

**PCT**WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<b>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> :</b>  <b>C07K 14/00</b>	<b>A2</b>	<b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer:</b> <b>WO 99/42477</b>  <b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:</b> 26. August 1999 (26.08.99)
<b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/DE99/00535  <b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 18. Februar 1999 (18.02.99)  <b>(30) Prioritätsdaten:</b> 198 06 803.4      18. Februar 1998 (18.02.98)      DE  <b>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):</b> DEUTSCHES      KREBSFORSCHUNGSZENTRUM STIFTUNG DES ÖFFENTLICHEN RECHTS [DE/DE]; Im Neuenheimer Feld 280, D-69120 Heidelberg (DE).  <b>(71)(72) Anmelder und Erfinder:</b> KOEPESELL, Hermann [DE/DE]; Julius-Maximilians-Universität, Koellikerstrasse 6 (DE).  <b>(72) Erfinder; und</b> <b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US):</b> WIESSLER, Manfred [DE/DE]; Wilhelm-Mayer-Strasse 2, D-67227 Frankenthal (DE).  <b>(74) Anwalt:</b> SCHÜSSLER, Andrea; Trudering Strasse 246, D-81825 München (DE).		<b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  <b>Veröffentlicht</b> <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>
<b>(54) Title:</b> TRANSPORTER FOR SACCHARIDE-COUPLED MEDICAMENTS		
<b>(54) Bezeichnung:</b> TRANSPORTER FÜR SACCHARID-GEKOPPELTE ARZNEIMITTEL		
<b>(57) Abstract</b>		
<p>The invention relates to a nucleic acid molecule from a sugar transporter family. Said nucleic acid codes for a protein with the biological activity of a transporter for saccharide-coupled medicaments. The invention also relates to vectors containing these nucleic acid molecules. In a preferred form, these vectors are suitable for the expression of the transporter in prokaryotes or eukaryotes and for gene therapy. The invention also relates to proteins which are coded by the nucleic acid and to antibodies which specifically recognise these proteins. The objects of the invention can be used to test cells, especially tumour cells, for the presence of a transporter of this kind. In the event that said transporter is not present in cells, it can be introduced by gene therapy. In this way, tumour cells can be made accessible to chemotherapy much more effectively than previously possible.</p>		
<b>(57) Zusammenfassung</b>		
<p>Beschrieben wird ein Nukleinsäuremolekül aus einer Zuckertransporterfamilie, wobei die Nukleinsäure für ein Protein mit der biologischen Aktivität eines Transporters für Saccharid-gekoppelte Arzneimittel kodiert. Ferner werden diese Nukleinsäuremoleküle enthaltende Vektoren beschrieben, wobei in einer bevorzugten Ausführungsform diese Vektoren zur Expression des Transporters in Prokaryonten oder Eukaryonten sowie zur Genterapie geeignet sind. Ausserdem werden davon codierte Proteine und Antikörper beansprucht, welche diese Proteine spezifisch erkennen. Mit diesen erfindungsgemässen Gegenständen können Zellen, vorzugsweise Tumorzellen, auf das Vorhandensein eines solchen Transporters untersucht werden. Bei Fehlen des beschriebenen Transporters in Zellen kann dieser auf genterapeutischem Weg eingebracht werden. Tumorzellen können auf diesem Weg wirkungsvoller als bisher möglich einer Chemotherapie zugänglich gemacht werden.</p>		

### **LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

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

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

### **Transporter für Saccharid-gekoppelte Arzneimittel**

Die vorliegende Erfindung betrifft einen Transporter für Saccharid-gekoppelte Arzneimittel in Zellen. Weiter betrifft die Erfindung eine für den Transporter kodierende Nukleinsäure, gegen den Transporter gerichtete Antikörper und Mittel zum Nachweis des Transporters in (Tumor)zellen sowie Mittel zum Einbringen des Transporters in Zellen.

Allgemein stellt eine schlechte zelluläre Aufnahme von Arzneimitteln häufig eine Begrenzung von Therapien dar. So gelangen viele Therapeutika nicht in die Zellen, weil sie wasserlöslich sind und die Zellmembran nicht durchdringen können oder sie gelangen in alle Zellen, wenn sie lipidlöslich sind. Bei Tumorerkrankungen unterschiedlichster Art, wo die Chemotherapie mit Zytostatika eine wichtige Säule der Therapie darstellt, ist die Auswahl der Zytostatika ein besonderes Problem. Hier muß der behandelnde Arzt die wichtige Entscheidung treffen, welches Zytostatikum aus der Vielzahl möglicher Zytostatika eingesetzt werden soll. Diese Entscheidung muß allerdings oft riviidiert werden, da nach einiger Behandlungszeit festgestellt wird, daß das Zytostatikum nicht die gewünschte Wirkung entfaltet. Dies kann beispielsweise daran liegen, daß keine nennenswerte Aufnahme der Wirksubstanz im Tumor stattgefunden hat und das Zytostatikum schnell wieder ausgeschieden wird. In einem solchen Fall ist kostbare Behandlungszeit verloren gegangen und die Tumorerkrankung häufig weiter fortgeschritten. Man hat nun vor einiger Zeit herausgefunden, daß Saccharid-gekoppelte Zytostatika Vorteile für die Tumor-Chemotherapie bringen. Diese sind besser wasserlöslich und häufig wirkungsvoller als ungekoppelte, da sie spezifischer wirken und weniger Nebenwirkungen haben. Saccharid-gekoppelte Zytostatika können im Gegensatz zu den herkömmlichen Zytostatika wegen ihrer Wasserlöslichkeit nicht passiv durch Zellmembranen gelangen. Sie benötigen für den Eintritt in Zellen Transportproteine oder Kanäle. Saccharid-

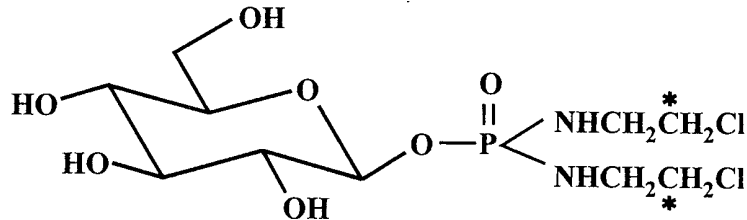
gekoppelte Zytostatika sind beispielsweise im europäischen Patent EP-B-0 369 182 beschrieben. Man wußte aber bisher nicht, über welche Transportmechanismen diese Zytostatika in die Tumorzellen gelangen und hatte deshalb keine Möglichkeit, die zelluläre Aufnahme der Saccharid-gekoppelten Zytostatika zu modulieren und vorauszusagen. Was vorstehend für Zytostatika zum Eintritt in Tumorzellen beschrieben worden ist, gilt sinngemäß auch für andere Arzneimittel, die in erkranktes Normalgewebe oder erkrankte Normalzellen gelangen müssen.

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung liegt nun darin, eine Möglichkeit bereitzustellen, mit dem erkrankte Zellen, insbesondere Tumorzellen, identifiziert werden können, die für Saccharid-gekoppelte Arzneimittel, insbesondere Zytostatika, zugänglich sind. Weiter besteht die Aufgabe der vorliegenden Erfindung darin, Zellen mit einem Transporter auszustatten, damit diese befähigt werden, Saccharid-gekoppelte Arzneimittel, insbesondere Zytostatika, zu transportieren.

Gelöst wird diese Aufgabe durch die in den Patentansprüchen definierten Gegenstände.

Von den Erfindern wurde herausgefunden, daß bestimmte menschliche Zellen einen Transporter aufweisen, mit dem Saccharid-gekoppelte Arzneimittel, insbesondere Zytostatika, leicht in die Zelle transportiert werden können. Bei diesem Transporter handelt es sich um eine Subtype von natriumabhängigen Zuckertransportern der sog. SGLT-Familie, die als SAAT1 bezeichnet wird. Von den Erfindern wurde herausgefunden, daß diese Transportersubtypen im Gegensatz zu den anderen Subtypen dieser Familie in der Lage ist, Saccharid-gekoppelte Arzneimittel zu transportieren. Unter Saccharid-gekoppelten Arzneimitteln sollen erfindungsgemäß alle Medikamente verstanden werden, die mit einem Saccharid verbunden sind, vorzugsweise  $\beta$ -glykosidisch mit D-Glucose oder D-Galactose. Insbesondere sollen darunter Saccharid-gekoppelte Zytostatika verstanden werden, die sich für eine Chemotherapie von Tumoren eignen und mit einem Saccharid verbunden ist, vorzugsweise  $\beta$ -glykosidisch mit Glucose

oder Galactose verbunden ist. Ganz bevorzugt ist darunter  $\beta$ -D-Glycosylisophosphoramid-Mustard (D-19575) zu verstehen. Diese Verbindung hat die folgende Formel:



Außerdem sind weitere bevorzugte Saccharid-gekoppelte Zytostatika in EP-B-0 369 182 zu finden.

Die Erfindung ermöglicht, Gewebe und Organe zu identifizieren, bei denen Saccharid-gekoppelte Arzneimittel über einen Transporter aufgenommen werden können. Die Erfindung ermöglicht auch eine Voraussage von Nebenwirkungen bei der Behandlung mit Saccharid-gekoppelten Arzneimitteln, insbesondere Zytostatika. Nebenwirkungen sind nämlich in allen Organen möglich, die den Transporter enthalten. Für diese Organe können schützende Maßnahmen durchgeführt werden.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Nucleinsäure, die für ein Protein mit der biologischen Aktivität eines Transporters für Saccharid-gekoppelte Arzneimittel kodiert. Diese Nucleinsäure kann eine RNA oder eine DNA sein. Letztere kann z.B. eine genomische DNA oder eine cDNA sein. Erfindungsgemäß ist dies eine Nucleinsäure, bevorzugt eine DNA, die folgendes umfaßt:

- (a) die Nucleinsäure von Fig. 1 bzw. Fig. 1A, oder eine hiervon durch ein oder mehrere Basenpaare unterschiedliche DNA bzw. ein Fragment davon,
- (b) eine mit der Nucleinsäure von (a) hybridisierende DNA, oder
- (c) eine mit der Nucleinsäure von (a) oder (b) über den degenerierten genetischen Code verwandte DNA.

Die unter (a) und (c) definierten Nucleinsäuremoleküle umfassen Nucleinsäuremoleküle, die sich gegenüber der in Figur 1 angegebenen Sequenz durch Deletion(en), Insertion(en), Austausch(e) oder andere im Stand der Technik bekannte Modifikationen unterscheiden. Der Begriff "Nucleinsäurefragment" soll einen Ausschnitt bzw. Segment des ursprünglichen Nucleinsäuremoleküls umfassen, wobei das durch dieses Nucleinsäurefragment codierte Protein noch Transporteraktivität aufweist. Dazu zählen auch Allelvarianten. Verfahren zur Erzeugung der vorstehenden Änderungen in der Nucleinsäuresequenz sind dem Fachmann bekannt und in Standardwerken der Molekularbiologie beschrieben, beispielsweise in Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2. Ausgabe, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor NY (1989). Der Fachmann ist auch in der Lage zu bestimmen, ob ein von einer so veränderten Nucleinsäuresequenz codiertes Protein noch über die biologische Aktivität eines Transporters verfügt. Dies geschieht beispielsweise dadurch, daß das Protein in Oozyten des Krallenfrosches *Xenopus laevis* exprimiert und die Eier danach bezüglich ihrer Transportaktivität untersucht werden (Busch et al., *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 271, No. 51, S. 32599-32604, 1996).

Der Ausdruck "hybridisierende DNA" weist auf eine DNA hin, die unter üblichen Bedingungen, insbesondere bei 20°C unter dem Schmelzpunkt der DNA, mit einer DNA von (a) hybridisiert. Der Begriff "hybridisieren" bezieht sich dabei auf konventionelle Hybridisierungsbedingungen, vorzugsweise auf Hybridisierungsbedingungen, bei denen als Lösung 5xSSPE, 1% SDS, 1xDenhardts-Lösung verwendet wird und die Hybridisierungstemperaturen zwischen 35°C und 70°C, vorzugsweise bei 65°C liegen. Nach der Hybridisierung wird vorzugsweise zuerst mit 2xSSC, 1% SDS und danach mit 0,2xSSC bei Temperaturen zwischen 35°C und 70°C, vorzugsweise bei 65°C gewaschen (zur Definition von SSPE, SSC und Denhardts-Lösung siehe Sambrook et al., supra). Besonders bevorzugt sind stringente Hybridisierungsbedingungen, wie sie beispielsweise in Sambrook et al., supra, beschrieben sind.

In einer bevorzugten Ausführungsform stammt das erfindungsgemäße Nuclein-

säuremolekül von einem Säuger, vorzugsweise von einem Menschen. Auf Nucleinsäurehybridisierung basierende Screening-Verfahren erlauben die Isolierung der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle aus jedem Organismus bzw. abgeleiteten cDNA-Banken, wobei Sonden verwendet werden, die die in Figur 1 angegebene Nucleinsäuresequenz oder einen Teil davon enthalten.

Die erfindungsgemäßen Nucleinsäuren können auch in einen Vektor bzw. Expressionsvektor inseriert werden. Somit umfaßt die vorliegende Erfindung auch diese Nucleinsäuremoleküle enthaltende Vektoren. Beispiele solcher sind dem Fachmann bekannt. Im Falle eines Expressionsvektors für *E. coli* sind dies z.B. pGEMEX, pUC-Derivate, pBR322, pBlueScript, pGEX-2T, pET3b und pQE-8. Für die Expression in Hefe sind z.B. pY100 und Ycpad1 zu nennen, während für die Expression in tierischen Zellen z.B. pKCR, pEFBOS, cDM8 und pCEV4, anzugeben sind. Für die Expression in Insektenzellen eignet sich besonders der Baculovirus-Expressionsvektor pAcSGHisNT-A. In einer bevorzugten Ausführungsform ist das erfindungsgemäße Nucleinsäuremolekül im Vektor mit regulatorischen Elementen funktionell verknüpft, die dessen Expression in prokaryotischen oder eukaryotischen Wirtszellen erlauben. Solche Vektoren enthalten neben den regulatorischen Elementen, beispielsweise einem Promotor, typischerweise einen Replikationsursprung und spezifische Gene, die die phänotypische Selektion einer transformierten Wirtszelle erlauben. Zu den regulatorischen Elementen für die Expression in Prokaryonten, beispielsweise *E. coli*, zählen der lac-, trp-Promotor oder T7-Promotor, und für die Expression in Eukaryonten der AOX1- oder GAL1-Promotor in Hefe, und der CMV-, SV40-, RVS-40-Promotor, CMV- oder SV40-Enhancer für die Expression in tierischen Zellen. Weitere Beispiele für geeignete Promotoren sind der Metallothionein I- und der Polyhedrin-Promotor.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist der die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle enthaltene Vektor ein Virus, beispielsweise ein Adenovirus oder Vaccinia-Virus, der bei einer Gentherapie von Nutzen ist. Besonders bevorzugt sind Retroviren. Beispiele für geeignete Retroviren sind MoMuLV, HaMuSV, MuMTV, RSV oder GaLV. Für Zwecke der Gentherapie können die erfindungs-

gemäßen Nucleinsäuremoleküle auch in Form von kolloidalen Dispersionen zu den Zielzellen transportiert werden. Dazu zählen beispielsweise Liposomen oder Lipoplexe (Mannino et al., *Biotechniques* 6 (1988), 682). Durch das gentherapeutische Einbringen des Transporters in Zellen, die diesen sonst nicht aufweisen, werden diese für Saccharid-gekoppelte Arzneimittel empfänglich gemacht und können in einer medikamentösen Therapie effizient behandelt werden. Im Falle von Tumorzellen erfolgt die Behandlung mit Saccharid-gekoppelten Zytostatika, die im Rahmen einer Chemotherapie effizient vernichtet werden.

Allgemeine auf dem Fachgebiet bekannte Verfahren können zur Konstruktion von Expressionsvektoren, die die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle und geeignete Kontrollsequenzen enthalten, verwendet werden. Zu diesen Verfahren zählen beispielsweise in vitro-Rekombinationstechniken, synthetische Verfahren, sowie in vivo-Rekombinationsverfahren, wie sie beispielsweise in Sambrook et al., *supra*, beschrieben sind. Der Fachmann weiß somit, in welcher Weise eine erfindungsgemäße DNA in einen Expressionsvektor inseriert werden muß. Ihm ist auch bekannt, daß diese DNA in Verbindung mit einer für ein anderes Protein bzw. Peptid kodierenden DNA inseriert werden kann, so daß die erfindungsgemäße DNA in Form eines Fusionsproteins exprimiert werden kann.

Die vorliegende Erfindung betrifft auch die vorstehend beschriebenen Vektoren enthaltende Wirtszellen. Zu diesen Wirtszellen zählen Bakterien, Hefe, Insekten- und Tierzellen, vorzugsweise Säugerzellen. Bevorzugt sind die E.coli-Stämme HB101, DH1, x1776, JM101, JM 109, BL21 und SG 13009, der Hefe-Stamm *Saccharomyces cerevisiae* und die tierischen Zellen L, 3T3, FM3A, CHO, COS, Vero und HeLa sowie die Insektenzellen sf9. Verfahren zur Transformation dieser Wirtszellen, zur phänotypischen Selektion von Transformanten und zur Expression der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle unter Verwendung der vorstehend beschriebenen Vektoren sind auf dem Fachgebiet bekannt.

Von den Erfindern wurde ein bevorzugter menschlicher Transporter für Saccharid-gekoppelte Arzneimittel mit SAAT1 bezeichnet, und ein Clon, der eine

cDNA-Teilsequenz von SAAT1 aus der Großhirnrinde des Menschen enthält, wurde am 11. Februar 1998 bei der DSMZ, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, 38124 Braunschweig, unter der Hinterlegungsnummer DSM 11991 hinterlegt.

Die vorliegende Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Herstellung eines Proteins mit der biologischen Aktivität eines Transporters für Saccharid-gekoppelte Arzneimittel, umfassend die Kultivierung der vorstehend beschriebenen Wirtszellen unter Bedingungen, die die Expression des Proteins erlauben (vorzugsweise stabile Expression), und Gewinnung des Proteins aus der Kultur. Der Fachmann kennt dabei Bedingungen, transformierte bzw. transfizierte Zellen zu kultivieren. Geeignete Verfahren zur rekombinanten Herstellung des Proteins sind allgemein bekannt (siehe beispielsweise Holmgren, *Annu.Rev.Biochem.* 54 (1985), 237, LaVallie et al., *Bio/Technology* 11 (1993), 187, Wong, *Curr.Opin.Biotech.* 6 (1995), 517, Romanos, *Curr.Opin.Biotech.* 6 (1995), 527, Williams et al., *Curr. Opin. Biotech.* 6 (1995), 538, und Davies, *Curr. Opin.Biotech.* 6 (1995), 543. Auch sind ihm Verfahren bekannt, das durch die erfindungsgemäße Nucleinsäure exprimierte Protein zu isolieren und zu reinigen. Auch geeignete Reinigungsverfahren (beispielsweise präparative Chromatographie, Affinitätschromatographie, beispielsweise Immunoaffinitätschromatographie, HPLC etc.) sind allgemein bekannt.

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung einen von dem erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekül codiertes oder nach dem vorstehenden Verfahren erhaltenes Protein mit Aktivität für den Transport von Saccharid-gekoppelten Arzneimittel. Ein solches Protein ist in Fig. 2 bzw. Fig. 2A gezeigt. In diesem Zusammenhang soll erwähnt werden, daß das erfindungsgemäße Protein gemäß üblicher Verfahren modifiziert sein kann, wobei das Protein auch als Fusionsprotein vorliegen kann.. Zu diesen Modifikationen zählen Austausche, Insertionen oder Deletionen von Aminosäuren, die die Struktur des Proteins modifizieren, wobei seine biologische Aktivität im Wesentlichen erhalten bleibt. Zu den Austauschen zählen z.B. "konservative" Austausche von Amino-

säureresten, d.h. Austausch gegen biologisch ähnliche Reste, z.B. die Substitution eines hydrophoben Rests (z.B. Isoleucin, Valin, Leucin, Methionin) gegen einen anderen hydrophoben Rest, oder die Substitution eines polaren Rests gegen einen anderen polaren Rest (z.B. Arginin gegen Lysin, Glutaminsäure gegen Asparaginsäure etc.). Deletionen können zur Erzeugung von Molekülen führen, die eine deutlich geringere Größe aufweisen, d.h., denen beispielsweise Aminosäuren am N- oder C-Terminus fehlen.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein gegen ein vorstehendes Protein bzw. Fusionsprotein gerichteter Antikörper. Die Antikörper können monoclonale, polyclonale oder synthetische Antikörper sein oder Fragmente davon, beispielsweise Fab-, Fv- oder scFv-Fragmente. Vorzugsweise handelt es sich dabei um einen monoclonalen Antikörper. Für die Herstellung ist es günstig, Tiere, insbesondere Kaninchen oder Hühner für einen polyklonalen und Mäuse für einen monoklonalen Antikörper, mit einem vorstehenden (Fusions)protein oder Fragmenten davon zu immunisieren. Weitere "Booster" der Tiere können mit dem gleichen (Fusions)protein oder Fragmenten davon erfolgen. Der polyklonale Antikörper kann dann aus dem Serum bzw. Eigelb der Tiere erhalten werden. Die erfindungsgemäßen Antikörper können gemäß Standardverfahren hergestellt werden, wobei das von den erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekülen codierte Protein oder ein synthetisches Fragment davon als Immunogen dienen. Monoclonale Antikörper können beispielsweise durch das von Köhler und Milstein (Nature 256 (1975), 495) und Galfré, Meth. Enzymol. 73 (1981), 3, beschriebene Verfahren hergestellt werden, wobei Maus-Myelomzellen mit von immunisierten Säugern stammenden Milzzellen fusioniert werden. Diese Antikörper können beispielsweise zur Immunpräzipitation der vorstehend diskutierten Proteine mit Transporteraktivität oder zur Isolierung verwandter Proteine aus cDNA-Expressionsbanken verwendet werden. Die Antikörper können beispielsweise in Immunoassays in Flüssigphase oder an einen festen Träger gebunden werden. Dabei können die Antikörper auf verschiedene Art und Weise markiert sein. Geeignete Marker und Markierungsverfahren sind auf dem Fachgebiet bekannt. Beispiele für Immunassays sind ELISA und RIA.

Die vorliegende Erfindung betrifft ferner die Verwendung der vorstehend beschriebenen Nucleinsäuren, Vektoren, Proteine und/oder Antikörper als Arzneimittel. Diese Arzneimittel enthalten gegebenenfalls zusätzlich einen pharmazeutisch verträglichen Träger. Geeignete Träger und die Formulierung derartiger Arzneimittel sind dem Fachmann bekannt. Zu geeigneten Trägern zählen beispielsweise Phosphat-gepufferte Kochsalzlösungen, Wasser, Emulsionen, beispielsweise Öl/Wasser-Emulsionen, Netzmittel, sterile Lösungen etc. Die Verabreichung der Arzneimittel kann oral oder parenteral erfolgen. Zu den Verfahren für die parenterale Verabreichung gehören die topische, intra-arterielle (z.B. direkt zu dem Tumor), intramuskuläre, subkutane, intramedulläre, intrathekale, intraventrikuläre, intravenöse, intraperitoneale oder intranasale Verabreichung. Die geeignete Dosierung wird von dem behandelnden Arzt bestimmt und hängt von verschiedenen Faktoren ab, beispielsweise von dem Alter, dem Geschlecht, dem Gewicht des Patienten, dem Stadium einer Erkrankung (z.B. eines Tumors), der Art der Verabreichung etc. ab.

Dabei kann das Arzneimittel in der Gentherapie Verwendung finden, wobei die vorstehend beschriebenen Verfahren bzw. Vektoren zur Einschleusung der erfindungsgemäßen Nucleinsäuren Anwendung finden können. Andererseits kann das von den erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekülen codierte Protein direkt verabreicht werden, um so in Zellen, die keine funktionalen Kopien der für den Transporter codierenden Gene besitzen, Transporteraktivität herzustellen. Das Arzneimittel kommt bevorzugt dann zur Anwendung, wenn die nachstehend beschriebenen Verfahren den Nachweis darüber liefern, daß in dem betreffenden Gewebe eines Patienten biologisch aktive Transporter nicht oder in zu geringen Mengen gebildet werden.

Außerdem eignen sich die Gegenstände die vorliegende Erfindung für ein Verfahren zum Nachweis der Expression eines von dem vorstehenden Nucleinsäuremolekül codierten Transporters durch Bestimmung der Anwesenheit der diesen Transporter codierenden mRNA, wobei das Verfahren umfaßt:

- 10 -

- (a) Gewinnung von mRNA aus Gewebe,
- (b) Inkontaktbringen der so erhaltenen mRNA mit dem erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekül als Sonde unter Hybridisierungsbedingungen, und
- (c) Nachweis der Anwesenheit der mit der Sonde hybridisierten mRNA, wodurch die Expression des Transporters in Gewebe nachgewiesen wird.

Dieses Verfahren eignet sich insbesondere für den Nachweis in Tumorgewebe.

Geeignete Methoden zur Durchführung dieses Verfahrens sind dem Fachmann bekannt und dieser kann auch zur Gewinnung geeigneter Proben, zur Durchführung geeigneter Extraktionsverfahren und Hybridisierungsverfahren und zum Nachweis spezifischer mRNAs nach den in den nachstehend angegebenen Beispielen genau beschriebenen Verfahren vorgehen.

Der vorstehende Nachweis kann auch über PCR durchgeführt werden. Dabei werden Primer verwendet, die die den Transporter codierende Sequenz flankieren. Insbesondere eignet sich eine RT-PCR. Dafür wird aus geeigneten Zellen RNA isoliert und einer reversen Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion unterworfen. Die Durchführung einer RT-PCR ist dem Fachmann geläufig und es gibt inzwischen auch käuflich erhältliche Kits dafür. Als Primer für menschliches SAAT1 können beispielsweise 5'-GGA CTT CCC CAG TAA TGT-3' (forward) und 5'-CTT CTC GGT AAA GCT CTC-3' (reverse) verwendet werden und in Form eines Kits zusammen mit den anderen üblichen Reagenzien für RT-PCR zur Verfügung gestellt werden. Die PCR-Produkte werden dann beispielsweise auf einem 1% Agarosegel aufgetrennt, geblottet und bei 48°C an die <sup>32</sup>P-markierten internen Oligonukleotide 5'-CAT CTG TGT GGT TTT GTT (forward) hybridisiert.

Ein von den erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekülen codierter Transporter kann auch auf Proteinebene nachgewiesen werden. Dieses Verfahren umfaßt die Schritte:

- 11 -

- (a) Gewinnen einer Probe aus Gewebe,
- (b) Inkontaktbringen der so erhaltenen Probe mit dem vorstehend beschriebenen Antikörper als Sonde unter Bedingungen, die die Bindung des Antikörpers an den Transporter erlauben, und
- (c) Nachweis des gebundenen Antikörpers, wodurch die Expression des Transporters in der Zelle nachgewiesen wird.

Dieser Nachweis kann ebenfalls unter Anwendung von dem Fachmann bekannten Standardtechniken durchgeführt werden. Diesem sind auch Zellaufschlußverfahren bekannt, die die Isolierung des Proteins auf eine solche Weise erlauben, daß dieses mit dem Antikörper in Kontakt gebracht werden kann. Der Nachweis des gebundenen Antikörpers erfolgt vorzugsweise über Immunassays, beispielsweise ELISA oder RIA.

Bei den obigen Verfahren ist unter einer Probe aus (Tumor)gewebe bzw. unter (Tumor)zellen beispielsweise eine Biopsie (z.B. Feinnadel- oder Stanzbiopsie), Serumprobe (vorzugsweise bei Blutzelltumoren), Liquorprobe oder Operationsmaterial zu verstehen.

Desweiteren eignen sich die Gegenstände der vorliegenden Erfindung dazu, Tumore und Metastasen, welche diesen SAAT1-Transporter exprimieren zu identifizieren. Dies kann geschehen, indem man dem Patienten ein z.B. mit Jod<sup>125</sup> radioaktiv markiertes Saccharid-gekoppeltes Zytostatikum verabreicht und dann die Verteilung der Reaktivität im Körper des Patienten mit Hilfe einer Szintigraphie abtastet. Als zweite Methode kommt NMR mit <sup>19</sup>F-markierten Zytostatika in Frage.

Die Gegenstände der vorliegenden Erfindung sind außerdem geeignet, um neue Saccharid-gekoppelte Arzneimittel, insbesondere Zytostatika, zu entwickeln, die über den SAAT1-Transporter in Zellen aufgenommen werden. Dazu muß der SAAT1-Transporter in Oozyten des Krallenfrosches *Xenopus laevis* oder in anderen Expressionssystemen exprimiert werden und die Aufnahme neuer

Saccharid-gekoppelter Arzneimittel gemessen werden (vgl. Fig. 3).

Die Erfindung wird anhand der Figuren weiter beschrieben, welche zeigen:

- Fig. 1: Nukleinsäuresequenz des SAAT1-Transporters des Menschen (aus Großhirnrinde)  
Fig. 1a: Nukleinsäureteilsequenz des SAAT1-Transportes des Menschen (Ausschnitt aus Fig. 1 von Nukleotid 251 bis Nukleotid 741)
- Fig. 2: Aminosäuresequenz des SAAT1-Transporters des Menschen (aus Großhirnrinde)  
Fig. 2a: Aminosäureteilsequenz des SAAT1-Transportes des Menschen (Ausschnitt aus Fig. 2 von Aminosäure 79 bis 241)
- Fig. 3: Nachweis, daß [ $^{14}\text{C}$ ]- $\beta$ -D-Glc-IPM nur von SAAT1 und keiner anderen Subtype der SGLT-Familie transportiert wird.
- Fig. 4: Nachweis, daß ein Saccharid-gekoppeltes Arzneimittel ( $\beta$ -D-Glycosyl-gentisinsäuremethylester) von SAAT1, aber nicht vom Transporter SGLT1 transportiert wird.
- Fig. 5: Verteilung von SAAT1 in menschlichen Organen und Geweben
- Fig. 6: Expression von SAAT1 in verschiedenen menschlichen Tumorgeweben
- Fig. 7: [ $^{14}\text{C}$ ]- $\beta$ -D-Glc-IPM Aufnahme in suspendierte menschliche Karzinoma T84-Zellen durch SAAT1

Die folgende Erfindung wird weiter anhand der nachfolgenden Beispiele beschrieben:

**Beispiel 1: Transkription von SAAT1 in menschlichen Tumorzellen**

Gesamt-RNA wurde gemäß Standardverfahren (Chomczynski et al., Anal. Biochem. **162**, S. 156-159, 1987) aus verschiedenen renalen Karzinomen gewonnen (siehe Fig. 6; Nukleargrad 1-Nierentumor: Spur c; Nukleargrad 2-Nierentumor: Spur d; Nukleargrad 3-Nierentumor: Spur e; menschl. Colonkarzinom aus Mäuse-Tumor-Xenografts: Spur f; menschl. Ovarkarzinom aus Mäuse-Tumor-Xenografts: Spur g; menschl. Karzinoma-Zelllinie KTCTL30: Spur h; renale menschl. Karzinoma-Zelllinie KTCTL104: Spur i; renale menschl. Karzinoma-Zelllinie T84: Spur k). Die RNAs und eine Kontrolle ohne RNA (Spur b) wurden 10 Min. bei 37°C mit DNase (2U DNase/ $\mu$ g RNA) behandelt, um Reste genomischer DNA zu entfernen. Danach wurden sie einer reversen Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) unterworfen. Die RT-PCR wurde mit Titan<sup>T</sup>-<sup>M</sup>One Tube RT-PCR-System (Boehringer Mannheim) den Herstellerinformationen folgend unterworfen. Es wurde jeweils 1  $\mu$ g RNA verwendet und die eingesetzten Primer waren 5'-GGA CTT CCC CAG TAA TGT-3' (forward) und 5'-CTT CTC GGT AAA GCT CTC-3' (reverse). Die PCR-Produkte und ein Größenmarker (Spur a) wurden auf einem 1% Agarosegel aufgetrennt. Ein Teil des Gels wurde mit Ethidiumbromid angefärbt (Fig. 6, obere Spalte). Der andere Teil des Gels wurde geblottet und bei 48°C an das <sup>32</sup>P-markierte Oligonukleotid 5'-CAT CTG TGT GGT TTT GTT-3' (forward) hybridisiert. Die Membran wurde bei 48°C mit 6xSSC enthaltend 0,05% (w/v) Natriumpyrophosphat gewaschen und zur Autoradiografie ein Film aufgelegt.

Als Kontrollexperiment wurde genomische DNA verwendet, mit der jede cDNA-Amplifikation aus genomischer DNA ausgeschlossen war.

Wie durch Fig. 6 verdeutlicht wird, ist das menschliche SAAT1-Fragment in Carcinomas der Niere, Darm und Ovarien, in Darmkrebszellen T84 und in zwei

renalen Carcinoma-Zelllinien nachweisbar.

**Beispiel 2: Transkription von SAAT1 in verschiedenen menschlichen Organen und Geweben**

Ein menschlicher RNA "Master-Blot" (Firma Clontech Laboratories, Palo Alto, Californien, USA; Katalog-Nr. 7770) auf dem mRNA-Proben aus vielen menschlichen Geweben aufgetragen sind, wurde nach den Angaben des Herstellers (Protokoll Nr. PT3004-1) mit einem radioaktiv markierten cDNA-Fragment des menschlichen SAAT1 (s. Fig. 1, Nukleotide 1730-2032) nach den Angaben des Herstellers hybridisiert und gewaschen. Das Ergebnis ist in Fig. 5 gezeigt. Dort ist zu sehen, daß kleine Mengen von SAAT1 in vielen Organen transkribiert werden. Am stärksten wird SAAT1 in der Skelettmuskulatur (Fig. 5 A3), in der Prostata (Fig. 5 A7), im Dünndarm (Fig. 5 C3), in der Lunge (Fig. 5 D2) und in der fötalen Leber (Fig. 5 E4) transkribiert.

**Beispiel 3: Expression von [<sup>14</sup>C]-β-D-Glc IPM Transport durch SAAT1 in Oozyten des Krallenfrosches *Xenopus laevis*.**

In *Xenopus laevis* Oozyten wurden 50 nl Wasser mit und ohne 10 ng cRNA von SGLT1 (Typ eines Saccharid-Transporter aus Kaninchen), SGLT1 (Mensch), Hu14 (Typ eines weiteren Saccharid-Transporters aus Mensch), SMIT (Typ eines weiteren Saccharid-Transporters aus Hund) oder SAAT1 (Schwein) injiziert. Nach 2-4 Tagen Inkubation wurde die Expression des jeweiligen Transporters durch Messung der Phlorizin-inhibierbaren Aufnahme nach 30 Minuten Inkubation mit 50 μM [<sup>14</sup>C] AMG (SGLT1, SAAT1), 1,25 mM [<sup>14</sup>C] AMG (Hu14) und 1 μM [<sup>3</sup>H] myo-Inositol gemessen. Die verwendeten Phlorizin-Konzentrationen waren 100 μM (SGLT1 aus Kaninchen), 200 μM (SGLT1 aus Mensch, Hu14, SAAT1) oder 500 μM (SMIT). Die exprimierte Phlorizin-inhibierbare Aufnahmerate von AMG und myo-Inositol waren 274 ± 22 (AMG, SGLT1, Kaninchen), 48

$\pm 5$  (AMG, SGLT1, Mensch),  $25 \pm 1$  (AMG, Hu 14),  $6,5 \pm 0,7$  (myo-Inositol, SMIT) bzw.  $18 \pm 2$  (AMG, SAAT1) pmol x Oozyte<sup>-1</sup> x h<sup>-1</sup>. Unter identischen experimentellen Bedingungen wurden die gleichen Chargen injizierter Oozyten auf die Phlorizin-inhibierbare Aufnahme von  $100 \mu\text{M}$  [<sup>14</sup>C]- $\beta$ -D-Glc-IPM getestet.

Das Ergebnis ist in Fig. 3 gezeigt, woraus klar hervorgeht, daß nur SAAT1 das Saccharid-gekoppelte Zytostatikum zu transportieren vermag.

**Beispiel 4: Expression des Transportes von  $\beta$ -D-Glycosylgentisinsäuremethylester durch SAAT1**

Gentisinsäuremethylester ist ein Antioxidationsmittel, welches z.B. bei Morbus Parkinson, eingesetzt werden kann. Die Strukturformel von  $\beta$ -D-Glycosylgentisinsäuremethylester ( $\beta$ -D-Glc-GME) ist im oberen Teil von Fig. 4 dargestellt. In *Xenopus laevis* Oozyten wurden 50 nl Wasser mit oder ohne 10 ng cRNA von SAAT1 (Schwein) oder SGLT1 (Menschen) injiziert. Nach 3 Tagen Inkubation wurde der durch SAAT1 vermittelte Transport von  $\beta$ -D-Glycosylgentisinsäuremethylester elektrisch gemessen. Dies ist möglich, da der SAAT1-Transporter ein sog. Na<sup>+</sup>-Kotransporter ist, der seine Substrate, also AMG oder  $\beta$ -D-Glycosylgentisinsäuremethylester, immer zusammen mit Natriumionen transportiert. Im vorliegenden Beispiel wurden die Oozyten entweder mit 1 mM AMG oder 1 mM  $\beta$ -D-Glc-GME überströmt und der in die Oozyten gerichtete Natrium-Strom gemessen. Dabei wurde die Spannung über die Membran auf -50 mV "geklemmt" (sof. voltage-clamp Methode, s. Busch et al., J. of Biological Chemistry, Vol. 271, No. 51, S. 32599-32604, 1996). Während die mit Wasser injizierten Oozyten nach Überströmung mit AMG oder  $\beta$ -D-Glc-GME keinen Strom zeigten, induzierte  $\beta$ -D-Glc-GME bei den Oozyten einen Strom, die SAAT1 exprimierten. Durch AMG konnten dagegen sowohl in den SGLT1 exprimierenden als auch in den SAAT1 exprimierenden Oozyten Ströme gemessen induziert werden. Das Ergebnis ist in Fig. 4 gezeigt, d.h. daß die Saccharid-gekoppelte therapeutisch wirksame Substanz  $\beta$ -D-Glc-GME von SAAT1, aber nicht von

SGLT1 transportiert wird.

**Beispiel 5:            $[^{14}\text{C}]\text{-}\beta\text{-D-Glc IPM}$  Aufnahme in menschl. Carcinomazellen**

T84-Zellen (ECACC Nr. 88021101), die von EACC (Salisbury, GB) erhalten wurden, wurden bei 37°C in einer 1:1 Mischung von Dulbecco's modified Eagle's-Medium und Ham's T12 Medium (Fa. Sigma) bei 5 % CO<sub>2</sub> auf Gewebekulturschalen der Firma Greiner kultiviert. Die Mischung enthielt weiter 10% fötales Rinderserum, 4 mM L-Glutamin, 10 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin. Nach Konfluenz der Zellen wurden diese durch 1-stündige Inkubation für 1 Std. bei 37°C mit Mg<sup>2+</sup>- Ca<sup>2+</sup>-freiem Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) enthaltend 0,5 mM EDTA, 10 mM Hepes und 28 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH7,4 abgelöst, bei 1000g sedimentiert und in PBS resuspendiert. Die suspendierten Zellen wurden 30 Sek. mit PBS, enthaltend verschiedene Konzentrationen D- $[^{14}\text{C}]\beta\text{-D-Glc-IPM}$  inkubiert. Die Inkubationen wurden mit eiskaltem PBS enthaltend 1 mM Phlorizin (bekannt als Inhibitor für Glucosetransporter) gestoppt. Die Zellen wurden zweimal mit dieser Stopplösung gewaschen, mit 4M Guanidinthiocyanat solubiliert und auf Radioaktivität untersucht.

Dieses Ergebnis ist in Fig. 7 gezeigt. Aus dem Ergebnis geht klar hervor, daß T84-Zellen über einen Transporter verfügen, der es ermöglicht, daß  $\beta\text{-D-Glc-IPM}$  aufgenommen wird.

**Beispiel 6:           Herstellung von Antikörpern**

Mit einem Gel-gereinigten Transporter-Proteinfragment gemäß Fig. 2 wurden Tiere wie folgt immunisiert:

**Immunisierungsprotokoll für polyklonale Antikörper im Kaninchen**

Pro Immunisierung wurden 35µg Gel-gereinigtes Protein in 0,7 ml PBS und 0,7 ml komplettem bzw. inkomplettem Freund's Adjuvans eingesetzt.

- Tag 0: 1. Immunisierung (komplettes Freund's Adjuvans)  
Tag 14: 2. Immunisierung (inkomplettes Freund's Adjuvans; icFA)  
Tag 28: 3. Immunisierung (icFA)  
Tag 56: 4. Immunisierung (icFA)  
Tag 80: Ausbluten

Das Serum des Kaninchens wurde im Immunoblot getestet. Hierzu wurde ein erfindungsgemäßes Fusionsprotein einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterzogen und auf ein Nitrocellulosefilter übertragen (vgl. Khyse-Andersen, J., J. Biochem. Biophys. Meth. 10, (1984), 203-209). Die Western Blot-Analyse wurde wie in Bock, C.-T. et al., Virus Genes 8, (1994), 215-229, beschrieben, durchgeführt. Hierzu wurde das Nitrocellulosefilter eine Stunde bei 37°C mit einem ersten Antikörper inkubiert. Dieser Antikörper war das Serum des Kaninchens (1:10000 in PBS). Nach mehreren Waschschritten mit PBS wurde das Nitrocellulosefilter mit einem zweiten Antikörper inkubiert. Dieser Antikörper war ein mit alkalischer Phosphatase gekoppelter monoklonaler Ziege Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper (Dianova) (1:5000) in PBS. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37°C folgten mehrere Waschschrritte mit PBS und anschließend die alkalische Phosphatase-Nachweisreaktion mit Entwicklerlösung (36µM 5' Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat, 400µM Nitroblau-tetrazolium, 100mM Tris-HCl, pH 9.5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>) bei Raumtemperatur, bis Banden sichtbar waren.

Es zeigte sich, daß erfindungsgemäße, polyklonale Antikörper hergestellt werden können.

#### **Immunisierungsprotokoll für polyklonale Antikörper im Huhn**

Pro Immunisierung wurden 40µg Gel-gereinigtes Protein in 0,8 ml PBS und 0,8 ml komplettem bzw. inkomplettem Freund's Adjuvans eingesetzt.

- Tag 0. 1. Immunisierung (komplettes Freund's Adjuvans)  
Tag 28: 2. Immunisierung (inkomplettes Freund's Adjuvans; icFA)

Tag 50: 3. Immunisierung (icFA)

Aus Eigelb wurden Antikörper extrahiert und im Western Blot getestet. Es wurden erfindungsgemäße, polyklonale Antikörper nachgewiesen.

### **Immunisierungsprotokoll für monoklonale Antikörper der Maus**

Pro Immunisierung wurden 12 $\mu$ g Gel-gereinigtes Protein in 0,25 ml PBS und 0,25 ml komplettem bzw. inkomplettem Freund's Adjuvans eingesetzt; bei der 4. Immunisierung war das Fusionsprotein in 0,5 ml (ohne Adjuvans) gelöst.

Tag 0. 1. Immunisierung (komplettes Freund's Adjuvans)

Tag 28: 2. Immunisierung (inkomplettes Freund's Adjuvans; icFA)

Tag 56: 3. Immunisierung (icFA)

Tag 84: 4. Immunisierung (PBS)

Tag 87: Fusion


Überstände von Hybridomen wurden im Western Blot getestet. Erfindungsgemäße, monoklonale Antikörper wurden nachgewiesen.

BUDAPESTER VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE  
ANERKENNUNG DER HINTERLEGUNG VON MIKROORGANISMEN  
FÜR DIE ZWECKE VON PATENTVERFAHREN

## INTERNATIONALES FORMBLATT

Bayrische Julius-  
Maximilians-Universität  
Anatomisches Institut I  
Prof. Dr. Koepsell  
Koellikerstr. 6  
97070 Würzburg

EMPFANGSBESTÄTIGUNG BEI ERSTHINTERLEGUNG,  
ausgestellt gemäß Regel 7.1 von der unten angegebenen  
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

I. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS	
Vom HINTERLEGER zugewiesenes Bezugszeichen: hSAAT1	Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugewiesene EINGANGSNUMMER: DSM 11991
II. WISSENSCHAFTLICHE BESCHREIBUNG UND/ODER VORGESCHLAGENE TAXONOMISCHE BEZEICHNUNG	
Mit dem unter I. bezeichneten Mikroorganismus wurde  <input checked="" type="checkbox"/> eine wissenschaftliche Beschreibung <input checked="" type="checkbox"/> eine vorgeschlagene taxonomische Bezeichnung  eingereicht. (Zutreffendes ankreuzen).	
III. EINGANG UND ANNAHME	
Diese internationale Hinterlegungsstelle nimmt den unter I bezeichneten Mikroorganismus an, der bei ihr am 1998-02-11 (Datum der Ersthinterlegung) <sup>1</sup> eingegangen ist.	
IV. EINGANG DES ANTRAGS AUF UMWANDLUNG	
Der unter I bezeichnete Mikroorganismus ist bei dieser Internationalen Hinterlegungsstelle am eingegangen (Datum der Ersthinterlegung) und ein Antrag auf Umwandlung dieser Ersthinterlegung in eine Hinterlegung gemäß Budapest Vertrag ist am eingegangen (Datum des Eingangs des Antrags auf Umwandlung).	
V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH  Anschritt: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:   Datum: 1998-02-13


<sup>1</sup> Falls Regel 6.4 Buchstabe d zutrifft, ist dies der Zeitpunkt, zu dem der Status einer internationalen Hinterlegungsstelle erworben worden ist.

BUDAPESTER VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE  
ANERKENNUNG DER HINTERLEGUNG VON MIKROORGANISMEN  
FÜR DIE ZWECKE VON PATENTVERFAHREN

## INTERNATIONALES FORMBLATT

Bayrische Julius-  
Maximilians-Universität  
Anatomisches Institut I  
Prof. Dr. Koepsell  
Koellikerstr. 6  
97070 Würzburg

LEBENSFÄHIGKEITSBESCHEINIGUNG  
ausgestellt gemäß Regel 10.2 von der unten angegebenen  
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

I. HINTERLEGER	II. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS
Name: Bayrische Julius- Maximilians-Universität Anschritt: Anatomisches Institut I Prof. Dr. Koepsell Koellikerstr. 6 97070 Würzburg	Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugeeilte EINGANGSNUMMER: DSM 11991  Datum der Hinterlegung oder Weiterleitung <sup>1</sup> : 1998-02-11
III. LEBENSFÄHIGKEITSBESCHEINIGUNG	
Die Lebensfähigkeit des unter II genannten Mikroorganismus ist am 1998-02-11 <sup>2</sup> geprüft worden. Zu diesem Zeitpunkt war der Mikroorganismus  <input checked="" type="checkbox"/> <sup>3</sup> lebensfähig <input type="checkbox"/> <sup>3</sup> nicht mehr lebensfähig	
IV. BEDINGUNGEN, UNTER DENEN DIE LEBENSFÄHIGKEITSPRÜFUNG DURCHGEFÜHRT WORDEN IST <sup>4</sup>	
V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH  Anschritt: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:    Datum: 1998-02-13

<sup>1</sup> Angabe des Datums der Ersthinterlegung. Wenn eine erneute Hinterlegung oder eine Weiterleitung vorgenommen worden ist, Angabe des Datums der jeweils letzten erneuten Hinterlegung oder Weiterleitung.

<sup>2</sup> In den in Regel 10.2 Buchstabe a Ziffer ii und iii vorgesehenen Fällen Angabe der letzten Lebensfähigkeitsprüfung.

<sup>3</sup> Zutreffendes ankreuzen.

<sup>4</sup> Ausfüllen, wenn die Angaben beantragt worden sind und wenn die Ergebnisse der Prüfung negativ waren.

### Patentansprüche

1. Nukleinsäure, kodierend für ein Transporterprotein für Saccharid-gekoppelte Arzneimittel, wobei die Nukleinsäure umfaßt:
  - (a) die Nukleinsäure von Fig. 1 oder eine hiervon durch ein oder mehrere Basenpaare unterschiedliche Nukleinsäure bzw. ein Fragment davon,
  - (b) eine mit der Nukleinsäure von (a) hybridisierende Nukleinsäure oder
  - (c) eine mit der Nukleinsäure von (a) oder (b) über den degenerierten genetischen Code verwandte Nukleinsäure.
2. Nukleinsäure nach Anspruch 1, wobei sie eine DNA ist.
3. Vektor, umfassend die Nukleinsäure nach Anspruch 1.
4. Transformante, enthaltend den Vektor nach Anspruch 3.
5. Transporterprotein für Saccharid-gekoppelte Arzneimittel umfassend die Aminosäuresequenz von Fig. 2, ein funktionelles Derivat oder Fragment davon.
6. Verfahren zur Herstellung des Proteins nach Anspruch 5, umfassend die Kultivierung der Transformante nach Anspruch 4 unter geeigneten Bedingungen.
7. Antikörper, gerichtet gegen das Protein nach Anspruch 5.
8. Verwendung des Proteins nach Anspruch 5 als Reagens zur Analyse von erkranktem Gewebe oder Zellen, vorzugsweise Tumorzellen.

9. Verwendung der Nukleinsäure nach Anspruch 1 oder 2 als Reagens zur Analyse von erkranktem Gewebe oder Zellen, vorzugsweise Tumorzellen.
10. Verwendung des Antikörpers nach Anspruch 7 als Reagenz zur Analyse von erkranktem Gewebe oder Zellen, vorzugsweise Tumorzellen.
11. Verwendung des Proteins nach Anspruch 5, der Nukleinsäure nach Anspruch 1 oder 2, oder des Plasmids nach Anspruch 3 zur Gentherapie von erkranktem Gewebe oder Zellen, insbesondere bei Tumorerkrankungen.
12. Verwendung des Proteins nach Anspruch 5, der Nukleinsäure nach Anspruch 1 oder 2, oder des Plasmids nach Anspruch 3 zur Austestung neuer Saccharid-gekoppelter Arzneimittel bezüglich ihrer prospektiven Aufnahme in erkranktem Gewebe oder Zellen, vorzugsweise Tumorzellen.

1/10

1 CGCCTGCAGG TCGGCCATGG CCAGTACGGT TAGCCCCAGC ACCATAGCTG  
51 AGACCCCA GACCCCTCCA TTGTCTGACC ACATCCGAAA TGCTGCTGAC  
101 ATCTCAGTCA TTGTCATCTA TTTTCTGGTG GTGATGGCTG TTGGGCTGTG  
151 GCGGATGCTG AAGACCAACC GAGGTACTAT AGGAGGCTTC TTCCTCGCTG  
201 GTCGTGATAT GGCCTGGTGG CCGATGGGCG CCTCTCTCTT TGCCAGTAAC  
251 ATCGGCAGCA ACCACTATGT GGGGCTGGCT GGGACAGGAG CAGCTTCAGG  
301 AGTCGCCACC GTAACATTTG AATGGACTTC CTCAGTAATG TTGCTGATTC  
351 TTGGGTGGAT CTTTGTCCCT ATCTACATCA AGTCGGGGGT GATGACCATG  
401 CCGGAATATC TCAAGAAGCG GTTTGGTGGG GAGCGACTCC AGGTCTACCT  
451 CTCCATCCTC TCCCTCTTCA TCTGTGTGGT TTTGTTAATT TCTGCAGACA  
501 TATTTGCTGG AGCCATATTC ATCAAGCTGG CCTTGGGATT GGACCTTTAC  
551 CTGGCAATCT TCATCCTCTT GGCTATGACT GCTGTTTACA CCACCACTGG  
601 GGGCTTGGCC TCGGTGATTT ACACAGACAC CCTCCAGACC ATCATCATGC  
651 TGATTGGCTC TTTTATTCTC ATGGGGTTTG CATTAAACGA AGTTGGAGGT  
701 TATGAGAGCT TTACCGAGAA GTACGTGAAT GCCACCCCAT CCGTAGTCGA  
751 GGGGGACAAC TTGACAATCA GTGCCAGTTG CTACACACCT CGGGCGGACT  
801 CCTTCCATAT CTTCCGAGAT GCTGTGACTG GGGACATTCC ATGGCCAGGA  
851 ATTATATTTG GAATGCCCAT TACAGCTTTG TGGTACTGGT GCACAAATCA  
901 GGTCAATTGTG CAGCGCTGCC TGTGTGGCAA GGACATGTCT CACGTGAAGG  
951 CCGCTTGCAT TATGTGTGCT TACCTGAAGC TGCTGCCCAT GTTCCTCATG  
1001 GTGATGCCGG GGATGATCAG CCGCATCCTG TACACAGATA TGGTAGCATG  
1051 TGTGGTACCT TCTGAATGCG TGAAACTG TGCGTTGAT GTTGGCTGCA  
1101 CCAACTACGC ATACCCACG ATGGTGCTGG AACTGATGCC CCAAGGACTG  
1151 CGAGGCCTGA TGCTTTCGGT CATGCTGGCC TCTCTCATGA GCTCCCTGAC  
1201 CTCCATCTTC AACAGCGCCA GCACCCTCTT CACCATTGAC CTCTACACCA  
1251 AGATGCGGAA GCAAGCGTCG GAGAAAGAGC TCCTGATAGC TGGACGGATA  
1301 TTTGTTCTTC TATTAAGTGT TGTGAGCATT GTGTGGGTCC CACTGGTACA  
1351 AGTTTCTCAA AATGGACAAC TAATCCATTA CACAGAATCA ATTTCTAGCT

Fig. 1

2/10

1401 ACCTTGGGCC TCCAATTGCA GCTGTCTTTG TGCTTGCCAT CTTCTGTAAA  
1451 AGAGTCAATG AACAGGGAGC ATTCTGGGGT CTAATGGTTG GACTTGCAAT  
1501 GGGCCTCATT CGTATGATAA CAGAGTTTGC TTATGGAACA GGGAGTTGCT  
1551 TGGCTCCCAG TAACTGTCCC AAGATTATCT GTGGAGTGCA CTATCTGTAC  
1601 TTTTCCATCG TTCTCAAAAA AGGGTCCATG CTGGTCACCC TGGGAATTC  
1651 CCTCTTAACA AAACCCATTC CTGATGTACA TCTGTACCGC CTGTGCTGGG  
1701 TTCTTCGGAA CAGTACAGAG GAGCGAATCG ATATAGATGC AGAAGAGAAA  
1751 AGTCAGGAAG AAACAGATGA TGGTGTGAA GAAGATTATC CTGAGAAATC  
1801 ACGTGGATGC CTCAAGAAAG CTTATGACTT GTTCTGCGGT TTGCAGAAGG  
1851 GACCCAAGCT AACCAAGGAG GAGGAGGAAG CCTTGAGCAA GAAGCTCACA  
1901 GACACGTCTG AGAGGCCCTC GTGGAGGACA ATAGTGAACA TCAACGCCAT  
1951 CCTCCTCCTG GCTGTGGTGG TCTTTATTCA CGGCTACTAT GCCTGAACTC  
2001 TATCTGAGCC ATTAGAATAA TGAATAATTC TTAAAAAAAA AAA

Fig. 1 (Forts.)

3/10

ATCGGCAGCAACCACTATGTGGGGCTGGCTGGGACAGGAGCAGCTTCAGG  
AGTCGCCACCGTAACATTTGAATGGACTTCCTCAGTAATGTTGCTGATTCTTGGGTGGAT  
CTTTGTCCCTATCTACATCAAGTCGGGGGTGATGACCATGCCGGAATATCTCAAGAAGCG  
GTTTGGTGGGGAGCGACTCCAGGTCTACCTCTCCATCCTCTCCCTCTTCATCTGTGTGGT  
TTTGTTAATTTCTGCAGACATATTTGCTGGAGCCATATTCATCAAGCTGGCCTTGGGATT  
GGACCTTTACCTGGCAATCTTCATCCTCTTGGCTATGACTGCTGTTTACACCACCACTGG  
GGCCTTGGCCTCGGTGATTTACACAGACACCCTCCAGACCATCATCATGCTGATTGGCTC  
TTTTATTCTCATGGGGTTTGCATTTAACGAAGTTGGAGGTTATGAGAGCTTTACCGAGAA  
GTACGTGAATGCCACCCCATC

Fig. 1A

4/10

1 MASTVSPSTI AETPEPPPLS DHIRNAADIS VIVIYFLVVM AVGLWAMLKT  
51 NRGTIIGGFLL AGRDMAWWPM GASLFASNIG SNHYVGLAGT GAASGVATVT  
101 FEWTSSVMLL ILGWIFVPIY IKSGVMTMPE YLKKRFGGER LQVYLSILSL  
151 FICVLLISA DIFAGAIFIK LALGLDLYLA IFILLAMTAV YTTTGGLASV  
201 IYDTLQITII MLIGSFILMG FAFNEVGGYE SFTEKYVNAT PSVVEGDNLT  
251 ISASCYTPRA DSFHIFRDAV TGDIPWPGII FGMPITALWY WCTNQVIVQR  
301 CLCGKDMSHV KAACIMCAYL KLLPMFLMVM PGMISRILYT DMVACVVPSE  
351 CVKHCGVDVG CTNYAYPTMV LELMPQGLRG LMLSVMLASL MSSLTSIFNS  
401 ASTLFTIDLY TKMRKQASEK ELLIAGRIFV LLLTVVSIVW VPLVQVSQNG  
451 QLIHYTESIS SYLGPPIAAV FVLAI FCKRV NEQGAFWGLM VGLAMGLIRM  
501 ITEFAYGTGS CLAPSNCPKI ICGVHYLYFS IVLKKGSM LV TLGISLLTKP  
551 IPDVHLYRLC WVLRNSTEER IDIDAEKSQ EETDDGVEED YPEKSRGCLK  
601 KAYDLFCGLQ KGPKLTKEEE EALSKKLTDT SERPSWRTIV NINAILLLAV  
651 VVFIHGYYA

Fig. 2

5/10

IGSNHYVGLAGTGAASGVATVTFEWTSPVMLLILGWIFVPIYIKSGVMTM  
PEYLKKRFGGERLQVYLSILSLFICVVLLISADIFAGAIFIKLALGLDLY  
LAIFILLAMTAVYTTTGGLASVIYTDTLQTIIMLIGSFILMGFAFNEVGG  
YESFTEKYVNATP

Fig. 2A

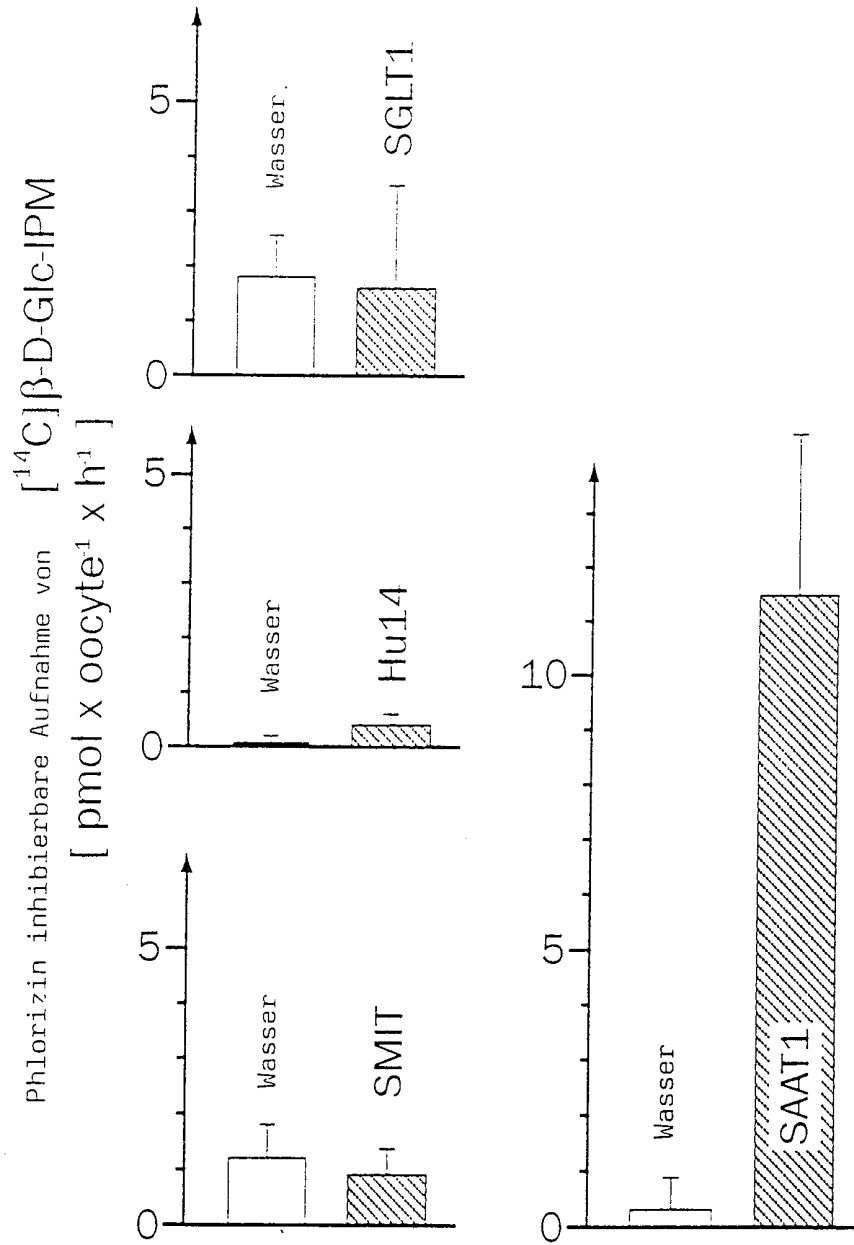


Fig. 3

**$\beta$ -D-Glycosylgentisinsäuremethylester  
( $\beta$ -D-Glc-GME)**

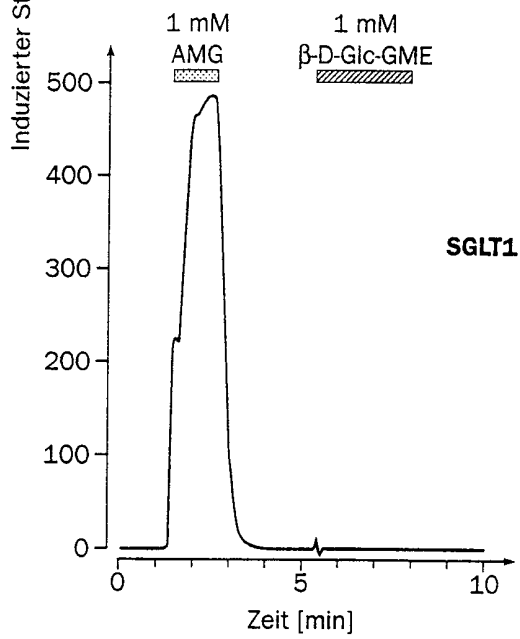
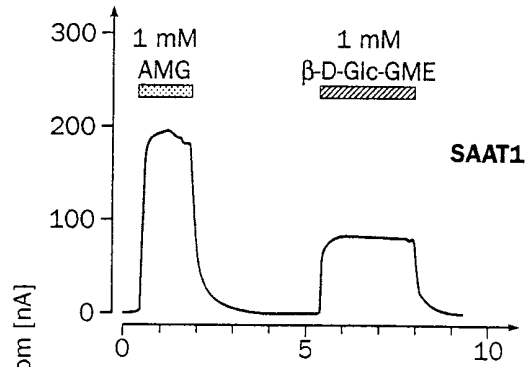
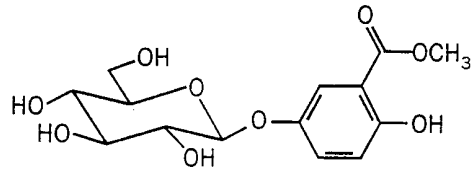
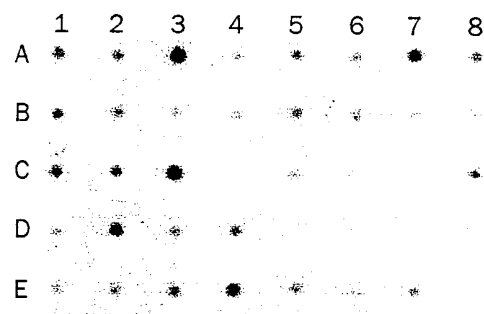


Fig. 4



A1 Herz	B1 Hoden	C1 Niere
A2 Aorta	B2 Ovar	C2 Leber
A3 Muskel	B3 Pankreas	C3 Dünndarm
A4 Kolon	B4 Epiphyse	C4 Milz
A5 Blase	B5 Nebenniere	C5 Thymus
A6 Uterus	B6 Schilddrüse	C6 Leukozyten
A7 Prostata	B7 Speicheldrüse	C7 Lymphknoten
A8 Magen	B8 Brustdrüse	C8 Knochenmark

D1 Appendix vermiformis	E1 fetales Gehirn
D2 Lunge	E2 fetales Herz
D3 Trachea	E3 fetale Niere
D4 Plazenta	E4 fetale Leber
D5 -	E5 fetale Milz
D6 -	E6 fetaler Thymus
D7 -	E7 fetale Lunge
D8 -	E8 -

Fig. 5

9/10

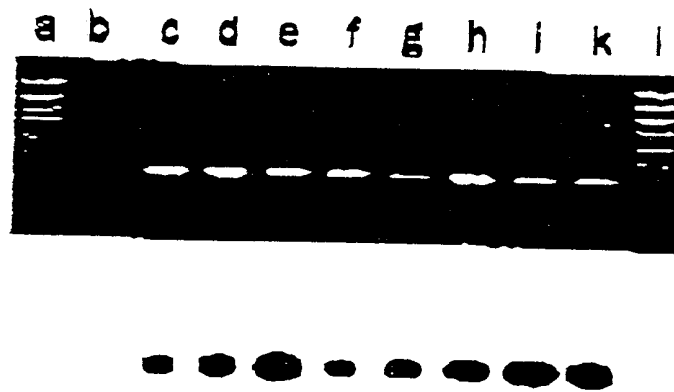


Fig. 6

10/10

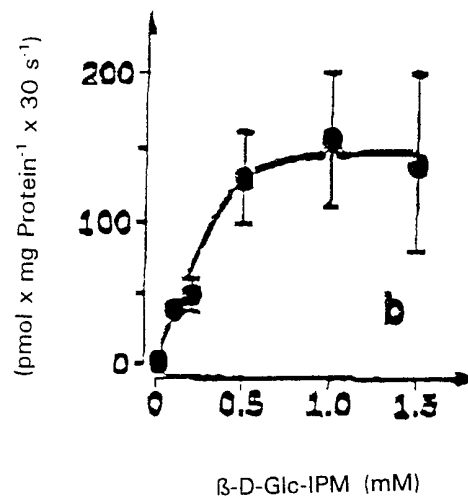


Fig. 7

## SEQUENZPROTOKOLL

## (1) ALLGEMEINE ANGABEN:

## (i) ANMELDER:

(A) NAME: Deutsches Krebsforschungszentrum  
(B) STRASSE: Im Neuenheimer Feld 280  
(C) ORT: Heidelberg  
(E) LAND: Deutschland  
(F) POSTLEITZAHL: 69120

(A) NAME: Prof. Dr. Hermann Koepsell  
(B) STRASSE: Koellikerstr. 6  
(C) ORT: Wuerzburg  
(E) LAND: Deutschland  
(F) POSTLEITZAHL: 97070

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Transporter fuer Saccharid-gekoppelte Arzneimittel

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 5

## (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 #1.30 (EPA)

(v) DATEN DER JETZIGER ANMELDUNG:  
ANMELDENUMMER: nicht bekannt

## (vi) DATEN DER VORANMELDUNG:

(A) ANMELDENUMMER: DE 198 06 803.4  
(B) ANMELDETAG: 18-FEB-1998

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 18 Basenpaare  
(B) ART: Nucleotid  
(C) STRANGFORM: Einzelstrang  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

GGACTTCCCC AGTAATGT

2

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 18 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "primer"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

CTTCTCGGTA AAGCTCTC

18

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 18 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "primer"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

CATCTGTGTG GTTTTGTT

18

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 2043 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE:17..1994

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

CGCCTGCAGG TCGGCCATGG CCAGTACGGT TAGCCCCAGC ACCATAGCTG AGACCCAGA

60

GCCACCTCCA TTGTCTGACC ACATCCGAAA TGCTGCTGAC ATCTCAGTCA TTGTCATCTA 120  
 TTTTCTGGTG GTGATGGCTG TTGGGCTGTG GCGGATGCTG AAGACCAACC GAGGTACTAT 180  
 AGGAGGCTTC TTCCTCGCTG GTCGTGATAT GGCCTGGTGG CCGATGGGCG CCTCTCTCTT 240  
 TGCCAGTAAC ATCGGCAGCA ACCACTATGT GGGGCTGGCT GGGACAGGAG CAGCTTCAGG 300  
 AGTCGCCACC GTAACATTTG AATGGACTTC CTCAGTAATG TTGCTGATTC TTGGGTGGAT 360  
 CTTTGTCCCT ATCTACATCA AGTCGGGGGT GATGACCATG CCGGAATATC TCAAGAAGCG 420  
 GTTTGGTGGG GAGCGACTCC AGGTCTACCT CTCCATCCTC TCCCTCTTCA TCTGTGTGGT 480  
 TTTGTTAATT TCTGCAGACA TATTTGCTGG AGCCATATTC ATCAAGCTGG CCTTGGGATT 540  
 GGACCTTTAC CTGGCAATCT TCATCCTCTT GGCTATGACT GCTGTTTACA CCACCACTGG 600  
 GGGCTTGGCC TCGGTGATTT ACACAGACAC CCTCCAGACC ATCATCATGC TGATTGGCTC 660  
 TTTTATTCTC ATGGGGTTTG CATTTAACGA AGTTGGAGGT TATGAGAGCT TTACCGAGAA 720  
 GTACGTGAAT GCCACCCCAT CCGTAGTCGA GGGGGACAAC TTGACAATCA GTGCCAGTTG 780  
 CTACACACCT CGGGCGGACT CCTTCCATAT CTTCGGAGAT GCTGTGACTG GGGACATTCC 840  
 ATGGCCAGGA ATTATATTTG GAATGCCCAT TACAGCTTTG TGGTACTGGT GCACAAATCA 900  
 GGTCAATTGTG CAGCGCTGCC TGTGTGGCAA GGACATGTCT CACGTGAAGG CCGCTTGCAT 960  
 TATGTGTGCT TACCTGAAGC TGCTGCCCCAT GTTCCTCATG GTGATGCCGG GGATGATCAG 1020  
 CCGCATCCTG TACACAGATA TGGTAGCATG TGTGGTACCT TCTGAATGCG TGAAACACTG 1080  
 TGGCGTTGAT GTTGGCTGCA CCAACTACGC ATACCCCACG ATGGTGCTGG AACTGATGCC 1140  
 CCAAGGACTG CGAGGCCTGA TGCTTTCGGT CATGCTGGCC TCTCTCATGA GCTCCCTGAC 1200  
 CTCCATCTTC AACAGCGCCA GCACCCTCTT CACCATTGAC CTCTACACCA AGATGCGGAA 1260  
 GCAAGCGTCG GAGAAAGAGC TCCTGATAGC TGGACGGATA TTTGTTCTTC TATTAAGTGT 1320  
 TGTGAGCATT GTGTGGGTCC CACTGGTACA AGTTTCTCAA AATGGACAAC TAATCCATTA 1380  
 CACAGAATCA ATTTCTAGCT ACCTTGGGCC TCCAATTGCA GCTGTCTTTG TGCTTGCCAT 1440  
 CTTCTGTAAA AGAGTCAATG AACAGGGAGC ATTCTGGGGT CTAATGGTTG GACTTGCAAT 1500  
 GGGCCTCATT CGTATGATAA CAGAGTTTGC TTATGGAACA GGGAGTTGCT TGGCTCCCAG 1560  
 TAACTGTCCC AAGATTATCT GTGGAGTGCA CTATCTGTAC TTTTCCATCG TTCTCAAAAA 1620  
 AGGGTCCATG CTGGTCACCC TGGGAATTTT CCTCTTAACA AAACCCATTC CTGATGTACA 1680  
 TCTGTACCGC CTGTGCTGGG TTCTTCGGAA CAGTACAGAG GAGCGAATCG ATATAGATGC 1740

```

AGAAGAGAAA AGTCAGGAAG AACAGATGA TGGTGTGAA GAAGATTATC CTGAGAAAATC      1800
ACGTGGATGC CTCAAGAAAG CTTATGACTT GTTCTGCGGT TTGCAGAAGG GACCCAAGCT      1860
AACCAAGGAG GAGGAGGAAG CCTTGAGCAA GAAGCTCACA GACACGTCTG AGAGGCCCTC      1920
GTGGAGGACA ATAGTGAACA TCAACGCCAT CCTCCTCCTG GCTGTGGTGG TCTTTATTCA      1980
CGGCTACTAT GCCTGAACTC TATCTGAGCC ATTAGAATAA TGAATAATTC TTAAAAAAAAA      2040
AAA                                                                                   2043
    
```

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 659 Aminosäuren
  - (B) ART: Aminosäure
  - (C) STRANGFORM: nicht bekannt
  - (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

- (ix) MERKMAL:
  - (A) NAME/SCHLÜSSEL: Protein
  - (B) LÄNGE: 1..659

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

```

Met Ala Ser Thr Val Ser Pro Ser Thr Ile Ala Glu Thr Pro Glu Pro
1                               5                               10                               15
Pro Pro Leu Ser Asp His Ile Arg Asn Ala Ala Asp Ile Ser Val Ile
20                               25                               30
Val Ile Tyr Phe Leu Val Val Met Ala Val Gly Leu Trp Ala Met Leu
35                               40                               45
Lys Thr Asn Arg Gly Thr Ile Gly Gly Phe Phe Leu Ala Gly Arg Asp
50                               55                               60
Met Ala Trp Trp Pro Met Gly Ala Ser Leu Phe Ala Ser Asn Ile Gly
65                               70                               75                               80
Ser Asn His Tyr Val Gly Leu Ala Gly Thr Gly Ala Ala Ser Gly Val
85                               90                               95
Ala Thr Val Thr Phe Glu Trp Thr Ser Ser Val Met Leu Leu Ile Leu
100                              105                              110
Gly Trp Ile Phe Val Pro Ile Tyr Ile Lys Ser Gly Val Met Thr Met
115                              120                              125
    
```

Pro Glu Tyr Leu Lys Lys Arg Phe Gly Gly Glu Arg Leu Gln Val Tyr  
 130 135 140  
 Leu Ser Ile Leu Ser Leu Phe Ile Cys Val Val Leu Leu Ile Ser Ala  
 145 150 155 160  
 Asp Ile Phe Ala Gly Ala Ile Phe Ile Lys Leu Ala Leu Gly Leu Asp  
 165 170 175  
 Leu Tyr Leu Ala Ile Phe Ile Leu Leu Ala Met Thr Ala Val Tyr Thr  
 180 185 190  
 Thr Thr Gly Gly Leu Ala Ser Val Ile Tyr Thr Asp Thr Leu Gln Thr  
 195 200 205  
 Ile Ile Met Leu Ile Gly Ser Phe Ile Leu Met Gly Phe Ala Phe Asn  
 210 215 220  
 Glu Val Gly Gly Tyr Glu Ser Phe Thr Glu Lys Tyr Val Asn Ala Thr  
 225 230 235 240  
 Pro Ser Val Val Glu Gly Asp Asn Leu Thr Ile Ser Ala Ser Cys Tyr  
 245 250 255  
 Thr Pro Arg Ala Asp Ser Phe His Ile Phe Arg Asp Ala Val Thr Gly  
 260 265 270  
 Asp Ile Pro Trp Pro Gly Ile Ile Phe Gly Met Pro Ile Thr Ala Leu  
 275 280 285  
 Trp Tyr Trp Cys Thr Asn Gln Val Ile Val Gln Arg Cys Leu Cys Gly  
 290 295 300  
 Lys Asp Met Ser His Val Lys Ala Ala Cys Ile Met Cys Ala Tyr Leu  
 305 310 315 320  
 Lys Leu Leu Pro Met Phe Leu Met Val Met Pro Gly Met Ile Ser Arg  
 325 330 335  
 Ile Leu Tyr Thr Asp Met Val Ala Cys Val Val Pro Ser Glu Cys Val  
 340 345 350  
 Lys His Cys Gly Val Asp Val Gly Cys Thr Asn Tyr Ala Tyr Pro Thr  
 355 360 365  
 Met Val Leu Glu Leu Met Pro Gln Gly Leu Arg Gly Leu Met Leu Ser  
 370 375 380  
 Val Met Leu Ala Ser Leu Met Ser Ser Leu Thr Ser Ile Phe Asn Ser  
 385 390 395 400  
 Ala Ser Thr Leu Phe Thr Ile Asp Leu Tyr Thr Lys Met Arg Lys Gln  
 405 410 415  
 Ala Ser Glu Lys Glu Leu Leu Ile Ala Gly Arg Ile Phe Val Leu Leu  
 420 425 430

6

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