



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 696 35 088 T2 2006.06.14**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 939 804 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **696 35 088.2**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US96/17957**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **96 939 612.6**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 98/018921**

(86) PCT-Anmeldetag: **25.10.1996**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **07.05.1998**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **08.09.1999**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **17.08.2005**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **14.06.2006**

(51) Int Cl.⁸: **C12N 15/12 (2006.01)**

C07K 14/52 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C07K 16/24 (2006.01)

A61K 38/19 (2006.01)

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

(74) Vertreter:
Vossius & Partner, 81675 München

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

(72) Erfinder:
**YU, Guo-Liang, Berkeley, US; EBNER, Reinhard,
Gaithersburg, US; NI, Jian, Germantown, US**

(54) Bezeichnung: **NEUTROKIN alpha**

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

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

Beschreibung

Gebiet der Erfindung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein neues Cytokin, exprimiert von Neutrophilen, welches daher als Neurokin- α -Protein („Neurokin- α “) bezeichnet worden ist. Im Besonderen werden Nucleinsäuremoleküle bereitgestellt, die das Neurokin- α -Protein codieren. Neurokin- α Polypeptide werden auch bereitgestellt sowie Vektoren, Wirtszellen und rekombinante Verfahren zur Herstellung derselben.

Fachgebiet

[0002] Die menschlichen Tumornekrosefaktoren (TNF- α) und (TNF- β , oder Lymphotoxin) sind verwandte Mitglieder einer umfassenden Klasse an Polypeptid-Mediatoren, welche die Interferone, Interleukine und Wachstumsfaktoren einschließen, die gemeinsam als Cytokine bezeichnet werden (Beutler, B. und Cerami, A., *Annu. Ret., Immunol.*, 7625-655 (1989)). Die Sequenzanalyse der Cytokinrezeptoren hat mehrere Unterfamilien von Membranproteinen definiert (1) die Ig-Superfamilie, (2) die Hämatoopoetin (Cytokin)-Rezeptor-Superfamilie und (3) die Tumornekrosefaktor (TNF)/Nerven-Wachstumsfaktor (NGF)-Rezeptor Superfamilie (für einen Überblick der TNF-Superfamilie siehe Gruss und Dower, *Blood* 85 (12):3378-3404 (1995) und Aggarwal und Natarajan, *Eur. Cytokine Netw.*, 7(2):93-124 (1996)). Die TNF/NGF-Rezeptor-Superfamilie besteht aus mindestens 10 verschiedenen Proteinen. Gruss und Dower, vorstehend. Liganden für diese Rezeptoren sind identifiziert worden und gehören zu mindestens zwei Cytokin-Superfamilien. Gruss und Dower, vorstehend.

[0003] Tumornekrosefaktor (eine Mischung aus TNF- α und TNF- β) wurde ursprünglich als Folge seiner Anti-Tumor-Aktivität entdeckt, sie werden jetzt jedoch als pleiothrophe Cytokine anerkannt, die zu zahlreichen biologische Aktivitäten, einschließlich Apoptose von manchen transformierten Zelllinien, Mediation der Zellaktivierung und Proliferation im Stande sind und auch in der Immunregulation und Entzündung wichtige Rollen spielen.

[0004] Bis heute schließen die bekannten Mitglieder der TNF-Liganden-Superfamilie TNF- α , TNF- β (Lymphotoxin- α), LT- β , OX40L, Fas-Ligand, CD30L, CD27L, CD40L und 4-IBBL ein. Die Liganden der TNF-Liganden-Superfamilie sind saure TNF-ähnliche Moleküle mit ungefähr 20% Sequenzhomologie in der extrazellulären Domäne (Bereich, 12%–36%) und liegen hauptsächlich als Membran-gebundene Formen vor, wobei die biologisch aktive Form ein trimerer/multimerer Komplex ist. Lösliche Formen der TNF-Liganden-Superfamilie sind bis jetzt nur für TNF, LT- β und den Fas-Liganden identifiziert worden (für einen generellen Überblicksartikel siehe Gruss, H. und Dower, S.K., *Blood*, 85(12):3378-3404 (1995)), welcher hiermit in seiner Gesamtheit durch Bezugnahme miteinbezogen ist. Diese Proteine sind an der Regulation der Zellproliferation, Aktivierung und Differenzierung, einschließlich Kontrolle des Zellüberlebens oder des Zelltods durch Apoptose oder Cytotoxizität beteiligt (Armitage, R.J., *Curr. Opin, Immunol.* 6:407 (1994) und Smith, C.A., *Cell* 75:959 (1994)).

[0005] Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α ; auch als Cachektin bezeichnet, nachstehend „TNF“) wird hauptsächlich von Monozyten und Makrophagen, als Antwort auf Endotoxin oder andere Stimuli, als ein lösliches Homotrimer von 17 kD Protein-Untereinheiten segregiert (Smith, R.A. et al., *J. Biol. Chem.* 262:6951-6954 (1987)). Eine Membran-gebundene 26 kD Vorläuferform von TNF wurde auch beschrieben (Kriegler, M. et al., *Cell* 53:45-53 (1988)).

[0006] Sich häufende Indizien deuten darauf hin, dass TNF ein regulatorisches Cytokin mit pleiotropen biologischen Aktivitäten ist. Diese Aktivitäten schließen ein: Inhibierung von Lipoprotein-Lipase-Synthese („Cachektin“-Aktivität) (Beutler, B. et al., *Nature* 316:552 (1985)), Aktivierung von polymorphnukleären Leukocyten (Klebanoff, S.J. et al., *J. Immunol.* 136:4220 (1986); Perussia, B., et al., *J. Immunol.* 138:765 (1987)), Inhibierung des Zellwachstums oder Stimulation des Zellwachstums (Vilcek, J. et al., *J. Exp. Med.* 163:632 (1986); Sugarman, B.J. et al., *Science* 230:943 (1985); Lachman, L.B. et al., *J. Immunol.* 138:2913 (1987)), cytotoxische Wirkung auf bestimmte transformierte Zelltypen (Lachmann, L.B. et al., vorstehend; Darzynkiewicz, Z. et al., *Canc. Res.* 44:83 (1984)); Antivirale Aktivität (Kohase, M. et al., *Cell* 45:659 (1986); Wong, G.H.W. et al., *Nature* 323:819 (1986)), Stimulierung der Knochenresorption (Bertolini, D.R. et al., *Nature* 319:516 (1986); Saklatvala, J., *Nature* 322:547 (1986)); Stimulierung von Kollagenase und Prostaglandin-E2-Produktion (Dayer, J.-M. et al., *J. Exp. Med.* 162:2163 (1985)); und immunregulatorische Wirkungen, einschließlich der Aktivierung von T-Zellen (Yokota, S. et al., *J. Immunol.* 140:531 (1988)); B-Zellen (Kehrl, J.H. et al., *J. Exp. Med.* 166:786 (1987)); Monocyten (Philip, R. et al., *Nature* 323:86 (1986)); Thymocyten (Ranges, G.E. et al., *J. Exp. Med.* 167:1472 (1988)) und Stimulierung der Zelloberflächen-Expression von Haupt-Histokompatibilitäts-Komplexen (MHC)-Klasse I und II Molekülen (Collins, T. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:446 (1986); Pujol-Borrel, R.

et al., Nature 326:304 (1987)).

[0007] TNF ist für seine pro-entzündlichen Wirkungen bekannt, die in Verletzung des Gewebes enden, wie zum Beispiel Induktion einer gerinnungsfördernden Wirkung auf vaskuläre Endothelzellen (Poher, J.S. et al., J. Immunol. 136:1680 (1986)), verstärkte Anhaftung von Neutrophilen und Lymphozyten (Poher, J.S. et al., J. Immunol. 138:3319 (1987)), und Stimulierung der Freisetzung des Blutplättchenaktivierungsfaktors von Makrophagen, Neutrophilen und vaskulären Endothelzellen (Camussi, G. et al., J. Exp. Med. 166:1390 (1987)).

[0008] Neueste Hinweise bringen TNF mit der Pathogenese von vielen Infektionen in Zusammenhang (Cerami, A. et al., Immunol. Today 9:28 (1988)), Immunerkrankungen, neoplastische Pathologie, z.B.: in Kachexie, die manche Malignitäten begleitet (Oliff, A. et al., Cell 50:555 (1987)) und in autoimmunen Pathologien und Transplantat-Gegen-Empfänger-Pathologie (Piguet, P.-F. et al., J. Exp. Med. 166:1280 (1987)). Die Assoziation von TNF mit Krebs und infektiösen Pathologien wird oft mit dem katabolischen Zustand des Wirtes in Zusammenhang gebracht. Ein Hauptproblem bei Krebspatienten ist der Gewichtsverlust, der gewöhnlich mit Anorexie im Zusammenhang steht. Die resultierende umfassende Auszehrung ist als „Kachexie“ bekannt (Kern, K.A. et al. J. Parent. Enter. Nutr. 12:286-298 (1988)). Kachexie schließt progressiven Gewichtsverlust, Anorexie, und eine anhaltende Aushöhlung der Körpermasse als Antwort auf das maligne Wachstum ein. Der kachektische Zustand steht folglich mit einer signifikanten Morbidität in Zusammenhang und ist für die Mehrheit der Krebsmortalität verantwortlich. Etliche Studien haben darauf hingedeutet, dass TNF ein wichtiger Mediator der Kachexie bei Krebs, infektiöser Pathologie und in anderen katabolischen Zuständen ist.

[0009] Es wird angenommen, dass TNF bei den pathophysiologischen Konsequenzen von Gram-negativer Sepsis und endotoxischem Schock eine zentrale Rolle spielt (Michie, H.R. et al., J. Surg. 76:670-671 (1989); Debets, J.M.H. et al., Second Vienna Shock Forum, S. 463-466 (1989); Simpson, S. Q. et al., Crit. Care Clin. 5:27-47 (1989)), einschließlich Fieber, Unwohlsein, Anorexie und Kachexie. Endotoxin ist ein wirksamer Monocyten/Macrophagen-Aktivator, der die Produktion und Absonderung von TNF (Kornbluth, S.K. et al., J. Immunol. 137:2585-2591 (1986)) und anderen Cytokinen stimuliert. Da TNF eine Vielzahl an biologischen Effekten von Endotoxin nachahmen kann wurde daraus geschlossen, dass es ein zentraler Mediator, verantwortlich für die klinischen Manifestationen von mit Endotoxin in Beziehung stehenden Erkrankungen ist. TNF und andere von Monocyten abgeleitete Cytokine vermitteln den Stoffwechsel betreffende und neurohormonale Reaktionen auf Endotoxin (Michie, H.R. et al., N. Eng. J. Med. 318:1481-1486 (1988)). Endotoxin-Verabreichung an menschliche Freiwillige erzeugt eine akute Erkrankung mit Grippe-ähnlichen Symptomen einschließlich Fieber, Herzrasen, erhöhter Stoffwechselrate und Freisetzung von Stresshormonen (Revhug. A. et al., Arch. Surg. 123:162-170 (1988)). Erhöhte Spiegel an zirkulierenden TNF wurden auch in Patienten gefunden, die an Gram-negativer Sepsis leiden (Waage, A. et al., Lancet 1:355-357 (1987); Hammerle, A.F. et al., Second Vienna Shock Forum S. 715-718 (1989); Debets, J. M. H. et al., Crit. Care Med. 17:489-497 (1989); Calandra, T. et al., J. Infec. Dis. 161:982-987 (1990)).

[0010] Passive Immuntherapie, die auf die Neutralisierung von TNF abzielt, kann, wie vorstehend besprochen, einen vorteilhaften Effekt in Gram-negativer Sepsis und Endotoxämie haben, basierend auf der erhöhten TNF-Produktion und erhöhten TNF-Spiegeln in diesen pathologischen Zuständen. Antikörper gegen einen „Modulator“-Stoff, der als Cachektin (später wurde festgestellt, dass es identisch zu TNF ist) charakterisiert wurde, wurden später von Cerami et al., offenbart (EPA Patentveröffentlichung 0.212.489, 4. März, 1987). Von solchen Antikörpern wurde angenommen, dass sie in diagnostischen Immunotests und in der Therapie von Schock in bakteriellen Infektionen nützlich sind. Rubin et al. (EPA Patentveröffentlichung 0.218.868, 22. April, 1987) offenbarte monoclonale Antikörper gegen menschlichen TNF, die solche Antikörper segregierende Hybridome, Verfahren zu Herstellung solcher Antikörper und die Verwendung solcher Antikörper in Immunotests von TNF. Yone et al., offenbarte (EPA Patentveröffentlichung 0.288.088, 26. Oktober 1988) anti-TNF-Antikörper einschließlich mAk und ihre Nutzen in der Immunotest-Diagnose von Krankheiten, insbesondere der Kawasaki-Krankheit und bakteriellen Infektionen. Die Körperflüssigkeiten der Patienten mit Kawasaki-Krankheit (infantiles akutes febriles mucocutanes Lymphknoten-Syndrom; Kawasaki, T., Allergy 16:178 (1967); Kawasaki, T., Shonica (Pediatrics) 26:935 (1985)) sollen erhöhte TNF-Mengen enthalten, die mit dem Fortschreiten der Krankheit in Zusammenhang stehen (Yone et al., vorstehend).

[0011] Andere Forscher haben mAk beschrieben, die für rekombinanten menschlichen TNF spezifisch sind, die neutralisierende Aktivität in vitro aufwiesen (Liang, C-M. et al. Biochem. Biophys. Res. Comm. 137:847-854 (1986); Meager, A. et al., Hybridoma 6:305-311 (1987); Fendly et al., Hybridoma 6:359-369 (1987); Bringman, T.S. et al., Hybridoma 6:489-507 (1987); Hirai, M. et al., J. Immunol. Meth. 96:57-62 (1987); Moller, A. et al., Cytokine 2:162-169 (1990)). Manche dieser mAk wurden verwendet, um Epitope von menschlichem TNF zu kartieren und Enzym-Immunotests zu entwickeln (Fendly et al., vorstehend; Hirai et al., vorstehend; Moller et

al., vorstehend) und die Reinigung von rekombinantem TNF zu unterstützen (Bringman et al., vorstehend). Diese Studien schaffen jedoch keine Basis für die Herstellung von TNF-neutralisierenden Antikörpern die, aufgrund von Immunogenität, fehlender Spezifität und/oder pharmazeutischer Eignung, für die in vivo Diagnose oder therapeutische Verwendungen im Menschen verwendet werden können.

[0012] Es wurde in anderen Säugern als dem Menschen gezeigt, dass neutralisierende Antiseren oder mAk gegen TNF nachteilige physiologische Veränderungen aufheben und den Tod, nach einer letalen Herausforderung in experimenteller Endotoxämie und Bakteriämie, verhindern. Dieser Effekt ist z.B. in Nager-Letalitätstests und in Pathologie-Modell-Systemen von Primaten bewiesen worden (Mathison, J.C. et al., *J. Clin. Invest.* 81:1925-1937 (1988); Beutler, B. et al., *Science* 229:869-871 (1985); Tracey, K.J. et al., *Nature* 330:662-664 (1987); Shimamoto, Y. et al., *Immunol. Lett.* 17:311-318 (1988); Silva, A. T. et al., *J. Infect. Dis.* 162:421-427 (1990); Opal, S. M. et al., *J. Infect. Dis.* 161:1148-1152 (1990); Hinshaw, L.B. et al., *Circ. Shock* 30:279-292 (1990)).

[0013] Bis heute ist die Erfahrung mit einer anti-TNF-mAk-Therapie beim Menschen begrenzt gewesen, zeigt aber hilfreiche therapeutische Resultate z.B.: in Arthritis und Sepsis. Siehe z.B.: Elliott, M.J. et al., *Baillieres Clin. Rheumatol.* 9:633-52 (1995); Feldmann M, et al., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* USA 766:272-8 (1995); van der Poll, T. et al., *Shock* 3:1-12 (1995); Wherry et al., *Crit. Care. Med.* 21:S436-40 (1993); Tracey K.J., et al., *Crit. Care Med.* 21:S415-22 (1993).

[0014] Die Entwicklung von Säugetieren ist sowohl von der Proliferation und Differenzierung der Zellen als auch vom programmierten Zelltod abhängig, der durch Apoptose stattfindet (Walker, et al., *Methods Achiev. Exp. Pathol.* 13:18 (1988). Apoptose spielt in der Zerstörung von immunen Thymocyten, die Eigenantigene erkennen, eine kritische Rolle. Das Versagen dieses normalen Eliminationsprozesses kann bei Autoimmunerkrankungen eine Rolle spielen (Gammon et al., *Immunology Today* 12:193 (1991)).

[0015] Itoh et al. (*Cell* 66:233 (1991)) beschrieb ein Zelloberflächenantigen, Fas/CD23, welches Apoptose vermittelt und an der clonalen Deletion von T-Zellen beteiligt ist. Fas wird in aktivierten T-Zellen, B-Zellen, Neutrophilen und im Thymus, Leber, Herz, Lunge und Ovarien von erwachsenen Mäusen exprimiert (Watanabe-Fukunaga et al., *J. Immunol.* 148:1274 (1992)), zusätzlich zu aktivierten T-Zellen, B-Zellen, Neutrophilen. Apoptose wird in Experimenten induziert, in welchen ein monoklonaler Antikörper mit Fas „cross-linked“ wird (Yonehara et al., *J. Exp. Med.* 169:1747 (1989); Trauth et al., *Science* 245:301 (1989)). Außerdem gibt es ein Beispiel in welchem die Bindung eines monoklonalen Antikörpers an Fas unter bestimmten Bedingungen auf T-Zellen stimulierend wirkt (Alderson et al., *J. Exp. Med.* 178:2231 (1993)).

[0016] Das Fas-Antigen ist ein Zelloberflächenprotein mit einem relativen Molekulargewicht von 45 kDa. Sowohl menschliche als auch Mausgene für Fas sind von Watanabe-Fukunaga et al., (*J. Immunol.* 148:1274 (1992)) und Itoh et al., (*Cell* 66:233 (1991)) cloniert worden. Die von diesen Genen codierten Proteine sind beide Transmembranproteine mit struktureller Homologie zu der Nerven-Wachstumsfaktor/Tumornekrosefaktor-Superfamilie, die zwei TNF-Rezeptoren, den Nerven-Wachstumsfaktor-Rezeptor mit niedriger Affinität und CD40, CD27, CD30 und OX40 enthält.

[0017] Vor kurzem ist der Fas-Ligand beschrieben worden (Suda et al., *Cell* 75:1169 (1993)). Die Aminosäuresequenz deutet darauf hin, dass der Fas-Ligand ein Typ-II-Transmembranprotein ist, das zur TNF-Familie gehört. Das Fas-Liganden-Polypeptid umfasst daher drei Hauptdomänen: eine kurze intrazelluläre Domäne am aminoterminalen Ende und eine längere extrazelluläre Domäne am carboxyterminalen Ende, verbunden durch eine hydrophobe Transmembrandomäne. Übereinstimmend mit der T-Zell-vermittelten Cytotoxizität wird der Fas-Ligand in Splenocyten und Thymocyten exprimiert. Der gereinigte Fas-Ligand hat ein Molekulargewicht von 40 kDa.

[0018] Vor kurzem wurde gezeigt, dass Fas/Fas-Ligand-Interaktionen für die Apoptose, welche der Aktivierung von T-Zellen folgt, verantwortlich sind (Ju et al., *Nature* 373:444 (1995); Brunner et al., *Nature* 373:441 (1995)). Die Aktivierung von T-Zellen induziert beide Proteine auf der Zelloberfläche. Anschließende Interaktionen zwischen dem Liganden und dem Rezeptor führen zur Apoptose der Zellen. Das unterstützt die mögliche regulatorische Rolle für Apoptose, induziert durch Fas/Fas-Ligand-Interaktion während normalen Immunreaktionen.

[0019] Demgemäß ist ein Bedarf vorhanden Cytokine ähnlich zu TNF bereitzustellen, die an pathologischen Zuständen beteiligt sind. Derartige neue Cytokine könnten verwendet werden, um zur Therapie von Erkrankungen, die mit TNF-ähnlichen Cytokinen in Beziehung stehen, neue Antikörper oder andere Antagonisten

herzustellen, welche an diese TNF-ähnlichen Cytokine binden.

Zusammenfassung der Erfindung

[0020] Die vorliegende Erfindung stellt Nucleinsäuremoleküle bereit, umfassend ein Polynucleotid, das ein Cytokin codiert, welches strukturell ähnlich zu TNF und verwandten Cytokinen ist und von dem angenommen wird, dass es ähnliche biologische Effekte und Wirkungen hat. Dieses Cytokin wird Neutrokin- α genannt und die Erfindung schließt Neutrokin- α -Polypeptide ein, die mindestens einen Teil der Aminosäuresequenz in **Fig. 1** (SEQ ID NR: 2) aufweisen oder eine Aminosäuresequenz die durch den cDNA-Clon codiert ist, der am 22. Oktober 1996, mit der zugewiesenen ATCC-Nummer 97768, in einem bakteriellen Wirt hinterlegt wurde. Die durch Sequenzierung des hinterlegten Neutrokin- α -Clons bestimmte Nucleotidsequenz, die in **Fig. 1** (SEQ ID NR: 1) gezeigt wird, enthält einen offenen Leserahmen, der ein komplettes Polypeptid von 285 Aminosäureresten, einschließlich einem N-terminalen Methionin, einer vorhergesagten intrazellulären Domäne von etwa 46 Aminosäureresten, einer vorhergesagten Transmembrandomäne von etwa 26 Aminosäuren, einer vorhergesagten extrazellulären Domäne von etwa 213 Aminosäuren und einem für das gesamte Protein abgeleiteten Molekulargewicht von etwa 31 kDa einschließt. Was andere Typ-II-Transmembranproteine betrifft, beinhalten lösliche Formen von Neutrokin- α die Gesamte oder einen Teil der extrazellulären Domäne, die von der Transmembrandomäne gespalten wurde und ein Polypeptid, umfassend das gesamte Neutrokin- α -Polypeptid, dem die Transmembrandomäne fehlt, d.h. die extrazelluläre Domäne verbunden mit der Intrazellulären Domäne.

[0021] Ein Aspekt der Erfindung stellt daher ein Nucleinsäuremolekül bereit, umfassend ein Polynucleotid, das eine Nucleotidsequenz aufweist, die ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus: (a) einer Nucleotidsequenz, welche das Vollängen-Neutrokin- α -Polypeptid mit der gesamten Aminosäuresequenz in **Fig. 1** (SEQ ID NR: 2) aufweist oder wie codiert durch den cDNA-Clon enthalten in der ATCC-Hinterlegung vom 22. Oktober 1996, mit der ATCC-Nummer 97768; (b) einer Nucleotidsequenz, welche die vorhergesagte extrazelluläre Domäne des Neutrokin- α -Polypeptids codiert, welche die Aminosäuresequenz der Positionen 73 bis 285 in **Fig. 1** (SEQ ID NR: 2) aufweist oder wie codiert durch den cDNA-Clon, der in der ATCC-Nr. 97768, hinterlegt am 22. Oktober 1996, enthalten ist; (c) einer Nucleotidsequenz, welche ein Polypeptid codiert, umfassend die intrazelluläre Domäne von Neutrokin- α (Aminosäurereste von etwa 1 bis etwa 46 in **Fig. 1** (SEQ ID NR: 2)) oder wie codiert durch den cDNA-Clon, der in der ATCC-Nr. 97768, hinterlegt am 22. Oktober 1996, enthalten ist; (d) einer Nucleotidsequenz, welche ein Polypeptid codiert, umfassend die Transmembrandomäne von Neutrokin- α (Aminosäurereste von etwa 47 bis etwa 72 in **Fig. 1** (SEQ ID NR: 2)) oder wie codiert durch den cDNA-Clon, der in der ATCC-Nr. 97768, hinterlegt am 22. Oktober 1996, enthalten ist; (e) einer Nucleotidsequenz, welche ein lösliches Neutrokin, ein Polypeptid codiert, das die extrazelluläre und intrazelluläre Domäne aufweist, dem aber die Transmembrandomäne fehlt; und (f) einer Nucleotidsequenz, die komplementär zu jeder der vorstehend beschriebenen Nucleotidsequenzen aus (a), (b), (c), (d) oder (e) ist.

[0022] Weitere Ausführungsformen der Erfindung schließen isolierte Nucleinsäuremoleküle ein, die ein Polynucleotid umfassen, das eine Nucleotidsequenz aufweist, die mindestens 90% identisch ist, stärker bevorzugt mindestens 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch ist zu jeder der vorstehend beschriebenen Nucleotidsequenzen aus (a), (b), (c), (d), (e) oder (f) und die ein Polypeptid codieren, welches Neutrokin- α -Aktivität aufweist oder ein Polynucleotid, das unter stringenten Hybridisierungsbedingungen an ein vorstehend beschriebenes Polynucleotid aus (a), (b), (c), (d), (e) oder (f) hybridisiert und das ein Polypeptid codiert, welches Neutrokin- α -Aktivität ausweist. Dieses hybridisierende Polynucleotid hybridisiert unter stringenten Bedingungen nicht an ein Polynucleotid, das eine Nucleotidsequenz aufweist, welche ausschließlich aus A-Resten oder ausschließlich T-Resten besteht. Die vorliegende Erfindung beschreibt außerdem ein Nucleinsäuremolekül, umfassend ein Polynucleotid, welches die Aminosäuresequenz eines Epitop-tragenden Anteils eines Neutrokin- α -Polypeptids codiert, welches eine vorstehend beschriebene Aminosäuresequenz aus (a), (b), (c), (d), oder (e) aufweist.

[0023] Die vorliegende Erfindung bezieht sich auch auf rekombinante Vektoren, welche die Nucleinsäuremoleküle der vorliegenden Erfindung einschließen und auf Wirtszellen, welche die rekombinanten Vektoren enthalten sowie auf Verfahren zur Herstellung solcher Vektoren und Wirtszellen und für ihre Verwendung in der Produktion von Neutrokin- α -Polypeptiden oder -Peptiden durch rekombinante Verfahren.

[0024] Die Erfindung stellt ferner ein Neutrokin- α -Polypeptid bereit, umfassend eine Aminosäuresequenz ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus: (a) der Aminosäuresequenz des Vollängen-Neutrokin- α -Polypeptids, welches die gesamte Aminosäuresequenz zeigt in **Fig. 1** (SEQ ID NR: 2) aufweist oder wie codiert durch den cDNA-Clon, welcher in der ATCC-Nr. 97768, hinterlegt am 22. Oktober 1996, enthalten ist; (b) der Aminosäuresequenz einer vorhergesagten extrazellulären Domäne des Neutrokin- α -Polypeptids welches die Amino-

säuresequenz der Positionen 73 bis 285 in **Fig. 1** (SEQ ID NR: 2) aufweist oder wie codiert durch den cDNA-Clon, der in der ATCC-Nr. 97768, hinterlegt am 22. Oktober 1996, enthalten ist; (c) der Aminosäuresequenz der intrazellulären Domäne von Neutrokin- α (Aminosäurereste von etwa 1 bis etwa 46 in **Fig. 1** (SEQ ID NR: 2)) oder wie codiert durch den cDNA-Clon, der in der ATCC-Nr. 97768, hinterlegt am 22. Oktober 1996, enthalten ist; (d) der Aminosäuresequenz der Transmembrandomäne von Neutrokin- α (Aminosäurereste von etwa 47 bis etwa 72 in **Fig. 1** (SEQ ID NR: 2)) oder wie codiert durch den cDNA-Clon, der in der ATCC-Nr. 97768, hinterlegt am 22. Oktober 1996, enthalten ist; und (e) der Aminosäuresequenz des löslichen Neutrokin- α -Polypeptids, welches die extrazelluläre und intrazelluläre Domäne aufweist, dem aber die Transmembrandomäne fehlt, wobei jede dieser Domänen vorstehend definiert ist.

[0025] Die Polypeptide der vorstehenden Erfindung schließen auch Polypeptide ein, die eine Aminosäuresequenz mit mindestens 90% Ähnlichkeit aufweisen und stärker bevorzugt mindestens 95% Ähnlichkeit zu jenen vorstehend beschriebenen in (a), (b), (c), (d) oder (e) sowie auch Polypeptide, die eine Aminosäuresequenz aufweisen, die mindestens 90% identisch ist und noch stärker bevorzugt 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch zu den Vorstehenden ist, worin diese ähnlichen Polypeptide eine Neutrokin- α -Aktivität aufweisen.

[0026] Außerdem beschreibt die vorliegende Erfindung ein Peptid oder Polypeptid, das eine Aminosäuresequenz eines Epitop-tragenden Anteils eines Neutrokin- α -Polypeptids hat, das eine Aminosäuresequenz vorstehend beschrieben in (a), (b), (c), (d) oder (e) aufweist. Peptide oder Polypeptide, die eine Aminosäuresequenz eines Epitop-tragenden Anteil eines Neutrokin- α -Polypeptids der Erfindung aufweisen, schließen Anteile solcher Polypeptide mit mindestens sechs oder sieben, vorzugsweise mindestens neun und stärker bevorzugt mindestens etwa 30 Aminosäuren bis zu etwa 50 Aminosäuren ein, obwohl Epitop-tragende Polypeptide jeder Länge bis zu und einschließlich der gesamten Aminosäuresequenz eines vorstehend beschriebenen Polypeptids der Erfindung auch in der Erfindung offenbart sind. In einer anderen Ausführungsform stellt die Erfindung einen Antikörper bereit, der spezifisch an ein Polypeptid bindet, das eine Aminosäuresequenz vorstehend beschrieben in (a), (b), (c), (d) oder (e) aufweist.

[0027] Die Erfindung stellt ferner Verfahren zur Isolierung von Antikörpern bereit, die spezifisch an ein Neutrokin- α -Polypeptid binden, welches eine wie hierin beschriebene Aminosäuresequenz aufweist. Solche Antikörper sind, wie nachstehend beschrieben, diagnostisch oder therapeutisch verwendbar.

[0028] Die Erfindung stellt auch ein Arzneimittel bereit, umfassend lösliche Neutrokin- α -Polypeptide, im Besonderen menschliche Neutrokin- α -Polypeptide, die zum Beispiel zur Behandlung von Tumor und Tumor-Metastasen, Infektionen durch Bakterien, Viren und anderen Parasiten, Immundefizienzen, entzündliche Erkrankungen, Lymphadenopathien, Autoimmunerkrankungen, Transplantat-Gegen-Empfänger-Reaktion eingesetzt werden können und, um die periphere Toleranz zu stimulieren, manche transformierten Zelllinien zu zerstören, Zellaktivierung und Proliferation zu vermitteln und sie werden funktionell als primäre Mediatoren der Immunregulation und entzündlicher Reaktionen angesehen.

[0029] Die Erfindung stellt ferner eine Zusammensetzung bereit, umfassend ein Neutrokin- α -Polynucleotid oder ein Neutrokin- α -Polypeptid zur Verwendung in der Verabreichung an Zellen *in vitro* und an Zellen *ex vivo*. Diese Zusammensetzung kann dafür geeignet sein Zellen *in vivo* oder an einen multizellulären Organismus verabreicht zu werden. In bestimmten besonders bevorzugten Ausführungsformen dieses Aspekts der Erfindung umfasst die Zusammensetzung ein Neutrokin- α -Polynucleotid zur Expression eines Neutrokin- α -Polypeptids in einem Wirtsorganismus zur Behandlung einer Krankheit. Besonders bevorzugt ist in dieser Beziehung die Expression in menschlichen Patienten zur Behandlung einer Fehlfunktion verbunden mit abnormaler endogener Aktivität eines Neutrokin- α -Gens.

[0030] Die vorliegende Erfindung beschreibt auch ein Durchmusterungs-Verfahren zur Identifizierung von Verbindungen, die im Stande sind eine zelluläre Reaktion, induziert durch Neutrokin- α , zu verstärken oder zu hemmen, das beinhaltet Zellen die Neutrokin- α exprimieren mit in Frage kommenden Verbindungen in Kontakt zu bringen, eine zelluläre Reaktion zu testen und die zelluläre Reaktion mit einer normalen zellulären Reaktion zu vergleichen, die normale Antwort wird getestet, wenn in der Abwesenheit der in Frage kommenden Verbindung, Kontakt hergestellt wurde; wobei eine über die normale Reaktion erhöhte zelluläre Reaktion darauf hindeutet, dass die Verbindung ein Agonist ist und ein über die normale Reaktion verminderte zelluläre Reaktion darauf hindeutet, dass die Verbindung ein Antagonist ist.

[0031] In einem anderen Aspekt wird ein Verfahren zur Identifizierung von Neutrokin- α -Rezeptoren beschrieben sowie ein Durchmusterungstest für Agonisten und Antagonisten unter Verwendung solcher Rezeptoren. Dieser Test schließt die Bestimmung des Effekts ein, den eine in Frage kommende Verbindung auf die Neuro-

kin- α -Bindung an den Neutrokin- α -Rezeptor hat. Im Besonderen schließt dieses Verfahren Kontaktaufnahme eines Neutrokin- α -Rezeptors mit einem Neutrokin- α -Polypeptid und einer in Frage kommenden Verbindung ein und die Bestimmung, ob die Bindung des Neutrokin- α -Polypeptids aufgrund der Anwesenheit der in Frage kommenden Verbindung erhöht oder vermindert ist. Die Antagonisten können eingesetzt werden, um septischen Schock, Entzündung, Zerebrale Malaria, Aktivierung des HIV-Virus, Transplantat-Wirt-Abstoßung, Knochenresorption, und rheumatoide Arthritis und Kachexie (Auszehrung und Unterernährung) zu vermeiden.

[0032] Die vorliegenden Erfinder haben entdeckt, dass Neutrokin- α nicht nur in Neutrophilen exprimiert wird, sondern auch in Nieren, Lunge, peripheren Leukocyten, Knochenmark, T-Zell-Lymphoma, B-Zell-Lymphoma, aktivierten T-Zellen, Magenkrebs, glatter Muskulatur, Makrophagen und Blutgewebe der Nabelschnur. Für etliche der Erkrankungen dieser Gewebe und Zellen wie zum Beispiel Tumor und Tumormetastasen, bakteriellen Infektionen, Viren und anderen Parasiten, Immundefizienzen, septischen Schock, Entzündung, Zerebrale Malaria, Aktivierung des HIV-Virus, Transplantat-Wirt-Abstoßung, Knochenresorption, rheumatoide Arthritis und Kachexie (Auszehrung und Unterernährung) wird angenommen, dass erheblich höhere oder niedrigere Mengen an Neutrokin- α -Genexpression in bestimmten Geweben nachgewiesen werden können (z.B.: Knochenmark) oder Körperflüssigkeiten (z.B.: Serum, Plasma, Harn, Gelenksflüssigkeit oder Rückenmarksflüssigkeit) entnommen von einer Person, die eine solche Erkrankung hat, relativ zu einer „Standard“-Neutrokin- α -Genexpressionsmenge d.h. der Neutrokin- α -Expressionsmenge in Gewebe oder Körperflüssigkeiten einer Person die diese Erkrankung nicht hat. Die Erfindung beschreibt daher ein diagnostisches Verfahren das während der Diagnose einer Erkrankung verwendbar ist, die einschließt: (a) Testen der Neutrokin- α -Genexpressionsmenge in Zellen oder Körperflüssigkeiten einer Person; (b) Vergleich der Neutrokin- α -Genexpressionsmenge mit einer Standard Neutrokin- α -Genexpressionsmenge, wobei eine Erhöhung oder Verminderung der getesteten Neutrokin- α -Genexpressionsmenge verglichen, mit der Standard Neutrokin- α -Genexpressionsmenge auf eine Erkrankung hinweist.

[0033] Die vorliegende Erfindung beschreibt die Verwendung eines Neutrokin- α -Polypeptids der Erfindung für die Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung einer Person, welche erhöhte Mengen an Neutrokin- α -Aktivität im Körper benötigt.

[0034] Ferner beschreibt die vorliegende Erfindung die Verwendung von Neutrokin- α -spezifischen Antikörpern für die Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung einer Person, die erhöhte Mengen an Neutrokin- α -Aktivität im Körper benötigt.

Kurze Beschreibung der Figuren

[0035] **Fig. 1** zeigt die Nucleotid- (SEQ ID NR: 1) und die davon abgeleiteten Aminosäuresequenzen (SEQ ID NR: 2) des Neutrokin- α -Proteins. Aminosäuren 1 bis 46 stellen die intrazelluläre Domäne dar, Aminosäuren 47 bis 72 die Transmembrandomäne (die unterstrichen Sequenz) und Aminosäuren 73 bis 285 die extrazelluläre Domäne (die restliche Sequenz).

[0036] **Fig. 2** zeigt die Identitätsbereiche zwischen den Aminosäuresequenzen des Neutrokin- α -Proteins und TNF- α (SEQ ID NR: 3), TNF- β (Lymphotoxin; SEQ ID NR: 4) und FAS-Ligand (SEQ ID NR: 5), bestimmt durch die „Megalign“-Routine, die Teil eines Computerprogramms mit dem Namen „DNASar“ ist.

[0037] **Fig. 3** zeigt eine Analyse der Aminosäuresequenz von Neutrokin- α . Alpha, Beta-, Schleife- und Knäuelbereiche; hydrophile und hydrophobe Eigenschaften; amphiphatische Eigenschaften; flexible Bereiche, Antigenindex und Oberflächenwahrscheinlichkeit werden gezeigt. Im Diagramm des „Antigenindex-Jameson-Wolf“ wird die Stelle der hoch antigenen Bereiche des Neutrokin- α -Proteins bezeichnet, d.h. Bereiche von welchen Epitop-tragende Peptide der Erfindung erhalten werden können.

[0038] **Fig. 4** zeigt die Übereinstimmung der Neutrokin- α -Nucleotidsequenz, die von der menschlichen cDNA bestimmt wurde, die in der ATCC-Hinterlegung vom 22. Oktober 1996 hinterlegt wurde, mit verwandten menschlichen cDNA-Clonen der Erfindung, die als HSOAD55R (SEQ ID NR: 7), HSLAH84R (SEQ ID NR: 8) und HLTBM08R (SEQ ID NR: 9) bezeichnet wurden.

Genaue Beschreibung

[0039] Die vorliegende Erfindung stellt Nucleinsäuremoleküle bereit, umfassend ein das Neutrokin- α -Polypeptid codierendes Polynucleotid, welches die in **Fig. 1** (SEQ ID NR: 2) gezeigte Aminosäuresequenz aufweist, die durch Sequenzierung einer clonierten cDNA von Neutrokin- α bestimmt wurde. Die in **Fig. 1** (SEQ ID

NR: 1) gezeigte Nucleotidsequenz wurde durch Sequenzierung des HNEDU15 Clons, der am 22. Oktober 1996 bei der American Type Culture Collection, 12301 Park Lawn Drive, Rockville, Maryland hinterlegt wurde, erhalten. Der hinterlegte Clon ist im pBlueskript SK (-)-Plasmid (Stratagene, La Jolla, CA) enthalten.

[0040] Das Neutrokin- α -Protein der vorliegenden Erfindung teilt eine Sequenzhomologie mit dem Translationsprodukt der menschlichen mRNAs für TNF- α , TNF- β und dem Fas-Liganden (**Fig. 2**). Wie vorstehend angemerkt, wird von TNF- α angenommen, dass er ein wichtiges Cytokin ist, welches bei Cytotoxizität, Nekrose, Apoptose, gemeinsamer Stimulation, Proliferation, Lymphknotenbildung, Klassenumwandlung der Immunglobuline, Differenzierung, antiviraler Aktivität, Regulation der Adhäsionsmoleküle und anderer Cytokine und Wachstumsfaktoren eine Rolle spielt.

Nucleinsäuremoleküle

[0041] Soweit nicht anders angegeben, wurden alle hierin durch DNA-Sequenzierung bestimmten Nucleotidsequenzen unter Verwendung eines automatisierten DNA-Sequenziergeräts (wie zum Beispiel dem Modell 373 von Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA) bestimmt und alle Aminosäuresequenzen von Polypeptiden die durch die hierin bestimmten DNA-Moleküle codiert sind, wurden durch Translation einer DNA-Sequenz vorausgesagt, die wie vorstehend beschrieben bestimmt wurde. Daher kann, wie im Fachgebiet für jede durch diesen automatisierten Ansatz bestimmte DNA-Sequenz bekannt ist, jede der hierin bestimmten Nucleotidsequenzen einige Fehler enthalten. Nucleotidsequenzen, die durch Automatisierung bestimmt werden sind typischerweise mindesten etwa 90% identisch, typischer mindestens etwa 95% bis zu mindestens etwa 99,9% identisch zu der tatsächlichen Nucleotidsequenz des sequenzierten DNA-Moleküls. Die tatsächliche Sequenz kann durch andere Methoden, einschließlich im Fachgebiet bekannter manueller DNA-Sequenzierungsverfahren, genauer bestimmt werden. Wie auch im Fachgebiet bekannt ist, kann eine einzelne Insertion oder Deletion einer bestimmten Nucleotidsequenz, verglichen mit der tatsächlichen Sequenz, eine Verschiebung des Leserahmens in der Translation der Nucleotidsequenz verursachen, sodass die vorhergesagte durch eine bestimmte Nucleotidsequenz codierte Aminosäuresequenz, beginnend am Punkt einer solchen Insertion oder Deletion, völlig unterschiedlich von der Aminosäuresequenz sein wird, die eigentlich durch das sequenzierte DNA-Molekül codiert ist.

[0042] Mit „Nucleotidsequenz“ eines Nucleinsäuremoleküls oder Polynucleotids ist ein DNA-Molekül oder ein Polynucleotid, eine Sequenz von Desoxyribonucleotiden vorgesehen und für ein RNA-Molekül oder Polynucleotid die entsprechende Sequenz von Ribonucleotiden (A, G, C und U) wo jedes Thymidindesoxiribonucleotid (T) in der spezifischen Desoxyribonucleotidsequenz durch das Ribonucleotid Uridin (U) ersetzt wird.

[0043] Unter Verwendung der hierin bereitgestellten Information wie zum Beispiel der Nucleotidsequenz in **Fig. 1**, kann unter Verwendung von Standard-Clonierungs- und Durchmusterungsverfahren, wie zum Beispiel jenen für die Clonierung von cDNA unter Verwendung von mRNAs als Startmaterial ein Nucleinsäuremolekül der vorliegenden Erfindung erhalten werden, das ein Neutrokin- α -Polypeptid codiert. Erläuternd für die Erfindung wurde das in **Fig. 1** (SEQ ID NR: 1) beschriebene Nucleinsäuremolekül in einer von Neutrophilen stammenden cDNA-Bank entdeckt. Exprimierte Sequenz-Tags, die einem Teil der Neutrokin- α -cDNA entsprechen, wurden auch in Neutrophilen gefunden.

[0044] Das Neutrokin- α -Gen enthält einen offenen Leserahmen, der ein Protein von etwa 285 Aminosäureresten, eine intrazelluläre Domäne von etwa 46 Aminosäuren (Aminosäurereste von etwa 1 bis etwa 46 in **Fig. 1** (SEQ ID NR: 2)), eine Transmembrandomäne von etwa 26 Aminosäuren (Aminosäurereste von etwa 47 bis etwa 72 in **Fig. 1** (SEQ ID NR: 2)), eine extrazelluläre Domäne von etwa 213 Aminosäuren (Aminosäurereste von etwa 73 bis etwa 285 in **Fig. 1** (SEQ ID NR: 2)) codiert; und ein abgeleitetes Molekulargewicht von etwa 31 kDa aufweist. Das in **Fig. 1** (SEQ ID NR: 2) gezeigte Neutrokin- α -Protein ist etwa 20% ähnlich und etwa 10% identisch zu menschlichem TNF- α , auf welchen in der GenBank unter Hinterlegungsnummer 339764 zugegriffen werden kann.

[0045] Wie ein Fachmann verstehen wird, kann das tatsächliche gesamte Neutrokin- α -Polypeptid, das durch die hinterlegte cDNA codiert ist und etwa 285 Aminosäuren umfasst, aufgrund der Möglichkeiten der vorstehend besprochenen Sequenzierungsfehler, etwas kürzer sein. Im Besonderen enthält die bestimmte Neutrokin- α -Codierungssequenz ein zweites Methionincodon, das als ein alternatives Startcodon für die Translation des offenen Leserahmens, bei den Nucleotidpositionen 210 – 213 in **Fig. 1** (SEQ ID NR: 1) dienen kann. Allgemeiner gesagt, kann der tatsächliche offene Leserahmen überall im Bereich von ± 20 Aminosäuren, wahrscheinlicher im Bereich von ± 10 Aminosäuren von jenen sein, die entweder vom ersten oder zweiten Methionincodon vom in **Fig. 1** (SEQ ID NR: 1) gezeigten N-Terminus vorausgesagt wurden. Es wird ferner verstanden

werden, dass sich die genaue „Lage“ der extrazellulären-, intrazellulären und Transmembrandomänen des Neutrokin- α -Polypeptids, abhängig von den zur Identifizierung der verschiedenen funktionellen Domänen verwendeten analytischen Kriterien, leicht verändern kann. Zum Beispiel kann die genaue Lage der extrazellulären Domäne von Neutrokin- α in **Fig. 1** (SEQ ID NR: 2) leicht unterschiedlich sein (z.B.: kann sich die Lage um etwa 1 bis etwa 20 Reste verschieben, wahrscheinlicher um etwa 1 bis etwa 5 Reste), abhängig von den Kriterien die verwendet werden, um die Domäne zu definieren. In diesem Fall wurden die Enden der Transmembrandomäne und der Beginn der extrazellulären Domäne auf Basis der Identifizierung der hydrophoben Aminosäuresequenz in der vorstehend angezeigten Position, wie in **Fig. 3** gezeigt, vorausgesagt. Auf jeden Fall stellt die Erfindung, wie nachstehend weiter besprochen, Polypeptide bereit, die verschiedene Reste vom N-Terminus des gesamten Polypeptids entfernt haben, einschließlich Polypeptide, denen ein oder mehrere Aminosäuren vom N-Terminus der hierin beschriebenen extrazellulären Domäne fehlen, diese stellen lösliche Formen der extrazellulären Domäne des Neutrokin- α -Proteins dar, behalten jedoch Neutrokin- α -Aktivität bei.

[0046] Wie angedeutet können die Nucleinsäuremoleküle der vorliegenden Erfindung in Form von RNA wie zum Beispiel mRNA sein oder in Form von DNA, einschließlich zum Beispiel cDNA und genomische DNA, die durch Clonierung erhalten wurde oder synthetisch hergestellt wurde. Die DNA kann doppelsträngig oder einzelsträngig sein. Einzelsträngige DNA oder RNA kann der codierende Strang sein, der auch als der Sense-Strang bekannt ist oder es kann der nicht-codierende Strang sein, der auch als Anti-Sense-Strang bekannt ist.

[0047] Mit „isoliertes(n) Nucleinsäuremoleküle(n)“ ist ein Nucleinsäuremolekül gemeint, DNA oder RNA, welches von seiner arteigenen Umgebung entfernt wurde. Zum Beispiel rekombinante in einem Vektor enthaltene DNA-Moleküle werden für den Zweck der vorliegenden Erfindung als isoliert erachtet. Weitere Beispiele für isolierte DNA-Moleküle schließen rekombinante DNA-Moleküle ein, die in heterologen Wirtszellen aufrechterhalten werden oder gereinigte (teilweise oder wesentlich) DNA-Moleküle in Lösung. Isolierte RNA-Moleküle schließen in vivo oder in vitro RNA-Transkripte der DNA-Moleküle der vorliegenden Erfindung ein. Isolierte Nucleinsäuremoleküle gemäß der vorliegenden Erfindung schließen ferner solche Moleküle ein, die synthetisch erzeugt wurden.

[0048] Nucleinsäuremoleküle der vorliegenden Erfindung schließen DNA-Moleküle ein, umfassend einen offenen Leserahmen (ORF) mit einem Startcodon an der Position 147–149 der in **Fig. 1** (SEQ ID NR: 1) gezeigten Nucleotidsequenz. Außerdem schließen die Nucleinsäuremoleküle der Erfindung DNA-Moleküle ein, die eine Sequenz umfassen, welche sich wesentlich von jenen vorstehend beschriebenen unterscheidet, die aber aufgrund der Degeneration des genetischen Codes noch immer das Neutrokin- α -Protein codiert. Selbstverständlich ist der genetische Code im Fachgebiet gut bekannt. Es wäre daher für einen Fachmann Routine vorstehend beschriebene degenerierte Varianten zu erzeugen. In einem anderen Aspekt stellt die Erfindung Neutrokin- α -Polypeptid codierende Nucleinsäuremoleküle bereit, die eine Aminosäuresequenz aufweisen, welche durch die in dem am 22. Oktober 1996 hinterlegten Plasmid enthaltene cDNA codiert ist. Vorzugsweise wird dieses Nucleinsäuremolekül eine Sequenz umfassen, welche die extrazelluläre Domäne des Polypeptids codiert, das durch den vorstehend beschriebenen hinterlegten cDNA-Clon codiert ist.

[0049] Die Erfindung stellt ferner ein Nucleinsäuremolekül bereit, welches die in **Fig. 1** (SEQ ID NR: 1) gezeigte Nucleotidsequenz aufweist oder die in dem vorstehend beschriebenen hinterlegten Clon enthaltene Nucleotidsequenz der Neutrokin- α -cDNA, oder ein Nucleinsäuremolekül, das eine zu einer der vorstehenden Sequenzen komplementäre Sequenz aufweist. Solche Moleküle, im Besonderen DNA-Moleküle, sind als Sonden für Gen-Kartierung durch in situ Hybridisierung mit Chromosomen verwendbar und für den Nachweis der Expression des Neutrokin- α -Gens in menschlichem Gewebe, zum Beispiel durch Northern Blotting.

[0050] Die vorliegende Erfindung ist ferner auf Nucleinsäuremoleküle gerichtet, die Teile der hierin beschriebenen Nucleotidsequenzen codieren sowie auf Fragmente der isolierten Nucleinsäuremoleküle, die hierin beschrieben werden, wobei diese Teile oder Fragmente ein Polypeptid codieren das Neutrokin- α -Aktivität aufweist. Im Besonderen stellt die Erfindung ein Polynucleotid bereit, das eine Nucleotidsequenz aufweist, die einen Teil der SEQ ID NR: 1 darstellt, die aus den Positionen 1–1001 der SEQ ID NR: 1 besteht.

[0051] Allgemeiner gesagt sind bei einem Fragment eines Nucleinsäuremoleküls, das die Nucleotidsequenz der hinterlegten cDNA aufweist, oder die in **Fig. 1** (SEQ ID NR:1) gezeigte Nucleotidsequenz, Fragmente von mindestens etwa 15 nt und stärker bevorzugt mindestens etwa 20 nt, noch stärker bevorzugt mindestens etwa 30 nt und sogar noch stärker bevorzugt mindestens etwa 40 nt in Länge vorgesehen, die, wie vorstehend hierin besprochen, als diagnostische Sonden und Primer verwendbar sind. Natürlich sind auch größere Fragmente von 50–300nt Länge gemäß der vorliegenden Erfindung verwendbar, wie auch Fragmente, die mit den meisten

wenn nicht mit allen der wie in **Fig. 1** (SEQ ID NR: 1) gezeigten Nucleotidsequenz der hinterlegten cDNA übereinstimmen. Mit einem Fragment von mindestens 20 nt Länge sind zum Beispiel Fragmente vorgesehen, die 20 oder mehr zusammenhängende Basen von der Nucleotidsequenz der hinterlegten cDNA oder der wie in **Fig. 1** (SEQ ID NR: 1) gezeigten Nucleotidsequenz enthalten.

[0052] In einem anderen Aspekt stellt die Erfindung ein Nucleinsäuremolekül bereit, umfassend ein Polynucleotid, welches unter stringenten Hybridisierungsbedingungen mit einem Teil des Polynucleotids in einem vorstehend beschriebenen Nucleinsäuremolekül der Erfindung hybridisiert zum Beispiel dem cDNA-Clon der in der ATCC-Nr. 97768 enthalten ist und am 22. Oktober 1996 hinterlegt wurde und der ein Polypeptid codiert, welches Neutrokin- α -Aktivität aufweist. Unter „stringenten Hybridisierungsbedingungen“ ist eine Inkubation über Nacht bei 42°C vorgesehen, in einer Lösung umfassend: 50% Formamid, 5 \times SSC (150 mM NaCl, 15 mM Trinatrium-Citrat), 50 mM Natriumphosphat (pH-Wert 7,6), 5 \times Denhart's Lösung, 10% Dextransulfat und 20 μ g/ml denaturierte gescherte Lachssperma DNA, gefolgt vom Waschen der Filter in 0,1 \times SSC bei etwa 65°C.

[0053] Mit einem Polynucleotid, das an einen „Teil“ eines Polynucleotids hybridisiert ist ein Polynucleotid (entweder DNA oder RNA) vorgesehen, welches an mindestens etwa 15 Nucleotide (nt) und stärker bevorzugt an mindestens etwa 20 nt und noch stärker bevorzugt an mindestens etwa 30 nt und sogar noch stärker bevorzugt an etwa 30–70 (z.B.: 50) nt der Referenzpolynucleotide hybridisiert. Diese sind als diagnostische Sonden und Primer verwendbar, wie vorstehend und nachstehend im Einzelnen besprochen wird.

[0054] Mit einem Teil eines Polynucleotids von zum Beispiel „mindestens 20 nt in Länge“ sind 20 oder mehr zusammenhängende Nucleotide der Nucleotidsequenz des Referenzpolynucleotids vorgesehen (z.B.: die hinterlegte cDNA oder die wie in **Fig. 1** (SEQ ID NR: 1) gezeigte Nucleotidsequenz. Natürlich wäre ein Polynucleotid, das nur an eine Poly-A-Sequenz hybridisiert (wie den 3'-terminalen Poly-(A)-Teil der in **Fig. 1** (SEQ ID NR:1) gezeigten Neutrokin- α -cDNA), oder an einen komplementären Abschnitt von T (oder U)-Resten nicht in einem Polynucleotid der Erfindung enthalten das verwendet wird, um an einen Teil der Nucleinsäure der Erfindung zu hybridisieren, da solch ein Polynucleotid an jedes Nucleinsäuremolekül hybridisieren würde, das einen Poly-(A)-Abschnitt oder ein Gegenstück davon (z.B.: praktisch jeder doppelsträngige cDNA-Clon) enthält.

[0055] Wie angedeutet können die ein Neutrokin- α -Polypeptid codierenden Nucleinsäuremoleküle der vorliegenden Erfindung jene umfassen, die für sich die Aminosäuresequenz der extrazellulären Domäne des Polypeptids codieren; und die codierende Sequenz für die extrazelluläre Domäne des Polypeptids und der zusätzlichen Sequenzen wie jenen, die intrazelluläre und Transmembrandomänen-Sequenzen oder eine pre- oder pro- oder prepro-Proteinsequenz codieren; die codierende Sequenz der extrazellulären Domäne des Polypeptids mit oder ohne der vorstehend erwähnten zusätzlichen codierenden Sequenzen, sind aber nicht auf sie beschränkt.

[0056] Auch durch Nucleinsäuren der Erfindung codiert sind die vorstehenden Proteinsequenzen gemeinsam mit zusätzlichen, nicht-codierenden Sequenzen, zum Beispiel einschließlich aber nicht beschränkt auf Introns und nicht-codierende 5'- und 3'-Sequenzen, wie die transkribierten, nicht-translatierten Sequenzen, welche in der Transkription, mRNA-Processing einschließlich Splicing und Polyadenylierungssignalen zum Beispiel Ribosomen-Bindung und Stabilität von mRNA eine Rolle spielen; eine zusätzliche codierende Sequenz die für zusätzliche Aminosäuren codiert, wie zum Beispiel jene, die zusätzliche Funktionen bereitstellen.

[0057] Die das Polypeptid codierende Sequenz, kann daher mit einer Markersequenz fusioniert werden, wie zum Beispiel einer Sequenz, die ein Peptid codiert, das die Reinigung des fusionierten Proteins erleichtert. In bestimmten bevorzugten Ausführungsformen dieses Aspekts der Erfindung ist die Marker-Aminosäuresequenz ein Hexa-Histidin-Peptid, wie unter anderem das in einem pQE-Vektor bereitgestellte „Tag“ (QUIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311), viele davon sind im Handel erhältlich. Wie zum Beispiel in Gentz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:821-824 (1989) beschrieben, gewährleistet Hexa-Histidin eine bequeme Reinigung des Fusionsproteins. Das „HA“-Tag ist ein anderes für die Reinigung nützliches Peptid, welches einem vom Influenza-Hämagglutinin-Protein abgeleiteten Epitop entspricht, das von Wilson et al., Cell 37: 767 (1984) beschrieben wurde. Wie nachstehend besprochen schließen andere solche Fusionsproteine Neutrokin- α , am N- oder C-Terminus an Fc fusioniert, ein.

Varianten und Mutanten der Polynucleotide

[0058] Die vorliegende Erfindung betrifft weiterhin Varianten von Nucleinsäuremolekülen der vorliegenden Erfindung, die Teile, Analoge oder Derivate des Neutrokin- α -Proteins codieren, die Neutrokin- α -Aktivität aufweisen. Varianten können natürlich vorkommen, wie zum Beispiel eine natürliche Allel-Variante. Mit einer „Al-

l-Varianter" ist eine von mehreren wechselnden Formen eines Gens gemeint, das einen bestimmten Locus auf einem Chromosom eines Organismus innehat. Genes II, Lewin, B., Herausgeber John Wiley & Sons, New York (1985). Nicht natürlich vorkommende Varianten können unter Verwendung von im Fachgebiet bekannten Mutagenese-Methoden hergestellt werden.

[0059] Solche Varianten schließen jene ein, die durch Nucleotid-Substitutionen, Deletionen oder Additionen hergestellt werden. Die Substitutionen, Deletionen oder Additionen können eine oder mehrere Nucleotide einschließen. Die Varianten können in codierenden Regionen, nicht-codierenden Regionen oder in Beidem verändert sein. Änderungen in den codierenden Regionen können konservative oder nicht-konservative Aminosäuresubstitutionen, -Deletionen oder -Additionen erzeugen. Besonders bevorzugt sind darunter stille Substitutionen, Additionen und Deletionen, welche die Eigenschaften und Wirkungen des Neutrokin- α -Proteins oder eines Teils davon nicht ändern. In dieser Hinsicht sind konservative Substitutionen auch besonders bevorzugt.

[0060] Höchst bevorzugt sind Nucleinsäuremoleküle, welche die extrazelluläre Domäne des Proteins codieren, welche die in **Fig. 1** (SEQ ID NR: 2) gezeigte Aminosäuresequenz aufweisen oder die extrazelluläre Domäne der Neutrokin- α -Aminosäuresequenz, die durch den hinterlegten cDNA-Clon codiert ist. Weitere Ausführungsformen schließen ein Nucleinsäuremolekül ein, umfassend ein Polynucleotid, welches eine Nucleotidsequenz aufweist, die mindestens 90% identisch und stärker bevorzugt mindestens 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch zu einem Polynucleotid ist, ausgewählt aus einer Gruppe bestehend aus: (a) eine das Neutrokin- α -Polypeptid codierende Nucleotidsequenz, welche die gesamte Aminosäuresequenz in **Fig. 1** (SEQ ID NR: 2) aufweist; (b) eine die vorausgesagte extrazelluläre Domäne des Neutrokin- α -Polypeptids codierende Nucleotidsequenz, welche die Aminosäuresequenz der Positionen 73–285 in **Fig. 1** (SEQ ID NR: 2) aufweist; (c) eine das Neutrokin- α -Polypeptid codierende Nucleotidsequenz, welche die gesamte durch den cDNA-Clon codierte Aminosäuresequenz aufweist, der in der ATCC-Nummer 97768, hinterlegt am 22. Oktober 1996, enthalten ist; (d) eine die extrazelluläre Domäne des Neutrokin- α -Polypeptids codierende Nucleotidsequenz, welche die durch den cDNA-Clon codierte Aminosäuresequenz aufweist, der in der ATCC-Nummer 97768, hinterlegt am 22. Oktober 1996, enthalten ist; und (e) eine Nucleotidsequenz, die zur vollen Länge jeder dieser vorstehenden Nucleotidsequenzen in (a), (b), (c) oder (d) komplementär ist.

[0061] Mit einem Polynucleotid, das zum Beispiel eine Nucleotidsequenz von mindestens 95% „Identität“ zu einer Referenznucleotidsequenz aufweist, die ein Neutrokin- α -Polypeptid codiert, ist vorgesehen, dass die Nucleotidsequenz des Polynucleotids zur Referenzsequenz identisch ist außer, dass die Polynucleotidsequenz bis zu 5 Punktmutationen pro 100 Nucleotiden der Referenz-Nucleotidsequenz beinhalten kann, die das Neutrokin- α -Polypeptid codiert. Um ein Polynucleotid zu erhalten, das eine Nucleotidsequenz aufweist, die mindestens 95% identisch zu einer Referenz-Nucleotidsequenz ist, können mit anderen Worten bis zu 5% der Nucleotide in der Referenzsequenz deletiert oder mit einem anderen Nucleotid substituiert sein oder es können etliche Nucleotide, bis zu 5% der Gesamtnucleotide in der Referenzsequenz, in die Referenzsequenz inseriert sein. Diese Mutationen der Referenzsequenz können an den 5'- oder 3'-terminalen Positionen der Referenz-Nucleotidsequenz vorkommen oder irgendwo zwischen diesen terminalen Positionen, hier und da eingefügt entweder einzeln unter den Nucleotiden der Referenzsequenz oder in einer oder mehreren zusammenhängenden Gruppen innerhalb der Referenzsequenz.

[0062] Ob ein bestimmtes Nucleinsäuremolekül zum Beispiel mindestens 90%, 95%, 96%, 97% 98% oder 99% zu der in **Fig. 1** gezeigten Nucleotidsequenz oder zu der Nucleotidsequenz des hinterlegten cDNA-Clons identisch ist, kann als eine praktische Frage unter Verwendung von bekannten Computerprogrammen wie zum Beispiel dem Bestfit-Programm (Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 von Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, WI 53711) bestimmt werden. Bestfit verwendet Smith und Waterman-Algorithmus der lokalen Homologie, *Advances in Applied Mathematics* 2.482–489 (1981), um das beste Homologiesegment zwischen zwei Sequenzen zu finden. Wenn man Bestfit oder irgendein anderes Sequenzvergleichsprogramm verwendet, um zu bestimmen, ob eine bestimmte Sequenz gemäß der vorliegenden Erfindung zum Beispiel 95% zu einer Referenzsequenz identisch ist, werden die Parameter natürlich so eingestellt, dass der Prozentsatz der Identität über die volle Länge der Referenz-Nucleotidsequenz berechnet wird, und dass Homologiesegmente bis zu 5% der Gesamt-Nucleotidzahl in der Referenzsequenz erlaubt sind.

[0063] Die vorliegende Anmeldung betrifft Nucleinsäuremoleküle, die mindestens 90%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch sind zum Beispiel zu der in **Fig. 1** (SEQ ID NR: 1) gezeigten Nucleotidsequenz oder zu der Nucleinsäuresequenz der hinterlegten cDNA, die ein Polypeptid codiert, das Neutrokin- α -Aktivität hat. Sogar wo ein bestimmtes Nucleinsäuremolekül kein Polypeptid codiert, das Neutrokin- α -Aktivität aufweist, würde ein Fachmann trotzdem wissen wie das Nucleinsäuremolekül zum Beispiel als eine Hybridisierungs- oder ein

Polymerasekettenreaktions (PCR)-Primer zu verwenden ist. Die Verwendungen der Nucleinsäuremoleküle der vorliegenden Erfindung, die kein Polypeptid codieren, das Neutrokin- α -Aktivität aufweist, schließen unter anderem ein (1) Isolierung des Neutrokin- α -Gens oder allelischer Varianten davon von einer cDNA-Bank; (2) in situ Hybridisierung (z.B.: „FISH“) an Spreitungen von Metaphase-Chromosomen, um die genau chromosomale Lage des Neutrokin- α -Gens bereitzustellen, wie in Verma et al., Human Chromosomes: A Manual of Basic Techniques, Pergamon Press, New York (1988), beschrieben; und Northern-Blot-Analyse zum Nachweis der Expression der Neutrokin- α -mRNA in bestimmten Geweben.

[0064] Bevorzugt werden jedoch Nucleinsäuremoleküle, die Sequenzen aufweisen, die mindestens 90%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch sind zu der in **Fig. 1** (SEQ ID NR: 1) gezeigten Nucleinsäuresequenz oder zu der Nucleinsäuresequenz der hinterlegten cDNA, die tatsächlich ein Polypeptid codieren, das Neutrokin- α -Aktivität aufweist. Mit „einem Polypeptid, das Neutrokin- α -Aktivität aufweist“, sind Polypeptide gemeint, die, wie in einem speziellen biologischen Test gemessen, ähnliche aber nicht notwendigerweise identische Aktivitäten zu einer Aktivität der extrazellulären Domäne oder des Volllängen Neutrokin- α -Proteins der Erfindung aufweisen. Zum Beispiel moduliert das Neutrokin- α -Protein der vorliegenden Erfindung Zellproliferation, Cytotoxizität und Zelltod. Ein in vitro Zellproliferation-, Cytotoxizität- und Zelltod-Test zur Messung des Effekts eines Proteins auf bestimmte Zellen kann zum Nachweis von Zellreplikation und/oder -tod durch Verwendung von im Fachgebiet gut bekannten und im Handel erhältlichen Reagenzien durchgeführt werden. Zum Beispiel werden vorstehend zahlreiche solcher Tests für Proteinaktivitäten, die mit TNF in Beziehung stehen, in den verschiedenen Literaturhinweisen im Abschnitt „technischer Hintergrund“ dieser Offenbarung beschrieben. Kurz gesagt schließt solch ein Test das Ernten humaner oder tierischer Zellen (z.B.: Maus) und Mischen mit (1) transfiziertem Zellüberstand des Wirts, der Neutrokin- α -Protein enthält (oder einem in Betracht kommenden Polypeptid) oder (2) nicht-transfiziertem Kontroll-Zellüberstand des Wirts und Messung des Effekts auf die Zellzahlen oder Lebensfähigkeit nach der Inkubation für eine bestimmte Zeitdauer. Solche Zellproliferations-Modulationsaktivitäten, wie sie mit dieser Testart gemessen werden können, sind für die Behandlung von Tumoren, Tumormetastase, Infektionen, Entzündungen durch Autoimmunerkrankungen und anderen mit dem Immunsystem in Beziehung stehenden Erkrankungen nützlich.

[0065] Neutrokin- α moduliert die Zellproliferation und Differenzierung in einer Dosisabhängigen Art in dem vorstehend beschriebenen Test. „Ein Polypeptid, welches Neutrokin- α -Proteinaktivität aufweist“ schließt daher Polypeptide ein, die in dem vorstehend beschriebenen Test in einer Dosis-abhängigen Art, auch beliebige der gleichen zellmodulatorischen Aktivitäten aufweisen (besonders immunmodulatorisch). Obwohl der Grad der Dosis-abhängigen Aktivität nicht mit der des Neutrokin- α -Proteins identisch sein muss, wird „ein Polypeptid, welches Neutrokin- α -Aktivität aufweist“ im Wesentlichen ähnliche Dosis-Abhängigkeit in einer bestimmten Aktivität, verglichen mit dem Neutrokin- α -Protein, aufweisen (d.h. das in Betracht kommende Polypeptid wird größere Aktivität oder nicht mehr als etwa 25-fach geringere und vorzugsweise nicht mehr als etwa zehnfach geringere Aktivität verglichen mit dem Referenz-Neutrokin- α -Protein zeigen).

[0066] Wie andere Mitglieder der TNF-Familie, zeigt Neutrokin- α eine Aktivität auf Leukozyten, einschließlich zum Beispiel Monocyten, Lymphozyten und Neutrophile. Aus diesem Grund ist Neutrokin- α in der Lenkung der Proliferation, Differenzierung und Migration dieser Zelltypen wirksam. Eine solche Aktivität ist für die Immunverstärkung oder -unterdrückung, Schutz des Rückenmarks, Stammzellenaktivierung, Kontrolle akuter und chronischer Entzündung und Behandlung von Leukämie nützlich. Tests zum Messen solcher Aktivität sind im Fachgebiet bekannt. Zum Beispiel siehe Peters et al., Immun. Today 17:273 (1996); Young et al., J. Exp. Med. 182:1111 (1995); Caux et al., Nature 390:258 (1992); und Santiago-Schwarz et al., Adv. Exp. Med. Biol. 378:7 (1995).

[0067] Aufgrund der Degeneration des genetischen Codes wird ein Fachmann natürlich sofort erkennen, dass eine große Zahl der Nucleinsäuremoleküle, die eine Sequenz aufweisen die mindestens 90%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch ist zu der Nucleinsäuresequenz der hinterlegten cDNA oder der in **Fig. 1** (SEQ ID NR: 1) gezeigten Nucleinsäuresequenz, ein Polypeptid codieren wird, welches „Neutrokin- α -Protein-Aktivität aufweist“. Da degenerierte Varianten dieser Nucleotidsequenzen eigentlich alle das gleiche Polypeptid codieren, wird das einem Fachmann sogar ohne Durchführung des vorstehend beschriebenen Vergleichstest klar sein. Es wird ferner im Fachgebiet für solche Nucleinsäuremoleküle, die keine degenerierte Varianten sind, anerkannt werden, dass eine angemessene Zahl auch ein Polypeptid codieren wird, das Neutrokin- α -Aktivität aufweist. Das liegt daran, dass sich der Fachmann die Aminosäuresubstitutionen kennt, die wie nachstehend weiter beschrieben wird, die Proteinfunktion voraussichtlich entweder wenig oder nicht erheblich beeinflussen werden (z.B.: Ersetzen einer aliphatischen Aminosäure mit einer zweiten aliphatischen Aminosäure).

Vektoren und Wirtszellen

[0068] Die vorliegende Erfindung betrifft auch Vektoren, welche die DNA-Moleküle der vorliegenden Erfindung beinhalten, Wirtszellen, die mit den rekombinanten Vektoren gentechnisch erzeugt werden und die Herstellung von Neutrokin- α -Polypeptiden oder Fragmenten davon durch rekombinante Methoden. Der Vektor kann zum Beispiel ein Phage, Plasmid, viraler oder retroviraler Vektor sein. Retrovirale Vektoren können replikationsfähig oder replikationsdefekt sein. Im letzteren Fall wird die virale Vermehrung im Allgemeinen nur in komplementierenden Wirtszellen vorkommen. Die Polynucleotide können mit einem Vektor verbunden sein, der einen auswählbaren Marker zur Vermehrung in einem Wirt enthält. Im Allgemeinen wird ein Plasmidvektor in ein Präzipitat, wie zum Beispiel ein Kalziumphosphat-Präzipitat, eingeführt oder in einen Komplex mit einem geladenen Lipid. Wenn der Vektor ein Virus ist, kann er unter Verwendung einer entsprechenden Verpackungs-Zelllinie *in vitro* verpackt werden und dann in Wirtszellen transduziert werden.

[0069] Das DNA-Insert sollte funktionsfähig mit einem entsprechenden Promotor, wie zum Beispiel dem PL-Promotor des Lamda-Phagen, den *E. coli* lac-, trp-, phoA- und tac-Promotoren, den SV40 frühen- und späten-Promotoren und Promotoren der retroviralen LTRs, um einige zu nennen, verbunden sein. Einem Fachmann werden andere geeignete Promotoren bekannt sein. Die Expressionsprodukte werden ferner Stellen für Transkriptionsinitiation, Termination und im transkribierten Bereich eine Ribosomenbindungsstelle für die Translation enthalten. Der codierende Teil der extrazellulären Domäne der durch die Konstrukte exprimierten Transkripte wird vorzugsweise eine Translationsinitiations- am Beginn und ein -terminationscodon (UAA, UGA oder UAG) einschließen, welches geeigneter Weise am Ende des zu translatierenden Polypeptids positioniert ist.

[0070] Wie angedeutet werden die Expressionsvektoren bevorzugt mindestens einen selektierbaren Marker einschließen. Solche Marker schließen Dihydrofolat-Reduktase, G418 oder Neomycin-Resistenz für eukaryotische Zellkultur und Tetracyclin-, Kanamycin- oder Ampicillin-Resistenzgene für die Züchtung in *E. coli* oder Bakterien ein. Repräsentative Beispiele von geeigneten Wirten schließen ein, sind aber nicht limitiert auf bakterielle Zellen, wie zum Beispiel *E. coli*, *Streptomyces* und *Salmonella typhimurium* Zellen; Pilzzellen wie zum Beispiel Hefezellen; Insektenzellen wie *Drosophila* S2 und *Spodoptera Sf9* Zellen; tierische Zellen wie CHO, COS, 293 und Bowes-Melanomazellen; und Pflanzenzellen. Geeignete Kulturmedien und Bedingungen für die vorstehend beschriebenen Wirtszellen sind im Fachgebiet bekannt.

[0071] Unter den für die Verwendung in Bakterien bevorzugten Vektoren sind pQE70, pQE60 und pQE-9, erhältlich von QIAGEN, Inc., vorstehend, pBS-Vektoren, Phagescript-Vektoren, Bluescript-Vektoren, pNH8A, pNH16a, pNH18A, pNH46A, erhältlich von Stratagene; und ptrc99a, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5, erhältlich von Pharmacia. Unter den bevorzugten eukaryotischen Vektoren sind pWLNEO, pSV2CAT, pOG44, pXT1 und pSG, erhältlich von Stratagene; und pSVK3, pBPV, pMSG und pSVL, erhältlich von Pharmacia. Andere geeignete Vektoren werden für den Fachmann leicht erkennbar sein.

[0072] Die Einführung des Konstrukts in die Wirtszelle kann durch Kalziumphosphat-Transfektion, DEAE-Dextran vermittelte Transfektion, kationische Lipid-vermittelte Transfektion, Elektroporation, Transduktion, Infektion oder andere Verfahren bewerkstelligt werden. Solche Verfahren sind in vielen Standard-Laborhandbüchern wie zum Beispiel Davis et al., *Basic Methods In Molecular Biology* (1986) beschrieben.

[0073] Das Polypeptid kann in einer veränderten Form, wie zum Beispiel einem Fusionsprotein exprimiert werden und kann nicht nur Sekretionssignale sondern auch zusätzliche heterologe funktionelle Bereiche einschließen. Zum Beispiel kann ein Bereich von zusätzlichen Aminosäuren, besonders geladene Aminosäuren, zum N-Terminus des Polypeptids hinzugefügt werden, um die Stabilität und Fortdauer in der Wirtszelle, während der Reinigung oder während weiterer Behandlung und Lagerung zu verbessern. Auch Peptidreste können zum Polypeptid hinzugefügt werden, um die Reinigung zu erleichtern. Solche Bereiche können vor der endgültigen Herstellung des Polypeptids entfernt werden. Die Zugabe von Peptidresten zu Polypeptiden, um Sekretion oder Exkretion hervorzurufen, die Stabilität zu verbessern und unter anderem um die Reinigung zu erleichtern sind im Fachgebiet geläufige und routinemäßig durchgeführte Methoden. Ein bevorzugtes Fusionsprotein umfasst einen heterologen Bereich von Immunglobulin der für Stabilisierung und Reinigung der Proteine nützlich ist. Zum Beispiel offenbart EP-A-0 464 533 (kanadisches Gegenstück 2045869) Fusionsproteine umfassend verschiedene Teile der konstanten Region von Immunglobulin-Molekülen mit einem anderen menschlichen Protein oder Teil davon. In vielen Fällen ist der Fc-Teil in einem Fusionsprotein durch und durch von Vorteil für die Verwendung in Therapie und Diagnose und resultiert daher zum Beispiel in verbesserten pharmakokinetischen Eigenschaften (EP-A-0 232.262). Andererseits wäre es für manche Verwendungen wünschenswert, wenn der Fc-Teil entfernt werden könnte, nachdem das Fusionsprotein in der beschriebenen vorteilhaften

Weise exprimiert, nachgewiesen und gereinigt wurde. Das ist der Fall wenn sich der Fc-Teil als nachteilig bei der Verwendung in Therapie und Diagnose erweist, zum Beispiel wenn das Fusionsprotein als Antigen für Immunisierungen verwendet werden soll. In der Arzneistoffentdeckung sind zum Beispiel menschliche Proteine wie zum Beispiel hIL-5 zum Zweck von Durchmusterungstests mit hoher Durchsatzleistung mit Fc-Teilen fusioniert, um Antagonisten von hIL-5 zu identifizieren. Siehe D. Bennett et al., J. Molecular Recognition 8:52-58 (1995) und K. Johanson et al., J. Biol. Chem. 270:9459-9471 (1995).

[0074] Das Neutrokin- α -Protein kann aus rekombinanten Zellkulturen durch gut bekannte Verfahren, einschließlich Ammoniumsulfat oder Ethanolpräzipitation, Säureextraktion, Anionen- oder Kationenaustausch-Chromatographie, Phosphozellulose-Chromatographie, hydrophobe Interaktions-Chromatographie, Affinitätschromatographie, Hydroxyapatit-Chromatographie und Lektin-Chromatographie gewonnen werden. Besonders bevorzugt wird Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) bei der Reinigung angewandt. Polypeptide der vorliegenden Erfindung schließen natürlich gereinigte Produkte, Produkte von chemischen synthetischen Verfahren und Produkte hergestellt durch rekombinanten Verfahren von einem prokaryotischen oder eukaryotischen Wirt, einschließlich zum Beispiel Bakterien, Hefe, höhere Pflanzen, Insekten- und Säugerzellen ein. Abhängig von dem in einem rekombinanten Produktionsverfahren verwendeten Wirt, können die Polypeptide der vorliegenden Erfindung glycosyliert oder nicht-glycosyliert sein. Außerdem können die Polypeptide der Erfindung auch einen modifizierten Start-Methioninrest einschließen, in manchen Fällen als ein Ergebnis Wirts-vermittelter Vorgänge.

Neutrokin- α -Polypeptide und Fragmente

[0075] Die Erfindung stellt ferner ein Neutrokin- α -Polypeptid bereit, welches die Aminosäuresequenz aufweist, die durch die hinterlegte cDNA codiert ist oder die Aminosäuresequenz in **Fig. 1** (SEQ ID NR: 2), oder ein Peptid oder Polypeptid, das einen Teil der vorstehend beschriebenen Polypeptide, die Neutrokin- α -Aktivität aufweisen, umfassen.

Varianten und Mutanten der Polypeptide

[0076] Protein-Technologie kann eingesetzt werden, um die Eigenschaften der Neutrokin- α -Polypeptide zu verbessern und zu ändern. Rekombinante DNA-Technologie, die Fachleuten bekannt ist, kann verwendet werden, um neue Mutationsproteine oder „Muteine“ zu schaffen, die einzelne oder mehrfache Aminosäuresubstitutionen, Deletionen, Additionen oder Fusionsproteine beinhalten. Solche veränderten Polypeptide können z.B.: gesteigerte Aktivität und erhöhte Stabilität zeigen. Außerdem können sie mit höheren Erträgen gereinigt werden und zeigen bessere Löslichkeit als die entsprechenden natürlichen Polypeptide, zumindest unter bestimmten Reinigungs- und Lagerungsbedingungen.

N-terminale und C-terminale Deletionsmutanten

[0077] Es ist im Fachgebiet gut bekannt, dass zum Beispiel für viele Proteine, einschließlich der extrazellulären Domäne oder reifen Formen) eines abgesonderten Proteins eine oder mehrere Aminosäuren vom N-Terminus oder C-Terminus ohne einen erheblichen Verlust der biologischen Funktion entfernt werden können. Zum Beispiel haben Ron et al., J. Biol. Chem., 268:2984-2988 (1993) berichtet, dass veränderte KGF-Proteine, sogar Heparin-Bindungsaktivität aufwiesen wenn 3, 8, oder 27 aminoterminalen Aminosäurereste fehlten.

[0078] Im vorliegenden Fall kann das Protein der Erfindung, nachdem es ein Mitglied der TNF-Polypeptidfamilie ist, bei Deletionen der N-terminalen Aminosäuren bis zu den Gly (G)-Resten auf Position 191 in **Fig. 1** (SEQ ID NR: 2) etwas biologische Aktivität, wie zum Beispiel Cytotoxizität für geeignete Zielzellen, beibehalten. Von Polypeptiden mit weiteren N-terminalen Deletionen einschließlich Gly(G)-Rest würde nicht erwartet werden, dass sie solche biologischen Aktivitäten beibehalten, da bekannt ist, dass dieser Rest in mit TNF verwandten Polypeptiden der Anfang der konservierten Domäne ist, die für die biologischen Aktivitäten benötigt wird. Sogar wenn die Deletion einer oder mehrerer Aminosäuren vom N-Terminus eines Proteins jedoch zu Veränderung oder Verlust einer oder mehrerer biologischer Funktionen des Proteins führt, können andere biologische Aktivitäten immer noch erhalten bleiben. Die Fähigkeit des verkürzten Proteins Antikörper zu induzieren und/oder zu binden, welche die gesamte oder die extrazelluläre Domäne des Proteins erkennen, wird daher im Allgemeinen erhalten bleiben, wenn weniger als die Mehrheit der Reste der gesamten oder extrazellulären Domäne des Proteins vom N-Terminus entfernt wird. Ob ein bestimmtes Polypeptid, dem die N-terminalen Reste eines Gesamtproteins fehlen, solche immunologischen Aktivitäten beibehält, kann durch hierin beschriebene Routine- und ansonsten im Fachgebiet bekannte Verfahren leicht bestimmt werden.

[0079] Demgemäß stellt die vorliegende Erfindung ferner Polypeptide bereit, die einen oder mehrere Reste vom Aminoterminus der Aminosäuresequenz des in **Fig. 1** (SEQ ID NR: 2) gezeigten Neutrokin- α -Proteins, bis zum Gly191-Rest vom Amino-Terminus und Polynucleotide aufweisen, die solche Polypeptide codieren. Im Besonderen stellt die vorliegende Erfindung Polypeptide bereit, welche die Aminosäuresequenz der Reste n-285 von SEQ ID NR: 2 aufweisen, wobei n eine Ganzzahl im Bereich von 2 – 190 ist und 191 die Position des ersten Restes vom N-Terminus des gesamten Neutrokin- α -Polypeptids (gezeigt in SEQ ID NR: 2), von dem angenommen wird, dass es für die Aktivität des Neutrokin- α -Proteins benötigt wird. Spezieller stellt die Erfindung Polynucleotide bereit, die Polypeptide codieren, welche die Aminosäuresequenz der Reste 2-285, 3-285, 4-285, 5-285, 6-285, 7-285, 8-285, 9-285, 10-285, 11-285, 12-285, 13-285, 14-285, 15-285, 16-285, 17-285, 18-285, 19-285, 20-285, 21-285, 22-285, 23-285, 24-285, 25-285, 26-285, 27-285, 28-285, 29-285, 30-285, 31-285, 32-285, 33-285, 34-285, 35-285, 36-285, 37-285, 38-285, 39-285, 40-285, 41-285, 42-285, 43-285, 44-285, 45-285, 46-285, 47-285, 48-285, 49-285, 50-285, 51-285, 52-285, 53-285, 54-285, 55-285, 56-285, 57-285, 58-285, 59-285, 60-285, 61-285, 62-285, 63-285, 64-285, 65-285, 66-285, 67-285, 68-285, 69-285, 70-285, 71-285, 72-285, 73-285, 74-285, 75-285, 76-285, 77-285, 78-285, 79-285, 80-285,, 81-285, 82-285, 83-285, 84-285, 85-255, 86-285, 87-285, 88-285, 89-285, 90-285, 91-285, 92-285, 93-285, 94-285, 45-285, 96-285, 97-285, 98-285, 99-285, 100-285, 101-285, 102-285, 103-285, 104-285, 105-285, 106-285, 107-285, 108-285, 109-285, 110-285, 111-285, 112-285, 113-285, 114-285, 115-285, 116-285, 117-285, 118-285, 119-285, 120-285, 121-285, 122-285, 123-285, 124-285, 125-285, 126-285, 127-285, 128-285, 129-285, 130-285, 131-285, 132-285, 133-285, 134-285, 135-285, 136-285, 137-285, 138-285, 139-285, 140-285, 141-285, 142-285, 143-285, 144-285, 145-285, 146-285, 147-285, 148-285, 149-285, 150-285, 151-285, 152-285, 153-285, 154-285, 155-285, 156-285, 157-285, 158-285, 159-285, 160-285, 161-285, 162-285, 163-285, 164-285, 165-285, 166-285, 167-285, 168-285, 169-285, 170-285, 171-285, 172-285, 173-285, 174-285, 175-285, 176-285, 177-285, 178-285, 179-285, 180-285, 181-285, 182-285, 183-285, 184-285, 185-285, 186-285, 187-285, 188-285, 189-285, 190-285, von SEQ ID NR: 2 aufweisen.

[0080] Polynucleotide, die diese Polypeptide codieren werden auch bereitgestellt.

[0081] In ähnlicher Weise sind viele Beispiele biologisch funktioneller C-terminaler Deletions-Muteine bekannt. Zum Beispiel zeigt Gamma-Interferon durch die Deletion von 8–10 Aminosäureresten vom Carboxyterminus des Proteins (Döbeli et al., J. Biotechnology 7:199-216 (1988)) bis zu 10mal höhere Aktivitäten. Nachdem das vorliegende Protein ein Mitglied der TNF-Polypeptidfamilie ist, wird von Deletionen der C-terminalen Aminosäuren, bis zum Leu auf Position 284 erwartet, dass sie die meisten, wenn nicht alle biologischen Aktivitäten, wie zum Beispiel Rezeptorbindung und Modulation der Zellreplikation, beibehalten. Polypeptide die bis zu etwa 10 zusätzlichen C-terminalen Resten aufweisen (d.h. bis zum Gly-Rest auf Position 273) können auch etwas Aktivität, wie zum Beispiel Rezeptorbindung, beibehalten, obwohl solchen Polypeptide ein Teil der konservierten TNF-Domäne fehlt, beginnend etwa bei Leu284. Sogar wenn die Deletion von einer oder mehreren Aminosäuren vom C-Terminus eines Proteins jedoch zu Änderung oder Verlust einer oder mehrerer biologischen Funktionen des Proteins führt, können andere biologische Aktivitäten noch immer beibehalten werden. Die Fähigkeit eines verkürzten Proteins Antikörper zu induzieren und/oder zu binden, die das gesamte oder reife Protein erkennen, wird daher im Allgemeinen beibehalten, wenn weniger als die Mehrheit der Reste des gesamten oder reifen Proteins vom C-Terminus entfernt werden. Ob ein bestimmtes Polypeptid, dem die C-terminalen Reste des Gesamtproteins fehlen, solche immunologischen Aktivitäten beibehält, kann leicht durch hierin beschriebene und ansonsten im Fachgebiet bekannte Verfahren bestimmt werden.

[0082] Demgemäß stellt die vorliegende Erfindung ferner Polypeptide bereit, die einen oder mehrere Reste vom Carboxy-Terminus der Aminosäuresequenz des in **Fig. 1** (SEQ ID NR: 2) gezeigten Neutrokin- α -Proteins, bis zum Gly274-Rest vom Carboxy-Terminus und Polynucleotide aufweisen, die solche Polypeptide codieren. Im Besonderen stellt die vorliegende Erfindung Polypeptide bereit, welche die Aminosäuresequenz der Reste 1-m der Aminosäuresequenz in SEQ ID NR: 2 aufweisen, wobei m eine Ganzzahl im Bereich von 274 – 284 ist. Spezieller stellt die Erfindung Polynucleotide bereit, die Polypeptide codieren, welche die Aminosäuresequenz der Reste 1-274, 1-275, 1-276, 1-277, 1-278, 1-279, 1-280, 1-281, 1-282, 1-283 und 1-284 von SEQ ID NR: 2 aufweisen. Polynucleotide, die diese Polypeptide codieren werden auch bereitgestellt.

[0083] Außerdem bereitgestellt werden Polypeptide, welche eine oder mehrere Aminosäuren sowohl vom Amino-Terminus als auch vom Carboxy-Terminus entfernt haben, welche allgemein so beschrieben werden können, dass sie die Reste n-m der SEQ ID NR: 2 enthalten; wobei n und m Ganzzahlen wie vorstehend beschrieben, sind. Auch eingeschlossen sind Nucleotidsequenzen, welche ein Polypeptid beinhalten, bestehend aus einem Teil der gesamten Neutrokin- α -Aminosäuresequenz, codiert durch den in der ATCC-Hinterlegung vom 22. Oktober 1996 enthaltenen cDNA-Clon, wobei dieser Teil zwischen 1 bis 190 Aminosäuren vom Amino-Terminus oder zwischen 1 bis 11 Aminosäuren vom C-Terminus der gesamten Aminosäuresequenz, codiert

durch den cDNA-Clon im hinterlegten Clon (oder irgendeiner Kombination dieser N-terminalen und C-terminalen Deletionen), ausschließt. Polynucleotide, die alle der vorstehend beschriebenen Deletions-Polypeptide codieren, werden auch bereitgestellt.

Andere Mutanten

[0084] Zusätzlich zu terminalen Deletionsformen des vorstehend besprochenen Proteins wird der Fachmann verstehen, dass manche Aminosäuresequenzen des Neutrokin- α -Polypeptids ohne erheblichen Effekt auf Struktur oder Funktion des Proteins verändert werden können. Wenn solche Sequenzunterschiede bedacht werden, sollte man sich erinnern, dass es auf dem Protein kritische Bereiche geben wird, welche die Aktivität bestimmen.

[0085] Die Erfindung schließt daher ferner Variationen der Neutrokin- α -Polypeptide ein, die wesentliche Neutrokin- α -Polypeptidaktivität zeigen oder die Bereiche des Neutrokin- α -Proteins, wie die nachstehend besprochenen Proteinbereiche, einschließen. Solche Mutanten schließen Deletionen, Insertionen, Inversionen, Wiederholungen und Typsubstitutionen ein, die gemäß den allgemeinen im Fachgebiet bekannten Regeln so ausgewählt werden, dass sie einen geringen Einfluss auf die Aktivität zu haben. Zum Beispiel wird in Bowie, J. U. et al., „Deciphering the Message in Protein Sequences: Tolerance to Amino Acid Substitutions,“ Science 247:1306-1310 (1990) eine Anleitung bezüglich der Herstellung phänotypisch stiller Aminosäure-Substitutionen bereitgestellt, wobei die Autoren darauf hinweisen, dass es zwei Hauptansätze zum Studieren der Toleranzänderung einer Aminosäuresequenz gibt. Das erste Verfahren verlässt sich auf den Vorgang der Evolution, in welchem Mutationen durch natürliche Selektion entweder akzeptiert oder zurückgewiesen werden. Der zweite Ansatz verwendet Gentechnologie, um Aminosäureänderungen bei spezifischen Positionen eines clonierten Gens einzuführen und Selektionen oder Durchmusterungen, um Sequenzen zu identifizieren, welche die Funktionalität aufrechterhalten.

[0086] Wie die Autoren angeben, haben diese Untersuchungen gezeigt, dass Proteine im Bezug auf Substitutionen überraschend tolerant sind. Die Autoren weisen ferner darauf hin, dass Aminosäureänderungen auf einer bestimmten Position des Proteins wahrscheinlich toleriert werden. Zum Beispiel benötigen die meisten verborgenen Aminosäurereste nicht-polare Seitenketten, wohingegen im Allgemeinen wenige Merkmale von Oberflächen-Seitenketten konserviert sind.

[0087] Andere solcher phänotypisch stillen Substitutionen werden in Bowie, J. U. et al., vorstehend und in den dort angeführten Literaturhinweisen beschrieben. Typischerweise werden Austausche unter den aliphatischen Aminosäuren Ala, Val, Leu und Ile, eine für eine andere, der Austausch der Hydroxylreste Ser und Thr untereinander, der Austausch der sauren Reste Asp und Glu, Substitutionen zwischen den Amid-Resten Asn und Gln, der Austausch der basischen Reste Lys und Arg und der Austausch unter den aromatischen Resten Phe, Tyr als konservative Substitutionen angesehen.

[0088] Daher kann das Fragment, Derivat oder Analog des Polypeptides von **Fig. 1** (SEQ ID NR: 2) welches Neutrokin- α -Aktivität aufweist, oder des durch die hinterlegte cDNA codierte (i) eines sein, in welchem ein oder mehrere Aminosäurereste mit einem konservierten oder nicht-konservierten Aminosäurerest (vorzugsweise einem konservierten Aminosäurerest) substituiert sind und solche substituierten Aminosäurereste können oder können nicht durch den genetischen Code codiert sein, oder (ii) eines, in welchem ein oder mehrere Aminosäurereste eine Substituentengruppe beinhalten, oder (iii) eines, in welchem die extrazelluläre Domäne des Polypeptids mit einer anderen Verbindung wie zum Beispiel einer Verbindung zur Verlängerung der Halbwertszeit des Polypeptids (zum Beispiel Polyethylenglycol), oder (iv) eines in welchem die zusätzlichen Aminosäuren mit der extrazellulären Domäne des Polypeptids verbunden sind, wie zum Beispiel ein IgG-Fc-Fusionsregions-Peptid oder eine Leader- oder sekretorische Sequenz oder eine Sequenz, die zur Reinigung der extrazellulären Domäne des Polypeptids eingesetzt wird oder eine Pro-Proteinsequenz. Solche Fragmente, Derivate oder Analoge werden aufgrund der Lehren hierin, von Fachleuten als im Rahmen erachtet.

[0089] Das Neutrokin- α der vorliegenden Erfindung kann daher ein oder mehrere Aminosäuresubstitutionen, Deletionen oder Additionen, entweder aufgrund natürlicher Mutationen oder menschlicher Manipulation, einschließen. Wie angedeutet sind die Änderungen vorzugsweise von geringem Ausmaß, wie zum Beispiel konservative Aminosäuresubstitutionen, die keine erhebliche Wirkung auf Faltung oder Aktivität des Proteins haben (siehe Tabelle 1).

TABELLE 1. Konservative Aminosäuresubstitutionen

Aromatisch	Phenylalanin Tryptophan Tyrosin
Hydrophob	Leucin Isoleucin Valin
Polar	Glutamin Asparagin
Basisch	Arginin Lysin Histidin
Sauer	Asparaginsäure Glutaminsäure
Klein	Alanin Serin Threonin Methionin Glycin

[0090] Aminosäuren im Neutrokin- α -Protein der vorliegenden Erfindung, die für die Funktion unerlässlich sind können durch im Fachgebiet bekannte Verfahren wie zum Beispiel zielgerichtete Mutagenese oder Alanin-Scanning-Mutagenese (Cunningham und Wells, Science 244:1081-1085 (1989)) identifiziert werden. Das letztere Verfahren führt in jeden Rest des Moleküls einzelne Alanin-Mutationen ein. Die daraus resultierenden mutierten Moleküle werden auf biologische Aktivität wie zum Beispiel Rezeptorbindung oder in vitro oder in vitro proliferative Aktivität untersucht.

[0091] Von speziellem Interesse sind Substitutionen von geladenen Aminosäuren mit anderen geladenen oder neutralen Aminosäuren, welche Proteine mit höchst wünschenswerten verbesserten Eigenschaften, wie zum Beispiel geringere Aggregation, erzeugen können. Aggregation kann nicht nur die Aktivität verringern sondern auch bei der Herstellung pharmazeutischer Formulierungen Schwierigkeiten bereiten, da Aggregate immunogen sein können (Pinckard et al., Clin. Exp. Immunol. 2:331-340 (1967); Robbins et al., Diabetes 36:838-845 (1987); Cleland et al., Crit. Rev. Therapeutic Drug Carrier Systems 10:307-377 (1993).

[0092] Der Austausch von Aminosäuren kann auch die Bindungsselektivität eines Liganden and Zelloberflächenrezeptoren ändern. Zum Beispiel beschreibt Ostade et al., Nature 361:266-268 (1993) bestimmte Mutationen, die in der selektiven Bindung von TNF- α an nur einen der beiden bekannten Typen der TNF-Rezeptoren

resultieren. Nachdem Neutrokin- α ein Mitglied der TNF-Polypeptidfamilie ist, ist es wahrscheinlich, dass ähnliche Mutationen zu jenen in TNF- α , in Neutrokin- α ähnliche Effekte haben.

[0093] Stellen die für die Liganden-Rezeptorbindung kritisch sind können auch durch Strukturanalysen, wie zum Beispiel Kristallisation, kernmagnetische Resonanz oder Photoaffinitäts-Markierung (Smith et al., J. Mol. Biol. 224:899-904 (1992) und de Vos et al., Science 255:306-312 (1992)), bestimmt werden. Nachdem Neutrokin- α ein Mitglied der mit TNF verwandten Proteinfamilie ist werden, um die biologischen Aktivitäten von Neutrokin- α eher zu verändern als sie total zu eliminieren, vorzugsweise Mutationen in Sequenzen gemacht, die Aminosäuren der konservierten Domäne von TNF codieren, d.h. in den Positionen 191–284 von **Fig. 1** (SEQ ID NR: 2), stärker bevorzugt in Resten innerhalb dieser Region, die nicht in allen Mitgliedern der TNF-Familie konserviert sind. Durch Herstellung einer spezifischen Mutation in Neutrokin- α in der Position, wo eine solche konservierte Aminosäure in der Regel in den verwandten TNFs gefunden wird, wird Neutrokin- α als ein Antagonist wirken und auf diese Weise antigene Aktivität besitzen. Demgemäß schließen die Polypeptide der vorliegenden Erfindung Neutrokin- α -Mutanten ein. Solche Neutrokin- α -Mutanten setzen sich aus Gesamtlänge oder vorzugsweise der extrazellulären Domäne der in **Fig. 1** (SEQ ID NR: 2) gezeigten Neutrokin- α -Aminosäuresequenz zusammen. Ein Teil der vorliegenden Erfindung wird auch von isolierten Polynucleotiden gebildet, umfassend Nucleinsäuresequenzen, welche die vorstehenden Neutrokin- α -Mutanten codieren.

[0094] Die Polypeptide der vorliegenden Erfindung werden vorzugsweise in einer isolierten Form bereitgestellt und sind vorzugsweise im wesentlichen gereinigt. Eine rekombinant erzeugte Version des Neutrokin- α -Polypeptids kann durch das in Smith und Johnson, Gene 67:31-40 (1988) beschriebene Ein-Schritt-Verfahren im wesentlichen gereinigt werden.

[0095] Die Polypeptide der vorliegenden Erfindung schließen das gesamte durch die hinterlegte cDNA codierte Polypeptid ein, einschließlich den intrazellulären-, Transmembran- und extrazellulären Domänen des durch die hinterlegte cDNA codierten Polypeptids, die extrazelluläre Domäne ohne den intrazellulären und Transmembrandomänen des Proteins, das gesamte Polypeptid von **Fig. 1** (SEQ ID NR: 2), die extrazelluläre Domäne von **Fig. 1** (SEQ ID NR: 2) ohne den intrazellulären und Transmembrandomänen sowie auch Polypeptide, die zumindest 90% Ähnlichkeit, stärker bevorzugt mindestens 95% Ähnlichkeit und noch stärker bevorzugt mindestens 96%, 97%, 98% oder 99% Ähnlichkeit zu jenen vorstehend beschriebenen haben.

[0096] Mit „% Ähnlichkeit“ für zwei Polypeptide ist eine Bewertung der Ähnlichkeit gemeint, die durch Vergleich der Aminosäuresequenzen der beiden Polypeptide unter Verwendung des Bestfit-Programms (Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 for Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, WI 53711) und den Standardeinstellungen zur Bestimmung der Ähnlichkeit erzeugt wird. Bestfit verwendet den lokalen Homologie Algorithmus von Smith und Waterman (Advances in Applied Mathematics 2:482-489, 1981), um den Abschnitt mit der größten Ähnlichkeit zwischen zwei Sequenzen zu finden.

[0097] Bei einem Polypeptid, welches eine Aminosäuresequenz von zum Beispiel mindestens 95% „identisch“ zu einer Referenz-Aminosäuresequenz eines Neutrokin- α -Polypeptids aufweist ist vorgesehen, dass die Aminosäuresequenz des Polypeptids identisch zur Referenzsequenz ist außer, dass die Polypeptidsequenz bis zu fünf Aminosäureänderungen pro 100 Aminosäuren der Referenzaminosäure des Neutrokin- α -Polypeptids beinhalten kann. Mit anderen Worten können bis zu 5% der Aminosäurereste der Referenzsequenz entfernt oder mit einer anderen Aminosäure ausgetauscht werden oder eine Zahl von Aminosäuren, bis zu 5% der gesamten Aminosäurereste in der Referenzsequenz, in die Referenzsequenz inseriert werden, um ein Polypeptid zu erhalten, welches eine Aminosäuresequenz aufweist, die mindestens 95% identisch ist zu einer Referenzaminosäuresequenz. Diese Änderungen der Referenzsequenz können an den Amino- oder Carboxy-terminalen Positionen der Referenz-Aminosäuresequenz stattfinden oder irgendwo zwischen jenen terminalen Positionen, entweder einzeln hier und da unter den Resten in der Referenzsequenz eingefügt oder in einer oder mehreren zusammenhängenden Gruppen innerhalb der Referenzsequenz.

[0098] Als eine praktische Angelegenheit, ob irgendein besonderes Polypeptid zum Beispiel mindestens 90%, 95%, 96%, 97% 98% oder 99% identisch ist zu der in **Fig. 1** (SEQ ID NR: 2) gezeigten Aminosäuresequenz oder zu der Aminosäuresequenz, die durch den hinterlegten cDNA Clon codiert ist, kann herkömmlicherweise unter Verwendung bekannter Computerprogramme wie das Bestfit-Programm (Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 for Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, WI 53711) bestimmt werden. Wenn Bestfit oder irgendein anderes Sequenzvergleichsprogramm verwendet wird, um zu bestimmen ob eine bestimmte Sequenz gemäß der vorliegenden Erfindung zum Beispiel 95% identisch ist zu einer Referenzsequenz, werden die Parameter natürlich so eingestellt, dass

der Prozentsatz der Identität über die Länge der gesamten Referenz-Aminosäuresequenz berechnet wird und, dass Homologielücken bis zu 5% in der Gesamtzahl der Aminosäurereste in der Referenzsequenz erlaubt werden.

[0099] Das Polypeptid der vorliegenden Erfindung könnte als ein Molekulargewichtsmarker auf SDS-PAGE-Gelen oder auf molekularen Sieb-Gelfiltrationssäulen unter Verwendung von Verfahren verwendet werden die Fachleuten gut bekannt sind.

[0100] Wie nachstehend im Detail beschrieben können die Polypeptide der vorliegenden Erfindung auch benutzt werden, um polyclonale und monoclonale Antikörper zu erzeugen, welche wie nachstehend beschrieben, in Tests zum Nachweis der Neutrokin- α -Proteinexpression verwendbar sind oder als Agonisten und Antagonisten, die in der Lage sind die Neutrokin- α -Proteinfunktion zu verstärken oder zu hemmen. Weiterhin können solche Polypeptide im Zwei-Hybridsystem von Hefe verwendet werden, um Neutrokin- α -Protein-Bindungsproteine einzufangen, die gemäß der vorliegenden Erfindung auch in Betracht kommende Agonisten oder Antagonisten sind. Das Hefe-Zwei-Hybridsystem ist in Fields und Song, Nature 340:245-246 (1989) beschrieben.

Epitop-tragende Teile

[0101] In einem anderen Aspekt wird ein Peptid oder Polypeptid, umfassend einen Epitop-tragenden Anteil eines Polypeptids der Erfindung offenbart. Das Epitop dieses Polypeptidteils ist ein immunogenes oder antigenes Epitop eines Polypeptids der Erfindung. Ein „immunogenes Epitop“ wird als ein Teil eines Proteins definiert, welches eine Antikörperreaktion hervorruft, wenn das gesamte Protein das Immunogen ist. Andererseits wird ein Bereich eines Proteinmoleküls an welches ein Antikörper binden kann als ein „antigenes Epitop“ definiert. Die Zahl der immunogenen Epitope eines Proteins ist allgemein geringer als die Zahl der antigenen Epitope. Siehe zum Beispiel Geysen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3998-4002 (1983).

[0102] Bezüglich der Selektion von Peptiden oder Polypeptiden, die antigene Epitope tragen (d.h. die einen Bereich eines Proteinmoleküls enthalten, an welches ein Antikörper binden kann) ist es im Fachgebiet wohl bekannt, dass relativ kurze synthetische Peptide, die einen Teil eines Proteins imitieren routinemäßig in der Lage sind ein Antiserum auszulösen, welches mit dem teilweise imitierten Protein reagiert. Siehe zum Beispiel Sutcliffe, J. G., Shinnick, T. M., Green, N. und Learner, R. A. (1983) „Antibodies that react with predetermined sites on proteins“, Science, 219:660-666. Peptide die in der Lage sind protein-reaktive Seren auszulösen sind häufig in der Primärsequenz eines Proteins repräsentiert und können sich durch eine Gruppe einfacher chemischer Regeln charakterisiert werden und sind weder auf immundominante Bereiche von intakten Proteinen (d.h. immunogene Epitope) beschränkt noch auf die Amino- oder Carboxyl-Enden. Antigene Epitop-tragende Peptide und Polypeptide der Erfindung sind daher verwendbar, um Antikörper einschließlich monoclonale Antikörper auszulösen, die spezifisch an die Polypeptide der Erfindung binden. Siehe zum Beispiel Wilson et al., Cell 37:767-778 (1984) auf 777.

[0103] Antigene Epitop-tragende Peptide und Polypeptide enthalten vorzugsweise eine Sequenz von mindestens sieben, stärker bevorzugt mindestens neun und am stärksten bevorzugt zwischen etwa 15 bis etwa 30 Aminosäuren, die innerhalb der Aminosäuresequenz eines Polypeptids der Erfindung enthalten sind. Nicht imitierende Beispiele antigener Polypeptide oder Peptide, die verwendet werden können, um Neutrokin- α -spezifische-Antikörper herzustellen, schließen ein: ein Polypeptid, umfassend Aminosäurereste von etwa Phe-115 bis etwa Leu-147 in **Fig. 1** (SEQ ID NR: 2); ein Polypeptid, umfassend Aminosäurereste von etwa Ile-150 bis etwa Tyr-163 in **Fig. 1** (SEQ ID NR: 2); ein Polypeptid, umfassend Aminosäurereste von etwa Ser-171 bis etwa Phe-194 in **Fig. 1** (SEQ ID NR: 2); ein Polypeptid, umfassend Aminosäurereste von etwa Glu-223 bis etwa Tyr-247 in **Fig. 1** (SEQ ID NR: 2); ein Polypeptid, umfassend Aminosäurereste von etwa Ser-271 bis etwa Phe-278 in **Fig. 1** (SEQ ID NR: 2); diese Polypeptidfragmente sind, wie vorstehend in **Fig. 3** gezeigt, durch den Jameson-Wolf-Antigenen-Index, als antigene Epitope tragende Neutrokin- α -Proteine bestimmt worden.

[0104] Epitop-tragende Peptide und Polypeptide können durch irgendwelche herkömmliche Mittel hergestellt werden. Siehe z.B.: Houghten, R. A. (1985) General method for the rapid solid-phase synthesis of large numbers of peptides: specificity of antigen-antibody interaction at the level of individual amino acids. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:5131-5135; dieses Verfahren der "gleichzeitigen multiplen Peptidsynthese (SMPS)" wird im U. S. Patent Nr. 4.631.211, zu Houghten et al. (1986), näher beschrieben.

[0105] Epitop-tragende Peptide und Polypeptide werden verwendet, um Antikörper gemäß im Fachgebiet gut bekannter Verfahren zu induzieren. Siehe zum Beispiel Sutcliffe et al., vorstehend; Wilson et al., vorstehend, Chow, M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:910-914; und Bittle, F. J. et al., J. Gen. Virol 66:2347-2354

(1985). Immunogene Epitop-tragende Peptide, d. h. jene Teile eines Proteins die eine Antikörperreaktion auslösen, wenn das gesamte Protein das Immunogen ist, werden gemäß den im Fachgebiet bekannten Verfahren identifiziert. Siehe zum Beispiel Geysen et al., vorstehend. Näher noch zu Geysen (1990) beschreibt U.S. Patent Nr. 5.194.392 ein allgemeines Verfahren zum Nachweis oder zur Bestimmung der Sequenz von Monomeren (Aminosäuren oder andere Verbindungen), welches ein topologisches Äquivalent des Epitops (d.h. ein „Mimotop“) darstellt, das komplementär zu einem bestimmten Paratop (Antigen-Bindungsteile) eines Antikörpers von Interesse ist. Allgemeiner gesagt beschreibt das U.S. Patent Nr. 4.433.092, zu Geysen (1989), ein Verfahren zum Nachweis oder der Bestimmung einer Sequenz von Monomeren, die ein topographisches Äquivalent eines Liganden ist, der komplementär zu der Ligandenbindungsstelle eines bestimmten Rezeptors von Interesse ist. Ähnlich offenbart U.S. Patent Nr. 5.480.971 zu Houghten, R. A. et al. (1996) über peralkylierte Oligopeptid-Gemische, lineare C1-C7-Alkyl peralkylierte Oligopeptide und Gruppen und Genbanken solcher Peptide, sowie auch Verfahren zur Verwendung solcher Oligopeptid-Gruppen und Genbanken zur Bestimmung der Sequenz eines peralkylierten Oligopeptids, welches vorzugsweise an ein Akzeptor-Molekül von Interesse bindet. Folglich können nicht-Peptidanaloge der Epitoptragenden Peptide der Erfindung auch routinemäßig durch diese Verfahren hergestellt werden.

Fusionsprofeine

[0106] Wie ein Fachmann verstehen wird, können Neutrokin- α -Polypeptide der Erfindung und die vorstehend beschriebenen Epitop-tragenden Fragmente davon mit Teilen der konstanten Domäne von Immunglobulinen (IgG) vereinigt werden, was in chimere Polypeptiden resultiert. Diese Fusionsproteine erleichtern die Reinigung und zeigen eine erhöhte Halbwertszeit in vivo. Das wurde zum Beispiel für chimere Proteine bestehend aus den ersten beiden Domänen des menschlichen CD4-Polypeptides und verschiedenen Domänen der konstanten Region der schweren oder leichten Ketten von Säuger-Immunglobulinen (EP A 394.827; Traunecker et al., Nature 331:84-86 (1988)) gezeigt. Fusionsproteine, die aufgrund des IgG-Teils eine Disulfid-verbundene dimere Struktur aufweisen, können auch in der Bindung und Neutralisierung anderer Moleküle effizienter sein als das monomere Neutrokin- α -Protein oder Proteinfragment alleine (Fountoulakis et al., J. Biochem. 270:3958-3964 (1995)).

Diagnose von mit dem Immunsystem in Zusammenhang stehenden Erkrankungen

[0107] Die gegenwärtigen Erfinder haben herausgefunden, dass Neutrokin- α in verschiedenen Geweben und besonders in Neutrophilen exprimiert wird. Für eine Reihe Erkrankungen, die mit dem Immunsystem in Zusammenhang stehen, können wesentlich veränderte (erhöhte oder verminderte) Level der Neutrokin- α -Genexpression im Gewebe des Immunsystems oder in anderen Zellen oder Körperflüssigkeiten nachgewiesen werden (z.B.: Serum, Plasma, Harn, Gelenksflüssigkeit oder Rückenmarksflüssigkeit), entnommen von einer Person, die eine solche Erkrankung hat, relativ zu einer „Standard“-Neutrokin- α -Genexpressionsmenge, das heißt der Neutrokin- α -Genexpressionslevel in Geweben des Immunsystems oder Körperflüssigkeiten einer Person, die keine Erkrankung des Immunsystems hat. Die Erfindung stellt daher ein diagnostisches Verfahren bereit, das während der Diagnose einer System-Erkrankung nützlich ist, welches die Messung des Expressionslevels des das Neutrokin- α -Protein codierenden Gens in Geweben des Immunsystems oder anderen Zellen oder Körperflüssigkeiten einer Person einschließt und den Vergleich des gemessenen Genexpressionslevels mit einem Standard-Neutrokin- α -Gen-Expressionslevel, wobei eine Erhöhung oder Erniedrigung der Genexpressionslevel, verglichen mit dem Standard, ein Hinweis auf eine Erkrankung des Immunsystems ist.

[0108] Im Besonderen wird angenommen, dass gewisse Gewebe in Säugern mit Immun-Krebs erheblich erhöhte oder verringerte Mengen des Neutrokin- α -Proteins und der das Neutrokin- α -Protein codierenden mRNA exprimieren, wenn sie mit dem „Standard“-Level verglichen werden. Ferner wird angenommen, dass erhöhte oder rückläufige Mengen des Neutrokin- α -Proteins in bestimmten Körperflüssigkeiten von Säugern mit einem solchen Krebs nachgewiesen werden können (z.B.: Serum, Plasma, Harn und Rückenmarksflüssigkeit), wenn sie mit dem Serum von Säugern der gleichen Spezies verglichen werden, die keinen Krebs haben.

[0109] Hierin wird daher ein diagnostisches Verfahren beschrieben, das während der Diagnose einer Erkrankung des Immunsystems, einschließlich Krebs dieses Systems, nützlich ist, welches die Messung des Expressionslevels des das Neutrokin- α -Protein codierenden Gens im Gewebe des Immunsystems oder anderen Zellen oder Körperflüssigkeiten von einer Person einschließt und Vergleich des gemessenen Genexpressionslevels mit einem Standard-Neutrokin- α -Expressionslevel, wobei eine Erhöhung oder eine Verminderung des Genexpressionslevels im Vergleich mit dem Standard ein Hinweis auf eine Erkrankung des Immunsystems ist.

[0110] Wo gemäß herkömmlicher Verfahren eine Diagnose einer Erkrankung im Immunsystem, einschließlich

einer Diagnose eines Tumors bereits gemacht wurde ist die vorliegende Erfindung als ein prognostischer Indikator nützlich, wobei Patienten, die erhöhte oder rückläufige Neutrokin- α -Genexpression aufweisen, im Vergleich mit Patienten die das Gen näher der Menge der Standardmenge exprimieren, ein schlechteres klinisches Ergebnis erfahren werden.

[0111] Mit „Testen des Expressionslevels des das Neutrokin- α -Protein exprimierenden Gens“ ist eine quantitative oder qualitative Messung oder Schätzung der Menge des Neutrokin- α -Proteins oder der Menge der das Neutrokin- α -Protein codierenden mRNA in einer ersten biologischen Probe vorgesehen, entweder direkt (z.B.: durch Bestimmung oder Schätzung der absoluten Proteinmenge oder mRNA-Menge) oder relativ (z.B.: durch Vergleich der Neutrokin- α -Proteinmenge oder mRNA-Menge in einer zweiten biologischen Probe). Vorzugsweise werden die Neutrokin- α -Proteinmengen oder mRNA-Mengen in der ersten biologischen Probe gemessen oder geschätzt und mit einer Standard-Neutrokin- α -Proteinmenge oder mRNA-Menge verglichen, der Standard wird von einer zweiten biologischen Probe genommen, die von einer Person erhalten wird, die keine Erkrankung aufweist oder durch Mittelwertbildung der Mengen einer Personenpopulation bestimmt, die keine Erkrankung des Immunsystems aufweist. Wie im Fachgebiet klar sein wird, kann die einmal bekannte Neutrokin- α -Proteinmenge oder mRNA-Menge wiederholt als Standard zum Vergleich verwendet werden.

[0112] Mit „biologischer Probe“ ist irgendeine biologische Probe vorgesehen, die von einer Person, Körperflüssigkeit, Zelllinie, Gewebekultur oder anderer Quelle erhalten wird, welche das Neutrokin- α -Protein oder die mRNA enthält. Wie angedeutet schließen biologische Proben Körperflüssigkeiten ein (wie Serum, Plasma, Harn, Gelenksflüssigkeit und Rückenmarksflüssigkeit), welche die freie extrazelluläre Domäne des Neutrokin- α -Proteins enthalten, Gewebe des Immunsystems und andere Gewebequellen, bei denen festgestellt wurde, dass sie die gesamte oder freie extrazelluläre Domäne des Neutrokin- α oder einen Neutrokin- α -Rezeptor exprimieren. Verfahren zur Erlangung von Gewebebiopsien und Körperflüssigkeiten von Säugern sind im Fachgebiet gut bekannt. Wo die biologische Probe mRNA enthalten soll, wird eine Gewebebiopsie als die bevorzugte Quelle angesehen.

[0113] Die vorliegende Erfindung ist für die Diagnose oder Behandlung von verschiedenen mit dem Immunsystem in Zusammenhang stehenden Erkrankungen in Säugern, vorzugsweise Menschen, nützlich. Solche Erkrankungen schließen ein, sind aber nicht beschränkt auf Tumore und Tumormetastasen, Infektionen durch Bakterien, Viren und andere Parasiten, Immundefizienzen, entzündliche Erkrankungen, Lymphadenopathie, Autoimmunerkrankungen und Transplantat-Gegen-Empfänger-Reaktion.

[0114] Gesamte zelluläre RNA kann von einer biologischen Probe unter Verwendung einer geeigneten Methode wie zum Beispiel dem Ein-Schritt Guanidium-Thiocyanat-Phenol-Chlorophorm-Verfahren, beschrieben in Chomczynski und Sacchi, Anal. Biochem. 162:156-159 (1987) isoliert werden. Mengen an mRNA, die das Neutrokin- α -Protein codieren werden dann unter Verwendung irgendeines geeigneten Verfahrens getestet. Diese schließen Northern-Blot-Analyse, S1-Nuclease-Mapping, die Polymerase-Kettenreaktion (PCR), reverse Transkription in Kombination mit der Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) und reverse Transkription in Kombination mit der Ligase-Kettenreaktion (RT-LCR) ein.

[0115] Der Test der Neutrokin- α -Proteinmengen in einer biologischen Probe kann unter Verwendung von auf Antikörper-basierenden Methoden stattfinden. Zum Beispiel kann die Expression des Neutrokin- α -Proteins in Geweben mit klassischen immunhistologischen Verfahren studiert werden (Jalkanen, M., et al., J. Cell. Biol. 101:976-985 (1985); Jalkanen, M., et al., J. Cell. Biol. 105:3087-3096 (1987)). Andere auf Antikörpern basierende Verfahren, die zum Nachweis der Neutrokin- α -Protein-Genexpression nützlich sind schließen Immuntests, wie zum Beispiel den Enzym-Immuntest (ELISA) und den Radioimmuntest (RIA) ein. Geeignete Markierungen für Antikörpertests sind im Fachgebiet gut bekannt und schließen Enzymmarkierungen wie zum Beispiel Glucoseoxidase, und Radioisotope wie zum Beispiel Jod (^{125}I , ^{121}I), Kohlenstoff (^{14}C), Schwefel (^{35}S), Tritium (^3H), Indium (^{112}In) und Technetium ($^{99\text{m}}\text{Tc}$) und fluoreszierende Markierung wie zum Beispiel Fluoreszein und Rhodamin und Biotin, ein.

[0116] Neutrokin- α -Protein kann zusätzlich zum Testen der Neutrokin- α -Proteinlevel in einer von einer Person erhaltenen biologischen Probe auch durch bildgebende Verfahren („imaging“) in vivo nachgewiesen werden. Antikörpermarkierungen oder Marker in vivo des Neutrokin- α -Proteins für die bildgebenden Verfahren schließen jene ein, die durch Radiographie, kernmagnetische Resonanz oder ESR nachweisbar sind. Geeignete Markierungen für Radiographie schließen Radioisotope wie Barium oder Cäsium ein, die nachweisbare Strahlung abgeben, die aber für die Testperson nicht offen schädlich sind. Geeignete Marker für kernmagnetische Resonanz und ESR schließen jene mit einem nachweisbaren charakteristischen Spin ein, wie zum Beispiel Deuterium, das durch Markierung von Nährstoffen für das relevante Hybridom in den Antikörper eingebaut wer-

den kann.

[0117] Ein für das Neutrokin- α -Protein spezifischer Antikörper oder Antikörperfragment, der (das) mit einem geeigneten nachweisbaren Rest für das bildgebende Verfahren, wie zum Beispiel einem Radioisotop (zum Beispiel ^{131}I , ^{112}I , $^{99\text{m}}\text{Tc}$), einer röntgenfähigen Substanz oder einem Material, das durch kernmagnetische Resonanz nachweisbar ist, markiert worden ist, wird (zum Beispiel parenteral, subkutan oder intraperitoneal) in den Säuger eingeführt, der auf eine Erkrankung des Immunsystems untersucht werden soll. Es wird im Fachgebiet klar sein, dass die Größe der Testperson und des Systems des bildgebenden Verfahrens die Qualität der Einheit des bildgebenden Verfahrens bestimmen wird, die benötigt wird, um diagnostische Bildgebungen zu erzeugen. Im Falle eines Radioisotoprestes für eine menschliche Testperson wird sich die injizierte Menge an Radioaktivität normalerweise zwischen etwa 5 und 20 Millicurie $^{99\text{m}}\text{Tc}$ bewegen. Der (das) markierte Antikörper oder Antikörperfragment wird dann vorzugsweise an der Stelle von Zellen akkumulieren, die Neutrokin- α -Protein enthalten. In vivo Tumorimaging wird in S.W. Burchiel et al., „Immunopharmacokinetics of Radiolabeled Antibodies and Their Fragments“ (Kapitel 13 in Tumor Imaging: The Radiochemical Detection of Cancer, S.W. Burchiel und B. A. Rhodes, Herausgeber Masson Publishing Inc. (1982)).

Antikörper

[0118] Neutrokin- α -Protein-spezifische Antikörper zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung können gegen intaktes Neutrokin- α -Protein oder ein antigenes Polypeptidfragment davon erzeugt werden, welches gemeinsam mit einem Trägerprotein, wie zum Beispiel einem Albumin einem tierischen System (wie Kaninchen oder Maus) präsentiert wird oder, wenn es lange genug ist (mindestens etwa 25 Aminosäuren), ohne einem Trägerstoff.

[0119] Der wie er hierin gebrauchte Begriff „Antikörper“ (Ak) oder „monoclonaler Antikörper“ (mAk) soll intakte Moleküle sowie auch Antikörperfragmente (wie zum Beispiel Fab- und F(ab')₂-Fragmente) einschließen, die in der Lage sind spezifisch an das Neutrokin- α -Protein zu binden. Fab- und F(ab')₂-Fragmenten fehlt das Fc-Fragment eines intakten Antikörpers, sie werden schneller aus dem Blutkreislauf entfernt und können weniger unspezifische Gewebefindung aufweisen als ein intakter Antikörper (Wahl et al., J. Nucl. Med. 24:316-325 (1983)). Diese Fragmente werden daher bevorzugt.

[0120] Die Antikörper der vorliegenden Erfindung können durch jedes einer Vielfalt an Verfahren erzeugt werden. Zum Beispiel können Zellen, die das Neutrokin- α -Protein oder ein antigenes Fragment davon exprimieren einem Tier verabreicht werden, um die Produktion von Seren zu induzieren, die polyclonale Antikörper enthalten. In einem bevorzugten Verfahren wird eine Aufbereitung des Neutrokin- α -Proteins erzeugt und gereinigt, um es im Wesentlichen frei von natürlichen verunreinigenden Substanzen zu machen. Eine solche Aufbereitung wird dann in eine tierische Zelle eingebracht, um polyclonale Antiseren von größerer spezifischer Aktivität zu erzeugen.

[0121] In einem besonders bevorzugten Verfahren sind die Antikörper der vorliegenden Erfindung monoclonale Antikörper (oder Neutrokin- α -Protein-Bindungsfragmente davon). Solche monoclonalen Antikörper können unter Verwendung der Hybridomtechnologie erzeugt werden (Köhler et al., Nature 256:495 (1975); Köhler et al., Eur. J. Immunol. 6:511 (1976); Köhler et al., Eur. J. Immunol. 6:292 (1976); Hammerling et al., in: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas, Elsevier, N.Y., (1981) Seiten 563-681). Im Allgemeinen schließen solche Verfahren die Immunisierung eines Tieres (vorzugsweise einer Maus) mit einem Neutrokin- α -Proteinantigen, oder stärker bevorzugt mit einer Neutrokin- α -Protein exprimierenden Zelle, ein. Geeignete Zellen können durch ihre Kapazität erkannt werden einen anti-Neutrokin- α -Proteinantikörper zu binden. Solche Zellen können in irgendeinem geeigneten Gewebekulturmedium gezüchtet werden; es wird jedoch bevorzugt solche Zellen in Earle's modifiziertem Eagle-Medium, ergänzt mit 10% fötalem Rinderserum (inaktiviert bei etwa 56°C) zu züchten, das ergänzt wurde mit etwa 10 g/l an nicht-essentiellen Aminosäuren, etwa 1.000 E/ml Penicillin und etwa 100 µg/ml Streptomycin. Die Splenocyten solcher Mäuse werden extrahiert und mit einer geeigneten Myelomzelllinie fusioniert. Jede geeignete Myelomzelllinie kann gemäß der vorliegenden Erfindung eingesetzt werden; es wird jedoch bevorzugt, die Eltern-Myelomzelllinie (SP2O), erhältlich von der American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, einzusetzen. Nach der Fusion werden die resultierenden Hybridomzellen selektiv im HAT-Medium und dann durch limitierte Verdünnung weiter gezüchtet, wie von Wands et al., beschrieben (Gastroenterology 80:225-232 (1981)) aufrechterhalten. Die durch eine solche Selektion erhaltenen Hybridomzellen werden dann getestet, um Clone zu identifizieren, die Antikörper absondern, welche in der Lage sind das Neutrokin- α -Proteinantigen zu binden.

[0122] Alternativ können zusätzliche Antikörper, die in der Lage sind das Neutrokin- α -Proteinantigen zu bin-

den, in einem Zwei-Schritt-Verfahren durch die Verwendung von anti-idiotypischen Antikörpern erzeugt werden. Solch ein Verfahren nützt die Tatsache, dass Antikörper selbst Antigene sind und, dass es daher möglich ist einen Antikörper zu erhalten, der an einen sekundären Antikörper bindet. In Übereinstimmung mit diesem Verfahren, werden Neutrokin- α -Protein-spezifische Antikörper verwendet, um ein Tier, vorzugsweise eine Maus, zu immunisieren. Die Splenocyten eines solchen Tieres werden dann verwendet, um Hybridomzellen zu erzeugen und die Hybridomzellen werden durchmustert, um Clone zu identifizieren, die einen Antikörper produzieren, dessen Fähigkeit an den Neutrokin- α -Proteinspezifischen Antikörper zu binden durch das Neutrokin- α -Proteinantigen blockiert werden kann. Solche Antikörper umfassen anti-idiotypische Antikörper gegen den Neutrokin- α -Protein-spezifischen-Antikörper und können für die Immunisierung eines Tieres verwendet werden, um die Bildung von weiteren Neutrokin- α -Proteinspezifischen-Antikörpern zu induzieren.

[0123] Es wird verständlich sein, dass Fab- und F(ab')₂ und andere Fragmente der Antikörper der vorliegenden Erfindung gemäß den hierin offenbarten Verfahren verwendet werden können. Solche Verfahren werden üblicherweise unter Verwendung von Enzymen wie zum Beispiel Papain (um Fab-Fragmente zu erzeugen) oder Pepsin (um F(ab')₂-Fragmente zu erzeugen) durch proteolytische Spaltung erzeugt. Alternativ können Neutrokin- α -Protein-bindende-Fragmente durch die Anwendung von rekombinanter DNA-Technologie oder durch synthetische Chemie produziert werden.

[0124] Wo in vivo bildgebende Verfahren verwendet werden, um erhöhte Mengen des Neutrokin- α -Proteins für die Diagnose in Menschen nachzuweisen, kann es vorzuziehen sein, „humanisierte“ chimere monoclonale Antikörper zu verwenden. Solche Antikörper können unter Verwendung von genetischen Konstrukten produziert werden, die von den Hybridomzellen abgeleitet sind, welche die vorstehend beschriebenen monoclonalen Antikörper erzeugen. Verfahren zur Produktion von chimeren Antikörpern sind im Fachgebiet bekannt. Für einen Überblick siehe Morrison, Science 229:1202 (1985); Oi et al., BioTechniques 4:214 (1986); Chabilly et al., U.S. Patent Nr. 4.816.567; Taniguchi et al., EP 171496; Morrison et al., EP 173494; Neuberger et al., WO 8601533; Robinson et al., WO 8702671; Boulianne et al., Nature 312:643 (1984); Neuberger et al., Nature 314:268 (1985).

Behandlung von mit dem Immunsystem in Zusammenhang stehenden Erkrankungen

[0125] Wie vorstehend erwähnt, sind Neutrokin- α -Polynucleotide und Polypeptide für die Diagnose von Zuständen nützlich, die abnorm hohe oderniedrige Expression von Neutrokin- α -Aktivitäten einschließen. Angesichts der Zellen und Gewebe in welchen Neutrokin- α exprimiert wird sowie der durch Neutrokin- α veränderten Aktivitäten ist es ganz offensichtlich, dass ein wesentlich veränderter (erhöhter oder verminderter) Expressionslevel von Neutrokin- α in einer Person, verglichen mit dem Standard oder einem „normalen“, Level pathologische Zustände erzeugt die mit den Körpersystemen) in Verbindung stehen, in welchen Neutrokin- α exprimiert und/oder aktiv ist.

[0126] Da das Neutrokin- α -Protein der Erfindung ein Mitglied der TNF-Familie ist wird es für einen Fachmann auch verständlich sein, dass die extrazelluläre Domäne des Proteins in löslicher Form von den Zellen freigesetzt werden kann, welche Neutrokin- α durch proteolytische Spaltung exprimieren und wenn das Neutrokin- α -Protein (besonders eine lösliche Form der extrazellulären Domäne) daher von einer exogenen Quelle zu den Zellen, Geweben oder dem Körper einer Person hinzugefügt wird, das Protein seine modulierenden Aktivitäten auf jede seiner Zielzellen der Person ausüben wird. Außerdem können Zellen, die dieses Typ-II Transmembranprotein exprimieren, zu Zellen, Geweben oder dem Körper einer Person hinzugefügt werden, wobei die hinzugefügten Zellen an die Zellen binden werden, die einen Rezeptor für Neutrokin- α exprimieren, wobei die Zellen die Neutrokin- α exprimieren Auswirkungen (z.B.: Cytotoxizität) auf die Rezeptortragenden Zielzellen ausüben können.

[0127] Es wird daher verständlich sein, dass die Verwendung eines Neutrokin- α -Proteins (in Form einer löslichen extrazellulären Domäne oder von Zellen, die das gesamte Protein exprimieren) für die Erzeugung eines Arzneimittels für die Behandlung von Zuständen geeignet ist, die durch eine Verminderung der Standard- oder Normallevel der Neutrokin- α -Aktivität in einer Person verursacht werden, besonders können Erkrankungen des Immunsystems behandelt werden. Die Erfindung stellt daher eine Verwendung eines Neutrokin- α -Polypeptids der Erfindung zur Erzeugung eines Arzneimittels für die Behandlung einer Person bereit, welche erhöhte Level an Neutrokin- α -Aktivität benötigt.

[0128] Nachdem Neutrokin- α zur TNF-Superfamilie zählt, sollte es auch die Angiogenese modulieren. Außerdem wird es, da Neutrokin- α Funktionen von Immunzellen hemmt, eine große Auswahl an entzündungshemmenden Aktivitäten aufweisen. Neutrokin- α kann für den Einsatz als ein anti-neovaskularisierender Stoff ge-

eignet sein, um feste Tumore durch Stimulierung der Invasion und Aktivierung der Wirtszellenabwehr zu behandeln, z.B.: cytotoxische T-Zellen und Makrophagen und durch Hemmung der Angiogenese von Tumoren. Fachleute werden andere, nicht-Krebs-Indikationen erkennen, in welchen die Proliferation von Blutgefäßen nicht erwünscht ist. Sie könnten auch für den Einsatz in der Erhöhung der Wirtsabwehr gegen resistente chronische und akute Infektionen geeignet sein, zum Beispiel bei myobakteriellen Infektionen über die Anziehung und Aktivierung von mikrobiellen Leukocyten. Neutrokin- α kann auch für den Einsatz in der Hemmung der T-Zell-Proliferation durch Inhibierung der IL-2-Biosynthese für die Behandlung von T-Zell-vermittelten Autoimmunerkrankungen und lymphocytischen Leukämien geeignet sein. Neutrokin- α kann auch für den Einsatz zur Stimulierung der Wundheilung, sowohl über Verstärkung der Fremdkörperentsorgung als auch über die Förderung von entzündlichen Zellen im Bindegewebe geeignet sein. In der gleichen Weise kann Neutrokin- α auch für den Einsatz in der Behandlung von anderen fibrotischen Erkrankungen, einschließlich Leberzirrhose, Osteoarthritis und Lungenfibrose geeignet sein. Neutrokin- α erhöht auch die Anwesenheit von Eosinophilen, die eine klare Funktion bei der Tötung von Parasitenlarven haben, die in das Gewebe eindringen, wie zum Beispiel in Bilharziose, Trichinose und Ascariasis. Es kann auch für den Einsatz zur Regulierung der Hämatopoese geeignet sein durch Regulierung der Aktivierung und Differenzierung von verschiedenen hämatopoetischen Vorläuferzellen, zum Beispiel, um folgend auf Chemotherapie reife Leukocyten aus Rückenmark freizusetzen, d.h. in Stammzellen-Mobilisierung. Neutrokin- α kann auch verwendet werden, um Sepsis zu behandeln.

Formulierungen

[0129] Die Neutrokin- α -Polypeptidzusammensetzung (welche vorzugsweise ein Polypeptid enthält, das eine lösliche Form der extrazellulären Domäne ist) wird in einer Art und Weise zusammengestellt und dosiert, die mit guter medizinischer Praxis übereinstimmt und den klinischen Zustand des einzelnen Patienten (besonders die Nebeneffekte der Behandlung mit dem Neutrokin- α -Polypeptid alleine), die Zufuhrstelle der Neutrokin- α -Polypeptidzusammensetzung, das Verfahren der Verabreichung, den zeitlichen Ablauf der Verabreichung und andere den Ärzten bekannte Faktoren berücksichtigt. Die „effektive Menge“ an Neutrokin- α -Polypeptid, für die hierin beschriebenen Zwecke, wird daher durch solche Erwägungen bestimmt.

[0130] Als ein allgemeiner Vorschlag wird die gesamte pharmazeutisch wirkungsvolle Menge des pro Dosis parenteral verabreichten Neutrokin- α -Polypeptids im Bereich von etwa 1 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{Tag}$ bis zu 10 $\text{mg}/\text{kg}/\text{Tag}$ des Körpergewichts des Patienten liegen obwohl das, wie vorstehend angemerkt, vom therapeutischen Ermessen abhängig sein wird. Stärker bevorzugt ist diese Dosis mindestens etwa 0,01 $\text{mg}/\text{kg}/\text{Tag}$ und für Menschen besonders bevorzugt zwischen etwa 0,01 und 1 $\text{mg}/\text{kg}/\text{Tag}$ für das Hormon. Wenn das Neutrokin- α -Polypeptid ohne Unterbrechung verabreicht wird, wird es üblicherweise mit einer Dosis von etwa 1 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{Stunde}$ bis zu etwa 50 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{Stunde}$ entweder durch 1–4 Injektionen pro Tag oder durch fortlaufende subkutane Infusion, zum Beispiel unter Verwendung einer Minipumpe, verabreicht. Eine Lösung für intravenöse Beutel kann auch eingesetzt werden. Die Behandlungsdauer die benötigt wird, um Veränderungen wahrzunehmen und das der Behandlung folgende Intervall in dem Reaktionen erfolgen, scheint abhängig vom erwünschten Effekt zu variieren.

[0131] Arzneimittel, die das Neutrokin- α der Erfindung enthalten, können oral, rektal, parenteral, intracisternal, intravaginal, intraperitoneal, topisch (wie durch Puder, Heilsalben, Tropfen oder transdermale Pflaster), bucal oder als ein orales oder nasales Spray verabreicht werden. Mit „pharmazeutisch verträglichem Träger“ ist ein nicht-toxischer fester, halbfester oder flüssiger Füllstoff, Verdünnungsmittel, Verkapselungsmaterial oder Formulierungshilfsmittel von jedem Typ gemeint. Der, wie hierin verwendete Begriff „parenteral“, bezieht sich auf Verabreichungsarten die intravenöse, intramuskuläre, intraperitoneale, intrasternale, subkutane und intra-articulare Injektion und Infusion einschließen.

[0132] Das Neutrokin- α -Polypeptid wird auch durch Systeme zur anhaltenden Freisetzung angemessen verabreicht. Geeignete Beispiele von Zusammensetzungen für die anhaltende Freisetzung schließen teilweise durchlässige Polymer-Matrizen in Gestalt von geformten Artikeln z.B.: Filmen, oder Mikrokapseln, ein. Matrizen für anhaltende Freisetzung schließen Polylaktide (U.S. Pat. No. 3.773.919, EP 58.481), Co-Polymere von L-Glutaminsäure und Gamma-Ethyl-L-Glutamat (Sidman, U. et al., Biopolymers 22:547-556 (1983)), Poly(2-hydroxyethyl-Methacrylat) (R. Langer et al., J. Biomed. Mater. Res. 15:167-277 (1981) und R. Langer, Chem. Tech. 12:98-105 (1982)), Ethylen-Vinyl-Acetat (R. Langer et al., ident) oder Poly.D(-)-3-Hydroxybutylsäure (EP 133.988) ein. Neutrokin- α -Polypeptid-Zusammensetzung zur anhaltenden Freisetzung schließen auch in Liposomen eingeschlossene Neutrokin- α -Polypeptide ein. Liposomen, die das Neutrokin- α -Polypeptid enthalten werden durch an sich bekannte Verfahren erzeugt: DE 3.218.121; Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 82:3688-3692 (1985); Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 77:4030-4034 (1980); EP 52.322; EP 36.676; EP 88.046; EP 143.949; EP 142.641; Japanische Patentanmeldung 83-118008; U.S. Patent-Num-

mern 4.485.045 und 4.544.545; und EP 102.324. Die Liposomen sind normalerweise vom kleinen (etwa 200-800 Angströms) unilamellaren Typ, in welchem der Lipidgehalt mehr als etwa 30 Molprozent Cholesterin beträgt. Das ausgewählte Verhältnis wird an die optimale Neutrokin- α -Polypeptid-Therapie angepasst.

[0133] In einer Ausführungsform wird das Neutrokin- α -Polypeptid für parenterale Verabreichung üblicherweise durch Mischen im gewünschten Reinheitsgrad in einer Einheitsdosis einer injizierbaren Form (Lösung, Suspension oder Emulsion) mit einem pharmazeutisch verträglichen Trägerstoff formuliert, d.h. einem der für den Empfänger in der angewandten Dosis und Konzentration ungiftig und mit anderen Inhaltsstoffen der Formulierung kompatibel ist. Zum Beispiel enthält die Rezeptur vorzugsweise keine oxidierenden Stoffe und andere Verbindungen, von denen bekannt ist, dass sie für Polypeptide schädlich sind.

[0134] Im Allgemeinen werden die Formulierungen erzeugt, indem die Neutrokin- α -Polypeptide einheitlich und in engen Kontakt mit flüssigen Trägerstoffen oder fein zerteilten festen Trägerstoffen oder beidem, gebracht werden. Dann wird das Produkt, falls nötig, in die gewünschte Rezeptur geformt. Vorzugsweise ist der Trägerstoff ein parenteraler Trägerstoff, stärker bevorzugt eine Lösung, die isotonisch mit dem Blut des Empfängers ist. Beispiele solcher Trägervehikel schließen Wasser, Salzlösung, Ringerlösung und Dextroselösung ein. Nicht-wässrige Vehikel wie zum Beispiel fixierte Öle und Ethyl-Oleat sind hierin auch nützlich sowie auch Liposomen.

[0135] Der Träger enthält geeigneter Weise geringe Mengen an Zusatzstoffen wie zum Beispiel Substanzen, die Isotonie und chemische Stabilität erhöhen. Solche Materialien sind bei den angewandten Dosierungen und Konzentrationen für den Empfänger ungiftig und schließen Puffer wie zum Beispiel Phosphate, Citrate, Succinat, Essigsäure und andere organische Säuren und deren Salze ein; Antioxidantien wie zum Beispiel Ascorbinsäure, Polypeptide mit niedrigem Molekulargewicht (weniger als etwa 10 Reste), z.B.: Polyarginin oder Tripeptide; Proteine wie zum Beispiel Serumalbumin, Gelatine, oder Immunglobuline; hydrophile Polymere wie zum Beispiel Polyvinylpyrrolidon; Aminosäuren wie zum Beispiel Glycin, Glutaminsäure, Asparaginsäure oder Arginin; Monosaccharide, Disaccharide und andere Kohlehydrate einschließlich Zellulose oder ihre Derivate, Glucose, Mannose oder Dextrine; Chelat-bildende Stoffe wie EDTA; Zuckeralkohole wie Mannitol oder Sorbit; Gegenionen wie Natrium; und/oder nicht-ionische oberflächenaktive Substanzen wie Polysorbate, Poloxamere oder PEG.

[0136] Das Neutrokin- α -Polypeptid wird üblicherweise in solchen Vehikeln, bei Konzentrationen von etwa 0,1 mg/ml bis zu 100 mg/ml, vorzugsweise 1–10 mg/ml bei einem pH-Wert von etwa 3 bis 8, formuliert. Es versteht sich, dass die Verwendung von bestimmten vorhergehend erwähnten Arzneistoffträgern, Trägern oder Stabilisatoren in der Bildung von Neutrokin- α -Polypeptidsalzen resultieren wird.

[0137] Ein Neutrokin- α -Polypeptide, das für die Herstellung eines Arzneimittels zur therapeutischen Verabreichung verwendet werden soll, muss steril sein. Sterilität wird leicht mittels Filtration durch Sterile-filtermembranen (z.B.: 0,2 Micron-Membranen) erreicht. Therapeutische Neutrokin- α -Polypeptidzusammensetzungen werden üblicherweise in einen Behälter platziert, der eine sterile Anschlussstelle hat, zum Beispiel ein Beutel oder Röhrchen für eine intravenöse Lösung, der einen durch eine hypodermische Injektionsnadel durchbohrbaren Verschluss aufweist.

[0138] Neutrokin- α -Polypeptide werden gewöhnlich in Behältern für eine oder mehrere Dosen gelagert, zum Beispiel versiegelten Ampullen oder Röhrchen, als eine wässrige Lösung oder als lyophilisierte Formulierung zur Wiederauflösung. Als Beispiel einer lyophilisierten Formulierung werden 10 ml Röhrchen mit 5 ml einer steril-filtrierte 1 % (Gew./Vol) wässrigen Neutrokin- α -Polypeptidlösung gefüllt und das resultierende Gemisch wird lyophilisiert. Die Infusionslösung wird durch Wiederherstellen des lyophilisierten Neutrokin- α -Polypeptids unter Verwendung eines bakteriostatischen Wassers für die Injektion erzeugt.

[0139] Die Erfindung kann auch eine pharmazeutische Packung oder Kit bereitstellen, umfassend einen oder mehrere, mit einem oder mehreren Inhaltsstoffen des Arzneimittels der Erfindung, gefüllten Behälter. Ein die Herstellung regulierender Hinweis in der Art und Weise wie sie von einer staatlichen Behörde vorgeschrieben wird, kann einem solchen Behälter(n) beigelegt sein, dieser Hinweis gibt die Bewilligung durch die Herstellungsgesellschaft, Verwendung oder Verkauf für Verabreichung an Menschen wieder. Außerdem können die Polypeptide der vorliegenden Erfindung gemeinsam mit anderen therapeutischen Verbindungen eingesetzt werden.

[0140] Die Erfindung beschreibt auch ein Verfahren des Durchmusterens von Verbindungen, um jene zu identifizieren, welche die Wirkung von Neutrokin- α auf Zellen verstärken oder blockieren, wie zum Beispiel seine Interaktion mit Neutrokin- α -Bindungsmolekülen wie zum Beispiel Rezeptormolekülen. Ein Agonist ist eine Verbindung, welche die natürlichen biologischen Funktionen von Neutrokin- α verstärkt oder, in einer ähnlichen Weise wie Neutrokin funktioniert, während Antagonisten solche Funktionen vermindern oder eliminieren.

[0141] In einem anderen Aspekt dieser Ausführungsform beschreibt die Erfindung ein Verfahren zur Identifizierung eines Rezeptorproteins oder eines anderen Liganden-Bindungsproteins, das spezifisch an ein Neutrokin- α -Polypeptid bindet. Zum Beispiel kann ein Zellteil wie zum Beispiel eine Membran oder eine Präparation davon, von einer Zelle erzeugt werden, die ein Molekül exprimiert, welches Neutrokin- α bindet. Die Präparation wird mit markiertem Neutrokin- α inkubiert und Komplexe von Neutrokin- α , die an den Rezeptor oder ein anderes Bindungsprotein gebunden sind, werden gemäß im Fachgebiet bekannten Routineverfahren isoliert und charakterisiert. Das Neutrokin- α -Polypeptid kann alternativ an einen festen Träger gebunden werden, so dass Bindungsmoleküle, die von Zellen solubilisiert wurden an die Säule gebunden und dann eluiert und gemäß Routineverfahren charakterisiert werden.

[0142] In dem Test der Erfindung für Agonisten oder Antagonisten kann ein Zellteil wie zum Beispiel eine Membran oder eine Präparation davon von einer Zelle erzeugt werden die ein Molekül exprimiert, das Neutrokin- α bindet, wie ein Molekül eines Signal- oder Regulatorischen-Weges, der durch Neutrokin- α moduliert wird. Die Präparation wird mit markiertem Neutrokin- α in der Abwesenheit oder Anwesenheit eines in Betracht kommenden Moleküls inkubiert, das ein Neutrokin- α -Agonist oder Antagonist sein kann. Die Fähigkeit des in Betracht kommenden Moleküls das Bindungsmolekül zu binden wird in der verminderten Bindung des markierten Liganden widerspiegelt. Moleküle die unnötig binden, d.h. ohne Induktion der Effekte von Neutrokin- α nach der Bindung des Neutrokin- α -Bindungsprotein, sind wahrscheinlich gute Antagonisten. Moleküle die gut binden und die gleichen oder eng verwandte Effekte wie Neutrokin- α hervorrufen sind Agonisten.

[0143] Neutrokin- α -ähnliche Effekte von möglichen Agonisten und Antagonisten können zum Beispiel durch Aktivitätsbestimmung eines „second Messenger-Systems“ nach der Interaktion des in Betracht kommenden Moleküls mit einer Zelle oder geeigneten Zellaufbereitung und mit dem Effekt von Neutrokin- α oder Molekülen, welche die gleichen Effekte hervorrufen wie Neutrokin- α , gemessen werden. „Second Messenger-Systeme“, die in diesem Zusammenhang verwendet werden können, schließen ein, sind aber nicht beschränkt auf AMP-Guanylat-Cyclase, Ionenkanal oder Phosphoinositid-Hydrolyse-Second-Messenger-Systeme.

[0144] Ein weiteres Beispiel eines Tests für Neutrokin- α -Antagonisten ist ein kompetitiver Test, der Neutrokin- α und einen möglichen Antagonisten mit Membrangebundenen Rezeptormolekülen oder rekombinanten Neutrokin- α -Rezeptormoleküle unter geeigneten Bedingungen für einen kompetitiven Hemmungstest vereinigt. Neutrokin- α kann zum Beispiel durch Radioaktivität so markiert werden, sodass die Zahl der an ein Rezeptormolekül gebundenen Neutrokin- α -Moleküle genau bestimmt werden kann, um die Effektivität des potentiellen Antagonisten abzuschätzen.

[0145] Mögliche Antagonisten schließen kleine organische Moleküle, Peptide, Polypeptide und Antikörper ein, die an ein Polypeptid der Erfindung binden und dadurch seine Aktivität hemmen oder auslöschen. Mögliche Antagonisten können auch kleine organische Moleküle ein Peptid, ein Polypeptid wie ein nahe verwandtes Protein oder Antikörper sein, das an die gleichen Stellen auf einem Bindungsmolekül bindet, wie zum Beispiel ein Rezeptormolekül, ohne dabei Neutrokin- α -induzierte Aktivitäten zu induzieren, und dadurch die Wirkung von Neutrokin- α , durch Ausschluss von Neutrokin- α von der Bindung, zu verhindern.

[0146] Andere mögliche Antagonisten schließen Antisense-Moleküle ein. Antisense-Technologie kann verwendet werden, um die Genexpression durch Antisense-DNA oder RNA oder durch die Bildung einer Dreifach-Helix zu kontrollieren. Antisense-Methoden werden zum Beispiel in Okano, J. Neurochem. 56:560 (1991); „Oligonucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression, CRC Press, Boca Raton, FL (1988), besprochen. Dreifach-Helixbildung wird zum Beispiel in Lee et al., Nucleic Acids Research 6: 3073 (1979); Cooney et al., Science 241:456 (1988); und Dervan et al., Science 251:1360 (1991) besprochen. Die Verfahren basieren auf der Bindung eines Polynucleotids an eine komplementäre DNA oder RNA. Zum Beispiel kann der 5'-codierende Teil eines Polynucleotids, das die extrazelluläre Domäne des Polypeptids der vorliegenden Erfindung codiert verwendet werden, um ein Antisense-RNA-Oligonucleotid von etwa 10 bis 40 Basenpaaren in Länge zu entwerfen. Ein DNA-Oligonucleotid wird entworfen, um komplementär zu einem Genbereich zu sein, der an der Transkription beteiligt ist und dadurch die Transkription und die Produktion von Neutrokin- α verhindert. Das

Antisense-RNA-Oligonucleotid hybridisiert in vivo an die mRNA und blockiert die Translation des mRNA-Moleküls in das Neutrokin- α -Polypeptid. Die vorstehend beschriebenen Oligonucleotide können auch in Zellen eingebracht werden, sodass die Antisense RNA oder DNA in vivo exprimiert werden kann, um die Produktion von Neutrokin- α zu hemmen.

[0147] Der Antagonist, der ein Antikörper der vorliegenden Erfindung ist, oder ein wie vorstehend beschriebenes Antisense-Konstrukt, kann in einem Mittel mit einem pharmazeutisch verträglichem Träger eingesetzt werden, z.B.: wie vorstehend beschrieben.

[0148] Die Antagonisten können zum Beispiel eingesetzt werden, um Neutrokin- α , die Chemotaxis und Aktivierung von Makrophagen und ihren Vorläufern und von Neutrophilen, Basophilen, B-Lymphocyten und manchen T-Zell-Untergruppen z.B.: aktivierten und CD8 cytotoxischen T-Zellen und natürlichen Killerzellen, in bestimmten Autoimmun- und chronischen entzündlichen und infektiösen Krankheiten zu inhibieren. Beispiele von Autoimmunerkrankungen schließen Multiple Sklerose und Insulin-abhängige Diabetes ein. Die Antagonisten können durch Verhinderung der Rekrutierung und Aktivierung von mononucleären Phagocyten auch für den Einsatz in der Behandlung von infektiösen Krankheiten einschließlich Silikose, Sarkoidose und idiopathischer Lungenfibrose geeignet sein. Sie können auch durch Verhinderung der Produktion und Migration von Eosinophilen für den Einsatz in der Behandlung des idiopathischen hyper-eosinophilen-Syndroms geeignet sein. Endotoxischer Schock kann durch Verhinderung der Migration von Makrophagen und deren Produktion der menschlichen Chemokin-Polypeptide der vorliegenden Erfindung auch durch die Antagonisten behandelt werden. Die Antagonisten können durch Verhinderung der Infiltration von Monocyten in der Arterienwand auch für den Einsatz in der Behandlung von Arteriosklerose geeignet sein. Die Antagonisten können auch für den Einsatz in der Behandlung von Histamin-vermittelten allergischen Reaktionen und immunologischen Erkrankungen, einschließlich allergischen Reaktionen in der späten Phase, chronischem Nesselfieber und atopischer Dermatitis durch Inhibierung der durch Chemokine induzierten Mastzellen und Degranulierung von Basophilen und Histaminfreisetzung geeignet sein. IgE-vermittelte allergische Reaktionen wie allergisches Asthma, Rhinitis und Ekzema können auch behandelt werden. Die Antagonisten können auch geeignet sein, um chronische und akute Entzündung zu behandeln, indem sie die Anziehung von Monocyten zu Wundzone verhindern. Sie können auch für den Einsatz zur Regulierung normaler Lungen-Makrophagenpopulationen geeignet sein, da chronische und akute entzündliche Lungenerkrankungen mit der Absonderung von mononucleären Phagocyten in der Lunge in Zusammenhang stehen. Antagonisten können auch für den Einsatz in der Behandlung von rheumatoider Arthritis geeignet sein, indem sie die Anlockung von Monocyten in die Gelenksflüssigkeit der Gelenke von Patienten verhindern. Das Einströmen und die Aktivierung von Monocyten spielt eine bedeutende Rolle in der Pathogenese von sowohl degenerativen als auch entzündlichen Arthropathien. Die Antagonisten können für den Einsatz bei der Störung der schädlichen Kaskaden geeignet sein, die hauptsächlich IL-1 und TNF zugeschrieben werden, welcher die Biosynthese von anderen entzündlichen Cytokinen verhindert. Auf diese Weise kann der Antagonist für den Einsatz zur Verhinderung der Entzündung geeignet sein. Die Antagonisten können auch für den Einsatz in der Hemmung von Fieber geeignet sein, das durch Chemokine induziert wird und unabhängig von Prostaglandin ist. Die Antagonisten können auch für den Einsatz in der Behandlung von Fällen von Knochenmarksversagen geeignet sein, zum Beispiel aplastischer Anämie und myelodysplastischem Syndrom. Die Antagonisten können auch für den Einsatz in der Behandlung von Asthma und Allergie geeignet sein, indem sie die Ansammlung von Eosinophilen in der Lunge verhindern. Die Antagonisten können auch für den Einsatz in der Behandlung von subepithelialer Basalmembran-Fibrose geeignet sein, die ein Hauptmerkmal der asthmatischen Lunge ist.

[0149] Antikörper gegen Neutrokin- α können beim Einsatz zur Bindung und Hemmung von Neutrokin- α -Aktivität zur Behandlung von ARDS geeignet sein, indem sie nach Verletzung die Infiltration von Neutrophilen in die Lunge verhindern. Die Antagonisten können für den Einsatz in einer Zusammensetzung mit einem pharmazeutisch verträglichen Trägerstoff geeignet sein, z.B.: wie hierin nachstehend beschrieben.

Chromosomentests

[0150] Die Nucleinsäuremoleküle der vorliegenden Erfindung sind auch für die Identifizierung von Chromosomen wertvoll. Auf die Sequenz wird spezifisch abgezielt und sie kann mit einer bestimmten Stelle auf dem menschlichen Chromosom hybridisieren. Darüber hinaus gibt es zurzeit Bedarf für die Identifizierung bestimmter Stellen auf dem Chromosom. Es sind im Moment basierend auf den tatsächlichen Sequenzdaten (wiederholter Polymorphismus) wenige Chromosomen-Markierungsreagenzien zur Markierung der chromosomalen Lage erhältlich. Die Kartierung von DNAs auf Chromosomen gemäß der vorliegenden Erfindung ist ein wichtiger erster Schritt in der Korrelation dieser Sequenzen mit Genen, die mit Erkrankungen im Zusammenhang stehen.

[0151] In bestimmten in diesem Zusammenhang bevorzugten Ausführungsformen wird die hierin offenbarte cDNA verwendet, um die genomische DNA eines Neutrokin- α -Proteingens zu klonieren. Das kann unter Verwendung einer Vielzahl an gut bekannten Methoden und Genbanken erreicht werden, die im Allgemeinen im Handel erhältlich sind. Die genomische DNA wird dann für diesen Zweck unter Verwendung gut bekannter Methoden für in situ Chromosomen-Kartierung verwendet.

[0152] Außerdem können die Sequenzen in manchen Fällen durch Erzeugung von PCR-Primern (vorzugsweise 15–25 bp) von der cDNA, auf Chromosomen kartiert werden. Computeranalyse des 3'-nicht-translatierten Bereichs des Gens wird verwendet, um Primer schnell auszuwählen, die nicht mehr als ein Exon in der genomischen DNA umfassen und folglich den Amplifikationsprozess erschweren. Diese Primer werden dann für PCR verwendet, um somatische Zellhybride zu durchmustern, die einzelne menschliche Chromosomen enthalten. Fluoreszenz in situ Hybridisierung („FISH“) eines cDNA-Clons auf einer Spreitung von Metapascen-chromosomen kann verwendet werden, um eine genaue chromosomale Lage in einem Schritt bereitzustellen. Diese Methode kann mit Sonden von der cDNA verwendet werden, die so kurz wie 50 oder 60 bp sind. Für eine Zusammenfassung dieser Methode siehe Verma et al., Human Chromosomes: A Manual Of Basic Techniques, Pergamon Press, New York (1988).

[0153] Wenn eine Sequenz erst einmal an eine genaue Chromosomenstelle kartiert wurde, kann die physikalische Position der Sequenz auf dem Chromosom mit den Daten der genetischen Karte korreliert werden. Solche Daten kann man zum Beispiel in V. McKusick finden, Mendelian Inheritance In Man, erhältlich On-Line durch die Johns Hopkins University, Welch Medical Library. Die Beziehung zwischen Genen und Erkrankungen, die zu dem gleichen chromosomalen Bereich kartiert worden sind, werden dann durch Verknüpfungsanalyse (gleichzeitige Vererbung von physikalisch benachbarten Genen) identifiziert.

[0154] Als Nächstes ist es notwendig die Unterschiede in der cDNA oder genomischen Sequenz zwischen betroffenen und nicht betroffenen Personen zu bestimmen. Wenn eine Mutation in manchen oder allen betroffenen Personen beobachtet wird aber nicht in irgendwelchen normalen Personen, dann ist es wahrscheinlich, dass die Mutation der ursächliche Auslöser der Krankheit ist.

[0155] Nachdem die Erfindung nun im Allgemeinen beschrieben wurde, wird das gleiche durch Referenz auf die folgenden Beispiele leichter verstanden werden, welche als Erläuterung bereitgestellt wurden und nicht als Limitierung beabsichtigt sind.

Beispiele

Beispiel 1a: Expression und Reinigung von „His-tagged“-Neutrokin- α in E. coli

[0156] Der bakterielle Expressionsvektor pQE9 (pD10) wird in diesem Beispiel für die bakterielle Expression verwendet. (QIAGEN, Inc., vorstehend). pQE9 codiert das Ampicillin-Resistenzgen („Amp^r“) und enthält einen bakteriellen Replikationsursprung („ori“), einen durch IPTG induzierbaren Promotor, eine Ribosomenbindungsstelle („RBS“), sechs Codons, die Histidinreste codieren, welche eine Affinitätsreinigung unter Verwendung von Nickel-Nitrilo-tri-Essigsäure („Ni-NTA“)- Affinitätsgranulat, verkauft von QIAGEN, Inc., vorstehend und geeignete einzelne Restriktionsenzym-Spaltungsstellen. Diese Elemente sind so angeordnet, dass ein inseriertes DNA-Fragment, welches ein Polypeptid codiert, dieses Polypeptid mit sechs His-Resten (d.h. einem „6 × His-tag“) exprimiert, die mit dem Aminoterminus dieses Polypeptids kovalent verbunden sind.

[0157] Die den gewünschten Teil des Neutrokin- α -Proteins codierende DNA-Sequenz, umfassend die Sequenz der extrazellulären Domäne, wird von dem hinterlegten cDNA-Clon unter Verwendung von PCR-Oligonucleotidprimern amplifiziert, die sich an die aminoterminalen Sequenz des gewünschten Teils des Neutrokin- α -Proteins und an Sequenzen des hinterlegten Konstrukts 3' von der cDNA-Codierungssequenz anlagern. Zusätzliche Nucleotide, die Restriktionstellen enthalten werden zu den 5'- bzw. 3'-Primersequenzen hinzugefügt, um die Clonierung in den pQE9-Vektor zu erleichtern.

[0158] Zur Clonierung der extrazellulären Domäne des Proteins weist der 5'-Primer die Sequenz 5' GTGGGATCCAGCCTCCGGGCAGAGCTG 3' (SEQ ID NR: 10) auf, welche die unterstrichene BamHI-Restriktionsstelle gefolgt von 18 Nucleotiden der aminoterminalen Codierungssequenz der extrazellulären Domäne der Neutrokin- α -Sequenz in **Fig. 1**, enthält. Einem Fachmann wird natürlich klar sein, dass die Stelle in der Protein-Codierungssequenz wo der 5'-Primer beginnt, verändert werden kann, um ein DNA-Segment zu amplifizieren, das irgendeinen gewünschten Teil des gesamten Neutrokin- α -Proteins, kürzer oder länger als die extrazelluläre Domäne der Form, codiert. Der 3'-Primer weist die

Sequenz

5'GTGAAGCTTTTATTACAGCAGTTTCAATGCACC3' (SEQ ID NR: 11)

auf, welche die unterstrichene HindIII-Restriktionsstelle gefolgt von zwei Stop-Codons und 18 Nucleotiden enthält, die komplementär zum 3'-Ende der codierenden Sequenz der Neutrokin- α -DNA-Sequenz in **Fig. 1** sind.

[0159] Das amplifizierte Neutrokin- α -DNA-Fragment und der Vektor pQE9 werden mit BamHI und HindIII gespalten und die gespaltenen DNAs werden dann ligiert. Die Insertion der Neutrokin- α -DNA in den gespaltenen pQE9-Vektor platziert den codierenden Bereich des Neutrokin- α -Proteins stromabwärts vom IPTG-induzierbaren Promotor und in den richtigen Leserahmen mit einem initiiierenden AUG und den sechs Histidin-Codons.

[0160] Das Ligierungsgemisch wird unter Verwendung von Standard-Verfahren wie jenen, die in Sambrook et al., *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2. Ausgabe; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1989), in kompetente *E. coli*-Zellen transformiert. Der *E. coli*-Stamm M15/rep4, der mehrfache Kopien des Plasmids pREP4 enthält, das den lac-Repressor exprimiert und Kanamycin-Resistenz („Kan^r“) verleiht, wird zur Durchführung des hierin beschriebenen darstellenden Beispiels verwendet. Dieser Stamm, der nur einer von vielen ist, die für die Expression des Neutrokin- α -Proteins geeignet sind, ist auch im Handel von QIAGEN, Inc., vorstehend, erhältlich. Transformanten werden durch ihre Fähigkeit identifiziert in der Gegenwart von Ampicillin und Kanamycin auf LB-Platten zu wachsen. Plasmid-DNA wird von resistenten Kolonien isoliert und die Identität der clonierten DNA durch Restriktionsanalyse, PCR und DNA-Sequenzierung bestätigt. Clone, welche die gewünschten Konstrukte enthalten, werden über Nacht in flüssiger Kultur in LB-Medium gezüchtet, das sowohl mit Ampicillin (100 μ g/ml) als auch Kanamycin (25 μ g/ml) ergänzt ist. Die Übernachtskultur wird dann verwendet, um eine große Kultur bei einer Verdünnung von ungefähr 1:25 bis 1:250, zu inokulieren. Die Zellen werden bis zu einer optischen Dichte, gemessen bei 600 nm („OD 600“), von zwischen 0,4 und 0,6 gezüchtet. Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid („IPTG“) wird dann bis zu einer Endkonzentration von 1 mM hinzugefügt, um die Transkription vom lac-Repressor-sensitiven-Promotor zu induzieren, indem der lacI-Repressor inaktiviert wird. Zellen werden anschließend für weitere 3 bis 4 Stunden inkubiert. Die Zellen wurden dann durch Zentrifugation geerntet.

[0161] Die Zellen werden dann für 3–4 Stunden bei 4°C in 6M Guanidin-HCl, pH-Wert 8 gerührt. Die Zelltrümmer werden durch Zentrifugation entfernt und der Überstand, der Neutrokin- α enthält, wird auf eine Nickel-Nitrilotriessigsäure („Ni-NTA“)-Affinitätsharzsäule (erhältlich von QIAGEN, Inc., vorstehend) geladen. Proteine mit einem 6 \times His-tag binden mit hoher Affinität an das Ni-NTA-Harz und können in einem einfachen Ein-Schritt-Verfahren (für Details siehe: *The QIAexpressionist*, 1995, QIAGEN, Inc., vorstehend) gereinigt werden. Kurz gesagt wird der Überstand in 6 M Guanidin-HCl, pH-Wert 8 auf die Säule geladen, die Säule wird zuerst mit 10 Volumina 6 M Guanidin-HCl, pH-Wert 8 gewaschen, dann mit 10 Volumina 6 M Guanidin-HCl, pH-Wert 6 und schließlich wird Neutrokin- α mit 6 M Guanidin-HCl, pH-Wert 5 eluiert.

[0162] Das gereinigte Protein wird dann durch Dialysieren gegen Phosphatpufferter-Kochsalzlösung (PBS) oder 50 mM Natriumacetat, pH-Wert 6 Puffer mit 200 mM NaCl, renaturiert. Beziehungsweise kann das Protein während es auf der Ni-NTA-Säule immobilisiert ist erfolgreich rückgefaltet werden. Die empfohlenen Bedingungen sind wie folgt: Renaturierung unter Verwendung eines linearen 6 M-1 M Harnstoffgradienten in 500 mM NaCl, 20% Glycerin, 20 mM Tris/HCl pH-Wert 7,4, der Proteaseinhibitoren enthält. Die Renaturierung sollte über eine Dauer von 1,5 Stunden oder mehr durchgeführt werden. Nach der Renaturierung können die Proteine durch Zugabe von 250 mM Imidazol eluiert werden. Imidazol wird durch einen letzten Dialyseschritt gegen PBS oder 50 mM Natriumacetat pH-Wert 6 Puffer mit 200 mM NaCl entfernt. Das gereinigte Protein wird bei 4°C gelagert oder bei –80°C eingefroren.

Beispiel 1b: Expression und Reinigung von Neutrokin- α in *E. coli*

[0163] Der bakterielle Expressionsvektor pQE60 wird in diesem Beispiel für die bakterielle Expression verwendet. (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA 91311). pQE60 codiert das Ampicillin-Resistenzgen („Amp^r“) und enthält einen bakteriellen Replikationsursprung („ori“), einen IPTG-induzierbaren Promotor, eine Ribosomenbindungsstelle („RBS“), sechs Codons, welche die Histidinreste codieren, die eine Affinitätsreinigung unter Verwendung einer Nickel-Nitrilotriessigsäure („Ni-NTA“)-Affinitätsharzsäule verkauft von QIAGEN, Inc., vorstehend erlauben und geeignete nur einmal vorkommende Restriktionsenzym-Spaltungsstellen. Diese Elemente sind so angeordnet, dass ein DNA-Fragment, welches ein Polypeptid codiert in solcher Weise inseriert werden kann, um dieses Polypeptid mit den sechs His-Resten (d.h., einem „6 \times His-tag“), die kovalent mit dem Carboxy-Terminus dieses Polypeptids verbunden sind zu erzeugen. In diesem Beispiel ist die Polypeptid-Codierungssequenz jedoch so inseriert, dass die Translation der sechs His-Codons verhindert wird und daher wird das Polypeptid ohne 6 \times His-tag erzeugt.

[0164] Die DNA-Sequenz, die den gewünschten Teil des Neutrokin- α -Proteins codiert, umfassend die Sequenz der extrazellulären Domäne, wird von dem hinterlegten cDNA-Clon unter Verwendung von PCR-Oligonucleotid-Primern amplifiziert, die sich an die aminoterminalen-Sequenzen des gewünschten Teils des Neutrokin- α -Proteins und an Sequenzen in dem hinterlegten 3'-Konstrukt an die cDNA-codierende Sequenz anlagern. Zusätzliche Nucleotide, die Restriktionsstellen enthalten, um die Clonierung in den pQE60-Vektor zu erleichtern, werden zu den 5'- bzw. 3'-Sequenzen hinzugefügt.

[0165] Für die Clonierung der extrazellulären Domäne des Proteins weist der 5'-Primer die Sequenz 5' GTGTCATGAGCCTCCGGGCAGAGCTG 3' (SEQ ID NR: 12) auf, welche die unterstrichene BspH-Restriktionsstelle gefolgt von 17 Nucleotiden der aminoterminalen-Codierungssequenz der extrazellulären Domäne der Neutrokin- α -Sequenz in **Fig. 1** enthält. Einem Fachmann wird natürlich klar sein, dass die Stelle in der Protein-Codierungssequenz wo der 5'-Primer beginnt verändert werden kann, um einen gewünschten Teil des gesamten Neutrokin- α -Proteins zu amplifizieren, der kürzer oder länger ist als die extrazelluläre Domäne der Form. Der 3'-Primer weist die Sequenz 5'GTGAAGCTTTTATTACAGCAGTTTCAATGCACC 3' (SEQ ID NR: 13) auf, welche die unterstrichene HindIII-Restriktionsstelle gefolgt von zwei Stop-Codons und 18 Nucleotiden enthält, die komplementär zum 3'-Ende der codierenden Sequenz der Neutrokin- α -DNA-Sequenz in **Fig. 1** sind.

[0166] Die amplifizierten Neutrokin- α -DNA-Fragmente und der Vektor pQE60 werden mit BspHI und HindIII gespalten und die gespaltenen DNAs werden dann ligiert. Insertion der Neutrokin- α -DNA in den gespaltenen pQE60-Vektor platziert den codierenden Bereich des Neutrokin- α -Proteins einschließlich des damit verbundenen Stop-Codons stromabwärts vom IPTG-induzierbaren Promotor und in den richtigen Leserahmen mit einem initiierenden AUG. Das damit verbundene Stop-Codon verhindert die Translation der sechs Histidin-Codons stromabwärts von der Insertionsstelle.

[0167] Das Ligationsgemisch wird unter Verwendung von Standard-Verfahren wie jenen, die in Sambrook et al., Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 2. Ausgabe.; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1989) beschrieben sind, in kompetente E. coli-Zellen transformiert. Der E.coli-Stamm M15/rep4, der mehrfache Kopien des Plasmids pREP4 enthält, welches den lac-Repressor exprimiert und Kanamycin-Resistenz („Kan^r“) verleiht, wird zur Durchführung des hierin beschriebenen darstellenden Beispiels verwendet. Dieser Stamm, der nur einer von vielen ist, die für die Expression des Neutrokin- α -Proteins geeignet sind, ist auch im Handel von QIAGEN, Inc., vorstehend, erhältlich. Transformanten werden durch ihre Fähigkeit in der Gegenwart von Ampicillin und Kanamycin auf LB-Platten zu wachsen identifiziert. Plasmid-DNA wird von resistenten Kolonien isoliert und die Identität der clonierten DNA durch Restriktionsanalyse, PCR und DNA-Sequenzierung bestätigt.

[0168] Clone, welche die gewünschten Konstrukte enthalten, werden übernacht in flüssiger Kultur in LB-Medium gezüchtet, das sowohl mit Ampicillin (100 μ g/ml) als auch Kanamycin (25 μ g/ml) ergänzt ist. Die Übernacht-Kultur wird verwendet, um eine große Kultur bei einer Verdünnung von ungefähr 1:25 bis 1:250 zu inokulieren. Die Zellen werden bis zu einer optischen Dichte, gemessen bei 600 nm („OD 600“), von zwischen 0,4 und 0,6 gezüchtet. Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid („IPTG“) wird dann bis zu einer Endkonzentration von 1 mM hinzugefügt, um die Transkription vom lac-Repressor-sensitiven-Promotor, durch Inaktivierung des lac-Repressors zu induzieren. Die Zellen werden anschließend für weitere 3 bis 4 Stunden inkubiert. Die Zellen wurden dann durch Zentrifugation geerntet.

[0169] Die Zellen werden dann für 3–4 Stunden bei 4°C in 6M Guanidin-HCl, pH-Wert 8 gerührt. Die Zelltrümmer werden durch Zentrifugation entfernt und der Überstand, der Neutrokin- α enthält, wird gegen 50 mM Natriumacetat-Puffer pH-Wert 6, ergänzt mit 200 mM NaCl, dialysiert. Alternativ kann das Protein erfolgreich durch Dialysieren gegen 500 mM NaCl, 20% Glycerin, 25 mM Tris/HCl pH-Wert 7,4, der Proteaseinhibitoren enthält, rückgefaltet werden. Nach Renaturierung kann das Protein durch Ionenaustausch-, hydrophobe Interaktions- und Größenausschluß-Chromatographie gereinigt werden. Beziehungsweise kann ein Affinitäts-Chromatographieschritt wie zum Beispiel eine Antikörpersäule verwendet werden, um reines Neutrokin- α -Protein zu erhalten. Das gereinigte Protein wird bei 4°C gelagert oder bei –80°C eingefroren.

Beispiel 2: Clonierung und Expression des Neutrokin- α -Proteins in einem Baculovirus-Expressionssystem

[0170] In diesem erläuternden Beispiel wird der Plasmid-Shuttlevektor pA2GP verwendet, um die clonierte DNA, welche die extrazelluläre Domäne des Proteins codiert, welcher die normalerweise damit verbundenen intrazellulären- und Transmembransequenzen fehlen, in ein Baculovirus zu inserieren, um die extrazelluläre Domäne des Neutrokin- α -Proteins unter Verwendung des Baculovirus-Leaders und Standardverfahren, wie

sie in Summers et al., A Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Cell Culture Procedures, Texas Agricultural Experimental Station Bulletin No. 1555 (1987) beschrieben sind, zu exprimieren. Dieser Expressionsvektor enthält den starken Polyhedrin-Promotor des Autographa californica nucleären Polyhedrose-Virus (AcMNPV) gefolgt vom sekretorischen Signalpeptid (leader) des Baculovirus gp67-Proteins und geeigneten Restriktionsstellen wie BamHI, XbaI und Asp718. Die Polyadenylierungsstelle des Simian-Virus-40 („SV40“) wird für eine effiziente Polyadenylierung benützt. Für einfache Selektion des rekombinanten Virus, enthält das Plasmid das Beta-Galactosidase-Gen von E. coli unter der Kontrolle eines schwachen Drosophila-Promotors in der gleichen Richtung, gefolgt vom Polyadenylierungssignal des Polyhedringens. Die inserierten Gene werden auf beiden Seiten durch virale Sequenzen für zellvermittelte homologe Rekombination mit viraler Wildtyp DNA flankiert, um ein lebensfähiges Virus zu erzeugen, das die clonierten Polynucleotide exprimiert.

[0171] Wie ein Fachmann leicht verstehen wird, können viele andere Baculovirusvektoren, wie zum Beispiel pAc373, pVL941 und pAcIM1, anstatt des vorstehenden Vektors verwendet werden, solange die Konstrukte geeignet gelegene Signale für Transkription, Translation, Sekretion und ähnliches bereitstellen, einschließlich einem Signalpeptid und nach Bedarf einem AUG im Leserahmen, bereitstellen. Solche Vektoren werden zum Beispiel in Luckow et al., Virology 170:31-39 (1989) beschrieben.

[0172] Die cDNA-Sequenz, welche die extrazelluläre Domäne des Neutrokin- α -Proteins in dem hinterlegten Clon codiert, fehlt das AUG-Initiationscodon und die in **Fig. 1** (SEQ ID NR: 2) gezeigten normalerweise damit verbundenen intrazellulären- und Transmembrandomänensequenzen, wird unter Verwendung von PCR-Oligonucleotidprimern amplifiziert, welche den 5'- und 3'-Sequenzen des Gens entsprechen. Der 5'-Primer weist die Sequenz

5' GTGGGATCCCGGGCAGAGCTGCAGGGC 3'

(SEQ ID NR: 14) auf, welche die unterstrichene BamHI-Restriktionsenzym-Stelle gefolgt von 18 Nucleotiden der Sequenz der extrazellulären Domäne des in **Fig. 1** gezeigten Neutrokin- α -Proteins enthält, beginnend mit dem angegebenen N-Terminus der extrazellulären Domäne des Proteins. Der 3'-Primer weist die Sequenz

5' GTGGGATCCCTTATTACAGCAGTTTCAATGCACC 3'

(SEQ ID NR: 15) auf, welche die unterstrichene BamHI-Restriktionsenzym-Stelle gefolgt von 18 Nucleotiden der Sequenz komplementär zur der 3'-codierenden Sequenz in **Fig. 1** enthält.

[0173] Das amplifizierte Fragment wird aus einem 1 % Agarosegel unter Verwendung eines im Handel erhältlichen Kits („GeneClean“, BIO 101 Inc., La Jolla, Ca.) isoliert. Das Fragment wird dann mit BamHI gespalten und wird wieder auf einem 1 % Agarosegel gereinigt. Dieses Fragment wird hierin als F1 bezeichnet.

[0174] Das Plasmid wird mit dem Restriktionsenzym BamHI gespalten und kann wahlweise unter Verwendung von Kalbsdarm-Phosphatase unter Verwendung von im Fachgebiet bekannten Routineverfahren dephosphoryliert werden. Die DNA wird dann von einem 1 % Agarosegel unter Verwendung eines im Handel erhältlichen Kits („GeneClean“ BIO 101 Inc., La Jolla, CA) isoliert. Diese Vektor-DNA wird hierin als „V1“ bezeichnet.

[0175] Das Fragment F1 und das dephosphorylierte Plasmid V1 werden mit T4 DNA-Ligase ligiert. E. coli HB 101 oder andere geeignete E. coli-Wirte, wie zum Beispiel XL-1 Blue (Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA)-Zellen, werden mit dem Ligationsgemisch transformiert und auf Kulturplatten ausgestrichen. Bakterien, die das Plasmid mit dem menschlichen Neutrokin- α -Gen enthalten, werden durch Spaltung der DNA von einzelnen Kolonien unter Verwendung von BamHI identifiziert und das Spaltungsprodukt dann durch Gelelektrophorese analysiert. Die Sequenz des clonierten Fragments wird durch DNA-Sequenzierung bestätigt. Dieses Plasmid wird hierin als pA2GP-Neutrokin- α bezeichnet.

[0176] 5 μ g des Plasmids pA2GP-Neutrokin- α werden mit 1,0 μ g einer im Handel erhältlichen linearisierten Baculovirus-DNA („BaculoGold™ baculovirus DNA“, Pharmingen, San Diego, CA) unter Verwendung des Lipofektions-Verfahrens beschrieben von Felgner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7413-7417 (1987)) gemeinsam transfektiert. 1 μ g der BaculoGold™-Virus-DNA und 5 μ g des Plasmids pA2GP-Neutrokin- α werden in einer sterilen Vertiefung einer Mikrotiterplatte gemischt, die 50 μ l serumfreies Grace-Medium enthält (Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD). Danach werden 10 μ l Lipofectin mit 90 μ l Grace-Medium hinzugefügt, gemischt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wird das Transfektionsgemisch tropfenweise zu Sf9-Insektenzellen (ATCC CRL 1711) hinzugefügt, die auf einer 35 mm Gewebekulturplatte mit 1 ml Grace-Medium ohne Serum ausgesäht wurden. Die Platte wird dann für 5 Stunden bei 27°C inkubiert. Die Transfektionslösung wird dann von der Platte entfernt und 1 ml Grace-Insektenmedium wird hinzugefügt, das mit 10% fötalem Kälberserum ergänzt wurde. Die Züchtung wird dann bei 27°C für vier Tage fortgesetzt.

[0177] Nach vier Tagen wird der Überstand geerntet und ein wie von Summers und Smith, vorstehend beschriebener Plaque-Test durchgeführt. Ein Agarosegel mit „Blue Gal“ (Life Technologies Inc., Gaithersburg) wird verwendet, um eine einfache Identifizierung und Isolierung von Gal-exprimierenden Clonen zu ermöglichen, die blau-gefärbte Plaques erzeugen. (Eine genaue Beschreibung eines „Plaque-Tests“ für diese Art, kann auch im Benutzerhandbuch für Insektenzellkultur und Baculovirologie, vertrieben durch Life Technologies Inc., Gaithersburg, Seite 9–10 gefunden werden.) Nach angemessener Inkubation, werden blau-gefärbte Plaques mit der Spitze einer Mikropipette (z.B.: Eppendorf) gepickt. Der die Viren enthaltende Agar wird dann in einem Mikrozentrifugenröhrchen, das 200 µl Grace-Medium enthält, resuspendiert und die den rekombinanten Baculovirus enthaltende Suspension wird verwendet, um Sf9-Zellen zu infizieren, die in 35 mm Schalen ausgesät wurden. Vier Tage später wurde der Überstand von diesen Kulturschalen geerntet und dann wurden sie bei 4°C gelagert. Das rekombinante Virus wird V-Neurokin-α genannt.

[0178] Um die Expression des Neurokin-α-Gens zu bestätigen, wurden Sf9-Zellen in Grace-Medium gezüchtet, welches mit 10% hitze-inaktiviertem, fötalem Rinderserum ergänzt war. Die Zellen wurden mit rekombinantem Baculovirus V-Neurokin-α bei einer Infektionsmultiplizität („MOI“) von etwa 2 infiziert. Wenn radioaktiv-markierte Proteine erwünscht sind, wird das Medium 6 Stunden später entfernt und mit SF900-11-Medium ohne Methionin und Cystein (erhältlich von Life Technologies Inc., Rockville, MD) ersetzt. Nach 42 Stunden werden 5 µCi ³⁵S-Methionin und 5 µCi ³⁵S-Cystein (erhältlich von Amersham) hinzugefügt. Die Zellen werden für 16 Stunden weiter inkubiert und dann durch Zentrifugation geerntet. Die Proteine im Überstand sowie die intrazellulären Proteine werden durch SDS-PAGE gefolgt von Autoradiographie (falls radioaktiv markiert) analysiert.

[0179] Mikrosequenzierung der Aminosäuresequenz des Aminoterminus der gereinigten Proteine kann verwendet werden, um die aminoterminalen-Sequenzen der extrazellulären Domäne des Proteins und folglich die Spaltungsstelle und Länge des sekretorischen Signalpeptids zu bestimmen.

Beispiel 3: Clonierung und Expression von Neurokin-α in Säugerzellen

[0180] Ein typischer Säuger-Expressionsvektor enthält das Promotor-Element, welches die Transkriptionsinitiation der mRNA vermittelt, die Protein-Codierungssequenz und Signale, die für die Transkriptionstermination und Polyadenylierung des Transkripts benötigt werden. Zusätzliche Elemente schließen Enhancer, Kozak-Sequenzen und intervenierende-Sequenzen ein, die durch Donor- und Akzeptor-Stellen für RNA-Splicing flankiert werden. Hoch effiziente Transkription kann mit den frühen und späten Promotoren von SV40, den langen terminalen Wiederholungen (LTRs) von Retroviren, z.B.: RSV, HTLV1, HIV1 und dem frühen Promotor des Cytomegalovirus (CMV), erzielt werden. Zelluläre Elemente können jedoch auch verwendet werden (z.B.: der menschliche Actin-Promotor). Geeignete Expressionsvektoren zur Verwendung in der Ausübung der vorliegenden Erfindung schließen zum Beispiel Vektoren wie pSVL und pMSG (Pharmacia, Uppsala, Schweden), pRSVcat (ATCC 37152), pSV2dhfr (ATCC 37146) und pBC12MI (ATCC 67109) ein. Säugerwirtszellen, die verwendet werden könnten, schließen menschliche Hela, 293, H9 und Jurkat-Zellen, Maus-NIH3T3 und C127-Zellen, Cos 1, Cos 7 und CV1, Wachtel QC1-3-Zellen, Maus-L-Zellen und chinesische Hamster-Ovarzellen (CHO) ein.

[0181] Wahlweise kann das Gen in stabilen Zelllinien exprimiert werden, die das Gen integriert in einem Chromosom enthalten. Die Co-Transfektion mit einem selektierbaren Marker wie dhfr, gpt, Neomycin, Hygromycin ermöglicht die Identifizierung und Isolierung der transfizierten Zellen.

[0182] Die transfizierten Zellen können auch amplifiziert werden, um große Mengen des codierten Proteins zu exprimieren. Der DHFR (Dihydrofolat-Reduktase)-Marker ist nützlich, um Zelllinien zu entwickeln, die mehrere hundert oder sogar mehrere tausend Kopien des Gens von Interesse tragen. Ein anderer nützlicher Selektionsmarker ist das Enzym Glutamin-Synthase (GS) (Murphy et al., *Biochem J.* 227:277-279 (1991); Bebbington et al., *Bio/Technology* 10:169-175 (1992)). Die Säugerzellen werden unter Verwendung dieser Marker in selektivem Medium gezüchtet und die Zellen mit der höchsten Resistenz werden selektiert. Diese Zelllinien enthalten, integriert in ein Chromosom, die (das) amplifizierte(n) Gen(e). Chinesische Hamster-Ovar (CHO)- und NSO-Zellen werden häufig für die Produktion von Proteinen verwendet.

[0183] Die Expressionsvektoren pC1 und pC4 enthalten den starken Promotor (LTR) des Rous-Sarcoma-Virus (Cullen et al., *Molecular and Cellular Biology*, 438-447 (März, 1985)) mit einem Fragment des CMV-Enhancers (Boshart et al., *Cell* 41:521-530 (1985)). Mehrfache Clonierungsstellen z.B.: mit den Restriktionsenzym-Schnittstellen BamHI, XbaI und Asp718, erleichtern die Clonierung des Gens von Interesse. Die Vektoren enthalten außerdem das 3'-Intron, die Polyadenylierungs- und Terminationssignale des Ratten-Preproin-

sulingens.

Beispiel 3(a): Clonierung und Expression in COS-Zellen

[0184] Das Expressionsplasmid, pNeurokin- α -HA, wird durch Clonierung eines Teils der hinterlegten cDNA, welche die extrazelluläre Domäne des Neurokin- α -Proteins codiert, in den Expressionsvektor pcDNA1/Amp oder pcDNAIII hergestellt (welcher von Invitrogen, Inc., erhalten werden kann). Um eine lösliche abgesonderte Form des Polypeptids zu erzeugen, wird die extrazelluläre Domäne mit der sekretorische Leadersequenz des menschlichen IL-6-Gens fusioniert.

[0185] Der Expressionvektor pcDNA1/amp enthält: (1) einen E. coli Replikationsursprung, der für die Vermehrung in E. coli und anderen prokaryotischen Zellen wirkungsvoll ist; (2) ein Ampicillinresistenzgen zur Selektion der Plasmidhaltenden prokaryotischen Zellen; (3) einen SV40 Replikationsursprung zur Vermehrung in eukaryotischen Zellen; (4) einen CMV-Promotor, einen Polylinker, ein SV40 Intron; (5) mehrere Codons, die ein Hämagglutinin-Fragment codieren (d.h. ein „HA“-tag zur Erleichterung der Reinigung) gefolgt von einem Terminationscodon und einem Polyadenylierungssignal das so angeordnet ist, dass eine cDNA in geeigneter Weise unter die Expressionskontrolle des CMV-Promotors platziert werden kann und mittels Restriktionsstellen im Polylinker funktionsfähig mit dem SV40-Intron und dem Polyadenylierungssignal verbunden wird. Das HA-tag entspricht einem Epitop, das vom Influenza-Hämagglutininprotein, beschrieben von Wilson et al., Cell 37:767 (1984) abgeleitet wurde. Die Fusion des HA-tag an das Zielprotein ermöglicht einen einfachen Nachweis und Wiederfindung des rekombinanten Proteins mit einem Antikörper, der das HA-Epitop erkennt. pcDNAIII enthält außerdem einen selektierbaren Neomycin-Marker.

[0186] Ein DNA-Fragment, das die extrazelluläre Domäne des Neurokin- α -Polypeptid codiert, wird in den Polylinkerbereich des Vektors cloniert, sodass das rekombinante Protein durch den CMV-Promotor kontrolliert wird. Die Strategie der Plasmidkonstruktion ist wie folgt. Die Neurokin- α -cDNA des hinterlegten Clons wird unter Verwendung von Primern amplifiziert, die, ähnlich wie vorstehend zur Konstruktion von Vektoren zur Expression von Neurokin- α in E. coli beschrieben, geeignete Restriktionsstellen aufweisen. Geeignete Primer schließen die folgenden, in diesem Beispiel verwendeten, ein. Der 5'-Primer, der die unterstrichene BamHI-Stelle, eine Kozak-Sequenz, ein AUG-Startcodon, eine Sequenz, die das sekretorische Leaderpeptid des menschlichen IL-6-Gens codiert und 18 Nucleotide des 5'-codierenden Bereichs des extrazellulären Domäne des Neurokin- α -Proteins enthält, hat die folgende Sequenz:

```
5' GCGGGATCCGCCACCATGAACTCCTTCTCCACAAGCGCCTTCG
GTCCAGTTGCCTTCTCCCTGGGGCTGCTCCTGGTGGTGGCTGCTG
CCTTCCCTGCCCGAGTTGTGAGACAAGGGGACCTGGCCAGC3'
```

(SEQ ID NR: 16) Der 3'-Primer, der die unterstrichene BamHI-Restriktionsstelle und 18 Nucleotide komplementär zur 3'-codierenden Sequenz direkt vor dem Stop-Codon enthält, hat die folgende Sequenz:

```
5' GTGGGATCCTTACAGCAGTTTCAATGCACC 3'
(SEQ ID NR: 17).
```

[0187] Das durch PCR amplifizierte DNA-Fragment und der Vektor pcDNA1/Amp werden mit BamHI gespalten und dann ligiert. Das Ligationsgemisch wird in den E.Coli-Stamm SURE transformiert (erhältlich von Stratagene Cloning Systems, 11099 North Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037) und die transformierte Kultur wird auf Ampicillin-Mediumplatten ausplattiert, die dann inkubiert, um das Wachstum Ampicillin-resistenter Kolonien zu ermöglichen. Plasmid-DNA wird von resistenten Kolonien isoliert und durch Restriktionsanalyse oder andere Mittel auf die Anwesenheit des Fragments untersucht, das die extrazelluläre Domäne von Neurokin- α codiert.

[0188] Zur Expression des rekombinanten Neurokin- α werden COS-Zellen wie vorstehend beschrieben, unter Verwendung von DEAE-DEXTRAN, wie zum Beispiel beschrieben in Sambrook et al., Molecular Cloning: a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989), mit einem Expressionvektor transfektiert. Die Zellen werden unter Bedingungen zur Expression von Neurokin- α durch diesen Vektor, inkubiert.

[0189] Die Expression des Neurokin- α -HA-Fusionsproteins wird durch radioaktive Markierung und Immunpräzipitation unter Verwendung des zum Beispiel in Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, 2. Ausgabe; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1988) beschriebenen Verfahrens nachgewiesen. Zu diesem Zweck werden die Zellen zwei Tage nach der Transfektion durch Inkubation in Medium für 8 Stunden markiert, das ^{35}S -Cystein enthält. Die Zellen und das Medium werden gesammelt und die Zellen werden gewaschen und mit Detergens-enthaltendem RIPA-Puffer lysiert: 150 mM NaCl, 1 % NP-40, 0,1

% SDS, 1 % NP-40, 0,5% DOC, 50mM TRIS, pH-Wert 7,5, wie beschrieben von Wilson et al. vorstehend zitiert. Proteine werden vom Zellysat und vom Kulturmedium unter Verwendung eines HA-spezifischen monoclonalen Antikörpers ausgefällt. Die ausgefällten Proteine werden dann durch SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert. Ein Expressionsprodukt der erwarteten Größe, das in der negativen Kontrolle nicht erkannt wird, wird im Zellysat erkannt.

Beispiel 3(b): Clonierung und Expression in CHO-Zellen

[0190] Der Vektor pC4 wird für die Expression des Neutrokin- α -Proteins verwendet. Plasmid pC4 ist ein Derivat des Plasmids pSV2-dhfr (ATCC Hinterlegungsnummer 37146). Um eine lösliche abgesonderte Form des Neutrokin- α -Polypeptids zu erzeugen wird der Teil der hinterlegten cDNA, der die extrazelluläre Domäne codiert, mit der sekretorischen Leader-Sequenz des menschlichen IL-6-Gens verbunden. Der Plasmidvektor enthält das Maus-DHFR-Gen unter der Kontrolle des frühen Promotors von SV40. Chinesische Hamster Ovar- oder andere Zellen, welchen Dihydrofolatreduktase-Aktivität fehlt und die mit jenen Plasmiden transfiziert sind, können durch Züchtung der Zellen in einem selektiven Medium (Alpha-Minus- MEM, Life Technologies), das mit den chemotherapeutischen Stoff Methotrexat ergänzt ist selektiert werden. Die Amplifizierung der DHFR-Gene in Zellen, die gegen Methotrexat (MTX) resistent sind, ist gut belegt (siehe z.B.: Alt, F. W., Kellems, R. M., Bertino, J. R., und Schimke, R. T., 1978, J. Biol. Chem. 253:1357-1370, Hamlin, J. L. und Ma, C. 1990, Biochem. et Biophys. Acta, 1097:107-143, Page, M. J. und Sydenham, M. A. 1991, Biotechnology 9:64-68). Zellen, die in steigenden Konzentrationen von MTX gezüchtet werden, entwickeln, als ein Resultat der Amplifikation des DHFR-Gens durch Überproduktion des Zielenzym DHFR eine Resistenz zu dem Arzneimittel. Wenn ein zweites Gen mit dem DHFR-Gen verbunden wird, wird es üblicherweise co-amplifiziert und überexprimiert. Es ist im Fachgebiet bekannt, dass dieser Ansatz verwendet werden kann, um Zelllinien zu entwickeln, die mehr als 1000 Kopien des (der) amplifizierten Gens(e) tragen. Wenn das Methotrexat anschließend entzogen wird, werden Zelllinien erhalten, die das amplifizierte Gen integriert in ein oder mehrere Chromosomen) der Wirtszelle enthalten.

[0191] Das Plasmid pC4 enthält den starken Promotor der „Long Terminal repeat“ (LTR) des Rous-Sarcoma-Virus für die Expression des Gens von Interesse (Cullen, et al., Molecular and Cellular Biology, März 1985:438-447) mit einem Fragment, das von dem Enhancer der so genannten „immediate-early“-Genen des menschlichen Cytomegalovirus (CMV) (Boshart et al., Cell 41:521-530 (1985)) isoliert wurde. Stromabwärts vom Promoter sind die folgenden einmaligen Restriktionsenzym-Schnittstellen, welche die Integration der Gene ermöglichen: BamHI, XbaI und Asp718. Hinter diesen Clonierungsstellen enthält das Plasmid das 3'-Intron und die Polyadenylierungsstelle des Ratten-Preproinsulins. Andere hoch effiziente Promotoren können auch für die Expression verwendet werden z.B.: der menschliche β -Actin-Promotor, die SV40 frühen und späten Promotoren und die LTRs von anderen Retroviren z.B.: HIV und HTLV1. Clontech's Tet-Off und Tet-On-Genexpressionssysteme und ähnliche Systeme können verwendet werden, um Neutrokin- α auf regulierte Art und Weise in Säugerzellen zu exprimieren (Gossen, M., & Bujard, H. 1992, Proc. Natl. Acad. Sci, USA 89: 5547-5551). Für die Polyadenylierung der mRNA können auch andere Signale z.B.: vom menschlichen Wachstumshormon oder Globinogenen verwendet werden. Stabile Zelllinien die ein Gen von Interesse integriert in die Chromosomen tragen, können auch nach der Co-Transfektion mit einem selektierbaren Marker wie zum Beispiel gpt, G418 oder Hygromycin selektiert werden. Es ist vorteilhaft am Beginn mehr als einen selektierbaren Marker zu verwenden z.B.: G418 mit Methotrexat.

[0192] Das Plasmid pC4 wird mit dem Restriktionsenzym BamHI gespalten und dann unter Verwendung von im Fachgebiet bekannten Verfahren mit Kälber-Darmphosphaten dephosphoryliert. Der Vektor wird dann von einem 1 % Agarosegel isoliert.

[0193] Die DNA-Sequenz, welche die extrazelluläre Domäne des Neutrokin- α -Proteins codiert wird unter Verwendung von PCR-Oligonucleotid-Primern amplifiziert, die den 5'- und 3'-Sequenzen des Gens entsprechen. Der 5'-Primer der die unterstrichene BamHI-Stelle, eine Kozak-Sequenz, ein AUG-Startcodon, eine Sequenz, die das sekretorische Leaderpeptid des menschlichen IL-6-Gens und 18 Nucleotide des 5'-codierenden Bereichs der extrazellulären Domäne des Neutrokin- α -Proteins enthält, hat die folgende Sequenz:

```
5'GCGGGATCCGCCACCATGAACTCCTTCTCCACAAGCGCCTTCG
GTCCAGTTGCCTTCTCCCTGGGGCTGCTCCTGGTGTTCCTGCTG
CCTTCCCTGCCCCAGTTGTGAGACAAGGGGACCTGGCCAGC3'
```

[0194] (SEQ ID NR: 16). Der 3'-Primer, welcher die unterstrichene BamHI-Stelle und 18 Nucleotide komplementär zu der 3'-codierenden Sequenz direkt vor dem Stop-Codon enthält, hat die folgende Sequenz:

```
5' GTGGGATCCCTTACAGCAGTTTCAATGCACC 3'
```

(SEQ ID NR: 17).

[0195] Das amplifizierte Fragment wird mit der BamHI-Endonuclease gespalten und dann wieder auf einem 1 % Agarosegel gereinigt. Das isolierte Fragment und der dephosphorylierte Vektor werden dann mit T4 DNA-Ligase ligiert. E. coli HB101 oder XL-1 Blue-Zellen werden dann transformiert und Bakterien, welche das in Plasmid pC4 inserierte Fragment enthalten, werden dann zum Beispiel durch Restriktionsenzym-Analyse identifiziert.

[0196] Chinesische Hamster Ovar-Zellen, welchen ein aktives DHFR-Gen fehlt, werden für die Transfektion verwendet. 5 µg des Expressionsplasmids pC4 werden mit 0,5 µg des Plasmids pSVneo unter Verwendung von Lipofektin co-transfiziert (Felgner et al., vorstehend). Das Plasmid pSV2-neo enthält einen dominanten selektierbaren Marker, das neo-Gen von Tn5, welches ein Enzym codiert, das Resistenz gegen eine Gruppe von Antibiotika einschließlich G418 verleiht. Die Zellen werden in Alpha-minus-MEM das mit 1 mg/ml G418 ergänzt wurde, ausgesät. Nach 2 Tagen werden die Zellen trypsinisiert und auf Hybridom-Clonierungsplatten (Greiner, Germany) in Alpha-Minus-MEM ausgesät, das mit 10, 25 oder 50 ng/ml Methotrexat und 1 mg/ml G418 ergänzt ist. Nach etwa 10–14 Tagen werden einzelne Clone trypsinisiert und dann in Petrischalen mit 6 Vertiefungen oder in 10 ml Flaschen unter Verwendung verschiedener Konzentrationen an Methotrexat (50 nM, 100 nM, 200 nM, 400 nM, 800 nM) ausgesät. Clone die bei den höchsten Methotrexat-Konzentrationen wachsen werden dann in neue Platten mit 6 Vertiefungen transferiert, die noch höhere Konzentrationen an Methotrexat enthalten (1 µM, 2 µM, 5 µM, 10 mM, 20 mM). Der gleiche Vorgang wird wiederholt, bis Clone erhalten werden, die bei einer Konzentration von 100 – 200 µM wachsen. Die Expression des gewünschten Genprodukts wird zum Beispiel durch SDS-PAGE und Western-Blot oder durch Umkehr-Phasen-HPLC-Analyse analysiert.

Beispiel 4: Gewebeverteilung der Neutrokin- α -mRNA-Expression

[0197] Northern-Blot-Analyse wird durchgeführt, um die Expression des Neutrokin- α -Gens in menschlichen Geweben unter Verwendung der unter anderem durch Sambrook et al., vorstehend zitiert, zu untersuchen. Eine cDNA-Sonde, welche die gesamte Nucleotidsequenz des Neutrokin- α -Proteins (SEQ ID NR: 1) enthält, wird unter Verwendung des rediprimeTM-DNA-Markierungssystem (Amersham Life Science) gemäß den Anweisungen des Herstellers mit ³²P markiert. Nach der Markierung wird die Sonde unter Verwendung einer CHROMA SPIN-100TM-Säule (Clontech Laboratories, Inc.) gemäß der Protokollnummer PT1200-1 des Herstellers gereinigt. Die gereinigte markierte Sonde wird dann verwendet, um verschiedene menschliche Gewebe auf Neutrokin- α -mRNA zu untersuchen.

[0198] „Northern (MTN)“-Blots von mehrfachen Geweben, welche verschiedene menschliche Gewebe (H) oder menschliche Immunsystemgewebe (IM) enthalten, werden von Clontech erhalten und mit einer markierten Sonde unter Verwendung der ExpressHybTM-Hybridisierungslösung (Clontech) gemäß der Protokollnummer PT1190-1 des Herstellers untersucht. Im Anschluss an Hybridisierung und Waschen werden die Blots aufgezogen und bei –70°C über Nacht auf Filmen exponiert und die Filme gemäß Standardverfahren entwickelt.

SEQUENZPROTOKOLL

(1) Allgemeine Information:

- (i) Anmelder: Yu, Guo-Liang
Ebner, Reinhard
Ni, Jian
- (ii) Titel der Anmeldung: Neutrokin-alpha
- (iii) Zahl der Sequenzen: 17
- (iv) Korrespondenzadresse:
 - (A) Adressant: Human Genome Science, Inc.
 - (B) Straße: 9410 Key West Avenue
 - (C) Stadt: Rockville
 - (D) Staat: MD
 - (E) Land: USA
 - (F) Postleitzahl: 20850
- (v) Computerlesbare Form:
 - (A) Medium: Diskette
 - (B) Computer: IBM PC-kompatibel
 - (C) Betriebssystem: PC-DOS/MS-DOS
 - (D) Software: PatentIn Release #1.0, Version #1.30
- (vi) Daten der vorliegenden Anmeldung:
 - (A) Anmeldenummer:
 - (B) Anmeldedatum:
 - (C) Klassifizierung:
- (viii) Informationen zum Anwalt/Vertreter:
 - (A) Name: Benson, Robert, H
 - (B) Registrierungsnummer: 30.446
 - (C) Referenz/Aktennummer: PF343
- (ix) Informationen zur Fernmeldeverbindung:
 - (A) Telephon: (301) 309-8504
 - (B) Telefax: (301) 309-8512

(2) Informationen zur SEQ ID NR: 1

- (i) Sequenzmerkmale:
 - (A) Länge: 1100 Basenpaare
 - (B) Typ: Nucleinsäure
 - (C) Strangform: Einzelstrang
 - (D) Topologie: linear
- (ii) Molekültyp: DNA (genomisch)
- (ix) Eigenschaft:
 - (A) Name/Schlüssel: CDS

(B) Lage: 147..1001

(ix) Eigenschaft:
 (A) Name/Schlüssel: Signal__Peptid
 (B) Lage: 285..381

(ix) Eigenschaft:
 (A) Name/Schlüssel: Reifes__Peptid
 (B) Lage: 147..1001

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NR: 1:

AAATTCAGGA TAACTCTCCT GAGGGGTGAG CCAAGCCCTG CCATGTAGTG CACGCAGGAC	60
ATCAACAAAC ACAGATAACA GGAAATGATC CATTCCCTGT GGTCAC TTAT TCTAAAGGCC	120
CCAACCTTCA AAGTTCAAGT AGTGAT ATG GAT GAC TCC ACA GAA AGG GAG CAG	173
Met Asp Asp Ser Thr Glu Arg Glu Gln	
1 5	
TCA CGC CTT ACT TCT TGC CTT AAG AAA AGA GAA GAA ATG AAA CTG AAG	221
Ser Arg Leu Thr Ser Cys Leu Lys Lys Arg Glu Glu Met Lys Leu Lys	
10 15 20 25	
GAG TGT GTT TCC ATC CTC CCA CGG AAG GAA AGC CCC TCT GTC CGA TCC	269
Glu Cys Val Ser Ile Leu Pro Arg Lys Glu Ser Pro Ser Val Arg Ser	
30 35 40	
TCC AAA GAC GGA AAG CTG CTG GCT GCA ACC TTG CTG CTG GCA CTG CTG	317
Ser Lys Asp Gly Lys Leu Leu Ala Ala Thr Leu Leu Leu Ala Leu Leu	
45 50 55	
TCT TGC TGC CTC ACG GTG GTG TCT TTC TAC CAG GTG GCC GCC CTG CAA	365
Ser Cys Cys Leu Thr Val Val Ser Phe Tyr Gln Val Ala Ala Leu Gln	
60 65 70	
GGG GAC CTG GCC AGC CTC CGG GCA GAG CTG CAG GGC CAC CAC GCG GAG	413
Gly Asp Leu Ala Ser Leu Arg Ala Glu Leu Gln Gly His His Ala Glu	
75 80 85	
AAG CTG CCA GCA GGA GCA GGA GCC CCC AAG GCC GGC CTG GAG GAA GCT	461
Lys Leu Pro Ala Gly Ala Gly Ala Pro Lys Ala Gly Leu Glu Glu Ala	
90 95 100 105	
CCA GCT GTC ACC GCG GGA CTG AAA ATC TTT GAA CCA CCA GCT CCA GGA	509
Pro Ala Val Thr Ala Gly Leu Lys Ile Phe Glu Pro Pro Ala Pro Gly	
110 115 120	
GAA GGC AAC TCC AGT CAG AAC AGC AGA AAT AAG CGT GCC GTT CAG GGT	557
Glu Gly Asn Ser Ser Gln Asn Ser Arg Asn Lys Arg Ala Val Gln Gly	
125 130 135	

CCA GAA GAA ACA GTC ACT CAA GAC TGC TTG CAA CTG ATT GCA GAC AGT Pro Glu Glu Thr Val Thr Gln Asp Cys Leu Gln Leu Ile Ala Asp Ser 140 145 150	605
GAA ACA CCA ACT ATA CAA AAA GGA TCT TAC ACA TTT GTT CCA TGG CTT Glu Thr Pro Thr Ile Gln Lys Gly Ser Tyr Thr Phe Val Pro Trp Leu 155 160 165	653
CTC AGC TTT AAA AGG GGA AGT GCC CTA GAA GAA AAA GAG AAT AAA ATA Leu Ser Phe Lys Arg Gly Ser Ala Leu Glu Glu Lys Glu Asn Lys Ile 170 175 180 185	701
TTG GTC AAA GAA ACT GGT TAC TTT TTT ATA TAT GGT CAG GTT TTA TAT Leu Val Lys Glu Thr Gly Tyr Phe Phe Ile Tyr Gly Gln Val Leu Tyr 190 195 200	749
ACT GAT AAG ACC TAC GCC ATG GGA CAT CTA ATT CAG AGG AAG AAG GTC Thr Asp Lys Thr Tyr Ala Met Gly His Leu Ile Gln Arg Lys Lys Val 205 210 215	797
CAT GTC TTT GGG GAT GAA TTG AGT CTG GTG ACT TTG TTT CGA TGT ATT His Val Phe Gly Asp Glu Leu Ser Leu Val Thr Leu Phe Arg Cys Ile 220 225 230	845
CAA AAT ATG CCT GAA ACA CTA CCC AAT AAT TCC TGC TAT TCA GCT GGC Gln Asn Met Pro Glu Thr Leu Pro Asn Asn Ser Cys Tyr Ser Ala Gly 235 240 245	893
ATT GCA AAA CTG GAA GAA GGA GAT GAA CTC CAA CTT GCA ATA CCA AGA Ile Ala Lys Leu Glu Glu Gly Asp Glu Leu Gln Leu Ala Ile Pro Arg 250 255 260 265	941
GAA AAT GCA CAA ATA TCA CTG GAT GGA GAT GTC ACA TTT TTT GGT GCA Glu Asn Ala Gln Ile Ser Leu Asp Gly Asp Val Thr Phe Phe Gly Ala 270 275 280	989
TTG AAA CTG CTG TGACCTACTT ACACCATGTC TGTAGCTATT TTCCTCCCTT Leu Lys Leu Leu 285	1041
TCTCTGTACC TCTAAGAAGA AAGAATCTAA CTGAAAATAC CAAAAAAAAA AAAAAAAAAA	1100

(2) Informationen zur SEQ ID NR: 2

- (i) Sequenzmerkmale:
 - (A) Länge: 285 Aminosäuren
 - (B) Typ: Aminosäure
 - (D) Topologie: linear
- (ii) Molekültyp: Protein
- (xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NR: 2:

Met Asp Asp Ser Thr Glu Arg Glu Gln Ser Arg Leu Thr Ser Cys Leu
 1 5 10 15
 Lys Lys Arg Glu Glu Met Lys Leu Lys Glu Cys Val Ser Ile Leu Pro
 20 25 30
 Arg Lys Glu Ser Pro Ser Val Arg Ser Ser Lys Asp Gly Lys Leu Leu
 35 40 45
 Ala Ala Thr Leu Leu Leu Ala Leu Leu Ser Cys Cys Leu Thr Val Val
 50 55 60
 Ser Phe Tyr Gln Val Ala Ala Leu Gln Gly Asp Leu Ala Ser Leu Arg
 65 70 75 80
 Ala Glu Leu Gln Gly His His Ala Glu Lys Leu Pro Ala Gly Ala Gly
 85 90 95
 Ala Pro Lys Ala Gly Leu Glu Glu Ala Pro Ala Val Thr Ala Gly Leu
 100 105 110
 Lys Ile Phe Glu Pro Pro Ala Pro Gly Glu Gly Asn Ser Ser Gln Asn
 115 120 125
 Ser Arg Asn Lys Arg Ala Val Gln Gly Pro Glu Glu Thr Val Thr Gln
 130 135 140
 Asp Cys Leu Gln Leu Ile Ala Asp Ser Glu Thr Pro Thr Ile Gln Lys
 145 150 155 160
 Gly Ser Tyr Thr Phe Val Pro Trp Leu Leu Ser Phe Lys Arg Gly Ser
 165 170 175
 Ala Leu Glu Glu Lys Glu Asn Lys Ile Leu Val Lys Glu Thr Gly Tyr
 180 185 190
 Phe Phe Ile Tyr Gly Gln Val Leu Tyr Thr Asp Lys Thr Tyr Ala Met
 195 200 205
 Gly His Leu Ile Gln Arg Lys Lys Val His Val Phe Gly Asp Glu Leu
 210 215 220
 Ser Leu Val Thr Leu Phe Arg Cys Ile Gln Asn Met Pro Glu Thr Leu
 225 230 235 240
 Pro Asn Asn Ser Cys Tyr Ser Ala Gly Ile Ala Lys Leu Glu Glu Gly
 245 250 255
 Asp Glu Leu Gln Leu Ala Ile Pro Arg Glu Asn Ala Gln Ile Ser Leu
 260 265 270
 Asp Gly Asp Val Thr Phe Phe Gly Ala Leu Lys Leu Leu
 275 280 285

(2) Informationen zur SEQ ID NR: 3

- (i) Sequenzmerkmale:
 - (A) Länge: 233 Aminosäuren
 - (B) Typ: Aminosäure
 - (C) Strangform: Einzelstrang
 - (D) Topologie: linear
- (ii) Molekültyp: Protein
- (xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NR: 3:

```

Met Ser Thr Glu Ser Met Ile Arg Asp Val Glu Leu Ala Glu Glu Ala
1           5           10           15
Leu Pro Lys Lys Thr Gly Gly Pro Gln Gly Ser Arg Arg Cys Leu Phe
20           25           30
Leu Ser Leu Phe Ser Phe Leu Ile Val Ala Gly Ala Thr Thr Leu Phe
35           40           45
Cys Leu Leu His Phe Gly Val Ile Gly Pro Gln Arg Glu Glu Ser Pro
50           55           60
Arg Asp Leu Ser Leu Ile Ser Pro Leu Ala Gln Ala Val Arg Ser Ser
65           70           75           80
Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro Val Ala His Val Val Ala Asn Pro
85           90           95
Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn Arg Arg Ala Asn Ala Leu
100          105          110
Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln Leu Val Val Pro Ser
115          120          125
Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe Lys Gly Gln Gly
130          135          140
Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr Ile Ser Arg Ile Ala
145          150          155          160
Val Ser Tyr Gln Thr Lys Val Asn Leu Leu Ser Ala Ile Lys Ser Pro
165          170          175
Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys Pro Trp Tyr Glu
180          185          190
Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Lys Gly Asp Arg Leu
195          200          205

```


Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp Phe Ala Glu Ser Gly
 210 215 220

Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu
 225 230

(2) Informationen zur SEQ ID NR: 4

- (i) Sequenzmerkmale:
 - (A) Länge: 205 Aminosäuren
 - (B) Typ: Aminosäure
 - (C) Strangform: Einzelstrang
 - (D) Topologie: linear
- (ii) Molekültyp: Protein
- (xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NR: 4:

Met Thr Pro Pro Glu Arg Leu Phe Leu Pro Arg Val Cys Gly Thr Thr
 1 5 10 15

Leu His Leu Leu Leu Leu Gly Leu Leu Leu Val Leu Leu Pro Gly Ala
 20 25 30

Gln Gly Leu Pro Gly Val Gly Leu Thr Pro Ser Ala Ala Gln Thr Ala
 35 40 45

Arg Gln His Pro Lys Met His Leu Ala His Ser Thr Leu Lys Pro Ala
 50 55 60

Ala His Leu Ile Gly Asp Pro Ser Lys Gln Asn Ser Leu Leu Trp Arg
 65 70 75 80

Ala Asn Thr Asp Arg Ala Phe Leu Gln Asp Gly Phe Ser Leu Ser Asn
 85 90 95

Asn Ser Leu Leu Val Pro Thr Ser Gly Ile Tyr Phe Val Tyr Ser Gln
 100 105 110

Val Val Phe Ser Gly Lys Ala Tyr Ser Pro Lys Ala Pro Ser Ser Pro
 115 120 125

Leu Tyr Leu Ala His Glu Val Gln Leu Phe Ser Ser Gln Tyr Pro Phe
 130 135 140

His Val Pro Leu Leu Ser Ser Gln Lys Met Val Tyr Pro Gly Leu Gln
 145 150 155 160

Glu Pro Trp Leu His Ser Met Tyr His Gly Ala Ala Phe Gln Leu Thr
 165 170 175

Gln Gly Asp Gln Leu Ser Thr His Thr Asp Gly Ile Pro His Leu Val
 180 185 190

Leu Ser Pro Ser Thr Val Phe Phe Gly Ala Phe Ala Leu
 195 200 205

(2) Informationen zur SEQ ID NR: 5

- (i) Sequenzmerkmale:
 (A) Länge: 244 Aminosäuren
 (B) Typ: Aminosäure
 (C) Strangform: Einzelstrang
 (D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: Protein

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NR: 5:

Met Gly Ala Leu Gly Leu Glu Gly Arg Gly Gly Arg Leu Gln Gly Arg
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Leu Leu Ala Val Ala Gly Ala Thr Ser Leu Val Thr Leu
 20 25 30
 Leu Leu Ala Val Pro Ile Thr Val Leu Ala Val Leu Ala Leu Val Pro
 35 40 45
 Gln Asp Gln Gly Gly Leu Val Thr Glu Thr Ala Asp Pro Gly Ala Gln
 50 55 60
 Ala Gln Gln Gly Leu Gly Phe Gln Lys Leu Pro Glu Glu Glu Pro Glu
 65 70 75 80
 Thr Asp Leu Ser Pro Gly Leu Pro Ala Ala His Leu Ile Gly Ala Pro
 85 90 95
 Leu Lys Gly Gln Gly Leu Gly Trp Glu Thr Thr Lys Glu Gln Ala Phe
 100 105 110
 Leu Thr Ser Gly Thr Gln Phe Ser Asp Ala Glu Gly Leu Ala Leu Pro
 115 120 125
 Gln Asp Gly Leu Tyr Tyr Leu Tyr Cys Leu Val Gly Tyr Arg Gly Arg
 130 135 140
 Ala Pro Pro Gly Gly Gly Asp Pro Gln Gly Arg Ser Val Thr Leu Arg
 145 150 155 160
 Ser Ser Leu Tyr Arg Ala Gly Gly Ala Tyr Gly Pro Gly Thr Pro Glu
 165 170 175

Leu Leu Leu Glu Gly Ala Glu Thr Val Thr Pro Val Leu Asp Pro Ala
 180 185 190
 Arg Arg Gln Gly Tyr Gly Pro Leu Trp Tyr Thr Ser Val Gly Phe Gly
 195 200 205
 Gly Leu Val Gln Leu Arg Arg Gly Glu Arg Val Tyr Val Asn Ile Ser
 210 215 220
 His Pro Asp Met Val Asp Phe Ala Arg Gly Lys Thr Phe Phe Gly Ala
 225 230 235 240
 Val Met Val Gly

(2) Informationen zur SEQ ID NR: 6

- (i) Sequenzmerkmale:
- (A) Länge: 281 Aminosäuren
 - (B) Typ: Aminosäure
 - (C) Strangform: Einzelstrang
 - (D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: Protein

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NR: 6:

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

Lys Gln Ile Gly His Pro Ser Pro Pro Pro Glu Lys Lys Glu Leu Arg
 130 135 140
 Lys Val Ala His Leu Thr Gly Lys Ser Asn Ser Arg Ser Met Pro Leu
 145 150 155 160
 Glu Trp Glu Asp Thr Tyr Gly Ile Val Leu Leu Ser Gly Val Lys Tyr
 165 170 175
 Lys Lys Gly Gly Leu Val Ile Asn Glu Thr Gly Leu Tyr Phe Val Tyr
 180 185 190
 Ser Lys Val Tyr Phe Arg Gly Gln Ser Cys Asn Asn Leu Pro Leu Ser
 195 200 205
 His Lys Val Tyr Met Arg Asn Ser Lys Tyr Pro Gln Asp Leu Val Met
 210 215 220
 Met Glu Gly Lys Met Met Ser Tyr Cys Thr Thr Gly Gln Met Trp Ala
 225 230 235 240
 Arg Ser Ser Tyr Leu Gly Ala Val Phe Asn Leu Thr Ser Ala Asp His
 245 250 255
 Leu Tyr Val Asn Val Ser Glu Leu Ser Leu Val Asn Phe Glu Glu Ser
 260 265 270
 Gln Thr Phe Phe Gly Leu Tyr Lys Leu
 275 280

(2) Informationen zur SEQ ID NR: 7

- (i) Sequenzmerkmale:
 - (A) Länge: 338 Basenpaare
 - (B) Typ: Nucleinsäure
 - (C) Strangform: Einzelstrang
 - (D) Topologie: linear
- (ii) Molekültyp: DNA (genomisch)
- (xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NR: 7:

AGGNTAACTC TCCTGAGGGG TGAGCCAAGC CCTGCCATGT AGTGCAAGCA GGACATCANC 60
 AAACACANNN NNCAGGAAAT AATCCATTCC CTGTGGTCAC TTATTCTAAA GGCCCCAACC 120
 TTCAAAGTTC AAGTAGTGAT ATGGATGACT CCACAGAAAG GGAGCAGTCA CGCCTTACTT 180
 CTTGCCTTAA GAAAAGAGAA GAAATGAAAC TGNAAGGAGT GTGTTTCCAT CCTCCCACGG 240
 AAGGAAAGCC CCTCTNTCCG ATCCTCCAAA GACGGAAAGC TGCTGGCTGC AACCTTGNTG 300
 NTGGCATTGT GTTCTTGCTG NCTCAAGGTG GTGTTTNT 338

(2) Informationen zur SEQ ID NR: 8

- (i) Sequenzmerkmale:
 - (A) Länge: 509 Basenpaare
 - (B) Typ: Nucleinsäure
 - (C) Strangform: Einzelstrang
 - (D) Topologie: linear
- (ii) Molekültyp: DNA (genomisch)
- (xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NR: 8:

```

AATTCGGCAN AGNAACTGG TTACTTTTTT ATATATGGTC AGGTTTTATA TACTGATAAG      60
ACCTACGCCA TGGGACATCT AGTTCAGAGG AAGAAGGTCC ATGTCTTTGG GGATGAATTG      120
AGTCTGGTGA CTTTGTTCG ATGTATTCAA AATATGCCTG AAACACTACC CAATAATTCC      180
TGCTATT CAG CTGGCATTGC AAAACTG GNA GGAAGGAGAT GAACTCCAAC TTGCAATACC      240
AGGGGAAAAT GCACAATTAT CACTGGGATG GAGATGTTCA CTTTTTTTGG GTGCCATTGA      300
AACTGCTGTG ACCTNCTTAC ANCANGTGCT GTTNGCTATT TTNCCTNCCT NTTCTNTGGT      360
AACCTCTTAG GAAGGAAGGA TTCTTAACTG GGAAATAACC CAAAAAANN TTAAANGGGT      420
ANGNGNNANA NGNGGGGNNG TTNCNNGNN GNNTTTTTNGG NNTATNTTNT NNTNGGGNNN      480
NGTAAAAATG GGGCCNANGG GGGNTTTTTT                                     509

```

(2) Informationen zur SEQ ID NR: 9

- (i) Sequenzmerkmale:
 - (A) Länge: 497 Basenpaare
 - (B) Typ: Nucleinsäure
 - (C) Strangform: Einzelstrang
 - (D) Topologie: linear
- (ii) Molekültyp: DNA (genomisch)
- (xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NR: 9:

```

AATTCGGCAC GAGCAAGGCC GGCCTGGAGG AAGCTCCAGC TGTCACCGCG GGA CTGAAAA      60
TCTTTGAACC ACCAGCTCCA GGAGAAGGCA ACTCCAGTCA GAACAGCAGA AATAAGCGTG      120
CCGTT CAGGG TCCAGAAGAA ACAGTCACTC AAGACTGCTT GCAACTGNTT GCAGACAGTG      180

```

AAACACCAAC TATACAAAA GGCTCCCTTC TGNTGCCACA TTTGGGCCAA GGAATGGAGA	240
GATTTCCTCG TCTGGAAACA TTTTGCCAAA CTCTTCAGAT ACTCTTINCT CTCTGGGAAT	300
CAAAGGAAAA TCTCTACTTA GATTNACACA TTTGTTCCCA TGGGTNTCTT AAGTTTTAAA	360
AGGGGAGTGC CCTTAGGAGG AAAAGGGGAT AAATATTGGC CAAGGNACTG GTTANTTTNT	420
AAATATGGTC AGGTTTNTAT ANCTGGTAGG CCTCGCCATG GGCATTNATT CANGGNGAGG	480
NCNNTCTTTT GGGNTGA	497

(2) Informationen zur SEQ ID NR: 10

- (i) Sequenzmerkmale:
 - (A) Länge: 27 Basenpaare
 - (B) Typ: Nucleinsäure
 - (C) Strangform: Einzelstrang
 - (D) Topologie: linear
- (ii) Molekültyp: DNA (genomisch)
- (xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NR: 10:

GTGGGATCCA GCCTCCGGGC AGAGCTG	27
-------------------------------	----

(2) Informationen zur SEQ ID NR: 11

- (i) Sequenzmerkmale:
 - (A) Länge: 33 Basenpaare
 - (B) Typ: Nucleinsäure
 - (C) Strangform: Einzelstrang
 - (D) Topologie: linear
- (ii) Molekültyp: DNA (genomisch)
- (xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NR: 11:

GTGAAGCTTT TATTACAGCA GTTCAATGC ACC	33
-------------------------------------	----

(2) Informationen zur SEQ ID NR: 12

- (i) Sequenzmerkmale:
 - (A) Länge: 26 Basenpaare
 - (B) Typ: Nucleinsäure
 - (C) Strangform: Einzelstrang
 - (D) Topologie: linear
- (ii) Molekültyp: DNA (genomisch)

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NR: 12:

GTGTCATGAG CCTCCGGGCA GAGCTG

26

(2) Informationen zur SEQ ID NR: 13

(i) Sequenzmerkmale:

- (A) Länge: 33 Basenpaare
- (B) Typ: Nucleinsäure
- (C) Strangform: Einzelstrang
- (D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: DNA (genomisch)

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NR: 13:

GTGAAGCTTT TATTACAGCA GTTCAATGC ACC

33

(2) Informationen zur SEQ ID NR: 14

(i) Sequenzmerkmale:

- (A) Länge: 28 Basenpaare
- (B) Typ: Nucleinsäure
- (C) Strangform: Einzelstrang
- (D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: DNA (genomisch)

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NR: 14:

GTGGGATCCC CGGGCAGAGC TGCAGGGC

28

(2) Informationen zur SEQ ID NR: 15

(i) Sequenzmerkmale:

- (A) Länge: 33 Basenpaare
- (B) Typ: Nucleinsäure
- (C) Strangform: Einzelstrang
- (D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: DNA (genomisch)

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NR: 15:

GTGGGATCCT TATTACAGCA GTTCAATGC ACC

33

(2) Informationen zur SEQ ID NR: 16

- (i) Sequenzmerkmale:
 - (A) Länge: 129 Basenpaare
 - (B) Typ: Nucleinsäure
 - (C) Strangform: Einzelstrang
 - (D) Topologie: linear
- (ii) Molekültyp: DNA (genomisch)
- (xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NR: 16:

GCGGGATCCG CCACCATGAA CTCCTTCTCC ACAAGCGCCT TCGGTCCAGT TGCCTTCTCC 60
 CTGGGGCTGC TCCTGGTGTT GCCTGCTGCC TTCCTGCCC CAGTTGTGAG ACAAGGGGAC 120
 CTGGCCAGC 129

(2) Informationen zur SEQ ID NR: 17

- (i) Sequenzmerkmale:
 - (A) Länge: 30 Basenpaare
 - (B) Typ: Nucleinsäure
 - (C) Strangform: Einzelstrang
 - (D) Topologie: linear
- (ii) Molekültyp: DNA (genomisch)
- (xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NR: 17:

GTGGGATCCT TACAGCAGT TCAATGCACC

30

Patentansprüche

1. Nucleinsäuremolekül, umfassend eine Polynucleotidsequenz, die ein Neutrokin- α -Polypeptid codiert, wobei die Polynucleotidsequenz ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus:

- (a) einer Polynucleotidsequenz, die das Volllängen-Neutrokin- α -Polypeptid mit der Aminosäuresequenz der Reste 1 bis 285 von SEQ ID NO: 2 codiert;
- (b) einer Polynucleotidsequenz, welche die extrazelluläre Domäne des Neutrokin- α -Polypeptids mit der Aminosäuresequenz der Reste 73 bis 285 von SEQ ID NO: 2 codiert;
- (c) einer Polynucleotidsequenz, welche die Aminosäuresequenz der Reste n bis 285 von SEQ ID NO: 2, wobei n eine ganze Zahl im Bereich von 2 bis 190 ist, der Reste 1 bis m von SEQ ID NO: 2, wobei m eine ganze Zahl im Bereich von 274 bis 284 ist, oder der Reste n bis m von SEQ ID NO: 2 codiert, wobei n eine ganze Zahl im Bereich von 2 bis 190 und m eine ganze Zahl im Bereich von 274 bis 284 ist, wobei die Polynucleotidsequenz ein Polypeptid mit Neutrokin- α -Aktivität codiert;
- (d) einer Polynucleotidsequenz, die zu mindestens 90 % identisch ist mit einer wie in (a) oder (b) definierten Polynucleotidsequenz und die ein Polypeptid mit Neutrokin- α -Aktivität codiert;
- (e) einer Polynucleotidsequenz, die ein Polypeptid mit einer Aminosäuresequenz codiert, die zu mindestens 90 % identisch ist mit der in (a), (b) oder (c) definierten Aminosäuresequenz, wobei das Polypeptid Neutrokin- α -Aktivität hat; und
- (f) einer Polynucleotidsequenz, welche das Komplement der Volllängen-Sequenz einer wie in (a) bis (e) definierten Polynucleotidsequenz ist.

2. Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 1, wobei die Aminosäuresequenz des Volllängen-Neutrokin- α -Polypeptids diejenige ist, welche von dem cDNA-Clon codiert wird, der in der ATCC-Hinterlegungs-Nr. 97768 enthalten ist.

3. Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 1, wobei die Aminosäuresequenz der extrazellulären Domäne des Neutrokin- α -Polypeptids diejenige ist, die von dem cDNA-Clon codiert wird, welcher in der ATCC-Hinterlegungs-Nr. 97768 enthalten ist.

4. Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 1, wobei die Neutrokin- α -Aktivität Modulation der Proliferation, Differenzierung oder des Überlebens von Lymphocyten ist.

5. Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 1, umfassend eine Polynucleotidsequenz, die ein Polypeptid codiert, das zu mindestens 95 % identisch ist mit einem Polypeptid, das die Aminosäure-Reste 134 bis 285 von SEQ ID NO: 2 umfasst.

6. Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 5, umfassend eine Polynucleotidsequenz, welche die Aminosäure-Reste 134 bis 285 von SEQ ID NO: 2 codiert.

7. Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 5, das aus einer Polynucleotidsequenz besteht, welche die Aminosäure-Reste 134 bis 285 von SEQ ID NO: 2 codiert.

8. Nucleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 7, das DNA oder RNA ist.

9. Verfahren zur Herstellung eines rekombinanten Vektors, umfassend das Inserieren des Nucleinsäuremoleküls nach einem der Ansprüche 1 bis 8 in einen Vektor.

10. Rekombinanter Vektor, enthaltend das Nucleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 8.

11. Vektor nach Anspruch 10, in dem das Nucleinsäuremolekül funktionell mit Expressions-Kontrollsequenzen verbunden ist, welche die Expression des Polynucleotids in prokaryontischen oder eukaryontischen Wirtszellen erlauben.

12. Verfahren zur Herstellung einer rekombinanten Wirtszelle, umfassend das Einbringen des Vektors nach Anspruch 10 oder 11 in eine Wirtszelle.

13. Wirtszelle, die gentechnisch verändert ist mit dem Nucleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 8.

14. Verfahren zur Herstellung eines Neutrokin- α -Polypeptids mit Neutrokin- α -Aktivität, umfassend: Züchten der Wirtszelle nach Anspruch 13 und Gewinnen des Neutrokin- α -Polypeptids, das von dem Nucleinsäuremolekül codiert wird.

15. Neutrokin- α -Polypeptid mit der Aminosäuresequenz, die von einem Nucleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 8 codiert wird, oder erhältlich durch das Verfahren nach Anspruch 14.

16. Neutrokin- α -Polypeptid nach Anspruch 15, das von der Wirtszelle nach Anspruch 13 proteolytisch gespalten wird.

17. Polypeptid nach Anspruch 15 oder 16, das markiert ist.

18. Polypeptid nach Anspruch 17, das radiomarkiert ist.

19. Polypeptid nach Anspruch 18, wobei das Polypeptid mit einem Radioisotop radiomarkiert ist, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus:

- (a) ^{131}I ;
- (b) ^{125}I ;
- (c) ^{121}I ;
- (d) ^{112}In ; und
- (e) $^{99\text{m}}\text{Tc}$.

20. Antikörper oder Teil davon, der/das spezifisch an den Neutrokin- α -Anteil eines Neutrokin- α -Polypeptids mit der Aminosäuresequenz, die von dem Nucleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1(a) bis 1(f) oder 7 codiert wird, oder an den Neutrokin- α -Anteil eines Neutrokin- α -Polypeptids nach Anspruch 15 oder 16 bindet.

21. Antikörper oder Teil davon nach Anspruch 20, der/das ein Antagonist des Polypeptids nach Anspruch 15 oder 16 ist.

22. Antikörper oder Teil davon nach Anspruch 20 oder 21, der/das ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus:

- (a) einem monoclonalen Antikörper;
- (b) einem polyclonalen Antikörper;
- (c) einem chimären Antikörper;
- (d) einem Fab-Fragment; und
- (e) einem F(ab')₂-Fragment.

23. Antikörper oder Teil davon nach einem der Ansprüche 20 bis 22, der/das markiert ist.

24. Antikörper oder Teil davon nach Anspruch 23, der/das mit einer Markierung markiert ist, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus:

- (a) einer Enzym-Markierung;
- (b) einem Radioisotop;
- (c) einer Fluoreszenz-Markierung; und
- (d) Biotin.

25. Antikörper oder Teil davon nach Anspruch 24, wobei die Markierung ein Radioisotop ist, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus:

- (a) ¹²⁵I;
- (b) ¹²¹I;
- (c) ¹³¹I;
- (d) ¹¹²In; und
- (e) ^{99m}Tc.

26. Arzneimittel, umfassend das Nucleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 8, das Polypeptid nach einem der Ansprüche 15 bis 19 oder den Antikörper oder Teil davon nach einem der Ansprüche 20 bis 25 und gegebenenfalls einen pharmazeutisch verträglichen Träger.

27. Diagnostisches Mittel, umfassend das Nucleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 8, das Polypeptid nach einem der Ansprüche 15 bis 19 oder den Antikörper oder Teil davon nach einem der Ansprüche 20 bis 25.

Es folgen 10 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

Neutrokin- α

1 AAATTCAGGATAACTCTCCTGAGGGGTGAGCCAAGCCCTGCCATGTAGTGACGCAGGAC 60

61 ATCAACAAACACAGATAACAGGAAATGATCCATTCCCTGTGGTCACTTATTCTAAAGGCC 120

121 CCAACCTTCAAAGTTCAAGTAGTGATATGGATGACTCCACAGAAAGGGAGCAGTCACGCC 180
 1 M D D S T E R E Q S R L 12

181 TTACTTCTTGCCTTAAGAAAAGAGAAGAAATGAAACTGAAGGAGTGTGTTTCCATCCTCC 240
 13 T S C L K K R E E M K L K E C V S I L P 32
 CD-I

241 CACGGAAGGAAAGCCCCTGTCCGATCCTCAAAGACGGAAAGCTGCTGGCTGCAACCT 300
 33 R K E S P S V R S S K D G K L L A A T L 52
 CD-I

301 TGCTGCTGGCACTGCTGTCTTGCTGCCTCACGGTGGTGTCTTTCTACCAGGTGGCCGCC 360
 53 L L A L L S C C L T V V S F Y Q V A A L 72

361 TGCAAGGGGACCTGGCCAGCCTCCGGGCAGAGCTGCAGGGCCACCACGCGGAGAAGCTGC 420
 73 Q G D L A S L R A E L Q G H H A E K L P 92
 CD-II

421 CAGCAGGAGCAGGAGCCCCAAGGCCGGCCTGGAGGAAGCTCCAGCTGTACC GCGGGAC 480
 93 A G A G A P K A G L E E A P A V T A G L 112
 CD-III

481 TGAAAATCTTTGAACCACCAGCTCCAGGAGAAGGCAACTCCAGTCAGAACAGCAGAAATA 540
 113 K I F E P P A P G E G N S S Q N S R N K 132
 #

541 AGCGTGCCGTTTCAGGGTCCAGAAGAAACAGTCACTCAAGACTGCTTGCAACTGATTGCAG 600
 133 R A V Q G P E E T V T Q D C L Q L I A D 152
 CD-IV

FIG.1A

Neutrokin - α

601 ACAGTGA AACCAACTATACAAAAAGGATCTTACACATTTGTTCCATGGCTTCTCAGCT 660
 153 S E T P T I Q K G S Y T F V P W L L S F 172
 CD-V

661 TTAAAAGGGGAAGTGCCCTAGAAGAAAAAGAGAATAAAATATTGGTCAAAGAAACTGGTT 720
 173 K R G S A L E E K E N K I L V K E T G Y 192
 CD-V CD-VI

721 ACTTTTTTATATATGGTCAGGTTTTATATACTGATAAGACCTACGCCATGGGACATCTAA 780
 193 F F I Y G Q V L Y T D K T Y A M G H L I 212
 CD-VI CD-VII

781 TTCAGAGGAAGAAGGTCCATGTCTTTGGGGATGAATTGAGTCTGGTGACTTTGTTTCGAT 840
 213 Q R K K V H V F G D E L S L V T L F R C 232
 CD-VII CD-VIII

841 GTATTCAAAATATGCCTGAAACACTACCCAATAATTCCTGCTATTTCAGCTGGCATTGCAA 900
 233 I Q N M P E T L P N N S C Y S A G I A K 252
 CD-VIII CD-IX

901 AACTGGAAGAAGGAGATGAACTCCAACCTTGAATACCAAGAGAAAATGCACAAATATCAC 960
 253 L E E G D E L O L A I P R E N A Q I S L 272
 CD-X

961 TGGATGGAGATGTCACATTTTTTGGTGCAATTGAAACTGCTGTGACCTACTTACACCATGT 1020
 273 D G D V T F F G A L K L L 285
 CD-XI

1021 CTGTAGCTATTTTCCCTCCTTTCTCTGTACCTCTAAGAAGAAAGAATCTAACTGAAAATA 1080

1081 CCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 1100

FIG.1B

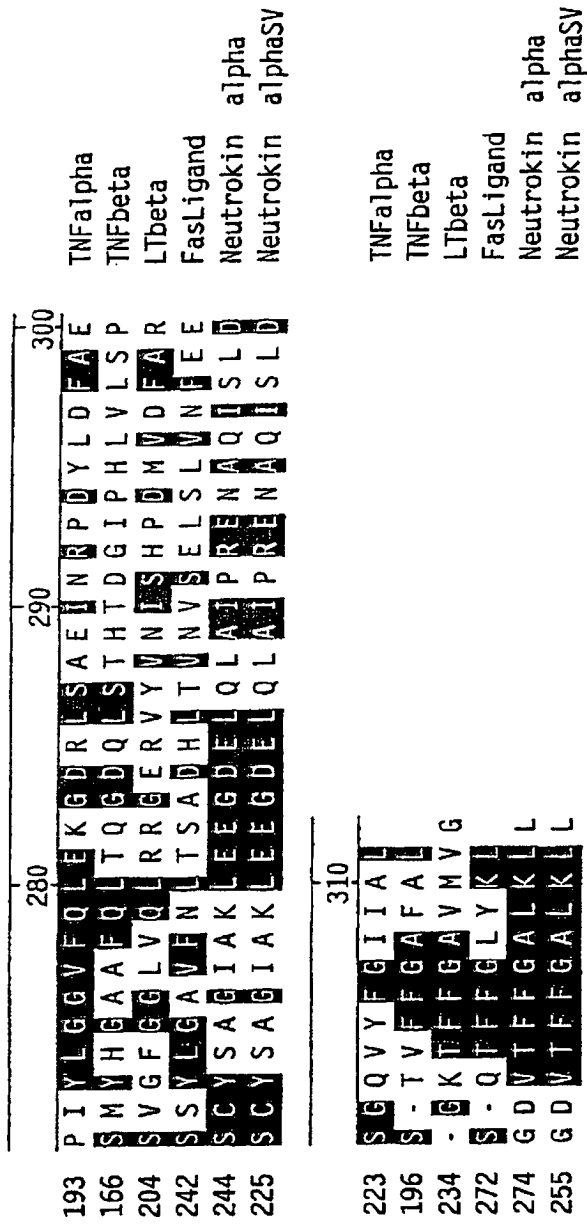


FIG.2D

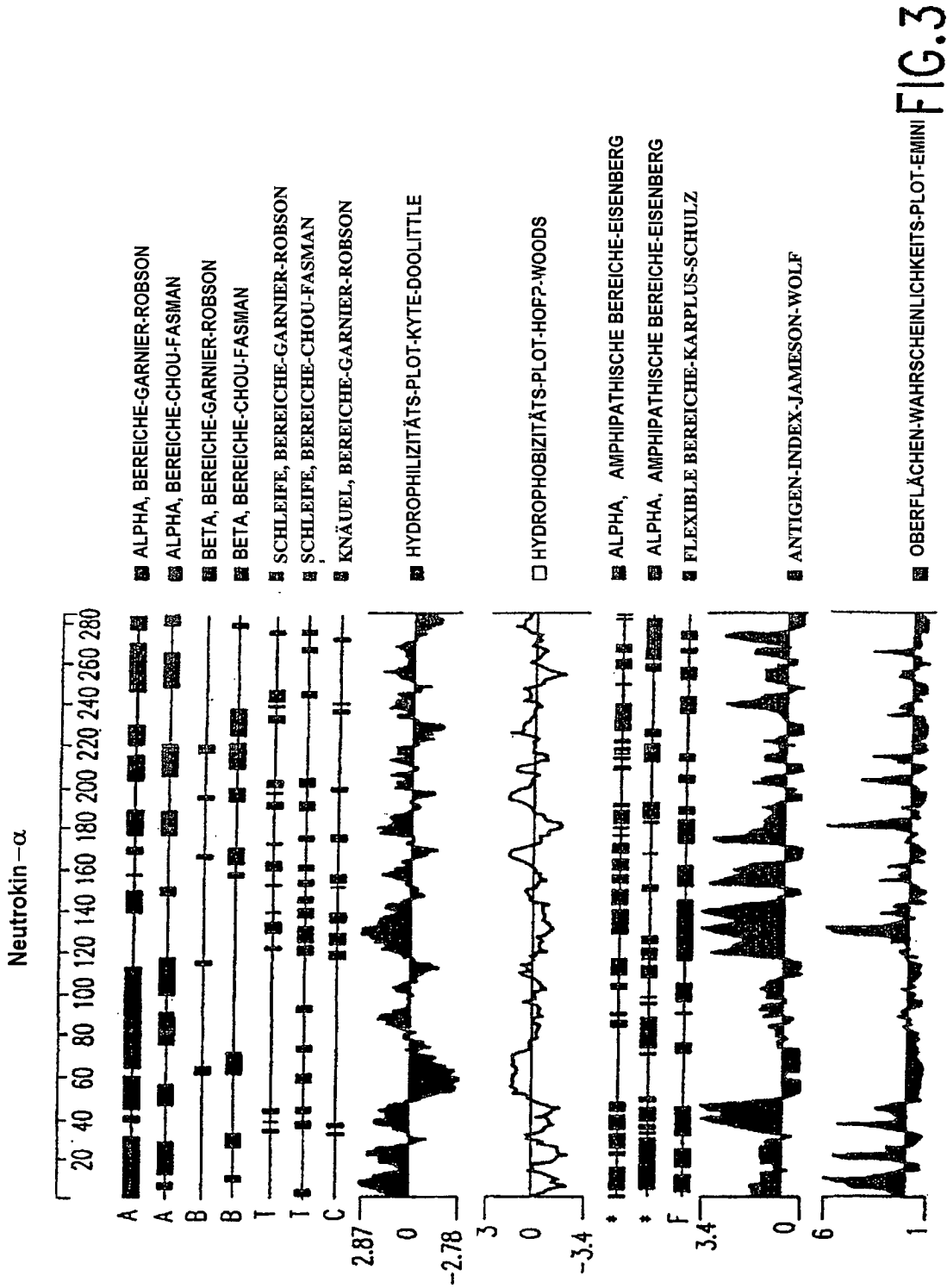


FIG.3

```

1
HSOAD55R .....A GGNTAACTCT CCTGAGGGGT GAGCCAAGCC CTGCCATGTA
HNEDU15X ...AAATTCA GGATAACTCT CCTGAGGGGT GAGCCAAGCC CTGCCATGTA
HSLAH84R .AATTCGGCA NAGNAACTG GTTACTTTTT TATATATGGT CAGGTTTTAT
HLTBM08R AATTCGGCAC GAGCAAGGCC GGCCTGGAGG AAGCTCCAGC TGTCACCGCG

51
HSOAD55R GTGCACGCAG GACATCANCA A..ACACANN NNNCAGGAAA TAATCCATTC
HNEDU15X GTGCACGCAG GACATCAACA A..ACACAGA TAACAGGAAA TGATCCATTC
HSLAH84R ATACTGATAA GACCTACGCC ATGGGACATC TAGTTCAGAG GAAGAAGGTC
HLTBM08R GGACTGAAAA TCTTTGAACC ACCAGCTCCA GGAGAAGGCA ACTCCAGTCA

101
HSOAD55R CCTGTGGTCA CTTATTCTAA AGGCCCCAAC CTTCAAAGTT CAAGTAGTGA
HNEDU15X CCTGTGGTCA CTTATTCTAA AGGCCCCAAC CTTCAAAGTT CAAGTAGTGA
HSLAH84R CATGTCTTTG GGGATGAATT GAGTCTGGTG ACTTTGTTTC GATGTATTCA
HLTBM08R GAACAGCAGA AATAAGCGTG CCGTTCAGGG TCCAGAAGAA ACAGTCACTC

151
HSOAD55R TATGGATGAC TCCACAGAAA GGGAGCAGTC ACGCCTTACT TCTTGCCTTA
HNEDU15X TATGGATGAC TCCACAGAAA GGGAGCAGTC ACGCCTTACT TCTTGCCTTA
HSLAH84R AAATATGCCT GAAACACTAC CCAATAATTC CTGCTATTCA GCTGGCATTG
HLTBM08R AAGACTGCTT GCAACTGNIT GCAGACAGTG AAACACCAAC TATACAAAAA

201
HSOAD55R AGAAAAGAGA AGAAATGAAA CTGNAAGGAG TGTGTTTCCA TCCTCCCACG
HNEDU15X AGAAAAGAGA AGAAATGAAA CT.GAAGGAG TGTGTTTCCA TCCTCCCACG
HSLAH84R CAAAAC TGGN AGGAAGGA...GATGAAC TCCAAC TTGC AATACCAGGG
HLTBM08R GGCTCCCTTC TGNTGCCACA TTTGGGCCAA GGAATGGAGA GATTTCTTCG

251
HSOAD55R GAAGGAAAGC CCCTCTNTCC GATCCTCCAA AGACGGAAAG CTGCTGGCTG
HNEDU15X GAAGGAAAGC CCCTCTGTCC GATCCTCCAA AGACGGAAAG CTGCTGGCTG
HSLAH84R GAAAATGCAC AATTATCACT GGGATGGAGA TGTTACATT TTTTGGGTGC
HLTBM08R TCTGGAAACA TTTTGCCAAA CTCTTCAGAT ACTCTTNTCT CTCTGGGAAT

301
HSOAD55R CAACCTTGNT GNTGGCATTG TGTTCTTGCT GNCTCAAGGT GGTGTTNTT.
HNEDU15X CAACCTTGCT GCTGGCACTG CTGTCTTGCT GCCTCACGGT GGTGCTTTTC
HSLAH84R CATTGAACT GCTGTGACCT NCTTACANCA NGTGCTGTTN GCTATTTTNC
HLTBM08R CAAAGGAAAA TCTCTACTTA GATTNACACA TTTGTTCCCA TGGGTNTCTT

351
HSOAD55R .....
HNEDU15X TACCAGGTGG CCGCCCTGCA AGGGGACCTG GCCAGCCTCC GGGCAGAGCT
HSLAH84R CTNCCTNTTC TNTGGTAACC TCTTAGGAAG GAAGGATTCT TAACTGGGAA
HLTBM08R AAGTTTTAAA AGGGGAGTGC CCTTAGGAGG AAAAGGGGAT AAATATTGGC

```

FIG.4A

	801		850
HSOAD55R
HNEDU15X	GTCCATGTCT	TTGGGGATGA	ATTGAGTCTG GTGACTTTGT TTCGATGTAT
HSLAH84R
HLTBM08R
	851		900
HSOAD55R
HNEDU15X	TCAAAATATG	CCTGAAACAC	TACCCAATAA TTCCTGCTAT TCAGCTGGCA
HSLAH84R
HLTBM08R
	901		950
HSOAD55R
HNEDU15X	TTGCAAAACT	GGAAGAAGGA	GATGAACTCC AACTTGCAAT ACCAAGAGAA
HSLAH84R
HLTBM08R
	951		1000
HSOAD55R
HNEDU15X	AATGCACAAA	TATCACTGGA	TGGAGATGTC ACATTTTTTG GTGCATTGAA
HSLAH84R
HLTBM08R
	1001		1050
HSOAD55R
HNEDU15X	ACTGCTGTGA	CCTACTTACA	CCATGTCTGT AGCTATTTTC CTCCTTTTCT
HSLAH84R
HLTBM08R
	1051		1100
HSOAD55R
HNEDU15X	CTGTACCTCT	AAGAAGAAAG	AATCTAACTG AAAATACCAA AAAAAAAAAA
HSLAH84R
HLTBM08R
	1101		
HSOAD55R		
HNEDU15X	AAAAAA		
HSLAH84R		
HLTBM08R		

FIG.4C