das Ampicillin-Resistenz-Gen von E. coli und das TRP1-Gen von S. cerevisiae, und einen Promotor, der von einem stark exprimierten Gen hergeleitet ist, wodurch die Transkription einer stromabwärts liegenden Struktursequenz gesteuert wird. Solche Promotoren können von Operons hergeleitet sein, die glykolytische Enzyme codieren, wie 3-Phosphoglycerat-Kinase (PGK), α-Faktor, saure Phosphatase oder Hitzeschockproteine u. a.. Die heterologe Struktursequenz wird in geeigneter Phase mit Translations-Initiations- und Terminationssequenzen und vorzugsweise mit einer Leader-Sequenz zusammengebaut, die in der Lage ist, die Sekretion des translatierten Proteins in den periplasmatischen Raum oder ins extrazelluläre Medium zu steuern. Gegebenenfalls kann die heterologe Sequenz ein Fusionsprotein codieren, das ein N-terminales Identifikationspeptid umfasst, welches gewünschte Merkmale bereitstellt, z. B. eine Stabilisation oder eine einfachere Reinigung des exprimierten rekombinanten Produkts.

[0050] Geeignete Expressionsvektoren für die Verwendung in Bakterien werden konstruiert, indem eine Struktur-DNA-Sequenz, welche ein gewünschtes Protein codiert, zusammen mit geeigneten Translations-Initiations- und Terminationssignalen in eine wirksame Lesephase mit einem funktionellen Promotor eingefügt wird. Der Vektor umfasst einen oder mehrere phänotypische selektierbare Marker und einen Replikationsursprung, um die Aufrechterhaltung des Vektors sicherzustellen und eine Amplifikation innerhalb des Wirts bereitzustellen, falls dies gewünscht wird. Prokaryotische Wirte, die für eine Transformation geeignet sind, umfassen E. coli, Bacillus subtilis, Salmonella typhimurium und verschiedene Arten der Gattungen Pseudomonas, Streptomyces und Staphylococcus, wobei jedoch auch andere als Mittel der Wahl eingesetzt werden können.

[0051] Als repräsentatives, jedoch nicht-einschränkendes Beispiel können geeignete Expressionsvektoren für die Verwendung in Bakterien einen selektierbaren Marker und einen bakteriellen Replikationsursprung umfassen, hergeleitet von kommerziell verfügbaren Plasmiden, die genetische Elemente des bekannten Clonierungsvektors pBR322 (ATCC 37017) enthalten. Solche kommerzielle Vektoren umfassen z. B. pKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden) und hGEM1 (Promega Biotec, Madison, WI, USA). Diese pBR322-„Rückgrat"-Abschnitte werden mit einem geeigneten Promotor und der zu exprimierenden Struktursequenz kombiniert.

[0052] Nachdem die Transformation eines geeigneten Wirtsstamms erfolgt ist und der Wirtsstamm bis zu einer geeigneten Zelldichte gewachsen ist, wird der gewählte Promotor durch geeignete Mittel induziert (z. B. durch einen Temperatursprung oder eine chemische Induktion), anschließend werden die Zellen einen weiteren Zeitraum gezüchtet.

[0053] Die Zellen werden typischerweise durch Zentrifugation geerntet, sodann durch physikalische oder chemische Verfahren aufgeschlossen und der resultierende Rohextrakt für eine weitere Reinigung gewonnen.

[0054] Die für die Expression von Proteinen verwendeten mikrobiellen Zellen können durch ein beliebiges herkömmliches Verfahren aufgeschlossen werden, umfassend das zyklische Durchführen von Einfrieren und Auftauen, die Beschallung, ein mechanisches Aufschließen oder die Verwendung von zelllysierenden Mitteln, wobei solche Verfahren dem Fachmann bekannt sind.

[0055] Außerdem können verschiedene Säugerzell-Kultursysteme eingesetzt werden, um ein rekombinantes Protein zu exprimieren. Beispiele von Säuger-Expressionssystemen umfassen die COS-7-Linien von Affennieren-Fibroblasten, die von Gluzman, Cell 23: 175 (1981), beschrieben wurden, und andere Zelllinien, die in der Lage sind, einen kompatiblen Vektor zu exprimieren, z. B. die Zelllinien C127, 3T3, CHO, HeLa und BHK. Säuger-Expressionsvektoren umfassen einen Replikationsursprung, einen geeigneten Promotor und Enhancer und außerdem beliebige erforderliche Ribosomenbindungsstellen, eine Polyadenylierungsstelle, Spleiß-Donor- und Akzeptor-Stellen, transkriptionale Terminationssequenzen und 5'-flankierende nicht-transkribierte Sequenzen. Unter Verwendung von DNA-Sequenzen, die von der SV40-Spleißung stammen, und von Polyadenylierungsstellen können die erforderlichen nicht-transkribierten genetischen Elemente bereitgestellt werden.

[0056] Die Chemokin-Polypeptide können aus den rekombinanten Zellkulturen durch verschiedene Verfahren gewonnen und gereinigt werden, umfassend Ammoniumsulfat- oder Ethanol-Fällung, Säure-Extraktion, Anionen- oder Kationen-Austausch-Chromatographie, Phosphocellulose-Chromatographie, hydrophobe-Wechselwirkung-Chromatographie, Affinitäts-Chromatographie, Hydroxylapatit-Chromatographie und Lectin-Chroma-

tographie. Außerdem können, sofern erforderlich, Schritte zur Umfaltung des Proteins eingesetzt werden, wodurch die Konfiguration des reifen Proteins vervollständigt wird. Schließlich kann für die letzten Reinigungsschritte noch eine Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC) verwendet werden.

[0057] Das Chemokin-Polypeptid der vorliegenden Erfindung kann ein natürlich gereinigtes Produkt oder ein Produkt aus chemischen synthetischen Verfahren sein, oder es kann anhand von rekombinanten Techniken durch einen prokaryotischen oder eukaryotischen Wirt erzeugt werden (z. B. durch Bakterien-, Hefe-, höhere Pflanzen-, Insekten- und Säugerzellen in Kultur). Abhängig von dem Wirt, der in einem rekombinanten Herstellungsverfahren eingesetzt wird, können die Polypeptide der vorliegenden Erfindung glykosyliert oder nicht-glykosyliert sein. Polypeptide der Erfindung können auch einen am Anfang stehenden Methionin-Aminosäurerest umfassen.

[0058] Das Chemokin-Polypeptid kann zur Hemmung der Koloniebildung von Knochenmark-Stammzellen eingesetzt werden, und zwar als eine zusätzliche schützende Behandlung während einer Chemotherapie gegen Krebs und bei Leukämie.

[0059] Das Chemokin-Polypeptid kann außerdem bei der Behandlung von Psoriasis zur Hemmung der Proliferation epidermaler Keratinocyten eingesetzt werden, wobei diese Krankheit durch eine Hyperproliferation der Keratinocyten gekennzeichnet ist.

[0060] Ferner kann das Chemokin-Polypeptid auch zur Behandlung solider Tumoren verwendet werden, wobei es die Invasion und Aktivierung von Verteidigungszellen des Wirts stimuliert, z. B. von cytotoxischen T-Zellen und Makrophagen. Außerdem können sie verwendet werden, um die Verteidigung des Wirts gegen resistente chronische Infektionen, z. B. Infektionen mit Mycobakterien, durch Anziehung und Aktivierung bakterizider Leukocyten zu stärken.

[0061] Das Chemokin-Polypeptid kann auch für die Behandlung eines Autoimmunleidens und lymphatischer Leukämien eingesetzt werden, indem es die T-Zell-Proliferation durch Hemmung der IL2-Biosynthese hemmt.

[0062] Ferner kann Ckβ-4 für die Wundheilung verwendet werden, und zwar sowohl anhand der Unterstützung bei der Entfernung von Gewebetrümmern und Bindegewebe-fördernden Entzündungszellen und auch anhand seiner Kontrolle einer übermäßigen TGF-β-vermittelten Fibrose. Auf gleiche Weise kann Ckβ-4 auch zur Behandlung anderer fibrotischer Störungen eingesetzt werden, umfassend Leberzirrhose, Osteoarthritits und Lungenfibrose. Die Chemokin-Polypeptide steigern auch das Vorliegen von Eosinophilen, welche die charakteristische Funktion haben, die Larven von Parasiten abzutöten, welche in Gewebe eindringen, wie bei der Schistosomiasis, Trichinose und Askariasis. Außerdem können sie zur Regulierung der Hämatopoese eingesetzt werden, indem sie die Aktivierung und Differenzierung verschiedener hämatopoetischer Vorläuferzellen regulieren.

[0063] Weiterhin können Chemokine als Inhibitoren der Angiogenese verwendet werden, und sie weisen somit auch Anti-Tumor-Effekte auf.

[0064] Das Chemokin-Polypeptid der vorliegenden Erfindung kann auch zum Identifizieren anderer Moleküle genutzt werden, die ähnliche biologische Eigenschaften besitzen. Ein solches Durchmusterungsverfahren sieht z. B. folgendermaßen aus, die codierende Region der Gene wird isoliert, indem die bekannte DNA-Sequenz zur Synthese von Oligonucleotid-Sonden verwendet wird. Sodann werden die markierten Oligonucleotide, die eine zur Sequenz der erfindungsgemäßen Gene komplementäre Sequenz aufweisen, zum Durchmustern einer Bank menschlicher cDNA, genomischer DNA oder mRNA eingesetzt, wobei bestimmt wird, mit welchen Mitgliedern der Bank die Sonde hybridisiert.

[0065] Die vorliegende Erfindung betrifft auch diagnostische Tests zum Nachweis veränderter Spiegel der Polypeptide oder der mRNA, welche die Information für solche Polypeptide bereitstellt, und zwar sowohl quantitativ als auch qualitativ. Solche Tests sind dem Fachmann bekannt und umfassen einen ELISA-Test, den Radioimmuntest und RT-PCR. Anhand der Spiegel der Polypeptide oder ihrer mRNAs, die in den Tests nachgewiesen werden, kann sodann die Bedeutung der Polypeptide bei verschiedenen Krankheiten geklärt werden, außerdem können sie für die Diagnose von Krankheiten genutzt werden, bei denen möglicherweise veränderte Spiegel der Polypeptide signifikant sind.

[0066] Die vorliegende Erfindung stellt ein Verfahren zur Identifizierung der Rezeptoren für die Polypeptide bereit. Das Gen, das die Rezeptoren codiert, kann durch Expressionsclonierung identifiziert werden. Hierbei

wird eine polyadenylierte RNA wird aus einer Zelle hergestellt, die auf die Polypeptide anspricht, anschließend wird eine aus dieser RNA erzeugte cDNA-Bank in Pools aufgeteilt und zur Transfektion von COS-Zellen oder anderer Zellen verwendet, die nicht auf die Polypeptide ansprechen. Sodann werden die auf Glas-Objektträgern gezüchteten transfizierten Zellen den markierten Polypeptiden ausgesetzt. Die Polypeptide können durch verschiedene Verfahren markiert werden, umfassend Iodierung oder Einschluss einer Erkennungsstelle für eine stellenspezifische Proteinkinase. Nach der Fixierung und Inkubation werden die Objektträger einer autoradiographischen Analyse unterworfen. Die positiven Pools werden identifiziert und anschließend Sub-Pools hergestellt und erneut unter Verwendung eines sich wiederholenden Sub-Pooling- und Rescreening-Prozesses transfiziert, wodurch schließlich ein einzelner Clon erhalten wird, der den mutmaßlichen Rezeptor codiert. Eine andere Vorgehensweise zur Identifizierung des Rezeptors besteht darin, die markierten Polypeptide durch Photoaffinität mit Zellmembran- oder Extraktpräparaten zu verbinden, die das Rezeptormolekül exprimieren. Das vernetzte Material wird durch eine PAGE-Analyse aufgetrennt und sodann einem Röntgenfilm ausgesetzt. Der markierte Komplex, der die Rezeptoren der Polypeptide enthält, kann ausgeschnitten, in Peptidfragmente aufgetrennt und einer Protein-Mikrosequenzierung unterworfen werden. Sodann kann unter Verwendung der aus der Mikrosequenzierung erhaltene Aminosäuresequenz ein Satz von Oligonucleotid-Sonden hergestellt werden, mit denen anschließend eine cDNA-Bank durchgemustert wird, wodurch die Gene identifiziert werden, welche die mutmaßlichen Rezeptoren codieren.

[0067] Die vorliegende Erfindung stellt ein Verfahren zur Durchmusterung von Arzneistoffen bereit, wobei diejenigen identifiziert werden, die eine Wechselwirkung der Polypeptide mit ihren identifizierten Rezeptoren verstärken (Agonisten) oder blockieren (Antagonisten). Ein Agonist ist eine Verbindung, die die natürlichen biologischen Funktionen der Polypeptide verstärkt, während Antagonisten solche Funktionen eliminieren. Z. B. kann eine Säugerzelle oder ein Membranpräparat, die/das die Rezeptoren der Polypeptide exprimiert, mit einem z. B. durch Radioaktivität markierten Chemokin-Polypeptid in Gegenwart des Arzneistoffs inkubiert werden. Sodann kann die Fähigkeit des Arzneistoffs gemessen werden, diese Wechselwirkung zu verstärken oder zu blockieren.

[0068] Mögliche Antagonisten umfassen Antikörper oder in einigen Fällen Oligonucleotide, die an die Polypeptide binden. Ein weiteres Beispiel eines möglichen Antagonisten ist eine negative Dominant-Mutante der Polypeptide. Negative Dominant-Mutanten sind Polypeptide, die an den Rezeptor des Wildtyp-Polypeptids binden, die jedoch keine biologische Aktivität mehr auslösen.

[0069] Ein Test, mit dem negative Dominant-Mutanten der Polypeptide nachgewiesen werden können, umfasst einen in vitro-Chemotaxis-Test, in dem eine Chemotaxis-Kammer mit mehreren Vertiefungen, ausgestattet mit Polyvinylpyrrolidon-freien Polycarbonat-Membranen, verwendet wird, um die Fähigkeit der Polypeptide zu messen, in Gegenwart und in Abwesenheit der möglichen Antagonist/Inhibitor- oder Agonist-Moleküle Leukocyten chemisch anzuziehen.

[0070] Antisense-Konstrukte, die unter Verwendung der Antisense-Technologie hergestellt wurden, sind auch mögliche Antagonisten. Die Antisense-Technologie kann eingesetzt werden, um die Genexpression über eine Tripelhelix-Bildung oder Antisense-DNA oder RNA zu steuern, wobei beide Verfahren auf einer Bindung eines Polynucleotids an DNA oder RNA beruhen. Z. B. wird unter Verwendung des 5'-codierenden Teils der Polynucleotidsequenz, die die reifen Polypeptide der vorliegenden Erfindung codiert, ein Antisense-RNA-Oligonucleotid mit einer Länge von etwa 10 bis 40 Basenpaaren entworfen. Ein DNA-Oligonucleotid wird so gestaltet, dass es zu der Region des Gens komplementär ist, die an der Transkription beteiligt ist (Tripelhelix, vgl. Lee et al., Nucl. Acids Res. 6: 3073 (1979); Cooney et al., Science 241: 456 (1988); und Dervan et al., Sciences 251: 1360 (1991)), wodurch die Transkription und die Produktion der Polypeptide verhindert wird. Das Antisense-RNA-Oligonucleotid hybridisiert mit der mRNA in vivo und blockiert die Translation des mRNA-Moleküls in die Polypeptide (Antisense – Okano, J. Neurochem. 56: 560 (1991); „Oligodesoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression", CRC Press, Boca Raton, FL (1988)). Die vorstehend beschriebenen Oligonucleotide können auch zu Zellen zugegeben werden, so dass die Antisense-RNA oder DNA in vivo exprimiert werden kann, wodurch die Produktion der Polypeptide gehemmt wird.

[0071] Ein weiterer möglicher Antagonist ist ein Peptidderivat der Polypeptide, wobei es sich um natürlich oder synthetisch modifizierte Analoga der Polypeptide handelt, die ihre biologische Funktion zwar verloren haben, die jedoch immer noch die Rezeptoren der Polypeptide erkennen und daran binden, wodurch die Rezeptoren wirksam blockiert werden. Beispiele von Peptidderivaten umfassen, sind jedoch nicht beschränkt auf kleine Peptide oder Peptid-artige Moleküle.

[0072] Die Antagonisten können eingesetzt werden, um die Chemotaxis und Aktivierung von Makrophagen

und ihren Vorläufern und von Neutrophilen, Basophilen, B-Lymphocyten und einigen T-Zell-Untergruppen, z. B. aktivierten und CD8-cytotoxischen T-Zellen und natürlichen Killerzellen, bei Autoimmunleiden und chronischen entzündlichen und infektiösen Krankheiten zu hemmen. Beispiele von Autoimmunleiden umfassen rheumatoide Arthritis, multiple Sklerose und Insulinabhängige Diabetes. Bei einigen Infektionskrankheiten liegen auch die folgenden Störungen vor: eine Silikose, Sarkoidose und idiopathische Lungenfibrose, wobei die Zunahme und die Aktivierung mononukleärer Phagocyten verhindert werden, ein idiopathisches Hypereosinophilie-Syndrom, wobei die Produktion und die Migration von Eosinophilen verhindert werden, ein endotoxischer Schock, wobei die Migration von Makrophagen und ihre Produktion der Chemokin-Polypeptide der vorliegenden Erfindung verhindert werden. Die Antagonisten können auch zur Behandlung von Atherosklerose eingesetzt werden, wobei sie die Infiltration von Monocyten in die Arterienwand verhindern.

[0073] Außerdem können die Antagonisten zur Behandlung von Histaminvermittelten allergischen Reaktionen eingesetzt werden, wobei sie die Chemokininduzierte Mastzellen- und Basophilen-Degranulation und die Freisetzung von Histamin hemmen.

[0074] Die Antagonisten können weiterhin zur Behandlung einer Entzündung verwendet werden, wobei sie die Anziehung von Monocyten zu einem Wundbereich verhindern. Sie können auch eingesetzt werden, um die normalen Makrophagenpopulationen der Lunge zu regulieren, da akute und chronische entzündliche Lungenkrankheiten mit einer Sequestrierung mononukleärer Phagocyten in der Lunge assoziiert sind.

[0075] Ferner können Antagonisten zur Behandlung der rheumatoiden Arthritis eingesetzt werden, wobei sie in den Gelenken der Patienten die Anziehung von Monocyten in die Synovialflüssigkeit verhindern. Das Einströmen und die Aktivierung von Monocyten spielt in der Pathogenese von sowohl degenerativen als auch entzündlichen Arthropathien eine signifikante Rolle.

[0076] Die Antagonisten können auch verwendet werden, um in die schädlichen Kaskaden einzugreifen, die hauptsächlich dem IL-1 und dem TNF zuzuschreiben sind, wodurch die Biosynthese anderer entzündlicher Cytokine verhindert wird. Auf diese Weise können die Antagonisten zur Verhinderung einer Entzündung eingesetzt werden. Ferner können die Antagonisten auch zur Hemmung eines durch Chemokine induzierten Prostaglandin-unabhängigen Fiebers verwendet werden.

[0077] Die Antagonisten können weiterhin zur Behandlung von Fällen einer Knochenmarkstörung eingesetzt werden, z. B. bei der aplastischen Anämie und dem myelodysplatischen Syndrom.

[0078] Die Antagonisten können auch zur Behandlung von Asthma und Allergie genutzt werden, wobei sie die Akkumulation von Eosinophilen in der Lunge verhindern. Die Antagonisten können in einer Zusammensetzung zusammen mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger eingesetzt werden, wie z. B. nachstehend beschrieben wird.

[0079] Die Chemokin-Polypeptide und Agonisten oder Antagonisten der vorliegenden Erfindung können in Kombination mit einem geeigneten pharmazeutischen Träger verwendet werden. Solche Zusammensetzungen umfassen eine therapeutisch wirksame Menge des Polypeptids und einen pharmazeutisch verträglichen Träger oder ein Excipiens. Ein solcher Träger umfasst, ist jedoch nicht beschränkt auf Kochsalzlösung, gepufferte Kochsalzlösung, Dextrose, Wasser, Glycerin, Ethanol und Kombinationen davon. Die Formulierung sollte für die gewünschte Verabreichungsart geeignet sein.

[0080] Außerdem stellt die Erfindung eine pharmazeutische Packung oder ein pharmazeutisches Kit bereit, die/das einen oder mehrere Behälter umfasst, die mit einem oder mehreren der Bestandteile der Arzneimittel der Erfindung gefüllt ist/sind. Außerdem kann zu einem solchen Behälter (solchen Behältern) noch eine Mitteilung in der Form beigelegt werden, die von der entsprechenden Behörde vorgeschrieben ist, die für Herstellung, Verwendung und Verkauf von pharmazeutischen oder biologischen Produkten zuständig ist, wobei dieser Mitteilung die Zulassung durch die Behörde für Herstellung, Verwendung und Verkauf von Produkten zur Verabreichung an Menschen zu entnehmen ist. Außerdem können die Polypeptide der vorliegenden Erfindung in Verbindung mit anderen therapeutischen Verbindungen eingesetzt werden.

[0081] Die Arzneimittel können in geeigneter Art und Weise verabreicht werden, z. B. über die topische, intravenöse, intraperitoneale, intramuskuläre, intratumorale, subkutane, intranasale oder intradermale Route. Die Polypeptide werden in einer Menge verabreicht, die zur Behandlung und/oder zur Prophylaxe der spezifischen Indikation wirksam ist. Im Allgemeinen werden die Polypeptide in einer Menge von mindestens etwa 10 µg/kg Körpergewicht verabreicht, und in den meisten Fällen werden sie in einer Menge von nicht mehr als 8

mg/kg Körpergewicht pro Tag verabreicht. In den meisten Fällen liegt die Dosierung im Bereich von etwa 10 µg/kg bis etwa 1 mg/kg Körpergewicht täglich, wobei die Verabreichungsrouten, Symptome usw. berücksichtigt werden müssen.

[0082] Das Chemokin-Polypeptid und die Agonisten oder Antagonisten können gemäß der vorliegenden Erfindung durch eine Expression solcher Polypeptide in vivo angewendet werden, diese wird häufig als „Gentherapie" bezeichnet.

[0083] Hierbei können z. B. Zellen aus einem Patienten mit einem Polynucleotid (DNA oder RNA), das ein Polypeptid codiert, ex vivo gentechnisch verändert werden, und die veränderten Zellen können sodann einem Patienten übertragen werden, der mit dem Polypeptid behandelt werden soll. Solche Verfahren sind dem Fachmann bekannt. Z. B. können Zellen durch Verfahren, die dem Fachmann bekannt sind, gentechnisch verändert werden, indem ein Retroviruspartikel eingesetzt wird, das eine RNA enthält, die ein Polypeptid der vorliegenden Erfindung codiert.

[0084] Genauso können Zellen in vivo gentechnisch so verändert werden, dass sie ein Polypeptid in vivo exprimieren, wobei z. B. Verfahren verwendet werden, die dem Fachmann bekannt sind. Wie dem Fachmann bekannt ist, kann eine produzierende Zelle zur Herstellung eines Retroviruspartikels, das eine das Polypeptid der vorliegenden Erfindung codierende RNA enthält, an einen Patienten verabreicht werden, wobei die Zellen in vivo gentechnisch verändert werden und die Expression des Polypeptids in vivo erfolgt. Für den Fachmann sollten diese und andere Verfahren zum Verabreichen eines Polypeptids der vorliegenden Erfindung durch ein solches Verfahren aus den Angaben der vorliegenden Erfindung ersichtlich sein. Z. B. kann es auch sein, dass das Expressionsvehikel zum gentechnischen Verändern von Zellen kein Retrovirus ist, sondern z. B. ein Adenovirus, das zur gentechnischen Veränderung von Zellen in vivo eingesetzt werden kann, nachdem es mit einem geeigneten Transportvehikel kombiniert wurde.

[0085] Die Sequenzen der vorliegenden Erfindung sind auch für die Identifizierung von Chromosomen nützlich. Die Sequenz steuert zielgerichtet spezifisch auf eine bestimmte Stelle auf einem einzelnen menschlichen Chromosom zu und kann damit hybridisieren. Außerdem besteht ein laufender Bedarf dafür, bestimmte Stellen auf dem Chromosom zu identifizieren. Zurzeit sind wenige Reagenzien zur Markierung von Chromosomen verfügbar, die auf den tatsächlichen Sequenzdaten basieren (Wiederholungs-Polymorphismen), mit denen eine chromosomale Lagebestimmung durchgeführt werden kann. Die Kartierung von DNAs auf Chromosomen gemäß der vorliegenden Erfindung ist ein wichtiger erster Schritt dahin, diese Sequenzen mit Genen zu korrelieren, die mit einer bestimmten Krankheit in Zusammenhang stehen.

[0086] Kurz gesagt können die Sequenzen auf bestimmten Chromosomen kartiert werden, indem aus der cDNA PCR-Primer hergestellt werden (vorzugsweise mit 15 bis 25 bp). Anhand einer Computeranalyse der cDNA können diejenigen Primer rasch selektiert werden, die in der genomischen DNA nicht mehr als ein Exon überspannen, wodurch der Amplifikationsprozess kompliziert wird. Danach werden diese Primer für ein PCR-Screening von Körperzell-Hybriden eingesetzt, die einzelne menschliche Chromosomen enthalten. Nur diejenigen Hybride, die das menschliche Gen enthalten, das dem Primer entspricht, werden sodann ein amplifiziertes Fragment ergeben.

[0087] Die PCR-Kartierung von Körperzell-Hybriden stellt ein schnelles Verfahren dar, mit dem eine bestimmte DNA einem bestimmten Chromosom zugewiesen werden kann. Unter Verwendung der vorliegenden Erfindung kann mit den gleichen Oligonucleotid-Primern in entsprechender Art und Weise eine Sub-Lokalisierung erreicht werden, indem Anordnungen von Fragmenten aus spezifischen Chromosomen oder Pools von großen genomischen Clonen verwendet werden. Andere Kartierungsstrategien, die genauso zur Lagebestimmung auf dem entsprechenden Chromosom eingesetzt werden können, umfassen die in situ-Hybridisierung, die Vor-Durchmusterung mit markierten Durchfluss-sortierten Chromosomen und die Vorauswahl durch Hybridisierung, so dass Chromosomenspezifische cDNA-Banken hergestellt werden können.

[0088] Unter Verwendung einer Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung (FISH) von cDNA-Clonen an einem Metaphasen-Chromosomenpräparat kann in einem Schritt die genaue Lage auf dem Chromosom ermittelt werden. Diese Technik eignet sich für eine kurze cDNA von 500 oder 600 Basen; jedoch besteht bei Clonen mit mehr als 2 000 bp eine größere Wahrscheinlichkeit, dass die Bindung an eine einmalige Stelle auf dem Chromosom bindet, wobei eine ausreichende Signalintensität für einen einfachen Nachweis bereitgestellt wird. Bei der FISH ist die Verwendung der Clone erforderlich, von welchen das EST stammt, und zwar je länger desto besser. Z. B. sind 2 000 bp gut, 4 000 bp sind besser, wobei möglicherweise nicht mehr als 4 000 bp erforderlich sind, um gute Ergebnisse in einem vernünftigen Zeitrahmen zu erhalten. Eine Übersicht über dieses Verfahren

findet sich in: Verma et al., „Human Chromosomes: A Manual of Basic Techniques", Pergamon Press, New York (1988).

[0089] Sobald eine Sequenz auf eine genaue Lage auf dem Chromosom kartiert wurde, kann die physikalische Position der Sequenz auf dem Chromosom mit den genetischen Kartendaten korreliert werden. Solche Daten finden sich z. B. in: V. McKusick, „Mendelian Inheritance in Man" (online verfügbar durch die Johns Hopkins University Welch Medical Library). Anschließend wird die Beziehung zwischen Genen und Krankheiten, die auf die gleiche Region auf dem Chromosom kartiert wurden, durch eine Kopplungsanalyse identifiziert (gemeinsame Vererbung von physikalisch nebeneinander liegenden Genen).

[0090] Als nächstes ist es erforderlich, die Unterschiede in der cDNA oder genomischen Sequenz zwischen betroffenen und nicht-betroffenen Individuen zu bestimmen. Wenn in einigen oder allen betroffenen Individuen eine bestimmte Mutation festgestellt wird, die in keinem normalem Individuum zu finden ist, ist es wahrscheinlich, dass die Krankheit durch die Mutation verursacht wird.

[0091] Mit der zurzeit üblichen Auflösung der Verfahren zur physikalischen und genetischen Markierung könnte eine cDNA, die genau auf eine mit der Krankheit in Zusammenhang stehende Region des Chromosoms lokalisiert wird, nur eines von 50 bis 500 möglichen auslösenden Genen identifizieren. (Wobei man von einer Auflösung der Kartierung von 1 Megabase und einem Gen pro 20 kb ausgeht.)

[0092] Die Polypeptide, ihre Fragmente oder andere Derivate oder Analoga davon oder Zellen, die sie exprimieren, können als Immunogen eingesetzt werden, um Antikörper dagegen zu erzeugen. Diese Antikörper können z. B. polyclonale oder monoclonale Antikörper sein. Die vorliegenden Erfindung umfasst auch chimäre, einzelkettige und humanisierte Antikörper, außerdem Fab-Fragmente oder das Produkt einer Fab-Expressionsbank. Für die Herstellung solcher Antikörper und Fragmente können verschiedenen Verfahren eingesetzt werden, die dem Fachmann bekannt sind.

[0093] Antikörper, die gegen die Polypeptide erzeugt werden, die einer Sequenz der vorliegenden Erfindung entsprechen, können erhalten werden, indem die Polypeptide direkt in ein Tier injiziert werden oder indem die Polypeptide an ein Tier verabreicht werden, wobei es sich vorzugsweise nicht um einen Menschen handelt. Der auf diese Weise erhaltene Antikörper bindet sodann an die Polypeptide selbst. Auf diese Weise kann sogar eine Sequenz, die nur ein Fragment der Polypeptide codiert, eingesetzt werden, um Antikörper zu erzeugen, die an die ganzen nativen Polypeptide binden. Anschließend kann das Polypeptid unter Verwendung solcher Antikörper aus dem Gewebe isoliert werden, das dieses Polypeptid exprimiert.

[0094] Zur Herstellung monoclonaler Antikörper kann eine beliebige Technik eingesetzt werden, durch die Antikörper anhand einer kontinuierlichen Zelllinie erzeugt werden. Beispiele umfassen die Hybridom-Technik (Köhler und Milstein, Nature 256: 495–497 (1975)), die Trioma-Technik, die menschliche B-Zell-Hybridom-Technik (Kozbor et al., Immunology Today 4: 72 (1983)) und die EBV-Hybridom-Technik zur Herstellung menschlicher monoclonaler Antikörper (Cole et al., 1985, in: „Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy", Alan R. Liss, Inc., S. 77–96).

[0095] Die zur Herstellung von einzelkettigen Antikörpern beschriebenen Verfahren (US Patent 4 946 778) können so angepasst werden, dass mit ihnen einzelkettige Antikörper gegen immunogene Polypeptidprodukte der vorliegenden Erfindung produziert werden können.

[0096] Die vorliegende Erfindung wird weiterhin mit Bezug auf die folgenden Beispiele beschrieben; es ist jedoch so zu verstehen, dass die vorliegende Erfindung nicht auf solche Beispiele beschränkt ist. Alle Anteile oder Mengen beziehen sich auf das Gewicht, sofern nichts anderes angegeben ist.

[0097] Um die folgenden Beispiele noch besser verständlich zu machen, werden nachstehend bestimmte häufig vorkommende Verfahren und/oder Begriffe erläutert.

[0098] „Plasmide" werden durch ein in Kleinbuchstaben geschriebenes p bezeichnet, vor und/oder hinter dem Großbuchstaben und/oder Ziffern stehen. Die hier am Anfang verwendeten Plasmide sind entweder im Handel oder öffentlich auf nicht eingeschränkter Basis verfügbar, oder sie können aus verfügbaren Plasmiden gemäß veröffentlichten Verfahren konstruiert werden. Außerdem sind gleichwertige Plasmide wie die beschriebenen nach dem Stand der Technik bekannt und dem Fachmann geläufig.

[0099] „Spaltung" einer DNA bezieht sich auf eine katalytische Spaltung der DNA mit einem Restriktionsen-

zym, das nur auf bestimmte Sequenzen in der DNA wirkt. Die verschiedenen Restriktionsenzyme, die hier verwendet werden, sind im Handel verfügbar, wobei die Reaktionsbedingungen, Cofaktoren und andere erforderliche Umstände so eingesetzt wurden, wie es dem Fachmann bekannt ist. Für analytische Zwecke wird typischerweise 1 µg Plasmid oder DNA-Fragment zusammen mit 2 Einheiten eines Enzyms in etwa 20 µl Pufferlösung verwendet. Für die Isolierung von DNA-Fragmenten zur Konstruktion von Plasmiden werden typischerweise 5 bis 50 µg DNA mit 20 bis 250 Einheiten Enzym in einem größeren Volumen verwendet. Geeignete Puffer und Substratmengen für bestimmte Restriktionsenzyme werden vom Hersteller vorgeschrieben. Normalerweise werden Inkubationszeiten von etwa einer Stunde bei 37°C verwendet, sie können jedoch gemäß den Angaben des Herstellers auch variieren. Nach der Spaltung wird das Reaktionsgemisch direkt einer Elektrophorese auf einem Polyacrylamid-Gel unterworfen, wodurch das gewünschte Fragment isoliert wird.

[0100] Die Größentrennung der gespaltenen Fragmente erfolgt unter Verwendung eines 8% Polyacrylamid-Gels, wie von Goeddel, D., et. al., Nucleic Acids Res. 8: 4057 (1980), beschrieben.

[0101] „Oligonucleotide" bezieht sich entweder auf ein einzelsträngiges Polydesoxynucleotid oder auf zwei komplementäre Polydesoxynucleotid-Stränge, die chemisch synthetisiert sein können. Solche synthetischen Oligonucleotide haben kein 5'-Phosphat und werden sich somit nicht mit einem anderen Oligonucleotid ligieren, ohne dass ein Phosphat mit einem ATP in Gegenwart einer Kinase angefügt wird. Ein synthetisches Oligonucleotid ligiert mit einem Fragment, das nicht dephosphoryliert wurde.

[0102] „Ligierung" bezieht sich auf den Prozess, bei dem Phosphodiester-Bindungen zwischen zwei doppelsträngigen Nucleinsäurefragmenten gebildet werden (Maniatis, T., et al., Id., S. 146). Soweit nichts anderes angegeben ist, kann eine Ligierung unter Verwendung bekannter Puffer und Bedingungen mit 10 Einheiten T4-DNA-Ligase („Ligase") pro 0,5 µg von etwa äquimolaren Mengen der zu ligierenden DNA-Fragmente durchgeführt werden.

[0103] Sofern nichts anderes angegeben ist, erfolgte die Transformation wie in den Verfahren von Graham, F., und Van der Eb, A., Virology 52: 456–457 (1973), beschrieben.

Beispiel 1

Bakterielle Expression und Reinigung von Ckβ-4

[0104] Die Ckβ-4 codierende DNA-Sequenz, ATCC # 75848, wird eingangs unter Verwendung von PCR-Oligonucleotid-Primern amplifiziert, die den 5'- und 3'-Sequenzen des prozessierten Ckβ-4-Proteins entsprechen (minus der mutmaßlichen Signalpeptid-Sequenz). Weitere Nucleotide, die dem Ckβ-4 entsprechen, wurden zu den 5'- bzw. 3'-Sequenzen zugefügt. Der 5'-Oligonucleotid-Primer hat die Sequenz 5'-CCCGCATGCAAGCAG-CAAGCAACTTT-3', enthält eine SphI-Restriktionsstelle (fett gedruckt), gefolgt von 17 Nucleotiden der codierenden Sequenz von Ckβ-4 (unterstrichen), die vom zweiten Nucleotid der Sequenzen aus beginnt, die das reife Protein codieren. Das Codon ATG ist in der SphI-Stelle enthalten. Im nächsten Codon, das auf ATG folgt, stammt die erste Base aus der SphI-Stelle, und die restlichen zwei Basen entsprechen der zweiten und dritten Base des ersten Codons des mutmaßlichen reifen Proteins. Folglich ist die erste Base in diesem Codon im Vergleich zu den ursprünglichen Sequenzen von G zu C verändert, dies führt im rekombinanten Protein zu einer Substitution von E zu Q. Die 3'-Sequenz, 5'-AAAGGATCCCATGTTCTTGACTTTTTTACT-3' enthält komplementäre Sequenzen zu einer BamHI-Stelle (fett gedruckt) und wird von 21 Nucleotiden von Genspezifischen Sequenzen gefolgt, die vor dem Terminations-Codon stehen. Die Restriktionsstellen entsprechen den Restriktionsstellen auf dem bakteriellen Expressionsvektor pQE-70 (Qiagen, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311). pQE-70 codiert eine Antibiotika-Resistenz (Amp^r), einen bakteriellen Replikationsursprung (ori), einen IPTG-regulierbaren Promotor-Operator (P/O), eine Ribosomenbindungsstelle (RBS), eine 6-His-Markierung und Restriktionsstellen. Anschließend wurde pQE-70 mit SphI und BamHI gespalten. Die amplifizierten Sequenzen wurden in pQE-70 ligiert und im Raster zusammen mit der Sequenz eingefügt, die die Histidin-Markierung und die RBS codiert. **Fig.** 8 zeigt eine schematische Darstellung dieser Anordnung. Danach wurde das Ligierungsgemisch für die Transformation des E. coli-Stamms eingesetzt, der von Qiagen unter dem Handelsnamen M15/rep 4 verfügbar ist, wobei das von Sambrook, J., et al., „Molecular Cloning, A Laboratory Manual", Cold Spring Laboratory Press, (1989), beschriebene Verfahren verwendet wurde. M15/rep4 enthält mehrere Kopien des Plasmids pREP4, das den lacI-Repressor exprimiert und außerdem eine Kanamycin-Resistenz (Kan^r) vermittelt. Die Transformanten können durch ihre Fähigkeit identifiziert werden, auf LB-Platten zu wachsen, wobei Ampicillin/Kanamycinresistente Kolonien selektiert werden. Die Plasmid-DNA wurde isoliert und durch Restriktionsanalyse bestätigt. Clone, die die gewünschten Konstrukte enthielten, wurden über Nacht (O/N) in Flüssigkultur in LB-Medien gezüchtet, die sowohl mit Amp (100 µg/ml) als

auch mit Kan (25 µg/ml) angereichert waren. Sodann wurde mit der O/N-Kultur eine große Kultur mit einem Verhältnis von 1 : 100 bis 1 : 250 beimpft. Die Zellen wurden bis zu einer optischen Dichte 600 (OD^{600}) von 0,4 bis 0,6 gezüchtet. Danach wurde IPTG („Isopropyl-B-D-thiogalactopyranosid") bis zu einer Endkonzentration von 1 mM zugegeben. IPTG induziert durch Inaktivierung des lacI-Repressors, wodurch der P/O außer Kraft gesetzt wird, was eine gesteigerte Genexpression zur Folge hat. Die Zellen wurden weitere drei bis vier Stunden gezüchtet. Danach wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet. Das Zellpellet wurde in dem chaotropen Mittel, 6 M Guanidin-HCl, solubilisiert. Nach der Klärung wurde das solubilisierte Ckβ-4 aus dieser Lösung durch Chromatographie auf einer Nickel-Chelat-Säule unter solchen Bedingungen gereinigt, die eine feste Bindung durch Proteine möglich machen, welche die 6-His-Markierung enthalten (Hochuli, E., et al., J. Chromatography 411: 177–184 (1984)). Ckβ-4 (> 98% rein) wurde in 6 M Guanidin-HCl bei pH 5,0 aus der Säule eluiert. Das Protein kann aus dem GnHCl durch verschiedene Verfahren renaturiert werden (Jaenicke, R., und Rudolph, R., „Protein Structure, A Practical Approach", IRL Press, New York (1990)). Zuerst wird ein Dialyseschritt eingesetzt, um das GnHCl zu entfernen. Andererseits kann das aus der Ni-Chelat-Säule isolierte gereinigte Protein auch an eine zweite Säule gebunden werden, über die ein abnehmender linearer GnHCl-Gradient laufen gelassen wird. Das Protein lässt man renaturieren, während es noch an die Säule gebunden ist, anschließend wird es dann mit einem Puffer eluiert, der 250 mM Imidazol, 150 mM NaCl, 25 mM Tris-HCl, pH 7,5, und 10% Glycerin enthält. Schließlich wird das lösliche Protein gegen einen Aufbewahrungspuffer dialysiert, der 5 mM Ammoniumbicarbonat enthält.

Beispiel 2

Expression eines rekombinanten Ckβ-4 in COS-Zellen

[0105] Die Expression des Plasmids, Ckβ-4-HA, wird aus einem Vektor pcDNAI/Amp (Invitrogen) hergeleitet, der die folgenden Bestandteile enthält: 1) Replikationsursprung von SV40, 2) Ampicillin-Resistenz-Gen, 3) Replikationsursprung von E. coli, 4) CMV-Promotor, gefolgt von einer Polylinker-Region, einem SV40-Intron und einer Polyadenylierungsstelle. Ein DNA-Fragment, das den gesamten Ckβ-4-Vorläufer codiert, und eine HA-Markierung, die im Raster mit seinem 3'-Ende fusioniert war, wurde in die Polylinker-Region des Vektors cloniert, somit wird die Expression des rekombinanten Proteins durch den CMV-Promotor gesteuert. Die HA-Markierung entspricht einem Epitop, das aus dem Influenza-Hämagglutinin-Protein stammt, wie früher beschrieben (I. Wilson, H. Niman, R. Heighten, A. Cherenson, M. Connolly und R. Lerner, Cell 37: 767 (1984)). Durch den Einbau der HA-Markierung in das Zielprotein wird ein einfacher Nachweis des rekombinanten Proteins mit einem Antikörper möglich gemacht, der das HA-Epitop erkennt.

[0106] Die Strategie zur Konstruktion des Plasmids lässt sich wie folgt beschreiben:

[0107] Die DNA-Sequenz, die das Ckβ-4 codiert, ATCC # 75848, wurde durch PCR auf dem ursprünglichen clonierten EST konstruiert, wobei die zwei folgenden Primer verwendet wurden: der 5'-Primer 5'-GGAAAGCTTATGTGCTGTACCAAGAGTTT-3' enthält eine HindIII-Stelle, gefolgt von 20 Nucleotiden der codierenden Sequenz von Ckβ-4, beginnend mit dem Initiations-Codon; die 3'-Sequenz 5'-CGCTCTAGATTAAGCGTAGTCTGGGACGTCGTATGGGTAACATGGTTCCTTGAC TTTTT-3' enthält komplementäre Sequenzen zu der XbaI-Stelle, ein Translations-Stopp-Codon, eine HA-Markierung und die letzten 20 Nucleotide der codierenden Sequenz von Ckβ-4 (nicht einschließlich des Stopp-Codons). Deshalb enthält das PCR-Produkt eine HindIII-Stelle, die Ckβ-4-codierenden Sequenz, gefolgt von einer im Raster fusionierten HA-Markierung, einem Translations-Terminations-Stopp-Codon direkt neben der HA-Markierung und einer XbaI-Stelle. Das PCR-amplifizierte DNA-Fragment und der Vektor pcDNAI/Amp wurden mit den Restriktionsenzymen HindIII und XbaI gespalten und ligiert. Das Ligierungsgemisch wurde in den E. coli Stamm SURE (erhältlich von Stratagene Cloning Systems, 11099 North Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037) transformiert, die transformierte Kultur wurde auf Platten mit Ampicillin-Medium plattiert und die resistenten Kolonien selektiert. Die Plasmid-DNA wurde aus den Transformanten isoliert und durch Restriktionsanalyse auf das Vorliegen des korrekten Fragments untersucht. Zur Expression des rekombinanten Ckβ-4 wurden COS-Zellen mit dem Expressionsvektor durch das DEAE-Dextran-Verfahren transfiziert (J. Sambrook, E. Fritsch, T. Maniatis, „Molecular Cloning: A.

[0108] Laboratory Manual", Cold Spring Laboratory Press, (1989)). Die Expression des Ckβ-4-HA-Proteins wurde durch eine Radiomarkierung und anhand eines Immunfällungsverfahrens nachgewiesen (E. Harlow, D. Lane, „Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1988)). Die Zellen wurden zwei Tage nach der Transfektion acht Stunden mit ^{35}S-Cystein markiert. Danach wurden die Kulturmedien gewonnen und die Zellen mit Detergens lysiert (RIPA-Puffer, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0,1% SDS, 1% NP-40, 0,5% DOC, 50 mM Tris, pH 7,5), (Wilson, I., et al., Id., 37: 767 (1984)). Sowohl das Zelllysat als auch die Kul-

turmedien wurden mit einem HA-spezifischen monoclonalen Antikörper gefällt. Die gefällten Proteine wurden durch SDS-PAGE analysiert.

[0109] Anhand der vorstehenden Angaben sind zahlreiche Modifikationen und Variationen der vorliegenden Erfindung möglich und liegen deshalb im Umfang der beiliegenden Patentansprüche, somit kann die Erfindung auch anders als hier beschrieben durchgeführt werden.

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER: Li, et al.

(ii) TITEL DER ERFINDUNG: Menschliche Chemokin-Polypeptide

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 2

(iv) KORRESPONDENZADRESSE:

(A) NAME: Carella, Byrne, Bain, Gilfillan, Cecchi, Stewart & Olstein

(B) STRASSE: 6 Becker Farm Road

(C) STADT: Roseland

(D) STAAT: New Jersey

(E) LAND: USA

(F) POSTLEITZAHL: 07068

(v) COMPUTERLESBARE FORM:

(A) ART DES MEDIUMS: Diskette, 3,5“

(B) COMPUTER: IBM PS/2

(C) BETRIEBSSYSTEM: MS-DOS

(D) SOFTWARE: Word Perfect 5.1

(vi) DERZEITIGE ANMELDUNGSDATEN:

(A) ANMELDUNGSNUMMER:

(B) TAG DER ANMELDUNG: Hiermit unterbreitet

(C) KLASSIFIZIERUNG:

(vii) FRÜHERE ANMELDUNGSDATEN:

(A) ANMELDUNGSNUMMER:

(B) TAG DER ANMELDUNG:

(viii) ANGABEN ZU ANWALT/VERTRETER:

(A) NAME: Ferraro, Gregory D.

(B) REGISTRIERUNGS-NUMMER: 36 134

(C) REFERENZ/DOCKET-NUMMER: 325800-183

(ix) ANGABEN ZU TELEKOMMUNIKATION:

(A) TELEFON: 201-994-1700

(B) TELEFAX: 201-994-1744

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) EIGENSCHAFTEN DER SEQUENZ:

(A) LÄNGE: 291 Basenpaare

(B) ART: Nucleinsäure

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

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

```
ATGTGCTGTA CCAAGAGTTT GCTCCTGGCT GCTTTGATGT CAGTGCTGCT ACTCCACCTC   60
TGCGGCGAAT CAGAAGCAGC AAGCAACTTT GACTGCTGTC TTGGATACAC AGACCGTATT  120
CTTCATCCTA AATTTATTGT GGGCTTCACA CGGCAGCTGG CCAATGAAGG CTGTGACATC  180
AATGCTATCA TCTTTCACAC AAAGAAAAAG TTGTCTGTGT GCGCAAATCC AAAACAGACT  240
TGGGTGAAAT ATATTGTGCG TCTCCTCAGT AAAAAAGTCA AGAACATGTA A           291
```

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) EIGENSCHAFTEN DER SEQUENZ:

(A) LÄNGE: 96 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRANGFORM:

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO: 2:

```
Met Cys Cys Thr Lys Ser Leu Leu Leu Ala Ala Leu Met Ser Val
               -20                 -15                 -10
Leu Leu Leu His Leu Cys Gly Glu Ser Glu Ala Ala Ser Asn Phe
                -5                   1                   5
Asp Cys Cys Leu Gly Tyr Thr Asp Arg Ile Leu His Pro Lys Phe
            10                  15                  20
Ile Val Gly Phe Thr Arg Gln Leu Ala Asn Glu Gly Cys Asp Ile
            25                  30                  35
Asn Ala Ile Ile Phe His Thr Lys Lys Lys Leu Ser Val Cys Ala
            40                  45                  50
Asn Pro Lys Gln Thr Trp Val Lys Tyr Ile Val Arg Leu Leu Ser
            55                  60                  65
Lys Lys Val Lys Asn Met
            70
```

Patentansprüche

1. Isoliertes Polynucleotid, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus

(a) Polynucleotiden, die mindestens die reife Form des Polypeptids mit der abgeleiteten Aminosäuresequenz, wie in **Fig.** 1 dargestellt, codieren;

(b) Polynucleotiden, die die codierende Sequenz wie in **Fig.** 1 dargestellt haben, die mindestens die reife Form des Polypeptids codiert;

(c) Polynucleotiden, die das Polypeptid codieren, das die Aminosäuresequenz von mindestens der reifen Form des Polypeptids hat, das durch die in ATCC 75848 enthaltene cDNA codiert wird;

(d) Polynucleotiden, die die codierende Sequenz der in ATCC 75848 enthaltenen cDNA haben, codierend für mindestens die reife Form des Polypeptids;

(e) Polynucleotiden, die ein Fragment eines Polypeptids codieren, das durch ein Polynucleotid nach einem von (a) bis (d) codiert wird, wobei das Fragment Ckβ-4 Aktivität hat; und

(f) Polynucleotiden, die mindestens 95% Sequenzidentität mit einem wie in einem von (a) bis (e) definierten Polynucleotid haben und welche ein Polypeptid codieren, das Ckβ-4 Aktivität hat;

oder der komplementäre Strang eines solchen Polynucleotids.

2. Polynucleotid nach Anspruch 1, das eine DNA ist.

3. DNA nach Anspruch 2, die eine genomische DNA ist.

4. Polynucleotid nach Anspruch 1, das eine RNA ist.

5. Vektor, der das Polynucleotid nach einem der Ansprüche 1 bis 4 enthält.

6. Vektor nach Anspruch 5, wobei das Polynucleotid mit Expressionskontrollsequenzen funktionell verbunden ist, die die Expression in prokaryontischen oder eukaryontischen Wirtszellen gestatten.

7. Wirtszelle, die mit dem Polynucleotid nach einem der Ansprüche 1 bis 4 oder dem Vektor nach Anspruch 5 oder 6 genetisch verändert wurde.

8. Verfahren zur Herstellung eines Polypeptids mit Ckβ-4 Aktivität, umfassend: das Züchten der Wirtszelle nach Anspruch 7 und Gewinnen des von dem Polynucleotid codierten Polypeptids aus der Kultur.

9. Verfahren zur Herstellung von Zellen, die in der Lage sind, ein Polypeptid mit Ckβ-4 Aktivität zu exprimieren, umfassend die genetische Veränderung von Zellen mit dem Vektor nach Anspruch 5 oder 6.

10. Polypeptid mit der Aminosäuresequenz, die von einem Polynucleotid nach einem der Ansprüche 1 bis 4 codiert wird oder erhältlich ist durch das Verfahren nach Anspruch 8.

11. Antikörper, der spezifisch für das Polypeptid nach Anspruch 10 ist.

12. Antagonist/Inhibitor gegen das Polypeptid nach Anspruch 10, wobei der Antagonist/Inhibitor ein Antikörper nach Anspruch 11 oder ein Antisense-Konstrukt ist, das spezifisch mit Transcripten eines Polynucleotids nach einem der Ansprüche 1 bis 4 hybridisiert.

13. Arzneimittel, umfassend das Polynucleotid nach einem der Ansprüche 1 bis 4, das Polypeptid nach Anspruch 10 oder den Antagonist/Inhibitor nach Anspruch 12 und gegebenenfalls einen pharmazeutisch verträglichen Träger.

14. Diagnostische Zusammensetzung, umfassend das Polynucleotid nach einem der Ansprüche 1 bis 4.

15. Verwendung des Polypeptids nach Anspruch 10 oder des Polynucleotids nach einem der Ansprüche 1 bis 4 für die Herstellung eines Arzneimittels für die schützende Behandlung während Krebs-Chemotherapie, und für Leukämie, für die Behandlung von Psoriasis, solider Tumoren, Autoimmunkrankheiten, lymphatischer Leukämie, fibrotischer Störungen, zur Wundheilung, zur Abwehr gegen resistente chronische Infektionen, zum Abtöten von Larven von Parasiten, zur Regulation der Hämatopoese, zur Hemmung der Angiogenese, zur Behandlung von Asthma oder Allergie.

16. Verwendung des Antagonisten/Inhibitors nach Anspruch 12 für die Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Autoimmunkrankheiten, chronischen entzündlichen und infektiösen Krankheiten.

Es folgen 2 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

Fig. 1

```
ATGTGCTGTACCAAGAGTTTGCTCCTGGCTGCTTTGATGTCAGTGCTGCTACTCCACCTC
M  C  C  T  K  S  L  L  L  A  A  L  M  S  V  L  L  L  L  H  L

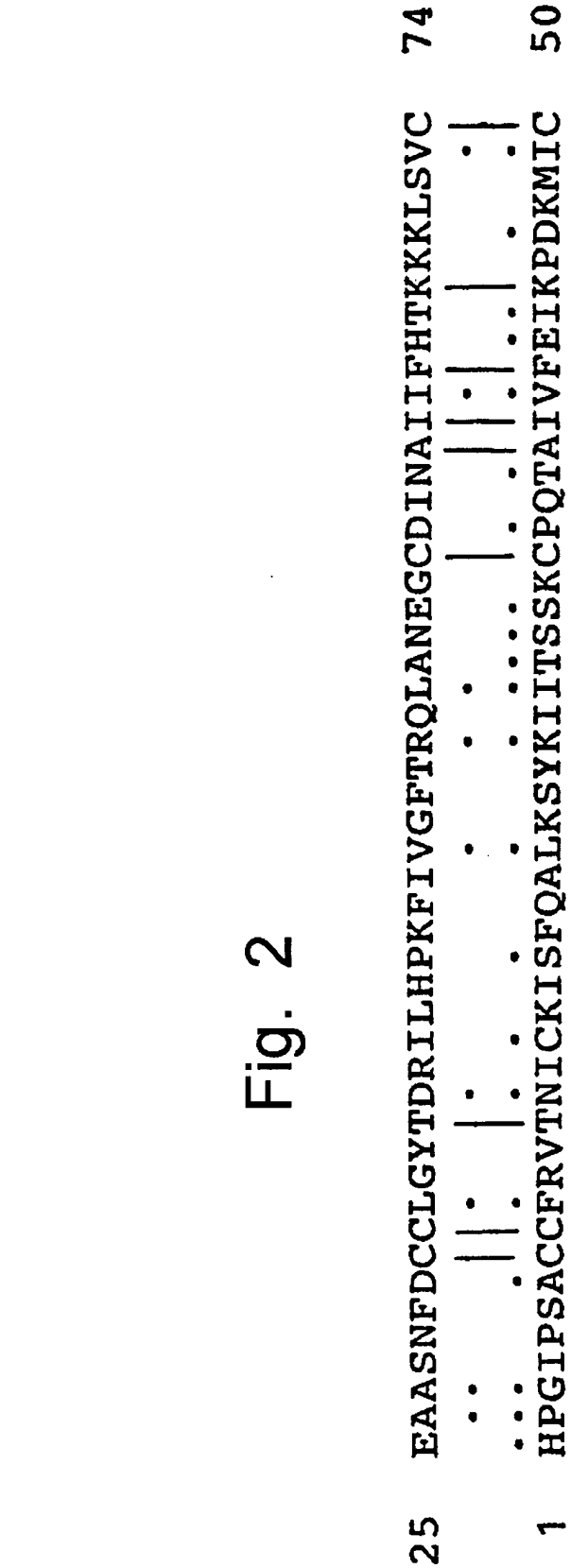
TGCGGCGAATCAGAAGCAGCAAGCAACTTTGACTGCTGTCTTGGATACACAGACCGTATT
C  G  E  S  E  A  A  S  N  F  D  C  C  L  G  Y  T  D  R  I

CTTCATCCTAAATTTATTGTGGGCTTCACACGGCAGCTGGCCAATGAAGGCTGTGACATC
L  H  P  K  F  I  V  G  F  T  R  Q  L  A  N  E  G  C  D  I

AATGCTATCATCTTTCACACAAAGAAAAAAGTTGTCTGTGTGCGCAAATCCAAAACAGACT
N  A  I  I  F  H  T  K  K  K  L  S  V  C  A  N  P  K  Q  T

TGGGTGAAATATATTGTGCGTCTCCTCAGTAAAAAAGTCAAGAACATGTAA
W  V  K  Y  I  V  R  L  L  S  K  K  V  K  N  M  *
```

Fig. 2


25 EAASNFDCCLGYTDRILHPKFIVGFTRQLANEGCDINAIIFHTKKKLSVC 74
1 HPGIPSACCFRVTNICKISFQALKSYKIITSSKCPQTAIVFEIKPDKMIC 50
75 ANPKQTWVKYIVRLLSKKVK 94
51 ADPRXXWVQDAKKYLDQISQ 70