PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro

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

(51) Internationale Patentklassifikation 6 :
C12N 15/24, C07K 14/54, C12N 1/21, A61K 38/19, C07K 16/24, C12N 5/10

A1

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/41231

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 6. November 1997 (06.11.97)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP97/02216

(22) Internationales Anmeldedatum: 30. April 1997 (30.04.97)

(30) Prioritätsdaten:

196 17 202.0	30. April 1996 (30.04.96)	DE
196 17 203.9	30. April 1996 (30.04.96)	DE

(71) Anmelder *(für alle Bestimmungsstaaten ausser US)*: BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND vertreten durch DEN BUNDESMINISTER FÜR GESUNDHEIT [DE/DE]; D-53108 Bonn (DE). BOEHRINGER MANNHEIM GMBH [DE/DE]; Sandhofer Strasse 112-116, D-68305 Mannheim (DE).

(72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder *(nur für US)*: KURTH, Reinhard [DE/DE]; Erlenweg 4, D-63303 Dreieich (DE). BAIER, Michael [DE/DE]; Eckenheimer Landstrasse 57a, D-60318 Frankfurt (DE). BANNERT, Norbert [DE/DE]; Adickesallee 13, D-60322 Frankfurt (DE). WERNER, Albrecht [DE/DE]; Prankelstrasse 30, D-69469 Weinheim (DE). LANG, Kurt [DE/DE]; Langoner Strasse 10, D-82377 Penzberg (DE).

(74) Anwalt: GRUSSDORF, Jürgen; Zellentin & Partner, Rubensstrasse 30, D-67061 Ludwigshafen (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, ARIPO Patent (GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht
Mit internationalem Recherchenbericht.
Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.

(54) Title: PROCESSED POLYPEPTIDES WITH IL-16 ACTIVITY, PROCESS FOR PREPARING THE SAME AND THEIR USE

(54) Bezeichnung: PROZESSIERTE POLYPEPTIDE MIT IL-16-AKTIVITÄT, VERFAHREN ZU IHRER HERSTELLUNG UND VERWENDUNG

(57) Abstract

A nucleic acid makes it possible to express a polypeptide with interleukin-16 activity in a procaryotic or eucaryotic host cell. Said nucleic acid codes for a polypeptide with the amino acid sequence SEQ ID NO:2 or for a SEQ ID NO:2 elongated at the N-terminus by an aspartic acid radical or shortened at the C-terminus by up to 8 amino acids. This nucleic acid is useful for producing an active IL-16 polypeptide.

(57) Zusammenfassung

Eine Nukleinsäure, mit welcher die Expression eines Polypeptids mit Interleukin-16-Aktivität in einer prokaryontischen oder eukaryontischen Wirtszelle erreicht werden kann, wobei die genannte Nukleinsäure für ein Polypeptid mit der Aminosäuresequenz SEQ ID NO:2 oder einer N-terminal um einen Asparaginsäurerest verlängerten SEQ ID NO:2 oder einer am C-Terminus um bis zu 8 Aminosäuren verkürzten Form davon codiert, ist zur Herstellung eines aktiven IL-16-Polypeptids geeignet.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien
AM	Armenien
AT	Österreich
AU	Australien
AZ	Aserbaidschan
BA	Bosnien-Herzegowina
BB	Barbados
BE	Belgien
BF	Burkina Faso
BG	Bulgarien
BJ	Benin
BR	Brasilien
BY	Belarus
CA	Kanada
CF	Zentralafrikanische Republik
CG	Kongo
CH	Schweiz
CI	Côte d'Ivoire
CM	Kamerun
CN	China
CU	Kuba
CZ	Tschechische Republik
DE	Deutschland
DK	Dänemark
EE	Estland
ES	Spanien
FI	Finnland
FR	Frankreich
GA	Gabun
GB	Vereinigtes Königreich
GE	Georgien
GH	Ghana
GN	Guinea
GR	Griechenland
HU	Ungarn
IE	Irland
IL	Israel
IS	Island
IT	Italien
JP	Japan
KE	Kenia
KG	Kirgisistan
KP	Demokratische Volksrepublik Korea
KR	Republik Korea
KZ	Kasachstan
LC	St. Lucia
LI	Liechtenstein
LK	Sri Lanka
LR	Liberia
LS	Lesotho
LT	Litauen
LU	Luxemburg
LV	Lettland
MC	Monaco
MD	Republik Moldau
MG	Madagaskar
MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien
ML	Mali
MN	Mongolei
MR	Mauretanien
MW	Malawi
MX	Mexiko
NE	Niger
NL	Niederlande
NO	Norwegen
NZ	Neuseeland
PL	Polen
PT	Portugal
RO	Rumänien
RU	Russische Föderation
SD	Sudan
SE	Schweden
SG	Singapur
SI	Slowenien
SK	Slowakei
SN	Senegal
SZ	Swasiland
TD	Tschad
TG	Togo
TJ	Tadschikistan
TM	Turkmenistan
TR	Türkei
TT	Trinidad und Tobago
UA	Ukraine
UG	Uganda
US	Vereinigte Staaten von Amerika
UZ	Usbekistan
VN	Vietnam
YU	Jugoslawien
ZW	Zimbabwe

Prozessierte Polypeptide mit IL-16-Aktivität, Verfahren zu ihrer Herstellung und Verwendung

Gegenstand der Erfindung sind Polypeptide mit IL-16-Aktivität, Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Verwendung. Die Erfindung beschreibt prozessiertes IL-16 mit hoher Aktivität.

IL-16 (Interleukin-16) ist ein Lymphokin, welches auch als "lymphocyte chemoattracting factor" (LCF) oder "immunodeficiency virus suppressing lymphokine" (ISL) bezeichnet wird. IL-16 und seine Eigenschaften sind in der WO 94/28134 und der WO 96/31607 sowie von Cruikshank, W.W., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 (1994) 5109-5113 und von Baier, M., et al., Nature 378 (1995) 563 beschrieben. Dort ist auch die rekombinante Herstellung von IL-16 beschrieben. Danach ist IL-16 ein Protein mit einer molekularen Masse von 13,385 D. Von Cruikshank wurde ebenfalls gefunden, daß ISL in einer Molekularsiebchromatographie als multimere Form mit einem Molekulargewicht von 50-60 bzw. 55-60 kD eluiert. Dieser multimeren Form, welche ein kationisches Homotetramer ist (Produktinformation AMS Biotechnology Ltd., Europe, Cat. No. 11177186), wird die "chemoattractant activity" zugeschrieben. Von Baier wird eine homodimere Form von IL-16 mit einem Molekulargewicht von 28 kD beschrieben. Die von Cruikshank et al. in J. Immunol. 146 (1991) 2928-2934 beschriebene "chemoattractant activity" und die von Baier beschriebene Aktivität von rekombinantem humanem IL-16 sind jedoch sehr gering.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, die Aktivität von IL-16 zu verbessern und IL-16-Formen bereitzustellen, die geringe Immunogenität zeigen und vorteilhaft für eine therapeutische Anwendung geeignet sind.

Die Aufgabe der Erfindung wird gelöst durch eine Nukleinsäure, mit welcher die Expression eines Polypeptids mit Interleukin-16-Aktivität in einer prokaryontischen oder eukaryontischen Wirtszelle erreicht werden kann, wobei die genannte Nukleinsäure

a) der DNA-Sequenz SEQ ID NO:1 oder einer DNA, die am 5'-Ende um ein Asparaginsäurecodon (GAC) verlängert ist oder ihrem komplementären Strang entspricht,
b) mit der DNA der Sequenz SEQ ID NO:1 oder einer DNA, die am 5'-Ende um ein Asparaginsäurecodon verlängert ist, unter stringenten Bedingungen hybridisiert,

c) oder eine Nukleinsäuresequenz, die ohne die Degeneration des genetischen Codes mit den durch a) und b) definierten Nukleinsäuresequenzen unter stringenten Bedingungen hybridisieren würde

d) und am 5'-Ende für eine der Aminosäuresequenzen SEQ ID NO:7 bis 10 oder für analoge Sequenzen, die N-terminal um eine Asparaginsäure verlängert sind, codiert.

Vorzugsweise codiert eine solche Nukleinsäure für ein Polypeptid mit der Aminosäuresequenz SEQ ID NO:2 oder für ein Polypeptid mit einer Sequenz, die gegenüber SEQ ID NO:2 N-terminal um ein Asparaginsäurecodon verlängert ist. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform codiert die Nukleinsäure für ein Polypeptid mit IL-16-Aktivität, welches am C-Terminus um bis zu 8 Aminosäuren verkürzt ist.

Eine solche Nukleinsäure codiert ein prozessiertes Polypeptid mit IL-16-Aktivität, besonders bevorzugt natürliches IL-16 von Primaten, wie humanes IL-16 oder IL-16 einer Affenart oder eines anderen Säugetiers, wie z.B. Maus.

Es hat sich überraschenderweise gezeigt, daß Fig. 2 der WO 94/28134 nicht das korrekt prozessierte IL-16 beschreibt. Das Startcodon "ATG" der precursor-Form des Proteins beginnt nicht mit Nukleotid 783, sondern mit Nukleotid 54 oder 174. Dieser Leserahmen ergibt sich, wenn nach Nukleotid 156 ein A, nach Nukleotid 398 ein C und nach Nukleotid 780 ein G eingefügt wird. Die Sequenz zeigt noch weitere Unterschiede zu Fig. 2 der WO 94/28134. Dabei handelt es sich z. B. um Nukleotidaustausche (313 G in A, 717 C in A). Bei der Expression in eukaryontischen Zellen wird IL-16 prozessiert. Dabei entsteht ein Polypeptid gemäß SEQ ID NO:2 und/oder ein Polypeptid mit einer Sequenz, die gegenüber SEQ ID NO:2 N-terminal um eine Asparaginsäure verlängert ist. Die Kenntnis des prozessierten IL-16 erlaubt die Herstellung von IL-16 und Derivaten mit hoher Aktivität und geringer Immunogenität.

IL-16 kann sich in seiner Sequenz von den von solchen DNA-Sequenzen codierten Proteinsequenzen in gewissem Umfang unterscheiden. Solche Sequenzvariationen können Aminosäureaustausche, -deletionen oder -additionen sein. Vorzugsweise ist die Aminosäuresequenz von IL-16 jedoch zu wenigstens 75%, besonders bevorzugt zu wenigstens 90% identisch mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID NO:2. Varianten von Teilen der Amino- und Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:2 sind beispielsweise in der WO 96/31607 und den internationalen Patentanmeldungen PCT/EP96/05662 und PCT/EP96/05661 beschrieben. Wesentlich ist jedoch, daß die Polypeptide einen korrekten N-Terminus besitzen. Bevorzugt sind demnach Proteine, in denen die ersten drei bis zehn Aminosäuren des N-Terminus unver-

ändert sind und damit N-terminal mit den Aminosäuresequenzen SEQ ID NO:6 bis 8 bzw. mit analogen Sequenzen, die N-terminal noch um einen Asparaginsäurerest verlängert sind, beginnen. Ebenfalls bevorzugt sind Proteine, die am C-Terminus um bis zu 8 Aminosäuren verkürzt sind.

Unter Nukleinsäuren im Sinne der Erfindung sind beispielsweise DNA, RNA und Nukleinsäurederivate und -Analoga zu verstehen. Bevorzugte Nukleinsäure-Analoga sind solche Verbindungen, bei denen das Zuckerphosphatgerüst durch andere Einheiten, wie z.B. Aminosäuren, ersetzt ist. Solche Verbindungen werden als PNA bezeichnet und sind in der WO 92/20702 beschrieben. Da beispielsweise PNA-DNA-Bindungen stärker als DNA-DNA-Bindungen sind, sind die nachstehend beschriebenen stringenten Bedingungen für PNA-DNA-Hybridisierung nicht anwendbar. Geeignete Hybridisierungsbedingungen sind jedoch in der WO 92/20703 beschrieben.

Unter dem Ausdruck "IL-16" ist im Sinne der Erfindung ein Polypeptid mit der Aktivität von IL-16 zu verstehen. Vorzugsweise zeigt IL-16 in dem in der WO 96/31607 beschriebenen Testverfahren die genannte Wirkung oder stimuliert die Zellteilung gemäß WO 94/28134.

IL-16 bindet an $CD4^+$ Lymphozyten und kann die Replikation von Viren, wie beispielsweise HIV-1, HIV-2 und SIV supprimieren. Die Funktion von IL-16 ist nicht durch seine Präsentation im MHC-Komplex limitiert.

Insbesondere zeigt IL-16 eine oder mehrere der folgenden Eigenschaften:

- Bindung an T-Zellen über den CD4-Rezeptor,
- Stimulierung der Expression von IL-2-Rezeptor und/oder HLA-DR-Antigen auf $CD4^+$-Lymphozyten,
- Stimulierung der Proliferation von T-Helferzellen in Gegenwart von IL-2,
- Suppression der Proliferation von mit Anti-CD3-Antikörpern stimulierten T-Helferzellen,
- Suppression der Replikation von Viren, vorzugsweise von HIV-1, HIV-2 oder SIV.

Bevorzugt sind Nukleinsäuren, die unter stringenten Bedingungen mit Nukleinsäuren der Sequenz SEQ ID NO:1 hybridisieren. Der Ausdruck "unter stringenten Bedingungen hybridisieren" bedeutet, daß zwei Nukleinsäurefragmente unter standardisierten Hybridisierungs-

bedingungen miteinander hybridisieren, wie beispielsweise beschrieben in Sambrook et al., "Expression of cloned genes in E. coli" in Molecular Cloning: A laboratory manual (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA. Solche Bedingungen sind beispielsweise Hybridisierung in 6,0 x SSC bei etwa 45°C, gefolgt durch einen Waschschritt bei 2 x SSC bei 50°C. Zur Auswahl der Stringenz kann die Salzkonzentration im Waschschritt beispielsweise zwischen 2,0 x SSC bei 50°C für geringe Stringenz und 0,2 x SSC bei 50°C für hohe Stringenz gewählt werden. Zusätzlich kann die Temperatur des im Waschschritt zwischen Raumtemperatur, ca. 22°C, für geringe Stringenz und 65°C bei hoher Stringenz variiert werden.

IL-16 wird vorzugsweise rekombinant in prokaryontischen oder eukaryontischen Wirtszellen hergestellt. Derartige Herstellverfahren sind beispielsweise beschrieben in WO 94/28134 und WO 96/31607, die auch hierfür Gegenstand der Offenbarung der vorliegenden Erfindung sind. Um allerdings die erfindungsgemäßen Formen von IL-16 durch rekombinante Herstellung definiert und reproduzierbar zu erhalten, müssen über die dem Fachmann geläufigen Verfahren zur rekombinanten Herstellung zusätzliche Maßnahmen ergriffen werden.

Die Herstellung von rekombinantem IL-16 kann nach den dem Fachmann geläufigen Methoden als heterologe Expression oder als homologe Expression (nach homologer Rekombination der IL16 Nukleinsäure ins Genom des Wirtsorganismus) erfolgen. Dazu wird zunächst eine DNA hergestellt, welche in der Lage ist, ein Protein zu produzieren, welches die Aktivität von IL-16 besitzt. Die DNA wird in einen Vektor kloniert, der in eine Wirtszelle transferiert werden kann und dort replizierbar ist. Ein derartiger Vektor enthält zusätzlich zur IL-16-Sequenz Regulator-Elemente, die zur Expression der DNA-Sequenz erforderlich sind. Dieser Vektor, der die IL-16-Sequenz und die Regulator-Elemente enthält, wird in einen Vektor transferiert, der in der Lage ist, die DNA von IL-16 zu exprimieren. Die Wirtszelle wird unter Bedingungen, die zur Amplifikation des Vektors geeignet sind, kultiviert und IL-16 gewonnen. Dabei wird durch geeignete Maßnahmen sichergestellt, daß das Protein eine aktive tertiäre Struktur einnehmen kann, in der es IL-16-Eigenschaften zeigt.

Auch die Nukleinsäuresequenz des Proteins kann modifiziert sein. Derartige Modifikationen sind beispielsweise:

- Veränderung der Nukleinsäure, um verschiedene Erkennungssequenzen von Restriktionsenzymen zur Erleichterung der Schritte der Ligation, Klonierung und Mutagenese einzuführen

- Veränderung der Nukleinsäure zum Einbau von bevorzugten Codons für die Wirtszelle

- Ergänzung der Nukleinsäure um zusätzliche Operator-Elemente, um die Expression in der Wirtszelle zu optimieren.

Die Expression des Proteins erfolgt vorzugsweise in Mikroorganismen, insbesondere in Prokaryonten, und dort in E. coli. Die Expression in Prokaryonten führt zu einem unglycosylierten Polypeptid.

Die Expressionsvektoren müssen einen Promotor enthalten, der die Expression des Proteins im Wirtsorganismus erlaubt. Derartige Promotoren sind dem Fachmann bekannt und sind beispielsweise lac Promotor (Chang et al., Nature 198 (1977) 1056), trp Promotor (Goeddel et al., Nuc. Acids Res. 8 (1980) 4057), λ_{PL} Promotor (Shimatake et al., Nature 292 (1981) 128) und T5 Promotor (US-Patent Nr. 4,689,406). Ebenfalls geeignet sind synthetische Promotoren wie beispielsweise tac Promotor (US-Patent Nr. 4,551,433). Ebenso geeignet sind gekoppelte Promotorsysteme wie beispielsweise T7-RNA-Polymerase/Promotorsystem (Studier et al., J. Mol. Biol. 189 (1986) 113). Ebenso geeignet sind hybride Promotoren aus einem Bacteriophagen-Promotor und der Operator-Region des Mikroorganismus (EP-A 0 267 851). Zusätzlich zum Promotor ist eine effektive Ribosomenbindungsstelle erforderlich. Für E. coli wird diese Ribosomenbindungsstelle als Shine-Dalgarno (SD)-Sequenz bezeichnet (Sambrook et al., "Expression of cloned genes in E. coli" in Molecular Cloning: A laboratory manual (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA).

Zur Verbesserung der Expression ist es möglich, das Protein als Fusionsprotein zu exprimieren. In diesem Fall wird üblicherweise eine DNA-Sequenz, welche für den N-terminalen Teil eines endogenen bakteriellen Proteins oder ein anderes stabiles Protein codiert, an das 5'-Ende der für IL-16 codierenden Sequenz fusioniert. Beispiele hierfür sind beispielsweise lacZ (Phillips and Silhavy, Nature 344 (1990) 882-884), trpE (Yansura, Meth. Enzymol. 185 (1990) 161 - 166).

Nach Expression des Vektors, vorzugsweise eines biologisch funktionellen Plasmids oder eines viralen Vektors, werden die Fusionsproteine vorzugsweise mit Enzymen (z.B. Faktor Xa) gespalten (Nagai et al., Nature 309 (1984) 810). Weitere Beispiele für Spaltstellen sind die IgA-Protease-Spaltstelle (WO 91/11520, EP-A 0 495 398), die Ubiquitin-Spaltstelle (Miller et al., Bio/Technology 7 (1989) 698) und die Enterokinase-Spaltstelle.

Die auf diese Weise in Bakterien exprimierten Proteine werden durch Aufschluß der Bakterien und Proteinisolierung in üblicher Weise gewonnen.

In einer weiteren Ausführungsform ist es möglich, die Proteine als aktive Proteine aus den Mikroorganismen zu sezernieren. Hierzu wird vorzugsweise ein Fusionsprodukt verwendet, welches aus der Signalsequenz, die für die Sekretion von Proteinen in den verwendeten Wirtsorganismen geeignet ist, und der Nukleinsäure, welche für das Protein codiert, besteht. Das Protein wird dabei entweder in das Medium (bei grampositiven Bakterien) oder in den periplasmatischen Raum (bei gramnegativen Bakterien) sezerniert. Zwischen der Signalsequenz und der für IL-16 codierenden Sequenz ist zweckmäßig eine Spaltstelle angebracht, die entweder bei der Prozessierung oder in einem zusätzlichen Schritt die Abspaltung des Proteins erlaubt. Derartige Signalsequenzen stammen beispielsweise von ompA (Ghrayeb et al., EMBO J. 3 (1984) 2437), phoA (Oka et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 (1985) 7212).

Zusätzlich enthalten die Vektoren noch Terminatoren. Terminatoren sind DNA-Sequenzen, die das Ende eines Transkriptionsvorganges signalisieren. Sie zeichnen sich meist durch zwei strukturelle Eigenarten aus: eine umgekehrt repetitive G/C-reiche Region, die intramolekular eine Doppelhelix bilden kann, sowie eine Anzahl von U(bzw. T)-Resten. Beispiele sind der Haupt-Terminator in der DNA des Phagen fd (Beck und Zink, Gene 16 (1981) 35-58) sowie rrnB (Brosius et al., J. Mol. Biol. 148 (1981) 107 - 127).

Zusätzlich enthalten die Expressionsvektoren üblicherweise einen selektierbaren Marker, um transformierte Zellen zu selektieren. Derartige selektierbare Marker sind beispielsweise die Resistenzgene für Ampicillin, Chloramphenicol, Erythromycin, Kanamycin, Neomycin und Tetracyclin (Davies et al., Ann. Rev. Microbiol. 32 (1978) 469). Ebenso geeignete selektierbare Marker sind die Gene für essentielle Substanzen der Biosynthese von für die Zelle notwendigen Stoffen wie z.B. Histidin, Tryptophan und Leucin.

Es sind eine Vielzahl von geeigneten bakteriellen Vektoren bekannt. Beispielsweise sind für die folgenden Bakterien Vektoren beschrieben: Bacillus subtilis (Palva et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79 (1982) 5582), E. coli (Aman et al., Gene 40 (1985) 183; Studier et al., J. Mol. Biol. 189 (1986) 113), Streptococcus cremoris (Powell et al., Appl. Environ. Microbiol. 54 (1988) 655), Streptococcus lividans und Streptomyces lividans (US-Patent Nr. 4,747,056).

Weitere gentechnologische Verfahren zur Herstellung und Expression von geeigneten Vektoren sind in J. Sambrook et al., Molecular Cloning: a laboratory manual (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, N.Y. beschrieben.

Eine Expression von rekombinantem IL-16 ist außer in prokaryontischen Mikroorganismen auch in Eukaryonten (wie beispielsweise CHO-Zellen, Hefe oder Insektenzellen) möglich. Als eukaryontisches Expressionssystem wird das Hefesystem oder Insektenzellen bevorzugt. Die Expression in Hefe kann über drei Arten von Hefevektoren (integrierende YIp (yeast integrating plasmids)-Vektoren, replizierende YRp (yeast replicon plasmids)-Vektoren und episomale YEp (yeast episomal plasmids)-Vektoren) erfolgen. Näheres hierzu ist beispielsweise in S.M. Kingsman et al, Tibtech 5 (1987) 53-57 beschrieben.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist eine prokaryontische oder eukaryontische Wirtszelle, welche mit einer Nukleinsäure, welche für ein erfindungsgemäßes IL-16-Polypeptid codiert, so transformiert oder transfiziert ist, daß die Wirtszelle das genannte Polypeptid exprimiert. Eine solche Wirtszelle enthält üblicherweise einen biologisch funktionellen Nukleinsäurevektor, vorzugsweise einen DNA-Vektor, eine Plasmid-DNA, welche diese Nukleinsäure enthält.

Weiter bevorzugt ist ein monomeres IL-16-Polypeptid, welches nicht in weitere Untereinheiten aufspaltbar ist.

Es hat sich überraschenderweise gezeigt, daß die in der WO 94/28134 beschriebene Nukleinsäure und Proteinsequenz von IL-16 nicht den natürlichen humanen Sequenzen entsprechen. Es handelt sich hier lediglich um ein nicht natürliches IL-16-Analoges. Für eine therapeutische Anwendung ist es jedoch bevorzugt, ein Protein zu verwenden, welches entweder mit dem natürlichen Protein identisch ist oder sich vom natürlichen Protein nur geringfügig unterscheidet und/oder mindestens vergleichbare Aktivität und Immunogenität zeigt. Die Sequenz des Proteins ist in SEQ ID NO:2 (gegebenenfalls mit N-terminaler Verlängerung um einen Asparaginsäurerest und/oder Verkürzung am C-Terminus um bis zu 8 Aminosäuren) beschrieben.

Die Nukleinsäuresequenz von IL-16 kann im Rahmen der Erfindung Deletionen, Mutationen und Additionen erhalten. Die monomere Form von IL-16 kann in einer bevorzugten Ausführungsform multimerisiert sein. Dadurch kann die Aktivität von IL-16 gesteigert werden. Vorzugsweise sind solche multimeren Formen dimere, tetramere oder oktamere Formen.

In einer weiteren Ausführungsform können die Polypeptide der Erfindung zusätzlich einen definierten Gehalt an Metallionen enthalten, wobei die Anzahl der Metallionen pro Untereinheit vorzugsweise 0,5 bis 2 beträgt.

Als Metallionen im Sinne der Erfindung sind eine Vielzahl von Metallionen geeignet. Wie sich gezeigt hat, sind sowohl Erdalkalimetalle als auch Elemente der Nebengruppen geeignet. Besonders geeignet sind Erdalkalimetalle, Kobalt, Zink, Selen, Mangan, Nickel, Kupfer, Eisen, Magnesium, Kalzium, Molybdän und Silber. Die Ionen können ein-, zwei-, drei- oder vierwertig sein. Besonders bevorzugt werden zweiwertige Ionen. Die Ionen werden vorzugsweise als Lösungen zugesetzt von $MgCl_2$, $CaCl_2$, $MnCl_2$, $BaCl_2$, $LiCl_2$, $Sr(NO_3)_2$, Na_2MoO_4, $AgCl_2$.

Solche multimeren Formen und metallionenhaltige Formen von IL-16 sind in der internationalen Patentanmeldung PCT/EP96/05661 beschrieben.

Das erfindungsgemäße Polypeptid kann dadurch hergestellt werden, daß eine prokaryontische oder eukaryontische Wirtszelle, die mit einer Nukleinsäuresequenz nach den Ansprüchen 1 oder 2 transformiert oder transfiziert ist, unter geeigneten Nährbedingungen kultiviert wird und das gewünschte Polypeptid gegebenenfalls isoliert wird. Falls die Herstellung des Polypeptids im Rahmen einer gentherapeutischen Behandlung in vivo erfolgen soll, wird das Polypeptid natürlich nicht aus der Zelle isoliert.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist eine pharmazeutische Zusammensetzung, die ein erfindungsgemäßes Polypeptid in einer für eine therapeutische Anwendung ausreichenden Menge und/oder spezifische Aktivität sowie gegebenenfalls ein pharmazeutisch geeignetes Verdünnungsmittel, Adjuvans und/oder Trägermittel enthält.

Die erfindungsgemäßen Polypeptide sind insbesondere geeignet zur Behandlung von pathologischen Zuständen, die durch virale Replikation, insbesondere retrovirale Replikation, verursacht sind, und zur Immunmodulation. Derartige therapeutische Anwendungen sind in der WO 96/31607 beschrieben. Hierin sind ebenfalls auch diagnostische Testverfahren beschrieben.

Vorzugsweise können die erfindungsgemäßen Polypeptide zur Immunsuppression verwendet werden. Diese Immunsuppression erfolgt vorzugsweise über eine Hemmung der Helferfunktion der TH_0 und/oder TH_1 und/oder TH_2 Zellen. Die erfindungsgemäßen Polypeptide sind demnach bei allen Erkrankungen von therapeutischem Wert, bei denen eine immundisregulato-

rische Komponente bei der Pathogenese postuiert wird, insbesondere eine Hyperimmunität. Als IL-16-therapierbare Erkrankungen können in der Kardiologie/Angiologie Erkrankungen wie Myokarditis, Endokarditis und Perikarditis in Frage kommen, in der Pulmonologie beispielsweise Bronchitis, Asthma, in der Hämatologie Autoimmunneuropenien und Transplantatabstoßung, in der Gastroenterologie chronische Gastritis, in der Endokrinologie Diabetes mellitus Typ I, in der Nephrologie Glomerulonephritis, Erkrankungen im rheumatischen Formenkreis, Erkrankungen in der Ophthalmologie, in der Neurologie, wie Multiple Sklerose, in der Dermatologie Ekzeme. Insbesondere können die erfindungsgemäßen Polypeptide bei Autoimmunerkrankungen, Allergien und zur Vermeidung von Transplantatabstoßungen verwendet werden.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren im Rahmen der Gentherapie. Hierfür geeignete Vektorsysteme sind beispielsweise retrovirale oder nicht-virale Vektorsysteme.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein polyklonaler oder monoklonaler Anti-IL-16-Antikörper oder ein immunoaktives Fragment davon, welcher an die ersten 3-20 Aminosäuren von SEQ ID NO:2 oder einer N-terminal um einen Asparaginsäurerest verlängerten SEQ ID NO:2 bindet, sowie Verfahren zur Herstellung von solchen Antikörpern und ihre Verwendung zur Bestimmung von IL-16 sowie zur Bestimmung von viralen Infektionen in eukaryontischen Zellen und insbesondere in Säugerzellmaterial. Mit IL-16 können auch Virus-aktivierte Säugerzellen, insbesondere T Zellen, bestimmt werden. Die Herstellung solcher Antikörper erfolgt durch Immunisierung mit einem erfindungsgemäßen Polypeptid. Die Herstellung eines solchen Antikörpers wird nach den dem Fachmann geläufigen Verfahren durchgeführt, durch Immunisierung mit einem Immunogen, welches die ersten 3-20 Aminosäuren von SEQ ID NO:2 oder einer N-terminal um einen Asparaginsäurerest verlängerten SEQ ID NO:2 als Hapten enthält. Anschließend kann der Antikörper aus dem immunisierten Säugetier in üblicher Weise gewonnen werden und gegebenenfalls ein monoklonaler Antikörper hergestellt werden.

Die folgenden Beispiele und Publikationen sowie das Sequenzprotokoll erläutern die Erfindung, deren Schutzumfang sich aus den Patentansprüchen ergibt, weiter. Die beschriebenen Verfahren sind als Beispiele zu verstehen, die auch noch nach Modifikationen den Gegenstand der Erfindung beschreiben.

Beispiel 1

Klonierung, Expression und Reinigung von IL-16

1.1 RNA Isolierung

5 x 10^7PBMC (vom Menschen oder Affen) wurden 48 Stunden mit 10 µg/ml Concanavalin A und 180 U/ml IL-2 kultiviert. Zur Herstellung der RNA wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit 5 ml Denaturierungslösung (RNA Isolation Kit, Stratagene) lysiert. Nach Zugabe von 1 ml Na-Acetat, 5 ml Phenol und 1 ml Chloroform/Isoamyl-Alkohol (24:1) wurde das Lysat 15 min. auf Eis gehalten. Die wäßrige Phase wurde anschließend mit 6 ml Isopropanol vermischt, um die RNA auszufällen, und 2 Stunden bei -20°C gelagert. Das Präzipitat wurde schließlich einmal mit reinem Ethanol gewaschen und in 150 µl H_2O gelöst. Die Ausbeute wurde photometrisch bestimmt und betrug 120 µg.

1.2 cDNA Synthese

Die Mischung für die cDNA Synthese enthielt 10 µg RNA, 0,2 µg Oligo-dT, 13 mM DTT und 5 µl "bulk first strand reaction mix" (First-Strand cDNA Synthesis Kit, Pharmacia) in einer Menge von 15 µl. Die Mischung wurde 1 Stunde bei 37°C inkubiert und anschließend bei -20°C zur späteren Verwendung gelagert.

Amplifikation, Klonierung von IL-16 cDNA und Herstellung eines Expressionsklons erfolgen wie in der WO 94/28134 oder WO 96/31607 beschrieben, unter Berücksichtigung der veränderten Sequenzen.

1.3 10 l Fermentation eines E. coli Expressionsklons für IL-16 und Hochdruckaufschluß

Aus Stammkulturen (Plattenausstrich oder bei -20°C gelagerten Ampullen) werden Vorkulturen angesetzt, die geschüttelt bei 37°C inkubiert werden. Das Überimpfvolumen in die nächsthöhere Dimension beträgt jeweils 1-10 Vol.-%. Zur Selektion gegen Plasmidverlust wird in Vor- und Hauptkultur Ampicillin (50-100 mg/l) eingesetzt.

Als Nährstoffe werden enzymatisch verdautes Eiweiß und/oder Hefeextrakt als N- und C-Quelle sowie Glycerin und/oder Glucose als zusätzliche C-Quelle verwendet. Das Medium wird auf pH 7 gepuffert und Metallsalze werden zur Stabilisierung des Fermentationsprozesses in physiologisch verträglichen Konzentrationen zugesetzt. Die Fermentation wird als Feed-batch mit einer gemischten Hefeextrakt/C-Quellen-Dosage durchgeführt. Die Fermentations-

temperatur beträgt 25-37°C. Über Belüftungsrate, Drehzahlregulierung und Dosagegeschwindigkeit wird der gelöste Sauerstoffpartialdruck (pO_2) in etwa unter 20% gehalten. Das Wachstum wird über Ermittlung der optischen Dichte (OD) bei 528 nm bestimmt. Mittels IPTG wird die Expression des IL-16 induziert. Nach einer Fermentationsdauer von 10 bis 20 Stunden wird bei OD-Stillstand die Biomasse durch Zentrifugation geerntet.

Die Biomasse wird in 50 mM Natriumphosphat, 5 mM EDTA, 100 mM Natriumchlorid, pH 7 aufgenommen und über eine kontinuierliche Hochdruckpresse bei 1000 Bar aufgeschlossen. Die so erhaltene Suspension wird erneut abzentrifugiert und der Überstand, der das gelöste IL-16 enthält, wird weiterverarbeitet.

1.4 Reinigung von rekombinantem humanem IL-16

550 ml Aufschlußüberstand in 50 mM Natriumphosphat, 5 mM EDTA, 100 mM NaCl, pH 7,2 wurden mit 55 ml 5 M NaCl, 60 mM $MgCl_2$, pH 8,0 versetzt, 30 min. gerührt und anschließend 30 min. bei 20.000 g zentrifugiert. 400 ml des Überstandes wurden auf eine Nickel-Chelat-Sepharose-Säule (V=60 ml; Pharmacia) aufgezogen, die vorher mit 30 µMol $NiCl_2$/ml Gel beladen und mit 50 mM Natriumphosphat, 0,2 M NaCl, pH 8,0 äquilibriert worden war. Die Säule wurde anschließend mit 300 ml 50 mM Natriumphosphat, 0,5 M NaCl, pH 7,0 gespült und das IL-16-Fusionsprotein dann mit einem Gradienten von 0 M bis 300 mM Imidazol, pH 7,0 in 50 mM Natriumphosphat, 0,1 M NaCl, pH 7,0 (2x 0,5 l Gradientenvolumen) eluiert. IL-16 enthaltende Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE identifiziert, vereinigt und gegen 20 mM Natriumphosphat, pH 7,0 dialysiert.

300 mg des so erhaltenen Fusionsproteins wurden bei 4°C gegen 20 l 20 mM Imidazol, pH 5,5 dialysiert und anschließend zur Entfernung von Trübungen 30 min. bei 20.000 g zentrifugiert. Der Überstand der Zentrifugation wurde anschließend mit NaOH auf pH 8,5 eingestellt, mit 0,3 mg Thrombin (Boehringer Mannheim GmbH) versetzt und 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Spaltansatz mit HCl auf pH 6,5 und die Leitfähigkeit durch Verdünnung mit H_2O auf 1,7 mS eingestellt. Die Probe wurde auf eine Q-Sepharose FF-Säule (45 ml; Pharmacia) aufgetragen, die vorher mit 20 mM Imidazol, pH 6,5 äquilibriert worden war. Die Elution von IL-16 erfolgte mit einem Gradienten von 0 bis 0,3 M NaCl in 20 mM Imidazol, pH 6,5. IL-16 enthaltende Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE identifiziert und vereinigt. Die Identität von IL-16 wurde durch Massenanalyse (Molekulargewicht 13.566 $\pm$ 3 D) und automatisierte N-terminale Sequenzanalyse bestätigt. Zur Konzentrationsbestimmung wurde die UV-Absorption von IL-16 bei 280 nm und ein berechneter molarer Extinktionskoeffizient

von 5540 $M^{-1}cm^{-1}$ bei dieser Wellenlänge (Mack et al., Analyt. Biochem. 200 (1992) 74-80) verwendet.

Um den gewünschten N-Terminus zu erhalten, wird gegebenenfalls mit einer Aminopeptidase (z.B. α-Aminoacylpeptidhydrolase) oder Dipeptidylpeptidase (z.B. Catepsin CCATH) nachgespalten.

Das so erhaltene IL-16 wies in der SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen eine Reinheit von mehr als 95% auf.

Zur Reinheitsanalyse mittels RP-HPLC wurde eine Vydac, Protein & Peptide C18, 4x180 mm Säule verwendet. Die Elution erfolgt durch einen linearen Gradienten von 0% nach 80% B (Lösungsmittel B: 90% Acetonitril in 0,1% TFA; Lösungsmittel A: 0,1% TFA in H_2O) innerhalb von 30 min. mit einer Flußrate von 1 ml/min. Die Detektion erfolgte bei 220 nm.

Beispiel 2

Herstellung von verkürztem IL-16 unter Verwendung einer Enterokinaseschnittstelle

2.1 Expressionsklon

Amplifikation, Klonierung von IL-16 cDNA und Herstellung eines Expressionsklons erfolgen wie in der WO 94/28134 oder der WO 96/31607 beschrieben, unter Berücksichtigung der veränderten Sequenzen.

Als Vorwärtsprimer wird ein Oligonukleotid der Sequenz **SEQ ID NO:3** verwendet, das eine EcoRI site, 6 His und eine Enterokinase-Spaltstelle (D_4K) enthält:

```
cccgaattc tatg cat cac cac cac cac cac gatgacgacgacaaa-tctgcagcctcagcctctgc
   EcoRI                    H6              D4K
```

Für die am 5'-Ende um ein Asparaginsäurecodon verlängerte Sequenz wird als Vorwärtsprimer ein Oligonukleotid der Sequenz **SEQ ID NO:6** verwendet, das ebenfalls eine EcoRI site, 6 His und eine Enterokinase-Spaltstelle (D_4K) enthält:

```
cccgaattc tatg cat cac cac cac cac cac gatgacgacgacaaa-gactctgcagcctcagcctc
   EcoRI                    H6              D4K
```

Als reverse primer werden entweder Oligonukleotid IL-16-R_1 **(SEQ ID NO:4)** :

IL16-R_1: gcg gat cca agc tta gga gtc tcc agc agc tgt g

oder Oligonukleotid IL-16-R_2 **(SEQ ID NO:5)** verwendet:

IL16-R_2: gcg gat cca agc tta ttc ctt gga ctg gag gct ttt tc

Die beiden reverse primer enthalten BamHI und HindIII Schnittstellen zur Klonierung.

Mit IL-16-R_1 wird eine Sequenz erhalten, welche für ein Protein gemäß SEQ ID NO:2 codiert.

Mit IL-16-R_2 wird eine Sequenz erhalten, welche für ein um 8 Aminosäuren am C-Terminus verkürztes IL-16 codiert. Dieses C-terminale IL-16 ist ebenfalls aktiv.

Die PCR-Reaktion, Klonierung und Herstellung des Expressionsklons (Fusionsprotein mit N-terminalem Poly-His-Anteil zur Aufreinigung) erfolgen nach Standardbedingungen:

0,2 mM dNTP Mix, je 1 pmol/µl forward und reverse Primer, 1 x high fidelity buffer (Boehringer Mannheim, D), 1,5 mM MgCl2, 2.6 U high fidelity enzyme mix (Boehringer Mannheim, D).

20 µl Endvolumen
Maschine: Perkin Elmer GeneAmp 9600

Reaktionsverlauf:
3 min 94°C, 1 min 56 °C, 2 min 72 °C, dann 25 Zyklen (20 sec 94°C, 20 sec 56°C, 1 min 72 °C)

2.2 Fermentation

Die Fermentation wird analog Beispiel 1.3 durchgeführt.

2.3 Reinigung und Spaltung

700 ml Aufschlußüberstand in 50 mM Natriumphosphat, 5 mM EDTA, 100 mM NaCl, pH 7,2, wurden mit 70 ml 5 M NaCl, 60 mM $MgCl_2$, pH 8.0 versetzt, 30 min gerührt und anschließend 30 min bei 20.000 g zentrifugiert. Der abzentrifugierte Überstand wurde auf eine Nickel-Chelat-Säule (V = 200 ml, Pharmacia) aufgezogen, die vorher mit einer $NiSO_4$-Lösung (c = 10 mg/ml) beladen und mit 50 mM Natriumphosphat, 0.5 M NaCl, pH 8.0 äquilibriert

worden war. Die Säule wurde anschließend mit Äquilibrierungspuffer gewaschen, bis die Basislinie (UV-Detektion bei 280 nm) fast erreicht war. Daraufhin wurde die Säule mit 1 l 50 mM Natriumphosphat, 0,5 M NaCl, pH 7,0 und mit 1 l 50 mM Natriumphosphat, 0,1 M NaCl, pH 7,0 gespült. Die Elution des Fusionsproteins erfolgte mit einem Gradienten von 0 - 300 mM Imidazol, pH 7,0 in 50 mM Natriumphosphat, 0,1 M NaCl, pH 7,0 (2 x 1,6 l). IL 16 - enthaltende Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE identifiziert und vereinigt. Dieser IL-16-Pool wurde im Provario (Filtron, Membran Omega 5 K) auf eine Konzentration von 5 mg Protein/ml eingeengt und gegen 50 mM Tris, pH 8.0 dialysiert.

Zur Enterokinasespaltung wurde ein 100 mg Fusionsprotein enthaltendes Äquivalent des Pools mit 50 mM Tris, pH 8,0 auf eine Proteinkonzentration von c = 1 mg/ml verdünnt. Nach Zugabe von 33 µg Enterokinase (Boehringer Mannheim; 1 : 3000 w/w) wurde der Spaltansatz über Nacht (14 h) bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der pH-Wert mit HCl auf pH 6,5 eingestellt.

Ungespaltenes IL-16 wurde durch Einrühren von 20 ml Nickel-Chelat-Sepharose (Vorbereitung s. oben; Bindungszeit 2 h) und anschließender Zentrifugation (10.000 g) bzw. Abnutschen des Überstands über eine Filterfritte entfernt. Die Identität des im Überstand enthaltenen gespaltenen IL-16 wurde durch N-terminale Sequenzierung und Massenanalyse bestätigt. Die Reinheit wurde mittels SDS-PAGE und RP-HPLC (Vydac, Diphenyl, 4,6 x 150 mm, linearer Gradient von 20% auf 95% B in 45 Minuten; Lösung A: 20 mM Kaliumphosphat in H_2O, pH 7,5; Lösung B: 100% Acetonitril) überprüft.

Beispiel 3

Spaltung von rekombinantem IL-16 mit Zellysat

3.1 Trennung von $CD8^+$ und $CD4^+$-Lymphozyten über MACS

Die mittels Ficoll-Gradienten aus einem "buffy coat" isolierten Lymphozyten werden in 500 µl PBS-Azid/1 x 10^8 Zellen (Phosphate Buffered Saline ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}, 0,01% Natriumazid, 5 mM EDTA, pH 7,2) resuspendiert. Nach Zugabe von 20 ml CD8-Microbeads/1 x 10^7 zu erwartende Zellen (Maus-Anti-Human-CD8-Antikörper, konjugiert mit magnetischen Partikeln, Miltenyi Biotec GmbH) erfolgt eine Inkubation bei 4°C über 15 min. Für weitere 5 min bei 4°C werden 2 mg DTAF/1 x 10^7 zu erwartende Zellen (Anti-Maus-IgG FITC konjugiert, Firma Dianova) hinzugegeben. Nach Verdünnung mit 25 ml PBS-Azid/1% BSA erfolgt eine erneute Zentrifugation (10 min, 1200 rpm, 4°C). Der Überstand wird verworfen, die Zellen in

2 ml PBS/1% BSA resuspendiert und die Zellsuspension auf eine Säule, die sich in einem Magnetseparator (Miltenyi Biotec GmbH) befindet, aufgetragen. Die $CD8^+$-Zellen, an die die CD8-Microbeads gekoppelt sind, werden in der Säule zurückgehalten, die Durchflußfraktion enthält dementsprechend alle Lymphozyten (ca. 80% $CD4^+$-Zellen) mit Ausnahme der $CD8^+$-Zellen. Nach Waschung wird die Säule aus der Halterung genommen und die $CD8^+$-Zellfraktion mit PBS-Azid/1% BSA eluiert. Die Durchfluß- und die $CD8^+$-Zellfraktion werden zentrifugiert, in Zellkulturmedium (RPMI 1640, 20% FKS, 2 mM Glutamin, 180 U/ml IL-2) resuspendiert, die Zellzahl auf 3×10^6 Zellen/ml eingestellt und die Zellen mit PHA stimuliert (9 mg/ml). Die Qualität der Lymphozytensubpopulationstrennung wird mittels FACS überprüft.

3.2 Herstellung des Zellysats und Verdauung von IL-16

Es werden 1×10^8 $CD8^+$ Lymphozyten, die drei Tage mit PHA stimuliert wurden, in 2 ml PBS, das mit 1% Triton X100 versetzt ist, für 10 min auf Eis lysiert. Sodann werden Zelldebris und Zellkerne durch Zentrifugation entfernt. 45 µl des so gewonnenen Zellysats werden mit 10 µg rekombinantem IL-16, das entweder am amino- oder carboxyterminalen Ende in Fusion mit einem Histidin-tag (HIS-tag, z.B. sechs Histidine mit Spaltstelle vgl. WO 94/28134) exprimiert wurde, 16 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Sodann werden die HIS-tag tragenden Fragmente mit Hilfe einer Nickel-Agarosematrix gereinigt. Nach weiterer Reinigung der entstandenen Fragmente in der HPLC werden die Massen der Fragmente massenspektrographisch bestimmt und so die Größe des N-terminalen Fragmentes ermittelt. Derart wurde ein natürlich prozessiertes IL-16-Fragment identifiziert, das mit dem in SEQ ID NO:1/2 beschriebenen bzw. den um ein Asparaginsäurecodon verlängerten N-Terminus beginnt.

Referenzliste

Aman et al., Gene 40 (1985) 183
Baier, M., et al., Nature 378 (1995) 563
Beck und Zink, Gene 16 (1981) 35-58
Brosius et al., J. Mol. Biol. 148 (1981) 107 - 127
Chang et al., Nature 198 (1977) 1056
Cruikshank, W.W., et al., J. Immunol. 146 (1991) 2928-2934
Cruikshank, W.W., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 (1994) 5109-5113
Davies et al., Ann. Rev. Microbiol. 32 (1978) 469

EP-A 0 267 851
EP-A 0 495 398
Ghrayeb et al., EMBO J. 3 (1984) 2437
Goeddel et al., Nuc. Acids Res. 8 (1980) 4057
Internationale Patentanmeldung PCT/EP96/05661
Internationale Patentanmeldung PCT/EP96/05662
Kingsman, S.M., et al, Tibtech 5 (1987) 53-57
Mack et al., Analyt. Biochem. 200 (1992) 74-80
Miller et al., Bio/Technology 7 (1989) 698
Nagai et al., Nature 309 (1984) 810
Oka et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 (1985) 7212
Palva et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79 (1982) 5582
Phillips and Silhavy, Nature 344 (1990) 882-884
Powell et al., Appl. Environ. Microbiol. 54 (1988) 655
Sambrook et al., "Expression of cloned genes in E. coli" in Molecular Cloning: A laboratory manual (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA
Shimatake et al., Nature 292 (1981) 128
Studier et al., J. Mol. Biol. 189 (1986) 113
US-Patent Nr. 4,551,433
US-Patent Nr. 4,689,406
US-Patent Nr. 4,747,056
WO 91/11520
WO 92/20702
WO 92/20703
WO 94/28134
WO 96/31607
Yansura, Meth. Enzymol. 185 (1990) 161-166

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:
(A) NAME: Bundesrepublik Deutschland vertreten durch den Bundesminister fuer Gesundheit
(B) STRASSE: -
(C) ORT: Bonn
(E) LAND: Deutschland
(F) POSTLEITZAHL: D-53108

(A) NAME: BOEHRINGER MANNHEIM GMBH
(B) STRASSE: Sandhofer Str. 116
(C) ORT: Mannheim
(E) LAND: Deutschland
(F) POSTLEITZAHL: D-68305
(G) TELEFON: 08856/60-3446
(H) TELEFAX: 08856/60-3451

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Prozessierte Polypeptide mit IL-16-Aktivitaet, Verfahren zu ihrer Herstellung und Verwendung

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 10

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:
(A) DATENTRÄGER: Floppy disk
(B) COMPUTER: IBM PC compatible
(C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30B (EPA)

(vi) DATEN DER URANMELDUNG:
(A) ANMELDENUMMER: DE 196 17 202.0
(B) ANMELDETAG: 30-APR-1996

(vi) DATEN DER URANMELDUNG:
(A) ANMELDENUMMER: DE 196 17 203.9
(B) ANMELDETAG: 30-APR-1996

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 366 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Doppelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS

(B) LAGE:1..366

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

```
TCT GCA GCC TCA GCC TCT GCA GCC AGT GAT GTT TCT GTA GAA TCT ACA      48
Ser Ala Ala Ser Ala Ser Ala Ala Ser Asp Val Ser Val Glu Ser Thr
  1               5                  10                  15

GCA GAG GCC ACA GTC TGC ACG GTG ACA CTG GAG AAG ATG TCG GCA GGG      96
Ala Glu Ala Thr Val Cys Thr Val Thr Leu Glu Lys Met Ser Ala Gly
            20                  25                  30

CTG GGC TTC AGC CTG GAA GGA GGG AAG GGC TCC CTA CAC GGA GAC AAG     144
Leu Gly Phe Ser Leu Glu Gly Gly Lys Gly Ser Leu His Gly Asp Lys
        35                  40                  45

CCT CTC ACC ATT AAC AGG ATT TTC AAA GGA GCA GCC TCA GAA CAA AGT     192
Pro Leu Thr Ile Asn Arg Ile Phe Lys Gly Ala Ala Ser Glu Gln Ser
    50                  55                  60

GAG ACA GTC CAG CCT GGA GAT GAA ATC TTG CAG CTG GGT GGC ACT GCC     240
Glu Thr Val Gln Pro Gly Asp Glu Ile Leu Gln Leu Gly Gly Thr Ala
65                  70                  75                  80

ATG CAG GGC CTC ACA CGG TTT GAA GCC TGG AAC ATC ATC AAG GCA CTG     288
Met Gln Gly Leu Thr Arg Phe Glu Ala Trp Asn Ile Ile Lys Ala Leu
                85                  90                  95

CCT GAT GGA CCT GTC ACG ATT GTC ATC AGG AGA AAA AGC CTC CAG TCC     336
Pro Asp Gly Pro Val Thr Ile Val Ile Arg Arg Lys Ser Leu Gln Ser
            100                 105                 110

AAG GAA ACC ACA GCT GCT GGA GAC TCC TAG                             366
Lys Glu Thr Thr Ala Ala Gly Asp Ser  *
        115                 120
```

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 122 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

```
Ser Ala Ala Ser Ala Ser Ala Ala Ser Asp Val Ser Val Glu Ser Thr
  1               5                  10                  15

Ala Glu Ala Thr Val Cys Thr Val Thr Leu Glu Lys Met Ser Ala Gly
            20                  25                  30
```

Leu Gly Phe Ser Leu Glu Gly Gly Lys Gly Ser Leu His Gly Asp Lys
35 40 45

Pro Leu Thr Ile Asn Arg Ile Phe Lys Gly Ala Ala Ser Glu Gln Ser
50 55 60

Glu Thr Val Gln Pro Gly Asp Glu Ile Leu Gln Leu Gly Gly Thr Ala
65 70 75 80

Met Gln Gly Leu Thr Arg Phe Glu Ala Trp Asn Ile Ile Lys Ala Leu
85 90 95

Pro Asp Gly Pro Val Thr Ile Val Ile Arg Arg Lys Ser Leu Gln Ser
100 105 110

Lys Glu Thr Thr Ala Ala Gly Asp Ser *
115 120

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 66 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: other nucleic acid
(A) BESCHREIBUNG: /desc = "forward primer"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

CCCGAATTCT ATGCATCACC ACCACCACCA CGATGACGAC GACAAATCTG CAGCCTCAGC 60

CTCTGC 66

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 34 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: other nucleic acid
(A) BESCHREIBUNG: /desc = "reverse primer IL-16-R1"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

GCGGATCCAA GCTTAGGAGT CTCCAGCAGC TGTG 34

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 38 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: other nucleic acid
(A) BESCHREIBUNG: /desc = "reverse primer IL-16-R2"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

GCGGATCCAA GCTTATTCCT TGGACTGGAG GCTTTTTC 38

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 66 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: other nucleic acid
(A) BESCHREIBUNG: /desc = "forward primer"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

CCCGAATTCT ATGCATCACC ACCACCACCA CGATGACGAC GACAAAGACT CTGCAGCCTC 60

AGCCTC 66

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 7 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

Ser Ala Ala Ser Ala Ser Ala
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 6 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

Ser Ala Ala Ser Ala Ser
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 9:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 5 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

Ser Ala Ala Ser Ala
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 10:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 4 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:

Ser Ala Ala Ser
1

Patentansprüche

1. Nukleinsäure, mit welcher die Expression eines Polypeptids mit Interleukin-16-Aktivität in einer prokaryontischen oder eukaryontischen Wirtszelle erreicht werden kann, wobei die genannte Nukleinsäure

   a) der DNA-Sequenz SEQ ID NO:1 oder einer DNA, die am 5'-Ende um ein Asparaginsäurecodon verlängert ist, oder ihrem komplementären Strang entspricht,

   b) mit der DNA der Sequenz SEQ ID NO:1 oder einer DNA, die am 5'-Ende um ein Asparaginsäurecodon verlängert ist, unter stringenten Bedingungen hybridisiert,

   c) oder eine Nukleinsäuresequenz, die ohne die Degeneration des genetischen Codes mit den durch a) und b) definierten Nukleinsäuresequenzen unter stringenten Bedingungen hybridisieren würde

   d) und am 5'-Ende für eine der Aminosäuresequenzen SEQ ID NO:7 bis 10 oder für analoge Sequenzen, die N-terminal um eine Asparaginsäure verlängert sind, codiert.

2. Nukleinsäure nach Anspruch 1, die Interleukin-16 von Primaten codiert.

3. Prokaryontische oder eukaryontische Wirtszelle, welche mit einer Nukleinsäure nach den Ansprüchen 1 oder 2 so transformiert oder transfiziert ist, daß die Wirtszelle das genannte Polypeptid exprimiert.

4. Biologisch funktioneller Nukleinsäurevektor, der eine Nukleinsäure gemäß Anspruch 1 oder 2 enthält.

5. Interleukin-16 aus Primaten, wie es als Produkt einer eukaryontischen Expression einer Nukleinsäure gemäß Anspruch 1 oder 2 im wesentlichen frei von anderen Humanproteinen erhältlich ist.

6. Humanes Interleukin-16, wie es als Produkt einer eukaryontischen Expression einer Nukleinsäure gemäß Anspruch 1 oder 2 nach Prozessierung im wesentlichen frei von anderen Humanproteinen erhältlich ist.

7. Polypeptid mit Interleukin-16-Aktivität, welches codiert wird von einer Nukleinsäure nach den Ansprüchen 1 oder 2.

8. Polypeptid mit Interleukin-16-Aktivität gemäß Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß es ein Multimeres aus einer definierten Anzahl von Untereinheiten darstellt, wobei das Polypeptid von Anspruch 7 eine Untereinheit ist.

9. Polypeptid nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß es aus 4 bis 32 Untereinheiten besteht.

10. Polypeptid nach den Ansprüchen 7 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß es einen definierten Gehalt an Metallionen enthält, wobei die Anzahl der Metallionen pro Untereinheit 0,5 bis 2 beträgt.

11. Verfahren zur Herstellung eines Polypeptids nach den Ansprüchen 7 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß eine prokaryontische oder eukaryontische Wirtszelle, die mit einer Nukleinsäuresequenz nach den Ansprüchen 1 oder 2 transformiert oder transfiziert ist, unter geeigneten Nährbedingungen kultiviert wird und das gewünschte Polypeptid gegebenenfalls isoliert wird.

12. Pharmazeutische Zusammensetzung, die ein Polypeptid nach den Ansprüchen 5 bis 10 sowie ein pharmazeutisch geeignetes Verdünnungsmittel, Adjuvans und/oder Trägermittel enthält.

13. Pharmazeutische Zusammensetzung enthaltend ein Polypeptid gemäß den Ansprüchen 5 - 10 in einer für eine therapeutische Anwendung ausreichenden Menge.

14. Verfahren zur Herstellung eines Antikörpers gegen ein Polypeptid mit Interleukin-16-Aktivität, dadurch gekennzeichnet, daß ein Säugetier mit einem Immunogen welches die ersten 3 - 20 Aminosäuren von SEQ ID NO:2 oder einer N-terminal um einen Asparaginsäurerest verlängerten SEQ ID NO:2 als Hapten enthält, immunisiert wird und der Antikörper anschließend aus dem Säugetier gewonnen wird.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter nal Application No
PCT/EP 97/02216

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C12N15/24 C07K14/54 C12N1/21 A61K38/19 C07K16/24
C12N5/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, vol. 91, May 1994, pages 5109-5113, XP002028072 CRUIKSHANK W W ET AL: "MOLECULAR AND FUNCTIONAL ANALYSIS OF A LYMPHOCYTE CHEMOATTRACTANT FACTOR: ASSOCIATION OF BIOLOGIC FUNCTION WITH CD4 EXPRESSION" cited in the application see the whole document --- -/--	1-14

[X] Further documents are listed in the continuation of box C.

[X] Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

1

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
20 August 1997	29. 08. 97

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016	Le Cornec, N

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter nal Application No
PCT/EP 97/02216

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 146, no. 9, 1 May 1991, BALTIMORE US, pages 2928-2934, XP002038181 W.W. CRUIKSHANK ET AL: "Lymphocyte Chemoattractant Factor induces CD4-dependent intracytoplasmic signaling in lymphocytes" cited in the application see page 2929, left-hand column, paragraph 5 - right-hand column, paragraph 1	5-10
A	WO 94 28134 A (THE TRUSTEES OF BOSTON UNIVERSITY) 8 December 1994 cited in the application see page 27, line 13 - line 29 see page 30, line 1 - page 31, line 30; claims seq ID 1 and 2	1-14
P,A	NATURE, vol. 381, 2 May 1996, LONDON GB, page 30 XP002038010 N. BANNERT ET AL: "Interleukin-16 or not ? reply to comments" see the whole document	1-14
A	NATURE, vol. 378, 7 December 1995, page 563 XP002016117 BAIER M ET AL: "HIV SUPPRESSION BY INTERLEUKIN-16" cited in the application	1-14
T	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, vol. 94, May 1997, WASHINGTON US, pages 5273-5277, XP002038013 M. BAIER ET AL: "Molecular cloning , sequence ,expression and processing of the Interleukin-16 precursor" see figure 3 see page 5275, right-hand column, paragraph 1 see page 5277, left-hand column, line 19 - line 39	1-14

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter nal Application No
PCT/EP 97/02216

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9428134 A	08-12-94	EP 0700439 A	13-03-96
		JP 8510907 T	19-11-96

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internales Aktenzeichen
PCT/EP 97/02216

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 C12N15/24 C07K14/54 C12N1/21 A61K38/19 C07K16/24
C12N5/10

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 6 C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, Bd. 91, Mai 1994, Seiten 5109-5113, XP002028072 CRUIKSHANK W W ET AL: "MOLECULAR AND FUNCTIONAL ANALYSIS OF A LYMPHOCYTE CHEMOATTRACTANT FACTOR: ASSOCIATION OF BIOLOGIC FUNCTION WITH CD4 EXPRESSION" in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument --- -/--	1-14

[X] Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

[X] Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zumVerständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
20.August 1997	29.08.97
Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+ 31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter Le Cornec, N

Formblatt PCT/ISA/210 (Blatt 2) (Juli 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Interr nales Aktenzeichen
PCT/EP 97/02216

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	JOURNAL OF IMMUNOLOGY, Bd. 146, Nr. 9, 1.Mai 1991, BALTIMORE US, Seiten 2928-2934, XP002038181 W.W. CRUIKSHANK ET AL: "Lymphocyte Chemoattractant Factor induces CD4-dependent intracytoplasmic signaling in lymphocytes" in der Anmeldung erwähnt siehe Seite 2929, linke Spalte, Absatz 5 - rechte Spalte, Absatz 1 ---	5-10
A	WO 94 28134 A (THE TRUSTEES OF BOSTON UNIVERSITY) 8.Dezember 1994 in der Anmeldung erwähnt siehe Seite 27, Zeile 13 - Zeile 29 siehe Seite 30, Zeile 1 - Seite 31, Zeile 30; Ansprüche seq ID 1 und 2 ---	1-14
P,A	NATURE, Bd. 381, 2.Mai 1996, LONDON GB, Seite 30 XP002038010 N. BANNERT ET AL: "Interleukin-16 or not ? reply to comments" siehe das ganze Dokument ---	1-14
A	NATURE, Bd. 378, 7.Dezember 1995, Seite 563 XP002016117 BAIER M ET AL: "HIV SUPPRESSION BY INTERLEUKIN-16" in der Anmeldung erwähnt ---	1-14
T	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, Bd. 94, Mai 1997, WASHINGTON US, Seiten 5273-5277, XP002038013 M. BAIER ET AL: "Molecular cloning , sequence ,expression and processing of the Interleukin-16 precursor" siehe Abbildung 3 siehe Seite 5275, rechte Spalte, Absatz 1 siehe Seite 5277, linke Spalte, Zeile 19 - Zeile 39 -----	1-14

1

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Inter nales Aktenzeichen
PCT/EP 97/02216

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9428134 A	08-12-94	EP 0700439 A	13-03-96
		JP 8510907 T	19-11-96