



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 695 35 243 T2** 2007.05.10

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 770 628 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **695 35 243.1**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/JP95/01396**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **95 925 116.6**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1996/002576**

(86) PCT-Anmeldetag: **12.07.1995**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **01.02.1996**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **02.05.1997**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **27.09.2006**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **10.05.2007**

(51) Int Cl.⁸: **A61K 39/395** (2006.01)

C07K 16/24 (2006.01)

C12P 21/08 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

16148194 **13.07.1994** **JP**

28995194 **24.11.1994** **JP**

31078594 **14.12.1994** **JP**

(73) Patentinhaber:

Chugai Seiyaku K.K., Tokio/Tokyo, JP

(74) Vertreter:

HOFFMANN & EITLE, 81925 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

**MATSUSHIMA, Kouji, Kanazawa-shi Ishikawa 921,
JP; MATSUMOTO, Yoshihiro, Gotenba-shi
Shizuoka 412 izuoka 412, JP; YAMADA, Yoshiki,
Gotenba-shi Shizuoka 412 ka 412, JP; SATO,
Koh, Gotenba-shi Shizuoka 412, JP; TSUCHIYA,
Masayuki, Gotenba-shi Shizuoka 412 uoka 412,
JP; YAMAZAKI, Tatsumi, Gotenba-shi Shizuoka
412 oka 412, JP**

(54) Bezeichnung: **GEGEN MENSCHLICHES INTERLEUKIN-8 GERICHTETER, REKONSTITUIERTER MENSCHLICHER ANTIKÖRPER**

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

Technisches Gebiet

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft einen umgeformten menschlichen Antikörper, bei dem die Komplementaritäts-bestimmenden Bereiche der variablen Region der menschlichen leichten Kette (L-Kette) und der variablen Region der menschlichen schweren Kette (H-Kette) durch den CDR eines monoklonalen Antikörpers der Maus gegen menschliches IL-8 substituiert sind. Außerdem stellt die vorliegende Erfindung DNAs bereit, die den oben erwähnten Antikörper und dessen Teile kodieren. Die vorliegende Erfindung betrifft auch einen Vektor, der die oben erwähnte DNA enthält, und genauer gesagt einen Expressionsvektor und einen Wirt, der mit diesem Vektor transformiert ist. Außerdem stellt die vorliegende Erfindung ein Verfahren zum Herstellen eines umgeformten menschlichen Antikörpers gegen IL-8 des Menschen bereit.

Technischer Hintergrund

[0002] Interleukin-8 (IL-8) wurde im Kulturüberstand von Monozyten entdeckt, die mit Lipopolysaccharid (LPS) stimuliert wurden, und ist ein Chemokin, das als von Monozyten stammender neutrophiler chemotaktischer Faktor (MDNCF) oder als Neutrophile aktivierendes Protein-1 (NAP-1) bekannt ist. IL-8 wird von zahlreichen Zellen hergestellt, wirkt auf polymorphkernige Leukozyten und Lymphozyten und hat die Wirkung, dass er entlang seines Konzentrationsgradienten Chemotaxis verursacht. Zusätzlich induziert es nicht nur Chemotaxis bei Neutrophilen, sondern es aktiviert auch die Funktionen einer neutrophilen Zelle wie Degranulierung, die Freisetzung von Superoxid, und die Förderung der Adhäsion an endotheliale Zellen.

[0003] Bei entzündlichen Erkrankungen, genauer gesagt bei respiratorischen Krankheiten wie pulmonärer zystischer Fibrose, idiopathischer pulmonärer Fibrose, adultem respiratorischem Stress-Syndrom, Sarkoidose und Empyem, wie auch bei Hauterkrankungen, wie Psoriasis und in der chronischen rheumatoiden Arthritis, Morbus Crohn und ulcerativer Colitis, wird eine pathologische Leukozyteninfiltrierung an der Entzündungsstelle dieser Erkrankungen beobachtet. Zusätzlich wird IL-8 in Testproben von Patienten mit diesen Erkrankungen nachgewiesen, was vermuten lässt, dass IL-8 eine zentrale Rolle bei der Entzündung spielen könnte. (McElvaney, N. G. et al., J. Clin. Invest., 90, 1296-1301, 1992; Lynch III, U. P. et al., Am. Rev. Respir. Dis., 145, 1433-1439, 1992; Donnelly, S. C. et al., Lancet, 341, 643-647, 1993; Car, B. D. et al., Am. J. Respir. Crit. Care Med., 149, 655-659, 1994; Antony, V. B. et al., J. Immunol., 151, 7216-7223, 1993; Takematsu, H. et al., Arch. Dermatol. 129, 74-80, 1993; Brennan, F. M. et al., Eur. J. Immunol., 20, 2141-2144, 1990; Izzo, R. S. et al., Scand. J. Gastroenterol., 28, 296-300, 1993; Izzo, R. S. et al., Am. J. Gastroenterol., 87, 1447-1452, 1992).

[0004] Nach einer Immunisierung von Mäusen mit menschlichem IL-8 als Antigen haben Ko, Y-C. et al. den monoklonalen Antikörper der Maus WS-4 hergestellt, der an menschliches IL-8 bindet, und die Bindung von menschlichem IL-8 an Neutrophile infolge der Bindung inhibiert, d. h. dass die biologische Aktivität, die menschliches IL-8 besitzt, neutralisiert wird. Es ist klar gezeigt worden, dass die Isotypen des Maus-monoklonalen Antikörpers WS-4 aus einer L-Kette vom κ -Typ und einer H-Kette vom $\text{C}\gamma 1$ -Typ bestehen (J. Immunol. Methods, 149; 227-235, 1992).

[0005] Bekannte Beispiele für Antikörper gegen menschliches IL-8 neben WS-4 schließen A.5.12.14 (Boylan, A. M. et al., J. Clin. invest., 89, 1257-1267, 1992), den Anti-Pep-1 Antikörper und den Anti-Pep-3-Antikörper, die in der Internationalen Patentanmeldung Nr. WO 92-04372 offenbart sind, und DM/C7 (Mulligan, M. S. et al., J. Immunol., 150, 5585-5595, 1993) ein.

[0006] Es wurde bei der Verabreichung des monoklonalen Antikörpers WS 4 der Maus in experimentellen Modellen unter Verwendung von Kaninchen ebenfalls gefunden, dass die Infiltration von Neutrophilen bei pulmonärer Ischämie und Reperusionsverletzung (Sekido, N. et al., Nature, 365, 654-657, 1993), bei der LPS-induzierten Dermatitis (Harada, A. et al., Internatl. Immunol., 5, 681-690, 1993) und bei der LPS- oder Interleukin-1 (IL-)induzierten Arthritis (Akahoshi, T. et al., Lymphokine Cytokine Res., 13, 113-116, 1994) inhibiert ist.

[0007] Es gibt ein Homologon des menschlichen IL-8 in Kaninchen, und dies wird als Kaninchen-IL-8 bezeichnet. Da klar gezeigt worden ist, dass der monoklonale Antikörper WS-4 der Maus mit Kaninchen-IL-8 kreuzreagiert, und dass der Antikörper die Bindung von Kaninchen-IL-8 an Kaninchen-Neutrophile inhibiert (Harada, A. et al., Internatl. Immunol., 5, 681-690, 1993) lassen diese Befunde vermuten, dass ein Antikörper gegen humanes IL-8 als therapeutisches Mittel zur Behandlung entzündlicher Erkrankungen beim Menschen nützlich sein würde.

[0008] Monoklonale Antikörper, die aus Säugern stammen, die keine Menschen sind, weisen einen starken Grad der Immunogenität (auch als Antigenizität bezeichnet) in Menschen auf. Aus diesem Grund, selbst wenn ein Maus-Antikörper an Menschen verabreicht wird, ist die Halbwertszeit des Maus-Antikörpers beim Menschen relativ kurz, da er als Fremdstanz metabolisiert wird, wodurch verhindert wird, dass die gewünschten Wirkungen entsprechend zutage treten. Außerdem verursacht ein menschlicher Anti-Maus-Antikörper, der als Reaktion auf den verabreichten Maus-Antikörper hergestellt wird, eine Immunreaktion, die sowohl unvorteilhaft als auch gefährlich für den Patienten ist, wobei Beispiele hierfür eine Impfstoffkrankung oder andere allergische Reaktionen einschließen. Aus diesem Grund kann ein Maus-Antikörper häufig an Menschen nicht verabreicht werden.

[0009] Um diese Probleme zu lösen, wurde ein Verfahren zum Herstellen eines humanisierten Antikörpers entwickelt. Ein Maus-Antikörper kann durch zwei Verfahren humanisiert werden. Das einfachere Verfahren schließt das Herstellen eines chimären Antikörpers ein, bei dem die variable Region (V-Region) vom ursprünglichen Maus-monoklonalen Antikörper stammt, und der konstante Bereich (C-Region) von einem geeigneten menschlichen Antikörper stammt. Da der daraus hervorgehende chimäre Antikörper die variable Region des Maus-Antikörpers in vollständiger Form enthält, hat er eine identische Spezifität wie der ursprüngliche Maus-Antikörper, und es kann erwartet werden, dass er an das Antigen bindet.

[0010] Da außerdem der Anteil an Proteinsequenzen in dem chimären Antikörper, die von einem nicht-menschlichen Tier stammen, wesentlich reduziert ist, wenn sie mit dem ursprünglichen Maus-Antikörper verglichen werden, wird vorhergesagt, dass dieser eine geringere Immunogenizität verglichen mit dem ursprünglichen Maus-Antikörper besitzt. Obwohl der chimäre Antikörper an ein Antigen gut bindet, und eine niedrige Immunogenizität besitzt, gibt es noch immer die Möglichkeit des Auftretens einer Immunreaktion gegen die variable Region der Maus (LoBuglio, A. F. et al., Proc. natl. Acad. Sci. USA, 86, 4220-4224, 1989).

[0011] Obwohl das zweite Verfahren zum Humanisieren eines Maus-Antikörpers komplexer ist, wird die latente Immunogenizität des Maus-Antikörpers beträchtlich reduziert. Bei diesem Verfahren wird eine der Komplementaritäts-bestimmenden Bereiche (CDR) von der variablen Region eines Maus-Antikörpers auf die menschliche variable Region verpflanzt, um eine umgeformte menschliche variable Region zu erzeugen. Um die Struktur des CDR der umgeformten menschlichen variablen Region näher an die Struktur des ursprünglichen Maus-Antikörpers anzunähern, gibt es Fälle, bei denen es notwendig sein kann, einen Teil der Proteinsequenz des Rahmenbereichs (FR), der den CDR der variablen Region des Maus-Antikörpers trägt, auf die menschliche variable Region zu verpflanzen.

[0012] Danach werden diese umgeformten menschlichen variablen Regionen mit der menschlichen konstanten Region verbunden. Die Teile, die von den nicht-menschlichen Proteinsequenzen abstammen, bestehen beim humanisierten Antikörper nur aus dem CDR und einem sehr geringen Anteil des FR. Der CDR setzt sich aus hypervariablen Proteinsequenzen zusammen, und diese weisen keine Spezifität auf. Aus diesem Grund sollte der umgeformte menschliche Antikörper, der Maus-CDRs enthält, keine Immunogenizität haben, die stärker ist als die eines natürlichen menschlichen Antikörpers, der menschliche CDRs enthält.

[0013] Zusätzliche Details im Hinblick auf umgeformte menschliche Antikörper können unter Bezugnahme auf Riechmann, L. et al., Nature, 332, 323-327, 1988; Junghans, R. P. et al., Cancer Research, 50, 1495-1502, 1990; L. Verhoeyen, M. et al., Science, 239, 1534-1536, 1988; Kettleborough, C. A. et al., Protein Eng., 4, 773-783, 1991; Maeda, H. et al., Hum. Antibodies Hybridomas, 2, 124-134, 1991; Gorman, S. D. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 4181-4185, 1991; Carter, P. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 4285-4289, 1992; Co, M. S. et al., J. Immunol., 148, 1149-1154, 1992; und Sato, K. et al., Cancer Res., 53, 851-856, 1993, gefunden werden.

Offenbarung der Erfindung

[0014] Wie oben angegeben, obwohl umgeformte menschliche Antikörper vermutlich zum Zwecke der Therapie nützlich sind, sind zahlreiche Maßnahmen notwendig, um einen umgeformten menschlichen Antikörper herzustellen, der eine ausreichende Bindungsaktivität und/oder eine neutralisierende Aktivität bezüglich eines spezifischen Antigens (z. B. Sato, K. et al., Cancer Res., 53, 851-856, 1993) aufweist. Die vorliegende Erfindung stellt einen Antikörper gegen menschliches IL-8 mit einem niedrigen Grad an Immunogenizität bereit.

[0015] Die vorliegende Erfindung stellt einen umgeformten menschlichen Antikörper gegen menschliches IL-8 bereit.

[0016] Noch genauer wird die vorliegende Erfindung in den angehängten Ansprüchen definiert.

Kurze Beschreibung der Zeichnung

[0017] **Fig. 1** zeigt die Expressionsvektoren HEF-VL-gk und HEF-VH-gy1 an, die den menschlichen Verlängerungsfaktor 1 α (HEF-1 α) Promotor/Enhancer enthalten, welcher für die Expression der L-Kette bzw. H-Kette des IL-8-Antikörpers nützlich ist.

[0018] **Fig. 2** ist ein Graph, der die Ergebnisse eines ELISAs zur Bestätigung der Bindungsfähigkeit des chimären WS-4-Antikörpers (chL/chH) an menschliches IL-8 wiedergibt, wobei dieser in das Kulturmedium von COS-Zellen sezerniert wurde.

[0019] **Fig. 3** ist ein Diagramm der Herstellung von DNA, die für die Aminosäuresequenzen jeweils der ersten Version „a“ (RVHa) der V-Region der H-Kette des umgeformten menschlichen WS-4-Antikörpers, und der ersten Version „a“ (RVLa) der V-Region der L-Kette des umgeformten menschlichen WS-4-Antikörpers (B) kodiert.

[0020] **Fig. 4** ist ein Graph, der die Ergebnisse eines ELISAs wiedergibt, bei dem die Bindungsfähigkeit von menschlichem IL-8 durch die V-Region der L-Kette (RVLa) und die V-Region der H-Kette (RVHa) des umgeformten menschlichen WS-4-Antikörpers in Kombination mit der jeweiligen V-Region der H-Kette des chimären WS-4-Antikörpers (chH) und der V-Region der L-Kette des chimären WS-4-Antikörpers (chL), die in COS-Zellen exprimiert wurden, mit der des chimären WS-4-Antikörpers (chl/chH), der in das Kulturmedium von COS-Zellen sezerniert wird, verglichen wird.

[0021] **Fig. 5** ist ein Graph, der die Ergebnisse eines ELISAs wiedergibt, bei dem die Bindungsfähigkeit gegenüber menschlichen IL-8 bei 8 Arten von umgeformtem menschlichen WS-4-Antikörpern verglichen werden, die RVLa (RVLa/RVHa, RVLa/RVHb, RVLa/RVHc, RVLa/RVHd, RVLa/RVHe, RVLa/RVHf, RVLa/RVHg und RVLa/RVHb) enthalten, welche in das Kulturmedium von COS-Zellen sezerniert werden, mit der des chimären WS-4-Antikörpers (chL/chH), welcher in das Kulturmedium von COS-Zellen sezerniert wird.

[0022] RVLa/RVHg ist ein erfindungsgemäßer Antikörper.

[0023] **Fig. 6** ist ein Graph, der die Ergebnisse aus einem ELISA zum Vergleichen der Bindungsfähigkeit an menschliches IL-8 durch 8 Arten umgeformter menschlicher WS-4-Antikörper wiedergibt, die RVLb enthalten (RVLb/RVHa, RVLb/RVHb, RVLb/RVHc, RVLb/RVHd, RVLb/RVHe, RVLb/RVHf, RVLb/RVHg und RVLb/RVHh), hergestellt im Kulturüberstand von COS-Zellen, gegenüber der des chimären WS-4-Antikörpers (chL/chH), der in das Kulturmedium von COS-Zellen sezerniert wird.

[0024] RVLb/RVHg ist ein erfindungsgemäßer Antikörper.

[0025] **Fig. 7** ist ein Graph, der die Ergebnisse eines ELISAs zum Vergleichen der Bindungsfähigkeiten der gereinigten umgeformten menschlichen WS-4-Antikörper RVLa/RVHg und RVLb/RVHg der vorliegenden Erfindung sowie des gereinigten chimären WS-4-Antikörpers (chL/chH) an menschliches IL-8 wiedergibt.

[0026] **Fig. 8** ist ein Graph, der die Ergebnisse eines Liganden-Rezeptor-Bindungs-Inhibitionsassays zum Vergleich der Fähigkeiten wiedergibt, der gereinigten umgeformten menschlichen Antikörper RVLa/RVHg und RVLb/RVHg der vorliegenden Erfindung mit dem Maus-WS-4-Antikörper und dem chimären WS-4-Antikörper (chL/chH) die Bindung von menschlichem IL-8 an den IL-8-Rezeptor zu inhibieren.

[0027] Klonierung der DNA, die für die V-Region der Maus kodiert Um ein Gen zu klonieren, das die V-Region des monoklonalen Antikörpers gegen menschliches IL-8 der Maus kodiert, ist es notwendig, ein Hybridom herzustellen, das einen monoklonalen Antikörper der Maus gegen menschliches IL-8 herstellt, um ein solches Gen zu gewinnen. Nach der Extraktion von mRNA aus dem Hybridom wird die mRNA nach bekannten Verfahren in Einzelstränge der cDNA umgewandelt, gefolgt von der Amplifizierung der Ziel-DNA unter Verwendung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR), um das Gen zu gewinnen. Ein Beispiel einer Quelle für dieses Gen ist das Hybridom WS-4, welches den monoklonalen Antikörper der Maus gegen menschliches IL-8 herstellt, hergestellt von Ko, Y. C. et al. Das Verfahren zum Herstellen dieses Hybridomas wird beschrieben in J. Immunol. Methods, 149, 227-235, 1992, und wird später als Referenzbeispiel 1 beschrieben.

(1) Extraktion von Gesamt-RNA

[0028] Um die Ziel-DNA zu klonieren, die für die V-Region des monoklonalen Antikörpers der Maus gegen menschliches IL-8 kodiert, kann Gesamt-RNA durch Zerstören der Hybridom-Zellen mittels Guanidinthiocyanat-Behandlung gewonnen werden, und indem eine Cäsiumchlorid-Dichte-Gradientenzentrifugation (Chirgwin, J. M. et al., *Biochemistry*, 18, 5294-5299, 1979) durchgeführt wird. Außerdem können andere Verfahren, die während der Klonierung von Genen verwendet werden, wie die, bei denen eine Detergenzbehandlung und eine Phenolbehandlung in Gegenwart eines Ribonuclease (RNase)-Inhibitors durchgeführt werden, beispielsweise eines Vanadiumkomplexes (Berger, S. L. et al., *Biochemistry*, 18, 5143-5149, 1979), ebenfalls verwendet werden.

(2) cDNA-Synthese

[0029] Als nächstes kann einzelsträngige cDNA, die komplementär zur mRNA ist, durch Behandlung der Gesamt-RNA mit Reverser Transkriptase unter Verwendung von oligo(dT), einem Oligonucleotid-Komplement zum poly(A)-Schwanz, der am 3'-Ende der mRNA gefunden wird, als Primer verwendet werden, und mit Hilfe der mRNA, die in der Gesamt-RNA enthalten ist, welche auf die obige Weise gewonnen wurde, als Matrize (Larrick, J. W. et al., *Bio/Technology*, 7, 934-938, 1989) gewonnen werden. Zusätzlich kann zum gleichen Zeitpunkt ebenfalls ein Zufallsprimer verwendet werden. Außerdem, im Fall, dass es gewünscht wird, mRNA zuerst zu isolieren, kann dies durch Auftragen der Gesamt-RNA auf eine Säule aus oligo(dT)-Zellulose durchgeführt werden, die der poly(A)-Schwanz der mRNA bindet.

(3) Amplifizierung von DNA, die für die V-Region kodiert, mittels Polymerase-Kettenreaktion

[0030] Als nächstes wird cDNA, die für die oben erwähnte V-Region kodiert, spezifisch unter Verwendung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert. Um die V-Region der L-Kette vom kappa (κ) Typ des monoklonalen Antikörpers der Maus zu amplifizieren, müssen die 11 Arten an Oligonucleotidprimern, die in den SEQ-ID Nr. 1-11 gezeigt sind (Maus-Kappa-Variable; MKV) und der Oligonucleotidprimer, der in SEQ-ID Nr. 12 gezeigt ist (Maus-Kappa-Konstant; MKC) als 5'-terminaler Primer bzw. 3'-terminaler Primer verwendet werden. Die oben erwähnten MKV-Primer hybridisieren an die DNA-Sequenz, die für die Leader-Sequenz der L-Kette vom Kappa-Typ der Maus kodiert, während der oben erwähnte MKC-Primer an die DNA-Sequenz hybridisiert, die für die C-Region der L-Kette vom Kappa-Typ der Maus kodiert.

[0031] Um die H-Ketten-V-Region des monoklonalen Antikörpers der Maus zu amplifizieren, werden die 12 Arten von Oligonucleotidprimern, die in den SEQ-ID Nr. 13-24 gezeigt sind (Maus Heavy Variable; MHV) und der Oligonucleotidprimer, der in SEQ-ID Nr. 25 gezeigt ist (Maus Heavy Konstant; MHC) als 5'-terminaler Primer bzw. 3'-terminaler Primer verwendet. Die oben erwähnten MHV-Primer hybridisieren an die DNA-Sequenz, die für die Leader-Sequenz der H-Kette der Maus kodiert, während der oben erwähnte MHC-Primer an die DNA-Sequenz hybridisiert, die für die C-Region der H-Kette der Maus kodiert.

[0032] Des Weiteren enthalten alle 5'-terminalen Primer (MKV und MHV) die Sequenz GTCGAC, die eine Sall-Restriktionsenzym-Schnittstelle nahe dem 3'-Terminus bereitstellt, während sowohl die 3'-terminalen Primer (MKC und MHC) die Nucleotidsequenz CCCGGG enthalten, die eine XmaI-Restriktionsenzymspaltstelle nahe dem 5'-Terminus bereitstellt. Diese Restriktionsenzym-Spaltstellen werden zur Subklonierung der Ziel-DNA-Fragmente verwendet, die für beide V-Regionen der entsprechenden Klonierungsvektoren kodieren. In dem Fall, dass diese Restriktionsenzymspaltstellen ebenfalls in der Ziel-DNA-Sequenz vorhanden sein sollten, die für beide V-Regionen kodiert, sollten andere Restriktionsenzymspaltstellen zur Subklonierung in die entsprechenden Klonierungsvektoren verwendet werden.

(4) Isolierung von DNA, die die V-Region kodiert

[0033] Als nächstes werden die PCR-Amplifikationsprodukte aufgetrennt und in einem niedrig schmelzenden Agarosegel oder durch eine Säule aufgereinigt (PCR Product Purification kit (QIAGEN PCR Purification Spin Kit: QUIAGEN); DNA purification kit (GENECLEAN II, BIO101), um ein DNA-Fragment zu gewinnen, das für die Ziel-V-Region des monoklonalen Antikörpers der Maus kodiert. Ein DNA-Fragment wird gewonnen, das für die Ziel-V-Region des monoklonalen Antikörpers kodiert, indem das gereinigte Amplifikationsprodukt mit den Restriktionsenzymen Sall und XmaI einer Enzymbehandlung unterworfen wird.

[0034] Des Weiteren wird durch Spalten eines geeigneten Klonierungsvektors wie des Plasmids pUC19 mit den gleichen Restriktionsenzymen Sall und XmaI und durch enzymatisches Verbinden des oben erwähnten

DNA-Fragments an pUC19 ein Plasmid gewonnen, das ein DNA-Fragment enthält, das für die Ziel-V-Region des Maus-monoklonalen Antikörpers kodiert. Die Bestimmung der Sequenz dieser klonierten DNA kann gemäß irgendeiner Routinemethode durchgeführt werden, ein Beispiel hierfür ist die Verwendung eines automatisierten DNA-Sequenziergeräts (Applied Biosystems). Die Klonierung und die Sequenzbestimmung der Ziel-DNA werden im Detail in den Beispielen 1 und 2 beschrieben.

Herstellung eines chimären Antikörpers

[0035] Vor dem Entwerfen einer umgeformten menschlichen V-Region eines Antikörpers gegen menschliches IL-8 ist es notwendig zu bestätigen, ob die verwendeten CDRs tatsächlich eine Antigen-Bindungsregion bilden. Für diesen Zweck wurde ein chimärer Antikörper hergestellt. Um einen chimären Antikörper herzustellen, ist es notwendig, DNA zu konstruieren, die für die L-Kette und die H-Kette des chimären Antikörpers kodiert. Das grundlegende Verfahren zum Herstellen von beiden DNAs schließt die Verbindung der entsprechenden DNA-Sequenzen der Maus-Leader-Sequenz, die in der PCR-klonierten DNA beobachtet wurde, und der Maus-V-Region-Sequenz mit einer DNA-Sequenz ein, die für die menschliche C-Region kodiert, welche bereits in einem Expressionsvektor für Säugerzellen vorhanden ist.

[0036] Die oben erwähnten C-Regionen des menschlichen Antikörpers können irgendwelche C-Regionen der menschlichen L-Ketten und irgendwelche C-Regionen der menschlichen H-Kette sein, und bezüglich der L-Kette schließen Beispiele die menschliche L-Ketten C κ oder C λ ein, während bezüglich der H-Kette, wenn es IgG ist, Beispiele C γ 1, C γ 2, C γ 3 oder C γ 4 (Ellison, J. et al., DNA, 1, 11-18 (1981), Takahashi, N. et al., Cell, 29, 671-679 (1982), Krawinkel, U. et al., EMBO J., 1, 403-407 (1982), oder andere Isotypen einschließen.

[0037] Zwei Arten von Expressionsvektoren werden zur Produktion des chimären Antikörpers hergestellt, nämlich ein Expressionsvektor, der DNA enthält, die für die V-Region der L-Kette der Maus, und für die C-Region der L-Kette des Menschen unter Kontrolle einer Enhancer-/Promotor-Expressionskontrollregion kodiert, und ein Expressionsvektor, der DNA enthält, die für die V-Region der H-Kette der Maus und die C-Region der H-Kette des Menschen unter Kontrolle einer Enhancer-/Promotor-artigen Expressionskontrollregion kodiert. Als nächstes werden Zellen, wie Säugerzellen, gleichzeitig mit diesen beiden Expressionsvektoren transformiert, und die transformierten Zellen werden entweder *in vitro* oder *in vivo* kultiviert, um ein chimäres Antigen herzustellen (z. B. WO 91/16928).

[0038] Alternativ kann DNA, die die V-Region der L-Kette der Maus und die C-Region der L-Kette des Menschen kodiert, und DNA, die die V-Region der H-Kette der Maus und die C-Region der H-Kette des Menschen kodiert, in einen einzigen Expressionsvektor eingeschleust werden, und Wirtszellen werden unter Verwendung dieses Vektors transformiert, und dann entweder *in vitro* oder *in vivo* kultiviert, um den chimären Antikörper herzustellen. Die Herstellung eines chimären Antikörpers vom monoklonalen Antikörper WS-4 ist in der Ausführungsform 4 beschrieben.

[0039] Eine cDNA, die für die Leader-Sequenz der L-Kette vom κ -Typ von Maus-WS-4, und für die V-Region kodiert wird unter Verwendung von PCR kloniert, und mit einem Expressionsvektor verbunden, der genomische DNA des Menschen enthält, die für die C κ -Region der L-Kette des Menschen kodiert. Gleichermaßen wird cDNA, die für die Leader-Sequenz und V-Region der H-Kette des WS-4-Antikörpers der Maus kodiert, unter Verwendung von PCR kloniert und mit einem Expressionsvektor verbunden, der genomische DNA des Menschen enthält, die für die menschliche C γ 1-Region kodiert.

[0040] Genauer gesagt werden geeignete Nucleotidsequenzen an den 5'- und 3'-Enden der cDNAs eingeschleust, die für die V-Region des WS-4-Antikörpers der Maus kodieren, in dem spezifisch entworfene PCR-Primer verwendet werden, so dass sie (1) einfach in den Expressionsvektor inseriert werden können, und sie (2) in diesem Expressionsvektor angemessen funktionieren (z. B. wird die Transkriptionseffizienz durch Einschleusen einer Kozak-Sequenz verbessert).

[0041] Als nächstes wird DNA, die für die V-Region des WS-4-Antikörpers der Maus kodiert, durch Amplifizierung mittels PCR unter Verwendung dieser Primer gewonnen und in den HEF-Expressionsvektor eingeschleust (siehe [Fig. 1](#)), welcher bereits die gewünschte menschliche C-Region enthält. Diese Vektoren sind für die transiente oder stabile Expression eines genetisch hergestellten Antikörpers in zahlreichen Säugerzellsystemen geeignet.

[0042] Wenn die Antigen-Bindungsaktivität des chimären WS-4-Antikörpers, der auf diese Weise hergestellt wurde, untersucht wurde, zeigte sich, dass der chimäre WS-4-Antikörper eine Bindungsaktivität gegenüber

menschlichen IL-8 aufweist (siehe [Fig. 2](#)). Daher wurde die Schlussfolgerung gezogen, dass die korrekte Maus-V-Region kloniert worden ist, und dass die korrekte Sequenz bestimmt worden ist.

[0043] Entwurf eines umgeformten menschlichen WS-4-Antikörpers Um einen umgeformten menschlichen Antikörper herzustellen, in dem die CDRs eines Maus-monoklonalen Antikörpers auf einen menschlichen Antikörper verpflanzt sind, ist es wünschenswert, dass es einen hohen Homologiegrad zwischen den Aminosäuresequenzen der FRs des Maus-monoklonalen Antikörpers mit den zu verpflanzenden CDRs und den Aminosäuresequenzen der FRs des menschlichen monoklonalen Antikörpers, in den die CDRs zu verpflanzen sind, gibt.

[0044] Aus diesem Grund können die menschlichen V-Regionen, die als Grundlage zum Entwurf der V-Regionen des umgeformten menschlichen WS-4-Antikörpers dienen, durch Vergleichen der Aminosäuresequenzen der FRs des monoklonalen Antikörpers der Maus mit der Aminosäuresequenz des FRs menschlicher Antikörper gewählt werden. Genauer gesagt wurden die V-Regionen der L- und H-Ketten des WS-4-Antikörpers der Maus mit allen bekannten menschlichen V-Regionen verglichen, die in der Datenbank der National Biomedical Research Foundation (NBRF) gefunden werden, indem eine Genanalyse-Software, GENETEX (Software Development Co., Ltd.), verwendet wird.

[0045] Im Vergleich mit bekannten V-Regionen menschlicher L-Ketten wurde herausgefunden, dass die V-Regionen der L-Kette des Maus-WS-4-Antikörpers dem menschlichen Antikörper HAU (Watnabe, S. et al., Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 351, 1291-1295, 1970) mit einer Homologie von 69,2 % am meisten ähneln. Andererseits wurde herausgefunden, dass beim Vergleich mit bekannten menschlichen V-Regionen der H-Kette die V-Region der H-Kette des WS-4-Antikörpers mit einer Homologie von 71,4 % am meisten der des menschlichen Antikörpers VDH26 (Buluwela, L. et al., EMBO J., 7, 2003-2010, 1988) ähnelt.

[0046] Im Allgemeinen ist die Homologie der Aminosäuresequenzen der V-Region der Maus zu den Aminosäuresequenzen der V-Regionen des Menschen weniger als die Homologie zu Aminosäuresequenzen der V-Regionen der Maus. Dies deutet an, dass die V-Region des Maus-WS-4-Antikörpers nicht vollständig der V-Region des Menschen ähnelt, und gleichzeitig zeigt es, dass die Humanisierung der WS-4 V-Region der Maus der beste Weg ist, um das Problem der Immunogenizität bei menschlichen Patienten zu lösen. Die V-Region des Maus-WS-4-Antikörpers wurde weiter mit der Konsensus-Sequenz der Untergruppe der V-Region des Menschen, die von Kabat, E. A. et al. (1991), Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5. Ausgabe, U.S. Department of Health and Human Services, U.S. Government Printing Office, definiert worden ist, um zwischen V-Regionen FRs zu vergleichen. Diese Ergebnisse sind in Tabelle 1 gezeigt.

Tabelle 1: Homologie (%) zwischen der FR der V-Region des Maus-WS-4 und dem FR der Konsensus-Sequenz der V-Region des Menschen verschiedener Untergruppen

A. FR in der V-Region der L-Kette			
HSGI	HSGII	HSGIII	HSGIV
64,4	51,3	57,3	57,5
B. FR in der V-Region der H-Kette			
HSGI	HSGII	HSGIII	
46,9	40,9	62,3	

[0047] Die FRs der V-Region der L-Kette des Maus-WS-4-Antikörpers ähnelten am stärksten der Konsensus-Sequenz des FRs der V-Region L-Ketten der Untergruppe I (HSGI) des Menschen, mit einer Homologie von 64,4 %. Andererseits ähnelten die FRs der V-Region der H-Kette des Maus-WS-4-Antikörpers am stärksten der Konsensus-Sequenz der Subgruppe III der V-Region der menschlichen H-Kette (HSGIII), mit einer Homologie von 62,3 %.

[0048] Diese Ergebnisse stützen Ergebnisse, die durch einen Vergleich mit bekannten menschlichen Antikörpern gewonnen wurden, der V-Region der L-Kette des menschlichen Antikörpers HAU, der zur Untergruppe I der V-Region der menschlichen L-Kette gehört, und der V-Region der H-Kette des menschlichen Antikörpers VDH26, welcher zur Untergruppe III der V-Region der menschlichen H-Kette gehört. Um die V-Region der L-Kette des umgeformten menschlichen WS-4-Antikörpers zu entwerfen, ist es vermutlich am besten, die V-Region der menschlichen L-Kette zu verwenden, die zur Untergruppe I gehört (HSGI), während es, wenn

man die V-Region der H-Kette des umgeformten menschlichen WS-4-Antikörpers entwirft, wahrscheinlich am besten ist, die V-Region der H-Kette zu verwenden, die zur Subgruppe III (HSGIII) des menschlichen Antikörpers gehört.

[0049] Bei einem Vergleich mit der V-Region der L-Kette bekannter menschlicher Antikörper ähnelte die V-Region der L-Kette des Maus-Antikörpers WS-4 am meisten der V-Region der L-Kette des menschlichen Antikörpers REI, einem Mitglieds der Subgruppe I der V-Region der menschlichen L-Kette. Daher wurde die FR von REI beim Entwurf der V-Region der L-Kette des umgeformten menschlichen WS-4-Antikörpers verwendet. Bei den menschlichen FR, die auf REI basieren, gibt es Unterschiede bei fünf Aminosäuren (an den Positionen 39, 71, 104, 105 und 107; siehe Tabelle 2) im Vergleich mit dem menschlichen REI, der in der ursprünglichen Literatur beschrieben wurde (Palm, W. et al., Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 356, 167-191, 1975; und Epp, O. et al., Biochemistry, 14, 4943-4952, 1975).

[0050] Die Aminosäure-Bezeichnungen, die in der Tabelle gezeigt werden, basieren auf der Erfahrung von Kabat, E. A. et al., (1991). Die Änderungen der zwei Aminosäuren an den Positionen 39 und 71 waren die gleichen Änderungen, die durch Aminosäuren verursacht wurden, die in FR der V-Region der L-Kette beim Ratten-CAMPATH-1H-Antikörper vorhanden waren (Riechmann et al., 1988). Nach Kabat et al. (1991) beruhen die Änderungen der drei anderen Aminosäuren in FR4 (Positionen 104, 105 und 107) auf der J-Region anderer menschlicher κ L-Ketten des Menschen, und weichen nicht vom Menschen ab.

[0051] Zwei Versionen der V-Region der L-Kette des umgeformten menschlichen WS-4-Antikörpers wurden entworfen. In der ersten Version RVL_a war FR identisch mit dem FR, der auf REI beruht, welcher beim umgeformten menschlichen CAMPATH-1H-Antikörper vorhanden ist (Riechmann, et al., 1988), während der CDR identisch war mit dem CDR in der V-Region der L-Kette des Maus-WS-4-Antikörpers. Die zweite Version RVL_b beruhte auf RVL_a und unterschied sich nur durch eine Aminosäure an der Position 71 im menschlichen FR3. Wie von Chothia, C. et al., J. Mol. Biol., 196, 901-917, 1987, definiert worden ist, ist der Aminosäure-Rest 71 ein Teil der kanonischen Struktur von CDR1 der V-Region der L-Kette.

[0052] Von einer Aminosäure an dieser Position wird vorhergesagt, dass sie direkt die Struktur der CDR1-Schleife der V-Region der L-Kette beeinflusst, und aus diesem Grund wird vermutet, dass sie eine signifikante Wirkung auf die Antigenbindung ausübt. In RVL_b der V-Region der L-Kette des umgeformten menschlichen WS-4-Antikörpers ist Phenylalanin an der Position 71 in Tyrosin geändert. Tabelle 2 zeigt die entsprechenden Aminosäuresequenzen der V-Region der L-Kette des WS-4-Antikörpers der Maus, den FR des modifizierten REI zur Verwendung im umgeformten menschlichen CAMPATH-1H-Antikörper (Riechmann, et al., 1988), und die zwei Versionen der V-Region der L-Kette des umgeformten menschlichen WS-4-Antikörpers.

Tabelle 2: Entwurf der L-Ketten V-Region des umgeformten menschlichen WS-4

	1	2	3	4
	12345678901234567890123		45678901234	567890123456789
WS-4L	DIQMTQSPASLSASVGETVTITC		RASEIIYSYLA	WYQQKQKGKSPQLLVY
REI	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC			WYQQKPGKAPKLLIY
RVL _a	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC		RASEIIYSYLA	WYQQKPGKAPKLLIY
RVL _b	-----		-----	-----
		FR1	CDR1	FR2
	5	6	7	8
	0123456	78901234567890123456789012345678		901234567
WS-4L	NAKTLAD	GVSSRFSGSGSGTQFSLRISLQPEDFGSYYC		QHHFGFPRT
REI		GVPSRFSGSGSGTDFTFITISLQPEDIATYYC		
RVL _a	NAKTLAD	GVPSRFSGSGSGTDFTFITISLQPEDIATYYC		QHHFGFPRT
RVL _b	-----	-----Y-----		-----
	CDR2		FR3	CDR3
	10			
	8901234567			
WS-4L	FGGGTKLELK			
REI	FGQGTKVEIK			
RVL _a	FGQGTKVEIK			
RVL _b	-----			
	FR4			

Anmerkung: FR von REI wird beim umgeformten menschlichen CAM-PATH-1H-Antikörper (Riechmann, et al., 1988) gefunden. Die fünf unterstrichenen Aminosäuren im FR von REI sind Aminosäuren, die sich von der Aminosäuresequenz des menschlichen REI unterscheiden. Die Aminosäuren werden unter Verwendung des Einzelbuchstabencodes angegeben. Die Aminosäurenummern stimmen mit der Definition von Kabat et al. überein.

[0053] Der FR in der V-Region der H-Kette des Maus-WS-4-Antikörpers ähnelt der V-Region der menschlichen H-Kette, die zur Untergruppe III gehört (Tabelle 1), am meisten.

[0054] Bei einem Vergleich mit bekannten V-Regionen menschlicher H-Ketten ähnelte die V-Region der H-Kette des Maus-WS-4-Antikörpers am meisten der V-Region der H-Kette des menschlichen Antikörpers VDH26, einem Mitglied der Untergruppe III der V-Region der menschlichen H-Kette von FR1 bis FR3 (Buluwela, L. et al., EMBO J., 7, 2003-2010, 1988). Bezüglich FR4 wurde entschieden, da die FR4-Sequenz von VDH26 nicht beschrieben worden ist, die Aminosäuresequenz von FR4 des menschlichen Antikörpers 4B4 zu verwenden, welcher zur Untergruppe III gehört (Sanz, I. et al., J. Immunol., 142, 883-887, 1989). Diese menschlichen V-Regionen der H-Kette wurden als Grundlage zum Entwerfen der V-Region der H-Kette des umgeformten menschlichen WS-4-Antikörpers verwendet.

[0055] Es wurden acht Versionen der V-Region der H-Kette des umgeformten menschlichen WS-4-Antikörpers entworfen. Bei allen acht Versionen beruhten die menschliche FR1, FR2 und FR3 auf FR1, FR2 und FR3 des menschlichen Antikörpers VDH26, während FR4 auf dem FR4 des menschlichen Antikörpers 4B4 beruht. Die CDR der Maus war identisch mit der CDR der V-Region der H-Kette des Maus-WS-4-Antikörpers.

[0056] Tabellen 3 und 4 zeigen die entsprechenden Aminosäuresequenzen der V-Region der H-Kette des Maus-WS-4-Antikörpers, der Matrize FR1 bis FR3 des menschlichen Antikörpers VDH26, FR4 des menschlichen Antikörpers 4B4 und die acht Versionen der V-Region der H-Kette des umgeformten menschlichen WS-4-Antikörpers.

Tabelle 3: Entwurf der V-Region der H-Kette des umgeformten menschlichen WS-4-Antikörpers (gefolgt von Tabelle 4)

	1									2									3								
	123456789012345678901234567890									123456789012345678901234567890									123456789012345678901234567890								
WS-4H	EVKLVESGGGLIQPGDSLRLSCVTSGFTFS									EVKLVESGGGLIQPGDSLRLSCVTSGFTFS									DYYLS								
VDH26	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS									EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS																	
RVIIa ~ h	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS									EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS									DYYLS								
										FR1									CDR1								
	4									5									6								
	67890123456789									012ABC3456789012345									67890123456789012345								
WS-4H	WVRQPPGKALEWVG									LIRNKANGYTREYSASVKG									WVRQPPGKALEWVG								
VDH26	WVRQAQGKGLELVG																		WVRQAQGKGLELVG								
RVIIa	WVRQAQGKGLELVG									LIRNKANGYTREYSASVKG									WVRQAQGKGLELVG								
RVIIb	-----W--									-----									-----								
RVIIc	-----P-----									-----									-----								
RVII d	-----P-----W--									-----									-----								
RVII e	----PP-----W--									-----									-----								
RVII f	-----P--A--W--									-----									-----								
RVII g	-----P-----W--									-----									-----								
RVII h	-----W--									-----									-----								
										FR2									CDR2								

Tabelle 4: Entwurf der V-Region der H-Kette des umgeformten menschlichen WS-4 (folgend auf Tabelle 3)

	7	8	9	10
	67890123456789012	ABC345678901234		567890ABC12.
WS-4H	RFTISRDDSQSILYLQMN	TLRGEDSATYYCAR		ENRYDVELAY
VDH26	RLTISRREDSKNTLYLQ	MSSLKTEDLAVYYCAR		
RVHa	RLTISRREDSKNTLYLQ	MSSLKTEDLAVYYCAR		ENRYDVELAY
RVHb	-----	-----		-----
RVHc	-----	-----		-----
RVHd	-----	-----		-----
RVHe	-----	-----		-----
RVHf	-----	-----		-----
RVHg	-F-----	-----		-----
RVHh	-F-----	-----		-----
		FR3		CDR3
	11			
	34567890123			
WS-4H	WGQGLVTVSA			
4B4	WGQGLVTVSS			
RVHa ~ h	WGQGLVTVSS			
	FR4			

Anmerkung: RVHa-h gibt RVHa, RVHb, RVHc, RVHd, RVHe, RVHf, RVHg und RVHh an.

[0057] Die Aminosäuren werden durch Verwendung des Einzelbuchstabencodes bezeichnet. Die Aminosäure-Nummern entsprechen der Definition von Kabat et al.

[0058] Herstellung von DNA, die für die V-Region des umgeformten menschlichen WS-4-Antikörpers kodiert. Die Herstellung der V-Region des umgeformten menschlichen WS-4-Antikörpers wird im Detail im Beispiel 5 beschrieben.

[0059] DNAs, die für die entsprechenden ersten Versionen der L-Kette und H-Ketten-V-Region des umgeformten WS-4-Antikörpers kodieren, wurden synthetisiert. Es wurde dann geprüft, dass die Gesamt-DNA-Sequenz der Version „a“ der V-Regionen der L-Kette und H-Kette des umgeformten menschlichen WS-4-Antikörpers für die korrekte Aminosäuresequenz kodiert, indem eine Sequenzbestimmung durchgeführt wurde. Die Sequenz der Version „a“ der L-Ketten-V-Region des umgeformten menschlichen WS-4-Antikörpers wird in SEQ-ID Nr. 72 gezeigt, während die Sequenz der Version „a“ der V-Region der H-Kette des umgeformten menschlichen WS-4-Antikörpers in SEQ-ID Nr. 40 gezeigt wird.

[0060] DNAs, die für andere Versionen der V-Region des umgeformten menschlichen WS-4-Antikörpers kodieren, wurden unter Verwendung einer geringfügigen Variierung des öffentlich offenbarten PCR-Mutations-Induktionsverfahrens (Kammann, M. et al., Nucleic Acids Res., 17, 5404, 1989) hergestellt, wobei die erste Version „a“ als Matrize verwendet wurde. Wie zuvor im Zusammenhang mit dem Entwurf der V-Region des umgeformten menschlichen WS-4-Antikörpers beschrieben worden ist, wurde DNA, die für eine zusätzliche Ver-

sion der V-Region der Kette des umgeformten menschlichen WS-4-Antikörpers (Version „b“), sowie DNA, die für sieben zusätzliche Versionen der V-Region der H-Kette des umgeformten menschlichen WS-4-Antikörpers kodiert (Versionen „b“, „c“, „d“, „e“, „f“, „g“ und „h“) hergestellt.

[0061] Diese zusätzlichen Versionen enthielten leichte Änderungen in einer Reihe von Aminosäuresequenzen der ersten Version, und diese Änderungen in den Aminosäuresequenzen wurden durch Durchführen geringer Veränderungen in der DNA-Sequenz unter Verwendung der PCR-Mutations-Induktion erzielt. Ein PCR-Primer, der die benötigte Änderung in die DNA-Sequenz einschleust, wurde entworfen. Nach einer Reihe von PCR-Reaktionen wurde das PCR-Produkt kloniert, gefolgt von einer Sequenzbestimmung, um zu bestätigen, dass die Änderungen in der DNA-Sequenz, so wie entworfen, aufgetreten sind. Die Sequenz der Version „d“ der V-Region der L-Kette des umgeformten menschlichen WS-4-Antikörpers wird in SEQ-ID Nr. 76 gezeigt, während die Sequenz an den Versionen „b“ bis „h“ der V-Region der H-Kette des umgeformten menschlichen WS-4-Antikörpers in den SEQ-ID Nr. 44, 48, 50, 54, 58, 62 bzw. 64 gezeigt sind.

[0062] Nach dem Überprüfen der DNA-Sequenzen zahlreicher Versionen der V-Region des umgeformten menschlichen WS-4-Antikörpers durch Sequenzbestimmung, wurden die DNAs, die für die V-Region des umgeformten menschlichen WS-4-Antikörpers kodieren, in Säugerzell-Expressionsvektoren subkloniert, die bereits DNA enthalten, die für die menschliche C-Region kodiert. Das bedeutet, dass DNA, die für die L-Region der V-Kette des umgeformten menschlichen WS-4-Antikörpers kodiert mit einer DNA-Sequenz verbunden wurde, die für die C-Region der menschlichen L-Kette kodiert, während DNA, die für die V-Region der H-Kette des umgeformten menschlichen WS-4-Antikörpers kodiert, mit einer DNA-Sequenz verbunden wurde, die für die menschliche C γ 1-Region kodiert.

[0063] Als nächstes wurden alle Kombinationen der Version „a“ oder „b“ der V-Region der menschlichen L-Kette und der Versionen „a“ bis „h“ der V-Region der H-Kette auf ihre Bindung an menschliches IL-8 getestet. Im Ergebnis, wie in [Fig. 7](#) gezeigt, wiesen beide umgeformten menschlichen Antikörper, die die Version „a“ oder „b“ der L-Kette enthalten sowie die Version „g“ (RVL α /RVH γ und RVL β /RVH γ) der H-Kette die Fähigkeit auf, an menschliches IL-8 in gleichem Maße zu binden, wie der chimäre WS-4-Antikörper.

[0064] Jedes Expressionssystem, einschließlich eukaryontischer Zellen, wie Tierzellen oder etablierter Säugerzellen, Pilzzellen, Hefezellen und prokaryontischer Zellen, wie Bakterienzellen (z. B. *Escherichia coli*) kann verwendet werden, um den umgeformten menschlichen Antikörper gegen humanes IL-8 herzustellen. Vorzugsweise wird der umgeformte Antikörper jedoch in Säugerzellen, wie COS-Zellen oder CHO-Zellen exprimiert. In diesen Zellen kann ein passender, gewöhnlich verwendeter Promotor verwendet werden, um in Säugerzellen zu exprimieren. Beispielsweise ist es bevorzugt, den Menschen-Cytomegalie-Immediate-Early (HCMV)-Promotor zu verwenden. Beispiele der Expressionsvektoren, die HCMV-Promotoren enthalten, schließen HCMV-VH-HC γ 1 und HCMV-VL-HCK ein, sowie die, die von pSV2neo stammen (Internationale Patentanmeldung Veröffentlichung Nr. WO 92-19759).

[0065] Zusätzlich schließen Beispiele anderer Promotoren für die genetische Expression in Säugerzellen, die verwendet werden können, Viruspromotoren ein, wie von einem Retrovirus, Poliomyavirus, Adenovirus und Affen-Virus 40 (SV40), wie auch Promotoren, die aus Säugerzellen stammen, wie den menschlichen Polypeptidketten-Verlängerungsfaktor 1 α (HEF-1 α). Beispielsweise kann eine Expression im Falle der Verwendung des SV40-Promotors durch das Befolgen des Verfahrens von Mulligan, R. C. et al. (*Nature*, 277, 108-114, 1979) durchgeführt werden, oder im Fall der Verwendung eines HEF-1 α -Promotors kann eine Expression durch das folgende Verfahren von Mizushima, S. et al. (*Nucleic Acids Res.*, 18, 5322, 1990) durchgeführt werden.

[0066] Ein anderes spezifisches Beispiel für einen nützlichen Promotor ist der HEF-1 α -Promotor. HEF-VH-g γ 1 und HEF-VL-g κ ([Fig. 1](#)) sind in einem Expressionsvektor enthalten, der diesen Promotor enthält. DNA-Sequenzen, die aus einem Polyomavirus, Adenovirus, SV40 oder Rinderpapillomavirus (BPV) und so weiter stammen, können als Replicatorkpunkte verwendet werden. Außerdem können zur Amplifizierung der Anzahl an genetischen Kopien in den Wirtszellen Aminoglycosid-3'-phosphotransferase, das neo-resistente Gen, Thymidinkinase (TK)-Gen, *E. coli* Xanthin-guanin phosphoribosyl-transferase (XGPRT)-Gen oder Dihydrofolatreductase (dhfr) als Selektionsmarker verwendet werden.

[0067] Zwei Arten an Expressionsvektoren werden für die Produktion des umgeformten Antikörpers hergestellt. Das bedeutet, dass ein Expressionsvektor, DNA enthält, die für die zuvor definierte umgeformte menschliche L-Kette unter Kontrolle eines Enhancer-/Promotortyps der Expressionskontrollregion wie auch ein anderer Expressionsvektor, der eine DNA enthält, die für die zuvor definierte umgeformte menschliche H-Kette unter Kontrolle eines Enhancer-/Promotortyps der Expressionskontrollregion hergestellt werden. Als nächstes wer-

den Wirtszellen, wie Säugerzellen, gleichzeitig durch diese Expressionsvektoren transformiert und die transformierten Zellen werden entweder *in vitro* oder *in vivo* kultiviert, um den umgeformten menschlichen Antikörper zu produzieren.

[0068] Alternativ dazu wird DNA, die für die umgeformte menschliche L-Kette und DNA, die für die umgeformte menschliche H-Kette kodiert, in einen einzelnen Expressionsvektor eingeschleust, es werden Wirtszellen unter Verwendung dieses Vektors transformiert und die transformierten Zellen werden dann entweder *in vitro* oder *in vivo* kultiviert, um den gewünschten umgeformten menschlichen Antikörper herzustellen.

[0069] Der umgeformte menschliche Antikörper, der auf diese Weise hergestellt wird, kann in Übereinstimmung mit Routineverfahren isoliert und gereinigt werden.

[0070] Umgeformte menschliche Antikörper $F(ab')_2$, Fab oder Fv, oder einzelkettige Fv, die sowohl Fv der H-Kette und L-Kette verbinden, können in einem geeigneten Wirt hergestellt werden und für bekannte Zwecke verwendet werden (siehe z. B. Bird, R. E. et al., TIBTECH, 9, 132-137, 1991).

[0071] Ein einzelkettiger Fv wird durch Verbinden der V-Region der H-Kette und der V-Region der L-Kette eines umgeformten menschlichen Antikörpers gegen menschliches IL-8 zusammengesetzt. In diesem Einzelketten-Fv sind die V-Region der H-Kette und die V-Region der L-Kette durch ein Verbindungsstück verbunden, bevorzugt durch ein Peptidverbindungsstück (Huston, J. S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 5879-5883, 1988).

[0072] Die V-Region der H-Kette und die V-Region der L-Kette dieses Einzelketten-Fv werden aus den Aminosäuresequenzen ausgewählt, die in den SEQ-ID Nr. 63, 73 und 77 beschrieben sind (siehe WO 88-01649).

[0073] Diese V-Regionen werden vorzugsweise durch eine Peptidverbindung verbunden. Beispiele für Peptidverbindungen, die verwendet werden, schließen jedes zufällige einzelkettige Peptid ein, das beispielsweise aus 12-19 Resten zusammengesetzt ist (siehe WO 88-09344).

[0074] DNA, die für einzelkettige Fv kodiert, wird gewonnen, indem DNA, die für die H-Kette oder die V-Region der H-Kette kodiert, und DNA, die für die L-Kette oder die V-Region der L-Kette des oben erwähnten umgeformten menschlichen Antikörpers als Matrize kodiert, verwendet wird, wobei ein Teil der gewünschten DNA, die für diese Aminosäuresequenz kodiert, amplifiziert wird, indem ein Primerpaar, das in einer PCR beide Enden festlegt, und Kombinieren eines Primerpaares, das die DNA definiert, die für einen Polypeptidlinker kodiert zusammen mit beiden seiner Enden, um so die H- und L-Ketten zu verbinden, verwendet wird.

[0075] Zusätzlich kann, sobald die DNA, die für den einzelkettigen Fv kodiert, hergestellt worden ist, ein Expressionsvektor, der diese zusammen mit einem Wirt enthält, welcher mit diesem Expressionsvektor transformiert ist, nach Routineverfahren gewonnen werden. Zusätzlich kann der einzelkettige Fv nach Routineverfahren unter Verwendung dieses Wirts gewonnen werden.

[0076] Im Vergleich mit Antikörpermolekülen besitzen einzelkettige Fv eine bessere Permeabilität in Gewebe, und es wird erwartet, dass sie in der Bildgebung, indem sie mit einem Radioisotop markiert werden, und als therapeutisches Mittel mit ähnlichen Funktionen wie ein umgeformter menschlicher Antikörper verwendet werden können.

[0077] ELISA (Enzyme-linked immunosorbant assay), EIA (Enzyme immunoassay), RIA (radioimmunoassay) oder Fluoreszenz-Antikörpertechniken können verwendet werden, um die Bindungsaktivität des umgeformten menschlichen Antikörpers zu bestätigen, und der $F(ab')_2$, Fab, Fv oder Einzelketten-Fv gegen IL-8 der vorliegenden Erfindung zu bestätigen. Beispielsweise wird im Fall der Verwendung eines Enzym-Immunoassays mit umgeformtem menschlichem Antikörper menschliches IL-8 zu einer Platte gegeben, die mit einem polyklonalen Antikörper gegen Menschen-IL-8 beschichtet ist, ein Überstand oder eine gereinigte Probe von Zellen, die den umgeformten menschlichen Antikörper gegen menschliches IL-8 produzieren, hinzugegeben, und dann wird ein geeigneter Sekundär-Antikörper hinzugegeben, der mit einem Enzym, wie alkalischer Phosphatase, markiert ist. Nach dem Inkubieren und dem Waschen der Platte wird ein Enzymsubstrat, wie Nitrophenylphosphat, hinzugegeben, gefolgt von einer Messung der Absorption, um die Antigen-Bindungs-fähigkeit zu untersuchen.

[0078] Die Fähigkeit des umgeformten menschlichen Antikörpers und der $F(ab')_2$, Fab, Fv oder Einzelketten-Fv gegen menschliches IL-8 die Bindung von IL-8 an IL-8-Rezeptoren zu inhibieren, wird durch ein ge-

wöhnliches Liganden-Rezeptor-Bindungsinhibitionstestverfahren untersucht. Um beispielsweise die Inhibierung der Bindung von IL-8 an IL-8-Rezeptoren auf Neutrophilen zu untersuchen, wird eine Zellsuspension nach dem Abtrennen von Neutrophilen, die aus Heparin-Blut durch Zentrifugieren oder andere Mittel gewonnen worden sind, hergestellt, die eine passende Anzahl an Zellen hat, die in dem oben erwähnten Test verwendet werden kann.

[0079] Eine Lösung, die IL-8 enthält, welches mit ^{125}I und so weiter markiert ist, und nicht markiertes IL-8 wird mit einer Lösung gemischt, die den Antikörper oder dessen Fragmente enthält, die in einer geeigneten Konzentration hergestellt worden sind, gefolgt von der Zugabe dieser Mischung zur oben erwähnten Neutrophilen-Suspension. Nach einem gewissen Zeitraum werden die Neutrophilen abgetrennt, und die Aktivität der Markierung bei den Neutrophilen wird untersucht.

[0080] Routinegemäß bekannte Verfahren, wie das Verfahren, das in Grob, P. M. et al., J. Biol. Chem., 265, 8311-8316, 1990, beschrieben ist, können für die Untersuchung der Inhibierung der Neutrophilen-Chemotaxis durch den Antikörper oder dessen Fragmente verwendet werden.

[0081] Im Fall der Verwendung einer kommerziell erhältlichen Chemotaxis-Kammer, wird IL-8 nach dem Verdünnen des erfindungsgemäßen Antikörpers oder dessen Fragmenten mit einem geeigneten Kulturmedium zur Kammer hinzugegeben, gefolgt von der Zugabe des verdünnten Antikörpers oder der Fragmente. Als nächstes wird die hergestellte Neutrophilen-Suspension zur Kammer hinzugegeben, und es wird ermöglicht, für einen gewissen Zeitraum stehen zu bleiben. Da migrierende Neutrophile am Filter adhären, das in der Kammer angebracht ist, kann die Anzahl solcher Neutrophiler durch gewöhnliche Verfahren gemessen werden, z. B. durch Färbung oder Fluoreszenzantikörperverfahren. Zusätzlich kann eine Messung ebenfalls durch mikroskopische Untersuchung mit einem Mikroskop oder durch automatisierte Messung unter Verwendung einer Maschine durchgeführt werden.

[0082] Nach dem Sterilisieren durch Filtrieren unter Verwendung eines Membranfilters, kann der umgeformte menschliche Antikörper, und das $\text{F}(\text{ab}')_2$, Fab, Fv oder Einzelketten-Fv-Fragmente gegen menschliches IL-8 als pharmazeutisches therapeutisches Agens vorzugsweise parenteral, beispielsweise durch intravenöse Injektion, intramuskuläre Injektion, intraperitoneale Injektion oder subkutane Injektion oder transtracheal, beispielsweise durch Verwendung eines Zerstäubers, verabreicht werden. Obwohl sie nach dem Alter und den Symptomen des Patienten variieren kann, ist die normale Dosis beim Menschen 1-1.000 mg/Körper, wobei eine geteilte Dosierung von 1-10 mg/kg/Woche ausgewählt werden können.

[0083] Nach der Untersuchung der Bindungsaktivität nach Aufreinigung können der umgeformte menschliche Antikörper und dessen $\text{F}(\text{ab}')_2$, Fab, Fv oder Einzelketten-Fv-Fragmente gegen menschliches IL-8 in einem pharmazeutischen therapeutischen Mittel durch routinemäßig verwendete Verfahren hergestellt werden, die für die Herstellung von Präparaten physiologisch aktiver Proteine verwendet werden. Beispielsweise besteht ein Präparat zur Injektion aus dem Lösen des verbesserten umgeformten menschlichen Antikörpers oder dessen $\text{F}(\text{ab}')_2$, Fab, Fv oder Einzelketten-Fv-Fragmenten gegen menschliches IL-8 in einem Lösungsmittel wie physiologischer Salzlösung oder Puffer, gefolgt von der Zugabe eines Anti-Adsorptionsmittels wie Tween 80, Gelatine oder menschlichem Serum Albumin (HSA). Alternativ dazu kann dieses Präparat ebenfalls für die Lösung gefriergetrocknet und vor der Verwendung rekonstituiert werden. Beispiele für Träger, die für das Gefrier-trocknen verwendet werden können, schließen Zuckeralkohole oder Zucker ein, wie Mannitol und Glucose.

Beispiele

Beispiel 1: Klonierung von DNA, die für die V-Region eines monoklonalen Antikörpers der Maus gegen menschliches IL-8 kodiert

[0084] DNA, die für die variable Region eines monoklonalen Antikörpers der Maus gegen menschliches IL-8 kodiert, wurde in der unten beschriebenen Weise kloniert.

1. Herstellung gesamter RNA

[0085] Die gesamte RNA wurde vom Hybridom WS-4 durch Modifizierung des Cäsiumchlorid-Dichtegradienten-Zentrifugationsverfahren von Chirgwin, J. M. et al., beschrieben in Biochemistry, 18, 5294-5299, 1979, hergestellt.

[0086] Das bedeutet, dass 1×10^7 Hybridom-WS-4-Zellen vollständig in 25 ml 4 M Guanidinthiocyanat (Fluka)

homogenisiert wurden. Das Homogenat wurde über eine 5,7 M Cäsiumchloridlösung in einem Zentrifugenröhrchen geschichtet, gefolgt von einer Präzipitierung der RNA durch Zentrifugieren für 14 h bei 20°C bei 31.000 upm in einem Beckman SW40-Rotor.

[0087] Das RNA-Präzipitat wurde mit 80 % Ethanol gewaschen, und dann in 200 µl 20 mM Tris-HCl (ph 7,5) gelöst, das 10 mM EDTA enthält und 0,5 % Natrium-N-laurylsarcosinat. Nach Zugabe von Proteinase (Boehringer) in einer Konzentration von 0,5 mg/ml wurde das erhaltene Gemisch in ein Wasserbad für 30 min. bei 37°C inkubiert. Das Gemisch wurde mit Phenol und Chloroform extrahiert, und die RNA wurde mit Ethanol präzipitiert. Als nächstes wurde das RNA-Präzipitat in 200 µl 10 mM Tris-HCl (ph 7,5), enthaltend 1 mM EDTA, gelöst.

2. Extraktion der Messenger-RNA (mRNA)

[0088] Um mRNA zu extrahieren, die für die H-Kette des monoklonalen Antikörpers WS-4 der Maus kodiert, wurde poly(A)-positive mRNA aus der Gesamt-RNA extrahiert, die in Schritt 1 oben gewonnen wurde, indem ein Fast Track mRNA-Isolations-Kit Version 3.2 (Invitrogen) verwendet wurde, und gefolgt wurde von dem Verfahren, das in den Anweisungen des Herstellers angegeben ist.

3. Synthese einzelsträngiger cDNA

[0089] Einzelsträngige cDNA wurde aus ungefähr 40 ng der in dem Schritt 2 oben gewonnenen mRNA synthetisiert, indem der cDNA-Cycle-Kit (Invitrogen) verwendet wurde, und dem Verfahren gefolgt wurde, das in den Anweisungen beschrieben ist. Das erhaltene Produkt wurde dann verwendet, um die cDNA zu amplifizieren, die für die V-Region der H-Kette der Maus kodiert. Außerdem wurde einzelkettige cDNA aus ungefähr 10 µg der oben erwähnten gesamten RNA synthetisiert, um cDNA zu amplifizieren, die für die V-Region der L-Kette der Maus kodiert.

4. Amplifizierung des Gens, das für die variable Region des Antikörpers kodiert, mittels PCR

(1) Amplifizierung der cDNA, die für die V-Region der H-Kette der Maus kodiert

[0090] MHV (mouse heavy variable)-Primer 1 bis 12, die in den SEQ-ID Nr. 13 bis 24 gezeigt sind, und MHC (mouse heavy constant)-Primer, der in SEQ-ID Nr. 25 gezeigt ist (Jones, S. T. et al., Bio/Technology, 9, 88-89, 1991) wurden als PCR-Primer verwendet. 100 µl der PCR-Lösung, die 10 mM Tris-HCl (ph 8,3), 50 mM KCl, 0,1 mM dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 1,5 mM MgCl₂, 0,001 % (w/v) Gelatine, 5 Einheiten DNA-Polymerase AmpliTaq (Perin Elmer Cetus), 0,25 µM eines der MHV-Primer, die in SEQ-ID Nr. 13 bis 24 gezeigt sind, 75 µM des MCH-Primers, der in SEQ-ID Nr. 25 gezeigt ist, und 1,5 µl der einzelsträngigen cDNA-Lösung, die in Schritt 3 oben gewonnen wurde, wurden verwendet. Die PCR-Lösungen wurden für jeden der MHV-Primer 1-12 hergestellt. Nach dem Bedecken jeder Lösung mit 50 µl Mineralöl, wurde diese in einer Größenordnung von 3 Minuten bei der anfänglichen Temperatur von 94°C erwärmt, gefolgt von einem Zyklus aus 1 Minute bei 94°C, 1 Minute bei 55°C und 1 Minute bei 72°C. Nach dem Wiederholen dieser Wärmezyklen über 30 Male, wurde das Reaktionsgemisch weiter für 10 Minuten bei 72°C inkubiert.

(2) Amplifizierung der cDNA, die für die V-Region der L-Kette der Maus kodiert

[0091] MKV (mouse kappa variable)-Primer 1 bis 11, die in den SEQ-ID Nr. 1 bis 11 gezeigt sind, und MKC (mouse kappa constant)-Primer, die in SEQ-ID Nr. 12 gezeigt ist (Jones, S. T. et al., Bio/Technology, 9, 88-89, 1991), wurden als PCR-Primer verwendet.

[0092] Die Amplifizierung der cDNA wurde mit 2,0 µl der einzelsträngigen cDNA durchgeführt, die in Schritt 3 oben gewonnen wurde, indem das gleiche Verfahren verwendet wurde, das für die Amplifizierung des Gens für die V-Region der H-Kette in Schritt 4 Teil (1) oben durchgeführt worden ist, mit der Ausnahme, dass die Amplifizierung unter Verwendung von 0,25 µM jeweils der MKV-Primer-Mischungen und 3,0 µM des MCK-Primers durchgeführt wurde.

5. Reinigung und Fragmentierung des PCR-Produktes

[0093] Die entsprechenden DNA-Fragmente der V-Region der H-Kette und der V-Region der L-Kette, die mittels PCR amplifiziert worden sind, wie oben beschrieben wurde, wurden durch Agarosegel-Electrophorese unter Verwendung von 1,5 % niedrigschmelzender Agarose (Sigma) aufgetrennt. Agarosestücke, die ein DNA-Fragment der H-Kette von ungefähr 450 bp Länge und ein L-Ketten-DNA-Fragment von ungefähr 400 bp

Länge enthalten, wurden getrennt ausgeschnitten und für 5 Minuten bei 65°C aufgeschmolzen, gefolgt von der Zugabe des gleichen Volumens 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), enthaltend 2 mM EDTA und 300 mM NaCl.

[0094] Diese Mischung wurde durch Phenol und Chloroform extrahiert, die DNA-Fragmente wurden durch Ethanol-Präzipitierung gewonnen, und in 10 mM Tris-HCl (pH 7,5) gelöst, die 1 mM EDTA enthalten. Als nächstes wurden die Fragmente für 3 Stunden bei 37°C unter Verwendung von 5 Einheiten Restriktionsenzym XmaI (New England BioLabs) in 10 mM Tris-HCl (pH 7,9), enthaltend 10 mM MgCl₂ und 1 mM Dithiothreitol, verdaut. Als nächstes wurden die DNA-Fragmente für 2 Stunden bei 37°C mit 40 Einheiten des Restriktionsenzym Sall (Takara Shuzo) verdaut, und die erhaltenen DNA-Fragmente wurden durch Agarosegel-Electrophorese unter Verwendung von 1,5 %iger niedrig schmelzender Agarose (Sigma) aufgetrennt.

[0095] Die Agarosestücke, die DNA-Fragmente enthalten, wurden ausgeschnitten und für 5 Minuten bei 65°C geschmolzen, gefolgt von der Zugabe eines gleichen Volumens an 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), enthaltend 2 mM EDTA und 300 mM NaCl. Dieses Gemisch wurde dann aus Phenol und Chloroform extrahiert, die DNA-Fragmente wurden durch Ethanolpräzipitierung gewonnen und in 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), enthaltend 1 mM EDTA, gelöst.

[0096] Auf diese Weise wurde jeweils ein DNA-Fragment, das ein Gen enthält, das für Maus κ-Typ L-Ketten V-Region kodiert, und ein DNA-Fragment, das ein Gen enthält, das für die V-Region der H-Kette der Maus kodiert, gewonnen. Die oben erwähnten DNA-Fragmente haben beide eine Sall-Anheftungsstelle an ihrem 5'-Terminus und eine XmaI-Anhängungsstelle an ihrem 3'-Terminus.

6. Ligierung und Transformation

[0097] Ungefähr 0,3 µg des Sall-XmaI DNA-Fragments, das das Gen enthält, das für die V-Region der L-Kette vom kappa-Typ der Maus kodiert, welches auf die oben beschriebene Weise hergestellt worden ist, wurden mit ungefähr 0,1 µg pUC19-Vektor (Takara Shuzo) gemischt, welches durch einen Verdau mit Sall, XmaI und alkalischer Phosphatase von *Escherichia coli* (BAP; Takara Shuzo), über 4 Stunden bei 16°C in einem gepufferten Reaktionsgemisch, enthaltend 1 Einheit T4 DNA-Ligase (Gibco BRL) und einen zusätzlichen Puffer zum Verbinden hergestellt wurde.

[0098] Als nächstes wurden 5 µl der oben erwähnten Ligationsmischung zu 50 µl kompetenter Zellen von *E.coli* DH5α (GIBCO BRL) hinzugegeben, worauf die Zellen für 30 Minuten auf Eis stehen gelassen wurden, für 1 Minute bei 42°C und wieder für 1 Minute auf Eis. Als nächstes wurden 400 µl 2 × YT-Medium (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook, et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) hinzugegeben. Nach dem Inkubieren für 1 Stunde bei 37°C wurden die *E.coli* auf 2 × YT Agarmedium (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook, et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989), enthaltend 50 µg/ml Ampicillin (Meiji Seika) ausgebreitet, gefolgt von einer Inkubation über Nacht bei 37°C, um die *E.coli*-Transformante zu erhalten. Anschließend wurden dieses Mal 50 µg X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indoyl-β-D-galactosid, Takara Shuzo) als Selektionsmarker hinzugegeben.

[0099] Diese Transformante wurde über Nacht bei 37°C in 10 ml 2 × YT Medium, enthaltend 50 µg/ml Ampicillin inkubiert, und die Plasmid-DNA wurde aus dieser Kultur unter Verwendung des QIA-GEN-Plasmid-Mini-Kits (QIAGEN) und dem Verfahren, das in den Anweisungen beschrieben ist, hergestellt.

[0100] Das Plasmid, das das Gen enthält, das für die V-Region der L-Kette vom κ-Typ der Maus kodiert, welches aus dem Hybridom WS-4 stammt, das so gewonnen wurde, wurde als pUC-WS-4-VL bezeichnet.

[0101] Ein Plasmid, das das Gen enthält, welches für die V-Region der H-Kette der Maus kodiert, die aus dem Hybridom WS-4 stammt, wurde aus dem Sall-XmaI DNA-Fragment gewonnen, indem das gleiche Verfahren, wie oben beschrieben, befolgt wurde, außer, dass JM109 als kompetente *E.coli*-Zellen verwendet wurden. Das erhaltene Plasmid wurde als pUC-WS4-VH bezeichnet.

Beispiel 2: Bestimmung der DNA-Nucleotidsequenz

[0102] Die Nucleotidsequenz der kodierenden Region der cDNA in den oben erwähnten Plasmiden wurde unter Verwendung des M13-Primers RV und M13-Primers M4 (beide Takara Shuzo) als Sequenzierprimer, mit einem automatisierten DNA-Sequenziergerät (Applied Biosystems Inc.) und dem Taq Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems Inc.) und unter Befolgung des Protokolls, das durch die Hersteller angegeben worden ist, bestimmt. Die Nucleotidsequenz des Gens, das für die V-Region der L-Kette des

Maus-WS-4-Antikörpers kodiert, das in dem Plasmid pUC-WS4-VL enthalten ist, ist in SEQ-ID Nr. 26 gezeigt. Zusätzlich ist die Sequenz des Gens, das die V-Region der H-Kette des Maus-WS-4-Antikörpers kodiert, das in dem Plasmid pUC-WS4-VH enthalten ist, in SEQ-ID Nr. 8 gezeigt.

Beispiel 3: Bestimmung des CDR

[0103] Die Grundstruktur der V-Regionen der L- und H-Ketten hat gemeinsame Ähnlichkeiten, wobei jede vier Rahmenbereiche aufweist, die durch drei hypervariable Regionen verbunden sind, d. h. Komplementaritäts-bestimmende Regionen (CDR). Obwohl die Aminosäuresequenz der Rahmenbereiche relativ gut konserviert ist, ist die Variabilität der Aminosäuresequenz der CDR-Regionen extrem hoch (Kabat, E. A. et al., „Sequences of Proteins of Immunological Interest“, US Dept. of Health and Human Services, 1991).

[0104] Auf Grundlage dieser Tatsache wurde der CDR wie in Tabelle 5 gezeigt, durch Untersuchen ihrer Homologie bestimmt, indem versucht wurde, die Aminosäuresequenz der variablen Region des Maus-monoklonalen Antikörpers gegen menschliches IL-8 mit der Datenbank an Aminosäuresequenzen der Antikörper, die von Kabat et al. hergestellt worden sind, zu vergleichen.

Tabelle 5: CDR in der L-Ketten-V-Region und H-Ketten-V-Region des Maus-WS-4-Antikörpers

Plasmid	Sequenz-Nr.	CDR 1	CDR 2	CDR 3
pUC-WS4-VL	26	24-34	50-56	89-97
pUC-WS4-VH	28	31-35	50-68	101-111

Beispiel 4: Bestimmung der Expression der klonierten cDNA (Herstellung des chimären WS-4-Antikörpers)

[0105] Um einen Vektor herzustellen, der chimären WS-4-Antikörper exprimiert, wurden die cDNA-Klone pUC-WS4-VL und pUC-WS4-VH, die für die V-Region der L-Kette bzw. der H-Kette des Maus-WS-4 kodieren, durch PCR modifiziert. Diese wurden dann in einen HEF-Expressionsvektor eingeschleust (Bezug genommen wird auf die zuvor beschriebene WO 92-19759 und [Fig. 1](#)).

[0106] Der Rückwärts-Primer (SEQ-ID Nr. 30) der V-Region der L-Kette und der Rückwärts-Primer (SEQ-ID Nr. 31) der V-Region der H-Kette wurden jeweils mit DNA hybridisiert, die für den Beginn der Leader-Sequenz der V-Region kodiert und so entworfen worden sind, dass sie eine Kozak-Konsensussequenz (Kozak, M. et al., J. Mol. Biol., 196, 947-950, 1987) sowie eine HindIII-Restriktionsschnittstelle haben. Der Vorwärtsprimer (SEQ-ID Nr. 32) der V-Region der L-Kette und der Vorwärtsprimer (SEQ-ID Nr. 33) der V-Region der H-Kette wurden mit einer DNA-Sequenz hybridisiert, die für das Ende der J-Kette kodiert, und so entworfen, dass sie eine Splice-Donor-Sequenz und eine BamHI-Restriktionsschnittstelle hinzufügen.

[0107] 100 µl einer PCR-Reaktionsmischung enthaltend 20 mM Tris-HCl (pH 8,2), 10 mM KCl, 6 mM (NH₄)₂SO₄, 1 % Triton X-100, 100 µM dNTPs, 1,5 mM MgCl₂, 100 pM jedes Primers, 100 ng der Matrizen-DNA (pUC-VL oder pUC-VH) und 2,5 U AmpliTaq-Enzym wurden mit 50 µl Mineralöl bedeckt. Nach einer anfänglichen Denaturierung für 3 Minuten bei 94°C wurde ein Erwärmungszyklus, der aus 1 Minute bei 94°C, 1 Minute bei 55°C und 1 Minute bei 72°C bestand, 30-mal wiederholt, gefolgt von einer endgültigen Inkubation für 10 Minuten bei 72°C.

[0108] Das PCR-Produkt wurde unter Verwendung eines 1,5-%igen Gels aus niedrigschmelzender Agarose gereinigt, gefolgt von einem Verdau mit HindIII und BamHI. Die V-Region der L-Kette wurde in den HEF-Expressionsvektor HEF-VL-gk kloniert, während die V-Region der H-Kette in den HEF-Expressionsvektor HEF-VH-gy1 kloniert wurde. Nach der Bestimmung der DNA-Sequenzen wurden Plasmide, die das DNA-Fragment enthalten, das die korrekte DNA-Sequenz hat, als HEF-chWS4L-gk beziehungsweise HEF-chWS4H-gy1 bezeichnet.

Transfektion in COS-Zellen

[0109] Um die transiente Expression des primären WS-4-Antikörpers zu beobachten, wurden die oben erwähnten Expressionsvektoren in COS-Zellen getestet. HEF-chWS4L-gk und HEF-chWS4H-gy1 wurden durch Electroporation unter Verwendung eines Genpuls-Systems (BioRad) gleichzeitig in COS-Zellen transfiziert. Jede DNA (10 µg) wurde in einem 0,8 ml Aliquot enthaltend 1×10^7 Zellen/ml in PBS hinzugegeben, und dann mit 1,5 kV mit einer Kapazität von 25 µF pulsiert.

[0110] Nach dem Einräumen eines Erholungszeitraums für 10 Minuten bei Raumtemperatur wurden die electroporierten Zellen in 15 ml DMEM Kulturmedium (GIBCO) suspendiert, das 5 γ -Globulin-freies fötales Kälberserum enthält, welches in ein Gewebekulturgefäß gegeben wurde. Nach dem Inkubieren für 96 Stunden wurde das Kulturmedium eingesammelt, die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugieren entfernt, und der Überstand wurde dann mit einem Scheibenfilter mit einem Porendurchmesser von 0,45 μ m (Gelman Science) filtriert.

ELISA

[0111] Die ELISA-Platten zur Messung der Antigenbindung und der Antikörperkonzentration wurden wie unten beschrieben hergestellt. Die ELISA-Platten zur Messung der Antigen-Bindungsfähigkeit wurden auf folgende Weise hergestellt. Nach dem Ausbilden einer festen Schicht in jeder Vertiefung einer 96-Well-Platte (Nunc) mit 100 μ l eines polyclonalen Ziege-Anti-Mensch IL-8-Antikörpers (R & D Systems), welcher in einer festen Schicht Puffer mit einer Konzentration von 2 μ g/ml (0,1 M Natriumbicarbonat, 0,02 % Natriumazid) gelöst war, und Blockieren mit 200 μ l Verdünnungspuffer (50 mM Tris-HCl (pH 7,2), 1 % Rinderserumalbumin (BSA), 1 mM $MgCl_2$, 0,15 M NaCl, 0,05 % Tween 20 und 0,02 % Natriumazid), wurden 100 μ l rekombinantes menschliches IL-8 (Amersham) (5 ng/ml) hinzugegeben.

[0112] Eine gereinigte Probe des chimären Antikörpers oder des Kulturüberstands der COS-Zellen, die diese exprimierten, wurden seriell verdünnt und in jede Vertiefung gegeben. Als nächstes wurden 100 μ l Alkalische Phosphatase markierter Ziege-Anti-Mensch IgG-Antikörper (TAGO) (1 μ g/ml) hinzugegeben. Nach einer Inkubation und Waschen wurde eine Substratlösung (1 mg/ml p-Nitrophenyl-phosphat) hinzugegeben, gefolgt von einer Messung der Absorption bei 405 nm.

[0113] Zur Messung der Antikörperkonzentration, nach dem Ausbilden einer festen Schicht in den Vertiefungen der 96-Wellplatte mit 100 μ l Ziege-Anti-Maus IgG-Antikörper (TAGO) bei einer Konzentration von 1 μ g/ml und Blockieren wurde eine gereinigte Probe des chimären Antikörpers oder Kulturmediums der COS-Zellen, die diese exprimierten, seriell verdünnt und zu jeder Vertiefung hinzugegeben. Als nächstes wurden 100 μ l Alkalische Phosphatase markierter Ziege-Anti-Maus IgG-Antikörper (TAGO) (1 μ g/ml) hinzugegeben. Nach der Inkubation und Waschen, wurde eine Substratlösung (1 mg/ml p-Nitrophenylphosphat) hinzugegeben, und die Absorption wurde bei 405 nm gemessen.

[0114] Da der chimäre Antikörper WS-4 im Ergebnis eine spezifische Bindung an IL-8 zeigte, wurde davon ausgegangen, dass dieser chimäre Antikörper die korrekte Struktur der V-Region des Maus-monoklonalen Antikörpers WS-4 hat (siehe [Fig. 2](#)).

[0115] Des Weiteren wurde Escherichia coli mit dem oben erwähnten Plasmid HEF-chWS4L-gk als Escherichia coli DH5 α (HEF-chWS4L-gk) hinterlegt und die Escherichia coli mit dem oben erwähnten Plasmid HEF-chWS4H-gy1 wurden als Escherichia coli JM109 (HEF-chWS4H-gy1) beim Bioengineering Industrial Technology Research Institute of the Agency of Industrial Science and Technology (1-1-3 Higashi, Tsukuba, Ibaraki, Japan) am 12. Juli 1994 unter den jeweiligen Bezeichnungen FERM BP-4739 beziehungsweise FERM BP-4740 gemäß den Vorschriften der Budapester Konvention hinterlegt.

Beispiel 5: Herstellung eines umgeformten menschlichen WS-4-Antikörpers

Herstellung der V-Region der H-Kette des umgeformten menschlichen WS-4-Antikörpers

[0116] DNA, die für die V-Region der H-Kette des umgeformten menschlichen WS-4-Antikörpers kodiert, wurde in der unten beschriebenen Weise entworfen. Vollständige DNA, die für die V-Region der H-Kette des umgeformten menschlichen WS-4-Antikörpers kodiert, wurde so entworfen, dass bekannte DNA-Sequenzen, die jeweils für FR1 bis FR3 des menschlichen Antikörpers VDH26 und FR4 des menschlichen Antikörpers 4B4 kodieren, an die DNA-Sequenz gebunden werden, die für die CDR der V-Region der H-Kette des Maus-WS-4-Antikörpers kodiert.

[0117] Als nächstes wurde eine HindIII-Erkennungsschnittstelle/Kozak Konsensus-Sequenz und eine BamHI Erkennungsschnittstelle/Splice-Donor-Sequenz jeweils an die 5'- bzw. 3'-Enden dieser DNA-Sequenz angehängt, gefolgt von der Einschleusung in einen HEF-Expressionsvektor. Die DNA-Sequenz, die auf diese Weise entworfen worden ist, wurde dann in vier ungefähr gleiche Oligonucleotide unterteilt, worauf die Sekundärstruktur dieser Oligonucleotide, für die es die Möglichkeit gibt, dass sie den Zusammenbau dieser Oligonucleotide beeinträchtigen, mittels Computer analysiert wurden.

[0118] Die vier Oligonucleotidsequenzen werden in den SEQ-ID Nr. 34 bis 37 gezeigt. Diese Oligonucleotide haben Längen von 113 bis 143 Basen, und die benachbarten Oligonucleotide haben eine Überlappregion, die jeweils aus 20 Basen besteht. HF1 (SEQ-ID Nr. 34) und HF3 (SEQ-ID Nr. 36) dieser vier Oligonucleotide haben eine Sense-DNA-Sequenz, während HF2 (SEQ-ID Nr. 35) und HF4 (SEQ-ID Nr. 37) eine Antisense-DNA-Sequenz haben. Diese Oligonucleotide wurden durch ein automatisiertes DNA-Synthesegerät (Applied Biosystems) synthetisiert.

[0119] Zusätzlich ist das Verfahren des Zusammenbaus dieser vier Oligonucleotide durch PCR in **Fig. 3** dargestellt. Ungefähr 100 ng jedes der HF1 und HF2 wie auch HF3 und HF4 wurden zusammengegeben und in ein PCR-Reaktionsgemisch mit einem endgültigen Volumen von 98 µl und 2,5 U der Pfu DNA-Polymerase enthalten, gegeben. Nach anfänglichem Denaturieren für 3 Minuten bei 94°C wurden die Lösungen für 2 Zyklen inkubiert, wobei jeder Zyklus aus einer Inkubation für 2 Minuten bei 94°C, 2 Minuten bei 55°C und 2 Minuten bei 72°C besteht.

[0120] Nach dem Ersetzen von jeweils dem halben Volumens der PCR-Reaktionslösungen wurde die Inkubation für zusätzliche zwei Zyklen fortgesetzt. Nach dem Hinzugeben von jeweils 100 pM RVH5'-Primer (SEQ-ID Nr. 38) und RVH3'-Primer (SEQ-ID NR. 39) als externer Primer wurden die PCR-Reaktionslösungen mit 50 µl Mineralöl bedeckt. Nach anfänglichem Denaturieren für 3 Minuten bei 94°C wurden die Reaktionslösungen für 45 Zyklen aus 1 Minute bei 94°C, 1 Minute bei 95°C und 1 Minute bei 72°C inkubiert, gefolgt von einer endgültigen Inkubation für 10 Minuten bei 72°C.

[0121] Ein DNA-Fragment, das ungefähr 450 Basenpaare enthält, wurde aus einem 1,5 %igen niedrigschmelzenden Agarosegel gereinigt, mit HindIII und BamHI verdaut und in den HEF-Expressionsvektor HEF-VH-gy1 ([Fig. 1](#)) kloniert. Nach dem Bestimmen der DNA-Sequenz unter Verwendung des EF-1-Primers (SEQ-ID Nr. 78) und des HIP-Primers (SEQ-ID Nr. 79) wurde das Plasmid, das ein DNA-Fragment enthält, das für die korrekte Aminosäuresequenz der V-Region der H-Kette kodiert, als HEF-RVHa-gy1 bezeichnet. Die Aminosäuresequenz und die Nucleotidsequenz der V-Region der H-Kette, die in diesem Plasmid HEF-RVHa-gy1 enthalten sind, werden in SEQ-ID Nr. 41 und 40 gezeigt.

[0122] Jede der Versionen "b", "c", "d", "e", "f", "g", und "h" der V-Region der H-Kette des umgeformten menschlichen WS-4-Antikörpers wurde in der unten beschriebenen Weise hergestellt.

[0123] Version „b“ (RHVb) wurde mittels PCR unter Verwendung der Mutagenprimer LTW1 (SEQ-ID Nr. 42) und LTW2 (SEQ-ID NR. 43) amplifiziert, die so entworfen sind, dass Leucin an der Position 47 durch Tryptophan ersetzt wird, RVH5' (SEQ-ID Nr. 38) und RVH3' (SEQ-ID Nr. 43) für Primer, die beide Enden definieren, und, das Plasmid HEF-RVHa-gy1 als Matrizen-DNA, um das Plasmid HEF-RVHb-gy1 zu gewinnen. Die Aminosäuresequenz und die Nucleotidsequenz der H-Ketten V-Region, die in diesem Plasmid HEF-RVHb-gy1 enthalten ist, sind in den Sequenzen SEQ-ID Nr. 45 und 44 gezeigt.

[0124] Version „c“ wurde mittels PCR unter Verwendung der Mutagenprimer QTP1 (SEQ-ID Nr. 46) und QTP2 (SEQ-ID Nr. 47) amplifiziert, die so entworfen wurden, dass Glutaminsäure an der Position 41 durch Prolin ersetzt ist, und das Plasmid HEF-RVHa-gy1 als Matrizen-DNA, um das Plasmid HEF-RVHc-gy1 zu gewinnen. Die Aminosäuresequenz und die Nucleotidsequenz der V-Region der H-Kette, die in diesem Plasmid HEF-RVHc-gy1 enthalten sind, sind in den SEQ-ID Nr. 49 und 48 gezeigt.

[0125] Version „d“ wurde mittels PCR unter Verwendung der Mutagenprimer QTP1 und QTP2 und Plasmid HEF-RVHb-gy1 als die Matrizen-DNA, um das Plasmid HEF-RVHd-gy1 zu gewinnen. Die Aminosäuresequenz und die Nucleotidsequenz der V-Region der H-Kette, die in diesem Plasmid HEF-RVHd-gy1 enthalten sind, sind in den SEQ-ID Nr. 51 und 50 gezeigt.

[0126] Version „e“ wurde unter Verwendung der Mutagenprimer ATP1 (SEQ-ID Nr. 52) und ATP2 (SEQ-ID Nr. 53), die so entworfen wurden, dass Alanin an der Position 40 durch Prolin ersetzt ist, und das Plasmid HEF-RVHd-gy1 als die Matrizen-DNA, um das Plasmid HEF-RVHe-gy1 zu gewinnen. Die Aminosäuresequenz und die Nucleotidsequenz der V-Region der H-Kette, die in diesem Plasmid HEF-RVHe-gy1 enthalten sind, sind in den SEQ-ID Nr. 55 und 54 gezeigt.

[0127] Version „f“ wurde unter Verwendung der Mutagenprimer GTA1 (SEQ-ID Nr. 56) und GTA2 (SEQ-ID Nr. 57), die so entworfen wurden, dass Glycin an der Position 44 durch Alanin ersetzt ist, und das Plasmid HEF-RVHd-gy1 als die Matrizen-DNA, um das Plasmid HEF-RVHf-gy1 zu gewinnen. Die Aminosäuresequenz und die Nucleotidsequenz der V-Region der H-Kette, die in diesem Plasmid HEF-RVHf-gy1 enthalten sind, sind

in den SEQ-ID Nr. 59 und 58 gezeigt.

[0128] Version „g“ wurde unter Verwendung der Mutagenprimer LTF1 (SEQ-ID Nr. 61) und LTF2 (SEQ-ID Nr. 61), die so entworfen wurden, dass Leucin an der Position 67 durch Phenylalanin ersetzt ist, und das Plasmid HEF-RVHd-gy1 als die Matrizen-DNA, um das Plasmid HEF-RVHg-gy1 zu gewinnen. Die Aminosäuresequenz und die Nucleotidsequenz der V-Region der H-Kette, die in diesem Plasmid HEF-RVHg-gy1 enthalten sind, sind in den SEQ-ID Nr. 63 und 62 gezeigt.

[0129] Version „h“ wurde unter Verwendung der Mutagenprimer LTF1 und LTF2 und Plasmid HEF-RVHb-gy1 als die Matrizen-DNA, um das Plasmid HEF-RVHh-gy1 zu gewinnen. Die Aminosäuresequenz und die Nucleotidsequenz der V-Region der H-Kette, die in diesem Plasmid HEF-RVHh-gy1 enthalten sind, sind in den SEQ-ID Nr. 65 und 64 gezeigt.

Herstellung der L-Ketten V-Region des umgeformten menschlichen WS-4-Antikörpers

[0130] DNA, die für die V-Region der L-Kette des umgeformten menschlichen WS-4-Antikörpers kodiert, wurde in der unten beschriebenen Weise entworfen. Vollständige DNA, die die V-Region der L-Kette des umgeformten menschlichen WS-4-Antikörpers kodiert, wurde so entworfen, dass eine DNA-Sequenz, die für den FR des menschlichen Antikörpers RE1 kodiert, mit der DNA-Sequenz verbunden wird, die für den CDR der V-Region der L-Kette des Maus-WS-4-Antikörpers kodiert.

[0131] Als nächstes wurden jeweils eine HindIII-Erkennungsschnittstelle/Kozak Konsensus-Sequenz und BamHI-Erkennungsschnittstelle/Splice Donor-Sequenz an die 5'- und 3'-Enden dieser DNA-Sequenz angehängt, um ihr so zu ermöglichen, dass sie in einen HEF-Expressionsvektor eingeschleust wird. Die DNA-Sequenz, die auf diese Weise entworfen wurde, wurde dann in vier ungefähr gleiche Oligonucleotide aufgeteilt, worauf die Sekundärstruktur dieser Oligonucleotide, bei denen die Möglichkeit besteht, dass sie den Zusammenbau dieser Oligonucleotide behindern, mit einem Computer analysiert wurde.

[0132] Die vier Oligonucleotidsequenzen sind in SEQ-ID Nr. 66 bis 69 gezeigt. Diese Oligonucleotide haben Längen von 106 bis 124 Basen, und die benachbarten Oligonucleotide haben eine überlappende Region, die im Wesentlichen aus 19 bis 23 Basen besteht. LF1 (SEQ-ID Nr. 66) und LF3 (SEQ-ID Nr. 68) dieser vier Oligonucleotide haben eine Sense-DNA-Sequenz, während die anderen LF2 (SEQ-ID Nr. 67) und LF4 (SEQ-ID Nr. 69) eine Antisense-DNA-Sequenz haben. Diese Oligonucleotide wurden unter Verwendung des gleichen Verfahrens synthetisiert, das für die oben erwähnten HF1 bis HF4 benutzt wurde.

[0133] Zum Zusammenbau wurden nach anfänglichem Denaturieren für 3 Minuten bei 94°C 98 µl einer PCR-Mischung, die 100 ng jedes der vier Arten der Nucleotide und 5 U Ampli Taq enthält, wurde die Mischung für zwei Zyklen inkubiert, wobei jeder Zyklus aus einer Inkubation für 2 Minuten bei 94°C, 2 Minuten bei 55°C und 2 Minuten bei 72°C besteht. Nach dem Zugeben von 100 pM von dem RVL5'-Primer (SEQ-ID Nr. 70) und dem RVL3'-Primer (SEQ-ID Nr. 71) als externem Primer wurde die PCR-Reaktionsmischung mit 50 µl Mineralöl bedeckt. Nach anfänglichem Denaturieren für 3 Minuten bei 94°C wurde die Reaktionslösung für 30 Zyklen aus 1 Minute bei 94°C, 1 Minute bei 55°C und 1 Minute bei 72°C unterworfen, schließlich gefolgt von einer Inkubation für 10 Minuten bei 72°C (siehe **Fig. 3**).

[0134] Ein DNA-Fragment, das ungefähr 400 Basenpaare enthält, wurde unter Verwendung von einem 1,5 %igen niedrigschmelzenden Agarosegel gereinigt, mit HindIII und BamHI verdaut und in den HEF-Expressionsvektor HEF-VL-gk (**Fig. 1**) kloniert. Nach dem Bestimmen der DNA-Sequenz unter Verwendung des EF-1-Primers (SEQ-ID Nr. 78) und des KIP-Primers (SEQ-ID Nr. 80) wurde das Plasmid, das ein DNA-Fragment enthält, welches für die korrekte Aminosäuresequenz der V-Region der L-Kette kodiert, als HEF-RVLa-gk bezeichnet. Die Aminosäuresequenz bzw. die Nucleotidsequenz der V-Region der L-Kette, die in diesem Plasmid HEF-RVLa-gk enthalten sind, sind in SEQ-ID Nr. 73 und 72 gezeigt.

[0135] Version „b“ (RVLb) wurde mittels PCR unter Verwendung der Mutagenprimer FTY1 (SEQ-ID Nr. 74) und FTY2 (SEQ-ID Nr. 75) amplifiziert, die so entworfen wurden, dass Phenylalanin an der Position 71 durch Tyrosin ersetzt wurde, RVL5' (SEQ-ID Nr. 70) und RVL3' (SEQ-ID Nr. 71) als Primer, die beide Enden definieren, das Plasmid HEF-RVLa-gk als Matrizen-DNA, um das Plasmid HEF-RVLb-gk zu erhalten. Die Aminosäuresequenz bzw. die Nucleotidsequenz der V-Region der L-Kette, die in diesem Plasmid HEF-RVLb-gk enthalten ist, wird in den SEQ-ID Nr. 77 und 76 gezeigt.

[0136] Um die Antigen-Bindungsfähigkeit jeder Kette des umgeformten menschlichen WS-4-Antikörpers zu

untersuchen, wurden COS-Zellen zuerst gleichzeitig in der zuvor beschriebenen Weise, mit dem Expressionsvektor HEF-RVLa-gk für die Version „a“ der L-Kette des umgeformten menschlichen WS-4-Antikörpers, und dem Expressionsvektor HEF-chWS4H-gy1 für die H-Kette des chimären WS-4-Antikörpers transfiziert. Nach dem Einsammeln des Kulturmediums, wie oben beschrieben wurde, wurden die Menge des hergestellten Antikörpers und die Antigen-Bindungsfähigkeit der hergestellten Antikörper unter Verwendung des Verfahrens, das in dem Abschnitt über die ELISAs in obigem Beispiel 4 beschrieben worden ist, gemessen. Diese Ergebnisse sind in [Fig. 4](#) gezeigt. Wie in [Fig. 4](#) gezeigt wird, wurde bestätigt, dass es keinen Unterschied in der Antigen-Bindungsfähigkeit zwischen dem chimären Antikörper (chL/chH), der als Positivkontrolle verwendet wurde, und dem Antikörper gab, der aus einer umgeformten L-Kette und einer chimären H-Kette bestand (RVLa/chH).

[0137] Um zum gleichen Zeitpunkt die Kombination des Expressionsvektors HEF-chWS4L-gk der L-Kette des chimären WS-4-Antikörpers und die Version „a“ der H-Kette des umgeformten menschlichen WS-4-Antikörpers zu ermitteln, wurden beide gleichzeitig in COS-Zellen cotransfiziert, und die Menge des hergestellten Antikörpers und die Antigen-Bindungsfähigkeit wurden für den erhaltenen Antikörper unter Verwendung des Verfahrens, das in dem Abschnitt „ELISA“ im obigen Beispiel 4 beschrieben worden ist, gemessen. Antigenbindungs-fähigkeit wurde für diesen Antikörper (chL/RVHa) (siehe [Fig. 4](#)) nicht nachgewiesen.

[0138] Wie zuvor beschrieben worden ist, wurde die Untersuchung jeder Version aller umgeformten H-Ketten durch gleichzeitiges Transfizieren von COS-Zellen mit jeder Version der umgeformten H-Kette und der Version „a“ der L-Kette des umgeformten WS-4-Antikörpers (RVLa) durchgeführt, da die Version „a“ der L-Kette des umgeformten menschlichen WS-4-Antikörpers Antigen-Bindungsfähigkeit aufwies, die der L-Kette des chimären WS-4-Antikörpers entspricht.

[0139] Das Ergebnis war, dass die Antikörper, die die Version „b“, „d“, „e“, „f“, „g“ und „h“ der umgeformten H-Kette haben, eine Antigen-Bindungsfähigkeit aufwiesen, die mit der des chimären WS-4-Antikörpers (chL/chH) vergleichbar ist, welcher als Positivkontrolle verwendet wurde, was darauf hindeutete, dass diese Kombination eine funktionale Antigen-Bindungsstelle des menschlichen Antikörpers bildet. Jedoch werden bezüglich der Menge des Antikörpers, der hergestellt wurde, alle Versionen in geringeren Mengen hergestellt, als der WS-4-Antikörper (chL/chH), mit der Ausnahme der Version „g“ (RVHg). Außerdem wurde beim Antikörper mit der H-Kette Version „c“ keine Antigen-Bindungsfähigkeit beobachtet (siehe [Fig. 5](#)).

[0140] Auf Grundlage dieser Befunde wurde geschlussfolgert, dass der Antikörper mit der Version „a“ der L-Kette des umgeformten menschlichen WS-4-Antikörpers (RVLa) und der Version „g“ der H-Kette des umgeformten menschlichen WS-4-Antikörpers eine funktionale Antigen-Bindungsstelle bildet, die eine günstige Antigen-Bindungsfähigkeit aufweist, und dass die Menge des Antikörpers, der nach einer simultanen Transfektion in COS-Zellen hergestellt wird, vergleichbar ist mit dem chimären WS-4-Antikörper (chL/chH).

[0141] Als nächstes wurde eine Untersuchung der Version „b“ der L-Kette des umgeformten humanen WS-4-Antikörpers (RVLb) durch gleichzeitiges Transfizieren von COS-Zellen mit jeder Version der H-Kette und der Version „b“ der L-Kette des umgeformten menschlichen WS-4-Antikörpers (RVLb) durchgeführt. Das Ergebnis zeigte, dass nur der Antikörper mit der Version „g“ der H-Kette des umgeformten menschlichen WS-4-Antikörpers (RVLb/RVHg) einer Antigen-Bindungsfähigkeit aufwies, die mit der des chimären WS-4-Antikörpers (chL/chH) vergleichbar ist, der als Positivkontrolle verwendet wurde, und es wurde geschlussfolgert, dass diese Kombination eine funktionale Antigen-Bindungsstelle eines menschlichen Antikörpers bildet. Zusätzlich wurden bezüglich der Menge des hergestellten Antikörpers alle Versionen in geringeren Mengen als der chimäre WS-4-Antikörper (chL/chH) hergestellt, ausgenommen die Version „g“ (RVHg) (siehe [Fig. 6](#)).

[0142] Bei der oben erwähnten Untersuchung wurden die zwei Arten des umgeformten menschlichen Antikörpers (RVZa/RVHg und RVLb/RVHg), die eine Bindungsaktivität gegenüber IL-8 des Menschen und eine Produktionsmenge, die mit der des chimären WS-4-Antikörpers (chL/chH) vergleichbar ist, aufwiesen, jeweils mit einer Protein-A-Säule gereinigt, worauf die Bindungsaktivität genau untersucht wurde, indem das Verfahren verwendet wurde, das in dem Abschnitt über den ELISA in Beispiel 4 beschrieben ist. Das Ergebnis zeigte, dass der chimäre WS-4-Antikörper (chL/chH) RVLa/RVHg-Antikörper und RVLb/RVHg-Antikörper alle die gleichen Ausmaße an Bindungsfähigkeit aufwiesen (siehe [Fig. 7](#)).

[0143] Auf Grundlage dieser Befunde wurde geschlussfolgert, dass nach simultaner Transfection in COS-Zellen ein Antikörper entweder mit der Version „a“ (RVLa) oder Version „b“ (RVLb) der L-Kette des umgeformten menschlichen WS-4-Antikörpers und der Version „g“ (RVHg) der H-Kette des umgeformten menschlichen WS-4-Antikörpers eine funktionale Antigen-Bindungsstelle bildet, die eine günstige Antigen-Bindungsfähigkeit,

und eine Antikörper-Produktionsmenge aufweist, die dem des chimären WS-4-Antikörpers (chL/chH) vergleichbar ist, erhalten wurde.

[0144] Die inhibitorische Aktivität der IL-8-Bindung an IL-8-Rezeptoren des umgeformten menschlichen Antikörpers, der aus der Version „a“ (RVLa) der H-Kette und der Version „g“ (RVLg) der H-Kette des umgeformten menschlichen WS-4-Antikörpers oder der Version „b“ (RVLb) der L-Kette und der Version „g“ (RVHg) der H-Kette bestand, wurde durch einen Liganden-Rezeptor-Bindungsinhibitions-Assay untersucht.

[0145] Ungefähr 100 µl einer heparinisierten Blutprobe normaler Individuen wurde in 35 ml Aliquots auf 15 ml Mono-Poly-Trennlösung (ICN Biomedicals) geschichtet, und die Schicht mit den menschlichen Neutrophilen wurde durch Zentrifugieren gemäß den beigefügten Instruktionen isoliert. Nach dem Waschen dieser Zellen mit RPMI-1640 Medium, enthaltend 1 % BSA, wurde die kontaminierenden Erythrozyten durch 150 mM Ammoniumchloridlösung entfernt. Nach dem Zentrifugieren wurden die Zellen mit RPMI-1640 Medium, enthaltend 1 % BSA, gewaschen, und in einer Konzentration von 2×10^7 Zellen/ml resuspendiert. Der Neutrophilen-Gehalt in dieser Zellsuspension nach einer Messung nach der Färbung der Schmierproben, die unter Verwendung einer Cytospin (Shandon) mit Diff-Quik stain (Green Cross) hergestellt worden sind, betrug 95 % oder mehr.

[0146] Die oben erwähnte Neutrophilen-Suspension wurde zentrifugiert und in einer Konzentration von 2×10^7 Zellen/ml mit Bindungspuffer (auf D-PBS enthaltend 1 % BSA und 0,1 % Natriumazid) resuspendiert. Zu diesem Zeitpunkt wurden der chimäre SK2 Antikörper mit einem Fc-Teil, der mit dem menschlichen Antikörper der vorliegenden Erfindung (siehe Internationale Patentanmeldung Nr. PCT/JP94/00859) identisch ist und dessen Antigen, menschliches IL-6, in Konzentrationen von ungefähr 50 µg/ml bzw. 40 ng/ml zugegeben, und zum Zweck einer Varsättigung der Fc-Rezeptoren auf den Neutrophilen inkubiert für 30 Minuten in einem Eisbad.

[0147] IL-8, welches radioaktiv mit 125 I markiert ist (74 TBq/mmol, Amersham) und nicht-markiertes IL-8 (Amersham) wurden durch Mischen in Bindungspuffer auf Konzentrationen von jeweils 4 ng/ml hergestellt. Der chimäre WS-4-Antikörper (chL/chH), der umgeformte menschliche Antikörper (RVLa/RVHg und RVLb/RVHg), der Negativ-Kontroll-Antikörper des Menschen (PAESEL + LOREI) oder die Positiv-Kontroll-Antikörper-Maus WS-4 wurden jeweils mit Bindungspuffern in Konzentrationen zwischen 2.000 ng/ml und ungefähr 8 ng/ml in schrittweisen 2-fach-Verdünnungen verdünnt. 50 µl der IL-8-Lösung und 50 µl jeder der Antikörper-Lösungen wurden für 30 Minuten in einem Eisbad inkubiert. Als nächstes wurden 100 µl der oben erwähnten Neutrophilen-Suspension hinzugegeben und eine Inkubation wurde für 1 Stunde unter Mischen nach jeweils 15 Minuten fortgesetzt. Nach der Inkubation wurde die Zellsuspension auf 200 µl einer 20 %igen Saccharoselösung geschichtet, gefolgt vom Zentrifugieren und Einfrieren. Um das IL-8 zu messen, das an die Zellen gebunden war, wurde das Zellsediment abgetrennt, und die Radioaktivität wurde mit einem Gamma-Strahlengerät (Aroka) gemessen. Die Ergebnisse sind in [Fig. 8](#) gezeigt.

[0148] Antikörper mit der Version „a“ der L-Kette (RVLa) und der Version „g“ der H-Kette (RVHg) des umgeformten menschlichen WS-4-Antikörpers oder der Version „b“ dieser L-Kette und der Version „g“ dieser H-Kette zeigten klar, dass sie eine Bindungs-inhibierende Wirkung haben, die mit der des chimären Antikörpers (chL/chH) bezüglich der Bindung von IL-8 an die IL-8-Rezeptoren vergleichbar ist.

[0149] Des Weiteren wurden Escherichia coli mit dem oben erwähnten Plasmid HEF-RVLa-gk als Escherichia coli DH5α (HEF-RVLa-gk) hinterlegt, und Escherichia coli, die das Plasmid HEF-RVHg-gy1 enthalten, wurden als Escherichia coli JM109 (HEF-RVHg-gy1) beim Bioengineering Industrial Technology Research Institute der Agency of Industrial Science and Technology (1-1-3 Higashi, Tsukuba, Ibaraki, Japan) am 12. Juli 1994 unter den Namen FERM BP-4738 bzw. FERM BP-4741 auf Grundlage der Vorschriften des Budapester Vertrags hinterlegt.

Referenzbeispiel 1: Herstellen des Hybridoms WS-4

[0150] Ein Hybridom, das einen monoklonalen Antikörper gegen menschliches IL-8 produziert, wurde durch Fusionieren von Milzzellen von BALB/c-Mäusen, die mit menschlichem IL-8 immunisiert worden sind, und Maus-Myelomzellen P3×63-Ag8.653 gemäß Routineverfahren unter Verwendung von Polyethylenglycol hergestellt. Die Durchmusterung wurde unter Verwendung der Aktivität der Bindung mit menschlichem IL-8 als Kriterium durchgeführt, um das Hybridom WS-4 herzustellen (Ko, Y. C. et al., J. Immunol. Methods, 149, 227-235, 1992).

[0151] Liste der Microorganismen, die nach den Voraussetzungen des Artikels 13 bis des Patent-Zusammenarbeitsvertrages, Internationale Hinterlegungsstelle, hinterlegt sind:

[0152] Name: National Institute of Bioscience and Human-Technology Agency of Industrial Science and Technology
Adresse: 1-3 Higashi 1-chome, Tsukuba, Ibaraki, Japan

Hinterlegungsnummern und Hinterlegungsdaten:

- (1) Escherichia coli DH5 α (HEF-RVLa-gk)
Hinterlegungs-Nr. FERM BP-4738
Hinterlegungs-Datum 12. Juli 1994
- (2) Escherichia coli DH5 α (HEF-chWS4L-gk)
Hinterlegungs-Nr. FERM BP-4739
Hinterlegungs-Datum 12. Juli 1994
- (3) Escherichia coli JM109 (HEF-chWS4H-g γ 1)
Hinterlegungs-Nr. FERM BP-4740
Hinterlegungs-Datum 12. Juli 1994
- (4) Escherichia coli JM109 (HEF-RVHg-g γ 1)
Hinterlegungs-Nr. FERM BP-4741
Hinterlegungs-Datum 12. Juli 1994

SEQUENZLISTE

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER

- (A) NAME: CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA
- (B) STRASSE: 5-1, UKIMA 5-CHOME
- (C) ORT: KITA-KU
- (E) LAND: JAPAN
- (F) POSTLEITZAHL: 115/JP

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Rekonstituierter menschlicher Antikörper gegen menschliches Interleukin-8

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 80

(iv) COMPUTERLESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Diskette
- (B) COMPUTER: IBM-PC-kompatibel
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Ausgabe #1.0, Version #1.30

(EPO)

(v) DATEN DER VORLIEGENDEN ANMELDUNG:
ANMELDUNG Nr.: EP 95 925 116.6

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 1

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 40 Basenpaare
- (B) ART: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: einzeln
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: andere Nucleinsäure

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 1:

ACTAGTCGAC ATGAAGTTGC CTGTTAGGCT GTTGGTGCTG

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 2

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 37 Basenpaare
- (B) ART: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: einzeln
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: andere Nucleinsäure

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 2:

ACTAGTCGAC ATGGAGCAGA CACACTCCTG TATGGGT

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 3

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 40 Basenpaare
- (B) ART: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: einzeln
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: andere Nucleinsäure

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 3:

ACTAGTCGAC ATGAGTGTGC TCACTCAGGT CCTGGSGTTG

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 4

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 43 Basenpaare
- (B) ART: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: einzeln
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: andere Nucleinsäure

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 4:

ACTAGTCGAC ATGAGGRCCC CTGCTCAGWT TYTTGGMWTC TTG

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 5

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 40 Basenpaare
- (B) ART: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: einzeln
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: andere Nucleinsäure

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 5:

ACTAGTCGAC ATGGATTTWC AGGTGCAGAT TWTCAGCTTC

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 6

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 37 Basenpaare
- (B) ART: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: einzeln
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: andere Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = „synthetische DNA“

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 6:

ACTAGTCGAC ATGAGGTKCY YTGYSAGYT YCTGRGG

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 7

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 41 Basenpaare
- (B) ART: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: einzeln
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: andere Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = „synthetische DNA“

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 7:

ACTAGTCGAC ATGGGCWTCA AGATGGAGTC ACAKWYYCWG G

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 8

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 41 Basenpaare
- (B) ART: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: einzeln
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: andere Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = „synthetische DNA“

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 8:

ACTAGTCGAC ATGTGGGGAY CTKTTTTYCM TTTTCAATT G

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 9

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 35 Basenpaare
- (B) ART: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: einzeln
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: andere Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = „synthetische DNA“

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 9:

ACTAGTCGAC ATGGTRTCCW CASCTCAGTT CCTTG

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 10

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 37 Basenpaare
- (B) ART: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: einzeln
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: andere Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = „synthetische DNA“

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 10:

ACTAGTCGAC ATGTATATAT GTTTGTGTC TATTTCT

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 11

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 38 Basenpaare

(B) ART: Nucleinsäure

(C) STRANGFORM: einzeln

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: andere Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = „synthetische DNA“

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 11:

ACTAGTCGAC ATGGAAGCCC CAGCTCAGCT TCTCTTCC

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 12

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 27 Basenpaare

(B) ART: Nucleinsäure

(C) STRANGFORM: einzeln

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: andere Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = „synthetische DNA“

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 12:

GGATCCCGGG TGGATGGTGG GAAGATG

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 13

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 37 Basenpaare

(B) ART: Nucleinsäure

(C) STRANGFORM: einzeln

(D) TOPOLOGIE: linear

- (ii) ART DES MOLEKÜLS: andere Nucleinsäure
 - (A) BESCHREIBUNG: /desc = „synthetische DNA“

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 13:
ACTAGTCGAC ATGAAATGCA GCTGGGTCAT STTCTTC

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 14

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 36 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleinsäure
 - (C) STRANGFORM: einzeln
 - (D) TOPOLOGIE: linear

- (ii) ART DES MOLEKÜLS: andere Nucleinsäure
 - (A) BESCHREIBUNG: /desc = „synthetische DNA“

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 14:
ACTAGTCGAC ATGGGATGGA GCTRTATCAT SYTCTT

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 15

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 37 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleinsäure
 - (C) STRANGFORM: einzeln
 - (D) TOPOLOGIE: linear

- (ii) ART DES MOLEKÜLS: andere Nucleinsäure
 - (A) BESCHREIBUNG: /desc = „synthetische DNA“

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 15:
ACTAGTCGAC ATGAAGWTGT GGTAAACTG GGTTTTT

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 16

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 35 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleinsäure

(C) STRANGFORM: einzeln

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: andere Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = „synthetische DNA“

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 16:

ACTAGTCGAC ATGRACCTTG GGYTCAGCTT GRTTT

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 17

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 40 Basenpaare

(B) ART: Nucleinsäure

(C) STRANGFORM: einzeln

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: andere Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = „synthetische DNA“

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 17:

ACTAGTCGAC ATGGACTCCA GGCTCAATTT AGTTTTTCCTT

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 18

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 37 Basenpaare

(B) ART: Nucleinsäure

(C) STRANGFORM: einzeln

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: andere Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = „synthetische DNA“

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 18:

ACTAGTCGAC ATGGCTGTCY TRGSGCTRCT CTTCTGC

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 19

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 36 Basenpaare
- (B) ART: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: einzeln
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: andere Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = „synthetische DNA“

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 19:

ACTAGTCGAC ATGGRATGGA GCKGGRTCTT TMTCTT

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 20

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 33 Basenpaare
- (B) ART: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: einzeln
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: andere Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = „synthetische DNA“

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 20:

ACTAGTCGAC ATGAGAGTGC TGATTCTTTT GTG

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 21

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 40 Basenpaare
- (B) ART: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: einzeln
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: andere Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = „synthetische DNA“

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 21:

ACTAGTCGAC ATGGMTTGGG TGTGGAMCTT GCTATTCCTG

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 22

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 37 Basenpaare
- (B) ART: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: einzeln
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: andere Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = „synthetische DNA“

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 22:

ACTAGTCGAC ATGGGCAGAC TTACATTCTC ATTCCTG

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 23

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 38 Basenpaare
- (B) ART: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: einzeln
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: andere Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = „synthetische DNA“

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 23:

ACTAGTCGAC ATGGATTTTG GGCTGATTTT TTTTATTG

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 24

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 37 Basenpaare
- (B) ART: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: einzeln
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: andere Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = „synthetische DNA“

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 24:

ACTAGTCGAC ATGATGGTGT TAAGTCTTCT GTACCTG

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 25

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 28 Basenpaare
- (B) ART: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: einzeln
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: andere Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = „synthetische DNA“

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 25:

GGATCCCGGG CCAGTGGATA GACAGATG

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 26

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 382 Basenpaare
- (B) ART: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: doppelt
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Maus

(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:

- (B) CLON: pUC-WS4-VL

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: mat_peptide
- (B) LAGE: 61..382

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: sig_peptide
- (B) LAGE: 1..60

(D) SONSTIGE ANGABEN: /note = „Mat peptide“

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS

(B) LÄNGE: 1..382

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 26:

ATG	AGT	GTG	CTC	ACT	CAG	GTC	CTG	GGG	TTG	CTG	CTG	CTG	TGG	CTT	ACA	48
Met	Ser	Val	Leu	Thr	Gln	Val	Leu	Gly	Leu	Leu	Leu	Leu	Trp	Leu	Thr	
-20					-15				-10						-5	
GGT	GCC	AGA	TGT	GAC	ATC	CAG	ATG	ACT	CAG	TCT	CCA	GCC	TCC	CTA	TCT	96
Gly	Ala	Arg	Cys	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ser	Leu	Ser	
				1				5					10			
GCA	TCT	GTG	GGA	GAA	ACT	GTC	ACC	ATC	ACA	TGT	CGA	GCA	AGT	GAG	ATT	144
Ala	Ser	Val	Gly	Glu	Thr	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Glu	Ile	
		15					20					25				
ATT	TAC	AGT	TAT	TTA	GCA	TGG	TAT	CAG	CAG	AAA	CAG	GGA	AAA	TCT	CCT	192
Ile	Tyr	Ser	Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Gln	Gly	Lys	Ser	Pro	
	30					35					40					
CAG	CTC	CTG	GTC	TAT	AAT	GCA	AAA	ACC	TTA	GCA	GAT	GGT	GTG	TCA	TCA	240
Gln	Leu	Leu	Val	Tyr	Asn	Ala	Lys	Thr	Leu	Ala	Asp	Gly	Val	Ser	Ser	
45					50					55					60	
AGG	TTC	AGT	GGC	AGT	GGA	TCA	GGC	ACA	CAG	TTT	TCT	CTG	CGG	ATC	AGC	288
Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Gln	Phe	Ser	Leu	Arg	Ile	Ser	
				65					70					75		
AGC	CTG	CAG	CCT	GAA	GAT	TTT	GGG	AGT	TAT	TAC	TGT	CAA	CAT	CAT	TTT	336
Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Gly	Ser	Tyr	Tyr	Cys	Gln	His	His	Phe	
			80					85					90			
GGT	TTT	CCT	CGG	ACG	TTC	GGT	GGA	GGC	ACC	AAG	CTG	GAA	CTC	AAA	C	382
Gly	Phe	Pro	Arg	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Leu	Lys		
		95					100					105				

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 27

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 127 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 27:

```

Met Ser Val Leu Thr Gln Val Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr
-20                               -15                -10                -5

Gly Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser
                               1                   5                   10

Ala Ser Val Gly Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ile
                               15                   20                   25

Ile Tyr Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro
                               30                   35                   40

Gln Leu Leu Val Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Ala Asp Gly Val Ser Ser
                               45                   50                   55                   60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Arg Ile Ser
                               65                   70                   75

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His His Phe
                               80                   85                   90

Gly Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
                               95                   100                  105
    
```

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 28

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 424 Basenpaare
- (B) ART: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: doppelt
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: andere Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = „synthetische DNA“

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Maus

(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:

- (B) CLON: pUC-WS4-VH

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: sig_peptide

(B) LAGE: 1..57

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: mat_peptide

(B) LAGE: 58..424

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS

(B) LAGE: 1..424

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 28:

ATG AAG TTG TGG TTA AAC TGG GTT TTT CTT GTG ACA CTT TTA AAT GGT	48
Met Lys Leu Trp Leu Asn Trp Val Phe Leu Val Thr Leu Leu Asn Gly	
-19 -15 -10 -5	
ATC CAG TGT GAG GTG AAA CTG GTG GAG TCT GGA GGA GGC TTG ATA CAG	96
Ile Gln Cys Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Ile Gln	
1 5 10	
CCT GGG GAT TCT CTG AGA CTC TCC TGT GTA ACC TCT GGG TTC ACC TTC	144
Pro Gly Asp Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Thr Ser Gly Phe Thr Phe	
15 20 25	
AGT GAT TAC TAC CTG AGC TGG GTC CGC CAG CCT CCA GGA AAG GCA CTT	192
Ser Asp Tyr Tyr Leu Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu	
30 35 40 45	
GAG TGG GTG GGT CTC ATT AGA AAC AAA GCC AAT GGT TAC ACA AGA GAG	240
Glu Trp Val Gly Leu Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Arg Glu	
50 55 60	
TAC AGT GCA TCT GTG AAG GGT CGG TTC ACC ATC TCC AGA GAT GAT TCC	288
Tyr Ser Ala Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser	
65 70 75	
CAA AGC ATC CTC TAT CTT CAA ATG AAC ACC CTG AGA GGT GAG GAC AGT	336
Gln Ser Ile Leu Tyr Leu Gln Met Asn Thr Leu Arg Gly Glu Asp Ser	
80 85 90	
GCC ACT TAT TAC TGT GCA CGA GAG AAC TAT AGG TAC GAC GTA GAG CTT	384
Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Asn Tyr Arg Tyr Asp Val Glu Leu	
95 100 105	
GCT TAC TGG GGC CAA GGG ACT CTG GTC ACT GTC TCT GCA G	424
Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala	
110 115 120	

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 29

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 141 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 29:

Met	Lys	Leu	Trp	Leu	Asn	Trp	Val	Phe	Leu	Val	Thr	Leu	Leu	Asn	Gly
-19				-15					-10					-5	
Ile	Gln	Cys	Glu	Val	Lys	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Ile	Gln
			1				5					10			
Pro	Gly	Asp	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Val	Thr	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe
	15					20					25				
Ser	Asp	Tyr	Tyr	Leu	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Ala	Leu
30					35					40					45
Glu	Trp	Val	Gly	Leu	Ile	Arg	Asn	Lys	Ala	Asn	Gly	Tyr	Thr	Arg	Glu
				50					55					60	
Tyr	Ser	Ala	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asp	Ser
			65					70					75		
Gln	Ser	Ile	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Thr	Leu	Arg	Gly	Glu	Asp	Ser
		80					85					90			
Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Glu	Asn	Tyr	Arg	Tyr	Asp	Val	Glu	Leu
	95					100					105				
Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ala			
110					115					120					

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 30

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 34 Basenpaare
- (B) ART: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: einzeln
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: andere Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = „synthetische DNA“

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 30:

ACAAAGCTTC CACCATGAGT GTGCTCACTC AGGT

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 31

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 37 Basenpaare
- (B) ART: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: einzeln
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: andere Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = „synthetische DNA“

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 31:

GATAAGCTTC CACCATGAAG TTGTGGTTAA ACTGGGT

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 32

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 37 Basenpaare
- (B) ART: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: einzeln
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: andere Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = „synthetische DNA“

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 32:

CTTGGATCCA CTCACGTTTG AGTTCCAGCT TGGTGCC

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 33

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 37 Basenpaare
- (B) ART: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: einzeln
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: andere Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = „synthetische DNA“

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 33:

GTCGGATCCA CTCACCTGCA GAGACAGTGA CCAGAGT

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 34

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 137 Basenpaare
- (B) ART: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: einzeln
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: andere Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = „synthetische DNA“

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 34:

```
TAAGCTTCCA CCATGGAGTT TGGGCTGAGC TGGGTTTTC TGTGCTAT TTTAAAGGGT      60
GTCCAGTGTG AAGTGCAGCT GTTGGAGTCT GGGGGAGGCT TGGTCCAGCC TGGGGGTTCT      120
CTGAGACTCT CATGTGC                                                    137
```

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 35

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 143 Basenpaare
- (B) ART: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: einzeln
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: andere Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = „synthetische DNA“

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 35:

```
GCACTGTACT CTCTTGTGTA ACCATTGGCT TTGTTTCTAA TGAGACCCAC CAACTCTAGC      60
CCTTTCCCTT GAGCTTGGCG GACCCAGCTC AGGTAGTAAT CACTGAAGGT GAATCCAGAG      120
GCAGCACATG AGAGTCTCAG AGA                                                    143
```

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 36

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 113 Basenpaare

- (B) ART: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: einzeln
- (D) TOPOLOGIE: linear

- (ii) ART DES MOLEKÜLS: andere Nucleinsäure
 - (A) BESCHREIBUNG: /desc = „synthetische DNA“

- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 36:

```
TACACAAGAG AGTACAGTGC ATCTGTGAAG GGCAGACTTA CCATCTCAAG AGAAGATTCA      60
AAGAACACGC TGTATCTGCA AATGAGCAGC CTGAAAACCG AAGACTTGGC CGT          113
```

- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 37

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 117 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleinsäure
 - (C) STRANGFORM: einzeln
 - (D) TOPOLOGIE: linear

- (ii) ART DES MOLEKÜLS: andere Nucleinsäure
 - (A) BESCHREIBUNG: /desc = „synthetische DNA“

- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 37:

```
TCGGATCCAC TCACCTGAGG AGACGGTGAC CAGGGTTCCT TGGCCCCAGT AAGCAAGCTC      60
TACGTCGTAG CGATAGTTCT CTCTAGCACA GTAATACAGC GCCAAGTCTT CGGTTTT          117
```

- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 38

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 37 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleinsäure
 - (C) STRANGFORM: einzeln
 - (D) TOPOLOGIE: linear

- (ii) ART DES MOLEKÜLS: andere Nucleinsäure
 - (A) BESCHREIBUNG: /desc = „synthetische DNA“

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 38:

GATAAGCTTC CACCATGGAG TTTGGGCTGA GCTGGGT

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 39

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 31 Basenpaare
- (B) ART: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: einzeln
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: andere Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = „synthetische DNA“

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 39:

GTCGGATCCA CTCACCTGAG GAGACGGTGA C

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 40

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 424 Basenpaare
- (B) ART: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: doppelt
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: andere Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = „synthetische DNA“

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Maus und Mensch

(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:

- (B) CLON: HEF-RVHa-gyl

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE: 1..424

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 40:

ATG GAG TTT GGG CTG AGC TGG GTT TTC CTT GTT GCT ATT TTA AAG GGT	48
Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly	
125 130 135	
GTC CAG TGT GAA GTG CAG CTG TTG GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTC CAG	96
Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln	
140 145 150	
CCT GGG GGT TCT CTG AGA CTC TCA TGT GCT GCC TCT GGA TTC ACC TTC	144
Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe	
155 160 165 170	
AGT GAT TAC TAC CTG AGC TGG GTC CGC CAA GCT CAA GGG AAA GGG CTA	192
Ser Asp Tyr Tyr Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Gln Gly Lys Gly Leu	
175 180 185	
GAG TTG GTG GGT CTC ATT AGA AAC AAA GCC AAT GGT TAC ACA AGA GAG	240
Glu Leu Val Gly Leu Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Arg Glu	
190 195 200	
TAC AGT GCA TCT GTG AAG GGC AGA CTT ACC ATC TCA AGA GAA GAT TCA	288
Tyr Ser Ala Ser Val Lys Gly Arg Leu Thr Ile Ser Arg Glu Asp Ser	
205 210 215	
AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AGC AGC CTG AAA ACC GAA GAC TTG	336
Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Thr Glu Asp Leu	
220 225 230	
GCC GTG TAT TAC TGT GCT AGA GAG AAC TAT CGC TAC GAC GTA GAG CTT	384
Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Asn Tyr Arg Tyr Asp Val Glu Leu	
235 240 245 250	
GCT TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA G	424
Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	
255 260	

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 41

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 141 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 41:

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

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 42

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 34 Basenpaare
- (B) ART: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: einzeln
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: andere Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = „synthetische DNA“

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 42:

GGCTAGAGTG GGTGGGTCTC ATTAGAAACA AAGC

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 43

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 36 Basenpaare
- (B) ART: Nucleinsäure

(C) STRANGFORM: einzeln

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: andere Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = „synthetische DNA“

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 43:

GAGACCCACC CACTCTAGCC CTTTCCCTTG AGCTTG

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 44

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 424 Basenpaare

(B) ART: Nucleinsäure

(C) STRANGFORM: doppelt

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: andere Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = „synthetische DNA“

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Maus und Mensch

(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:

(B) CLON: HEF-RVHb-gyl

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS

(B) LAGE: 1..424

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 44:

ATG GAG TTT GGG CTG AGC TGG GTT TTC CTT GTT GCT ATT TTA AAG GGT	48
Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly	
145 150 155	
GTC CAG TGT GAA GTG CAG CTG TTG GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTC CAG	96
Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln	
160 165 170	
CCT GGG GGT TCT CTG AGA CTC TCA TGT GCT GCC TCT GGA TTC ACC TTC	144
Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe	
175 180 185	
AGT GAT TAC TAC CTG AGC TGG GTC CGC CAA GCT CAA GGG AAA GGG CTA	192
Ser Asp Tyr Tyr Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Gln Gly Lys Gly Leu	
190 195 200 205	
GAG TGG GTG GGT CTC ATT AGA AAC AAA GCC AAT GGT TAC ACA AGA GAG	240
Glu Trp Val Gly Leu Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Arg Glu	
210 215 220	
TAC AGT GCA TCT GTG AAG GGC AGA CTT ACC ATC TCA AGA GAA GAT TCA	288
Tyr Ser Ala Ser Val Lys Gly Arg Leu Thr Ile Ser Arg Glu Asp Ser	
225 230 235	
AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AGC AGC CTG AAA ACC GAA GAC TTG	336
Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Thr Glu Asp Leu	
240 245 250	
GCC GTG TAT TAC TGT GCT AGA GAG AAC TAT CGC TAC GAC GTA GAG CTT	384
Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Asn Tyr Arg Tyr Asp Val Glu Leu	
255 260 265	
GCT TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA G	424
Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	
270 275 280	

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 45

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 141 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 45:

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

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 46

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 32 Basenpaare
- (B) ART: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: einzeln
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: andere Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = „synthetische DNA“

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 46:

TGGGTCCGCC AAGCTCCAGG GAAAGGGCTA GA

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 47

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 32 Basenpaare
- (B) ART: Nucleinsäure

(C) STRANGFORM: einzeln

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: andere Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = „synthetische DNA“

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 47:

TCTAGCCCTT TCCCTGGAGC TTGGCGGACC CA

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 48

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 424 Basenpaare

(B) ART: Nucleinsäure

(C) STRANGFORM: doppelt

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: andere Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = „synthetische DNA“

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Maus und Mensch

(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:

(B) CLON: HEF-RVHc-gyl

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS

(B) LAGE: 1..424

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 48:

ATG GAG TTT GGG CTG AGC TGG GTT TTC CTT GTT GCT ATT TTA AAG GGT	48
Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly	
145 150 155	
GTC CAG TGT GAA GTG CAG CTG TTG GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTC CAG	96
Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln	
160 165 170	
CCT GGG GGT TCT CTG AGA CTC TCA TGT GCT GCC TCT GGA TTC ACC TTC	144
Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe	
175 180 185	
AGT GAT TAC TAC CTG AGC TGG GTC CGC CAA GCT CCA GGG AAA GGG CTA	192
Ser Asp Tyr Tyr Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu	
190 195 200 205	
GAG TTG GTG GGT CTC ATT AGA AAC AAA GCC AAT GGT TAC ACA AGA GAG	240
Glu Leu Val Gly Leu Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Arg Glu	
210 215 220	
TAC AGT GCA TCT GTG AAG GGC AGA CTT ACC ATC TCA AGA GAA GAT TCA	288
Tyr Ser Ala Ser Val Lys Gly Arg Leu Thr Ile Ser Arg Glu Asp Ser	
225 230 235	
AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AGC AGC CTG AAA ACC GAA GAC TTG	336
Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Thr Glu Asp Leu	
240 245 250	
GCC GTG TAT TAC TGT GCT AGA GAG AAC TAT CGC TAC GAC GTA GAG CTT	384
Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Asn Tyr Arg Tyr Asp Val Glu Leu	
255 260 265	
GCT TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA G	424
Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	
270 275 280	

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 49

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 141 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 49:

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

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 50

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 424 Basenpaare
- (B) ART: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: doppelt
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: andere Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = „synthetische DNA“

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Maus und Mensch

(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:

- (B) CLON: HEF-RVHd-gyl

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS

(B) LAGE: 1..424

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 50:

ATG GAG TTT GGG CTG AGC TGG GTT TTC CTT GTT GCT ATT TTA AAG GGT	48
Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly	
145 150 155	
GTC CAG TGT GAA GTG CAG CTG TTG GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTC CAG	96
Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln	
160 165 170	
CCT GGG GGT TCT CTG AGA CTC TCA TGT GCT GCC TCT GGA TTC ACC TTC	144
Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe	
175 180 185	
AGT GAT TAC TAC CTG AGC TGG GTC CGC CAA GCT CCA GGG AAA GGG CTA	192
Ser Asp Tyr Tyr Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu	
190 195 200 205	
GAG TGG GTG GGT CTC ATT AGA AAC AAA GCC AAT GGT TAC ACA AGA GAG	240
Glu Trp Val Gly Leu Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Arg Glu	
210 215 220	
TAC AGT GCA TCT GTG AAG GGC AGA CTT ACC ATC TCA AGA GAA GAT TCA	288
Tyr Ser Ala Ser Val Lys Gly Arg Leu Thr Ile Ser Arg Glu Asp Ser	
225 230 235	
AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AGC AGC CTG AAA ACC GAA GAC TTG	336
Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Thr Glu Asp Leu	
240 245 250	
GCC GTG TAT TAC TGT GCT AGA GAG AAC TAT CGC TAC GAC GTA GAG CTT	384
Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Asn Tyr Arg Tyr Asp Val Glu Leu	
255 260 265	
GCT TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA G	424
Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	
270 275 280	

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 51

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 141 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 51:

```

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

```

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 52

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 26 Basenpaare
- (B) ART: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: einzeln
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: andere Nucleinsäure

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 52:

TGGGTCCGCC AACCTCCAGG GAAAGG

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 53

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 26 Basenpaare
- (B) ART: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: einzeln
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: andere Nucleinsäure

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 53:

CCTTTCCTG GAGGTTGGCG GACCCA

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 54

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 424 Basenpaare
- (B) ART: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: doppelt
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: andere Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = „synthetische DNA“

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Maus und Mensch

(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:

- (B) CLON: HEF-RVHe-gyl

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE: 1..424

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 54:

ATG GAG TTT GGG CTG AGC TGG GTT TTC CTT GTT GCT ATT TTA AAG GGT	48
Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly	
145 150 155	
GTC CAG TGT GAA GTG CAG CTG TTG GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTC CAG	96
Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln	
160 165 170	
CCT GGG GGT TCT CTG AGA CTC TCA TGT GCT GCC TCT GGA TTC ACC TTC	144
Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe	
175 180 185	
AGT GAT TAC TAC CTG AGC TGG GTC CGC CAA CCT CCA GGG AAA GGG CTA	192
Ser Asp Tyr Tyr Leu Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu	
190 195 200 205	
GAG TGG GTG GGT CTC ATT AGA AAC AAA GCC AAT GGT TAC ACA AGA GAG	240
Glu Trp Val Gly Leu Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Arg Glu	
210 215 220	
TAC AGT GCA TCT GTG AAG GGC AGA CTT ACC ATC TCA AGA GAA GAT TCA	288
Tyr Ser Ala Ser Val Lys Gly Arg Leu Thr Ile Ser Arg Glu Asp Ser	
225 230 235	
AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AGC AGC CTG AAA ACC GAA GAC TTG	336
Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Thr Glu Asp Leu	
240 245 250	
GCC GTG TAT TAC TGT GCT AGA GAG AAC TAT CGC TAC GAC GTA GAG CTT	384
Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Asn Tyr Arg Tyr Asp Val Glu Leu	
255 260 265	
GCT TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA G	424
Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	
270 275 280	

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 55

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 141 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 55:

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

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 56

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 29 Basenpaare
- (B) ART: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: einzeln
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: andere Nucleinsäure

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 56:

CAAGCTCCAG GGAAAGCGCT AGAGTGGGT

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 57

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 29 Basenpaare

- (B) ART: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: einzeln
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: andere Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = „synthetische DNA“

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 57:

ACCCACTCTA GCGCTTTCCC TGGAGCTTG

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 58

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 424 Basenpaare
- (B) ART: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: doppelt
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: andere Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = „synthetische DNA“

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Maus und Mensch

(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:

- (B) CLON: HEF-RVhf-gyl

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE: 1..424

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 58:

ATG GAG TTT GGG CTG AGC TGG GTT TTC CTT GTT GCT ATT TTA AAG GGT	48
Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly	
145 150 155	
GTC CAG TGT GAA GTG CAG CTG TTG GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTC CAG	96
Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln	
160 165 170	
CCT GGG GGT TCT CTG AGA CTC TCA TGT GCT GCC TCT GGA TTC ACC TTC	144
Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe	
175 180 185	
AGT GAT TAC TAC CTG AGC TGG GTC CGC CAA GCT CCA GGG AAA GCG CTA	192
Ser Asp Tyr Tyr Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Ala Leu	
190 195 200 205	
GAG TGG GTG GGT CTC ATT AGA AAC AAA GCC AAT GGT TAC ACA AGA GAG	240
Glu Trp Val Gly Leu Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Arg Glu	
210 215 220	
TAC AGT GCA TCT GTG AAG GGC AGA CTT ACC ATC TCA AGA GAA GAT TCA	288
Tyr Ser Ala Ser Val Lys Gly Arg Leu Thr Ile Ser Arg Glu Asp Ser	
225 230 235	
AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AGC AGC CTG AAA ACC GAA GAC TTG	336
Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Thr Glu Asp Leu	
240 245 250	
GCC GTG TAT TAC TGT GCT AGA GAG AAC TAT CGC TAC GAC GTA GAG CTT	384
Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Asn Tyr Arg Tyr Asp Val Glu Leu	
255 260 265	
GCT TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA G	424
Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	
270 275 280	

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 59

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 141 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 59:

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly
 1 5 10 15

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45

Ser Asp Tyr Tyr Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Ala Leu
 50 55 60

Glu Trp Val Gly Leu Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Arg Glu
 65 70 75 80

Tyr Ser Ala Ser Val Lys Gly Arg Leu Thr Ile Ser Arg Glu Asp Ser
 85 90 95

Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Thr Glu Asp Leu
 100 105 110

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Asn Tyr Arg Tyr Asp Val Glu Leu
 115 120 125

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 130 135 140

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 60

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 23 Basenpaare
- (B) ART: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: einzeln
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: andere Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = „synthetische DNA“

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 60:

GTGAAGGGCA GATTACCAT CTC

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 61

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 23 Basenpaare
- (B) ART: Nucleinsäure

(C) STRANGFORM: einzeln

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: andere Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = „synthetische DNA“

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 61:

GAGATGGTAA ATCTGCCCTT CAC

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 62

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 424 Basenpaare

(B) ART: Nucleinsäure

(C) STRANGFORM: doppelt

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: andere Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = „synthetische DNA“

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Maus und Mensch

(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:

(B) CLON: HEF-RVHg-gyl

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS

(B) LAGE: 1..424

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 62:

ATG GAG TTT GGG CTG AGC TGG GTT TTC CTT GTT GCT ATT TTA AAG GGT	48
Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly	
145 150 155	
GTC CAG TGT GAA GTG CAG CTG TTG GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTC CAG	96
Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln	
160 165 170	
CCT GGG GGT TCT CTG AGA CTC TCA TGT GCT GCC TCT GGA TTC ACC TTC	144
Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe	
175 180 185	
AGT GAT TAC TAC CTG AGC TGG GTC CGC CAA GCT CCA GGG AAA GGG CTA	192
Ser Asp Tyr Tyr Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu	
190 195 200 205	
GAG TGG GTG GGT CTC ATT AGA AAC AAA GCC AAT GGT TAC ACA AGA GAG	240
Glu Trp Val Gly Leu Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Arg Glu	
210 215 220	
TAC AGT GCA TCT GTG AAG GGC AGA TTT ACC ATC TCA AGA GAA GAT TCA	288
Tyr Ser Ala Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asp Ser	
225 230 235	
AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AGC AGC CTG AAA ACC GAA GAC TTG	336
Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Thr Glu Asp Leu	
240 245 250	
GCC GTG TAT TAC TGT GCT AGA GAG AAC TAT CGC TAC GAC GTA GAG CTT	384
Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Asn Tyr Arg Tyr Asp Val Glu Leu	
255 260 265	
GCT TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA G	424
Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	
270 275 280	

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 63

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 141 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 63:

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

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 64

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 424 Basenpaare
- (B) ART: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: doppelt
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: andere Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = „synthetische DNA“

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Maus und Mensch

(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:

- (B) CLON: HEF-RVHh-gyl

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS

(B) LAGE: 1..424

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 64:

ATG GAG TTT GGG CTG AGC TGG GTT TTC CTT GTT GCT ATT TTA AAG GGT	48
Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly	
145 150 155	
GTC CAG TGT GAA GTG CAG CTG TTG GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTC CAG	96
Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln	
160 165 170	
CCT GGG GGT TCT CTG AGA CTC TCA TGT GCT GCC TCT GGA TTC ACC TTC	144
Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe	
175 180 185	
AGT GAT TAC TAC CTG AGC TGG GTC CGC CAA GCT CAA GGG AAA GGG CTA	192
Ser Asp Tyr Tyr Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Gln Gly Lys Gly Leu	
190 195 200 205	
GAG TGG GTG GGT CTC ATT AGA AAC AAA GCC AAT GGT TAC ACA AGA GAG	240
Glu Trp Val Gly Leu Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Arg Glu	
210 215 220	
TAC AGT GCA TCT GTG AAG GGC AGA TTT ACC ATC TCA AGA GAA GAT TCA	288
Tyr Ser Ala Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asp Ser	
225 230 235	
AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AGC AGC CTG AAA ACC GAA GAC TTG	336
Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Thr Glu Asp Leu	
240 245 250	
GCC GTG TAT TAC TGT GCT AGA GAG AAC TAT CGC TAC GAC GTA GAG CTT	384
Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Asn Tyr Arg Tyr Asp Val Glu Leu	
255 260 265	
GCT TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA G	424
Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	
270 275 280	

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 65

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 141 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

TTGAAGCTTC CACCATGGGA TGGAGCTGTA TCATCCTCTT CTTGGTAGCA ACAGCTACAG	60
GTGTCCACTC CGACATCCAG ATGACCCAGA GCCCAAGCAG CCTGAGCGCC AGCGTAGGTG	120
ACAG	124

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 67

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 122 Basenpaare
- (B) ART: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: einzeln
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: andere Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = „synthetische DNA“

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 67:

GCATTGTAGA TCAGCAGCTT TGGAGCCTTT CCTGGCTTCT GCTGGTACCA TGCTAAATAA	60
CTGTAAATAA TCTCGCTTGC TCGACAGGTG ATGGTCACTC TGTCACCTAC GCTGGCGCTC	120
AG	122

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 68

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 121 Basenpaare
- (B) ART: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: einzeln
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: andere Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = „synthetische DNA“

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 68:

AGCTGCTGAT CTACAATGCA AAAACCTTAG CAGATGGAGT GCCAAGCAGA TTCAGCGGTA	60
GCGGTAGCGG TACCGACTTC ACCTTCACCA TCAGCAGCCT CCAGCCAGAG GACATCGCTA	120
C	121

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 69

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 106 Basenpaare
- (B) ART: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: einzeln
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: andere Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = „synthetische DNA“

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 69:

GTAGGATCCA CTCACGTTTG ATTCGACCT TGGTCCCTTG GCCGAACGTC CGAGGAAAAC 60

CAAAATGATG TTGGCAGTAG TAGGTAGCGA TGTCCTCTGG CTGGAG 106

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 70

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 20 Basenpaare
- (B) ART: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: einzeln
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: andere Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = „synthetische DNA“

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 70:

TTGAAGCTTC CACCATGGGA

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 71

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 20 Basenpaare
- (B) ART: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: einzeln
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: andere Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = „synthetische DNA“

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 71

GTAGGATCCA CTCACGTTTG

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 72

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 379 Basenpaare

(B) ART: Nucleinsäure

(C) STRANGFORM: doppelt

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: andere Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = „synthetische DNA“

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Maus und Mensch

(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:

(B) CLON: HEF-RVLa-gk

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS

(B) LAGE: 1..379

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 72:

ATG GGA TGG AGC TGT ATC ATC CTC TTC TTG GTA GCA ACA GCT ACA GGT 48

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
145 150 155

GTC CAC TCC GAC ATC CAG ATG ACC CAG AGC CCA AGC AGC CTG AGC GCC 96
Val His Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala
160 165 170

AGC	GTA	GGT	GAC	AGA	GTG	ACC	ATC	ACC	TGT	CGA	GCA	AGC	GAG	ATT	ATT	144
Ser	Val	Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Glu	Ile	Ile	
	175					180					185					
TAC	AGT	TAT	TTA	GCA	TGG	TAC	CAG	CAG	AAG	CCA	GGA	AAG	GCT	CCA	AAG	192
Tyr	Ser	Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	
	190				195				200					205		
CTG	CTG	ATC	TAC	AAT	GCA	AAA	ACC	TTA	GCA	GAT	GGA	GTG	CCA	AGC	AGA	240
Leu	Leu	Ile	Tyr	Asn	Ala	Lys	Thr	Leu	Ala	Asp	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	
				210				215						220		
TTC	AGC	GGT	AGC	GGT	AGC	GGT	ACC	GAC	TTC	ACC	TTC	ACC	ATC	AGC	AGC	288
Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Phe	Thr	Ile	Ser	Ser	
			225					230					235			
CTC	CAG	CCA	GAG	GAC	ATC	GCT	ACC	TAC	TAC	TGC	CAA	CAT	CAT	TTT	GGT	336
Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Ile	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	His	His	Phe	Gly	
		240					245					250				
TTT	CCT	CGG	ACG	TTC	GGC	CAA	GGG	ACC	AAG	GTC	GAA	ATC	AAA	C		379
Phe	Pro	Arg	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys			
	255					260					265					

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 73

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 126 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 73:

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

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 74

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 38 Basenpaare
- (B) ART: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: einzeln
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: andere Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = „synthetische DNA“

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 74:

AGCGGTAGCG GTACCGACTA CACCTTCACC ATCAGCAG

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 75

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 38 Basenpaare
- (B) ART: Nucleinsäure

(C) STRANGFORM: einzeln

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: andere Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = „synthetische DNA“

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 75:

CTGCTGATGG TGAAGGTGTA GTCGGTACCG CTACCGCT

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 76

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 379 Basenpaare

(B) ART: Nucleinsäure

(C) STRANGFORM: doppelt

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: andere Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = „synthetische DNA“

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Maus und Mensch

(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:

(B) CLON: HEF-RVLb-gk

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS

(B) LAGE: 1..379

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 76:

ATG GGA TGG AGC TGT ATC ATC CTC TTC TTG GTA GCA ACA GCT ACA GGT	48
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly	
130 135 140	
GTC CAC TCC GAC ATC CAG ATG ACC CAG AGC CCA AGC AGC CTG AGC GCC	96
Val His Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala	
145 150 155	
AGC GTA GGT GAC AGA GTG ACC ATC ACC TGT CGA GCA AGC GAG ATT ATT	144
Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ile Ile	
160 165 170	
TAC AGT TAT TTA GCA TGG TAC CAG CAG AAG CCA GGA AAG GCT CCA AAG	192
Tyr Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys	
175 180 185 190	
CTG CTG ATC TAC AAT GCA AAA ACC TTA GCA GAT GGA GTG CCA AGC AGA	240
Leu Leu Ile Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg	
195 200 205	
TTC AGC GGT AGC GGT AGC GGT ACC GAC TAC ACC TTC ACC ATC AGC AGC	288
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser	
210 215 220	
CTC CAG CCA GAG GAC ATC GCT ACC TAC TAC TGC CAA CAT CAT TTT GGT	336
Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His His Phe Gly	
225 230 235	
TTT CCT CGG ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTC GAA ATC AAA C	379
Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys	
240 245 250	

2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 77

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 126 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 77:

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly	
1 5 10 15	
Val His Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala	
20 25 30	

Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ile Ile
 35 40 45

Tyr Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
 50 55 60

Leu Leu Ile Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg
 65 70 75 80

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser
 85 90 95

Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His His Phe Gly
 100 105 110

Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 115 120 125

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 78

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 18 Basenpaare
- (B) ART: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: einzeln
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: andere Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = „synthetische DNA“

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 78:

CAGACAGTGG TTCAAAGT

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 79

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 17 Basenpaare
- (B) ART: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: einzeln
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: andere Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = „synthetische DNA“

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 79:

GCCCCAAAGC CAAGGTC

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 80

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 20 Basenpaare
- (B) ART: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: einzeln
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: andere Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = „synthetische DNA“

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 80:

AACTCAATGC TTTAGGCAAA

Patentansprüche

1. Umgestalteter menschlicher Anti-Interleukin-8-Antikörper umfassend:

(A) eine L-Kette umfassend:

- (1) eine C-Region der menschlichen L-Kette, und
- (2) eine V-Region der L-Kette;

(B) eine H-Kette umfassend:

- (1) eine C-Region der menschlichen H-Kette, und
- (2) eine V-Region der H-Kette;

wobei die V-Region der L-Kette eine in SEQ ID NO: 73 oder 77 gezeigte Aminosäuresequenz hat, und die V-Region der H-Kette eine in SEQ ID NO: 63 gezeigte Aminosäuresequenz hat.

2. Umgestalteter menschlicher Anti-IL-8-Antikörper gemäß Anspruch 1, wobei die C-Region der menschlichen L-Kette menschliches C_k und die C-Region der menschlichen H-Kette menschliches C_{y1} ist.

3. Umgestalteter menschlicher Anti-IL-8-Antikörper gemäß Anspruch 1, wobei die C-Region der menschlichen L-Kette menschliches C_k und die C-Region der menschlichen H-Kette menschliches C_{y4} ist.

4. Fv-Einzelkette, umfassend eine V-Region einer L-Kette und eine V-Region einer H-Kette, die diejenigen eines Anti-IL-8-Antikörpers gemäß Anspruch 1 sind, wobei die V-Region der L-Kette und die V-Region der H-Kette mit einem Linker verbunden sind, der eine Länge von 12 bis 19 Aminosäuren aufweist.

5. F(ab')₂ oder Fab, das von einem Antikörper gemäß Anspruch 1 abgeleitet ist.

6. DNA, die eine Fv-Einzelkette gemäß Anspruch 4 codiert, umfassend (i) DNA, die die V-Region einer L-Kette eines umgestalteten menschlichen Anti-IL-8-Antikörpers gemäß Anspruch 1 codiert, wobei die V-Region der L-Kette die in SEQ ID NO: 73 oder 77 gezeigte Aminosäuresequenz hat, und (ii) DNA, die die V-Region einer H-Kette eines umgestalteten menschlichen Anti-IL-8-Antikörpers gemäß Anspruch 1 codiert, wobei die V-Region der H-Kette die in SEQ ID NO: 63 gezeigte Aminosäuresequenz hat, wobei die DNA, die die V-Region der L-Kette codiert, und die DNA, die die V-Region der H-Kette codiert, mit einem DNA-Linker verbunden sind, der einen Peptid-Linker codiert, der eine Länge von 12 bis 19 Aminosäuren aufweist.

7. DNA, die eine Fv-Einzelkette gemäß Anspruch 4 codiert, umfassend (i) DNA, die die V-Region einer L-Kette eines umgestalteten menschlichen Anti-IL-8-Antikörpers gemäß Anspruch 1 codiert, wobei die Region, die die V-Region der L-Kette codiert, eine in SEQ ID NO: 72 oder 76 gezeigte Nucleotidsequenz hat, und (ii) DNA, die die V-Region einer H-Kette eines umgestalteten menschlichen Anti-IL-8-Antikörpers gemäß Anspruch 1 codiert, wobei die Region, die die V-Region der H-Kette codiert, eine in SEQ ID NO: 62 gezeigte Nu-

cleotidsequenz hat, wobei die DNA, die die V-Region der L-Kette codiert, und die DNA, die die V-Region der H-Kette codiert, und die DNA, die die V-Region der H-Kette codiert, mit einem DNA-Linker verbunden sind, der einen Peptid-Linker codiert, der eine Länge von 12 bis 19 Aminosäuren aufweist.

8. Expressionsvektor umfassend DNA gemäß Anspruch 6 oder 7.
9. Wirtszelle, die mit einem Expressionsvektor gemäß Anspruch 8 transformiert ist.
10. Verfahren zur Herstellung eines umgestalteten menschlichen Antikörpers, umfassend den Schritt der Züchtung einer Wirtszelle gemäß Anspruch 9.

Es folgen 8 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

Fig.1

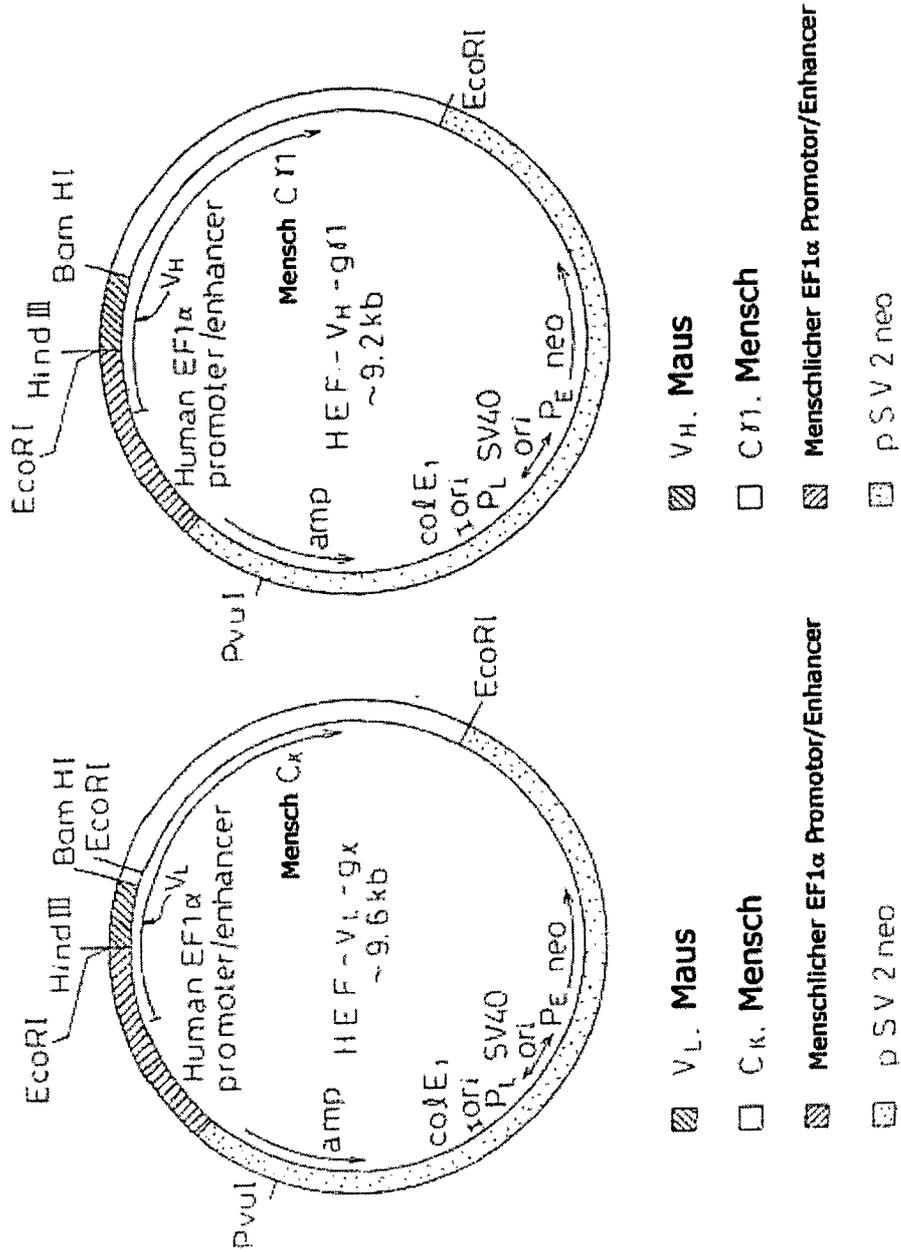


Fig.2

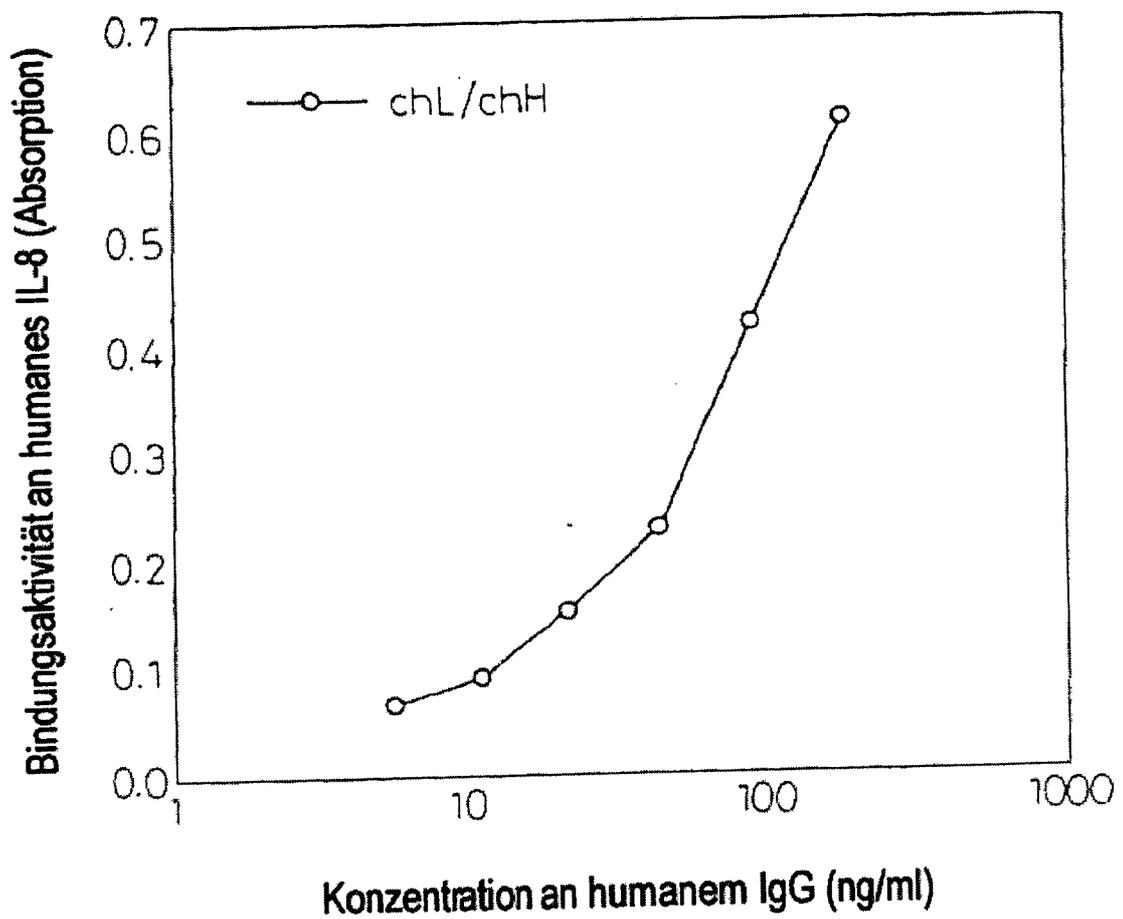
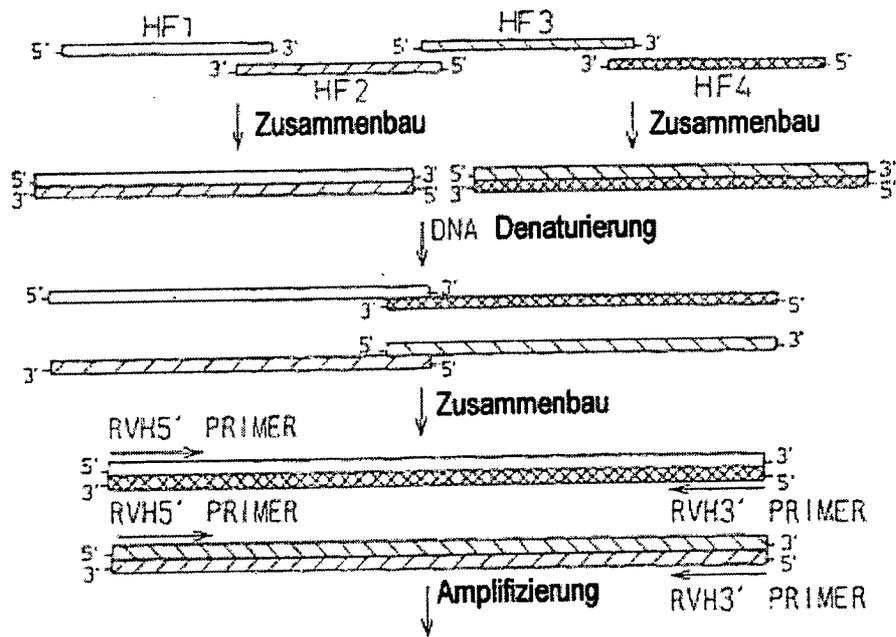


Fig. 3

A
Oligonukleotid-Synthese



B
Oligonukleotid-Synthese

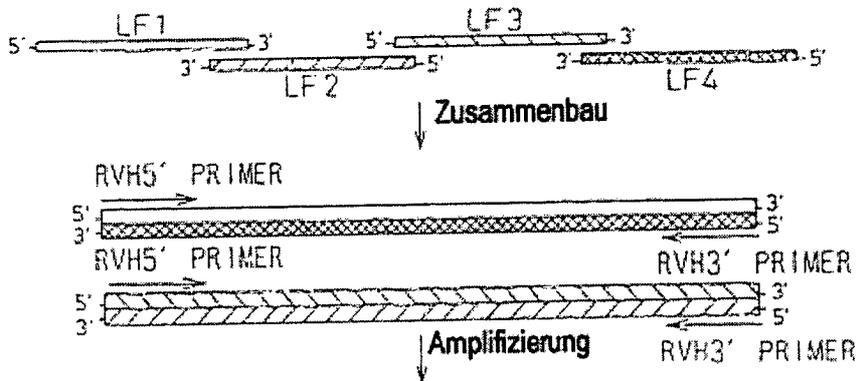


Fig.4

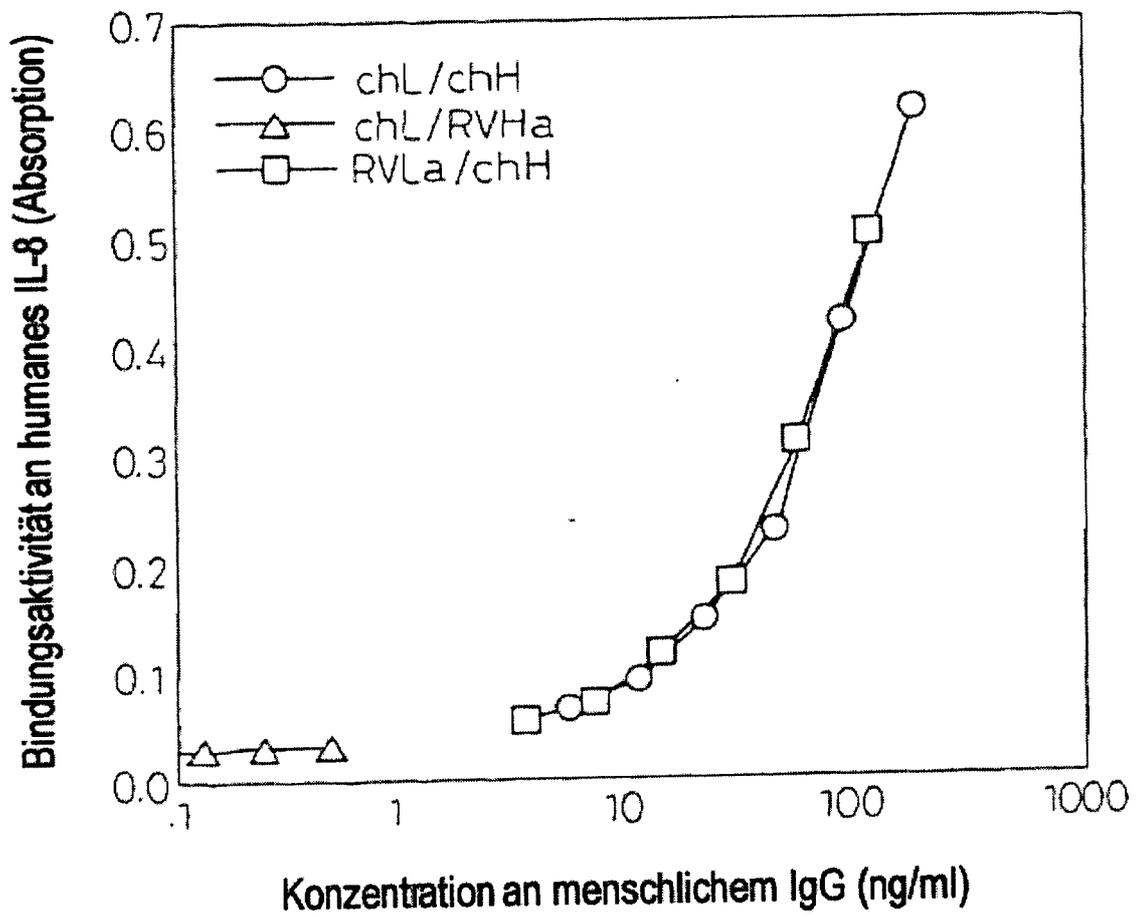


Fig.5

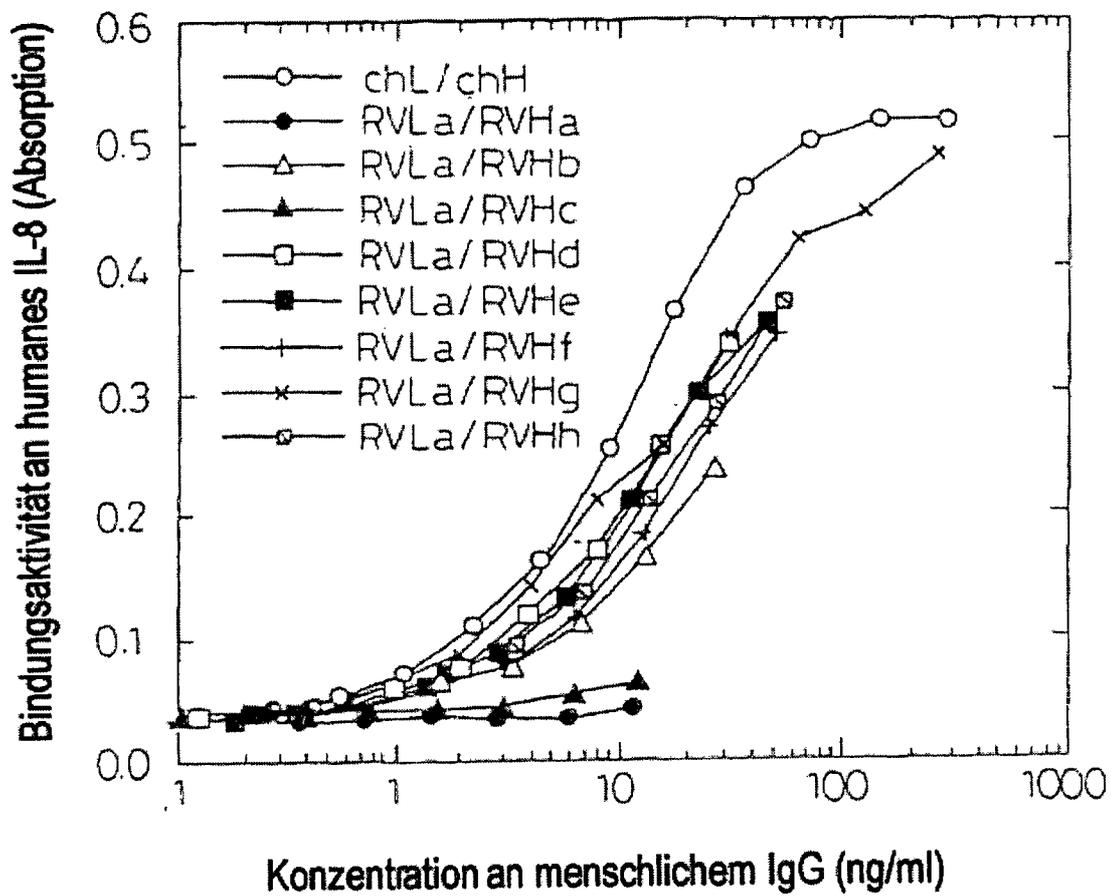


Fig.6

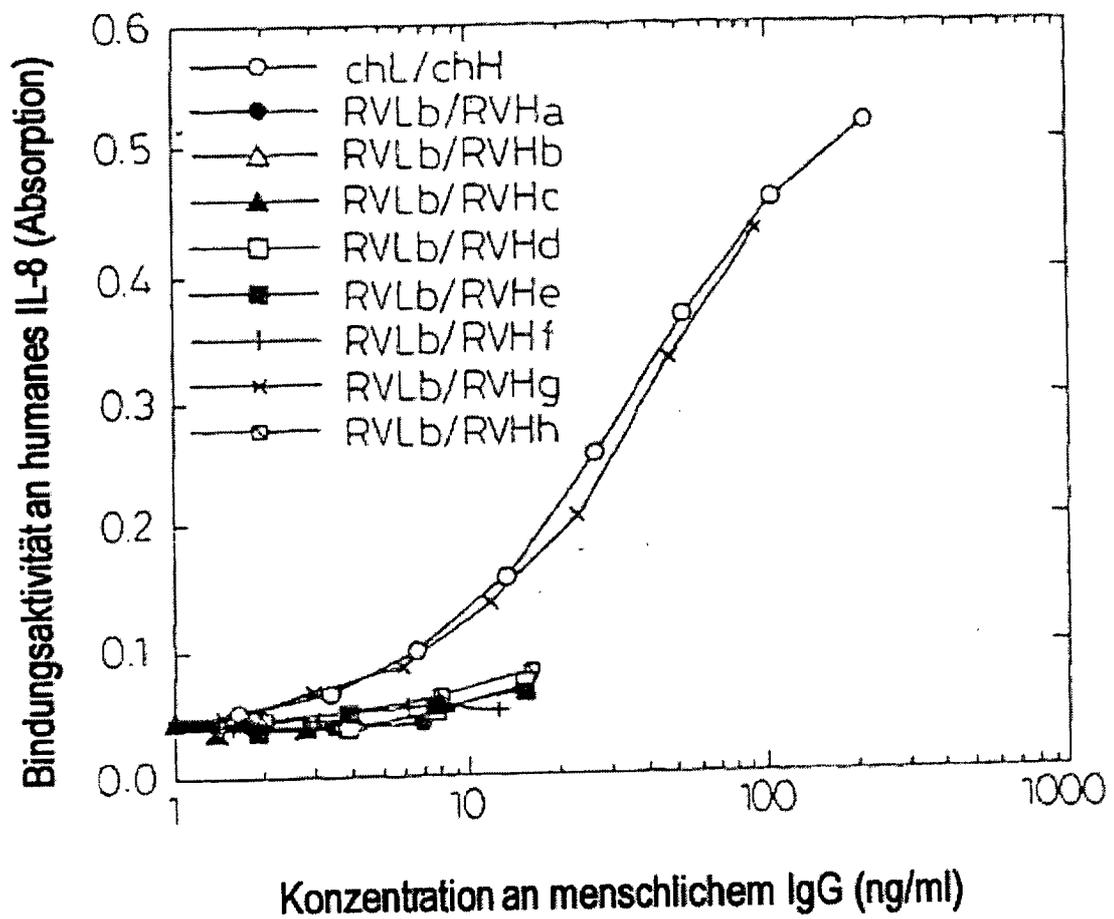


Fig.7

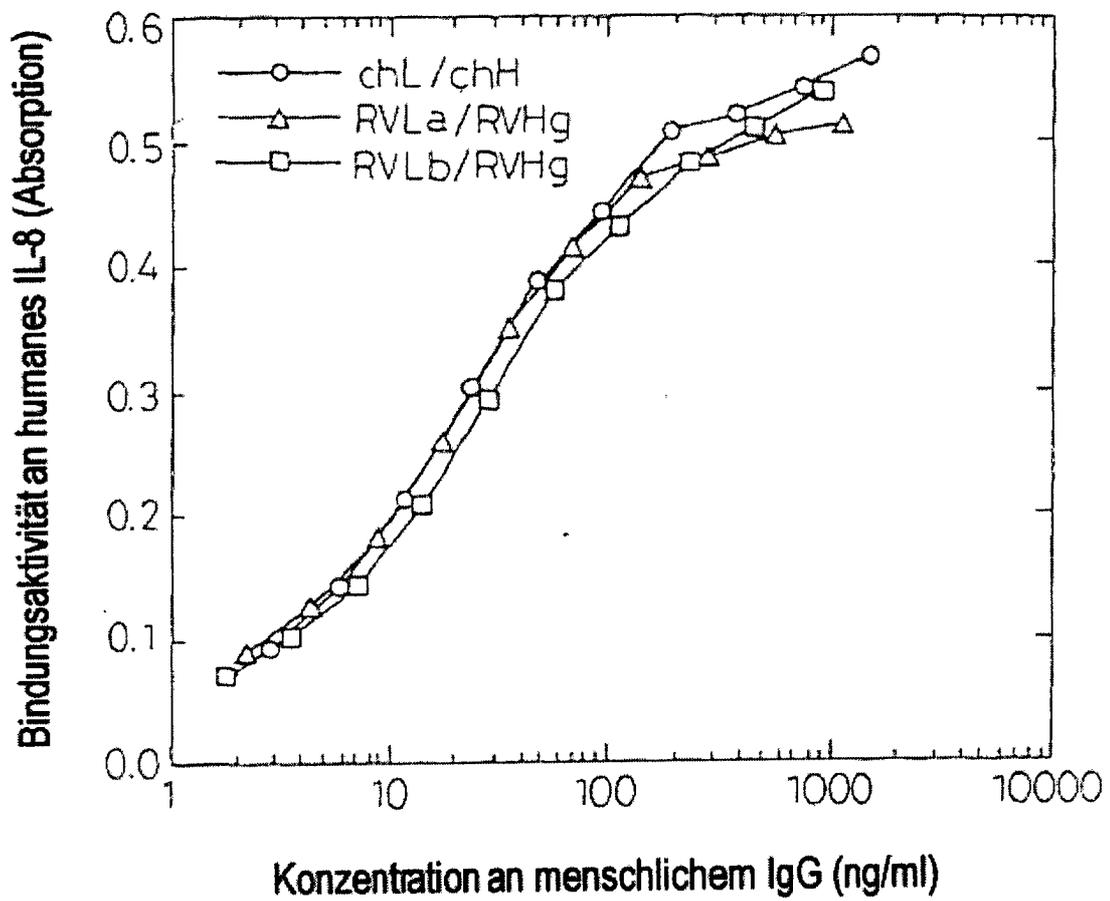


Fig.8

