



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 699 28 244 T2 2006.08.10

(12)

## Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 1 075 519 B1

(21) Deutsches Aktenzeichen: 699 28 244.6

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/BE99/00055

(96) Europäisches Aktenzeichen: 99 924 594.7

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 1999/057133

(86) PCT-Anmeldetag: 05.05.1999

(87) Veröffentlichungstag  
der PCT-Anmeldung: 11.11.1999

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 14.02.2001

(97) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung beim EPA: 09.11.2005

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 10.08.2006

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: C12N 15/12 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

98201472 06.05.1998 EP

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(73) Patentinhaber:

Vlaams Interuniversitair Instituut voor  
Biotechnologie vzw., Zwijnaarde, BE

(72) Erfinder:

BEYAERT, Rudi, B-9750 Zingem, BE; HEYNINCK,  
Karen, B-9830 Sint-Martens-Latem, BE; FIERS,  
Walter, B-9070 Destelbergen, BE

(74) Vertreter:

Vossius & Partner, 81675 München

(54) Bezeichnung: INHIBITOREN DER NF-KB AKTIVIERUNG

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

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

**Beschreibung****Gebiet der Erfindung**

**[0001]** Diese Erfindung betrifft neue Inhibitoren des Signalwegs, der den Nuclear factor kappa B (NF-κB) aktiviert, welche nützlich für die Behandlung von NF-κB-assoziierten Krankheiten und/oder zur Verbesserung von Antitumor-Behandlungen sind.

**[0002]** Die Erfindung betrifft auch Nucleinsäuren, die die neuen Inhibitoren codieren.

**[0003]** Die Erfindung betrifft weiter die Verwendung von diesen Inhibitoren abgeleiteten Polypeptiden für die Behandlung von NF-κB-assoziierten Krankheiten und/oder Krebs.

**[0004]** Weiter betrifft die Erfindung Arzneimittel, welche die neuen Inhibitoren oder Polypeptide umfassen, welche von diesen Inhibitoren abgeleitet sind.

**Hintergrund der Erfindung**

**[0005]** NF-κB ist ein ubiquitär exprimierter Transkriptionsfaktor, der die Expression einer Reihe von unterschiedlichen Genen steuert, welche an Entzündung, Immunreaktion, Differenzierung von lymphoiden Zellen, Wachstumskontrolle und Entwicklung beteiligt sind. NF-κB liegt im Cytoplasma als ein inaktives Dimer vor, welches aus p50- und p65-Unterheiten besteht, die an ein inhibitorisches Protein gebunden sind, welches als IκB bekannt ist. Letzteres wird in Reaktion auf verschiedene Umweltreize, wie z.B. Entzündungs-fördernde Cytokine, Viren, Lipopolysaccharide, Oxidationsmittel, UV-Licht und ionisierende Strahlung, phosphoryliert und abgebaut. Dies erlaubt NF-κB, sich in den Zellkern zu verlagern, wo es Gene aktiviert, die eine Schlüsselrolle bei der Regulierung entzündlicher Prozesse und Immunreaktionen spielen, einschließlich Gene, die Entzündungs-fördernde Cytokine (IL-1 β, TNF, GM-CSF, IL-2, IL-6, IL-11, IL-17), Chemokine (IL-8, RANTES, MIP-1α, MCP-2), Enzyme, welche Entzündungs-vermittelnde Stoffe herstellen (NO-Synthetase, Cyclo-oxygenase), Immunrezeptoren (IL-2-Rezeptor) und Adhäsionsmoleküle (ICAM-1, VCAM-1, E-Selectin) codieren. Einige dieser induzierten Proteine können wiederum NF-κB aktivieren, was zu einer weiteren Verstärkung und Aufrechterhaltung der Entzündungsreaktion führt. Kürzlich wurde gezeigt, dass NF-κB in bestimmten Zelltypen eine antiapoptotische Rolle spielt, am wahrscheinlichsten dadurch, dass es die Expression von antiapoptotisch wirksamen Genen induziert. Diese Funktion kann Tumorzellen vor Krebsbehandlungen schützen und eröffnet die Möglichkeit, NF-κB-inhibierende Verbindungen zu verwenden, um die Tumorzellen zu sensibilisieren und die Wirksamkeit von Krebsbehandlungen zu verbessern.

**[0006]** Wegen seiner direkten Rolle in der Regulation von Reaktionen auf Entzündungsfördernde Cytokine und Endotoxin spielt die Aktivierung von NF-κB eine wichtige Rolle bei der Entstehung verschiedener Krankheiten (Barnes und Karin, 1997): chronische Entzündungskrankheiten wie z.B. rheumatoide Arthritis, Asthma und entzündliche Darmerkrankung (Brand et al., 1996); akute Krankheiten wie z.B. septischer Schock (Remick, 1995); die Alzheimer-Krankheit, bei der das β-Amyloid-Protein NF-κB aktiviert (Behl et al., 1997); Atherosklerose, bei der NF-κB durch oxidierte Fette aktiviert werden kann (Brand et al., 1997); Autoimmunerkrankungen wie z.B. systemischer Lupus erythematoses (Kalschmidt et al., 1994); Krebs durch die Hochregulation bestimmter Onkogene oder durch die Verhinderung der Apoptose (Luque et al., 1997). Darüber hinaus ist NF-κB auch an Virus-Infektionen beteiligt, da es durch verschiedene virale Proteine aktiviert wird, was z.B. nach einer Infektion mit Schnupfenviren, Grippeviren, Epstein-Barr-Virus, HTLV, Cytomegalie-Virus oder Adenovirus vorkommt. Des Weiteren haben mehrere Viren wie z.B. HIV NF-κB-Bindungsstellen in ihren Promotor/Enhancer-Regionen (Mosialos, 1997).

**[0007]** Wegen der möglichen Rolle von NF-κB in vielen der oben erwähnten Krankheiten haben NF-κB und dessen Regulatoren viel Interesse als Ziele für die Behandlung von NF-κB-assoziierten Krankheiten auf sich gezogen. Glucocorticoide sind wirksame Inhibitoren von NF-κB, aber diese haben endokrine und metabolische Nebenwirkungen, wenn sie systemisch gegeben werden (Bames et al., 1993). Antioxidationsmittel stellen vielleicht eine andere Klasse von NF-κB Inhibitoren dar, aber derzeit verfügbare Antioxidationsmittel wie z.B. Acetylcystein wirken relativ schwach und unspezifisch (Schreck et al., 1991). Aspirin und Natriumsalicylat hemmen ebenfalls die Aktivierung von NF-κB, aber nur in relativ hohen Konzentrationen (Kopp und Gosh, 1994). Es gibt eine Reihe von natürlichen Inhibitoren von NF-κB wie z.B. Glyotoxin, welches aus Aspergillus gewonnen wird, aber diese Verbindungen sind zu giftig, als dass man sie als Medikament einsetzen könnte (Pahl et al., 1996). Schließlich gäbe es endogene Inhibitoren von NF-κB, wie z.B. IL-10, das NF-κB über eine Wirkung auf IκB blockiert (Wang et al., 1995). Allerdings ist eine komplette Hemmung von NF-κB in allen Zelltypen für längere Zeit

unerwünscht, weil NF-κB eine entscheidende Rolle bei der Immunreaktion und anderen Abwehrreaktionen spielt. Eine wichtige Rolle bei der Induktion von NF-κB durch TNF und IL-1 wurde kürzlich für die TNF-Rezeptor-assoziierten Faktoren TRAF2 und TRAF6 gezeigt, die zu dem stimulierten TNF-Rezeptor bzw. IL-1 Rezeptor rekrutiert werden (Rothe et al., 1995; Cao et al., 1996). Überexpression von TRAF2 oder TRAF6 aktiviert NF-κB, wohingegen dominant-negative Mutanten die TNF- oder IL-1-induzierte Aktivierung von NF-κB in den meisten Zelltypen hemmen. "Knock out"-Studien mit TRAF2 haben kürzlich gezeigt, dass TRAF2 nicht unbedingt für die NF-κB Aktivierung erforderlich ist, vermutlich wegen der Redundanz innerhalb der TRAF-Familie (Yeh et al. 1997). Der TRAF-induzierte Signalweg zu NF-κB wurde weiter durch die Identifizierung des TRAF-interagierenden Proteins NIK entschlüsselt, welches die Aktivierung von NF-κB auf TNF- und IL-1-Stimulierung vermittelt, indem es sich mit der IκB-Kinase-α und -β (IKK) verbindet und diese aktiviert (Malinin et al, 1997; Regnier et al., 1997; DiDonato et al., 1997; Zandi et al., 1997; Woronicz et al., 1997). Letztere sind Teil eines großen Multiproteinkomplexes, der NF-κB aktiviert, und sind für die Phosphorylierung von IκB verantwortlich, was in der Folge zu dessen Abbau sowie zur Verlagerung des freigesetzten, aktiven NF-κB in den Zellkern führt. Dies erlaubt eine spezifischere Hemmung der Aktivierung von NF-κB durch Reize (einschließlich TNF und IL-1), welche die TRAF-Signalwege aktivieren. Auf der Grundlage dieses Prinzips offenbart WO 97/37016 die Verwendung von NIK und anderen TRAF-interagierenden Proteinen zur Modulierung der NF-κB-Aktivität.

**[0008]** Ein anderes Protein, das mit TRAF2 assoziieren kann ist das Zinkfinger-Protein A20 (Song et al., 1996). Das letztere wird von einem "immediate early response"-Gen codiert, welches in verschiedenen Zelllinien nach Stimulation durch TNF oder IL-1 induziert wird (Oxit et al, 1990). Interessanterweise blockiert Überexpression von A20 sowohl die TNF- als auch IL-1-induzierte Aktivierung von NF-κB (Jaattela et al., 1996). Allerdings ist der Mechanismus, durch den A20 die Aktivierung von NF-κB blockiert, komplett unbekannt, aber im Gegensatz zu NIK scheint A20 nicht direkt auf IκB zu wirken, und folgt diesbezüglich einem anderen Weg, um die Aktivierung von NF-κB zu modulieren.

**[0009]** De Valck et al. (1997) haben mit Hilfe des Hefe-„Two-hybrid“-Verfahrens ein Protein isoliert, welches an A20 bindet, das sogenannte 14-3-3, und haben gezeigt, dass die Hemmung von NF-κB unabhängig von der Bindung von A20 an 14-3-3 war.

#### Ziele und Beschreibung der Erfindung

**[0010]** Es wird in der vorliegenden Erfindung gezeigt, dass andere neue, mit A20 interagierende Proteine unerwarteterweise die Aktivierung von NF-κB modulieren und/oder hemmen können.

**[0011]** Zu der Erfindung gehört ein isoliertes funktionelles Protein, das entweder eine Aminosäuresequenz mit 70–100% Homologie zu der in SEQ ID NO. 2 gezeigten Aminosäuresequenz oder eine Aminosäuresequenz mit 70–100% Homologie zu der in SEQ ID NO. 3 gezeigten Aminosäuresequenz oder alternativ eine Aminosäuresequenz mit 70–100% Homologie zu der in SEQ ID NO. 5 gezeigten Aminosäuresequenz aufweist.

**[0012]** Genauer gesagt umfasst dieses funktionelle Protein eine Aminosäuresequenz mit 70–100% Homologie zu den Aminosäuren 54–647 von SEQ ID NO. 2, noch genauer eine Aminosäuresequenz mit 70–100% Homologie zu den Aminosäuren 390–647 von SEQ ID NO. 2 und/oder alternativ eine Aminosäuresequenz mit 70–100% Homologie zu den Aminosäuren 420–647 von SEQ ID NO. 2.

**[0013]** Homologie bedeutet in diesem Zusammenhang identisch oder ähnlich zu der angegebenen Sequenz, wobei offensichtliche Austausche/Modifikationen einer jeden der bereit gestellten Aminosäuren darin ebenfalls eingeschlossen sind. Eine diesbezügliche Homologiesuche kann mit dem BLAST-P (Basic Local Alignment Search Tool)-Programm durchgeführt werden, welches dem Fachmann wohlbekannt ist. Was die entsprechende Nucleinsäuresequenz-Homologie anbelangt, wird auf die BLASTX- und BLASTN-Programme verwiesen, die auf dem Fachgebiet bekannt sind.

**[0014]** Ein Aspekt der Erfindung ist es, neue Modulatoren und/oder Inhibitoren der Signalwege von TNF und/oder der IL-1-induzierten NF-κB-Aktivierungswege anzubieten.

**[0015]** Eine wichtige Ausführungsform der Erfindung ist ein Protein, welches mindestens die Aminosäuren von SEQ ID NO. 2 umfasst.

**[0016]** Eine andere Ausführungsform der Erfindung ist ein Protein, welches mindestens die Aminosäuren 54–647 von SEQ ID NO. 2 umfasst, wie in SEQ ID NO. 3 dargestellt.

**[0017]** Eine weitere Ausführungsform der Erfindung ist ein Protein, welches mindestens die Aminosäuren von SEQ ID NO. 5 umfasst.

**[0018]** Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist die Verwendung eines Proteins, welches die Aminosäuren 420–647 von SEQ ID NO. 2 umfasst, um den NF-κB-assozierten Signalweg zu modulieren und/oder zu hemmen, besonders die TNF- und/oder IL-1-induzierten Signalwege.

**[0019]** Zusätzlich betrifft die Erfindung die Verwendung eines Proteins, welches die in SEQ ID NO. 6 und/oder SEQ ID NO. 7 gezeigte Konsensus-Sequenz umfasst, um den durch TNF und/oder IL-1 induzierten, NF-κB-assozierten Signalweg zu modulieren und/oder zu hemmen.

**[0020]** Ein anderer Aspekt der Erfindung ist die Verwendung der oben erwähnten Proteine in einem Durchmusterungsverfahren, um Verbindungen zu durchmustern, welche die Interaktion dieses Proteins/dieser Proteine mit anderen Proteinkomponenten des NF-κB-assozierten Signalwegs stören.

**[0021]** Eine andere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung der oben erwähnten Proteine, oder die Verwendung von Proteinkomponenten, welche mit der oben erwähnten Methode gescreent wurden, um Tumorzellen zu sensibilisieren und/oder Krebsbehandlung zu verbessern.

**[0022]** Alternativ hierzu betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren, einen Aktivator oder Inhibitor des mit A20 interagierenden Proteins/der mit A20 interagierenden Proteine zu identifizieren und zu erhalten, umfassend die Schritte:

- (a) Zusammenbringen einer zu durchmusternden Verbindung mit einem Reaktionsgemisch, welches das erfindungsgemäße Protein enthält, und einem Auslesesystem, das unter geeigneten Bedingungen mit dem Protein interagieren kann;
- (b) Halten des Reaktionsgemisches in Gegenwart der Verbindung oder einer Probe, welche eine Vielzahl von Verbindungen umfasst, unter Bedingungen, welche die Interaktion des Proteins mit dem Auslesesystem erlauben;
- (c) Identifizieren oder Überprüfen einer Probe bzw. Verbindung, welche zu einer Unterdrückung oder Aktivierung des Auslesesystems führen.

**[0023]** Der Begriff "Auslesesystem" im Kontext der vorliegenden Erfindung bedeutet eine DNA-Sequenz, welche nach Transkription und/oder Expression in einer Zelle, Gewebe oder Organismus einen auswertbaren und/oder selektierbaren Phänotyp ergibt. Solche Auslesesysteme sind Fachleuten wohlbekannt und umfassen zum Beispiel rekombinante DNA-Moleküle und Markergene wie vorstehend beschrieben.

**[0024]** Der Begriff "Vielzahl von Verbindungen" in einem Verfahren der Erfindung ist als Vielzahl von Stoffen zu verstehen, die identisch oder nicht identisch sein können.

**[0025]** Die Verbindung oder Vielzahl von Verbindungen kann zum Beispiel in Proben wie Zellextrakten von Tieren oder Mikroorganismen enthalten sein. Des Weiteren kann/können die Verbindung/en auf dem Fachgebiet bekannt sein, von denen man aber bisher nicht weiß, dass diese in der Lage sind, mit A20 interagierende Proteine zu unterdrücken oder zu aktivieren. Das Reaktionsgemisch kann ein zellfreier Extrakt sein oder kann eine Zelle oder Zellkultur umfassen. Geeignete Vorrichtungen für das erfindungsgemäße Verfahren sind dem Fachmann bekannt und sind zum Beispiel in Alberts et al., Molecular Biology of the Cell, dritte Ausgabe (1994) allgemein beschrieben. Die Vielzahl von Verbindungen kann zum Beispiel zu dem Reaktionsgemisch oder Kulturnedium zugegeben oder in die Zelle injiziert werden.

**[0026]** Falls mit dem erfindungsgemäßen Verfahren eine Probe identifiziert wird, welche eine Verbindung oder eine Vielzahl von Verbindungen enthält, dann ist es entweder möglich, die Verbindung aus der ursprünglichen Probe, welche die Verbindung enthielt, die in der Lage ist, die mit A20 interagierenden Proteine zu unterdrücken oder zu aktivieren, zu isolieren, oder man kann die ursprüngliche Probe, wenn sie zum Beispiel eine Vielzahl von Verbindungen enthält, weiter unterteilen, um die Anzahl der verschiedenen Stoffe pro Probe zu reduzieren und das Verfahren mit den unterteilten Proben wiederholen. Je nach Komplexität der Proben können die oben beschriebenen Schritte mehrmals durchgeführt werden, vorzugsweise bis die mit dem erfindungsgemäßen Verfahren identifizierte Probe nur noch eine begrenzte Anzahl von Stoffen oder nur noch einen Stoff umfasst. Diese Probe umfasst bevorzugt Stoffe mit ähnlichen chemischen und/oder physikalischen Eigenschaften, und am meisten bevorzugt sind diese Stoffe identisch. Die Verbindungen, welche mit dem erfindungsgemäßen Verfahren getestet und identifiziert werden können, können Expressionsbanken sein, z.B. cDNA-Expressionsbanken, Peptide, Proteine, Nucleinsäuren, Antikörper, kleine organische Verbindungen, Hor-

mone, Peptidmimetika, PNAs oder dergleichen (Milner, Nature Medicine 1 (1995), 879–880; Hupp, Cell 83 (1995), 237–245; Gibbs, Cell 79 (1994), 193–198 und vorstehend zitierte Veröffentlichungen).

**[0027]** Die Erfindung betrifft alternativ auch eine DNA Sequenz, welche die vorstehend erwähnten Proteine oder ein immunologisch aktives und/oder funktionelles Fragment eines solchen Proteins codiert, welches aus der Gruppe ausgewählt ist bestehend aus:

- (a) DNA-Sequenzen, welche eine Nucleotidsequenz umfassen, die ein Protein codiert, welches die in SEQ ID NO. 2 angegebene Aminosäuresequenz umfasst;
- (b) DNA-Sequenzen, welche eine Nucleotidsequenz umfassen wie sie in SEQ ID NO. 1 angegeben ist;
- (c) DNA-Sequenzen, welche mit dem komplementären Strang einer in (a) oder (b) definierten DNA-Sequenz hybridisieren und eine Aminosäuresequenz codieren, welche zu mindestens 70% identisch mit der Aminosäuresequenz ist, welche von der DNA-Sequenz von (a) oder (b) codiert wird;
- (d) DNA-Sequenzen, deren Nucleotidsequenz infolge des genetischen Codes zu einer Nucleotidsequenz von einer beliebigen der unter (a) bis (c) definierten DNA-Sequenzen degeneriert ist; und
- (e) DNA-Sequenzen, welche ein Fragment eines Proteins codieren, welches von einer beliebigen der DNA-Sequenzen von (a) bis (d) codiert wird.

**[0028]** Die Erfindung besteht somit aus DNA-Molekülen, auch Nucleinsäuresequenzen genannt, welche die vorstehend erwähnten Proteine codieren, bevorzugt eine Nucleinsäuresequenz mit 70–100% Homologie zu der in SEQ ID NO. 1 gezeigten DNA-Sequenz und/oder eine Nucleinsäuresequenz mit 70–100% Homologie zu der in SEQ ID NO. 4 gezeigten DNA-Sequenz.

**[0029]** Homologie bedeutet in diesem Zusammenhang, dass die jeweiligen Nucleinsäuremoleküle bzw. die von diesen codierten Proteine funktionell und/oder strukturell äquivalent sind. Die Nucleinsäuremoleküle, welche zu den oben beschriebenen Nucleinsäuremolekülen homolog und die Abkömmlinge dieser Nucleinsäuremoleküle sind, sind zum Beispiel Varianten dieser Nucleinsäuremoleküle, welche Modifikationen darstellen, die dieselbe biologische Funktion besitzen und welche insbesondere Proteine mit dergleichen oder im wesentlichen gleichen biologischen Funktion codieren. Diese können in der Natur vorkommende Varianten sein, wie z.B. Sequenzen anderer Varietäten oder Spezies, oder Mutationen. Diese Mutationen können in der Natur vorkommen oder können durch Mutagenese-Techniken erhalten werden. Die Allelvarianten können sowohl in der Natur vorkommende Allelvarianten sein als auch synthetisch hergestellte oder gentechnisch modifizierte Varianten sein.

**[0030]** Die von den verschiedenen Abkömmlingen und Varianten der oben beschriebenen Nucleinsäuremoleküle codierten Proteine weisen ähnliche gemeinsame Charakteristika auf, wie z.B. biologische Aktivität, Molekulargewicht, immunologische Reaktivität, Konformation etc. bzw. ähnliche physikalische Eigenschaften, wie z.B. elektrophoretische Mobilität, chromatographisches Verhalten, Sedimentationskoeffizienten, pH-Optimum, Temperatur-Optimum, Stabilität, Löslichkeit, spektroskopische Eigenschaften, etc.

**[0031]** Die vorliegende Erfindung betrifft auch Vektoren, insbesondere Plasmide, Cosmide, Viren, Bakteriophagen und andere in der Gentechnik herkömmlicherweise eingesetzte Vektoren, welche ein erfindungsgemäßes Nucleinsäuremolekül enthalten. Dem Fachmann wohlbekannte Verfahren können verwendet werden, um verschiedene Plasmide und Vektoren zu konstruieren, siehe zum Beispiel die in Sambrook, Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1989) N. Y. beschriebenen Techniken.

**[0032]** Alternativ können die erfindungsgemäßes Nucleinsäuremoleküle und Vektoren in Liposomen rekonserviert werden, um sie in Zielzellen zu transportieren.

**[0033]** In einer bevorzugten Ausführungsform ist das in dem Vektor enthaltene Nucleinsäuremolekül funktionsweise mit einer Kontrollsequenz/Kontrollsequenzen verknüpft, welche die Expression des Nucleinsäuremoleküls in prokaryontischen und/oder eukaryontischen Zellen erlaubt/erlauben.

**[0034]** Der Begriff "Kontrollsequenz" bezieht sich dabei auf regulatorische DNA-Sequenzen, die notwendig sind, um die Expression der codierenden Sequenzen zu bewirken, an die diese ligiert sind. Die Art solcher Kontrollsequenzen unterscheidet sich je nach Wirtsorganismus. In Prokaryonten beinhalten Kontrollsequenzen üblicherweise Promotor, ribosomale Bindungsstelle und Terminatoren. In Eukaryonten beinhalten Kontrollsequenzen üblicherweise Promotoren, Terminatoren sowie in manchen Fällen Enhancer, Transaktivatoren oder Transkriptionsfaktoren. Es ist beabsichtigt, dass der Begriff "Kontrollsequenz" minimal all diejenigen Komponenten beinhaltet, deren Anwesenheit für die Expression notwendig ist; er kann darüber hinaus auch zusätzliche vorteilhafte Komponenten beinhalten.

**[0035]** Der Begriff "funktionell verknüpft" bezieht sich auf eine Nebeneinanderstellung, in der die so bezeichneten Komponenten in einer Beziehung stehen, die es ihnen erlaubt, auf die beabsichtigte Art zu funktionieren. Eine Kontrollsequenz, die mit einer codierenden Sequenz "funktionell verknüpft" ist, ist auf eine solche Weise ligiert, dass eine Expression der codierenden Sequenz unter Bedingungen erreicht wird, die mit den Kontrollsequenzen kompatibel ist. Wenn es sich bei der Kontrollsequenz um einen Promotor handelt, ist es für den Fachmann naheliegend, dass eine doppelsträngige Nucleinsäure verwendet wird.

**[0036]** Der erfindungsgemäße Vektor ist somit bevorzugt ein Expressionsvektor. Ein "Expressionsvektor" ist ein Konstrukt, das verwendet werden kann, um eine ausgewählte Wirtszelle zu transformieren und gewährleistet die Expression einer codierenden Sequenz in dem ausgewählten Wirt. Expressionsvektoren können zum Beispiel Clonierungsvektoren, binäre Vektoren oder integrierende Vektoren sein. Expression umfasst die Transkription des Nucleinsäuremoleküls, bevorzugt in eine translatierbare mRNA. Regulatorische Elemente, welche eine Expression in prokaryontischen und/oder eukaryontischen Zellen gewährleisten, sind dem Fachmann wohlbekannt.

**[0037]** Die vorliegende Erfindung betrifft des weiteren Wirtszellen, welchen einen Vektor wie oben beschrieben oder ein erfindungsgemäßes Nucleinsäuremolekül umfassen, wobei das Nucleinsäuremolekül für die Wirtszelle fremd ist.

**[0038]** Mit "fremd" ist gemeint, dass das Nucleinsäuremolekül entweder heterolog in Bezug auf die Wirtszelle ist, d.h. von einer Zelle oder einem Organismus mit einem unterschiedlichen genomischen Hintergrund abgeleitet ist, oder es ist homolog in Bezug auf die Wirtszelle, liegt aber in einer andern genomischen Umgebung vor als das natürlich vorkommende Gegenstück des Nucleinsäuremoleküls. Das bedeutet, dass – falls das Nucleinsäuremolekül in Bezug auf die Wirtszelle homolog ist – es nicht an seinem natürlichen Ort in dem Genom dieser Wirtszelle vorliegt, insbesonders von unterschiedlichen Genen umgeben ist. In diesem Fall kann das Nucleinsäuremolekül entweder unter der Kontrolle seines eigenen Promoters oder unter der Kontrolle eines heterologen Promoters sein. Der erfindungsgemäße Vektor oder das erfindungsgemäß Nucleinsäuremolekül, die in der Wirtszelle vorliegen, können entweder in das Genom der Wirtszelle integriert sein oder können in irgendeiner Form extrachromosomal gehalten werden. Diesbezüglich ist es auch zu verstehen, dass das Nucleinsäuremolekül verwendet werden kann, um ein mutiertes Gen über homologe Rekombination wiederherzustellen oder neu zu schaffen (Paszkowski (ed.), Homologous Recombination and Gene Silencing in Plants. Kluwer Academic Publishers (1994)).

**[0039]** Die Wirtszelle kann eine beliebige prokaryontische oder eukaryontische Zelle sein wie z.B. Bakterien-, Insekten-, Pilz-, Pflanzen- oder Tierzellen. Bevorzugte Pilzzellen sind zum Beispiel solche vom Genus *Saccharomyces*, insbesondere solche der Art *S. cerevisiae*.

**[0040]** Ein anderer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung von mit A20 interagierenden Proteinen, was die Anzucht von Wirtszellen gemäß der Erfindung umfasst, die auf Grund des Vorliegens eines erfindungsgemäßen Vektors oder eines erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküls in der Lage sind, ein solches Protein unter Bedingungen, welche die Expression des Proteins erlauben, zu exprimieren, und das so hergestellte Protein aus der Kultur zu gewinnen.

**[0041]** Der Begriff "Expression" bedeutet die Herstellung eines Proteins oder einer Nucleotidsequenz in der Zelle. Dieser Begriff schließt jedoch auch die Expression des Proteins in einem Zell-freien System ein. Er schließt die Transkription in ein RNA-Produkt, posttranskriptionelle Modifizierung und/oder Translation in ein Protein-Produkt oder Polypeptid von einer DNA, welche dieses Produkt codiert, ein sowie mögliche post-transkriptionelle Modifizierungen. Je nachdem, welche spezifischen Konstrukte und Bedingungen eingesetzt werden, kann das Protein aus den Zellen, dem Kulturmedium oder aus beiden gewonnen werden. Dem Fachmann ist es wohlbekannt, dass es nicht nur möglich ist, ein natives Protein zu exprimieren, sondern auch das Protein als Fusionspolypeptide zu exprimieren oder Signalsequenzen hinzuzufügen, welche das Protein in bestimmte Teilbereiche der Wirtszelle lotsen, z.B. die Sekretion des Peptids in das Kulturmedium gewährleisten und dergleichen. Des weiteren können ein solches Protein und Fragmente davon mit Hilfe von Standardmethoden chemisch synthetisiert und/oder modifiziert werden.

**[0042]** Die in dieser Anmeldung verwendeten Begriffe "Protein" und "Polypeptid" sind untereinander austauschbar. "Polypeptid" bezieht sich auf ein Polymer aus Aminosäuren (Aminosäuresequenz) und bezieht sich nicht auf eine bestimmte Länge des Moleküls. Somit sind Peptide und Oligopeptide in der Definition eines Polypeptids eingeschlossen. Dieser Begriff bezieht sich auch auf post-transkriptionelle Modifikationen des Polypeptids bzw. schließt diese ein, wie z.B. Glycosylierungen, Acetylierungen, Phosphorylierungen und dergleichen.

In der Definition eingeschlossen sind zum Beispiel Polypeptide, welche eines oder mehrere Analoga einer Aminosäure enthalten (was zum Beispiel nicht in der Natur vorkommende Aminosäuren etc. einschließt), Polypeptide mit substituierten Bindungen, sowie andere auf dem Fachgebiet bekannte Modifikationen, sowohl in der Natur vorkommende als auch nicht in der Natur vorkommende.

**[0043]** Die vorliegende Erfindung betrifft weiter Proteine, welche von den erfindungsgemäß Nucleinsäuremolekülen codiert werden oder mit den oben beschriebenen Verfahren hergestellt oder erhalten werden und funktionelle und/oder immunologisch aktive Fragmente solcher mit A20 interagierenden Proteine. Die erfindungsgemäß Proteine und Polypeptide müssen nicht notwendigerweise von einer bezeichneten Nucleinsäuresequenz translatiert werden; die Polypeptide können auf eine beliebige Weise hergestellt werden, einschließlich zum Beispiel durch chemische Synthese oder durch Expression von einem rekombinanten Expressionssystem, oder durch Isolierung aus einem geeigneten viralen System. Die Polypeptide können ein oder mehrere Aminosäurenanaloga beinhalten, phosphorylierte Aminosäuren oder nicht in der Natur vorkommende Aminosäuren. Methoden zum Einfügen von Aminosäurenanaloga in eine Sequenz sind auf dem Fachgebiet bekannt. Die Polypeptide können auch eine oder mehrere Markierungen enthalten, welche den Fachleuten bekannt sind. In diesem Zusammenhang ist es auch selbstverständlich, dass die erfindungsgemäß Proteine weiter durch herkömmliche, auf dem Fachgebiet bekannte Methoden modifiziert werden können. Durch die Bereitstellung der erfindungsgemäß Proteine ist es auch möglich Fragmente zu bestimmen, welche biologische Aktivität behalten, nämlich die reife, prozessierte Form. Dies erlaubt die Konstruktion chimärer Proteine und Peptide, welche eine von dem erfindungsgemäß Protein abgeleitete Aminosäuresequenz umfassen, die entscheidend für deren Bindungsaktivität ist. Die anderen funktionellen Aminosäuresequenzen können entweder mit den erfindungsgemäß Proteinen physikalisch verknüpft sein, zum Beispiel durch chemische Verfahren, oder können durch auf dem Fachgebiet wohlbekannte rekombinante DNA-Techniken fusioniert werden.

**[0044]** Der Begriff "funktionelles Fragment einer Sequenz" oder "funktioneller Teil einer Sequenz" bedeutet eine verkürzte Sequenz der ursprünglichen Sequenz, auf welche verwiesen wird. Die verkürzte Sequenz (Nucleinsäure- oder Protein-Sequenz) kann sehr unterschiedliche Längen aufweisen; die minimale Größe wäre eine Sequenz von ausreichender Größe, um eine Sequenz mit einer mindestens vergleichbaren Funktion und/oder Aktivität zu liefern wie die ursprüngliche Sequenz, auf welche verwiesen wird, während die maximale Größe nicht kritisch ist. In manchen Anwendungen ist die maximale Größe gewöhnlich nicht wesentlich größer als es erforderlich ist, um die gewünschte Aktivität und/oder Funktionen) der ursprünglichen Sequenz bereitzustellen. Typischerweise hat die verkürzte Aminosäuresequenz eine Länge von etwa 5 bis etwa 60 Aminosäuren. Noch typischer hat die Sequenz jedoch eine maximale Länge von etwa 50 Aminosäuren, vorzugsweise eine maximale Länge von etwa 30 Aminosäuren. Es ist normalerweise wünschenswert, Sequenzen mit einer Länge von mindestens 10, 12 oder 15 Aminosäuren bis zu einem Maximum von etwa 20 oder 25 Aminosäuren auszuwählen.

**[0045]** Des weiteren können Faltungs-Simulationen und Computer-basierte Änderungen von Strukturmotiven des erfindungsgemäß Proteins durchgeführt werden, wofür man entsprechende Computerprogramme einsetzt (Olszewski, Proteins 25 (1996), 286–299; Hoffman, Comput. Appl. Biosci. 11 (1995), 675–679). Computerbasierte Modellierung der Proteinfaltung kann für die Untersuchung der Konformation und des Energiezustands detaillierter Peptid- und Proteinmodelle eingesetzt werden (Monge, J. Mol. Biol. 247 (1995), 995–1012; Renouf, Adv. Exp. Med. Biol. 376 (1995), 37–45). Insbesondere können entsprechende Programme zur Identifizierung von Interaktionsstellen des erfindungsgemäß Proteins, seines Rezeptors, seines Liganden oder anderer interagierender Proteine mittels Computer-unterstützter Suchen nach komplementären Peptidsequenzen eingesetzt werden (Fassina, Immunomethods 5 (1994), 114–120. Weitere geeignete Computersysteme für das Protein- und Peptid-Design sind im Stand der Technik beschrieben, zum Beispiel in Berry, Biochem. Soc. Trans. 22 (1994), 1033–1036; Wodak, Ann. N. Y. Acad. Sci. 501 (1987), 1–13; Pabo, Biochemistry 25 (1986), 5987–5991. Die mit der oben beschriebenen Computeranalyse erhaltenen Ergebnisse können zum Beispiel für die Herstellung von Peptidmimetika des erfindungsgemäß Proteins oder Fragmenten hiervon verwendet werden. Solche Pseudopeptid-Analoga der natürlichen Aminosäuresequenz des Proteins können das Protein, von dem sie abgeleitet sind sehr effizient nachahmen (Benkirane, J. Biol. Chem. 271 (1996), 33218–33224). Zum Beispiel führt der Einbau von leicht verfügbaren achiralen Aminosäureresten in ein erfindungsgemäßes Protein oder in ein Fragment hiervon zur Substitution der Amidbindungen durch Polymethylen-Einheiten einer aliphatischen Kette, womit eine einfache Strategie für die Konstruktion eines Peptidmimikums bereitgestellt wird (Banerjee, Biopolymers 39 (1996), 769–777). Superaktive Peptidmimetik-Analoga von kleinen Peptidhormonen in anderen Systemen sind im Stand der Technik beschrieben (Zhang, Biochem. Biophys. Res. Commun. 224 (1996), 327–331). Geeignete Peptidmimetika des erfindungsgemäß Proteins können auch mittels Synthese von kombinatorischen Peptidmimetika-Banken durch sukzessive Amidalkylierung und Überprüfung der resultierenden Verbindungen z.B. auf deren Bindungs- und immunologische Eigen-

schaften identifiziert werden. Methoden für die Herstellung und Verwendung von kombinatorischen Peptidmetika-Banken sind im Stand der Technik beschrieben, zum Beispiel in Ostresh, Methods in Enzymology 267 (1996), 220–234 und Oomer, Bioorg. Med. Chem. 4 (1996), 709–715.

**[0046]** Des weiteren kann eine dreidimensionale und/oder kristallographische Struktur des erfindungsgemäßen Proteins für das Design von Peptidmimetika-Inhibitoren der biologischen Aktivität des erfindungsgemäßen Proteins eingesetzt werden (Rose, Biochemistry 35 (1996), 12933–12944; Rutenber, Bioorg. Med. Chem. 4 (1996), 1545–1558).

**[0047]** Des weiteren betrifft die vorliegende Erfindung Antikörper, welche ein erfindungsgemäßes, mit A20 interagierendes Protein oder Teile, also spezifische Fragmente oder Epitope, eines solchen Proteins erkennen. Die erfindungsgemäßen Antikörper können verwendet werden, um andere mit A20 interagierende Proteine und Gene in beliebigen Organismen zu identifizieren und isolieren. Diese Antikörper können monoklonale Antikörper, polyclonale Antikörper oder synthetische Antikörper sein, sowie Fragmente von Antikörpern, wie z.B. Fab-, Fv- oder scFv-Fragmente etc. Monoklonale Antikörper können zum Beispiel mittels Techniken hergestellt werden, wie sie ursprünglich in Köhler und Milstein, Nature 256 (1975), 495, und Galfré, Meth. Enzymol. 73 (1981), 3, beschrieben sind, und welche die Fusion von Mausmyelomzellen mit von immunisierten Säugetieren erhaltenen Milzellen umfassen. Des weiteren können Antikörper oder Fragmente davon gegen die zuvor erwähnten Peptide erhalten werden, indem man Methoden verwendet, welche z.B. in Harlow and Lane "Antibodies, A Laboratory Manual", CSH Press, Cold Spring Harbor, 1988 beschrieben sind. Diese Antikörper können zum Beispiel für die Immunpräzipitation und Immunolokalisierung von erfindungsgemäßen Proteinen eingesetzt werden sowie für die Überwachung der Synthese solcher Proteine, z.B. in rekombinanten Organismen und zur Identifizierung von Verbindungen, welche mit dem erfindungsgemäßen Protein interagieren. Man kann zum Beispiel Oberflächen-Plasmon-Resonanz, wie sie in dem BIAcore-System eingesetzt wird, dazu verwenden, die Effizienz von Phagenantikörper-Auswahlverfahren zu steigern, was zu einer hohen Affinitätssteigerung einer einzelnen Bank von Phagenantikörpern führt, welche an ein Epitop des erfindungsgemäßen Proteins binden (Schier, Human Antibodies Hybridomas 7 (1996), 97–105; Malmborg, J. Immunol. Methods 183 (1995), 7–13). In vielen Fällen entsprechen die Vorgänge bei der Bindung von Antikörpern an Antigene denen anderer Ligand/Anti-Ligand-Bindungen.

**[0048]** Die Erfindung betrifft auch ein Diagnosemittel, welches mindestens eines der zuvor erwähnten Nucleinsäuremoleküle, Vektoren, Proteine, Antikörper oder Verbindungen umfasst und gegebenenfalls geeignete Nachweismittel.

**[0049]** Diese Diagnosemittel können in Verfahren eingesetzt werden, um die Expression von verwandten mit A20 interagierenden Proteinen zu messen, indem sie die Anwesenheit der entsprechenden mRNA nachweisen. Dies beinhaltet die Isolierung von mRNA aus einer Zelle und das Inkontaktbringen der so erhaltenen mRNA mit einer Sonde, welche eine Nucleinsäuresonde wie vorstehend beschrieben umfasst, unter Bedingungen, die eine Hybridisierung erlauben, den Nachweis der an die Sonde hybridisierten mRNA und dadurch den Nachweis der Expression des Proteins in der Zelle. Weitere Verfahren für den Nachweis des erfindungsgemäßen Proteins umfassen auf dem Fachgebiet wohlbekannte Immuntechniken, zum Beispiel das Enzym-gebundene Immunsorptions-Verfahren.

**[0050]** Die Erfindung betrifft auch ein Arzneimittel zur Behandlung von NF-κB-assoziierten Krankheiten wie z.B. Atemwegsstörungen, insbesondere das Atemnotsyndrom des Erwachsenen, Allotransplantat-Abstoßung, chronische Entzündungskrankheiten wie z.B. rheumatoide Arthritis, Asthma oder entzündliche Darmerkrankung und/oder Autoimmunerkrankungen wie z.B. systemischer Lupus erythematoses, wobei dieses Arzneimittel eine oder mehrere Verbindungen umfasst, die mittels der oben erwähnten Durchmusterungsmethode erhalten wurden, und welches in einer biologisch aktiven Menge vorliegt.

**[0051]** In einem anderen Aspekt betrifft die Erfindung ein Arzneimittel zur Behandlung von NF-κB-assoziierten Krankheiten wie z.B. Atemwegsstörungen, insbesondere das Atemnotsyndrom des Erwachsenen, Allotransplantat-Abstoßung, chronische Entzündungskrankheiten wie z.B. rheumatoide Arthritis, Asthma oder entzündliche Darmerkrankung und/oder Autoimmunerkrankungen wie z.B. systemischer Lupus erythematoses, wobei dieses Arzneimittel eines oder mehrere der oben erwähnten Proteine in einer biologisch aktiven Menge umfasst.

**[0052]** Die Erfindung betrifft auch ein Arzneimittel für eine Behandlung, um Tumorzellen zu sensibilisieren, wobei dieses Arzneimittel eines oder mehrere der oben erwähnten Proteine und/oder eine oder mehrere der oben erwähnten Verbindungen in einer biologisch aktiven Menge umfasst.

## KURZE BESCHREIBUNG DER FIGUREN

**[0053]** [Fig. 1](#): Gewebeverteilung der ABIN-Transkripte. Ein Northern-Blot von poly(A)<sup>+</sup> RNA (2 µg pro Spur) von verschiedenen Mausgeweben (Clontech) wurde mit dem ABIN-Fragment als Sonde getestet, welches mittels einem „Two hybrid“-Verfahren cloniert wurde, welche die C-terminalen Sequenzen abdeckte ABIN (390–599). RNA-Größenmarker sind in kB angegeben. Die Expression von β-Actin diente als Kontrolle für die geladene RNA-Menge.

**[0054]** [Fig. 2](#)

A: Co-Immunpräzipitation von A20 und ABIN nach transakter Transfektion der codierenden Plasmide für E-markiertes ABIN und „Green Fluorescent Protein“ (GFP), GFP-A20, GFP-A20(369–775), GFP-A20(1–368) oder eines leeren Expressionsvektors als eine Negativ-Kontrolle in 293T-Zellen. Die Immunpräzipitation (oberes Feld) wurde mit einem Anti-GFP-Antikörper durchgeführt, und der Western Blot-Nachweis mit einem Anti-E-tag-Antikörper. Um die Expressionsspiegel von ABIN zu kontrollieren, wurden 10 µl-Aliquots der Lysate durch Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt und auf einem Western-Blot mit Anti-E-tag-Antikörper untersucht (unteres Feld).  
B: Co-Immunpräzipitation des C-terminalen Fragments von ABIN, welchem die mutmaßliche „Leucine zipper“-Struktur fehlt mit GFP-A20, nach transakter Überexpression in 293T-Zellen. Immunpräzipitation und Expressionsspiegel wurden wie für das Voll-Länge-ABIN beschrieben bestimmt und sind im oberen bzw. im unteren Feld gezeigt.

**[0055]** [Fig. 3](#): Konsensus-Sequenzen, welche aus einem Vergleich der ABIN- und ABIN2-Sequenzen abgeleitet wurden.

**[0056]** [Fig. 4](#)

A: Wirkung von ABIN oder Fragmenten von ABIN auf die TNF- und IL-1-induzierte Aktivierung von NF-κB, wie sie über die Reportergenaktivität gemessen wurde. 293T-Zellen wurden transient mit 100 ng pUT651, 100 ng pNFconluc und 100 ng Expressionsplasmid transfiziert und 6 Stunden lang mit hTNF (1000 IU/ml) oder mIL-1β (20 ng/ml) stimuliert. Als Kontrolle wurden 100 ng der Plasmide transfiziert, welche GFP oder GFP-A20 codieren.  
B: Wirkung einer transienten Transfektion suboptimaler Mengen von Expressionsplasmiden, welche A20 (5 ng) und ABIN (20 ng) codieren, auf die TNF-vermittelte Induktion von NF-κB in 293T-Zellen. In beiden Experimenten betrugen die Standardabweichungen weniger als 10%.

**[0057]** [Fig. 5](#): Wirkung von ABIN oder Fragmenten von ABIN auf die TPA-induzierte Aktivierung von NF-κB, wie sie über die Reportergenaktivität gemessen wurde. 293T-Zellen wurden transient mit 100 ng pUT651, 100 ng pNFconluc und 100 ng Expressionsplasmid transfiziert und 6 Stunden lang mit TPA (200 ng/ml) stimuliert. Als Kontrolle wurden 100 ng der Plasmide transfiziert, welche GFP oder GFP-A20 codieren.

**[0058]** [Fig. 6](#): Wirkung von ABIN2 auf die TNF- und TPA-induzierte Aktivierung von NF-κB, wie sie über die Reportergenaktivität gemessen wurde. 293T-Zellen wurden transient mit 100 ng pUT651, 100 ng pNFconluc und 600 ng Expressionsplasmid transfiziert und 6 Stunden lang mit hTNF (1000 IU/ml) oder TPA (200 ng/ml) stimuliert. Als Kontrolle wurden 600 ng der Plasmide transfiziert, welche GFP oder GFP-A20 codieren.

**[0059]** [Fig. 7](#)

A: Wirkung von Voll-Länge-ABIN auf die Aktivierung von NF-κB in 293T-Zellen, die durch Überexpression von TRADD, RIP, TRAF2, NIK oder p65 nach Transfektion von 300 ng der diese codierenden Plasmide, zusammen mit 100 ng pUT651, 100 ng pNFconluc und 500 ng pCAGGS-ABIN induziert wurde. Die Zellen wurden 24 Stunden nach Transfektion lysiert, und Luciferase und β-Galactosidase-Aktivität wurden gemessen.  
B: Wirkung von verkürztem ABIN, welches die „Leucine zipper“-Struktur enthält (ABIN(390–647)) auf TRADD-, RIP-, TRAF2- oder NIK-induzierte Aktivierung von NF-κB. In beiden Experimenten betrugen die Standardabweichungen weniger als 10%.

**[0060]** [Fig. 8](#): Wirkung von ortsspezifischen Mutationen in 2 Bereichen von ABIN auf dessen Bindung an A20 und auf dessen Hemmung der Aktivierung von NF-κB.

A. Aminosäurevergleich zweier homologer Sequenzen, welche man in ABIN und ABIN-2 gefunden hat. Identische Aminosäuren sind fett gedruckt dargestellt. Ortsspezifische Mutationen (unterstrichen) führen zu den Mutanten ABIN-MUT1, ABIN-MUT2, ABIN-MUT3 und ABIN-MUT4 wie gezeigt.  
B. Co-Immunopräzipitation von mutiertem ABIN mit A20 nach transakter Expression dieser Gene in

293T-Zellen. Zellen wurden mit den Plasmiden pCAGGS-GFP oder pCAGGS-GFP/A20 transfiziert, zusammen mit den Plasmiden, welche ABIN oder dessen ortsspezifische Mutanten (ABIN-MUT1, ABIN-MUT2, ABIN-MUT3 oder ABIN-MUT4) codieren. Lysate von diesen Zellen wurden mit einem polyclonalen Anti-GFP-Antikörper immunpräzipitiert und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Eine Western Blot-Analyse wurde mit einem monoklonalen Anti-E-tag-Antikörper durchgeführt, um nach einer Co-immunpräzipitation von ABIN oder dessen Mutanten zu suchen (oberes Feld). Die unteren Felder zeigen die Gesamtexpressionsspiegel von GFP, GFP/A20 und ABIN. In diesem Fall wurde ein Teil des Gesamtlysats mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Expression wurde mit Anti-GFP- oder Anti-E-tag-Antikörpern nachgewiesen.

C. Wirkung von mutiertem ABIN auf TNF-induzierte Aktivierung von NF-κB. 293T-Zellen wurden transient mit 100 ng pUT651, 100 ng pNFconluc und 200 ng Expressionsplasmid wie angegeben transfiziert und 6 Stunden lang mit TNF (1000 IU/ml) stimuliert. Zellextrakte wurden auf Luciferase- und β-Galactosidase-Aktivität untersucht, und die Ergebnisse in Form von luc/gal aufgetragen, was eine Messgröße der Aktivität von NF-κB darstellt. Jeder Wert ist das Mittel (N = 3) mit Standardabweichungen von weniger als 10%.

D. Dominant-negative Wirkung von ABIN-MUT2, ABIN-MUT3 und ABIN-MUT4 auf die NF-κB-hemmende Funktion von ABIN. 293T-Zellen wurden transient mit 100 ng pUT651, 100 ng pNFconluc und 200 ng pCAGGS-ABIN oder leerem Vektor transfiziert. Zusätzlich wurden 600 ng der Expressionsvektoren, welche ABIN-MUT2, ABIN-MUT3, ABIN-MUT4 codieren, oder leerer Vektor wie angegeben co-transfiziert. Die Zellen wurden 6 Stunden lang mit TNF (1000 IU/ml) stimuliert. Die Zellextrakte wurden auf Luciferase- und β-Galactosidase-Aktivität untersucht, und die Ergebnisse in Form von luc/gal aufgetragen.

#### BEGRIFFSERKLÄRUNGEN

**[0061]** Die folgenden Begriffserklärungen sind dazu vorgesehen, die Bedeutung und den Begriffsumfang der verschiedenen in der vorliegenden Beschreibung verwendeten Begriffe näher zu illustrieren und zu definieren.

**[0062]** Der Begriff "Behandlung", "behandeln" oder "behandeln" bedeutet irgendeine Behandlung einer Krankheit in einem Säuger, einschließlich: (1) Vorbeugen einer Krankheit, was bewirkt, dass sich die klinischen Symptome dieser Krankheit nicht entwickeln; (2) Hemmen der Krankheit, indem die Entwicklung der klinischen Symptome angehalten wird; und/oder (3) Lindern der Krankheit, was eine Zurückentwicklung der klinischen Symptome bewirkt.

**[0063]** Der Begriff "wirksame Menge" bedeutet eine Dosierung, welche ausreichend ist, um eine Behandlung für den zu behandelnden Krankheitszustand zur Verfügung zu stellen. Diese wird je nach Patient, Krankheit und durchzuführender Behandlung variieren.

**[0064]** "In der Lage zu interagieren" bedeutet, dass ein Protein einen Komplex mit einem anderen Protein eingehen kann, welcher mittels einem Hefe „Two hybrid“-Verfahren, oder mittels Co-Immunpräzipitation, oder gleichwertigen, dem Fachmann bekannten Systemen gemessen werden kann.

**[0065]** Ein "funktionelles" Protein oder Fragment bedeutet ein Protein oder Fragment, welches in der Lage ist, mit dem Zinkfinger-Protein A20, oder mit einem anderen Protein des NF-κB-assozierten Signalwegs zu interagieren.

**[0066]** "Protein A20" ("A20") bedeutet das TNF-induzierte Zinkfinger-Protein, das von (Oxit et al., 1990; Oipiari et al., 1990; Tewari et al., 1995) beschrieben wurde, oder ein aktives Fragment hiervon, wie z.B. der den Zinkfinger enthaltende Teil (Aminosäuren 387–790 des menschlichen A20; Aminosäuren 369–775 des A20 der Maus).

**[0067]** Die Begriffe "Gen(e)", "Polynucleotid", "Nucleinsäuresequenz", "Nucleotidsequenz", "DNA-Sequenz" oder "Nucleinsäuremolekül(e)" wie hier benutzt beziehen sich auf eine polymere Form von Nucleotiden jeglicher Länge, entweder Ribonucleotide oder Desoxyribonucleotide. Dieser Begriff bezieht sich nur auf die Primärstruktur des Moleküls. Somit schließt dieser Begriff doppel- und einzelsträngige DNA, und RNA ein. Er schließt auch bekannte Arten von Modifikationen ein, zum Beispiel Methylierung, die Bildung von "Cap-Strukturen" durch die Substitution eines oder mehrerer der natürlich vorkommenden Nucleotide mit einem Analagon. Bevorzugt umfasst die erfindungsgemäße DNA-Sequenz eine codierende Sequenz, welche das vorstehend definierte, mit A20 interagierende Protein codiert.

**[0068]** Eine "codierende Sequenz" ist eine Nucleotidsequenz, die in mRNA transkribiert und/oder in ein Polypeptid translatiert wird, wenn sie unter die Kontrolle geeigneter regulatorischer Sequenzen gebracht wird. Die Grenzen der codierenden Sequenz sind am 5'-Ende durch das Translations-Startcodon und am 3'-Ende durch

das Translations-Stopcodon festgelegt. Eine codierende Sequenz kann, ohne darauf beschränkt zu sein, mRNA, cDNA, rekombinante Nucleotidsequenzen oder genomische DNA einschließen, wobei unter bestimmten Umständen auch Introns vorliegen können.

**[0069]** "Konsensus-Sequenz" bedeutet einen Abschnitt von mindestens 15 Aminosäuren, welcher 50–100% Homologie, bevorzugt 70–100% Homologie zwischen ABIN und ABIN2 aufweist.

**[0070]** "Verbindung" bedeutet eine beliebige chemische oder biologische Verbindung, einschließlich einfacher oder komplexer anorganischer oder organischer Moleküle, Peptide, Peptidmimetika, Proteine, Antikörper, Kohlenhydrate oder Nucleinsäuren, welche die Bindung zwischen einem in SEQ ID NO. 2, 3, 5, 6 oder 7 gezeigten Protein mit einer Verbindung des NF-κB-assoziierten Signalwegs stört, wie z.B. A20.

**[0071]** Wie hierin verwendet, bezieht sich der Begriff "Mittel" auf ein beliebiges Mittel wie z.B. ein Arzneimittel, welches als Wirkstoff ein isoliertes funktionelles Protein gemäß der vorliegenden Erfindung umfasst, unter Umständen in Gegenwart eines dem Fachmann bekannten geeigneten Excipienten, und daher in Form eines beliebigen geeigneten Mittels, wie unten ausgeführt, in einer beliebigen, dem Fachmann bekannten Verabreichungsform dargeboten werden kann. Der bevorzugte Verabreichungsweg ist parenteral. Bei einer parenteralen Verabreichung wird die Rezeptur der erfindungsgemäßen Arzneimittel in einer Einheitsdosierung in einer injizierbaren Form wie z.B. einer Lösung, Suspension oder Emulsion vorliegen, in Verbindung mit einem pharmazeutisch verträglichen Excipienten. Solche Excipienten sind von Natur aus nicht-toxisch und nicht-therapeutisch. Beispiele für solche Excipienten sind Kochsalzlösung, Ringer-Lösung, Dextroselösung und Hank-Lösung. Nichtwässrige Excipienten wie z.B. nicht-flüchtige Öle und Ethyoleat können ebenfalls verwendet werden. Ein bevorzugter Excipient ist 5% Dextrose in Kochsalzlösung. Der Excipient kann geringe Anteile von Zusatzstoffen enthalten, wie z.B. Stoffe, welche die Isotonie und chemische Stabilität erhöhen, einschließlich Puffer und Konservierungsstoffe.

**[0072]** Das isolierte funktionelle Protein der Erfindung wird in einer Konzentration verabreicht, die therapeutisch wirksam ist, um Allotransplantat-Abstoßung, Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion (GVHD), Allergie und Autoimmunkrankheiten zu verhindern. Die Dosierung und Verabreichungsart wird von der Einzelperson abhängen. Üblicherweise werden die Mittel so verabreicht, dass das isolierte funktionelle Protein in einer Dosis zwischen 1 µg/kg und 10 mg/kg, bevorzugter zwischen 10 µg/kg und 5 mg/kg, am bevorzugtesten zwischen 0.1 und 2 mg/kg gegeben wird. Bevorzugt wird es als Bolus gegeben. Eine konstante Infusion über eine kurze Zeit (30 Minuten) kann ebenfalls eingesetzt werden. Die Mittel, welche das isolierte funktionelle Protein gemäß der Erfindung umfassen, können in einer Dosis zwischen 5 und 20 µg/kg/Minute, bevorzugter zwischen 7 und 15 µg/kg/Minute infundiert werden.

**[0073]** Die im Einzelfall benötigte "therapeutisch wirksame Menge" des isolierten funktionellen Proteins gemäß der Erfindung sollte als die Menge bestimmt werden, welche ausreicht, um den behandlungsbedürftigen Patienten zu heilen oder die Krankheit und ihre Komplikationen wenigstens teilweise zu stoppen. Die für diesen Zweck wirksamen Mengen werden von der Schwere der Krankheit und dem Allgemeinzustand des Patienten abhängen. Es können einzelne oder mehrfache Verabreichungen erforderlich sein, je nach der vom Patienten benötigten und tolerierten Dosierung und Häufigkeit.

**[0074]** Im Hinblick auf die Verwendung des isolierten funktionellen Proteins der vorliegenden Erfindung, Allotransplantat-Abstoßungen zu verhindern, sollte hervorgehoben werden, dass die erfindungsgemäßen Proteine oder die Mittel, welche dieses umfassen, vor, während oder nach der Organtransplantation verabreicht werden können, wie es von Fall zu Fall gewünscht wird. Falls das Protein oder die Mittel, welche dies umfassen, direkt dem Wirt verabreicht werden, wird die Behandlung bevorzugt zum Zeitpunkt der Transplantation beginnen und danach fortgeführt werden, um die Aktivierung und Differenzierung der T-Zellen des Wirts gegen die MHC auf dem Allotransplantat zu verhindern. Falls das Spenderorgan ex vivo mit dem erfindungsgemäßen Protein oder Mitteln, welche dieses umfassen, perfundiert wird, wird die Behandlung des Spenderorgans ex vivo vor dem Zeitpunkt der Transplantation des Spenderorgans beginnen, um die Aktivierung und Differenzierung der T-Zellen des Wirts gegen die MHC auf dem Allotransplantat zu verhindern.

**[0075]** Die Erfindung wird nachstehend an Hand von Beispielen weiter erklärt, ohne dadurch den Umfang der vorliegenden Erfindung einzuschränken.

## BEISPIELE

## Beispiel 1: Isolierung der neuen Inhibitoren

**[0076]** Die neuen Inhibitoren des NF-κB-Signalwegs wurden unter Verwendung eines Hefe-"Two-hybrid"-Systems mit dem Protein A20 als Köder isoliert. Das Hefe-"Two-hybrid"-System wurde von Clontech Laboratories (Palo Alto, CA) gekauft. Die Durchmusterung einer L929r2 cDNA-Bank mit pAS2-A20 wurde früher beschrieben (De Valck et al. 1997). Hefe-Kolonien, die interagierende Proteine exprimierten, wurden durch Wachstum auf Minimalmedien ohne Tryptophan, Leucin und Histidin, in Gegenwart von 5 mM 3-Amino-1,2,4-triazol und durch Durchmusterung auf β-gal-Aktivität isoliert. Plasmid-DNA wurde aus positiven Kolonien extrahiert, und die pGAD424 Vektoren, welche Kandidaten für mit A20 interagierende Proteine waren, wurden durch Elektroporation in den E.coli-Stamm HB101 und durch Wachstum auf Medien ohne Leucin gewonnen.

**[0077]** Von  $1.3 \times 10^6$  Transformanten exprimierten 11 Clone mit A20 interagierende Proteine, einschließlich A20 selbst (De Valck et al., 1996) und 14-3-3-Proteine (De Valck et al., 1997). Drei Clone enthielten C-terminalen Fragmente derselben cDNA, welche ein unbekanntes Protein codierte, das hiermit "A20 Binding Inhibitor" der Aktivierung von NF-κB (ABIN) benannt wird und 1 Clon enthielt das C-terminale Fragment (1136 bp) eines unbekannten Proteins, das hiermit ABIN2 genannt wird.

**[0078]** Voll-Länge-ABIN-cDNA wurde anschließend durch Koloniehybridisierung aus der L929r2-cDNA-Bank isoliert (De Valck et al., 1996), wobei als Sonde ein Fragment von ABIN (entsprechend den Aminosäuren 390–599) diente, welches über das "Two hybrid"-Verfahren clonierte worden war. Mehrere cDNAs wurden isoliert, und in der längsten cDNA wurden in allen drei Leserahmen Stopcodons 5' von einem potenziellen Methionin-Startcodon identifiziert. Es wurden zwei verschiedene Spleißvarianten gefunden, die ungefähr 2800 und 2600 Nucleotide lang waren, mit einem offenen Leserahmen von 1941 bzw. 1781 Nucleotiden, welche an zwei verschiedenen Methioninen begannen (ABIN (1–647) (SEQ ID NO. 2) und ABIN (54–647) (SEQ ID NO. 3)). Diese cDNAs codieren Proteine von 72 und 68 kDa, welche eine amphipathische Helix mit 4 aufeinander folgenden Wiederholungen von Leucin, gefolgt von 6 zufälligen Aminosäurenresten enthalten, charakteristisch für eine "Leucine zipper"-Struktur.

**[0079]** Voll-Länge-cDNA von ABIN2 wurde aus Mäuseherz durch 5' RACE (SMART PCR cDNA Synthesekit, Clontech) isoliert, wobei ein 3'-Primer verwendet wurde, der an einen EST-Clon (572231) hybridisiert, welcher dem ABIN2-Fragment entspricht, der über die "Two hybrid"-Analyse isoliert wurde, jedoch 507 zusätzliche Nucleotide am 5'-Ende aufweist. Eine 1967 Nucleotide lange cDNA wurde isoliert, die einen 1290 Nucleotide langen offenen Leserahmen enthielt, welcher ein Protein von 430 Aminosäuren codierte (SEQ ID NO. 5).

## Beispiel 2: Expressionsmuster von ABIN und ABIN2.

**[0080]** Eine Northern Blot-Untersuchung zeigte, dass sowohl ABIN als auch ABIN2 in allen getesteten Geweben der Maus exprimiert werden (Herz, Hirn, Milz, Lunge, Leber, Skelettmuskel, Niere, Hoden; siehe [Fig. 1](#); nur die Daten für ABIN sind gezeigt). ABIN liegt als eine mRNA von ungefähr 2800 bp vor, was mit der Länge der clonierten Voll-Länge-cDNA übereinstimmt. Im Gegensatz zu A20 ist die ABIN mRNA konstitutiv sowohl in TNF-sensitiven als auch TNF-resistenten Subclonen exprimiert, welche von der parentalen Zelllinie L929s abgeleitet sind, unabhängig von der Stimulation mit TNF.

**[0081]** ABIN2 liegt als mRNA von ungefähr 2000 bp vor, was mit der Länge der clonierten Voll-Länge-cDNA übereinstimmt.

## Beispiel 3: Untersuchung der Interaktion der ABIN- und ABIN2-Proteine und Protein-Fragmente mit A20.

**[0082]** Voll-Länge-ABIN(1–647) und ABIN(54–647) waren in der Lage, in einem Hefe-"Two hybrid"-System an A20 zu binden, was die ursprüngliche Interaktion bestätigte, die mit den 3 C-terminalen Fragmenten ABIN(390–599), ABIN(249–647) und ABIN(312–647) gefunden wurde. Die letzteren enthalten das mutmaßliche "Leucine zipper"-Proteininteraktionsmotiv (397–420).

**[0083]** Die weitere Analyse wurde mittels Co-Immunpräzipitation durchgeführt. Die eukaryontischen Plasmide für ABIN und dessen Fragmente sowie für ABIN2 wurden hergestellt, indem die entsprechenden PCR-Fragmente im selben Leserahmen mit einem N-terminalen "E-tag" in das Säuger-Expressionsplasmid pCAGGS (Niwa et al., 1991) eingefügt wurden. cDNAs, welche die Mutante GFP(S65T) und ein Fusionsprotein von GFP(S65T) mit A20 der Maus codierten, wurden ebenfalls in pCAGGS cloniert.

**[0084]**  $2 \times 10^6$  menschliche embryonale 293T-Nierenzellen wurden auf 10-cm Petrischalen ausplattiert und transient mit den geeigneten Plasmiden mit der Calciumphosphat-DNA-Copräzipitation transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen in 500 µl Lyse-Puffer (50 mM Hepes pH 7.6, 250 mM NaCl, 0.1% Nonidet P-40 und 5 mM EDTA) lysiert. Die Lysate wurden mit 5 µl von Kaninchen-Anti-GFP Antikörper (Clontech) inkubiert, und Immunkomplexe wurden auf Protein A-Trisacryl (Pierce) immobilisiert. Letzteres wurde zwei Mal mit Lyse-Puffer und zwei Mal mit Lyse-Puffer, welcher 1 M NaCl enthielt, gewaschen. Co-präzipitierte Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und durch Western-Blotting mit Maus-Anti-E-tag-Antikörper (Pharmacia) sichtbar gemacht.

**[0085]** Voll-Länge-ABIN sowie das C-terminale Fragment, welchem das "Leucine zipper"-Motiv fehlte (ABIN(420–647)), waren immer noch in der Lage, mit A20 in 293T-Zellen, welche transient mit einem Expressionsplasmid für chimäres GFP-A20 Protein und Voll-Länge- oder verkürztem ABIN mit einem N-terminalen "E-tag" ([Fig. 2](#)) transfiziert worden waren, zu co-immunopräzipitieren. Die Interaktion von ABIN mit A20 benötigte den C-terminalen, Zinkfinger-enthaltenden Teil von A20 (A20(369–775)). Es ist früher gezeigt worden, dass diese Domäne für die Dimerisierung von A20 und für die Interaktion von A20 mit 14-3-3-Protein notwendig ist (De Valck et al., 1996; De Valck et al., 1997). Im Gegensatz dazu ist früher gezeigt worden, dass der N-terminalen Teil des menschlichen A20 (A20(1–386)) mit TRAF2 interagiert (Song et al., 1996), was darauf hinweist, dass A20 als Adapter-Protein zwischen TRAF2 und ABIN fungiert. Die Interaktion zwischen A20 und ABIN wurde nicht durch Stimulation mit TNF beeinflusst.

**[0086]** Um die subzelluläre Verteilung von ABIN zu charakterisieren, transfizierten wir GFP-A20- und mit einem "E-tag" versehene ABIN-cDNA transient in 293T-Zellen und untersuchten deren Expression mittels GFP-Fluoreszenz und Immunfluoreszenz über den Anti-E tag-Antikörper.  $4 \times 10^5$  293T-Zellen wurden auf Deckgläschen in Platten mit 6 Vertiefungen ausgesät und mit 1 µg Plasmid-DNA transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen auf den Deckgläschen mit 3% Paraformaldehyd fixiert. Nach Permeabilisierung mit 1% Triton X-100 wurden die Zellen 2 Stunden mit Maus-Anti-E-tag Antikörper (1/1000) inkubiert, gefolgt von einer zweiten Inkubation mit an Biotin gekoppeltem Anti-Maus-Ig-Antikörper (Amersham, 1/1000). Nach anschließender Inkubation mit an Texasred gekoppeltem Streptavidin (Amersham), kann die Fluoreszenz durch Fluoreszenzmikroskopie (Zeiss, Axiophot) analysiert werden, wobei ein Filterset mit einer Anregung bei 543 nm und einer Emission bei 600 nm verwendet wurde. In denselben Zellen kann die GFP-Fluoreszenz bei einer unterschiedlichen Wellenlänge bestimmt werden, nämlich einer Absorption bei 485 nm und einer Emission bei 510 nm.

**[0087]** ABIN co-lokalisierte mit A20 im gesamten Cytoplasma, sowohl in unstimulierten als auch in TNF-stimulierten Zellen. Diese Beobachtung macht die Existenz von regulatorischen Neuverteilungsvorgängen relativ unwahrscheinlich.

#### Beispiel 4: Sequenzanalyse der cDNAs.

**[0088]** Die Analyse der Nucleotidsequenzen wurde mittels "Cycle sequencing" auf einem AB1373A-Sequenzergerät (Applied Biosystems, Foster City, CA) durchgeführt. Die Sequenz des Voll-Länge-ABIN ist in SEQ ID NO. 1 gezeigt; die Sequenz von ABIN2 ist in SEQ ID NO. 4 gezeigt.

**[0089]** Datenbanksuchen nach ähnlichen Sequenzen (BLAST) zeigten, dass ABIN das Maushomolog einer partiellen menschlichen cDNA ist, welche ein Protein mit einer unbekannten Funktion codiert (Genbank-Hinterlegungsnummer D30755: Nagase et al., 1995). Außerdem zeigt ABIN Homologie mit einem partiellen Protein, das mit dem Nef-Protein des menschlichen Immunschwäche-Virus (HIV) interagiert, dem NIP40-1 (jetziger Name: Naf1 = nef associated factor 1; Fukushi et al., FEBS Letters, 442 (1999), 83–88). HIV-Nef trägt wesentlich zur Pathogenese der Krankheit bei, indem es die Virusreplikation erhöht und T-Zell Funktionen merklich stört. Interessanterweise ist die Wirkung von Nef auf die Aktivierung der Wirtszelle teilweise durch seine Interaktion mit spezifischen, an der Signalübertragung beteiligten zellulären Proteinen erklärt worden (Harris, 1996), für die ABIN ein Beispiel sein könnte.

**[0090]** Es gibt keine Proteine in der Datenbank, welche eindeutig homolog zu ABIN2 sind. Man kann jedoch, indem man ABIN2 mit ABIN vergleicht, zwei homologe Bereiche definieren und davon zwei Konsensus-Sequenzen ableiten ([Fig. 3](#), SEQ ID NOs. 6 und 7)), welche für die Interaktion dieser Proteine mit A20 und/oder für deren weitere Funktion in der Signalübertragung wichtig sein könnten.

Beispiel 5: Rolle von ABIN, der ABIN-Fragmente und/oder ABIN2 in dem TNF-, IL-1- und/oder TPA-induzierten Signalweg, welcher zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B führt, gemessen über die Reportergen-Aktivität.

**[0091]** Die Konstruktion der ABIN-, ABIN-Fragmente- und ABIN2-Plasmide wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Das Plasmid pNFconluc, das ein Luciferase-Reportergen codiert, das von einem minimalen, auf NF- $\kappa$ B ansprechenden Promotor angetrieben wird (beschrieben von Kimura et al. (1986)) und das Plasmid pUT651, welches  $\beta$ -Galactosidase codiert, wurden von Eurogentec (Seraing, Belgien) erhalten. NF- $\kappa$ B-Aktivität wurde über die NF- $\kappa$ B-abhängige Expression eines Luciferase-Reportergens bestimmt. Hierfür wurden 293T-Zellen in Platten mit 6 Vertiefungen bei  $4 \times 10^5$  Zellen pro Vertiefung ausplattiert und transient mit der Calciumphosphat-DNA-Co-präzipitations-Methode transfiziert. Jede Transfektion enthielt 800 ng des Expressionsplasmids sowie 100 ng des pNFconluc-Plasmids als Reporter und 100 ng pUT651-Plasmid als Bezugsgröße für die Transfektionseffizienz. 24 Stunden nach der Transfektion wurden diese Zellen mit Trypsin behandelt und auf eine Platte mit 24 Vertiefungen ausgesät.

**[0092]** Wiederum 24 Stunden später wurden die Zellen entweder mit 1000 IU/ml hTNF, 20 ng/ml mIL1- $\beta$  oder 200 ng/ml TPA (Sigma) stimuliert oder unbehandelt gelassen. Nach 6 Stunden Stimulation wurden die Zellen in 200  $\mu$ l Lyse-Puffer lysiert und auf Luciferase- und  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität untersucht, wie in De Valck et al., 1997 beschrieben. GFP und GFP-A20 dienten als Negativ- bzw. Positivkontrollen.

**[0093]** Ähnlich wie A20 waren beide Spleißvarianten von ABIN in der Lage, die durch TNF oder IL-1 induzierte Aktivierung von NF- $\kappa$ B in diesen Zellen zu blockieren, wobei die kürzere, N-terminal verkürzte Isoform ein bisschen wirksamer war ([Fig. 4A](#)). Darüber hinaus zeigte eine Struktur-Funktions-Analyse der ABIN-Deletionsmutanten, dass sich die NF- $\kappa$ B-hemmende Aktivität in den C-terminalen 228 Aminosäuren (ABIN(420–647)) befindet, welche auch für die Interaktion mit A20 ausreichen. Die letztere ABIN-Mutante enthält die "Leucine Zipper"-Struktur nicht mehr, was beweist, dass diese Proteindomäne weder an der Interaktion mit A20 noch an der Hemmung von NF- $\kappa$ B beteiligt ist ([Fig. 4A](#)). Überexpression einer Kombination von suboptimalen Dosen von A20 und ABIN, die für sich allein nicht ausreichten, um die Aktivierung von NF- $\kappa$ B zu hemmen, verminderten die Aktivierung von NF- $\kappa$ B nach Stimulation mit TNF ([Fig. 4B](#)) oder IL-1 beträchtlich. Dies deutet darauf hin, dass ABIN den NF- $\kappa$ B-hemmenden Effekt von A20 vermittelt.

**[0094]** Komplettes ABIN (1–647; SED. ID. NO. 2), die kürzere Spleißvariante (54–647; SEQ. ID. NO. 3) und das C-terminale Fragment (390–647) sind auch in der Lage, die durch TPA induzierte Aktivierung von NF- $\kappa$ B zu blockieren ([Fig. 5](#)).

**[0095]** Ähnliche Ergebnisse wurden erhalten, wenn ABIN2 an Stelle von ABIN oder ABIN-Fragmenten in dem Test eingesetzt wurde ([Fig. 6](#)).

Beispiel 6: Wirkung von ABIN und/oder ABIN-Fragmenten auf die durch Überexpression von TRADD, RIP, TRAF2, NIK oder p65 induzierte Aktivierung von NF- $\kappa$ B.

**[0096]** Expressionsvektoren für ABIN und ABIN Fragmente wurden wie vorstehend beschrieben konstruiert. Die Expressionsvektoren, welche TRAF2, NIK und p65 enthalten, sind beschrieben worden (Malinin et al., 1997; Rothe et al., 1994; Vanden Berghe et al., 1998). PCR-Fragmente, die TRADD und RIP codieren, wurden in pCDNA3 (Invitrogen, Carlsbad, CA) cloniert, im gleichen Leserahmen mit einem C-terminalen "E-tag". Transfektion und Reporter-Assay wurden wie vorstehend beschrieben durchgeführt.

**[0097]** NF- $\kappa$ B kann in 293T-Zellen durch TNF-Behandlung sowie durch Überexpression spezifischer Proteine des TNF-Rezeptor-Komplexes, einschließlich TRADD, RIP, TRAF2 und NIK, aktiviert werden (Rothe et al., 1995; Malinin et al., 1997; Hsu et al., 1995; Ting et al., 1996). Letzterer bindet an und aktiviert den I $\kappa$ B-Kinase-Komplex, was zu einer Phosphorylierung von I $\kappa$ B führt. Dies ist ein Signal für die Ubiquitinierung und Abbau von I $\kappa$ B, was NF- $\kappa$ B freisetzt, welches sich dann in den Kern verlagert. Co-Transfektion von Expressionsplasmiden, welche diese TNF-Rezeptor-assoziierten Proteine codieren, zusammen mit den Expressionsplasmiden, die Voll-Länge-ABIN codieren, zeigte, dass letztere die durch TRADD oder RIP induzierte Aktivierung von NF- $\kappa$ B vollständig und die durch TRAF2 induzierte Aktivierung von NF- $\kappa$ B teilweise hemmten. Im Gegensatz dazu wurde kein deutlicher Unterschied beobachtet, wenn die NF- $\kappa$ B-abhängige Reportergen-Expression durch NIK oder direkter durch Überexpression der p65-Untereinheit von NF- $\kappa$ B induziert wurde ([Fig. 7](#)). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass ABIN die TNF-induzierte Aktivierung von NF- $\kappa$ B auf einer Ebene hemmt, welche vor der Aktivierung der NIK-I $\kappa$ B-Kinaseschritte liegt, zum Beispiel auf der Ebene von TRAF2 im TNF-Rezeptor-Komplex.

**[0098]** Da Mitglieder der TRAF Familie die Aktivierung von NF-κB über mehrere andere Stimuli vermitteln, einschließlich IL-1, Lymphotoxin β, CD30 und CD40 (Rothe et al., 1995; Cao et al., 1996; Nakano et al., 1996; Aizawa et al., 1997; Ishada et al., 1996), könnte ABIN das Potenzial haben, die Aktivierung von NF-κB in Reaktion auf ein breites Spektrum von Induktoren zu hemmen. Daher ist es wahrscheinlich, dass Medikamente, welche die Aktivität von ABIN nachahmen, einen therapeutischen Nutzen bei entzündlichen und neurodegenerativen Krankheiten sowie bei Krebs und AIDS aufweisen.

Beispiel 7: Zelltransfektion, Co-Immunpräzipitation und Western-Blotting.

**[0099]**  $2 \times 10^6$  menschliche embryonale 293T-Nierenzellen wurden auf 10-cm Petrischalen ausplattiert und transient mit der Calciumphosphat-DNA-Copräzipitation transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen in 500 µl Lyse-Puffer (50 mM Hepes pH 7.6, 250 mM NaCl, 0.1% Nonidet P-40 und 5 mM EDTA) lysiert. Die Lysate wurden mit 5 µl von Kaninchen-Anti-GFP Antikörper (Clontech) inkubiert, und Immun-Komplexe wurden auf Protein A-Trisacryl (Pierce) immobilisiert. Das 1 M NaCl. Co-präzipitierte Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und durch Western-Blotting mit Maus-Anti-E-tag-Antikörper (Pharmacia) untersucht.

Beispiel 8: NF-κB-abhängiger Reportergen-Assay.

**[0100]** NF-κB-Aktivität wurde über die NF-κB-abhängige Expression eines Luciferase-Reportergens bestimmt. Hierfür wurden 293T-Zellen in Platten mit 6 Vertiefungen mit  $4 \times 10^5$  Zellen pro Vertiefung ausplattiert und transient mit der Calciumphosphat-DNA-Co-präzipitations-Methode transfiziert. Jede Transfektion enthielt 800 ng der spezifischen Expressionplasmide sowie 100 ng of pNFconluc-Plasmid und 100 ng pUT651-Plasmid. 24 Stunden nach der Transfektion wurden diese Transfektanten mit Trypsin behandelt und auf eine Platte mit 24 Vertiefungen ausplattiert. Wiederum 24 Stunden später wurden die Zellen entweder mit 1000 IU/ml hTNF oder 7000 IU/ml IL1 stimuliert oder unbehandelt gelassen. Nach 6 Stunden Stimulierung wurden die Zellen in 200 µl Lyse-Puffer lysiert und auf Luciferase- und β-Galactosidase-Aktivität untersucht. Luciferase-Werte (luc) sind mit den β-Galactosidase-Werten (gal) normalisiert und als luc/gal aufgetragen.

Beispiel 9: Ortsspezifische Mutagenese.

**[0101]** Ortsspezifische Mutagenese von ABIN wurde mittels überlappender PCR-Reaktion unter Verwendung von Primern, welche die gewünschte Mutation enthalten durchgeführt. Die verwendeten Primer waren die Mutationsprimer 5'-GAATACCAGGAGGCGCAGATCCAGCGGCTCAATAAGCTTGGAGGAGGC-3' (SEQ ID NO. 9), 5'-GTTGCTGAAAGAGGACGTCAAAATCTTGAAGAGG-3' (SEQ ID NO. 10), 5'-GCAGGTAAAATCTTGAAGAGAACGCCAGAGGGAACG-3' (SEQ ID NO. 11), 5'-GCAGGTAAAATCTTGAAGAGGACTTCCAGAGGGAACGGAGTGATGCGCAACGCATGCCG-3 (SEQ ID. NO. 12), ein vorwärts gerichteter, am Startcodon lokalisierter Primer und zwei rückwärts gerichtete Primer, wovon der eine in der 3'-UTR und der andere in der codierenden Region hybridisierte. Das Xhol-BstEII-Fragment des Wildtyp-ABIN(54–647) in pCAGGS wurde mit dem gleichen Fragment der PCR-amplifizierten mutierten ABIN-cDNAs ausgetauscht.

Beispiel 10: Die Bindung von ABIN an A20 ist nicht ausreichend für dessen NF-κB-Hemmopotenzial.

**[0102]** Ein "Two hybrid"-Verfahren mit A20 enthüllte ein anderes neues A20-bindendes Protein, welches ebenfalls die Aktivierung von NF-κB nach Überexpression hemmen konnte. BLAST-Suchen mit diesem neuen, ABIN-2 genannten, Protein zeigten keine Homologie mit irgendeinem bekannten Protein. Jedoch wurden durch einen Vergleich der Proteinsequenz von ABIN-2 mit ABIN zwei 19 (AA 423–441) und 21 (AA 475–495) Aminosäuren lange Boxen mit 68% bzw. 67% Homologie identifiziert ([Fig. 8](#)). Daher wurde der Beitrag dieser Bereiche zur Bindung mit A20 und zu den NF-κB-hemmenden Wirkungen von ABIN durch ortsspezifische Mutagenese einer Reihe von konservierten Aminosäuren untersucht ([Fig. 8A](#)). Co-Immunpräzipitations-Analyse nach transiente Überexpression von GFP oder GFP/A20 zusammen mit Wildtyp-ABIN oder dessen ortsspezifischer Mutanten (ABIN-MUT1, ABIN-MUT2, ABIN-MUT3 und ABIN-MUT4) in 293T-Zellen zeigten, dass alle diese Mutanten immer noch A20 binden können ([Fig. 8B](#)). Andererseits hoben Punktmutationen in der zweiten Box (ABIN-MUT2, ABIN-MUT3 und ABIN-MUT4) die Fähigkeit von ABIN, die Aktivierung von NF-κB nach Stimulation der 293T-Zellen mit TNF zu blockieren, vollständig auf, selbst wenn größere Mengen dieser Expressionsplasmide transfiziert wurden. Im Gegensatz dazu verminderte die Mutation in der ersten Box (ABIN-MUT1) die NF-κB-hemmende Wirkung von ABIN nur leicht ([Fig. 8C](#)). Darüber hinaus beeinträchtigten Punktmutationen in dem zweiten konservierten Motiv die NF-κB-hemmende Wirkung von Wildtyp-ABIN auf eine dominante Weise ([Fig. 8D](#)). ABIN-MUT2 und ABIN-MUT3 haben im Vergleich zu ABIN-MUT4 eine stär-

kere Funktion als dominant-negative Mutanten von ABIN. In diesen Assays wurden, nach der Western Blot-Analyse unter Verwendung des Anti-E-tag Antikörpers zu urteilen, vergleichbare Expressionsspiegel der verschiedenen Mutanten und des Wildtyp-ABIN erhalten. Diese Ergebnisse legen nahe, dass der zweite konservierte Bereich an den NF-κB-hemmenden Wirkungen von ABIN beteiligt ist, und dass die Bindung von ABIN an A20 als solche nicht ausreichend für die Hemmung der Aktivierung von NF-κB ist.

#### LITERATUR

- Aizawa S, et al. Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 5 and TRAF2 are involved in CD30-mediated NF-κB activation. *J Biol Chem.* 272, 2042–2045. (1997)
- Barnes PJ, et al. Anti-inflammatory actions of steroids: molecular mechanisms. *Trends Pharmacol Sci.* 14 (12): 436–441 (1993).
- Barnes PJ and Karin M. Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med.* 336 (15): 1066–1071 (1997).
- Behl C, et al. Mechanism of amyloid beta protein induced neuronal cell death: current concepts and future perspectives. *J Neural Transm Suppl.* 49: 125–134 (1997).
- Brand K, et al. Activated transcription factor nuclear factor-kappa B is present in the atherosclerotic lesion. *J Clin Invest.* 97 (7): 1715–1722 (1996).
- Brand K, et al. Dysregulation of monocytic nuclear factor-kappa B by oxidized low-density lipoprotein. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 17 (10): 1901–1909 (1997).
- Cao Z, et al. TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1. *Nature* 383, 443–446. (1996)
- De Valck D, et al. A20, an inhibitor of cell death, self-associates by its zinc finger domain. *FEBS Lett.* 384, 61–64. (1996)
- De Valck D, et al. A20 inhibits NF-κB activation independently of binding to 14-3-3 proteins. *Biochem Biophys Res Commun.* 238, 590–594. (1997)
- DiDonato JA, et al. A cytokine-responsive IκB kinase that activates the transcription factor NF-κB. *Nature* 388, 548–554. (1997)
- Dixit VM, et al. Tumor necrosis factor-alpha induction of novel gene products in human endothelial cells including a macrophage-specific chemotaxin. *J Biol Chem.* 265, 2973–2978. (1990)
- Harris M. From negative factor to a critical role in virus pathogenesis: the changing fortunes of Nef. *J Gen Virol.* 77, 2379–2392. (1996)
- Hsu H, et al. The TNF receptor 1-associated Protein TRADD signals cell death and NF-κB activation. *Cell* 81, 495–504. (1995)
- Ishida T, et al. Identification of TRAF6, a novel tumor necrosis factor receptor-associated factor protein that mediates signaling from an amino-terminal domain of the CD40 cytoplasmic region. *J Biol Chem.* 271, 28745–28748. (1996)
- Jaattela M, et al. A20 zinc finger protein inhibits TNF and IL-1 signaling. *J Immunol.* 156, 1166–1173. (1996)
- Kaltschmidt C, et al. Transcription factor NF-kappa B is activated in microglia during experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol.* 55 (1): 99–106. (1994)
- Kimura A, et al. Detailed analysis of the mouse H-2K<sup>b</sup> promoter: enhancer-like sequences and their role in the regulation of class I gene expression. *Cell* 44 (2): 261–272. (1986)
- Kopp EB and Ghosh S. Inhibition of NF-kappa B by sodium salicylate and aspirin. *Science*. 265 (5174): 956–959. (1994)
- Krikos A, et al. Transcriptional activation of the tumor necrosis factor alpha-inducible zinc finger protein, A20, is mediated by κB elements. *J Biol Chem.* 267, 17971–17976. (1992)
- Luque I, et al. Rel/NF-kappa B and I kappa B factors in oncogenesis. *Semin Cancer Biol.* 8 (2): 103–111. (1997)
- Malanin NL, et al. MAP3K-related kinase involved in NF-κB induction by TNF, CD95 and IL-1. *Nature*. 385, 540–544 (1997)
- Mosialos G. The role of Rel/NF-kappa B proteins in viral oncogenesis and the regulation of viral transcription. *Semin Cancer Biol.* 8 (2): 121–129. (1997)
- Nagase, T et al. Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. III. The coding sequences of 40 new genes (KIAA0081-KIAA0120) deduced by analysis of cDNA clones from human cell line KG-1. *DNA Res.* 2 (1), 37–43 (1995).
- Nakano H, et al. TRAF5, an activator of NF-κB and putative signal transducer for the lymphotoxin-β receptor. *J Biol Chem.* 271, 14661–14664. (1996)
- Niwa H, et al. Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene*. 108, 193–199. (1991)
- Okipari, A. W. et al., The A20 cDNA induced by tumor necrosis factor alpha encodes a novel type of zinc finger protein. *J. Biol. Chem.* 265, 14705–14708, (1990).
- Pahl HL, et al. The immunosuppressive fungal metabolite gliotoxin specifically inhibits transcription factor

- NF-kappaB. *J Exp Med.* 183 (4): 1829–1840. (1996)
- Regnier CH, et al. Identification and characterization of an I $\kappa$ B kinase. *Cell.* 90, 373–383. (1997)
- Remick DG. Applied molecular biology of sepsis. *J Crit Care.* 10 (4): 198–212. (1995)
- Rothe M, et al. TRAF2-mediated activation of NF- $\kappa$ B by TNF receptor 2 and CD40. *Science.* 269, 1424–1427. (1995)
- Rothe M, et al. A novel family of putative signal transducers associated with the cytoplasmic domain of the 75 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* 78, 681–692. (1994)
- Schreck R, et al. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *EMBO J.* 10 (8): 2247–2258 (1991)
- Song HY, et al. The tumor necrosis factor-inducible zinc finger protein A20 interacts with TRAF1/TRAF2 and inhibits NF- $\kappa$ B activation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 93, 6721–6725. (1996)
- Tewari et al. Lymphoid expression and regulation of A20, an inhibitor of programmed cell death: *J. Immunol.* 1995, 154: 1699–1706.
- Ting AT, et al. RIP mediates tumor necrosis factor receptor 1 activation of NF- $\kappa$ B but not Fas/APO-1-initiated apoptosis. *EMBO J.* 15, 6189–6196. (1996)
- Vanden Berghe W, et al. p38 and extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase pathways are required for nuclear factor-kappaB p65 transactivation mediated by tumor necrosis factor. *J Biol Chem* 273 (6): 3285–3290. (1998)
- Wang P, et al. Interleukin (IL)-10 inhibits nuclear factor kappa B (NF kappa B) activation in human monocytes. IL-10 and IL-4 suppress cytokine synthesis by different mechanisms. *J Biol Chem.* 270 (16): 9558–9563. (1995)
- Woronicz JD, et al. I $\kappa$ B kinase-beta: NF- $\kappa$ B activation and complex formation with I $\kappa$ B kinase- $\alpha$  and NIK. *Science.* 278, 866–869. (1997)
- Yeh WC, et al. Early lethality, functional NF-kappaB activation, and increased sensitivity to TNF-induced cell death in TRAF2-deficient mice. *Immunity* 7 (5): 715–725. (1997)
- Zandi E, et al. The I $\kappa$ B kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKK $\alpha$  and IKK $\beta$ , necessary for I $\kappa$ B phosphorylation and NF- $\kappa$ B activation. *Cell.* 91, 243–252. (1997)

## SEQUENZPROTOKOLL

<110> VLAAMS INTERUNIVERSITAIR INSTITUUT VOOR BIOTECHNOL

<120> NEUE INHIBITOREN DER NF-kappaB AKTIVIERUNG

<130> V1-002-V017

<140> PCT/BE99/00055

<141> 1999-05-05

<150> 98201472.2

<151> 1998-05-06

<160> 16

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 2812

<212> DNA

<213> *Mus musculus*

<220>

<221> CDS

<222> (117) .. (2060)

<220>

<221> CDS

<222> (276) .. (2060)

<220>

<221> Intron

<222> (81) .. (252)

<400> 1

cacagggagg catggccgca ctcactgggc acatctttag atcacacctgt gcatttcgg 60

atgagtgacc tgggctgaag cttaggcggcc gtcacggcag gggttgagcc accctc atg 119

Met

1

gaa ggg aga gga ccc tac cgg atc tac gac cca ggg ggc agc acg cct 167

Glu Gly Arg Gly Pro Tyr Arg Ile Tyr Asp Pro Gly Gly Ser Thr Pro

5

10

15

ctg gga gag gtg tcc gca gct ttt gaa cgt cta gtg gag gag aat act 215

Leu Gly Val Ser Ala Ala Phe Glu Arg Leu Val Glu Glu Asn Thr

## DE 699 28 244 T2 2006.08.10

20

25

30

cg <del>g</del>	ct <del>g</del>	aag	gga	aaa	at <del>g</del>	caa	gg <del>g</del>	at <del>a</del>	aag	at <del>g</del>	tta	gg <del>g</del>	ag <del>a</del>	ctt	ct <del>g</del>	263
Arg	Leu	Lys	Gly	Lys	Met	Gln	Gly	Ile	Lys	Met	Leu	Gly	L <del>u</del>	Leu	Leu	
35					40				45							
gag	gag	tct	cag	at <del>g</del>	gaa	gc <del>g</del>	tcc	aga	ctc	cg <del>g</del>	cag	aag	gca	gag	gag	311
Glu	Glu	Ser	Gln	Met	Glu	Ala	Ser	Arg	Leu	Arg	Gln	Lys	Ala	Glu	Glu	
50					55				60			65				
ct <del>g</del>	gt <del>c</del>	aag	gac	agc	gag	ct <del>g</del>	tca	cca	cc <del>g</del>	aca	tct	gcc	ccc	tcc	tt <del>g</del>	359
Leu	Val	Lys	Asp	Ser	Glu	Leu	Ser	Pro	Pro	Thr	Ser	Ala	Pro	Ser	Leu	
70					75				80							
gt <del>c</del>	tcc	ttt	gat	gac	ct <del>g</del>	gct	gag	ctc	aca	gga	cag	gat	aca	aag	gt <del>c</del>	407
Val	Ser	Phe	Asp	Asp	Leu	Ala	Glu	Leu	Thr	Gly	Gln	Asp	Thr	Lys	Val	
85					90				95							
cag	gta	cat	cct	gct	gt <del>c</del>	acc	agc	act	gcc	gc <del>g</del>	acc	acc	acc	gcc	acc	455
Gln	Val	His	Pro	Ala	Thr	Ser	Thr	Ala	Ala	Thr	Thr	Thr	Ala	Thr	Ala	
100					105				110							
acc	acg	gga	aac	tcc	at <del>g</del>	gag	aag	ccc	gag	cca	gcc	tcc	aaa	tct	cc <del>g</del>	503
Thr	Thr	Gly	Asn	Ser	Met	Glu	Lys	Pro	Glu	Pro	Ala	Ser	Lys	Ser	Pro	
115					120				125							
tcc	aat	ggc	gcc	tcc	tc <del>g</del>	gac	ttt	gaa	gt <del>g</del>	gt <del>c</del>	cct	act	gag	gag	cag	551
Ser	Asn	Gly	Ala	Ser	Ser	Asp	Phe	Glu	Val	Val	Pro	Thr	Glu	Gln		
130					135				140			145				
aat	tca	ccc	gaa	act	ggc	agc	cac	cct	ac <del>g</del>	aa <del>c</del>	at <del>g</del>	at <del>g</del>	gac	ct <del>g</del>	gg <del>g</del>	599
Asn	Ser	Pro	Glu	Thr	Gly	Ser	His	Pro	Thr	Asn	Met	Met	Asp	Leu	Gly	
150					155				160							
ccc	cca	ccc	cca	gag	gac	agc	aa <del>c</del>	ct <del>g</del>	aag	ctc	cac	ctg	cag	cg <del>c</del>	ct <del>g</del>	647
Pro	Pro	Pro	Pro	Glu	Asp	Ser	Asn	Leu	Lys	Leu	His	Leu	Gln	Arg	Leu	
165					170				175							
gag	acc	acc	ctt	agc	gt <del>g</del>	tgt	gca	gag	gag	cca	gac	cac	agc	cag	ctc	695
Glu	Thr	Thr	Leu	Ser	Val	Cys	Ala	Glu	Glu	Pro	Asp	His	Ser	Gln	Leu	
180					185				190							
ttc	acc	cac	ctg	ggc	cg <del>c</del>	at <del>g</del>	gc <del>g</del>	tc <del>g</del>	gag	ttc	aa <del>c</del>	agg	tt <del>g</del>	gc <del>g</del>	tcc	743
Phe	Thr	His	Leu	Gly	Arg	Met	Ala	Leu	Glu	Phe	Asn	Arg	Leu	Ala	Ser	
195					200				205							
aaa	gt <del>g</del>	cat	aaa	aat	gag	cag	cg <del>c</del>	acc	tcc	atc	ctg	cag	acc	tta	tgt	791
Lys	Val	His	Lys	Asn	Glu	Gln	Arg	Thr	Ser	Ile	Leu	Gln	Thr	Leu	Cys	

## DE 699 28 244 T2 2006.08.10

210	215	220	225
gag cag ctg cgc cag gag aat gaa gcc ctg aag gcc aag ctg gac aag			839
Glu Gln Leu Arg Gln Glu Asn Glu Ala Leu Lys Ala Lys Leu Asp Lys			
230	235	240	
ggc ctg gaa cag cgg gat ctg gct gag agg ctg cgg gag gaa aac			887
Gly Leu Glu Gln Arg Asp Leu Ala Ala Glu Arg Leu Arg Glu Glu Asn			
245	250	255	
acg gag ctc aag aaa ctg ttg atg aac agc agc tgc aaa gag gga ctc			935
Thr Glu Leu Lys Lys Leu Leu Met Asn Ser Ser Cys Lys Glu Gly Leu			
260	265	270	
tgt ggg cag ccc agc tcc cca aag cca gag ggt gct ggc aag aag ggc			983
Cys Gly Gln Pro Ser Ser Pro Lys Pro Glu Gly Ala Gly Lys Lys Gly			
275	280	285	
gtg gct gga cag cag cag gcc agt gtg atg gcg agt aaa gtc cct gaa			1031
Val Ala Gly Gln Gln Ala Ser Val Met Ala Ser Lys Val Pro Glu			
290	295	300	305
gcg ggg gcc ttt gga gca gct gag aag aaa gtg aag ttg cta gaa cag			1079
Ala Gly Ala Phe Gly Ala Ala Glu Lys Lys Val Lys Leu Leu Glu Gln			
310	315	320	
caa cgc atg gag ctg ctg gaa gtg aac aag cag tgg gac cag cat ttc			1127
Gln Arg Met Glu Leu Leu Glu Val Asn Lys Gln Trp Asp Gln His Phe			
325	330	335	
cgg tcc atg aag cag cag tat gag cag aag atc aca gag ctt cgc cag			1175
Arg Ser Met Lys Gln Gln Tyr Glu Gln Lys Ile Thr Glu Leu Arg Gln			
340	345	350	
aag ctg gtg gac ctg cag aaa cag gta act gag ctg gag gcc gaa cgg			1223
Lys Leu Val Asp Leu Gln Lys Gln Val Thr Glu Leu Glu Ala Glu Arg			
355	360	365	
gag cag aag cag cgt gac ttt gac cgg aaa ctc ctc ctg gcc aaa tcg			1271
Glu Gln Lys Gln Arg Asp Phe Asp Arg Lys Leu Leu Ala Lys Ser			
370	375	380	385
aag ata gag atg gaa gag acc gac aag gag cag ctg aca gca gag gcc			1319
Lys Ile Glu Met Glu Glu Thr Asp Lys Glu Gln Leu Thr Ala Glu Ala			
390	395	400	
aag gaa ctg cgc cag aag gtc agg tac cta cag gat cag ctg agc ccg			1367
Lys Glu Leu Arg Gln Lys Val Arg Tyr Leu Gln Asp Gln Leu Ser Pro			

## DE 699 28 244 T2 2006.08.10

405

410

415

ctc aca agg caa cga gaa tac cag gag aag gag atc cag cgg ctc aat 1415  
 Leu Thr Arg Gln Arg Glu Tyr Gln Glu Lys Glu Ile Gln Arg Leu Asn  
 420 425 430

aag gcc ctg gag gag gcc ctc agc atc cag gcc tct cca tca tct ccg 1463  
 Lys Ala Leu Glu Glu Ala Leu Ser Ile Gln Ala Ser Pro Ser Ser Pro  
 435 440 445

cct gc~~a~~ gct ttt ggg agt cca gaa ggc gtt ggg ggc cat ctg agg aag 1511  
 Pro Ala Ala Phe Gly Ser Pro Glu Gly Val Gly His Leu Arg Lys  
 450 455 460 465

cag gaa cta gtg aca cag aat gag ttg ctg aaa cag cag gta aag atc 1559  
 Gln Glu Leu Val Thr Gln Asn Glu Leu Leu Lys Gln Gln Val Lys Ile  
 470 475 480

ttt gaa gag gac ttc cag agg gaa cgg agt gac cgt gaa cgc atg aat 1607  
 Phe Glu Glu Asp Phe Gln Arg Glu Arg Ser Asp Arg Glu Arg Met Asn  
 485 490 495

gaa gag aag gag gag ctg aag aag caa gta gag aag ctg cag gcc cag 1655  
 Glu Glu Lys Glu Glu Leu Lys Lys Gin Val Glu Lys Leu Gln Ala Gln  
 500 505 510

gtc acc ctg act aat gcc cag ctc aaa act ctc aaa gag gag gag aag 1703  
 Val Thr Leu Thr Asn Ala Gln Leu Lys Thr Leu Lys Glu Glu Glu Lys  
 515 520 525

gcc aag gaa gcc ctc aaa cag cag aag agg aaa gca aag gct tcg gga 1751  
 Ala Lys Glu Ala Leu Lys Gln Gln Lys Arg Lys Ala Lys Ala Ser Gly  
 530 535 540 545

gag cgc tac cac atg gaa ccc cac cct gag cac gtc tgc ggc gcc tat 1799  
 Glu Arg Tyr His Met Glu Pro His Pro Glu His Val Cys Gly Ala Tyr  
 550 555 560

ccc tat gcc tac cca ccc atg cca gcc atg gta cct cac cat gcc tac 1847  
 Pro Tyr Ala Tyr Pro Pro Met Pro Ala Met Val Pro His His Ala Tyr  
 565 570 575

aag gac tgg tcc cag atc cga tac cct cca ccc cct gtg ccc atg gag 1895  
 Lys Asp Trp Ser Gln Ile Arg Tyr Pro Pro Pro Pro Val Pro Met Glu  
 580 585 590

cac ccg ccc cca cac ccc aac tct cgc ctc ttc cat ctg ccg gag tac 1943  
 His Pro Pro Pro His Pro Asn Ser Arg Leu Phe His Leu Pro Glu Tyr

## DE 699 28 244 T2 2006.08.10

595

600

605

acc tgg cgt cca ccc tgt gca ggg att cgg aat cag agc tct caa gtg 1991  
 Thr Trp Arg Pro Pro Cys Ala Gly Ile Arg Asn Gln Ser Ser Gln Val  
 610 615 620 625

atg gac ccg ccc cca gac agg cct gca gag cca gag tct gca gac aat 2039  
 Met Asp Pro Pro Pro Asp Arg Pro Ala Glu Pro Glu Ser Ala Asp Asn  
 630 635 640

gac tgt gat ggg ccc cag tga ggctgcagtg ggtcatttgg ttccacacctc 2090  
 Asp Cys Asp Gly Pro Gln  
 645

atcttcaga gccagctgac ctcagattgc caaaagtttg aaggccatgt gcatgttctg 2150

tgtgacccaa gccttggcag aggagaggct gggatggta gctggctcac atccccagcc 2210

aagcctcgaa ctgttgacaa gaccaggag aatccaccca tgggcgccc ccaggttctt 2270

atggatgcaa gcaggagaag ctcaaacaccc tgccctttgc caagacaagg aagcctcacc 2330

tggctttgac ctgccatccg ttgctgaggc cactggcttc catcctaaga atgaggtgca 2390

acaagacccc attctcacag aacctcaaag acttggttcc aggctctcca gagaccatac 2450

ccaactcatg tgcattgtgcc gtttttgctt caagctcagt agcaggacct gccccgagcc 2510

ccctgctctt tgccccctctg tgaggagttt cggagagggc tttgtctcta gagcagaaga 2570

gaatgatggg acggcctgtat gctgtcatgc tctccactgc acctgtggca gcctcctgag 2630

agccaccaag atctgggatg aaggccacac cagccatgtc tgctgaaggg ccccaactg 2690

agatgactcc ggcctccaca gtttagatgtt tatggtgcca gaggtctata ttaaggtagc 2750

tgtctgttgc taggcagccg tttgcacaaa tcttggacat aaatccaact tgaagatcaa 2810

aa

2812

<210> 2

<211> 628

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

Val Ser Ala Ala Phe Glu Arg Leu Val Glu Glu Asn Thr Arg Leu Lys

1

5

10

15

Gly Lys Met Gln Gly Ile Lys Met Leu Gly Glu Leu Leu Glu Glu Ser  
 20 25 30

Gln Met Glu Ala Ser Arg Leu Arg Gln Lys Ala Glu Glu Leu Val Lys  
 35 40 45

Asp Ser Glu Leu Ser Pro Pro Thr Ser Ala Pro Ser Leu Val Ser Phe  
 50 55 60

Asp Asp Leu Ala Glu Leu Thr Gly Gln Asp Thr Lys Val Gln Val His  
 65 70 75 80

Pro Ala Thr Ser Thr Ala Ala Thr Thr Ala Thr Ala Thr Thr Gly  
 85 90 95

Asn Ser Met Glu Lys Pro Glu Pro Ala Ser Lys Ser Pro Ser Asn Gly  
 100 105 110

Ala Ser Ser Asp Phe Glu Val Val Pro Thr Glu Glu Gln Asn Ser Pro  
 115 120 125

Glu Thr Gly Ser His Pro Thr Asn Met Met Asp Leu Gly Pro Pro Pro  
 130 135 140

Pro Glu Asp Ser Asn Leu Lys Leu His Leu Gln Arg Leu Glu Thr Thr  
 145 150 155 160

Leu Ser Val Cys Ala Glu Glu Pro Asp His Ser Gln Leu Phe Thr His  
 165 170 175

Leu Gly Arg Met Ala Leu Glu Phe Asn Arg Leu Ala Ser Lys Val His  
 180 185 190

Lys Asn Glu Gln Arg Thr Ser Ile Leu Gln Thr Leu Cys Glu Gln Leu  
 195 200 205

Arg Gln Glu Asn Glu Ala Leu Lys Ala Lys Leu Asp Lys Gly Leu Glu  
 210 215 220

Gln Arg Asp Leu Ala Ala Glu Arg Leu Arg Glu Glu Asn Thr Glu Leu  
 225 230 235 240

Lys Lys Leu Leu Met Asn Ser Ser Cys Lys Glu Gly Leu Cys Gly Gln  
 245 250 255

Pro Ser Ser Pro Lys Pro Glu Gly Ala Gly Lys Gly Val Ala Gly

260

265

270

Gln Gln Gln Ala Ser Val Met Ala Ser Lys Val Pro Glu Ala Gly Ala  
 275                    280                    285

Phe Gly Ala Ala Glu Lys Lys Val Lys Leu Leu Glu Gln Gln Arg Met  
 290                    295                    300

Glu Leu Leu Glu Val Asn Lys Gln Trp Asp Gln His Phe Arg Ser Met  
 305                    310                    315                    320

Lys Gln Gln Tyr Glu Gln Lys Ile Thr Glu Leu Arg Gln Lys Leu Val  
 325                    330                    335

Asp Leu Gln Lys Gln Val Thr Glu Leu Glu Ala Glu Arg Glu Gln Lys  
 340                    345                    350

Gln Arg Asp Phe Asp Arg Lys Leu Leu Leu Ala Lys Ser Lys Ile Glu  
 355                    360                    365

Met Glu Glu Thr Asp Lys Glu Gln Leu Thr Ala Glu Ala Lys Glu Leu  
 370                    375                    380

Arg Gln Lys Val Arg Tyr Leu Gln Asp Gln Leu Ser Pro Leu Thr Arg  
 385                    390                    395                    400

Gln Arg Glu Tyr Gln Glu Lys Glu Ile Gln Arg Leu Asn Lys Ala Leu  
 405                    410                    415

Glu Glu Ala Leu Ser Ile Gln Ala Ser Pro Ser Ser Pro Pro Ala Ala  
 420                    425                    430

Phe Gly Ser Pro Glu Gly Val Gly Gly His Leu Arg Lys Gln Glu Leu  
 435                    440                    445

Val Thr Gln Asn Glu Leu Leu Lys Gln Gln Val Lys Ile Phe Glu Glu  
 450                    455                    460

Asp Phe Gln Arg Glu Arg Ser Asp Arg Glu Arg Met Asn Glu Glu Lys  
 465                    470                    475                    480

Glu Glu Leu Lys Lys Gln Val Glu Lys Leu Gln Ala Gln Val Thr Leu  
 485                    490                    495

Thr Asn Ala Gln Leu Lys Thr Leu Lys Glu Glu Glu Lys Ala Lys Glu  
 500                    505                    510

Ala Leu Lys Gln Gln Lys Arg Lys Ala Lys Ala Ser Gly Glu Arg Tyr

515

520

525

His Met Glu Pro His Pro Glu His Val Cys Gly Ala Tyr Pro Tyr Ala  
 530 535 540

Tyr Pro Pro Met Pro Ala Met Val Pro His His Ala Tyr Lys Asp Trp  
 545 550 555 560

Ser Gln Ile Arg Tyr Pro Pro Pro Val Pro Met Glu His Pro Pro  
 565 570 575

Pro His Pro Asn Ser Arg Leu Phe His Leu Pro Glu Tyr Thr Trp Arg  
 580 585 590

Pro Pro Cys Ala Gly Ile Arg Asn Gln Ser Ser Gln Val Met Asp Pro  
 595 600 605

Pro Pro Asp Arg Pro Ala Glu Pro Glu Ser Ala Asp Asn Asp Cys Asp  
 610 615 620

Gly Pro Gln  
 625

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 575

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 3

Pro Pro Thr Ser Ala Pro Ser Leu Val Ser Phe Asp Asp Leu Ala Glu  
 1 5 10 15

Leu Thr Gly Gln Asp Thr Lys Val Gln Val His Pro Ala Thr Ser Thr  
 20 25 30

Ala Ala Thr Thr Ala Thr Ala Thr Thr Gly Asn Ser Met Glu Lys  
 35 40 45

Pro Glu Pro Ala Ser Lys Ser Pro Ser Asn Gly Ala Ser Ser Asp Phe  
 50 55 60

Glu Val Val Pro Thr Glu Glu Gln Asn Ser Pro Glu Thr Gly Ser His  
 65 70 75 80

Pro Thr Asn Met Met Asp Leu Gly Pro Pro Pro Glu Asp Ser Asn

85

90

95

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

340

345

350

Glu Lys Glu Ile Gln Arg Leu Asn Lys Ala Leu Glu Glu Ala Leu Ser  
 355                   360                   365

Ile Gln Ala Ser Pro Ser Ser Pro Pro Ala Ala Phe Gly Ser Pro Glu  
 370                   375                   380

Gly Val Gly Gly His Leu Arg Lys Gln Glu Leu Val Thr Gln Asn Glu  
 385                   390                   395                   400

Leu Leu Lys Gln Gln Val Lys Ile Phe Glu Glu Asp Phe Gln Arg Glu  
 405                   410                   415

Arg Ser Asp Arg Glu Arg Met Asn Glu Glu Lys Glu Glu Leu Lys Lys  
 420                   425                   430

Gln Val Glu Lys Leu Gln Ala Gln Val Thr Leu Thr Asn Ala Gln Leu  
 435                   440                   445

Lys Thr Leu Lys Glu Glu Lys Ala Lys Glu Ala Leu Lys Gln Gln  
 450                   455                   460

Lys Arg Lys Ala Lys Ala Ser Gly Glu Arg Tyr His Met Glu Pro His  
 465                   470                   475                   480

Pro Glu His Val Cys Gly Ala Tyr Pro Tyr Ala Tyr Pro Pro Met Pro  
 485                   490                   495

Ala Met Val Pro His His Ala Tyr Lys Asp Trp Ser Gln Ile Arg Tyr  
 500                   505                   510

Pro Pro Pro Pro Val Pro Met Glu His Pro Pro Pro His Pro Asn Ser  
 515                   520                   525

Arg Leu Phe His Leu Pro Glu Tyr Thr Trp Arg Pro Pro Cys Ala Gly  
 530                   535                   540

Ile Arg Asn Gln Ser Ser Gln Val Met Asp Pro Pro Pro Asp Arg Pro  
 545                   550                   555                   560

Ala Glu Pro Glu Ser Ala Asp Asn Asp Cys Asp Gly Pro Gln  
 565                   570                   575

&lt;210&gt; 4

<211> 1967  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (83)..(1375)

<400> 4

aaactttccg ggaaggctgg tttcgctcc ccctgtgtgg agaagttgga gacgcctaag 60  
 tccccacgga aggcctacag cc atg tcg tct ggg gac cca agg tct ggt aga 112  
 Met Ser Ser Gly Asp Pro Arg Ser Gly Arg  
 1 5 10  
 cag gac ggg gcc ccg cgt gcg gcc gca gcg ctc tgt ggc ctg tac cac 160  
 Gln Asp Gly Ala Pro Arg Ala Ala Ala Leu Cys Gly Leu Tyr His  
 15 20 25  
 gag gcc ggc cag caa cta cag cgc ctg aag gat cag ctg gcc gcg cgt 208  
 Glu Ala Gly Gln Gln Leu Gln Arg Leu Lys Asp Gln Leu Ala Ala Arg  
 30 35 40  
 gac gcc ctc atc gcg agc ctc cgc acc cgc ctc gcg gct ctg gaa ggg 256  
 Asp Ala Leu Ile Ala Ser Leu Arg Thr Arg Leu Ala Ala Leu Glu Gly  
 45 50 55  
 cac acg gcg ccg tca ctc gtg gac gca ctt ctg gat cag gtg gag cgc 304  
 His Thr Ala Pro Ser Leu Val Asp Ala Leu Leu Asp Gln Val Glu Arg  
 60 65 70  
 ttc cgt gag cag ctg cga cga cag gag gaa ggc gct tcg gag acc cag 352  
 Phe Arg Glu Gln Leu Arg Arg Gln Glu Glu Gly Ala Ser Glu Thr Gln  
 75 80 85 90  
 ctg cgg cag gaa gtt gaa aga ctt acg gag cgt cta gag gaa aaa gag 400  
 Leu Arg Gln Glu Val Glu Arg Leu Thr Glu Arg Leu Glu Glu Lys Glu  
 95 100 105  
 agg gag atg caa cag ctg atg agc cag cct cag cat gag caa gag aag 448  
 Arg Glu Met Gln Gln Leu Met Ser Gln Pro Gln His Glu Gln Glu Lys  
 110 115 120  
 gag gta gtc ttg ctt cgg cga agt gtg gca gag aag gag aaa gcc agg 496  
 Glu Val Val Leu Leu Arg Arg Ser Val Ala Glu Lys Glu Lys Ala Arg  
 125 130 135  
 gcc gcc agt gat gtt ctg tgc cgc tcc ttg gct gat gag acc cac caa 544

## DE 699 28 244 T2 2006.08.10

Ala Ala Ser Asp Val Leu Cys Arg Ser Leu Ala Asp Glu Thr His Gln  
 140 145 150

ctg cgc agg aca ttg gca gcc act gcc cac atg tgc caa cat ctg gcc 592  
 Leu Arg Arg Thr Leu Ala Ala Thr Ala His Met Cys Gln His Leu Ala  
 155 160 165 170

aaa tgt ctg gat gaa cga cag tgt gca cag gga gac gct ggg gag aaa 640  
 Lys Cys Leu Asp Glu Arg Gln Cys Ala Gln Gly Asp Ala Gly Glu Lys  
 175 180 185

agc cct gct gag cta gag caa aca agc agc gat gct tct ggc cag agt 688  
 Ser Pro Ala Glu Leu Glu Gln Thr Ser Ser Asp Ala Ser Gly Gln Ser  
 190 195 200

gtt att aag aag tta cag gaa gaa aat cga ctg tta aaa cag aag gtg 736  
 Val Ile Lys Lys Leu Gln Glu Asn Arg Leu Leu Lys Gln Lys Val  
 205 210 215

act cat gta gaa gac ctc aat gct aag tgg cag cgt tat gat gca agt 784  
 Thr His Val Glu Asp Leu Asn Ala Lys Trp Gln Arg Tyr Asp Ala Ser  
 220 225 230

agg gac gaa tat gtg aag ggg ttg cat gcc cag cta aag agg cgg cag 832  
 Arg Asp Glu Tyr Val Lys Gly Leu His Ala Gln Leu Lys Arg Arg Gln  
 235 240 245 250

gtc cct ctg gag cct gag ctg atg aag aag gag att tcc cga ctt aac 880  
 Val Pro Leu Glu Pro Glu Leu Met Lys Lys Glu Ile Ser Arg Leu Asn  
 255 260 265

aga cag ttg gag gag aaa ata agt gac tgt gcg gaa gca aac cag gag 928  
 Arg Gln Leu Glu Glu Lys Ile Ser Asp Cys Ala Glu Ala Asn Gln Glu  
 270 275 280

ctg aca gcc atg agg atg tcc cgg gac act gcg ctg gag cga gtg cag 976  
 Leu Thr Ala Met Arg Met Ser Arg Asp Thr Ala Leu Glu Arg Val Gln  
 285 290 295

atg cta gaa cag cag att ctt gct tac aag gat gac ttc aaa tca gaa 1024  
 Met Leu Glu Gln Gln Ile Leu Ala Tyr Lys Asp Asp Phe Lys Ser Glu  
 300 305 310

agg gca gat cgg gaa cga gcg cac agt agg att caa gag ctg gag gaa 1072  
 Arg Ala Asp Arg Glu Arg Ala His Ser Arg Ile Gln Glu Leu Glu Glu  
 315 320 325 330

aag atc atg tcc ttg atg tac caa gtg tcc cag aga cag gac tcc cgg 1120

## DE 699 28 244 T2 2006.08.10

Lys Ile Met Ser Leu Met Tyr Gln Val Ser Gln Arg Gln Asp Ser Arg  
 335 340 345

gag cca gga ccc tgt cggtt att cat acg ggg aac aaa act gcc aag tac 1168  
 Glu Pro Gly Pro Cys Arg Ile His Thr Gly Asn Lys Thr Ala Lys Tyr  
 350 355 360

tta gag atg gat gca ctg gag cat gtg acc cct ggc ggc tgg agg cct 1216  
 Leu Glu Met Asp Ala Leu Glu His Val Thr Pro Gly Gly Trp Arg Pro  
 365 370 375

gag tct agg tcc caa cag atg gaa cct tct gca gag ggt ggg cat gtg 1264  
 Glu Ser Arg Ser Gln Gln Met Glu Pro Ser Ala Glu Gly Gly His Val  
 380 385 390

tgc aca gcc cag aga ggt cag ggt gac ctt cag tgc cct cat tgc ctg 1312  
 Cys Thr Ala Gln Arg Gly Gln Gly Asp Leu Gln Cys Pro His Cys Leu  
 395 400 405 410

cgg tgc ttc agt gat gag caa ggc gag gca ttc ctc agg cac ctg tct 1360  
 Arg Cys Phe Ser Asp Glu Gln Gly Glu Ala Phe Leu Arg His Leu Ser  
 415 420 425

gag tgc tgc caa tga gccagacatt gcccgtgtga cccatgacca ccatacgctgc 1415  
 Glu Cys Cys Gln  
 430

tctaaggac tgggaggggt cctcagactc agtttcaac tcagtgtgtt gcattctcct 1475

gggatctagg gccccaaatgg gcagggtcac tggaaaggta tcttgtttc atttgaccat 1535

ggtagactt ggtcagaggg aactattgac agagcaggag gaagaggggtg gggtcaggga 1595

catcaagtgg acatcagttt tgtctcacgt agagtttggta gtgagctgtc aattcaaagc 1655

tgcaagctat cagttgtggg aatattctga agcctgcttg cacctagagt tatgccactt 1715

gctggaaaggga aagttgctg tgggagcagt gtgtcctctt tcttagggtgg tagctccatc 1775

ctgtttagta gtgagataca ctccctgact ggtctgtgct gcattacagt tacatgatac 1835

actagaacct tcccaaactc agcagagcca cacagctgca tccagtacca tcaccctgca 1895

aaacacttgt atttccaaaa gggaaagcac ctttatttcc taatcattta ttttataat 1955

aatggcttt ac 1967

<210> 5  
 <211> 411  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

&lt;400&gt; 5

## DE 699 28 244 T2 2006.08.10

Leu Cys Gly Leu Tyr His Glu Ala Gly Gln Gln Leu Gln Arg Leu Lys  
1 5 10 15

Asp Gln Leu Ala Ala Arg Asp Ala Leu Ile Ala Ser Leu Arg Thr Arg  
20 25 30

Leu Ala Ala Leu Glu Gly His Thr Ala Pro Ser Leu Val Asp Ala Leu  
35 40 45

Leu Asp Gln Val Glu Arg Phe Arg Glu Gln Leu Arg Arg Gln Glu Glu  
50 55 60

Gly Ala Ser Glu Thr Gln Leu Arg Gln Glu Val Glu Arg Leu Thr Glu  
65 70 75 80

Arg Leu Glu Glu Lys Glu Arg Glu Met Gln Gln Leu Met Ser Gln Pro  
85 90 95

Gln His Glu Gln Glu Lys Glu Val Val Leu Leu Arg Arg Ser Val Ala  
100 105 110

Glu Lys Glu Lys Ala Arg Ala Ala Ser Asp Val Leu Cys Arg Ser Leu  
115 120 125

Ala Asp Glu Thr His Gln Leu Arg Arg Thr Leu Ala Ala Thr Ala His  
130 135 140

Met Cys Gln His Leu Ala Lys Cys Leu Asp Glu Arg Gln Cys Ala Gln  
145 150 155 160

Gly Asp Ala Gly Glu Lys Ser Pro Ala Glu Leu Glu Gln Thr Ser Ser  
165 170 175

Asp Ala Ser Gly Gln Ser Val Ile Lys Lys Leu Gln Glu Glu Asn Arg  
180 185 190

Leu Leu Lys Gln Lys Val Thr His Val Glu Asp Leu Asn Ala Lys Trp  
195 200 205

Gln Arg Tyr Asp Ala Ser Arg Asp Glu Tyr Val Lys Gly Leu His Ala  
210 215 220

DE 699 28 244 T2 2006.08.10

Gln Leu Lys Arg Arg Gln Val Pro Leu Glu Pro Glu Leu Met Lys Lys  
225 230 235 240

Glu Ile Ser Arg Leu Asn Arg Gln Leu Glu Glu Lys Ile Ser Asp Cys  
245 250 255

Ala Glu Ala Asn Gln Glu Leu Thr Ala Met Arg Met Ser Arg Asp Thr  
260 265 270

Ala Leu Glu Arg Val Gln Met Leu Glu Gln Gln Ile Leu Ala Tyr Lys  
275 280 285

Asp Asp Phe Lys Ser Glu Arg Ala Asp Arg Glu Arg Ala His Ser Arg  
290 295 300

Ile Gln Glu Leu Glu Glu Lys Ile Met Ser Leu Met Tyr Gln Val Ser  
305 310 315 320

Gln Arg Gln Asp Ser Arg Glu Pro Gly Pro Cys Arg Ile His Thr Gly  
325 330 335

Asn Lys Thr Ala Lys Tyr Leu Glu Met Asp Ala Leu Glu His Val Thr  
340 345 350

Pro Gly Gly Trp Arg Pro Glu Ser Arg Ser Gln Gln Met Glu Pro Ser  
355 360 365

Ala Glu Gly Gly His Val Cys Thr Ala Gln Arg Gly Gln Gly Asp Leu  
370 375 380

Gln Cys Pro His Cys Leu Arg Cys Phe Ser Asp Glu Gln Gly Glu Ala  
385 390 395 400

Phe Leu Arg His Leu Ser Glu Cys Cys Gln  
405 410

<210> 6

<211> 19

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Konsensus-Aminosäuresequenz 1

<400> 6

Glu Xaa Xaa Xaa Lys Glu Ile Xaa Arg Leu Asn Xaa Xaa Leu Glu Glu  
 1                5                10                15

Xaa Xaa Ser

<210> 7

<211> 21

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Konsensus-Aminosäuresequenz 2

<400> 7

Leu Xaa Gln Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asp Phe Xaa Xaa Glu Arg  
 1                5                10                15

Xaa Asp Arg Glu Arg

20

<210> 8

<211> 228

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 8

Arg Gln Arg Glu Tyr Gln Glu Lys Glu Ile Gln Arg Leu Asn Lys Ala  
 1                5                10                15

Leu Glu Glu Ala Leu Ser Ile Gln Ala Ser Pro Ser Ser Pro Pro Ala  
 20                25                30

Ala Phe Gly Ser Pro Glu Gly Val Gly Gly His Leu Arg Lys Gln Glu  
 35                40                45

Leu Val Thr Gln Asn Glu Leu Leu Lys Gln Gln Val Lys Ile Phe Glu  
 50                55                60

Glu Asp Phe Gln Arg Glu Arg Ser Asp Arg Glu Arg Met Asn Glu Glu  
 65                70                75                80

Lys Glu Glu Leu Lys Lys Gln Val Glu Lys Leu Gln Ala Gln Val Thr  
 85                90                95

Leu Thr Asn Ala Gln Leu Lys Thr Leu Lys Glu Glu Glu Lys Ala Lys  
 100 105 110  
  
 Glu Ala Leu Lys Gln Gln Lys Arg Lys Ala Lys Ala Ser Gly Glu Arg  
 115 120 125  
  
 Tyr His Met Glu Pro His Pro Glu His Val Cys Gly Ala Tyr Pro Tyr  
 130 135 140  
  
 Ala Tyr Pro Pro Met Pro Ala Met Val Pro His His Ala Tyr Lys Asp  
 145 150 155 160  
  
 Trp Ser Gln Ile Arg Tyr Pro Pro Pro Pro Val Pro Met Glu His Pro  
 165 170 175  
  
 Pro Pro His Pro Asn Ser Arg Leu Phe His Leu Pro Glu Tyr Thr Trp  
 180 185 190  
  
 Arg Pro Pro Cys Ala Gly Ile Arg Asn Gln Ser Ser Gln Val Met Asp  
 195 200 205  
  
 Pro Pro Pro Asp Arg Pro Ala Glu Pro Glu Ser Ala Asp Asn Asp Cys  
 210 215 220  
  
 Asp Gly Pro Gln  
 225

<210> 9  
 <211> 50  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Mutationsprimer  
  
 <400> 9

gaataccagg aggcgagat ccagcggctc aataaagctt tggaggaggc 50

<210> 10  
 <211> 35  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Mutationsprimer

&lt;400&gt; 10

gttgctgaaa gaggacgtca aaatcttga agagg

35

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 39

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Beschreibung der künstlichen Sequenz: Mutationsprimer

&lt;400&gt; 11

gcaggtaaaa atctttgaag agaatgccca gagggAACG

39

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 62

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Beschreibung der künstlichen Sequenz: Mutationsprimer

&lt;400&gt; 12

gcaggtaaaa atctttgaag aggacttcca gagggAACG agtcatgcgc aacgcattcc 60

cg

62

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 19

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Beschreibung der künstlichen Sequenz: ABIN-MUT1-Mutante

&lt;400&gt; 13

Glu	Tyr	Gln	Glu
1		5	
Ala		Gln	Ile
			Gln
			Arg
			Leu
			Asn
			Lys
			Ala
			Leu
			Glu
			15

Ala Leu Ser

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: ABIN-MUT2-Mutante

<400> 14

Leu Lys Glu Glu Val Lys Ile Phe Glu Glu Asp Phe Gln Arg Glu Arg  
1 5 10 15  
  
Ser Asp Arg Glu Arg  
20

<210> 15

<211> 21

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: ABIN-MUT3-Mutante

<400> 15

Leu Lys Gln Gln Val Lys Ile Phe Glu Glu Asn Ala Gln Arg Glu Arg  
1 5 10 15  
  
Ser Asp Arg Glu Arg  
20

<210> 16

<211> 21

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: ABIN-MUT4-Mutante

<400> 16

Leu Lys Gln Gln Val Lys Ile Phe Glu Glu Asp Phe Gln Arg Glu Arg  
1 5 10 15  
  
Ser Asp Ala Gln Arg  
20

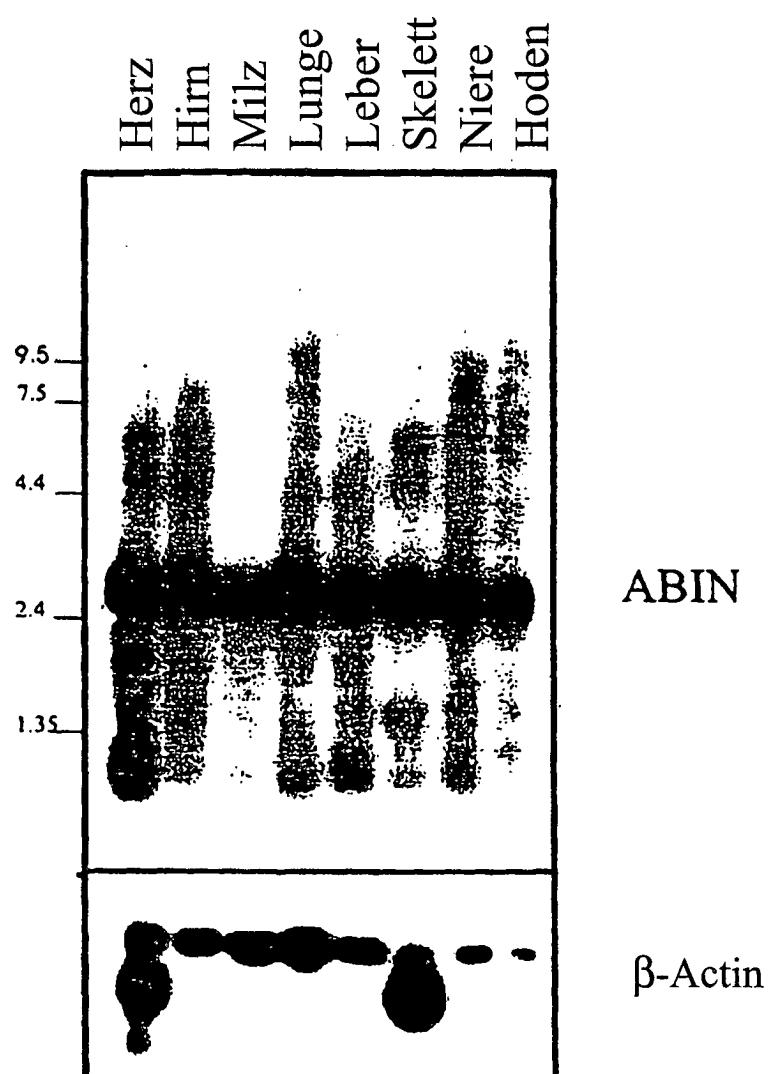
### Patentansprüche

1. Ein isoliertes Protein umfassend eine Aminosäure-Sequenz mit 70–100% Homologie zur Aminosäure-Sequenz in SEQ ID NO: 2, das zur Interaktion mit dem Protein A20 in der Lage ist und/oder die NF-κB-Aktivierung moduliert und/oder inhibiert und das nicht der Nef-assoziierte Faktor 1 ist.
2. Ein isoliertes Protein umfassend eine Aminosäure-Sequenz mit 70–100% Homologie zu den Aminosäuren 54–647 von SEQ ID NO: 2, wie sie dargestellt ist in SEQ ID NO: 3, das zur Interaktion mit dem Protein A20 in der Lage ist und/oder die NF-κB-Aktivierung moduliert und/oder inhibiert.
3. Ein isoliertes Protein umfassend eine Aminosäure-Sequenz mit 70–100% Homologie zu den Aminosäuren 420–647 von SEQ ID NO: 2, wie sie dargestellt ist in SEQ ID NO: 8, das zur Interaktion mit dem Protein A20 in der Lage ist und/oder die NF-κB-Aktivierung moduliert und/oder inhibiert.

4. Ein isoliertes Protein umfassend eine Aminosäure-Sequenz mit 70–100% Homologie zur Aminosäure-Sequenz in SEQ ID NO: 5, das zur Interaktion mit dem Protein A20 in der Lage ist und/oder die NF-κB-Aktivierung moduliert und/oder inhibiert.
5. Ein isoliertes Protein nach einem der Ansprüche 1 bis 4 umfassend die Konsensus-Aminosäure-Sequenz aus SEQ ID NO: 6 und/oder SEQ ID NO: 7.
6. Eine Nukleinsäure, die das Protein nach einem der Ansprüche 1 bis 5 kodiert.
7. Die Nukleinsäure nach Anspruch 6 mit etwa 70–100% Homologie zu der DNA-Sequenz in SEQ ID NO: 1.
8. Die Nukleinsäure nach Anspruch 6 mit etwa 70–100% Homologie zu der DNA-Sequenz in SEQ ID NO: 4.
9. Ein isoliertes Protein und/oder ein Fragment von diesem, das zur Interaktion mit dem Protein A20 in der Lage ist und/oder die NF-κB-Aktivierung moduliert und/oder inhibiert nach einem der Ansprüche 1 bis 5 zur Verwendung als Medikament.
10. Verwendung eines isolierten Proteins und/oder eines Fragments von diesem, das zur Interaktion mit dem Protein A20 in der Lage ist und/oder die NF-κB-Aktivierung moduliert und/oder inhibiert nach einem der Ansprüche 1 bis 5 für die Herstellung eines Medikaments zur Behandlung einer Atemwegserkrankung, einer Allotransplantatabstoßung, einer chronischen Entzündungserkrankung, eines septischen Schocks, der Alzheimer-Krankheit, von Arteriosklerose, Krebs und/oder einer Autoimmunerkrankung.
11. Verwendung nach Anspruch 10, wobei die Atemwegserkrankung das Atemnotsyndrom von Erwachsenen ist, wobei die chronische Entzündungserkrankung rheumatoide Arthritis, Asthma oder eine entzündliche Darmerkrankung ist, und wobei die Autoimmunerkrankung systemischer Lupus erythematoses (SLE) ist.
12. Verwendung eines isolierten funktionalen Proteins und/oder eines Fragments davon, das zur Interaktion mit dem Protein A20 in der Lage ist und/oder die NF-κB-Aktivierung moduliert und/oder inhibiert nach einem der Ansprüche 10 bis 11, wobei das Protein zumindest die Aminosäuren 54–647, vorzugsweise 390–647, von SEQ ID NO: 2 umfasst.
13. Verwendung eines funktionalen Proteins und/oder eines Fragments davon, das zur Interaktion mit dem Protein A20 in der Lage ist und/oder die NF-κB-Aktivierung moduliert und/oder inhibiert nach Anspruch 12, wobei das Protein zumindest die Aminosäuren 420–647 von SEQ ID NO: 2 umfasst.
14. Verwendung eines funktionalen Proteins nach einem der Ansprüche 1 bis 5 und/oder eines Fragments davon, das zur Interaktion mit dem Protein A20 in der Lage ist und/oder die NF-κB-Aktivierung moduliert und/oder inhibiert, zum Durchmustern von Verbindungen, die die Interaktion dieses/dieser Proteins/Proteine mit anderen Protein-Komponenten der NF-κB betreffenden Signalkaskade beeinträchtigen.
15. Ein Verfahren zum Durchmustern von Verbindungen, wobei das Verfahren die Verwendung eines Proteins nach Anspruch 14 umfasst.
16. Pharmazeutische Zusammensetzung umfassend mindestens ein isoliertes funktionales Protein nach einem der Ansprüche 1 bis 5 und/oder Fragmente von diesem, die zur Interaktion mit dem Protein A20 in der Lage sind und/oder die NF-κB-Aktivierung modulieren und/oder inhibieren, und ein pharmazeutisch verträgliches Trägermaterial.

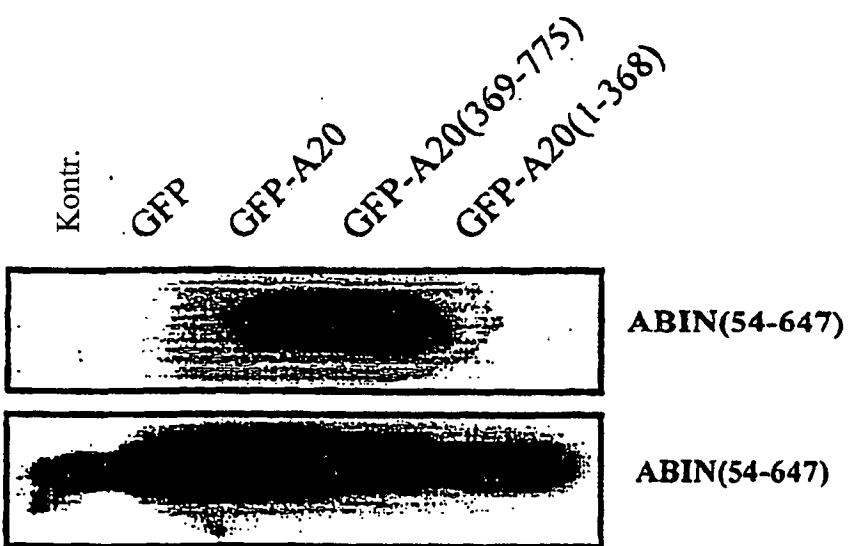
Es folgen 8 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen



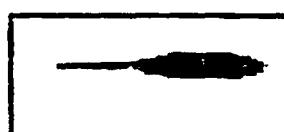
Figur 1

**A**

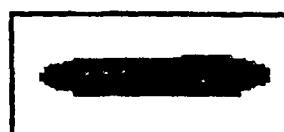


**B**

GFP      GFP-A20



ABIN(420-647)



ABIN(420-647)

Figur 2

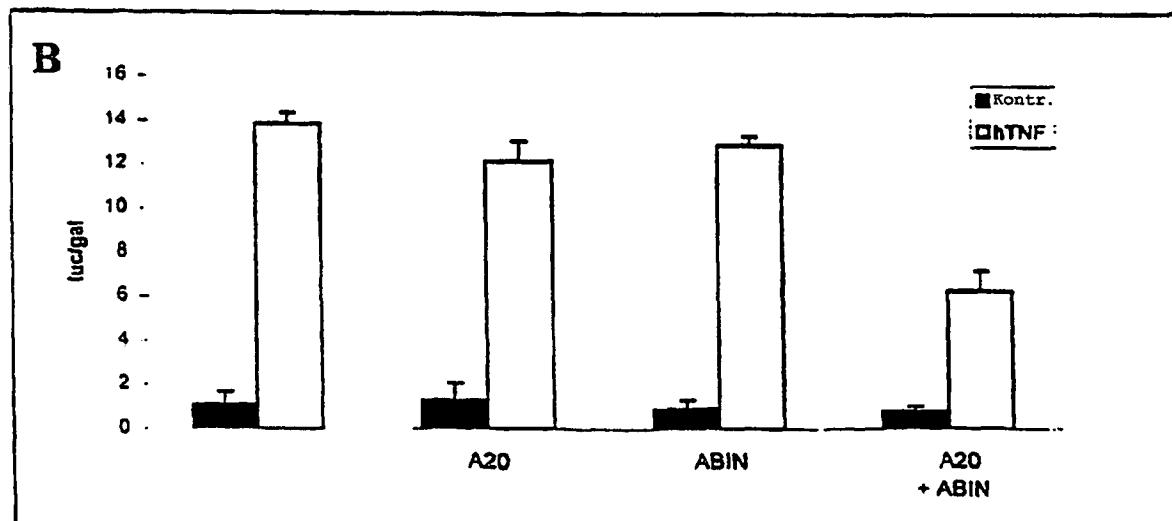
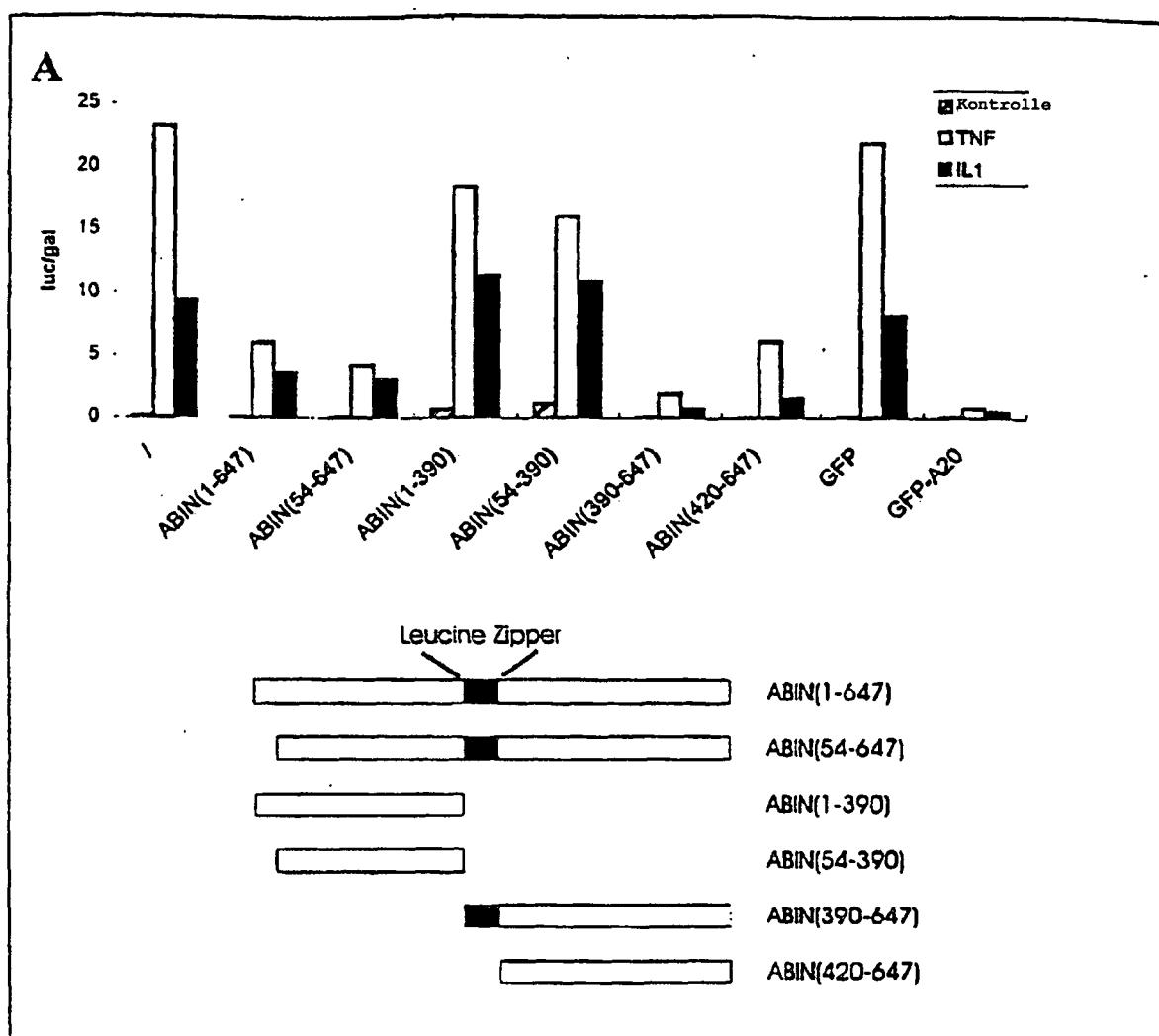
SEQUENZ 1

ABIN	<sup>423</sup> E Y Q E K E I Q R L N K A L E E A L S <sup>441</sup>
ABIN-2	<sup>256</sup> E L M K K E I S R L N R Q L E E K I S <sup>274</sup>
KONSENSUS	E x x K E I x R L N K/R x L E E x L/I S

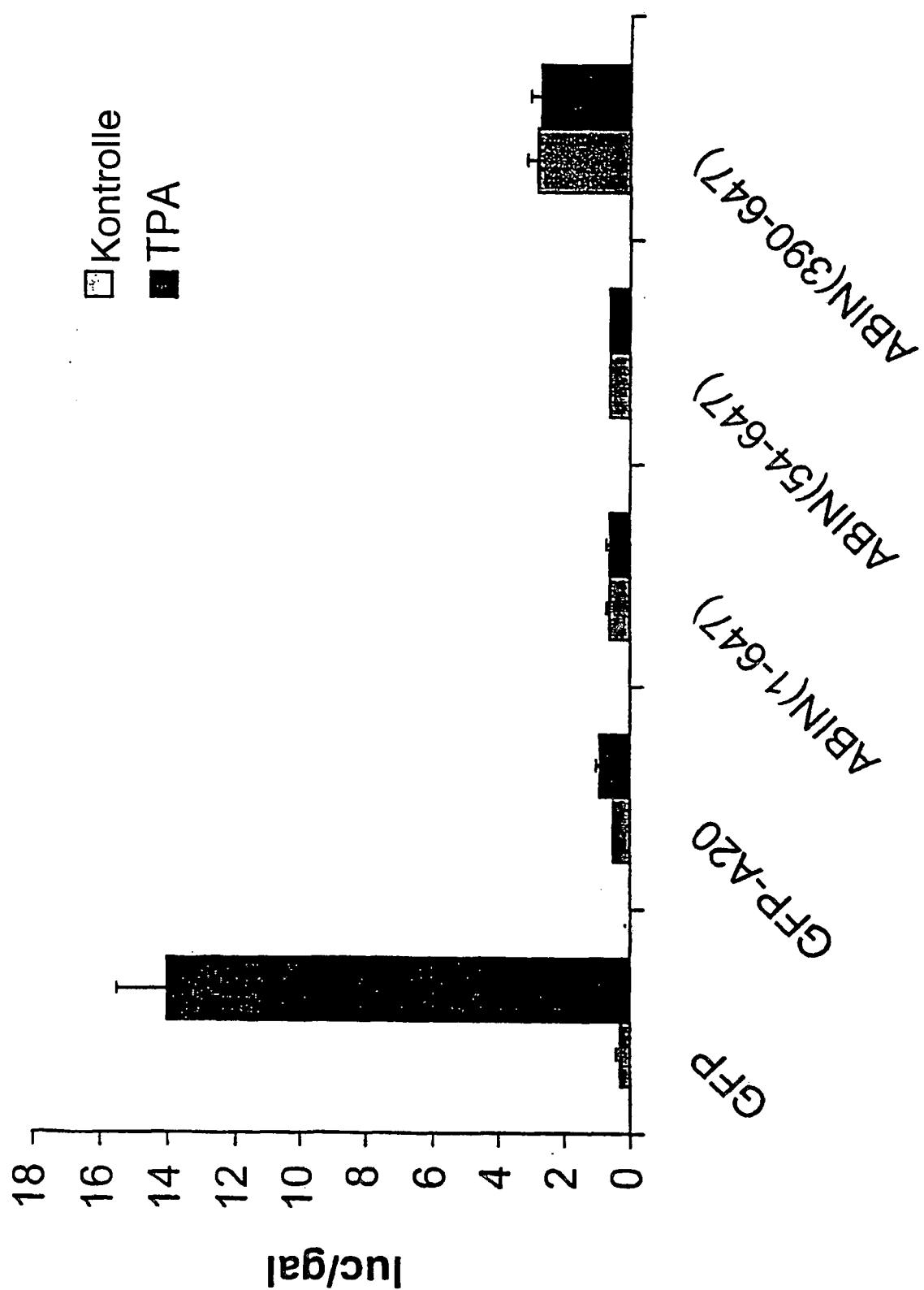
SEQUENZ 2

ABIN	<sup>475</sup> L K Q V K I F E E D F Q R E R S D R E R <sup>495</sup>
ABIN-2	<sup>100</sup> L E Q Q I L A Y K D D F K S E R A D R E R <sup>120</sup>
KONSENSUS	L x Q Q V/I x I/A x x E/D D F x x E R x D R E R

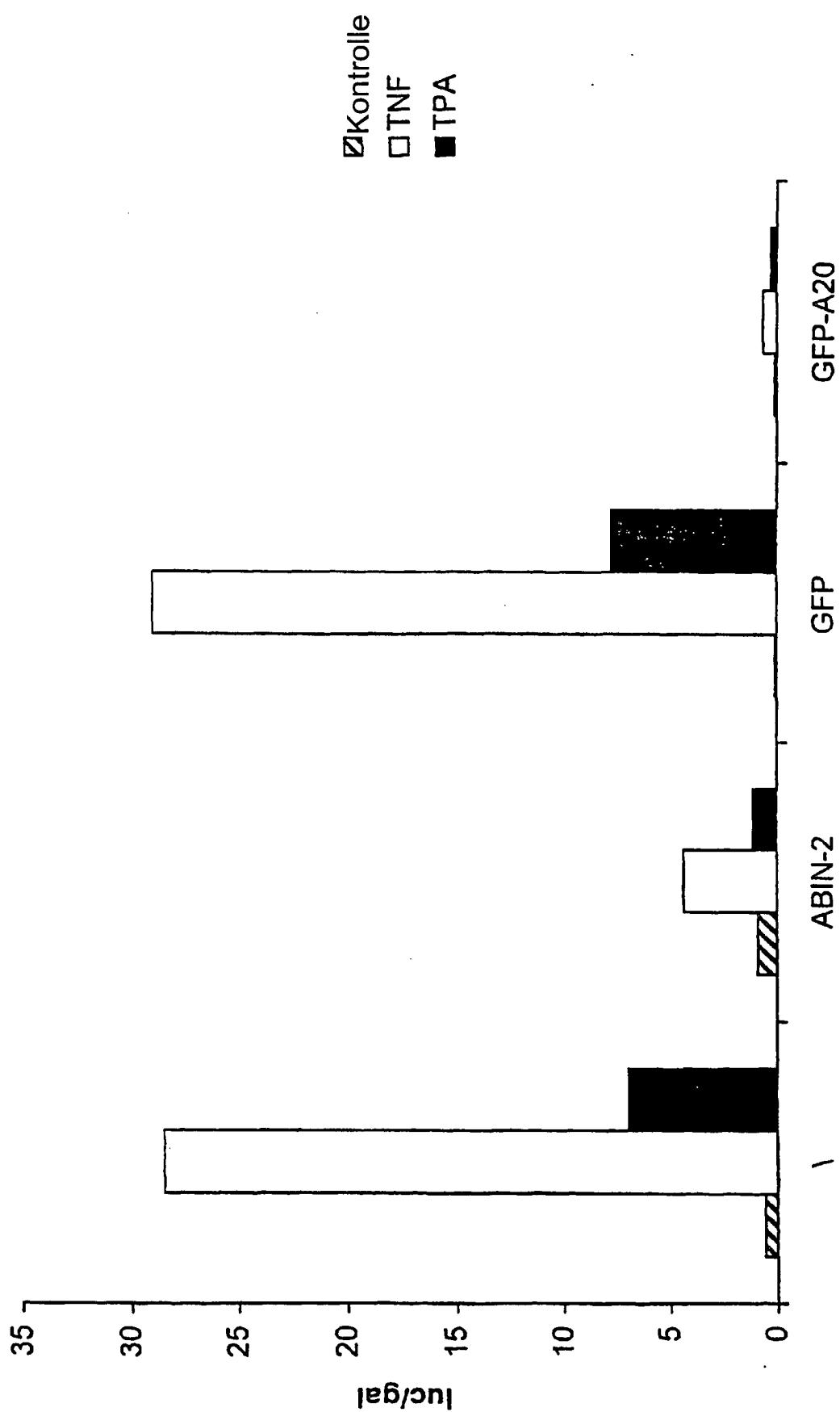
Figur 3



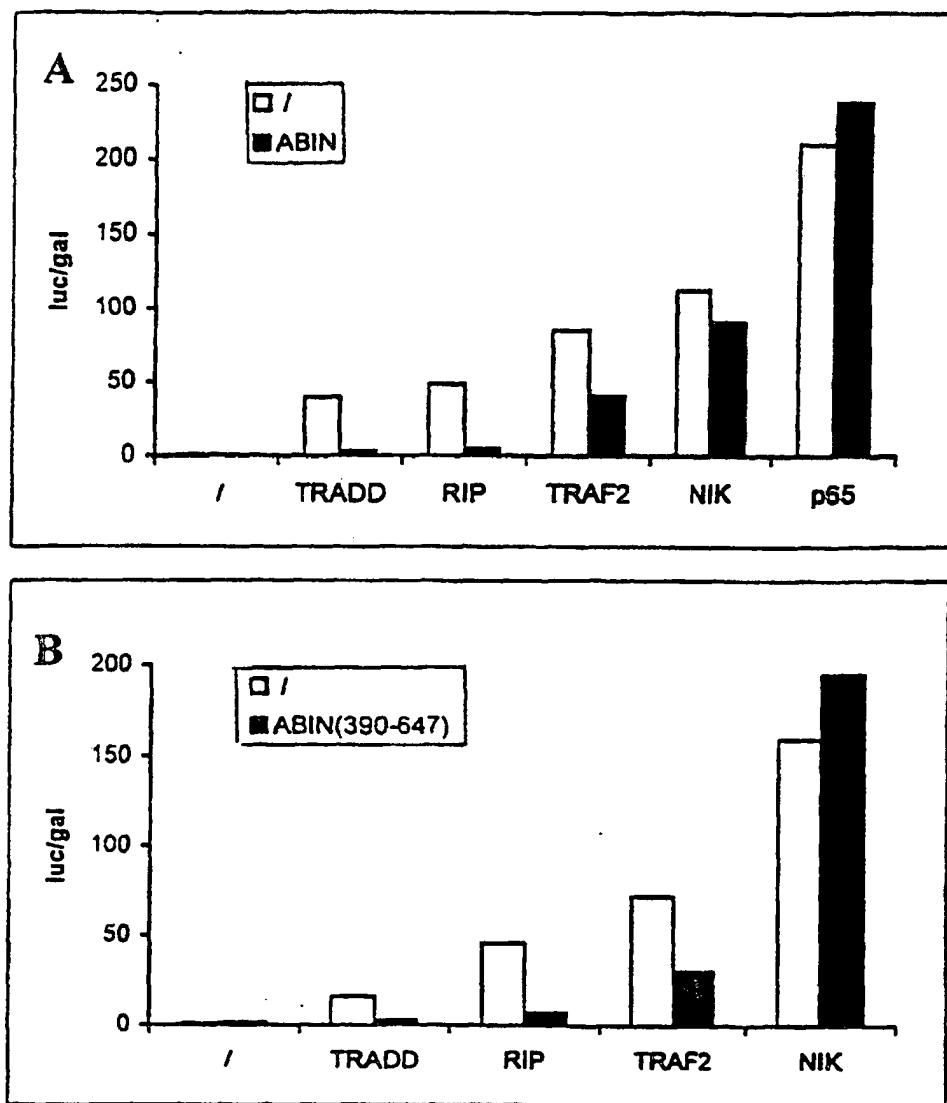
Figur 4



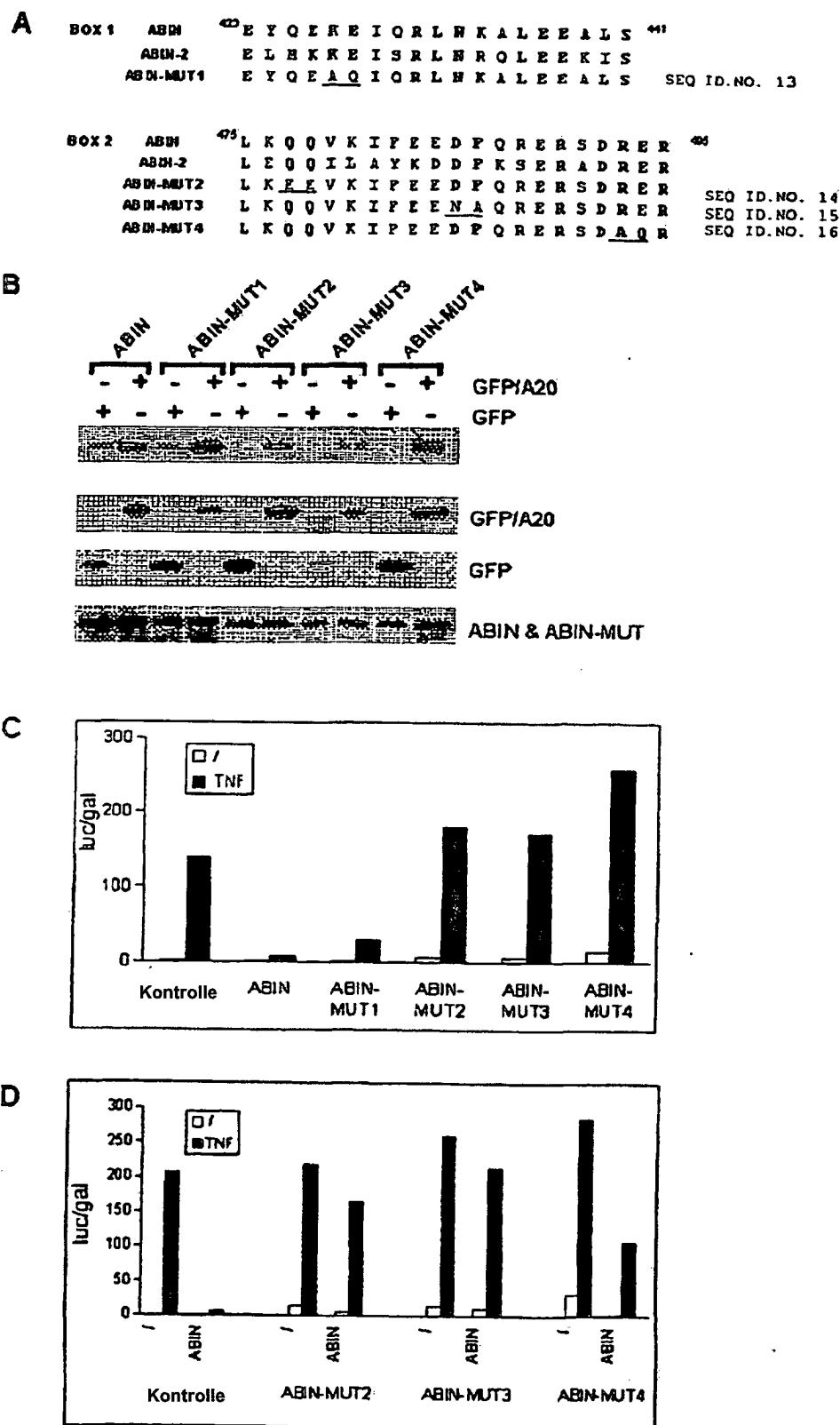
Figur 5



Figur 6



Figur 7



Figur 8