

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-521607
(P2004-521607A)

(43) 公表日 平成16年7月22日(2004.7.22)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	Z N A A 4 B O 2 4
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 39/395	D 4 B O 6 3
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 39/395	N 4 B O 6 4
A 6 1 P 7/00	A 6 1 P 7/00	4 B O 6 5
A 6 1 P 9/00	A 6 1 P 9/00	4 C O 8 4

審査請求 有 予備審査請求 有 (全 121 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2002-500722 (P2002-500722)	(71) 出願人 503405999 ノイラクソ、バイオテック、ゲゼルシャフト、ミット、ベシユレンクテル、ハフツング NEURAXO BIOTEC GMBH ドイツ連邦共和国デュッセルドルフ、メロピンガープラッツ、1ア-
(86) (22) 出願日 平成13年6月1日(2001.6.1)	(74) 代理人 100075812 弁理士 吉武 賢次
(85) 翻訳文提出日 平成14年12月2日(2002.12.2)	(74) 代理人 100091487 弁理士 中村 行孝
(86) 国際出願番号 PCT/EP2001/006250	(74) 代理人 100094640 弁理士 紺野 昭男
(87) 国際公開番号 W02001/092530	(74) 代理人 100107342 弁理士 横田 修孝
(87) 国際公開日 平成13年12月6日(2001.12.6)	
(31) 優先権主張番号 100 27 383.1	
(32) 優先日 平成12年6月2日(2000.6.2)	
(33) 優先権主張国 ドイツ(DE)	

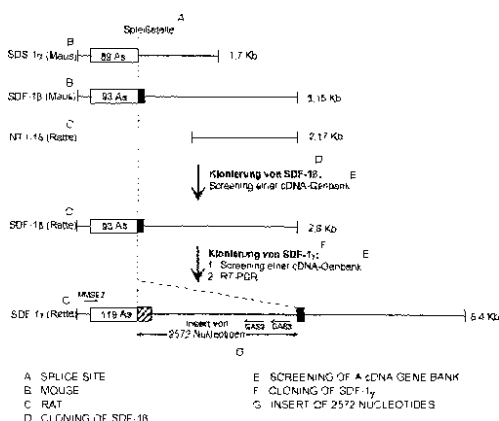
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ケモカイン、神経ペプチド前駆体または少なくとも一つの神経ペプチドをコードする核酸配列を含んでなる核酸分子

(57) 【要約】

本発明は、ケモカイン、神経ペプチド前駆体または少なくとも一つの神経ペプチドをコードする核酸配列を含んでなる核酸分子、ならびにこの核酸分子を含有する宿主細胞に関する。さらに、本発明は、ケモカインもしくは神経ペプチドとして機能する、または少なくとも一つの神経ペプチドを含むポリペプチド分子、および少なくとも一つの神経ペプチドを含むその断片、ならびに前記ポリペプチド分子またはその断片の製造方法に関する。さらに、本発明は、抗体、検出法、およびテストキット、ならびに医薬組成物に関する。

本発明の目的は、SDF-1因子またはその受容体(CXCR4)の欠陥に関連する疾病の診断および/または治療のために使用できる新たな手段を提供することにある。



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

以下の配列を含んでなる配列を有する、核酸分子：

(1) 以下の配列から選択される、ケモカイン、神経ペプチド前駆体または少なくとも一つの神経ペプチドをコードする核酸配列：

(a) 配列番号 1 で表される核酸配列、

(b) 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする核酸配列、

(c) 前記 (a) に示される配列に対して少なくとも 60% の同一性を有する核酸配列、

(d) 前記 (a) に示される配列のもう一方の鎖とハイブリダイズする、もしくは遺伝コードの縮重を考慮した上でハイブリダイズするものとされる配列、および

(e) 前記 (a) または前記 (b) に示される一の配列の誘導体であって、1 以上のヌクレオチドの置換、付加、逆位および/または欠失によって得られ、ケモカイン、神経ペプチド前駆体または少なくとも一つの神経ペプチドをコードする、誘導体；または

(2) 前記 (a) ~ (e) に示される核酸配列の一つと相補的な配列。

10

【請求項 2】

前記 (1) (c) に示される核酸配列が少なくとも 80% の同一性を有するものである、請求項 1 に記載の核酸分子。

【請求項 3】

前記 (1) (c) に示される核酸配列が少なくとも 90% の同一性を有するものである、請求項 1 に記載の核酸分子。

20

【請求項 4】

前記 (1) (c) に示される核酸配列が少なくとも 95% の同一性を有するものである、請求項 1 に記載の核酸分子。

【請求項 5】

配列番号 3 で表される核酸配列を含んでなる、請求項 1 に記載の核酸分子。

【請求項 6】

配列番号 4 で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする核酸配列を含んでなる、請求項 1 に記載の核酸分子。

【請求項 7】

発現に好適なプロモーターをさらに含んでなり、コード核酸配列が該プロモーターの制御下にある、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の核酸分子。

30

【請求項 8】

宿主細胞内での核酸分子の複製および/または宿主細胞ゲノムへの核酸分子の組込みを可能とするベクターの配列をさらに含んでなる、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の核酸分子。

【請求項 9】

請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の核酸分子を含有し、該核酸分子の発現に好適な原核または真核細胞である、宿主細胞。

【請求項 10】

原核宿主細胞が大腸菌である、請求項 9 に記載の宿主細胞。

40

【請求項 11】

真核宿主細胞が真菌、昆虫または哺乳類細胞である、請求項 9 に記載の宿主細胞。

【請求項 12】

酵母サッカロミセス・セレピシエ、メチロトロフ酵母ハンセニューラ・ポリモルファ、二形性酵母アルクスラ・アデニニボランスまたは糸状菌ソルダリア・マクロスポラである、請求項 11 に記載の宿主細胞。

【請求項 13】

CHO 細胞、COS 細胞または HeLa 細胞である、請求項 11 に記載の宿主細胞。

【請求項 14】

以下の配列から選択されるアミノ酸配列を含んでなる、ポリペプチド分子：

50

(i) 配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9 および / または配列番号 10 で表されるアミノ酸配列、および / またはこれらの配列の 2 以上の組合せを含むアミノ酸配列、

(i i) 配列番号 4 で表されるアミノ酸配列、

(i i i) 配列番号 4 の第 20 アミノ酸 ~ 第 119 アミノ酸の配列に相当するアミノ酸配列、

(i v) 配列番号 22 で表されるアミノ酸配列、および

(v) 前記 (i)、(i i)、(i i i) または (i v) に示される配列に対して少なくとも 85% の同一性を有するアミノ酸配列。

【請求項 15】

前記 (v) に示される配列が少なくとも 90% の同一性を有するものである、請求項 14 に記載のポリペプチド分子。

【請求項 16】

前記 (v) に示される配列が少なくとも 95% の同一性を有するものである、請求項 14 に記載のポリペプチド分子。

【請求項 17】

配列番号 12 または配列番号 13 で表されるアミノ酸配列を含むものである、請求項 14 に記載のポリペプチド分子。

【請求項 18】

少なくとも一つの神経ペプチドを含む、請求項 14 ~ 17 のいずれか一項に記載のポリペプチド分子の断片。

【請求項 19】

配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9 および / または配列番号 10 で表されるアミノ酸配列の少なくとも一つを含んでなる、請求項 18 に記載の断片。

【請求項 20】

請求項 14 ~ 19 のいずれか一項に記載のポリペプチド分子および / またはその断片の製造方法であって、発現および実行する可能性のあるプロセッシングに好適な条件下で請求項 9 ~ 13 のいずれか一項に記載の宿主細胞を培養すること、ならびに、所望により、発現したポリペプチド分子または断片を精製することを含んでなる、方法。

【請求項 21】

請求項 14 ~ 19 のいずれか一項に記載のポリペプチド分子および / またはその断片に特異的な抗体。

【請求項 22】

生物試料中の請求項 14 ~ 19 のいずれか一項に記載のポリペプチド分子および / またはその断片を *in vitro* で検出する方法であって、前記ポリペプチド分子および / または断片に特異的な試薬を前記試料に接触させ、これらの結合を検出することを含んでなる、方法。

【請求項 23】

請求項 14 ~ 19 のいずれか一項に記載のポリペプチドおよび / またはその断片を検出するためのテストキットであって、前記ポリペプチドおよび / または断片に特異的な少なくとも一種の試薬を含んでなる、テストキット。

【請求項 24】

請求項 21 に記載の、前記ポリペプチド分子および / または断片に特異的な少なくとも一種の抗体を含む、請求項 23 に記載のテストキット。

【請求項 25】

生物試料中の請求項 14 ~ 17 のいずれか一項に記載のポリペプチド分子をコードする核酸を *in vitro* で検出する方法であって、

前記試料に、検出可能な標識を有する請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の核酸分子および / またはその断片を接触させる工程、ならびに

前記標識を検出する工程

10

20

30

40

50

を含んでなる、方法。

【請求項 26】

請求項 14 ~ 19 のいずれか一項に記載の少なくとも一種のポリペプチド分子および/もしくはその断片、ならびに/または前記分子または前記断片の医薬上適合する塩を含有する、医薬組成物。

【請求項 27】

少なくとも一種の抗体をさらに含有する、請求項 26 に記載の医薬組成物。

【請求項 28】

脱髄性疾患もしくは神経変性疾患、または神経系の発達障害の治療に用いるための、請求項 26 または 27 に記載の医薬組成物。

10

【請求項 29】

ヒトにおける HIV 感染症、特に HIV 脳症の予防または治療に用いるための、請求項 26 または 27 に記載の医薬組成物。

【請求項 30】

造血系、免疫系および心血管系の疾患の治療に用いるための、請求項 26 または 27 に記載の医薬組成物。

【請求項 31】

請求項 14 ~ 19 のいずれか一項に記載のポリペプチド分子および/またはその断片に特異的な少なくとも一種の試薬を含有する、医薬組成物。

【請求項 32】

前記試薬が抗体である、請求項 31 に記載の医薬組成物。

20

【請求項 33】

請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の少なくとも一種の核酸分子を含有する、医薬組成物。

【請求項 34】

脱髄性疾患もしくは神経変性疾患、または神経系の発達障害の診断または治療に用いるための、請求項 31 ~ 33 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 35】

ヒトにおける HIV 感染症、特に HIV 脳症の診断または治療に用いるための、請求項 31 ~ 33 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

30

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、ケモカイン、神経ペプチド前駆体または少なくとも一つの神経ペプチドをコードする核酸配列を含んでなる核酸分子、ならびにこの核酸分子を含有する宿主細胞に関する。さらに、本発明は、ケモカインもしくは神経ペプチドとして機能する、または少なくとも一つの神経ペプチドを含むポリペプチド分子、および少なくとも一つの神経ペプチドを含むその断片、ならびに前記ポリペプチド分子またはその断片の製造方法に関する。さらに、本発明は、抗体、検出方法およびテストキット、ならびに医薬組成物に関する。

【0002】

SDF-1 (間質細胞由来因子 1) および選択的スプライシングから生じるそのイソ型である SDF-1 は、マウスの骨髄間質細胞株から初めてクローニングされた (Tashiro et al., 1993)。得られたアミノ酸配列の、インターロイキン 8 (32%) およびマクロファージ炎症タンパク質 1 (32%) の配列との確たる相同性と 4 つの特徴的なシステイン残基の存在に基づき、SDF-1 および SDF-1 は CXCR1 () ケモカインのグループに属するものとされている。CXCR1 () ケモカインは、様々な距離関係にある炎症性サイトカインからなる、インタークリン (intercrine) サイトカイン系のサブグループである。マウスおよびヒトの SDF-1 および SDF-1 の cDNA 配列は互いに高い相同性を示し、一つの遺伝子の選択的スプライシングから生じたものである。

40

【0003】

50

SDF-1の生物学的機能はヒトSDF-1によって検討された。SDF-1はB細胞の成熟に必要とされ、Tリンパ球向性を作動し、神経細胞系hNTに細胞死を誘導する。SDF-1は、Tリンパ球向性HIV1株の結合性補因子であるT細胞のケモカイン受容体CXCR4(LESTR/Fusin)の天然リガンドである。SDF-1およびは、繊維芽細胞および肝細胞においてin vitroでもin vivoでも「増殖停止状態」特異的発現パターンを示す。SDF-1遺伝子が不活性化されたマウスは、B細胞形成の低下、心室中隔の欠損および小脳への細胞移動の欠損を示し、誕生後すぐに死亡する。SDF-1は神経再生において重要な役割を果たす可能性がある。

【0004】

本発明は、その基礎として、SDF-1因子またはその受容体(CXCR4)の欠陥に関連する疾病の診断および/または治療のための新たな手段を提供することを目的とする。 10

【0005】

本発明によれば、この目的は、以下の配列を含んでなる核酸分子によって達成される：

(1)以下の配列から選択される、ケモカイン、神経ペプチド前駆体または少なくとも一つの神経ペプチドをコードする核酸配列：

(a)配列番号1で表される核酸配列、

(b)配列番号2で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする核酸配列、

(c)前記(a)に示される配列に対して少なくとも60%の同一性を有する核酸配列、

(d)前記(a)に示される配列のもう一方の鎖とハイブリダイズする、もしくは遺伝コードの縮重を考慮した上でハイブリダイズするものとされる配列、および 20

(e)前記(a)または前記(b)に示される一の配列の誘導体であって、1以上のヌクレオチドの置換、付加、逆位および/または欠失によって得られ、ケモカイン、神経ペプチド前駆体または少なくとも一つの神経ペプチドをコードする、誘導体；または

(2)前記(a)~(e)に示される核酸配列の一つと相補的な配列。

【0006】

本明細書において用いられる「ポリペプチド」には、7以上のアミノ酸から構成されるペプチドまたはタンパク質も含まれる。

【0007】

「ケモカイン」とは、比較的小さなタンパク質のファミリーのメンバーを表し、特徴的なシステイン残基の配置に基づいて4つのサブグループ：C、CC、CX CおよびCX₃C 30に分けられる。これらのケモカインは特異的な受容体に結合する(Rollins, B. J., 1997)。本発明に関して、「ケモカイン」は、特にCX Cケモカインファミリーのメンバーに対して用いられる。本発明におけるケモカインは、好ましくは、Koller et al (2001)に記載の条件下でのCa画像実験において、ラットまたはヒトの中樞神経系由来の一次星状細胞および/またはニューロンにおける細胞内カルシウム濃度に1.5倍~10倍の上昇をもたらすポリペプチド分子とされる。

【0008】

神経系において調節および調整機能を有する、生物学的に活性で生理学上重要なシグナル分子を、「神経ペプチド」という。これらの機能性ドメインとしては、とりわけ、神経伝達、受容体調整、細胞膜の電気生理学的特性の変更および代謝プロセスの各ドメインが挙げられる。神経ペプチドはニューロンで合成され、 40

その大部分がシナプスで放出される(Siegel et al., 1989)。

【0009】

「神経ペプチド前駆体」とは、タンパク質分解による開裂によって活性型神経ペプチドに変換されるタンパク質前駆体とされる。

【0010】

本発明による核酸分子に含まれる核酸配列は、ゲノムDNA、cDNAまたは合成DNAであってよく、ここで合成DNA配列とは、改変されたヌクレオシド内結合も含むものとされる。

【0011】

本発明による核酸配列に関して「少なくとも60%の同一性を有する」とは、周知の方法、例えばコンピューターによる配列比較(Altschul et al., 1990)によって決定することができるDNAレベルでの同一性をいう。

【0012】

当業者に周知の「同一性」とは、配列間の一致によって決定される2以上の核酸分子間の関連の程度を意味する。「同一性」のパーセンテージは、ギャップその他の配列の特色を考慮した2以上の配列における同一領域のパーセンテージによって示される。

【0013】

関連のある核酸分子の相互の同一性は、周知の方法を参照して決定することができる。多くの場合、専用のコンピュータープログラムには、特定のカリキュレーションベアリング・アルゴリズム要素が挿入されている。同一性決定の好ましい方法では、ほとんどの場合、検討される配列間の最大的一致が算出される。2つの配列間の同一性の決定のためのコンピュータープログラムとしては、GAPを包含するGCGプログラムパッケージ(Devereux, J., et al., Nucleic Acids Research 12(12) 387, 1984)、ウイスコンシン大学遺伝学コンピューターグループ(Genetics Computer Group university of Wisconsin, Madison WI)、BLASTP、BLASTNおよびFASTA(Altschul et al., 1990)が挙げられるが、これらに限定されるものではない。BLASTXプログラムはthe National Centre for Biotechnology Information(NCBI)から、または他の供給元(BLAST handbook, Altschul S. et al., NCBNLM NIH Bethesda MD 20894; Altschul et al., 1990)から入手できる。また、周知のSmith Watermanアルゴリズムも同一性の決定に使用できる。

【0014】

核酸配列比較のための好ましいパラメーターとしては以下のものが挙げられる：

アルゴリズム： Needleman and Wunsch (1970)；

比較マトリックス： マッチ=+10；
ミスマッチ=0；

ギャップペナルティー： 50；

ギャップ長ペナルティー： 3。

【0015】

また、GAPプログラムも上記のパラメーターとともに用いるのに好適である。上記のパラメーターは、核酸配列比較のための標準パラメーター(デフォルトパラメーター)である。

【0016】

その他のアルゴリズムの例としては、プログラムハンドブック(ウイスコンシンパッケージ、バージョン9、1997年9月)に記載されているギャップ・オープニング・ペナルティー、ギャップ・エクステンション・ペナルティ、比較マトリックスが挙げられ、これも使用できる。何を選択するかは、実行される比較によって異なり、さらには、実行される比較が、GAPまたはBest Fitが好ましいとされる配列対の間のものであるか、またはFASTAおよびBLASTが好ましいとされる配列および包括的データバンクの間のものであるかによって異なる。上記アルゴリズムで確認した場合における60%の一致は、この報告において60%の同一性であるとされる。さらに高い程度の同一性は相応の妥当性を持つ。

【0017】

「(a)に示される配列のもう一方の鎖とハイブリダイズする配列」とは、(a)に示される配列のもう一方の鎖とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする配列をいう。例えば、ハイブリダイゼーションは、42にて、5×SSPE、5×デンハート溶液、0.1%SDS、100µg/mlサケ精子DNA、30~50%ホルムアミドからなる

ハイブリダイゼーション溶液を用いて行えばよい (Sambrook et al., 1989)。洗浄段階では、2 x SSPE、0.1% SDS 中 42 で 10 ~ 15 分の洗浄を 2 回行った後、2 x SSPE、0.1% SDS 中 50 で 20 分の洗浄を 2 回行う。あるいは、洗浄液において、SSPE の代わりに SSC を用いてもよい。

【0018】

驚くべきことに、今般、本発明による核酸分子は、ケモカインの SDF ファミリーの新たなメンバーであることが分かった。これを SDF - 1 と呼ぶ。ヒト SDF - 1 およびラット SDF - 1 に関する SDF - 1 cDNA のクローニングおよび特徴づけ、ならびにその核酸配列およびそれから得られるアミノ酸配列は実施例に記載されている。

【0019】

SDF - 1 核酸配列は、SDF - 1 の全核酸配列、および同じ読み枠の下流において SDF - 1 のコドン 89 につながる 2572 個のヌクレオチドの付加配列からなる。この挿入により、新規な SDF - 1 ポリペプチドは、119 個のアミノ酸を有するアミノ酸配列および理論分子量 13.6 Kd を有し、この配列は、既知の SDF - 1 配列に比べ、カルボキシ末端においてアミノ酸 30 個だけ長くなっている。SDF - 1 は、既知のエクソン III と IV の間に新たな別のエクソン III a の挿入により生じたものであると考えられる (Shirozu et al., 1995 参照)。

【0020】

SDF - 1 のアミノ酸配列のカルボキシ末端領域では、2 つの塩基性アミノ酸 (Lys - Lys, Arg - Arg および Lys - Arg) の 5 グループにより、ゴルジ体および分泌小胞の膜結合プロテアーゼの認識パターンが形成され得る。この部位のタンパク質分解による開裂によって、5 つの短いペプチド (配列番号 5、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 10) および 1 つの短縮されたタンパク質 (配列番号 7) が生じ、これらのうち、2 つのペプチドおよび 1 つのポリペプチド (配列番号 5、配列番号 6 および配列番号 7) は、そのカルボキシ末端にグリシン残基を有する。カルボキシ末端にグリシン残基を有するペプチドは、ペプチジル - アミド化モノオキシゲナーゼ (PAM) (カルボキシレートのカルボキシ末端開裂を触媒し、これにより、神経ペプチドに特徴的な - アミド化カルボキシ末端 (CONH₂) を生じる) の可能性のある基質である (Eipper et al., 1992 による総説参照)。

【0021】

ラット SDF - 1 転写産物 (配列番号 16 参照) は 93 個のアミノ酸 (配列番号 17 参照) および理論分子量 10.5 kD を有するタンパク質をコードし、ここで最初の 19 個のアミノ酸は分泌タンパク質のシグナル配列を表す。全てイソ型として生じる成熟タンパク質の最初の 17 個のアミノ酸は、CXCR4 受容体との結合に必要である (Loetscher et al., 1998, Doranz et al., 1999 参照)。カルボキシ末端領域の 2 つの塩基性アミノ酸 (lys 89 および arg 90) はタンパク質分解による開裂の認識パターンを提供し、これにより、ペントペプチド (lys 89 - met 93、配列番号 18) および短縮されたタンパク質が生じる。

【0022】

本発明の一つの実施形態によれば、本発明による核酸分子は、配列番号 1 で表される核酸配列に対して、少なくとも 80%、好ましくは少なくとも 90%、特に好ましくは少なくとも 95% の同一性を有する核酸配列を含む。

【0023】

配列番号 3 で表される核酸配列、または配列番号 4 で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする核酸配列を含む核酸分子が特に好ましい。

【0024】

本発明による核酸分子は、発現に好適なプロモーターをさらに含んでもよく、ここでコード核酸配列はそのプロモーターの制御下に置かれる。ここで用いられる「発現に好適なプロモーター」とは、プロモーターエレメントの制御下にある、ケモカイン、神経ペプチド前駆体または少なくとも一つの神経ペプチドをコードする核酸配列の転写 (RNA 合成)

10

20

30

40

50

の開始点および開始頻度が宿主生物内で確立するDNA断片を意味する。選択されるプロモーターは、発現に用いられる発現系によって異なる。一般に構成プロモーターが好ましいが、例えばメタロチオネインプロモーターなどの誘導プロモーターも使用できる。本発明を実施するのに有用なプロモーターとしては、とりわけ、ハンセニューラ・ポリモルファ (Hansenula polymorpha) 由来のFMD-、MOX-、TPS1-、PMA1-およびDAS-プロモーター、S. cerevisiae 由来のADH1-、PDC1-、GAP1-およびCUP1-プロモーター、アルクスラ・アデニノボランス (Arxula adeninovorans) 由来のAXDH-およびASHB4-プロモーター、ならびにソルダリア・マクロスポラ (Sordaria macrospora) 由来のNDK1-およびCPC2-プロモーターが挙げられる。 10

【0025】

本発明による核酸分子は、宿主細胞内での核酸分子の複製および/または宿主細胞ゲノムへの核酸分子の組込みを可能とするベクターの配列をさらに含んでもよい。当技術分野では、多くのクローニングベクターおよび発現ベクターが知られている (Recombinant Gene Expression Protocols, Meth. Mol. Biol. Vol 62, Humana Press, Hew Jersey, USA 参照)。宿主細胞内での複製のために用いるベクターは、複製開始点および必要であればさらなる調節領域を含んでいなければならない。ベクターは、派生物などのバクテリオファージ、アデノウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルス、SV40ウイルス、レトロウイルス、アグロバクテリウム・ツメファシエンス (Agrobacterium tumefaciens) 由来のTiプラスミドなどのプラスミド、YACベクターおよびBACベクターから選択することができる。 20

【0026】

さらに、本発明によれば、少なくとも本発明による核酸分子を含有する宿主細胞が提供され、この宿主細胞は、核酸分子の発現に好適であり、さらには、必要であれば生じたポリペプチド分子のプロセッシングに好適な原核または真核細胞である。当技術分野では、膨大な数の原核および真核発現系が知られている。宿主細胞は、例えば、大腸菌 (E. coli) および枯草菌 (B. subtilis) などの原核細胞から選択してもよいし、真菌細胞、植物細胞、昆虫細胞および哺乳類細胞、例えばCHO細胞、COS細胞もしくはHeLa細胞またはその派生物などの真核細胞から選択してもよい。当技術分野では、例えばあるCHO産生株が知られており、これはCHO細胞に比べてグリコシル化パターンが変更されている。真核細胞は、好ましくは酵母サッカロミセス・セレビスエ、メチロトロフ酵母ハンセニューラ・ポリモルファ、二形性酵母アルクスラ・アデニノボランス (Arxula adeninivorans) または糸状菌ソルダリア・マクロスポラである。 30

【0027】

さらに、本発明によれば、以下の配列から選択されるアミノ酸配列を含んでなるポリペプチド分子が提供される：

(i) 配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9および/または配列番号10で表されるアミノ酸配列の一つ、および/またはこれらの配列の2以上の組合せを含むアミノ酸配列、 40

(ii) 配列番号4で表されるアミノ酸配列、

(iii) 配列番号4の第20アミノ酸～第119アミノ酸の配列に相当するアミノ酸配列、

(iv) 配列番号22で表されるアミノ酸配列、および

(v) 前記(i)、(ii)、(iii)または(iv)に示される配列に対して少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列。

【0028】

ここで、「少なくとも85%の同一性を有する」とは、周知の方法、例えばコンピュータ 50

ーによる配列比較 (Altschul et al., 1999) によって決定されるアミノ酸配列レベルでの一致をいう。

【0029】

ここで「同一性」とは、配列間の一一致によって決定される2以上のポリペプチド分子間の関連の程度を意味し、ここで一致という場合、同一としての一致と保存的アミノ酸置換の双方を意味するものとされる。「同一性」のパーセンテージは、ギャップその他の配列の特色を考慮した2以上の配列における同一領域のパーセンテージによって示される。

【0030】

「保存的アミノ酸置換」とは、その置換がポリペプチド分子の(空間的な)構造に極めて限定された影響しか及ぼさない、あるアミノ酸残基から別のアミノ酸残基への置換をいう。基本的に、天然に存在するアミノ酸は、物理化学的に異なる4つの群に分類される。アルギニン、リジンおよびヒスチジンは塩基性アミノ酸群に属する。グルタミン酸およびアスパラギン酸は酸性アミノ酸に属する。無電荷/極性アミノ酸には、グルタミン、アスパラギン、セリン、トレオニンおよびチロシンが含まれる。非極性アミノ酸には、フェニルアラニン、トリプトファン、システイン、グリシン、アラニン、バリン、メチオニン、イソロイシン、ロイシンおよびプロリンが含まれる。ここで、保存的アミノ酸置換は、示されたアミノ酸の、同じ物理化学群に属するアミノ酸による置換を意味する。

10

【0031】

関連のあるポリペプチド分子の相互の同一性は、周知の方法を参照して決定することができる。同一性決定の好ましい方法は、調べる配列間の最大一致に極めて近い値を示すものである。2つの配列間の同一性の決定のためのコンピュータプログラムとしては、GAPを包含するGCGプログラムパッケージ(Devereux, J., et al., Nucleic Acids Research 12(12) 387, 1984)、ウイスコンシン大学遺伝学コンピュータグループ(Genetics Computer Group university of Wisconsin, Madison WI)、BLASTP、BLASTNおよびFASTA(Altschul et al., 1990)が挙げられるが、これらに限定されるものではない。BLASTXプログラムはthe National Centre for Biotechnology Information (NCBI)から、または他の供給元(BLAST handbook, Altschul S. et al., NCB NLM NIH Bethesda MD 20894; Altschul et al., 1990)から入手できる。また、周知のSmith Watermanアルゴリズムも同一性の決定に使用できる。

20

30

【0032】

配列比較のための好ましいパラメーターとしては下記のものが挙げられる：

アルゴリズム: Needleman and Wunsch (1970);
 比較マトリックス: Henikoff and Henikoff (1992)のBLOSUM 62;
 ギャップペナルティー: 12;
 ギャップ長ペナルティー: 4;
 類似閾値: 0。

【0033】

また、GAPプログラムも上記のパラメーターとともに用いるのに好適である。上記のパラメーターは、アミノ酸配列比較の標準パラメーター(デフォルトパラメーター)であり、これによって末端のギャップが同一性の値を小さくすることはない。極めて短い配列の場合には、さらに、参照配列と比較する際に予測値を100, 000まで高め、ワードサイズを2に減らす必要があるかもしれない。

40

【0034】

その他のアルゴリズムの例として、プログラムハンドブック(ウイスコンシンパッケージ、バージョン9、1997年9月)に記載されているものをはじめ、ギャップ・オープニング・ペナルティー、ギャップ・エクステンション・ペナルティ、比較レンプレートを使用してもよい。何を選択するかは、実行される比較によって異なり、さらには、実行され

50

る比較が、G A PもしくはB e s t F i tが好ましいとされる配列対のものであるか、またはF A S T AもしくはB L A S Tが好ましいとされる配列および包括的データバンクの間のものであるかによって異なる。

【0035】

上記アルゴリズムによって得られる85%の一致は、本明細書において85%の同一性であるとされる。さらに高い程度の同一性は相応の妥当性を持つ。

【0036】

本発明の一つの実施形態によれば、本発明によるポリペプチド分子は、上記(i)、(ii)、(iii)または(iv)に示されるアミノ酸配列と少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%の同一性を有する配列を含む。配列番号12または配列番号13で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチド分子が特に好ましい。

10

【0037】

本発明の一つの実施形態によれば、本発明によるポリペプチド分子は、配列番号5、配列番号6および/または配列番号7で表されるアミノ酸配列を含む。配列番号5および配列番号6で表されるアミノ酸配列を含む本発明によるポリペプチド分子が好ましい。

【0038】

他の実施形態によれば、本発明により、本発明による少なくとも一つのポリペプチドを含んでなる融合タンパク質が提供される。

【0039】

少なくとも一つの神経ペプチドを含む、本発明によるポリペプチド分子の断片も同様に本発明に包含される。前記断片は、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9および/または配列番号10で表される少なくとも一つのアミノ酸配列を含むことが好ましい。配列番号5、配列番号6または配列番号7で表されるアミノ酸配列を有する断片が特に好ましい。また、本発明によるポリペプチド分子の断片は、例えばグリコシル化、リン酸化、アセチル化またはアミド化によって修飾されていてもよい。

20

【0040】

好ましくは、本発明によるペプチド分子、ペプチド分子の融合タンパク質または断片は、K o l l e r (2 0 0 1) に記載の条件下でのC a画像実験において、ラットまたはヒトの中樞神経系に由来する一次星状細胞および/またはニューロンにおける細胞内カルシウム濃度に1.5~10倍の上昇をもたらすことが示される。

30

【0041】

さらに、本発明によれば、本発明によるポリペプチド分子および/またはその断片の製造方法であって、発現および実行する可能性のあるプロセッシングに好適な条件下で本発明による宿主細胞を培養すること、ならびに、所望により、発現したポリペプチド分子または断片を精製すること、を含んでなる方法が提供される。あるいは、ポリペプチド分子およびその断片は、例えばM e r r i f i e l d合成および/または断片縮合などの化学的および酵素的合成によって得てもよい。化学的、酵素的および組換え作出法の組合せも同様に考えられる。

【0042】

さらに、本発明によれば、本発明のポリペプチド分子および/またはその断片に特異的な抗体が提供される。一般に、特異的抗体は、本発明によるポリペプチド分子または断片、好ましくは好適な高分子量担体分子(多くの場合タンパク質)と結合させたものを用いて、例えばマウスまたはウサギなどの実験動物を免疫化することによって作製することができる。この場合、免疫化は当技術分野で公知の好適なアジュバントによって促進することができる。モノクローナル抗体は、通常、免疫化したマウスから採取した脾臓細胞と腫瘍細胞とを融合し、生じたハイブリドーマを選択することによって得ることができる。効率的に特異的抗体を分泌するハイブリドーマは、生き残っているものを走査することにより判断することができる。あるいは、抗体は組換え技術によって製造してもよく、この組換え抗体の製造では、ハイブリドーマ細胞またはBリンパ球からmRNAを単離し、これに基づいて対応するcDNAを合成し、PCRにより増幅させる。好適なベクター内へ連結

40

50

し、好適な宿主細胞へ挿入した後、細胞培養残渣または細胞溶解物から回収することができる。組換え抗体により抗体の「ヒト化」が可能であり、その結果、免疫原性が小さくなる。適切な方法は当技術分野で周知である。

【0043】

生物試料における本発明によるポリペプチド分子および/またはその断片の検出において、本発明によれば、ポリペプチド分子および/またはその断片に特異的な試薬を該試料に接触させ、これらの結合を検出することを含んでなる、*in vitro*における方法が提供される。

【0044】

さらに、本発明によれば、本発明によるポリペプチドおよび/または断片に特異的な少なくとも一種の試薬を含んでなる、ポリペプチドまたはその断片を検出するためのテストキットが提供される。このような特異的試薬の例としては、抗体、抗体フラグメント、例えばFabもしくはF(ab)₂フラグメントまたは抗体誘導体があり、そのうち、抗体が特に好ましい。抗体、抗体フラグメント、例えばFabもしくはF(ab)₂フラグメントまたは抗体誘導体は、モノクローナル起源であってもポリクローナル起源であってもよい。

10

【0045】

さらに、本発明によれば、生物試料中の本発明によるポリペプチド分子をコードする核酸を*in vitro*で検出する方法が提供され、該方法は、前記試料に、検出可能な標識を有する本発明による核酸分子および/またはその断片を接触させる工程、ならびに前記標識を検出する工程を含んでなる。

20

【0046】

さらに、本発明によれば、本発明による少なくとも一種のポリペプチド分子および/もしくはその断片、ならびに/または前記ポリペプチド分子または前記断片の医薬上許容される塩を含有する医薬組成物が提供される。これらの医薬組成物は、医薬上許容される賦形剤および/または希釈剤を含んでもよい。好適な賦形剤または希釈剤は当技術分野で周知である。静脈内、皮下または筋肉内投与に好適な医薬組成物が好ましい。本発明による医薬組成物の一つの実施形態によれば、該組成物はまた、本発明による1以上のポリペプチド分子またはその断片の他、少なくとも一種の抗体を含有する。

30

【0047】

本発明によれば、これらの医薬組成物は、脱髄性疾患(*demyelinating disease*)もしくは神経変性疾患(*neurodegenerative disease*)、または神経系の発達障害(*developmental disorder*)の治療に使用できる。本発明による医薬組成物のさらなる用途としては、ヒトにおけるHIV感染症、特にHIV脳症の予防または治療がある。同様に、本発明は、造血系、免疫系ならびに心臓・循環系の疾病の治療のための本発明による医薬組成物の使用を包含する。

40

【0048】

本発明によるポリペプチド分子および/またはその断片に特異的な少なくとも一種の試薬を含有する医薬組成物も、本発明に包含される。この試薬は、好ましくは抗体である。このような医薬組成物は、脱髄性疾患もしくは神経変性疾患、または神経系の発達障害の診断または治療に使用できる。他の用途としては、ヒトにおけるHIV感染症、特にHIV脳症の診断または治療がある。

【0049】

以下に示す図面および実施例により、本発明を説明する。

【0050】

実施例

実施例1：SDF-1のクローニングおよび配列解析

50

A . 材料および方法動物実験

成体ウイスターラット (体重 200 ~ 250 g) をクロラール水和物 (350 ml / 体重 kg) の腹腔内投与により麻酔した。大腿上部の坐骨神経を鉗子で一時的に圧迫した (Muller et al., 1986)。この神経経路から RNA を得るため、創傷の前後 2 ~ 3 mm の組織を摘出し、処置した。動物に対する試験は総て、ドイツ動物保護法の指針に従って行った。

【0051】

RNA の単離

ラット組織からの全 RNA をフェノール - グアニジン - チオシアネート法 (Chomczynski and Sacchi, 1987) によって単離した。凍結組織標本を、ポリトロン (Brinkmann, Westbury, USA) を用いて、2500 rpm で 45 秒間の均質化を 2 回行なった。ポリ A⁺ RNA を、オリゴ (dT) セルロースクロマトグラフィー (Sambrook et al., 1988) により単離した。

【0052】

cDNA 遺伝子バンクの構築

cDNA 遺伝子バンクの構築のため、成体マウスの坐骨神経由来の 4.5 μg ポリ A⁺ RNA を鋳型として用い、オリゴ (dT)₁₂₋₁₈ をプライマーとして用いた。cDNA は TimeSaver cDNA 合成キット (Pharmacia LKB, Piscataway, NJ) を用いて作製した。この cDNA を、ギガパック II パッケージング抽出液 (Stratagene) を用いて、EcoRI で予め切断しておいた -ZAP II ファージ粒子に連結することにより結合させた。得られた cDNA 遺伝子バンクの評価の結果、約 0.5 × 10⁶ の複雑性が得られた。遺伝子バンクのスクリーニングは、rSDF-1 の 3' 非翻訳領域 (ヌクレオチド 743 ~ 1368) 由来の放射性標識 DNA 断片を用いて、標準的な方法により行った (Sambrook et al., 1969)。

【0053】

オリゴヌクレオチド

下記のオリゴヌクレオチドを、Gene Assembler Plus Synthesator (Pharmacia, Piscataway, NJ) を用いて合成した：

MMSE2 : 5' - ACGCCATGGACGCCAAGGTCG - 3' (配列番号 19) (rSDF-1 - cDNA のヌクレオチド 49 ~ 69 に相当)；

GAS2 : 5' - ACTGTAAGGAAGACCCCTCTCTCACCC - 3' (配列番号 20) (SDF-1 のヌクレオチド 2327 ~ 2303 に相当)；

GAS3 : 5' - GTTGAGACTATGCATCGACTCCAAC - 3' (配列番号 21) (SDF-1 のヌクレオチド 2576 ~ 2552 に相当)。

【0054】

DNA 配列の決定および解析

隣接領域を含む SDF-1 および SDF-1 中の 2.5 Kb 長の挿入物の cDNA 両鎖を、T17 シーケンシングキット (Pharmacia - LKB) を用いたジデオキシ - DNA シーケンシング法 (Sanger et al., 1977) によって配列決定した。

これらの配列は RT-PCR 反応からの他の独立したクローンを配列決定することにより確認した。FASTA (Pearson 1980) および BLAST (Altschul et al., 1990) プログラムを用い、データを EMBL データバンクと比較した。これらの配列のさらなる包括的解析を、PCGENE ソフトパッケージ (Intelligenetics, Mountain View, CA) を用いて行った。

【0055】

RT-PCR

1.5 μg の全 RNA および逆転写酵素 Superscript (Gibco, Gai 50

thersburg)を用い、製造業者の説明書に従って逆転写を行った。最初のcDNA鎖をRNアーゼH(Boehringer Mannheim)で消化し、さらにAmplitaqポリメラーゼ(Pertkin Elmer)またはPfuポリメラーゼ(Stratagene, La Jolla)(SDF-1用)によるPCR増幅の鋳型としてその1/10量を用いた。

【0056】

B. SDF-1 のクローニングおよびシーケンシング

神経病巣の後に示差的に発現する遺伝子の同定のために、ラット坐骨神経から作製した遺伝子バンクから、2174ヌクレオチドを有するcDNAクローンNT-I-15を単離した。NT-I-15クローンの配列解析により、このクローンがマウスSDF-1-cDNAの3'非翻訳領域(UTR)(Tashiro et al., 1993参照)と86%の相同性を有することが示された。ストリンジェントな洗浄条件下でのノーザンブロット試験では、NT-I-15は成体ラットの坐骨神経からの2つの転写産物とハイブリダイズした(図2)。小さい方の転写産物は約3Kbの大きさのSDF-1 mRNAに相当し、5.5Kbの大きい転写産物は未知であった。この転写産物をSDF-1と呼んだ。

10

【0057】

両転写産物の完全クローンの単離は、遺伝子バンクをスクリーニングすること、および逆転写PCR(RT-PCR)の方法によって行なった。ラットの坐骨神経に由来する遺伝子バンクの、ラットのSDF-1の3'UTR領域のヌクレオチド734~1368に相当する、NT-I-15クローンの626ヌクレオチド長のcDNA断片を用いたスクリーニングにより、2819ヌクレオチドの長さを有する完全cDNAクローンが回収され、これにはSDF-1の全コード領域が含まれていた。

20

【0058】

NT-I-15の626ヌクレオチド長のcDNA断片を用いたcDNA遺伝子バンクの再度のスクリーニングにより、約3400ヌクレオチドのSDF-1不完全クローンを回収し、これはSDF-1の全3'UTR領域および最後の4コドン(90~93)だけでなく、コドン90の上流に約1Kbの長さの新しい(非コード)配列を含んでいた。次に、ノーザンブロットで同定された5.5Kbの長さの転写産物が、SDF-1のコドン89と90の間の2.5Kb長の挿入物によって作出される、選択的にスプライシングされたイソ型を表すものと仮定した。この仮説を実証するため、SDF-G6クローンの5'末端において新たな配列に特異的なアンチセンスプライマー(プライマーGAS2およびGAS3)およびSDF-1の翻訳開始部位に相当するセンスプライマー(プライマーMNSE2)を用いたRT-PCRにより、新たな配列を作出した。増幅されたPCR断片の配列決定により、コドン89から下流の転写産物がSDF-1以外の配列を有することが示された。この転写産物は、119アミノ酸のペプチドをコードしており、その最初の89アミノ酸はSDF-1およびの最初の89アミノ酸と同一であった。その後のノーザンブロット解析では、得られた配列が5.5Kb長の転写産物を示すことが確認された。SDF-1およびに共通の3'領域に由来する(図2A)、またはコード領域の全5'領域のSDFイソ型の総てに共通の5'領域に由来するcDNAプローブ(図2B)は3Kb長の(SDF-1)転写産物および5.5Kb長の(SDF-1)転写産物の双方とハイブリダイズしたが、2.5Kb長の挿入物に特異的なcDNAプローブは5.5KbのSDF-1転写産物のみとしかハイブリダイズしなかった(図2C)。ラットの坐骨神経では、1.5Kb長のSDF-1-mRNAは検出することができなかった。

30

40

【0059】

ラットのSDF-1cDNAの両鎖を配列決定した。SDF-1については、2572ヌクレオチド長の新たな挿入物および既知のSDF-1を有する隣接領域を、同様に重ねて配列決定した。SDF-1に関して導き出されたアミノ酸は、理論分子量10.5Kdを有する93アミノ酸のペプチドであった。最初の19のアミノ酸はタンパク質分

50

泌に関するシグナルペプチドである。SDF-1 に関して導き出されたアミノ酸配列は、SDF-1 の最初の89のアミノ酸残基とSDF-1 とは相同性を示さないカルボキシ末端領域の30の付加的アミノ酸を含む(図3と比較)。119アミノ酸長のSDF-1 ペプチドの理論分子量は13.5Kdである。ラットのSDF-1 のアミノ酸配列は、対応するマウスタンパク質と強い相同性(96.8%)を示す(保存的アミノ酸置換を考慮すると98.9%)。新しいSDF-1 イソ型であるSDF-1 およびSDF-1 と既知のSDF-1 配列の比較は図4に示されている。

【0060】

実施例2：種々の組織および発達段階でのSDF-1 およびSDF-1 mRNAの検出

10

A. ノーザンプロット解析

各10 μ gの全RNAを、15%ホルムアルデヒドを含有する1.2%アガロースゲルにて分画し、次に、Nytran NY13 N-メンブラン(Schleicher and Schull, Keene, NH)へ常法により転写した。これらのフィルターにUV照射し、メチレンブルーで染色し(Sambrook et al., 1989)、0.5Mリン酸ナトリウム溶液中7%SDSとプレハイブリダイズさせ、同じ溶液中で³²P標識cDNAプローブ1~5 \times 10⁶cpm/mlとハイブリダイズさせた。(i)SDF-1 / の全3'UTR領域(SDF-1 のヌクレオチド743~1368)、(ii)SDF-1 イソ型の総てをコードする全領域(ヌクレオチド49~239)および(iii)SDF-1 特異的挿入物の1702ヌクレオチド長セグメント(SDF-1 cDNAのヌクレオチド625~2357)に相当するcDNA断片を一方向PCRにより放射性標識した(Sturzl et al., 1991)。ハイブリダイゼーション後、これらのフィルターを2 \times SSC/1%SDS中60 $\frac{1}{2}$ で少なくとも15分間、さらに0.1 \times SSC/1%SDS中60 $\frac{1}{2}$ で少なくとも15分間洗浄した。これらのフィルターをX線フィルム(X-Omat, Kodak)に露光するか、あるいはBAS1050バイオイメージャー(Fuji)で直接定量した。

20

【0061】

B. 種々の組織でのSDF-1 およびSDF-1 mRNAの検出

図5Aに示されるノーザンプロットハイブリダイゼーション試験を、³²P-dCTPで放射性標識した、成体ラットの種々の組織に由来する全RNAおよびSDF-1 / の全3'UTR領域由来の602ヌクレオチド長の断片を用いて行った。SDF-1 およびSDF-1 mRNAの種々の組織間の分布は相補的パターンを示した。イソ型は主として肝臓、腎臓、脾臓および胸腺で検出されたが、SDF-1 は主として心臓および肺の組織、ならびに神経系の成熟組織に見られた(図5)。SDF-1 転写産物が主としてとりわけ胚および新生の脳組織ならびに坐骨神経点に見られるということは、神経系の発達中のSDF-1 発現の示差的調節を示している。SDF-1 もSDF-1 も筋肉および精巣組織では検出できない。

30

【0062】

C. 発達過程における脳および坐骨神経でのSDF-1 およびSDF-1 mRNAの検出

40

脳：

SDF-1 およびSDF-1 の発達段階に特異的な分布の検討のために、ラットの種々の発達段階(17日胚(E17)から成体ラットまで)における脳組織由来のRNAを、SDF-1 / の共通3'UTR領域の602ヌクレオチド長断片を用いて試験した。E17胚の脳組織では、主としてSDF-1 mRNAが検出されたが、この転写産物量は年齢が増すとともに少なくなり、成体ラットの脳組織では検出できなかった。これに対し、SDF-1 転写産物の量はE17胚では極めて低く、徐々に増え、成体ラットでは最大に達した(図5B)。

【0063】

坐骨神経：

50

種々の発達段階（出生後1日（P1）から完全成長の齢に達するまで）のラットの坐骨神経から全RNAを単離した。P1では、SDF-1 mRNAが少量検出され、この転写産物量はP4～P7段階において上昇し、成体ラットの神経組織では検出限界以下に低下した（図5C）。

【0064】

このようにSDF-1 およびSDF-1 mRNAは、発達中および成体ラットの神経系で異なるパターンを示すようである。SDF-1 イソ型は主として胚または周産期の中枢および末梢神経系に見られるが、SDF-1 は成体ラットの神経系で最も重要な変異体である（図5B、C）。出生後4日から7日の間はグリア細胞の分化およびニューロンの成熟が始まるが、この期間では、SDF-1 とSDF-1 はほぼ同等の量であるようである。

10

【0065】

D. 坐骨神経の病変後のSDF-1 とSDF-1 mRNAの検出

圧迫によって坐骨神経を損傷させた後、神経遠位端でSDF-1 とSDF-1 とのmRNAパターンの小さな変化を観察した。放射性ノーザンプロットフィルターの「多重定量的イメージング」により、SDF-1 量の一時的上昇を測定したところ、神経圧迫後2日で最大175%に達し、その後、圧迫後7日までにレベルが下がり、対照と同レベルになった。試験によれば、神経病変後のSDF-1 mRNAには有意な変化は見られなかった。

【0066】

実施例3：in situハイブリダイゼーションによるSDF-1 転写産物の細胞局在

20

A. in situハイブリダイゼーション

組織標本をTissue Tec II (Miles, Napperville, IL) に包埋し、メチルブタン中で-70℃にて凍結させ、厚さ20μmの切片とした。これらの切片を固定した後、アセチル化し、Angerer et al. (1987) に従って55℃で4時間プレハイブリダイズさせた。(i) SDF-1 / の全3' UTR領域のサブクローン(SDF-1 のヌクレオチド1758～2199)、(ii) 全5' UTRおよびコード領域の、SDF-1 全イソ型総てのサブクローン(SDF-1 cDNAのヌクレオチド1～596)、および(iii) SDF-1 特異的挿入物のサブクローン(SDF-1 cDNAのヌクレオチド661～1313)のin vitro転写産物を、ジゴキシゲニンUTPを用いて、Boehringer MannheimのDIG-RNA標識キットにより作製した。55℃で一晩ハイブリダイズさせた後、RNアーゼ処理(0.6M NaCl、20mMトリスHCl、2mM EDTA、pH 8中20μg/ml)を37℃にて20分間行った。次に、これらの切片に対し、2×SSCを用いた各回50秒での20分間の洗浄を3回、および0.2×SSCを用いた各回50秒での20分間の洗浄を3回行った。ジゴキシゲニンの検出は、製造業者(Boehringer Mannheim)の説明書に従って行った。

30

【0067】

B. SDF-1 転写産物の細胞局在

in situハイブリダイゼーションのために、(a) SDF-1 / の共通3' UTR領域、(b) SDF-1 イソ型の総てに共通のコードおよび5' UTR領域および(c) SDF-1 特異的挿入物からのアンチセンス転写産物をジゴキシゲニン-UTPで標識した。センス転写産物を陰性対照として用いた。

40

【0068】

成体ラットのCNSでは、有随神経相でも、例えば脳梁でも、大脳灰白質を有する領域で乏突起神経膠細胞の「パールネックレス」様の列として、強く、そして明瞭なハイブリダイゼーションシグナルが見られた（図5A、B）。他のハイブリダイゼーションシグナルは、特に、小脳のプルキニエおよび顆粒ニューロン（図6D、E）、海馬の錐体および顆粒ニューロン（図6G、H）、ならびに新皮質の総ての主要層のニューロン（図7A、B

50

）に関連して見られた。対応するセンス転写産物では、ハイブリダイゼーションシグナルは見られなかった（SDF-1 のセンスプローブについては図6C、F、Iを参照）。

【0069】

SDF-1 特異的アンチセンス転写産物で得られたシグナルは、全SDF-1 アンチセンスプローブで得られたハイブリダイゼーションパターンと殆ど同一であったが、このことはSDF-1 イソ型が成体ラットの脳のニューロンおよび乏突起神経膠細胞で発現することを示す。SDF-1 転写産物は、成体ラットの脳に存在する限りにおいて、SDF-1 と同じ領域および細胞集団に存在するようである。

【0070】

成体ラットの坐骨神経の縦方向の切片では、SDF-1 / の全3'領域からのアンチセンスプローブにより、軸索相近傍のシュワン細胞の典型的な形を示唆する紡錘形ハイブリダイゼーションシグナルが生じた（図8A、B）。坐骨神経の横方向切片のS-100免疫活性とハイブリダイゼーションシグナルとの局在の一致（矢印参照）により、シュワン細胞におけるSDF-1 / の発現が確認された（図8D、E）。SDF-1 特異的アンチセンスプローブを用いて成体ラットの坐骨神経の標識パターンを得ると（図8H）、これはSDFイソ型の総てに共通のアンチセンス転写産物のハイブリダイゼーションパターン（図8G）を強く示唆した。SDF-1 RNA（およびおそらくはSDF-1 イソ型も）は、坐骨神経のシュワン細胞でも（矢印参照）液胞細胞でも（図8G、Hの右上の隅参照）生じる。in situハイブリダイゼーション試験の結果は図2および図3のノーザンブロット試験の結果と一致する。SDF-1 mRNAは、成体ラットの脳または坐骨神経のいずれにおいても、SDF-1 特異的3'領域由来のアンチセンス/センス転写産物によって検出されなかった。

【0071】

実施例4：ハンセニューラ・ポリモルファにおけるSDF-1 産物の発現

A. hSDF-1 構築物

ハンセニューラ・ポリモルファにおけるSDF-1 の発現のため、Hisタグに対する良好な分析的近似を得ることを目的として、3つの異なる構築物を作製した。これらの構築物は図13に示されている。

【0072】

1. M-mhSDF-1 - H6（メチオニン/成熟ヒトSDF-1 / Hisタグ）。この融合タンパク質では、成熟ヒトSDF-1 の配列（配列番号12のアミノ酸20~119）がN末端メチオニン残基の端部に配置されている。リーダー配列は存在しないので、細胞質局在が予測された。C末端には6個のヒスチジン残基（Hisタグ）が配置されている。

【0073】

2. hSDF-1 - H6（成熟ヒトSDF-1 / Hisタグ）。この構築物は、SDF-1 のアミノ酸1~119（配列番号12）の後にC末端Hisタグを含む。これは結果としてヒト細胞で公知の天然リーダー配列を含んでなる。リーダー配列は異種宿主細胞でも認識されることがあるので、H.ポリモルファが原型のSDF-1 リーダーペプチドを認識するかどうかはこの構築物で調べられる。

【0074】

3. MF - mhSDF-1 - H6（サッカロミセス・セレピシエ由来接合因子 のプレプロ配列/成熟ヒトSDF-1 / Hisタグ）。H.ポリモルファで用いられることの多い、関連の醸造酵母サッカロミセス・セレピシエ由来の接合因子 のプレプロ配列の端部に、成熟SDF-1 の配列（配列番号12のアミノ酸20~119）を配置した。この構築物は、H.ポリモルファによる分泌に適している。

【0075】

B. 発現プラスミドの構築

プラスミドSDF-1 - PCR II - TOP Oは439bp長のSDF-1 挿入物を含んでおり（図14）、基本構築物として用いた。第一のステップでは、C末端Hisタグ

グの6個のコドンをhSDF-1配列に包含させた(hSDF-1-H6、図15)。

【0076】

H.ポリモルファにおけるSDF-1構築物の後の発現のための基本ベクターとして、発現される外来遺伝子がFMDプロモーターの制御下にある組込型プラスミドpFPMT121(Gellissen, 2000)を挿入した。このプラスミドを基に、以下の発現ベクターを構築した。

【0077】

1. pFPMT-M-mhSDF-1-H6。PCRにより、SDF-1のコード配列がEcoRI制限切断部位(開始コドンの前)およびBamHI制限切断部位によって挟まれたDNA断片を作製した。PCRII-TOPO(Invitrogen, Groningen, NL)中のhSDF-1-H6を鋳型として用いた。このPCR産物をEcoRI/BamHIで消化し、pFPMT121プラスミドの対応する部位の間にクローニングした。得られたプラスミドpFPMT-M-hSDF-1-H6の地図は図16に示されている。

【0078】

2. pFPMT-hSDF-1-H6。この構築物でも、EcoRI制限部位およびBamHI制限部位で挟まれたPCR産物をまず構築したが、その際、PCRII-TOPO中のhSDF-1-H6を再び鋳型DNAとして用いた。このPCR産物をEcoRIおよびBamHIで消化し、pFPMT121プラスミドの対応する部位の間にクローニングした。得られたプラスミドpFPMT-hSDF-1-H6の地図は図17に示されている。

【0079】

3. pFPMT-MF-mhSDF-1-H6。このプラスミドの作製のため、2つの異なるPCR産物を構築した(図18参照)。最初のPCR産物(PCR1A)は、EcoRI制限部位(開始コドンの前)ともう一方の末端では成熟hSDF-1配列の最初のコドンと相同性を有する塩基に挟まれた接合因子のプレプロ配列のコドンを含んでいた。もう一つのPCR断片(PCR1B)は、最前部では接合因子のプレプロ配列の最後部と相同性を有する塩基が隣接し、最後部ではBam-I制限部位(停止コドンの末端)が隣接した成熟hSDF-1の配列を含む。次に、上記のPCR1AおよびPCR1Bの両産物を混合してさらなるPCR反応を行った。プライマーとして、PCR1A由来のフォワードプライマー(EcoRI制限部位を含む)とPCR1B由来のバックワードプライマー(Bam-I制限部位を含む)を用いた。得られたPCR産物は、EcoRI(開始コドンの前)およびBamHI(停止コドンの後)で挟まれ、mhSDF-1の配列と融合した接合因子のプレプロ配列を含んでいた。EcoRI/BamHIで消化した後、その断片をpFPMT121プラスミドの対応する制限部位の間にクローニングした。得られたプラスミドpFPMT-MF-mhSDF-1-H6の地図は図19に示されている。

【0080】

C. 作製した発現ベクターでのH.ポリモルファの形質転換株の作出および同定

エレクトロポレーション用のコンピテントH.ポリモルファ細胞の作製のため、5mlのYPD培地をH.ポリモルファRB11の単一コロニー(odc、オロチジン-5-リン酸-デカルボキシラーゼ欠損(ウラシル栄養要求性)H.ポリモルファ株(Weydemann et al., 1995))とともにインキュベートし、37°Cで16時間振盪した。次に、2L容エルレンメヤーフラスコにて100mlのYPD培地にこの前培養物3mlを接種し、37°CにてOD₅₀₀が0.8~1となるまでインキュベートした(振盪数140rpm)。細胞の回収は、ベックマン遠心分離機にて50mlファルコンチューブで培養物を遠心分離(4000rpm、6分)ことにより行った。上清を除去した後、細胞を20mlの50mMリン酸カリウムバッファー(pH7.5、予め37°Cに温

めたもの)に再懸濁し、0.5 mlの1 M DTTと混合し、35 で15分間インキュベートした(水浴中)。

【0081】

この細胞を再び遠心沈降させた後(3000 rpm、10分、ベックマン遠心分離機)、100 ml、次いで50 mlのSTMバッファー(270 mMサッカロース、10 mMトリス-HCl pH7.5、1 mM MgCl₂)中で洗浄した。さらに遠心分離した後、細胞を0.5 mlのSTMバッファーに再懸濁し、そのまま60 µlアリコート成形質転換に用いるか、-70 でその後使用するまで冷凍保存した。

【0082】

H. ポリモルファのコンピテント細胞を、以下のように、構築した(上記)3種の発現プラスミドで形質転換した:コンピテントH. ポリモルファ60 µlと1~2 µlの導入用環状プラスミドDNAを混合し、2 mm幅のエレクトロポレーションキュベットに移した。エレクトロポレーションは2 kV、25 µFおよび200 オームで行った。次に、細胞を1 mlのYPD培地が入った試験管に移し、37 にて1時間振盪した(傾斜角45°、160 rpm)。この回収の後、細胞各330 µlをYNB寒天プレート(1%グルコース、ウラシルを含まない)にプレティングした。これらのプレートを、37 で、肉眼でウラシル原栄養体コロニーが見えるようになるまでインキュベートした(約1週間)。

【0083】

この際、36個の各ウラシル原栄養体コロニーを4回の継代と2回の安定化によって安定株とした。継代培養では、各2 mlのYNB培地(1%グルコース)に形質転換プレートに由来する単一のウラシル原栄養体コロニーを接種し、37 で2日間インキュベートした(傾斜角45°、振盪数160 rpm)。得られた培養物各150 µlを2 mlの新鮮YNB培地に移し、再び2日間インキュベートした(上記参照)。この操作を4回行った(すなわち、4回継代培養)。安定化のため、最新の継代培養物からの培養物各150 µgを2 mlのYPD培地に移し、37 で2日間インキュベートした(上記参照)。次に、これらの培養物のアリコートをYNB寒天プレート(ウラシルを含まない)にプレティングした。培養ごとに一コロニーを単離し、これを一株とした。

【0084】

D. SDF-1 産物の発現の誘導および検出

単離後、総ての株に対してMeOH誘導を行い、可溶性細胞内画分を、hSDF-1 産物の含量に関して、ウエスタンブロット法によって解析した。まず、10 ml容試験管にて各2 mlのYPD培地に試験する単一コロニー株を接種した後、外来遺伝子の発現を誘導するため、37 にて16時間インキュベートした(傾斜角45°、振盪数160 rpm)。次に、得られた濃厚な増殖培養物150 µlを接種物として各々3 mlのYNB培地(1%グリセリン)にプレティングした。37 で24時間振盪した後、細胞を遠心沈降させ、各々3 mlのYNB培地(1%MeOH)中に再懸濁した。次に、再び37 にて24時間振盪することにより、外来遺伝子の発現を誘導した。

【0085】

誘導培養物に由来する細胞を遠心分離した後、上清のアリコートを4 x SAB(8% w/v SDS、40% w/vグリセリン、8 mM EDTA pH6.8、250 mMトリス pH6.8、0.4% w/vブロムフェノールブルー、40% v/v -メルカプトエタノール)と混合し、95 で5分間変性させて培養上清を調製した。

【0086】

細胞内可溶性画分の調製のため、以下のステップを氷上または4で行った。誘導培養物由来の細胞ペレットを各々500 µlの抽出バッファー(50 mMトリス pH7.5、150 mM NaCl、0.1% v/vトリトンX100またはPBSバッファー)に再懸濁し、各々12.5 µlのPMSFと混合した。次に、これらの試料を、1.5 ml容エッペンドルフ管に移した。500 µlのガラスビーズを加えた後、Vibraxを用いて2500 rpmにて細胞破碎を行った。この上清を新しいエッペンドルフ管に移し、1

0, 000 rpmにて10分間遠心分離した(冷却機能を備えたエッペンドルフ遠心機)。この遠心分離上清はいわゆる可溶性細胞内画分と呼ばれる。直接タンパク質ゲル電気泳動のため、これらを1/4量の4xSABと混合し、95 で5分間変性させるか、後に使用するまでSABを加えずに-20 で冷凍保存した。

【0087】

PNGアーゼF消化のため、各8 μ lの無処理の細胞内可溶性画分を1 μ lの1%SDSと混合し、95 にて5分間インキュベートした。次に、1 μ lのPNGアーゼF(2u、Roche)または水を加えた。37 で16時間インキュベートした後、4 μ lの4xSABを加え、試料を95 で5分間変性させ、タンパク質ゲル上で分離した。

【0088】

タンパク質ゲル電気泳動による変性試料の分離は、説明書の記載に従って4~20%トリシン-SDSゲル(Novex)にて行った。次に、これらのタンパク質バンドを、説明書の記載に従ってSemi-Dry-Blot装置(Trans-Blot SD; Bio-rad)にてニトロセルロースメンブランに転写した。ウエスタンブロットのため、マウス由来のHisタグ特異的モノクローナル抗体(RGS-His-Antikörper, Qiagen, Hilden, BRD)またはヤギ由来SDF-1特異的ポリクローナル血清(SDF-1(C19); #sc6193; Santa Cruz Biotechnology, USA)を一次抗体(血清)として用いた。ウエスタンブロットは、製造業者の説明書に従い、ウエスタン・ブリーズ・キットマウスまたはヤギ(Novex)を用いて行った。

10

20

【0089】

このように、有意な量の特定のhSDF-1-H6誘導体を産生した株を、3種の構築物の各々に関して同定することができた。各場合でさらなる産物の解析のため、最も生産性の高い株を選択した。pFPMT-M-mhSDF-1-H6ではg7-5/36株が、pFPMT-hSDF-1-H6およびpFPMT-MF-mhSDF-1-H6ではg8-28/7株およびg9c-20/6株がそれぞれ選択された。

【0090】

E. 産物の解析

g7-5/36株、g8-28/7株およびg9c-20/6株の培養上清では、ウエスタンブロットによって分泌SDF-1産物は検出できなかった。これらの株の細胞内可溶性画分では、SDF-1産物はマウス由来のHisタグ特異的抗体でも、ヤギ由来のSDF-1特異的血清(SDF-1(C19); #sc6193; Santa Cruz Biotechnology, USA)でも同定することができた(図20A、B参照)。対照株(SDF-1を含まない)の細胞内可溶性画分は、SDF-1産物と同定される産物を示さなかった(図20、トラック8(A)、トラック1(B))。

30

【0091】

ウエスタンブロットで認められた主要なSDF-1産物の分子量は、一般に、理論分子量よりもいく分か高い。M-mhSDF-1-H6:理論値12,692kDa、測定値約16kDa(図20、トラック2および3(A);トラック3および4(B));hSDF-1-H6:理論値14,529kDa、測定値約17kDa(図20、トラック4および5(A)、トラック5および6(B));MF-mhSDF-1-H6:理論値21,468kDa、測定値約30kDa(図20、トラック6および7(A)、トラック7および8(B))。主要バンドは、Hisタグ特異的抗体でも、SDF-1特異的血清でも検出可能であることから、これらのバンドに属するタンパク質はC末端に組み込まれているはずである。さらに、種々の産物の見掛けの分子量は、推定される相対順序M-mhSDF-1-H6 < hSDF-1-H6 < MF-mhSDF-1-H6(図20)を示す。

40

【0092】

M-mhSDF-1-H6およびhSDF-1-H6のアミノ酸配列は、潜在的なN-グリコシル化部位を含まない。従って、PNGアーゼF消化は特定の主要産物バンドの

50

見掛けの分子量に影響を及ぼさない(図20、トラック2/3および4/5(A)、トラック3/4および5/6(B))。MF - mhSDF - 1 - H6はMF プレプロ配列の領域に3つのグリコシル化部位を持ち、これは典型的にはER*においてN-グリコシル化をもたらす。PNGアーゼF消化の後、見掛けの分子量30kDaの産物が誘導されないことは、この産物において関連するものはERに組み込まれていないプレプロ産物であることを示す(図20、トラック6/7(A)、トラック7/8(B))。30kDaより上に、3つの弱いPNGアーゼF感受性バンドが存在するが(トラック7(B))、これはN-脱グリコシル化の後に30kDaより下へ移動する(トラック8(B))。これらのバンドはプロ配列におけるMF - mhSDF - 1 - H6のN-グリコシル化プロ型として説明することができ、ERに入る際には、これからプレ配列が切断される。

10

【0093】

実施例5：神経細胞およびグリア細胞のカルシウム濃度に対する組換えヒトSDF - 1の作用

この実施例では、神経細胞およびグリア細胞中のカルシウム濃度に対する、ハンセニューラ・ポリモルファの細胞抽出液中の組換えヒトSDF - 1 (M - mhSDF - 1 - H6)の効果を調べる。カルシウム濃度の評価のため、カルシウムイメージング法を用いた(Koller et al., 2001参照)。

【0094】

カルシウムイメージング実験のため、ラット(ウイスター系)の一次星状細胞および一次皮質ニューロンを、新生ラット(生後0~1日;星状細胞)から、あるいはラット胚(15日目の胚;皮質ニューロン)から調製し、Koller et al. (2001)に記載のようにして培養した。培養5~15日後、in vitroにて細胞にカルシウム指示薬Fura - 2を1時間かけて充填した。細胞内のFura - 2は、遊離のカルシウムと反応して、Fura - 2(380nm)とは異なる吸収波長(340nm)を有するFura - カルシウムを形成する。吸光度(F340/F380)により相対的細胞内カルシウム濃度を求め、グラフで表すことができる。この方法により、細胞外刺激(例えば、リガンド/受容体相互作用)によって誘起される細胞内カルシウム濃度の変化を検出することができる。

20

【0095】

図21はカルシウムイメージング実験の結果を示しており、星状細胞におけるカルシウム濃度に対するSDF - 1 およびSDF - 1 の作用が比較されている。SDF - 1 (50nM、R&D Systems, Wiesbaden, BDR)の適用後、培養星状細胞のカルシウム濃度は上昇する(図21A)。組換えSDF - 1 を含む酵母細胞抽出液の適用後(M - mhSDF - 1 - H6)(全タンパク質36pg)、培養星状細胞では細胞内カルシウムが上昇する(図21B)。しかし、この応答は、SDF - 1 に対する応答よりもさらに若干制限されている。

30

【0096】

対照抽出液の適用後(挿入部を含まないpFPMT121プラスミドで形質転換されたH・ハンセニューラRB11細胞の細胞抽出液に由来するタンパク質22.4μg)、培養星状細胞の細胞内カルシウムの上昇は見られない(図21C)。

40

【0097】

図21Dは、SDF - 1 および対照抽出液を用いた細胞内カルシウムにおける上昇の、SDF - 1 によって誘起されるカルシウム上昇との比較における定量評価を示している。

【0098】

さらに、CXCR4特異的抗体(モノクローナル抗体12G5; R&D Systems, Wiesbaden, BRD)による細胞のプレインキュベーションが上記のカルシウム応答を低下させ得るかどうかを、従前にSDF - 1 により誘導されたカルシウム反応に関して観察されたようにして(カルシウムイメージング実験の詳細な方法論についてはKoller et al., 2001を参照)試験した。

50

【0099】

図22は、CXCR4に対する抗体を含まない(A)および含む(B)SDF-1に関する星状細胞におけるカルシウムイメージング実験の結果を示している。図23は、SDF-1に関する対応する実験の結果を示している。SDF-1の適用後(50nM、R&D Systems, Wiesbaden, BRD)、培養星状細胞の細胞内カルシウム濃度は急激に上昇する(図22A)。しかし、モノクローナル抗体12G5と5分間プレインキュベートした後にSDF-1を加えると、培養星状細胞は約50%低下した細胞内カルシウム流出を示す(図22B)。これらの結果は文献における知見と一致するものであり、中枢神経系由来の星状細胞の細胞内カルシウム濃度に対するSDF-1または-1の影響がCXCR4受容体により媒介されていることを実証するものである。 10

【0100】

組換えSDF-1(M-mhSDF-1-H6;PBSバッファー中の細胞内容物)を含む35μgの酵母抽出液を適用した後、培養星状細胞では測定可能なカルシウム上昇がもたらされる(図23A)。SDF-1の場合とは違って、CXCR4受容体に対するモノクローナル抗体12G5とともに5分間プレインキュベートした培養星状細胞に対するSDF-1の適用は、急激に上昇する有意な細胞内カルシウム排出をもたらさず(図23B)。

【0101】

CXCR4抗体とともにプレインキュベートした後、ラット脳由来の皮質ニューロンの細胞培養物も、SDF-1に対する反応と同様に、カルシウム濃度のさらなる上昇を示す。図24は、皮質ニューロンにおける対応するカルシウムイメージング実験の結果を示している。組換えSDF-1(M-mhSDF-1-H6)を含む酵母抽出液35μgおよび125μg(全タンパク質)を適用したいずれの場合にも、一次皮質ニューロン培養物におけるカルシウム濃度に有意な上昇がもたらされる(図24A)。モノクローナル抗体12G5(CXCR4に対する抗体)とともに5分間プレインキュベートした後、SDF-1を添加すると、一次皮質ニューロン培養物における急激に上昇する細胞内カルシウム排出がもたらされる(図24B)。 20

【0102】

上記の結果は、中枢神経系由来のニューロンおよび星状細胞のSDF-1および/またはSDF-1に対する細胞の生理学的反応が、新たなケモカインSDF-1に対する反応とは明らかに異なることを実証するものである。 30

【0103】

実施例6：星状細胞における細胞内カルシウム濃度に対する、SDF-1およびそれに合成により製造されたペプチド分解産物に由来するC末端基本ペプチドの作用

まず、SDF-1のC末端領域における少なくとも30のアミノ酸に相当するアミノ酸配列を有する塩基性ペプチドの添加が、星状細胞のカルシウム濃度にどのように影響するかを調べた。

【0104】

図25は、星状細胞におけるSDF-1のC末端塩基性ペプチドを用いたカルシウムイメージング実験の結果を示している。SDF-1のC末端の30アミノ酸を示す合成ペプチド1μg/mlの適用は、培養星状細胞の細胞内カルシウム濃度に弱い影響しか与えない(図25A)。これらの星状細胞をモノクローナル抗体12G5(CXCR4に対する抗体)とともに予め5分間インキュベートしたところ、同じC末端ペプチドの適用により、一次星状細胞において急激に上昇する細胞内カルシウム排出が生じる(図25B)。 40

【0105】

ペプチドRREKVG(ペプチド1、配列番号5)、KKEKIG(ペプチド2、配列番号6)、KKKRQ(ペプチド3、配列番号8)、KKRKAQ(ペプチド4、配列番号9)およびKKKN(ペプチド5、配列番号10)、ならびにアミド化ペプチド1'(RREKV(NH₂))および2'(KKEKI(NH₂))を用いたカルシウムイ 50

メーキング実験では、非アミド化ペプチド1、2および3、ならびにアミド化ペプチド1'および2'の添加が、星状細胞における細胞内カルシウム濃度の上昇をもたらすことが確認された。図26では、1mg/mlのペプチド2(KKEKIG、配列番号6)(図26A)またはペプチド3(KKKRQ、配列番号8)(図26B)の添加が培養一次星状細胞における細胞内カルシウム濃度の有意な上昇をもたらすことが示されている。他方、ペプチド4および5は星状細胞のカルシウム濃度には上昇をもたらさない。

【0106】

これらの結果は、推定神経ペプチドが種々の方法で細胞内カルシウム濃度を調整し得ることを示す。いずれの場合にも、それらは、抗CXCR4抗体による細胞のプレインキュベーション後の、SDF-1による細胞内カルシウム濃度の劇的なアップレギュレーションは、SDF-1および/またはSDF-1ケモカインと一致する分子セグメントではなく、SDF-1のC末端領域によって引き起こされることを示唆している。この知見により、SDF-1のC末端の特殊かつ特異的な機能が確認され、完全なSDF-1分子を用いた場合に得られた結果が裏付けられる。

10

【0107】

参考文献

【表1】

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. and Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403-410.

Angerer, L.M., Stoler, M.H. and Angerer, R.C. (1987) In situ hybridization with RNA probes: An annotated recipe. In K.L. Valentino, R.H. Eberwine, J.D. Barchas (Hrsg.) *In Situ Hybridization. Application to neurobiology*, Oxford University Press, New York, 42-70.

Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987) Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156-159.

10

Devereux, J., et al. (1984) *Nucleic Acids Research* 12 (12): 387.

Doranz, B.J., Orsini, M.J., Turner, J.D., Hoffman, T.L., Berson, J.F., Hoxie, J.A., Peiper, S.C., Brass, L.F. and Doms, R.W. (1999) Identification of CXCR4 domains that support coreceptor and chemokine receptor functions *J. Virol.* 73, 2752-2761.

20

Eipper, B., Stoffers, D. and Xu, R. (1992) The biosynthesis of neuropeptides: peptide alpha amidation. *Annu. Rev. Neurosci.* 15, 57-85.

Gellissen, G. (2000) Heterologous protein production in methylotrophic yeasts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54:741-750.

Henikoff und Henikoff (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915-10919.

30

Köller, H., Trimborn, M., from Giesen, H.-J., Schroeter, M. and Arendt, G. (2001) TNF α reduces glutamate induced intracellular Ca²⁺ increase in cultured cortical astrocytes. *Brain Research* 893:237-243.

Loetscher, P., Gong, J.H., Dewald, B., Baggiolini, M. and Clark-Lewis, I. (1998) N-terminal peptides of stromal cell-derived factor-1 with CXC chemokine receptor 4 agonist and antagonist activities. *J. Biochem.* 273 (35):22279-83.

Müller, H.W., Ignatius, M.J., Hangen, D.H. and Shooter, E.M. (1986) Expression of specific sheath cell proteins during peripheral nerve regeneration in mammals, *J. Cell Biol.* 102, 393-402.

10

PCT1385-1966

35.

Needleman and Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443-453.

Pearson, W.R. (1990) Rapid and sensitive sequence comparison with FASTP and FASTA. *Methods Enzymol.* 183, 63-98.

Rollins, B.J. (1997) Chemokines. *Blood* 90, 909-928.

20

Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: A laboratory Manual* 2. Ausgabe, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Sanger, N., Nicklen, S. and Coulson, A.R., (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 144-148.

Shirozu, M., Nakano, T., Inazawa, J., Tashiro, K., Tada, H., Shinohara, T. and Honjo, T. (1995) Structure and chromosomal localization of the human stromal cell-derived factor 1 (SDF1) gene. *Genomics* 28, 495-500.

30

Siegel, G., Agranoff, B. Albers, R.W., Molinoff, P. (1989) *Basic Neurochemistry*, Raven Press, New York.

Stürzl, M., Roth, W.K., Viehweger, P. and Hoffschneider, H.Ü. (1991) Taq DNA-polymerase synthesized single stranded DNA hybridization probes and their application in Northern blotting and in-situ hybridization. In Rolfs, A.,

40

Schumacher, A.C., Marx, P. (Hrsg.) PCR-Topics. Usage of Polymerase Chain Reaction in Genetic and Infectious Diseases. Berlin, Springer-Verlag, 41-45.

Tashiro, K. Tada, H., Heilker, R., Sherozou, M., Nakano, T. and Honjo, T. (1993) Signal sequence trap: a cloning strategy for secreted proteins and type I membrane proteins. *Science* 261, 600-602.

10

Weydemann, U., Keup, P., Piontek, M., Strasser, A.W.M., Schweden, J., Gellissen, G., Janowicz, Z.A. (1995) High level secretion of hirudin by *Hansenula polymorpha* - authentic processing of three different preprohirudins. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 44: 844-849.

【図面の簡単な説明】

20

【図 1】

図 1 は、ラット由来の S D F - 1 および S D F - 1 - c D N A のクローニングのための、R T - P C R を用いた方法を示す。5' および 3' U T R 領域を直線で示し、コード領域を小さな四角で示している。小さな矢印はプライマーの位置と方向を示す。同一または相同な配列は同じ図形で表されている。S D F - 1 のコード領域の最後の 4 つのコドンは小さな黒四角で表されている。破線は S D F - 1 の 2 5 7 2 ヌクレオチドの挿入物を示す。S D F - 1 の 3 0 個のカルボキシ末端コドンは、斜線を付した小さな四角で表されている。

【図 2】

図 2 は、成体ラットの坐骨神経における S D F - 1 および S D F - 1 転写産物を検出するための、ノーザンブロット試験の結果を示す。これらのフィルターを、(A) S D F - 1 のヌクレオチド 7 4 3 ~ 1 3 6 8 に相当し、S D F - 1 および S D F - 1 に共通の 3' U T R 配列の一部である、6 2 6 ヌクレオチド長の N T - I - 1 5 - c D N A の放射性標識 P C R 断片、(B) 配列番号 1 6 のヌクレオチド 4 9 ~ 2 3 9 に相当する、総ての S D F - 1 イソ型の共通コード領域である、1 9 0 ヌクレオチド長の P C R 断片、ならびに (C) S D F - 1 - c D N A のヌクレオチド 6 2 5 ~ 2 3 2 7 に相当し、S D F - 1 特異的挿入物から、プライマー G A S 2 および M M S E 2 で得られた P C R 産物の P v u I I 消化により生じた、1 7 0 2 ヌクレオチド長の断片、とハイブリダイズさせた。

30

【図 3】

図 3 は、ラット由来の核酸配列、ならびにこれらに由来する S D F - 1 および S D F - 1 - c D N A のアミノ酸配列を示す。S D F - 1 に特異的な挿入物は枠で囲んである。共通のシグナルペプチドの核酸配列には下線を付している。ヌクレオチド (左側) およびアミノ酸 (右側) の番号は S D F - 1 の配列に相当する。(9 3) は S D F - 1 の最後のアミノ酸を表している。

40

【図 4】

図 4 は、マウスおよびラットの S D F - 1 タンパク質のアミノ酸配列の比較を示す。点は同一のアミノ酸を示す。1 9 アミノ酸長のシグナルペプチドは枠で囲んである。

【図 5】

図 5 は、種々の組織 (A) および種々の発達段階 (B) における S D F - 1 および S D

50

F - 1 転写産物の証拠を示す種々のノーザンブロット試験の結果を示す。(A)坐骨神経(SN)、脳(Br)、肺(Lu)、心臓(HE)、筋肉(Mu)、精巣(Te)、肝臓(Li)、腎臓(Ki)、脾臓(Sp)および胸腺(Th)からの全RNAを含むノーザンブロットフィルターを、SDF-1 およびSDF-1 に共通の3'-UTR領域由来の放射性標識cDNAプローブとハイブリダイズさせた。(B)発達中のラット脳中のSDF-1 およびSDF-1 mRNAの検出。17日齢ラット胎児(E17)ならびに誕生後1、4、7、13および20日(P1-20)のラットおよび成体ラット(Ad)の脳からの全RNAを含むノーザンブロットフィルターを、(A)と同様にハイブリダイズさせた。(C)発達過程のラットの坐骨神経のSDF-1 およびSDF-1 mRNAの検出。1、4、7、14および21日齢のラット(P1-21)、ならびに成体ラット(Ad)の前記神経からの全RNAを含むノーザンブロットフィルターを、(A)と同様にSDF-1 / プローブとハイブリダイズさせた。上側の矢印はリボゾーム28S RNAの位置を示し、下側のものはメチレンブルー染色したノーザンブロットフィルターによるものを示す。

10

20

30

40

50

【図6】

図6は、成体ラットの脳中のSDF-1 mRNAの細胞局在のためのin situハイブリダイゼーション試験の結果を示す。これらの切片を全SDF-1イソ型の全5'UTRおよびコード配列のサブクローン(A、D、E)、またはSDF-1 特異的挿入物のサブクローン(B、E、H)に由来するジゴキシゲニン-UTPで標識した596ヌクレオチド長のアンチセンス転写産物とともにインキュベートした。センス転写産物とのハイブリダイゼーションを陰性対照として用いた(C、F、I)。(A、B、C)脳梁の背側灰白層の左右対称スライドにおける標識乏突起神経膠細胞および強く標識されたニューロンの「パールネックレス」様形跡を有する脳梁。(D、E、F)小脳のプルキニエ細胞および顆粒細胞で強いハイブリダイゼーションシグナルが見られ、他のスライドでは弱いシグナルが見られる。(G、H、I)海馬の錐体細胞および顆粒細胞では極めて強いハイブリダイゼーションシグナルが検出される。ラインは10μm。

【図7】

図7は、図6と同じプローブを用い、ラットの脳の新皮質におけるSDF-1 mRNAの細胞局在のためのin situハイブリダイゼーション試験の結果を示す。新皮質の前外側(frontolateral)(A)および中外側(mediolateral)(B)領域由来の切片では、総ての新皮質スライド(I~VI)のニューロンが、総てのSDF-1 mRNAイソ型に共通のアンチセンスプローブ(A)でもSDF-1 特異的プローブでも強く標識されている。

【図8】

図8は、成体ラットの坐骨神経中のSDF-1 mRNAの細胞局在のためのin situハイブリダイゼーション試験の結果を示す。これらの切片を、(a)SDF-1 およびSDF-1 に共通の3'UTR領域(A~C、E、F)、(b)総てのSDF-1イソ型に共通の5'UTRおよびコード領域(G)、およびSDF-1 特異的挿入物(H、I)に由来する、センスおよびアンチセンス方向のジゴキシゲニン-UTP標識RNAプローブとハイブリダイズさせた。(A、B、C)縦方向の切片は軸索近傍の紡錘型の顕著なシュワン細胞を示す。(D)S100タンパク質(シュワン細胞のマーカー)に対する抗体で免疫染色した横方向の切片。(E)前記(D)の横方向切片の付近の縦方向切片のハイブリダイズシグナルは、同じ場所でS100に対して免疫陽性の細胞と思われる軸索を取り囲む、標識された半円形のシュワン細胞を示している(D、E中の矢印)。(G、H)アンチセンス転写産物で標識された近傍の両横方向切片(多くの半円形のシュワン細胞(矢印)および上部の右隅の血管壁を示す)のいずれか一方とのハイブリダイゼーション。(C、F、I)センス方向の転写産物とのハイブリダイゼーションを陰性対照として用いた。A、C、G~I中の直線:100μm、D~F:10μm。

【図9】

図9は、ラット由来のSDF-1 の核酸配列のコード領域およびそれから誘導されるア

ミノ酸配列を示す。

【図10】

図10は、ヒトSDF-1の核酸配列のコード領域およびそれから誘導されるアミノ酸配列を示す。

【図11】

図11は、ヒトおよびラットSDF-1の核酸配列のコード領域の比較を示す。「hum」：ヒト配列；「rat」：ラット配列。

【図12】

図12は、図11の核酸配列に由来するヒトおよびラットSDF-1のアミノ酸配列の比較を示す。「hum」：ヒト配列；「rat」：ラット配列。

10

【図13】

図13は、プラスミドPCR II - TOPO (Invitrogen, Groningen, NL)におけるhSDF-1およびhSDF-1-H6構築物、ならびにプラスミドpFPMT121における構築物、M-mhSDF-1-H6、SDF-1-H6およびMF-mhSDF-1-H6を模式的に示す。

【図14】

図14は、hSDF-1遺伝子のコード領域を含む439bp長のDNA断片の制限地図を示す。

【図15】

図15は、hSDF-1遺伝子およびHisタグのコード領域を含む457bp長のDNA断片の制限地図を示す。

20

【図16】

図16は、発現プラスミドpFPMT-M-mhSDF-1-H6の制限地図を示す。

【図17】

図17は、発現プラスミドpFPMT-hSDF-1-H6の制限地図を示す。

【図18】

図18は、発現プラスミドpFPMT-MF-mhSDF-1-H6の作出法を模式的に示す。矢印で示した「P」はPCRプライマーを表す。

【図19】

図19は、発現プラスミドpFPMT-MF-mhSDF-1-H6の制限地図を示す。

30

【図20】

図20は、(A)SDF-1特異的抗体SDF-1(C19)(Santa Cruz Biotechnology, USA)および(B)Hisタグ特異的抗体(RGS-His抗体、マウスIgG1、Qiagen, Hilden, BRD)を含む、H.ポリモルファの細胞抽出物における発現産物の証拠を示すウエスタンブロット試験の結果を示す。(A)のトラックは、(1)シーブルー・プレステイン・スタンダード、(2)M-mhSDF-1-H6、(3)PNGアーゼFで処理したM-mhSDF-1-H6、(4)hSDF-1-H6、(5)PNGアーゼFで処理したhSDF-1-H6、(6)MF-mhSDF-1-H6、(7)PNGアーゼFで処理したMF-mhSDF-1-H6および(8)SDF-1を含まない細胞抽出液を含む。(B)のトラックは、(1)SDF-1を含まない細胞抽出液、(2)シーブルー・プレステイン・スタンダード、(3)M-mhSDF-1-H6、(4)PNGアーゼFで処理したM-mhSDF-1-H6、(5)hSDF-1-H6、(6)PNGアーゼFで処理したhSDF-1-H6、(7)MF-mhSDF-1-H6および(8)PNGアーゼFで処理したMF-mhSDF-1-H6を含む。

40

【図21】

図21は、星状細胞のカルシウム濃度に対するSDF-1およびSDF-1の効果の比較を示す：(A)50nM SDF-1；(B)組換えSDF-1(M-mhSDF-1-H6)を含む35μg酵母抽出液；(C)22.4μg対照抽出液；(D)S

50

D F - 1 によって誘導される細胞内カルシウム上昇に対する S D F - 1 および対照抽出液による細胞内カルシウムの上昇の定量評価。

【 図 2 2 】

図 2 2 は、C X C R 4 に対する抗体とのプレインキュベーションを伴わない (A) または伴う (B)、S D F - 1 に対する星状細胞におけるカルシウム画像実験の結果を示す。

【 図 2 3 】

図 2 3 は、C X C R 4 に対する抗体とのプレインキュベーションを伴わない (A) または伴う (B)、S D F - 1 に対する星状細胞におけるカルシウム画像実験の結果を示す。

【 図 2 4 】

図 2 4 は、C X C R 4 に対する抗体とのプレインキュベーションを伴わない (A) または伴う (B)、S D F - 1 に対する皮質ニューロンにおけるカルシウム画像実験の結果を示す。

10

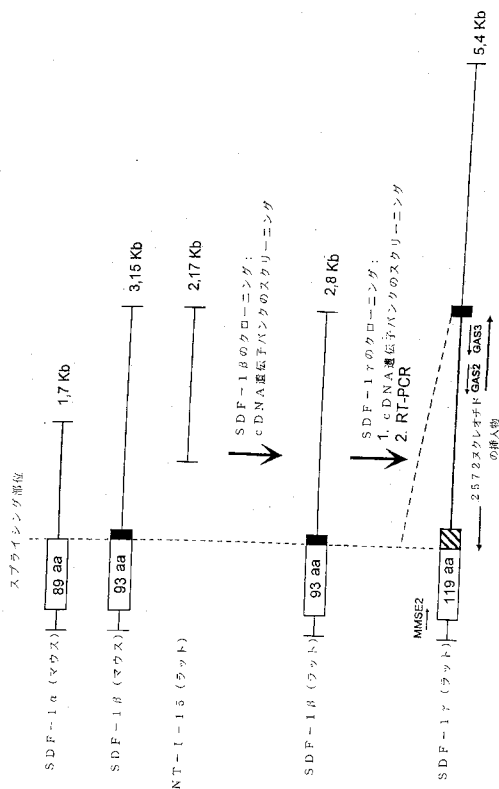
【 図 2 5 】

図 2 5 は、C X C R 4 に対する抗体とのプレインキュベーションを伴わない (A) または伴う (B)、S D F - 1 の C 末端塩基性ペプチド (3 0 アミノ酸) に対する星状細胞におけるカルシウム画像実験の結果を示す。

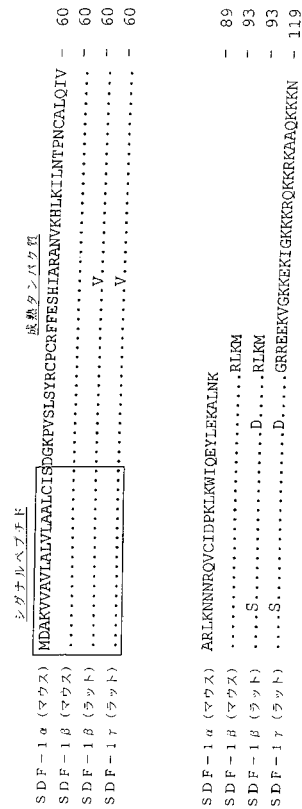
【 図 2 6 】

図 2 6 は、(A) ペプチド 2 (K K E K I G ; 配列番号 6) および (B) ペプチド 3 (K K K R Q ; 配列番号 8) に対する星状細胞におけるカルシウム画像実験の結果を示す。

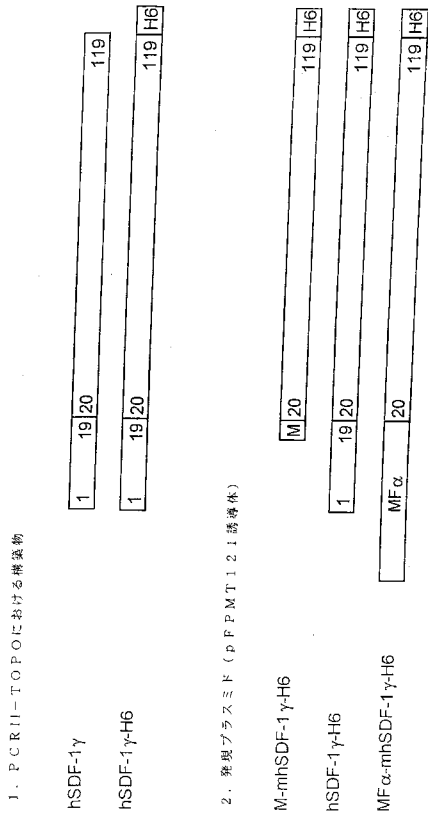
【 図 1 】



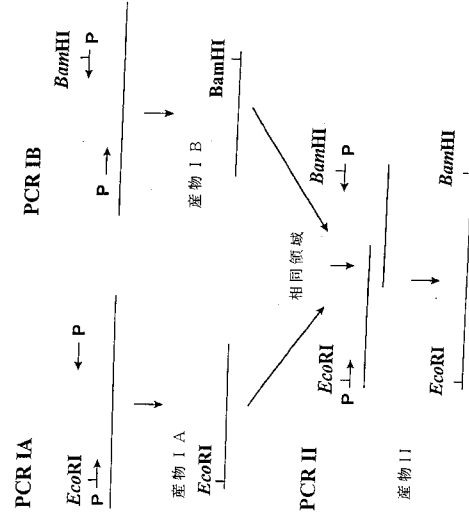
【 図 4 】



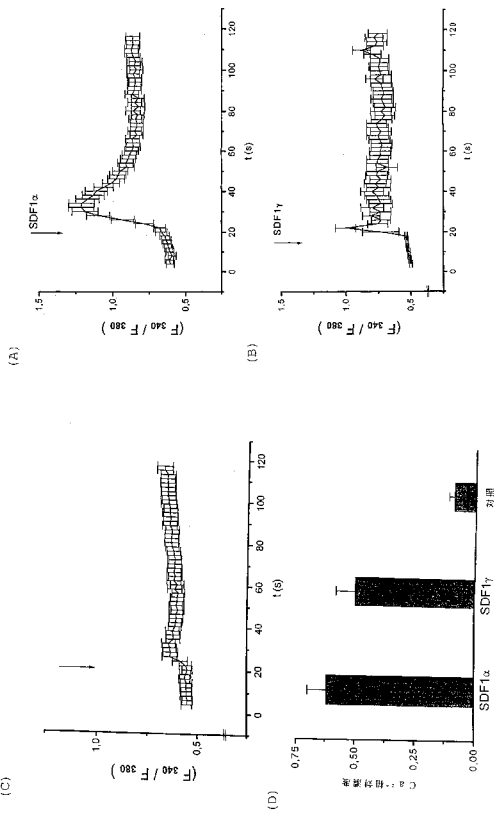
【 図 1 3 】



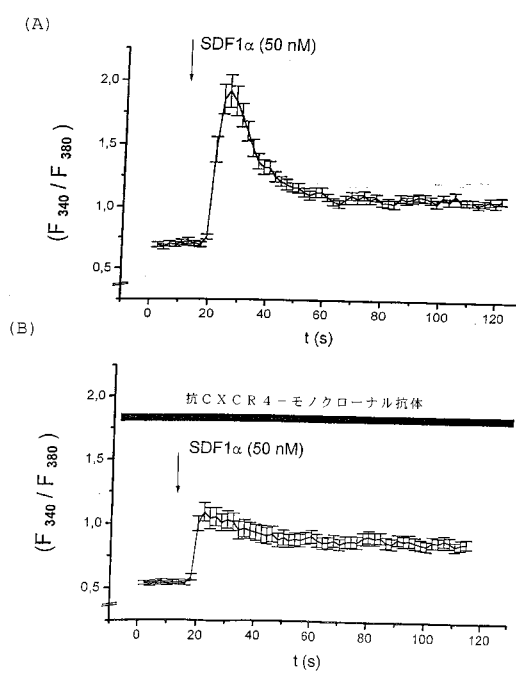
【 図 1 8 】



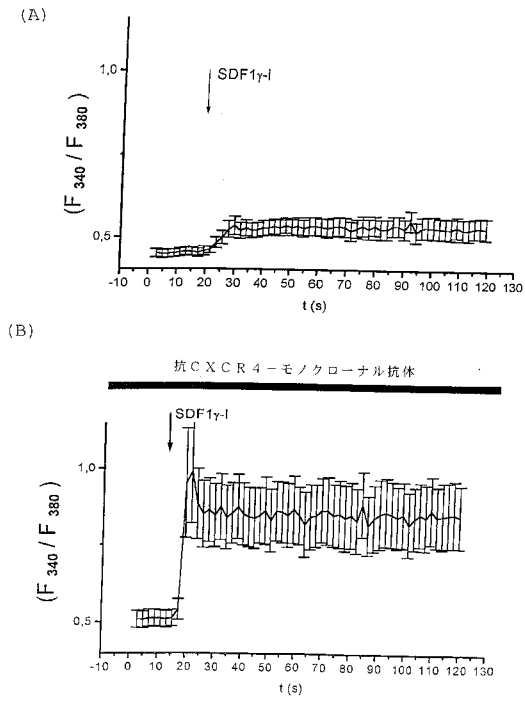
【 図 2 1 】



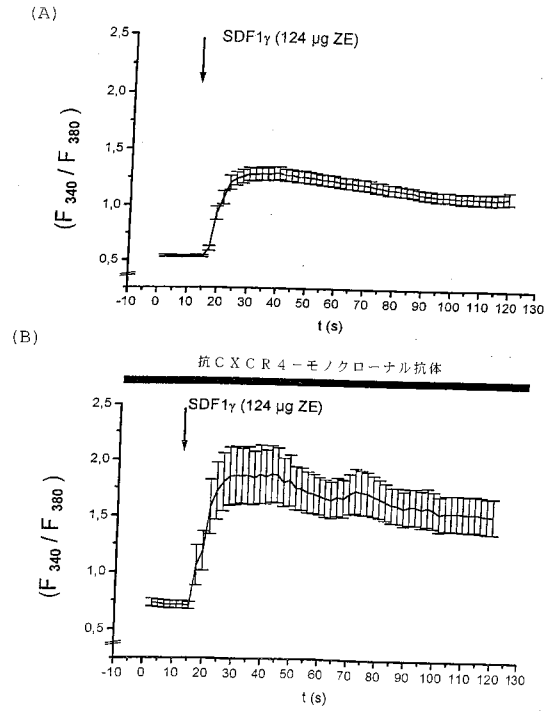
【 図 2 2 】



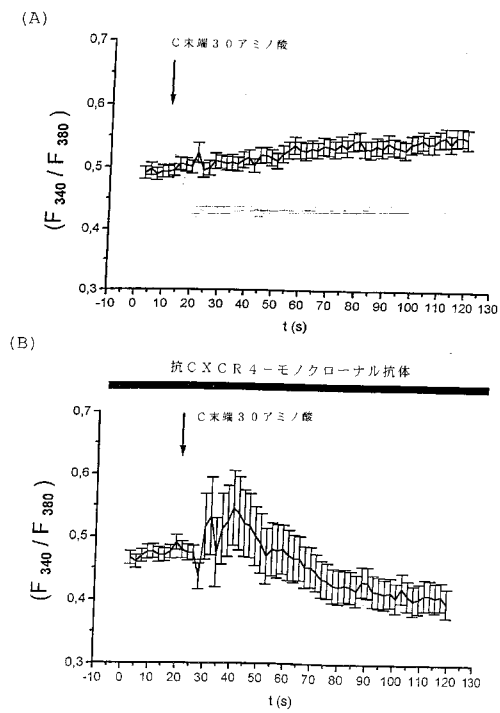
【 図 2 3 】



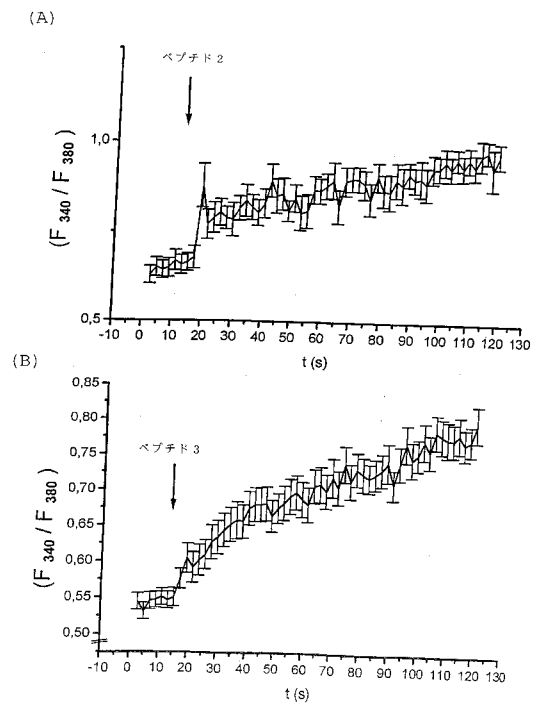
【 図 2 4 】



【 図 2 5 】



【 図 2 6 】



【国際公開パンフレット】

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

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
6. Dezember 2001 (06.12.2001)

PCT

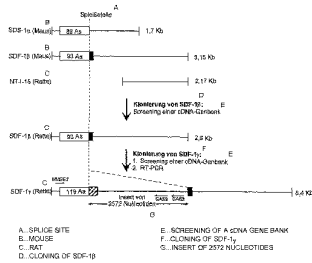
(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/92530 A1

- (51) Internationale Patentklassifikation: C12N 15/19, 15/71, 15/79, C07K 16/00, 14/52, C12Q 1/68, A61K 38/19, G01N 33/53
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): RHEIN BIOTECH GESELLSCHAFT FÜR NEUE BIOTECHNOLOGISCHE PROZESSE UND PRODUKTE MBH [DE/DE]; Eichsfelder Strasse 11, 40595 Düsseldorf (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/06250
- (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): MÜLLER, Hans, Werner [DE/DE]; Jakob-Kneip-Str. 88, 40595 Düsseldorf (DE). BOSSE, Frank [DE/DE]; Am Botanischen Garten 7, 40225 Düsseldorf (DE). GLEICHMANN, Marc [DE/DE]; Rappenberghalde 23, 72070 Tübingen (DE). GILLEN, Clemens [DE/DE]; Albert-Einstein-Str. 115, 52076 Aachen (DE). AUER, Johannes [DE/DE]; Angerstr. 7, 82445 Schwaigen OT Grafenastchau (DE).
- (22) Internationales Anmeldedatum: 1. Juni 2001 (01.06.2001)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität: 100 27 383.1 2. Juni 2000 (02.06.2000) DE

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: NUCLEIC ACID MOLECULE COMPRISING A NUCLEIC ACID SEQUENCE CODING FOR AN SDF-1 GAMMA CHEMOKINE, A NEUROPEPTIDE PRECURSOR OR AT LEAST ONE NEUROPEPTIDE

(54) Bezeichnung: NUKLEINSÄURE-MOLEKÜL UMFASSEND EINE FÜR EIN SDF-1 GAMMA CHEMOKIN, EINEN NEUROPEPTID-PRÄKURSOR ODER MINDESTENS EIN NEUROPEPTID KODIERENDE NUKLEINSÄURESEQUENZ



WO 01/92530 A1

(57) Abstract: The invention relates to a nucleic acid molecule comprising a nucleic acid sequence coding for a chemokine, a neuropeptide precursor or at least one neuropeptide, in addition to host cells containing said nucleic acid molecule. The invention also relates to a polypeptide molecule which acts as a chemokine or a neuropeptide or contains at least one neuropeptide, and to fragments thereof containing at least one neuropeptide. The invention further relates to a method for producing a polypeptide molecule or a fragment thereof. Also disclosed are antibodies, detection methods, test kits and pharmaceutical compositions. The aim of the invention is to provide novel agents which can be used specifically to diagnose and/or treat diseases which are linked to a defect in the SDF-1 factor or one of the receptors (CXCR4) thereof.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Nukleinsäure-Molekül, das eine für ein Chemokin, einen Neuropeptid-Präkursor oder mindestens ein Neuropeptid kodierende Nukleinsäuresequenz umfasst, sowie dieses Nukleinsäure-Molekül enthaltende Wirtszellen. Die Erfindung betrifft ferner ein

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 01/92530 A1



(74) **Anwalt: GRÜNECKER KINKELDEY STOCKMAIR & SCHWANHÄUSSER**, Maximilianstr. 58, 80538 München (DE).

(81) **Bestimmungsstaaten (national):** AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) **Bestimmungsstaaten (regional):** ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW),

eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

Polypeptid-Molekül, das als Chemokin oder Neuropeptid wirkt oder mindestens ein Neuropeptid enthält, sowie Fragmente davon, die mindestens ein Neuropeptid enthalten, und ein Verfahren zum Herstellen des Polypeptid-Moleküls oder eines Fragments davon. Darüber hinaus betrifft die Erfindung Antikörper, Nachweisverfahren und Test-Kits sowie pharmazeutische Zusammensetzungen. Der vorliegenden Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, neue Mittel zur Verfügung zu stellen, die gezielt zur Diagnose und/oder Behandlung von Erkrankungen, die in Zusammenhang mit einem Defekt des SDF-1-Faktors oder seines Rezeptors (CXCR4) stehen, eingesetzt werden können.

WO 01/92530

PCT/EP01/06250

NUCLEINSÄURE-MOLEKÜL UMFASSEND EINE FÜR EIN SDF-1 GAMMA CHEMOKIN, EINEN NEUROPEPTID-PRÄKURSOR ODER MINDESTENS EIN NEUROPEPTID KODIERENDE NUKLEINSÄURE-SEQUENZ

Die Erfindung betrifft ein Nukleinsäure-Molekül, das eine für ein Chemokin, einen Neuropeptid-Präkursor oder mindestens ein Neuropeptid kodierende Nukleinsäuresequenz umfasst, sowie dieses Nukleinsäure-Molekül enthaltende Wirtszellen. Die Erfindung betrifft ferner ein Polypeptid-Molekül, das als Chemokin oder Neuropeptid wirkt oder mindestens ein Neuropeptid enthält, sowie Fragmente davon, die mindestens ein Neuropeptid enthalten, und ein Verfahren zum Herstellen des Polypeptid-Moleküls oder eines Fragments davon. Darüber hinaus betrifft die Erfindung Antikörper, Nachweisverfahren und Test-Kits sowie pharmazeutische Zusammensetzungen.

SDF-1 α (stromal cell derived factor 1 α) und seine durch alternatives Spleißen entstehende Isoform SDF-1 β wurden ursprünglich aus einer Zelllinie von Stromazellen des Knochenmarks der Maus kloniert (Tashiro et al, 1993). Auf der Grundlage der festgestellten Homologie der abgeleiteten Aminosäuresequenz zu den Sequenzen des Interleukins 8 (32%) und des Makrophagen-Entzündungsproteins 1 α (32%) und der Anwesenheit von vier charakteristischen Cystein-Resten wurden SDF-1 α und SDF-1 β der Gruppe der CXC(α)-Chemokine zugeordnet. Die CXC(α)-Chemokine sind eine Untergruppe der Familie der interkrinen Cytokine, die aus verschiedenen entfernt verwandten entzündungsfördernden Cytokinen besteht. Die cDNA-Sequenzen für SDF-1 α und SDF-1 β der Maus und des Menschen weisen eine starke Homologie zueinander auf und entstehen durch alternatives Spleißen eines einzigen Gens.

Die biologische Funktion von SDF-1 wurde anhand des menschlichen SDF-1 α untersucht. SDF-1 α ist für die Reifung von B-Zellen erforderlich, wirkt T-lymphotrop und induziert den Zelltod bei der neuronalen Zelllinie hNT. SDF-1 α ist ein natürlicher Ligand des CXCR4(LESTR/Fusin)-Chemokin-Rezeptors von T-Zellen, der ein bindender Kofaktor von T-lymphotropen HIV-1-Stämmen ist. SDF-1 α und -1 β zeigen sowohl in vitro als auch in vivo ein „growth arrest“-spezifisches Expressionsmuster in Fibroblasten und Hepatozyten. Mäuse, bei denen das SDF-1-Gen inaktiviert wurde, zeigen eine verminderte Bildung von B-Zellen, einen Defekt des ventrikulären Septums und Defekte bei der Zellmigration im

WO 01/92530

PCT/EP01/06250

2

Kleinhirn, und sterben kurz nach der Geburt. SDF-1 könnte bei der Nervenregeneration eine wichtige Rolle spielen.

Der vorliegenden Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, neue Mittel zur Verfügung zu stellen, die gezielt zur Diagnose und/oder Behandlung von Erkrankungen, die in Zusammenhang mit einem Defekt des SDF-1-Faktors oder seines Rezeptors (CXCR4) stehen.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch ein Nukleinsäure-Molekül, umfassend:

(1) eine für ein Chemokin, einen Neuropeptid-Präkursor oder mindestens ein Neuropeptid kodierende Nukleinsäuresequenz, die aus folgenden Sequenzen ausgewählt ist:

- (a) einer Nukleinsäuresequenz nach SEQ ID NO:1;
- (b) einer Nukleinsäuresequenz, die ein Polypeptid mit einer Aminosäuresequenz nach SEQ ID NO:2 kodiert;
- (c) einer Nukleinsäuresequenz, die mit der in (a) angegebenen Sequenz zu mindestens 60% identisch ist;
- (d) einer Sequenz, die mit dem Gegenstrang der in (a) angegebenen Sequenz hybridisiert oder unter Berücksichtigung der Degeneration des genetischen Codes hybridisieren würde;
- (e) einem durch Substitution, Addition, Inversion und/oder Deletion einer oder mehrerer Nukleotide erhaltenen Derivat einer der in (a) oder (b) angegebenen Sequenzen, das für ein Chemokin, einen Neuropeptid-Präkursor oder mindestens ein Neuropeptid kodiert;

oder

(2) eine komplementäre Sequenz zu einer der in (a) bis (e) angegebenen Nukleinsäuresequenzen.

Der Begriff "Polypeptid", wie nachfolgend in der Beschreibung verwendet, umfaßt aus 7 oder mehr Aminosäuren zusammengesetzte Peptide oder Proteine.

WO 01/92530

PCT/EP01/06250

3

Der Begriff "Chemokin" steht für ein Mitglied einer Familie relativ kleiner Proteine, die auf der Basis der charakteristischen Anordnung von Cystein-Gruppen in vier Untergruppen unterteilt werden: C, CC, CXC und CX₃C. Die Chemokine binden an spezifische Rezeptoren (Rollins, B.J., 1997). In Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung bezieht sich der Begriff "Chemokin" insbesondere auf Mitglieder der CXC-Chemokinfamilie. Vorzugsweise handelt es sich bei dem Chemokin um ein Polypeptid-Molekül, das in einem Ca-Imaging-Experiment unter den in Köller et al (2001) beschriebenen Bedingungen einen 1,5 - 10-fachen Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration in primären Astrozyten und/oder Neuronen aus dem Zentralnervensystem von Ratten oder Menschen hervorruft.

Als "Neuropeptide" werden biologisch aktive und physiologisch wichtige Signalmoleküle mit regulatorischen und modulatorischen Funktionen im Nervensystem bezeichnet. Die Funktionsbereiche umfassen unter anderem Neurotransmission, Rezeptormodulation, Veränderung elektrophysiologischer Eigenschaften von Zellmembranen und metabolischer Prozesse. Neuropeptide werden von Neuronen synthetisiert und meist an der Synapse freigesetzt (Siegel et al., 1989).

Unter "Neuropeptid-Präkursor" wird ein Vorläuferprotein verstanden, das durch proteolytische Spaltung in ein aktives Neuropeptid überführt wird.

Die im erfindungsgemäßen Nukleinsäure-Molekül enthaltene Nukleinsäuresequenz kann eine genomische DNA, cDNA oder synthetische DNA sein, wobei unter synthetischen DNA-Sequenzen auch solche verstanden werden, die modifizierte Internukleosid-Bindungen enthalten.

In Zusammenhang mit den erfindungsgemäßen Nukleinsäure-Molekülen bezieht sich der Ausdruck „mindestens 60% identisch“ auf Identität auf DNA-Ebene, die gemäß bekannter Verfahren, z.B. der computergestützten Sequenzvergleiche (Altschul et al., 1990) bestimmt werden kann.

Der dem Fachmann bekannte Ausdruck „Identität“ bezeichnet den Grad der Verwandtschaft zwischen zwei oder mehr Nukleinsäuremolekülen, der durch die Übereinstimmung zwischen den Sequenzen bestimmt wird. Der Prozentsatz der „Identität“ ergibt sich aus dem Prozentsatz identischer Bereiche in zwei oder mehr Sequenzen unter Berücksichtigung von Lücken oder anderen Sequenzbesonderheiten.

WO 01/92530

PCT/EP01/06250

4

Die Identität miteinander verwandter Nukleinsäuremoleküle kann mit Hilfe bekannter Verfahren bestimmt werden. In der Regel werden spezielle Computerprogramme mit den besonderen Anforderungen Rechnung tragenden Algorithmen eingesetzt. Bevorzugte Verfahren zur Bestimmung der Identität erzeugen zunächst die größte Übereinstimmung zwischen den untersuchten Sequenzen. Computerprogramme zur Bestimmung der Identität zwischen zwei Sequenzen umfassen das GCG Programmpaket, einschließlich GAP (Devereux, J., et al., Nucleic Acids Research 12 (12): 387, 1984); Genetics Computer Group University of Wisconsin, Madison, (WI); BLASTP, BLASTN und FASTA (Altschul et al., 1990), sind jedoch nicht auf diese eingeschränkt. Das BLASTX Programm kann vom National Centre for Biotechnology Information (NCBI) und aus weiteren Quellen bezogen werden (BLAST Handbuch, Altschul S., et al., NCB NLM NIH Bethesda MD 20894; Altschul et al., 1990). Auch der bekannte Smith Waterman-Algorithmus kann zur Bestimmung von Identität verwendet werden.

Bevorzugte Parameter für den Nukleinsäuresequenz-Vergleich umfassen die nachstehenden:

Algorithmus:	Needleman und Wunsch (1970)
Vergleichsmatrix:	Übereinstimmung (matches) = + 10 Nichtübereinstimmung (mismatch) = 0
Lücken-Wert (Gap Penalty):	50
Lückenlängen-Wert (Gap Length Penalty):	3

Das GAP-Programm ist auch zur Verwendung mit den vorstehenden Parametern geeignet. Die vorstehenden Parameter sind die Standardparameter (default parameters) für Nukleinsäuresequenz-Vergleiche.

Weitere beispielhafte Algorithmen, Lücken-Öffnungs-Werte (gap opening penalties), Lückenausdehnungs-Werte (gap extension penalties), Vergleichsmatrizen einschließlich der im Programm-Handbuch, Wisconsin-Paket, Version 9, September 1997, genannten können verwendet werden. Die Auswahl wird von dem durchzuführenden Vergleich abhängen und weiterhin davon, ob der Vergleich zwischen Sequenzpaaren, wobei GAP oder Best Fit bevorzugt sind, oder zwischen einer Sequenz und einer umfangreichen Sequenz-Datenbank, wobei FASTA oder BLAST bevorzugt sind, durchgeführt wird. Eine mit dem

WO 01/92530

PCT/EP01/06250

5

oben genannten Algorithmus ermittelte Übereinstimmung von 60% wird im Rahmen dieser Anmeldung als 60%ige Identität bezeichnet. Entsprechendes gilt für höhere Identitätsgrade.

Das Merkmal "Sequenz, die mit dem Gegenstrang der in (a) angegebenen Sequenz hybridisiert" weist auf eine Sequenz hin, die unter stringenten Bedingungen mit dem Gegenstrang der unter (a) angegebenen Sequenz hybridisiert. Beispielsweise können die Hybridisierungen bei 42°C mit einer Hybridisierungslösung bestehend aus 5 x SSPE, 5 x Denhardt's, 0,1% SDS, 100 µg/ml Lachssperma-DNA, 30-50% Formamid (Sambrook et al., 1989) durchgeführt werden. Als Waschschritt eignet sich eine zweimal wiederholte 10-15minütige Waschung in 2 x SSPE, 0,1% SDS bei 42°C, gefolgt von einer zweimal wiederholten 20minütigen Waschung in 0,2 x SSPE, 0,1% SDS bei 50°C. Alternativ kann bei den Waschlösungen SSC anstelle von SSPE verwendet werden.

Überraschenderweise wurde nun gefunden, dass das erfindungsgemäße Nukleinsäure-Molekül ein neues Mitglied der SDF-Familie von Chemokinen darstellt, das im folgenden als SDF-1 γ bezeichnet wird. Die Klonierung und Charakterisierung der SDF-1 γ -cDNA sowie die Nukleinsäuresequenz und die davon abgeleitete Aminosäuresequenz für das humane SDF-1 γ und das SDF-1 γ von Ratte werden in den Beispielen beschrieben.

Die SDF-1 γ -Nukleinsäuresequenz besteht aus der vollständigen Nukleinsäuresequenz von SDF-1 β und einer zusätzlichen Sequenz von 2572 Nukleotiden, die im gleichen Leseraster stromabwärts an das Codon 89 von SDF-1 β anschließt. Durch dieses Insert ergibt sich für das neue SDF-1 γ -Polypeptid eine Aminosäuresequenz mit 119 Aminosäuren und einem theoretischen Molekulargewicht von 13,6 Kd, wobei die Sequenz am Carboxy-terminus im Vergleich zu der bekannten SDF-1 α -Sequenz um 30 Aminosäuren verlängert ist. Es wird vermutet, dass SDF-1 γ durch Insertion eines neuen alternativen Exons IIIa zwischen den bekannten Exons III und IV (vgl. Shirozu et al., 1995) erzeugt wird.

Im Carboxy-terminalen Bereich der Aminosäuresequenz von SDF-1 γ können 5 Gruppen aus zwei basischen Aminosäuren (Lys-Lys, Arg-Arg und Lys-Arg) Erkennungsmuster für eine Membran-gebundenen Protease des Golgi-Systems und der Sekretionsvesikel bilden. Durch proteolytische Spaltung an diesen Stellen entstehen fünf kurze Peptide (SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10) und ein verkürztes Protein (SEQ ID NO:7), von denen zwei Peptide und ein Polypeptid (SEQ ID NO:5, SEQ

WO 01/92530

PCT/EP01/06250

6

ID NO:6 und SEQ ID NO:7) einen Carboxy-terminalen Glycin-Rest aufweisen. Peptide mit einem Glycin-Rest am Carboxyterminus sind potentielle Substrate für die Peptidyl- α -amidierende Monooxygenase (PAM), die die Carboxy-terminale Spaltung von Carboxylat katalysiert und dadurch α -amidierte Carboxytermini (CONH₂) erzeugt, die für Neuropeptide charakteristisch sind (siehe Übersicht von Eipper et al., 1992).

Das SDF-1 β -Transkript von Ratte (siehe SEQ ID NO:16) kodiert ein Protein mit 93 Aminosäuren (siehe SEQ ID NO:17) und einem theoretischen Molekulargewicht von 10,5 Kd, wobei die ersten 19 Aminosäuren eine Signalsequenz für sezernierte Proteine darstellen. Die ersten 17 Aminosäuren des reifen Proteins, die in allen Isoformen vorkommen, werden für die Bindung an den CXCR4-Rezeptor benötigt (vgl. Loetscher et al. 1998; Doranz et al., 1999). Zwei basische Aminosäuren (Lys 89 und Arg 90) im Carboxy-terminalen Bereich liefern ein Erkennungsmuster für die proteolytische Spaltung, aus der sich ein Pentapeptid (Lys 89-Met 93, SEQ ID NO:18) und ein verkürztes Protein ergeben.

In einer Ausführungsform der Erfindung umfasst das erfindungsgemäße Nukleinsäure-Molekül eine Nukleinsäuresequenz, die mit der Nukleinsäuresequenz nach SEQ ID NO:1 zu mindestens 80%, vorzugsweise zu mindestens 90%, besonders bevorzugt zu mindestens 95% identisch ist.

Nukleinsäure-Moleküle, die eine Nukleinsäuresequenz nach SEQ ID NO:3 oder eine für ein Polypeptid mit einer Aminosäuresequenz nach SEQ ID NO:4 kodierende Nukleinsäuresequenz umfassen, sind besonders bevorzugt.

Das erfindungsgemäße Nukleinsäure-Molekül kann weiterhin einen zur Expression geeigneten Promotor umfassen, wobei die kodierende Nukleinsäuresequenz unter der Kontrolle des Promotors steht. Ein „zur Expression geeigneter Promotor“, wie hier verwendet, bezeichnet ein DNA-Fragment, durch das der Initiationspunkt und die Initiationshäufigkeit der Transkription (RNA-Synthese) einer unter der Kontrolle des Promotorelements stehenden Nukleinsäuresequenz, die ein Chemokin, einen Neuropeptid-Präkursor oder mindestens ein Neuropeptid kodiert, im Wirtsorganismus festgelegt werden. Die Wahl des Promotors hängt vom zur Expression verwendeten Expressionssystem ab. Generell sind konstitutive Promotoren bevorzugt, jedoch sind auch induzierbare Promotoren, wie z. B. der Metallothionein-Promotor, möglich. Zur Ausführung der Erfindung in Betracht kommende Promotoren schließen unter anderem die *FMD*-, *MOX*-, *TPS1*-, *PMA1*- und

WO 01/92530

PCT/EP01/06250

7

DAS-Promotoren aus *Hansenula polymorpha*, die AOX1- und GAP1-Promotoren aus *Pichia pastoris*, die ADH1-, PDC1-, GAP1- und CUP1-Promotoren aus *S. cerevisiae*, die AXDH- und AHSB4-Promotoren von *Arxula adeninivorans* und die NDK1- und CPC2-Promotoren von *Sordaria macrospora* ein.

Das erfindungsgemäße Nukleinsäure-Molekül kann darüber hinaus Sequenzen eines Vektors umfassen, die die Replikation des Nukleinsäure-Moleküls in einer Wirtszelle und/oder die Integration des Nukleinsäure-Moleküls in das Genom einer Wirtszelle ermöglichen. Im Stand der Technik sind zahlreiche Klonierungs- und Expressions-Vektoren bekannt, vgl. Recombinant Gene Expression Protocols, Meth. Mol. Biol. Vol. 62, Humana Press, New Jersey, USA. Zur Replikation in einer Wirtszelle muß der verwendete Vektor einen Replikationsursprung und gegebenenfalls weitere regulatorische Regionen enthalten. Der Vektor kann aus Bakteriophagen wie λ -Derivaten, Adenoviren, Vacciniaviren, Baculoviren, SV40-Virus, Retroviren; Plasmiden, wie Ti-Plasmiden von *Agrobacterium tumefaciens*, YAC-Vektoren und BAC-Vektoren ausgewählt sein.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ferner eine Wirtszelle, die mindestens ein erfindungsgemäßes Nukleinsäure-Molekül enthält, wobei die Wirtszelle eine zur Expression des Nukleinsäure-Moleküls und gegebenenfalls zur Prozessierung des entstandenen Polypeptid-Moleküls geeignete prokaryontische oder eukaryontische Zelle ist. Im Stand der Technik sind zahlreiche prokaryontische und eukaryontische Expressionssysteme bekannt. Wirtszellen können beispielsweise aus prokaryontischen Zellen, wie *E. coli* oder *B. subtilis*, oder aus eukaryontischen Zellen, wie Pilzzellen, Pflanzenzellen, Insektenzellen und Säugerzellen, z. B. CHO-Zellen, COS-Zellen oder HeLa-Zellen, sowie Derivaten davon ausgewählt sein. Im Stand der Technik sind beispielsweise bestimmte CHO-Produktionslinien bekannt, deren Glykosylierungsmuster im Vergleich zu CHO-Zellen verändert sind. Vorzugsweise ist die eukaryontische Wirtszelle die Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, die methylo trope Hefe *Hansenula polymorpha*, die dimorphe Hefe *Arxula adeninivorans* oder der filamentöse Pilz *Sordaria macrospora*.

Die Erfindung stellt ferner ein Polypeptid-Molekül bereit, das eine Aminosäuresequenz umfasst, die aus folgenden Sequenzen ausgewählt ist:

- (i) einer Aminosäuresequenz, die eine der Aminosäuresequenzen nach SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9 und/oder SEQ

WO 01/92530

PCT/EP01/06250

8

ID NO:10 und/oder Kombination aus zwei oder mehreren dieser Sequenzen umfaßt;

- (ii) einer Aminosäuresequenz nach SEQ ID NO:4;
- (iii) einer Aminosäuresequenz, die der Sequenz von Aminosäure 20 bis Aminosäure 119 in SEQ ID NO:4 entspricht;
- (iv) einer Aminosäuresequenz nach SEQ ID NO:22;
- (v) einer Aminosäuresequenz, die mit der in (i), (ii), (iii) oder (iv) angegebenen Sequenz zu mindestens 85% identisch ist.

In diesem Zusammenhang bezieht sich der Ausdruck "mindestens 85% identisch" auf Übereinstimmung auf der Ebene der Aminosäuresequenz, die gemäß bekannter Verfahren, z.B. der computergestützten Sequenzvergleiche (Altschul et al., 1990) bestimmt werden kann.

Der Ausdruck „Identität“ bezeichnet hier den Grad der Verwandtschaft zwischen zwei oder mehreren Polypeptid-Molekülen, der durch die Übereinstimmung zwischen den Sequenzen bestimmt wird, wobei unter Übereinstimmung sowohl identische Übereinstimmung als auch konservativer Aminosäure-Austausch zu verstehen ist. Der Prozentsatz der „Identität“ ergibt sich aus dem Prozentsatz übereinstimmender Bereiche in zwei oder mehr Sequenzen unter Berücksichtigung von Lücken oder anderen Sequenzbesonderheiten.

Der Begriff "konservativer Aminosäure-Austausch" bezieht sich auf einen Austausch eines Aminosäurerestes durch einen anderen Aminosäurerest, wobei der Austausch einen möglichst geringen Einfluß auf die (räumliche) Struktur des Polypeptid-Moleküls ausüben soll. Grundsätzlich werden vier physiko-chemische Gruppen unterschieden, in die die natürlicherweise vorkommenden Aminosäuren eingeteilt werden. Zur Gruppe der basischen Aminosäuren gehören Arginin, Lysin und Histidin. Zur Gruppe der sauren Aminosäuren gehören Glutaminsäure und Asparaginsäure. Die ungeladenen/polaren Aminosäuren umfassen Glutamin, Asparagin, Serin, Threonin und Tyrosin. Die nichtpolaren Aminosäuren umfassen Phenylalanin, Tryptophan, Cystein, Glycin, Alanin, Valin, Methionin, Isoleucin, Leucin und Prolin. Ein konservativer Aminosäure-Austausch bedeutet in

WO 01/92530

PCT/EP01/06250

9

diesem Zusammenhang den Austausch einer gegebenen Aminosäure durch eine Aminosäure, die zur gleichen physiko-chemischen Gruppe gehört.

Die Identität miteinander verwandter Polypeptid-Moleküle kann mit Hilfe bekannter Verfahren bestimmt werden. Bevorzugte Verfahren zur Bestimmung der Identität erzeugen zunächst die größte Übereinstimmung zwischen den untersuchten Sequenzen. Computerprogramme zur Bestimmung der Identität zwischen zwei Aminosäuresequenzen umfassen das GCG-Programmpaket, einschließlich GAP (Devereux et al., 1984; Genetics Computer Group University of Wisconsin, Madison, (WI)); BLASTP, BLASTN und FASTA (Altschul et al., 1990), sind jedoch nicht auf diese eingeschränkt. Das BLAST X Programm kann vom National Centre for Biotechnology Information (NCBI) und aus weiteren Quellen bezogen werden (BLAST Handbuch, Altschul, S. et al., NCB NLM NIH Bethesda MD 20894; Altschul et al., 1990). Auch der bekannte Smith Waterman-Algorithmus kann zur Bestimmung von Sequenzidentität verwendet werden.

Bevorzugte Parameter für den Sequenz-Vergleich umfassen die nachstehenden:

Algorithmus:	Needleman und Wunsch (1970)
Vergleichsmatrix:	BLOSUM 62 von Henikoff und Henikoff (1992)
Lücken-Wert (Gap Penalty):	12
Lückenzahl-Wert (Gap Length Penalty):	4
Schwellenwert der Ähnlichkeit:	0

Das GAP-Programm ist auch zur Verwendung mit den vorstehenden Parametern geeignet. Die vorstehenden Parameter sind die Standardparameter (default parameters) für Aminosäuresequenz-Vergleiche, wobei Lücken an den Enden den Identität-Wert nicht verringern. Bei sehr kurzen Sequenzen im Vergleich zur Referenzsequenz kann es weiterhin notwendig sein, den Erwartungswert (expected value) auf bis zu 100.000 zu erhöhen und gegebenenfalls die Wortlänge (word size) auf bis zu 2 zu verkleinern.

Weitere beispielhafte Algorithmen, Lücken-Öffnungs-Werte (gap opening penalties), Lückenausdehnungs-Werte (gap extension penalties), Vergleichsmatrizen einschließlich der im Programm-Handbuch, Wisconsin-Paket, Version 9, September 1997, genannten können verwendet werden. Die Auswahl wird von dem durchzuführenden Vergleich abhängen und weiterhin davon, ob der Vergleich zwischen Sequenzpaaren, wobei GAP

oder Best Fit bevorzugt sind, oder zwischen einer Sequenz und einer umfangreichen Sequenz-Datenbank, wobei FASTA oder BLAST bevorzugt sind, durchgeführt wird.

Eine mit dem oben genannten Algorithmus ermittelte Übereinstimmung von 85% wird im Rahmen dieser Anmeldung als 85%ige Identität bezeichnet. Entsprechendes gilt für höhere Identitätsgrade.

In einer Ausführungsform der Erfindung umfasst das erfindungsgemäße Polypeptid-Molekül eine Sequenz, die mit der vorstehend unter (i), (ii), (iii) oder (iv) angegebenen Aminosäuresequenz zu mindestens 90%, vorzugsweise zu mindestens 95% identisch ist. Besonders bevorzugt sind Polypeptid-Moleküle, die eine Aminosäuresequenz nach SEQ ID NO:12 oder SEQ ID NO:13 umfassen.

In einer Ausführungsform der Erfindung umfasst das erfindungsgemäße Polypeptid-Molekül die Aminosäuresequenzen nach SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6 und/oder SEQ ID NO:7. Bevorzugt sind Polypeptid-Moleküle gemäß der Erfindung, die die Aminosäuresequenzen nach SEQ ID NO:5 und SEQ ID NO:6 umfassen.

In einer weiteren Ausführungsform stellt die Erfindung ein Fusionsprotein bereit, das mindestens ein erfindungsgemäßes Polypeptid umfasst.

Fragmente der erfindungsgemäßen Polypeptid-Moleküle, die mindestens ein Neuropeptid umfassen, werden von der Erfindung ebenfalls umfasst. Bevorzugt sind Fragmente, die mindestens eine der Aminosäuresequenzen nach SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9 und/oder SEQ ID NO:10 umfassen. Besonders bevorzugt sind Fragmente mit der Aminosäuresequenz nach SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6 oder SEQ ID NO:7. Die Fragmente der erfindungsgemäßen Polypeptid-Moleküle können auch modifiziert sein, beispielsweise durch Glykosylierung, Phosphorylierung, Acetylierung oder Amidierung.

Vorzugsweise handelt es sich bei dem erfindungsgemäßen Polypeptid-Molekül, Fusionsprotein oder Fragment um ein Polypeptid-Molekül, das in einem Ca-Imaging-Experiment unter den in Köller et al (2001) beschriebenen Bedingungen einen 1,5 - 10-fachen Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration in primären Astrozyten und/oder Neuronen aus dem Zentralnervensystem von Ratten oder Menschen hervorruft.

Gegenstand der Erfindung ist weiterhin ein Verfahren zum Herstellen eines erfindungsgemäßen Polypeptid-Moleküls und/oder eines Fragments davon, das das Kultivieren einer erfindungsgemäßen Wirtszelle unter zur Expression und eventuellen Prozessierung geeigneten Bedingungen und gegebenenfalls das Aufreinigen des exprimierten Polypeptid-Moleküls oder Fragments umfasst. Alternativ können die erfindungsgemäßen Polypeptid-Moleküle und Fragmente davon auch durch chemische und enzymatische Synthese, wie beispielsweise Merrifield-Synthese, und/oder Fragmentkondensation erhalten werden. Kombinationen von chemischen, enzymatischen und rekombinanten Herstellungsverfahren kommen ebenfalls in Betracht.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Antikörper, der für ein erfindungsgemäßes Polypeptid-Molekül und/oder ein Fragment davon spezifisch ist. Allgemein sind spezifische Antikörper durch Immunisieren von Versuchstieren, wie z. B. Mäusen oder Kaninchen, mit den erfindungsgemäßen Polypeptid-Molekülen und/oder Fragmenten, die vorzugsweise an geeignete hochmolekulare Trägermoleküle (häufig Proteine) gekoppelt sind, erhältlich. Das Immunisieren kann hierbei durch den Zusatz geeigneter im Stand der Technik bekannter Adjuvanzien erleichtert werden. Monoklonale Antikörper sind üblicherweise durch Fusionieren von Milzzellen, die aus einer immunisierten Maus entnommen wurden, mit Tumorzellen und Selektionieren der dabei entstehenden Hybridome erhältlich. Diejenigen Hybridome, die effizient spezifische Antikörper sezernieren, können hierbei durch Absuchen des Überstandes bestimmt werden. Alternativ können Antikörper rekombinant hergestellt werden; bei der Herstellung rekombinanter Antikörper wird die mRNA aus Hybridomazellen oder B-Lymphozyten isoliert, die als Grundlage für die Synthese der entsprechenden cDNA fungiert und über PCR amplifiziert wird. Nach der Ligation in einen geeigneten Vektor und der Einführung in eine geeignete Wirtszellkultur läßt sich der Antikörper aus den Zellkulturüberständen oder den Zelllysaten gewinnen. Rekombinante Antikörper erlauben eine "Humanisierung" des Antikörpers und sind dadurch weniger immunogen. Die diesbezüglichen Verfahren sind im Stand der Technik bekannt.

Zum Nachweisen eines erfindungsgemäßen Polypeptid-Moleküls und/oder Fragments davon in einer biologischen Probe stellt die Erfindung ein in vitro-Verfahren bereit, das das Inkontaktbringen der Probe mit einem für das Polypeptid-Molekül und/oder für ein Fragment davon spezifischen Reagenz und das Nachweisen der Bindung umfasst.

WO 01/92530

PCT/EP01/06250

12

Die Erfindung stellt ferner einen Test-Kit zum Nachweisen eines Polypeptids und/oder eines Fragments davon bereit, der mindestens ein für das erfindungsgemäße Polypeptid und/oder Fragment spezifisches Reagenz umfasst. Ein Beispiel solcher spezifischen Reagenzien sind Antikörper, Antikörperfragmente, z. B. Fab oder F(ab)₂-Fragmente oder Antikörperderivate, wobei Antikörper besonders bevorzugt sind. Die Antikörper, Antikörperfragmente, z. B. Fab oder F(ab)₂-Fragmente oder Antikörperderivate können monoklonalen oder polyklonalen Ursprungs sein.

Ferner stellt die Erfindung ein in vitro-Verfahren zum Nachweisen einer erfindungsgemäßen Polypeptid-Molekül kodierenden Nukleinsäure in einer biologischen Probe bereit, das:

- das Inkontaktbringen der Probe mit einem erfindungsgemäßen Nukleinsäure-Molekül und/oder Fragment davon, wobei das Nukleinsäure-Molekül und/oder das Fragment eine nachweisbare Markierung tragen, und
- das Nachweisen der Markierung

umfasst.

Gegenstand der Erfindung sind ferner pharmazeutische Zusammensetzungen, die mindestens ein erfindungsgemäßes Polypeptid-Molekül und/oder ein Fragment davon und/oder ein pharmazeutisch verträgliches Salz eines solchen Polypeptid-Moleküls oder Fragments enthalten. Diese pharmazeutischen Zusammensetzungen können einen pharmakologisch verträglichen Träger und/oder Verdünnungsmittel enthalten. Geeignete Träger und/oder Verdünnungsmittel sind im Stand der Technik bekannt. Bevorzugt sind pharmazeutische Zusammensetzungen, die sich zur intravenösen, subkutanen oder intramuskulären Verabreichung eignen. In einer Ausführungsform der erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzungen enthält die Zusammensetzung neben einem oder mehreren erfindungsgemäßen Polypeptid-Molekülen oder Fragmenten derselben auch mindestens einen Antikörper.

Erfindungsgemäß können diese pharmazeutischen Zusammensetzungen zur Therapie von demyelinisierenden oder neurodegenerativen Erkrankungen oder von Entwicklungsstörungen des Nervensystems eingesetzt werden. Eine weitere Anwendung der erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzungen ist auf die Vorbeugung oder

WO 01/92530

PCT/EP01/06250

13

Behandlung einer HIV-Infektion und insbesondere einer HIV-Enzephalopathie in Menschen gerichtet. Von der Erfindung wird ebenfalls die Anwendung der erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzungen zur Therapie von Erkrankungen des hämatopoetischen Systems, des Immunsystems und des Herz/Kreislaufsystems umfaßt.

Pharmazeutische Zusammensetzungen, die mindestens ein für ein erfindungsgemäßes Polypeptid-Molekül und/oder ein Fragment davon spezifisches Reagenz enthalten, werden von der Erfindung ebenfalls umfasst. Vorzugsweise ist das Reagenz ein Antikörper. Solche pharmazeutische Zusammensetzungen können zur Diagnose oder Therapie von demyelinisierenden oder neurodegenerativen Erkrankungen oder von Entwicklungsstörungen des Nervensystems eingesetzt werden. Eine weitere Anwendung betrifft die Diagnose oder Behandlung einer HIV-Infektion und insbesondere einer HIV-Enzephalopathie in Menschen.

Die folgenden Figuren und Beispiele erläutern die Erfindung:

Figur 1 zeigt die auf RT-PCR beruhende Strategie zur Klonierung von SDF-1 β - und SDF-1 γ -cDNA aus Ratte. 5'- und 3'-UTR-Bereiche werden durch Linien, kodierende Bereiche durch Kästchen dargestellt. Kleine Pfeile zeigen die Position und Orientierung der Primer. Identische oder homologe Sequenzen werden durch identische graphische Elemente dargestellt. Die letzten vier Codons der kodierenden Region von SDF-1 β werden als schwarzes Kästchen dargestellt. Die Strichlinien markieren ein Insert von 2572 Nucleotiden in SDF-1 γ . Die 30 carboxyterminalen Codons von SDF-1 γ werden als schraffiertes Kästchen dargestellt.

Figur 2 zeigt das Ergebnis eines Northern-Blot-Versuchs zum Nachweis von SDF-1 β - und SDF-1 γ -Transkripten im Ischiasnerv von erwachsenen Ratten. Die Filter wurden (A) mit einem radioaktiv markierten, 626 Nucleotiden langen PCR-Fragment der NT-1-15-cDNA, das den Nucleotiden 743-1368 von SDF-1 β entspricht und Teil der SDF-1 β und SDF-1 γ gemeinsamen 3'-UTR-Sequenz ist, (B) mit einem 190 Nucleotide langen PCR-Fragment der allen SDF-1-Isoformen gemeinsamen kodierenden Region, das den Nucleotiden 49-239 in der SEQ ID NO:16 entspricht, (C) mit einem 1702 Nucleotide langen Fragment, das den Nucleotiden 625-2327 der SDF-1 γ -cDNA entspricht und von dem SDF-1 γ -spezifischen Insert durch Verdau des mit den Primern GAS2 und MMSE2 erhaltenen PCR-Produktes mit PvuII entstand, hybridisiert.

Figur 3 zeigt die Nukleinsäuresequenzen sowie die davon abgeleitete Aminosäuresequenzen der SDF-1 β - und SDF-1 γ -cDNA aus Ratte. Das SDF-1 γ -spezifische Insert ist durch einen Rahmen hervorgehoben. Die Nukleinsäuresequenz des gemeinsamen Signalpeptids ist unterstrichen. Die Numerierung der Nukleotide (links) und der Aminosäuren (rechts) entspricht der Sequenz von SDF-1 γ . (93) kennzeichnet die letzte Aminosäure von SDF-1 β .

Figur 4 zeigt einen Vergleich der Aminosäuresequenzen der SDF-1 Proteine von Maus und Ratte. Die Punkte stehen für identische Aminosäuren. Das 19 Aminosäuren lange Signalpeptid ist umrahmt.

Figur 5 zeigt das Ergebnis verschiedener Northern-Blot-Versuche zum Nachweis von SDF-1 β - und SDF-1 γ -Transkripten in verschiedenen Geweben (A) und Entwicklungsstadien (B). (A) Northern-Blot-Filter mit Gesamt-RNA aus Ischiasnerv (SN), Hirn (Br), Lunge (Lu), Herzen (HE), Muskel (Mu), Hoden (Te), Leber (Li), Niere (Ki), Milz (Sp) und Thymus (Th) von Ratten wurden mit einer radioaktiv markierten cDNA-Sonde aus dem SDF-1 β und SDF-1 γ gemeinsamen 3'-UTR-Bereich hybridisiert. (B) Nachweis von SDF-1 β - und SDF-1 γ -mRNA im Hirn von Ratten während der Entwicklung. Northern-Blot-Filter mit Gesamt-RNA aus dem Hirn von 17 Tage alten Rattenembryonen (E 17) sowie von Ratten 1, 4, 7, 13 und 20 Tage nach der Geburt (P1-20) und von erwachsenen Tieren (Ad) wurden wie bei (A) hybridisiert. (C) Nachweis von SDF- β - und SDF-1 γ -mRNA im Ischiasnerv von Ratten im Laufe der Entwicklung. Northern-Blot-Filter mit Gesamt-RNA, die aus Nerven von 1, 4, 7, 14 und 21 Tage alten Ratten (P1-21) und von erwachsenen Ratten (Ad) gewonnen wurde, wurden mit einer SDF-1 β/γ -Sonde wie bei (A) hybridisiert. Die Pfeilspitze in dem oberen Teil zeigt die Position der ribosomalen 28S-RNA; die unteren Teile zeigen mit Methylenblau gefärbte Northern-Blot-Filter.

Figur 6 zeigt das Ergebnis von *in situ*-Hybridisierungsversuchen zur zellulären Lokalisierung von SDF-1 γ -mRNA im Hirn von erwachsenen Ratten. Die Schnitte wurden mit einem Digoxigenin-UTP-markierten, 596 Nukleotide langen Antisense-Transkript, das aus einem Subklon der allen SDF-1-mRNA-Isoformen gemeinsamen 5'-UTR- und kodierenden Sequenz (A, D, E) bzw. von einem Subklon des SDF-1 γ -spezifischen Inserts (B, E, H) abgeleitet ist, inkubiert. Als negative Kontrolle diente die Hybridisierung mit Sense-Transkripten (C, F, I). (A, B, C) *Corpus callosum* mit „Perlenkette“-ähnlicher Anreihung von

WO 01/92530

PCT/EP01/06250

15

markierten Oligodendrozyten und stark markierten Neuronen in den bilateralen Schichten des *Indusium griseum dorsale* des *Corpus callosum*. (D, E, F) Starke Hybridisierungssignale werden in Purkinje- und Granulärzellen des Kleinhirns und schwache Signale in der äußeren Schicht beobachtet. (G, H, I) Sehr starke Hybridisierungssignale werden in pyramidalen und granulären Neuronen des Hippokampus nachgewiesen. Strich: 10 µm.

Figur 7 zeigt das Ergebnis von *in situ*-Hybridisierungsversuchen zur zellulären Lokalisierung von SDF-1 γ -mRNA im Neocortex von Ratten unter Verwendung der gleichen Sonden wie in Figur 6. Bei Schnitten aus den frontolateralen (A) und mediolateralen (B) Bereichen des Neocortex sind die Neuronen in sämtlichen Neocortex-Schichten (I - VI) sowohl mit der allen SDF-1-mRNA-Isoformen gemeinsamen Antisense-Sonde (A) als auch der SDF-1 γ -spezifischen Sonde (B) stark markiert.

Figur 8 zeigt das Ergebnis von *in situ*-Hybridisierungsversuchen zur zellulären Lokalisierung von SDF-1 γ -mRNA im Ischiasnerv von erwachsenen Ratten. Die Schnitte wurden mit Digoxigenin-UTP-markierten RNA-Sonden in Sense- und Antisense-Orientierung hybridisiert, die (a) von dem SDF-1 β und SDF-1 γ gemeinsamen 3'-UTR-Bereich (A-C, E, F), (b) von den allen SDF-1-Isoformen gemeinsamen 5'-UTR- und kodierenden Bereichen (G) und von dem SDF-1 γ -spezifischen Insert (H, I) abgeleitet wurden. (A, B, C) Der Längsschnitt zeigt mehrere spindelförmige Schwann-Zellen in der Nähe der Axone. (D) Mit einem Antikörper gegen das S100-Protein (einen Marker für Schwann-Zellen) immungefärbter Querschnitt. (E) Die Hybridisierungssignale bei einem dem Querschnitt in (D) benachbarten Querschnitt zeigen halbkreisförmige, die Axone umgebende markierte Schwann-Zellen, die an den gleichen Stellen wie die S100-immunpositiven Zellen auftreten (Pfeilspitzen in D, E). (G, H) Mit je einem der beiden Antisense-Transkripten markierte benachbarte Querschnitte, die zahlreiche halbkreisförmige Schwann-Zellen (siehe Pfeilspitzen) und die Wand eines Blutgefäßes in der oberen rechten Ecke zeigen. (C, F, I) Als negative Kontrolle diente die Hybridisierung mit Transkripten in Sense-Orientierung. Striche in A, C, G-I: 100 µm, in D-F: 10 µm.

Figur 9 zeigt den kodierenden Bereich der Nukleinsäuresequenz von SDF-1 γ aus Ratte und die davon abgeleitete Aminosäuresequenz.

Figur 10 zeigt den kodierenden Bereich der Nukleinsäuresequenz von humanem SDF-1 γ und die davon abgeleitete Aminosäuresequenz.

Figur 11 zeigt einen Vergleich der kodierenden Bereiche der Nukleinsäuresequenz von humanem und Ratten-SDF-1 γ . "hum": Humansequenz; "rat": Ratte.

Figur 12 zeigt einen Vergleich der von den Nukleinsäuresequenzen in Figur 11 abgeleiteten Aminosäuresequenzen von humanem und Ratten-SDF-1 γ . "hum": Humansequenz; "rat": Ratte.

Figur 13 zeigt schematisch die in dem Plasmid PCR11-TOPO (Invitrogen, Groningen, NL) eingebauten hSDF-1 γ - und hSDF-1 γ -H6-Konstrukte sowie die Konstrukte M-mhSDF-1 γ -H6, hSDF-1 γ -H6 und MF α -mhSDF-1 γ -H6 in dem Plasmid pFPMT121.

Figur 14 zeigt die Restriktionskarte des 439 bps langen DNA-Fragments mit dem kodierenden Bereich des hSDF-1 γ -Gens.

Figur 15 zeigt die Restriktionskarte des 457 bps langen DNA-Fragments mit dem kodierenden Bereich des hSDF-1 γ -Gens und dem His-Tag.

Figur 16 zeigt die Restriktionskarte des Expressionsplasmids pFPMT-M-mhSDF-1 γ -H6.

Figur 17 zeigt die Restriktionskarte des Expressionsplasmids pFPMT-hSDF-1 γ -H6.

Figur 18 zeigt schematisch die Strategie zur Generierung des Expressionsplasmids pFPMT-MF α -mhSDF-1 γ -H6. Die mit „P“ gekennzeichneten Pfeile stellen PCR-Primer dar.

Figur 19 zeigt die Restriktionskarte des Expressionsplasmids pFPMT-MF α -mhSDF-1 γ -H6.

Figur 20 zeigt das Ergebnis eines Western-Blot-Versuchs zum Nachweis der Expressionsprodukte in Zellextrakten von *H. polymorpha* (A) mit dem SDF-1-spezifischen Antikörper SDF-1(C19) (Santa Cruz Biotechnology, USA) und (B) mit einem His-Tag-spezifischen Antikörper (RGS-His Antibody, Mouse IgG1, Qiagen, Hilden, BRD). Die Spuren in (A) enthalten: (1) Sea Blue Prestained Standard, (2) M-mhSDF-1 γ -H6, (3) M-mhSDF-1 γ -H6 behandelt mit PNGaseF, (4) hSDF-1 γ -H6, (5) hSDF-1 γ -H6 behandelt mit PNGaseF, (6) MF α -mhSDF-1 γ -H6, (7) MF α -mhSDF-1 γ -H6 behandelt mit PNGaseF und (8) Zellextrakt ohne SDF-1 γ . Die Spuren in (B) enthalten: (1) Zellextrakt ohne SDF-1 γ , (2) Sea Blue Prestained Standard, (3) M-mhSDF-1 γ -H6, (4) M-mhSDF-1 γ -H6 behandelt

WO 01/92530

PCT/EP01/06250

17

mit PNGaseF, (5) hSDF-1 γ -H6, (6) hSDF-1 γ -H6 behandelt mit PNGaseF, (7) MF α -mhSDF-1 γ -H6 und (8) MF α -mhSDF-1 γ -H6 behandelt mit PNGaseF.

Figur 21 zeigt einen Vergleich der Wirkung von SDF-1 α und SDF-1 γ auf die Ca-Konzentration in Astrozyten. (A) 50 nM SDF-1 α ; (B) 35 μ g Hefezellextrakt mit rekombinantem SDF-1 γ (M-mhSDF-1 γ -H6); (C) 22,4 μ g Kontroll-Extrakt; (D) quantitative Auswertung des intrazellulären Calciumanstiegs bei SDF-1 γ und dem Kontroll-Extrakt bezogen auf den von SDF-1 α hervorgerufenen Calciumanstieg.

Figur 22 zeigt das Ergebnis eines Ca-Imaging-Experiments in Astrozyten für SDF-1 α ohne (A) und mit (B) Vorinkubation mit Antikörper gegen CXCR4.

Figur 23 zeigt das Ergebnis eines Ca-Imaging-Experiments in Astrozyten für SDF-1 γ ohne (A) und mit (B) Vorinkubation mit Antikörper gegen CXCR4.

Figur 24 zeigt das Ergebnis eines Ca-Imaging-Experiments in Cortexneuronen für SDF-1 γ ohne (A) und mit (B) Vorinkubation mit Antikörper gegen CXCR4.

Figur 25 zeigt das Ergebnis eines Ca-Imaging-Experiments in Astrozyten für das C-terminale basische Peptid von SDF-1 γ (30 Aminosäuren) ohne (A) und mit (B) Vorinkubation mit Antikörper gegen CXCR4.

Figur 26 zeigt das Ergebnis eines Ca-Imaging-Experiments in Astrozyten für: (A) das Peptid 2 (KKEKIG; SEQ ID NO:6) und (B) das Peptid 3 (KKKRQ; SEQ ID NO:8).

Beispiele

Beispiel 1

Klonierung und Sequenzanalyse von SDF-1 γ

A. Materialien und Methoden

Tierversuche

Erwachsene Wistar-Ratten (Körpergewicht 200-250 g) wurden durch intraperitoneale Verabreichung von Chloralhydrat (350 ml/kg Körpergewicht) betäubt. Der Ischiasnerv wurde im oberen Oberschenkelbereich mit Pinzetten kurzzeitig gequetscht (Müller et al., 1986). Vor der Gewinnung von RNA aus den Nervenbahnen wurde das Gewebe 2-3 mm

um die Wunde herum entfernt und entsorgt. Alle Tierversuche wurden gemäß den Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt.

RNA-Isolierung

Gesamt-RNA aus Rattengewebe wurde durch das Phenol-Guanidiniumthiocyanat-Verfahren (Chomczynski und Sacchi, 1987) isoliert. Die gefrorenen Gewebeprobe wurden zweimal 45 Sekunden lang bei 2500 Upm mit einem Polytron (Brinkmann, Westbury, NY) homogenisiert. Poly(A)⁺-RNA wurde durch Oligo(dT)-Cellulose-Chromatographie isoliert (Sambrook et al., 1998).

Herstellung einer cDNA-Genbank

Zur Herstellung einer cDNA-Genbank wurden 4,5 µg aus Ischiasnerv von erwachsenen Ratten isolierte Poly(A)⁺-RNA als Matrize und Oligo(dT)₁₂₋₁₈ als Primer verwendet. cDNA wurde mit dem TimeSaver-cDNA-Synthese-Kit (Pharmacia-LKB, Piscataway, NJ) generiert. Die cDNA wurde unter Verwendung des Gigapack II-Verpackungsextraktes (Stratagene) mit *EcoRI*/ vorgeschrittenen λ-ZAP II-Phagenpartikeln durch Ligation verknüpft. Die Titration der erhaltenen cDNA-Genbank ergab eine Komplexität von etwa 0,5 x 10⁶. Das Screening der cDNA-Genbank wurde durch Standardverfahren (Sambrook et al., 1989) mit einem radioaktiv markiertem cDNA-Fragment aus dem nicht translatierten 3'-Bereich von rSDF-1β (Nukleotide 743-1368) durchgeführt.

Oligonukleotide

Folgende Oligonukleotide wurden mit einem GeneAssembler Plus-Synthesator (Pharmacia, Piscataway, NJ) synthetisiert.

MMSE2: 5'-ACGCCATGGACGCCAAGGTCG-3' (SEQ ID NO:19) entspricht den Nukleotiden 49-69 der rSDF-1β-cDNA.

GAS2: 5'-ACTGTAAGGAAGACCCTCTCACC-3' (SEQ ID NO:20) entspricht den Nukleotiden 2327-2303 von SDF-1γ.

GAS3: 5'-GTTGAGACTATGCATCGACTCCAAC-3' (SEQ ID NO:21) entspricht den Nukleotiden 2576-2552 von SDF-1γ.

DNA-Sequenzierung und -analyse

Beide cDNA-Stränge von SDF-1 β und von dem 2,5 Kb langen Insert in SDF-1 γ einschließlich der flankierenden Bereiche wurden mit der Didesoxy-DNA-Sequenzierungsmethode (Sanger et. al., 1977) mit Hilfe des T7-Sequenzierungskits (Pharmacia-LKB) sequenziert. Die Sequenzen wurden durch Sequenzierung mehrerer unabhängiger Klone aus RT-PCR-Reaktionen bestätigt. Die Daten wurden mit Hilfe der Programme FASTA (Pearson, 1990) und BLAST (Altschul et al., 1990) mit der EMBL-Datenbank verglichen. Eine weitergehende Analyse der Sequenzen wurde mit Hilfe des PCGENE-Software-Pakets (Intelligenetics, Mountain View, CA) durchgeführt.

RT-PCR

Die Umkehrtranskription wurde mit 1-5 μ g Gesamt-RNA und Reverse-Transkriptase Superscript (Gibco, Gaithersburg) gemäß den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Der erste cDNA-Strang wurde mit RNase H (Boehringer Mannheim) verdaut und anschließend wurde 1/10 des Volumens als Matrize für die PCR-Amplifizierung mit Amplitaq-Polymerase (Perkin Elmer) oder Pfu-Polymerase (Stratagene, La Jolla) (für SDF-1 γ) verwendet.

B. Klonierung und Sequenzierung von SDF-1 γ

Bei der Identifizierung von Genen, die nach einer Nervenläsion differentiell exprimiert werden, wurde aus einer cDNA-Genbank, die aus Ischiasnerv von Ratten erzeugt wurde, der cDNA-Klon NT-I-15 mit 2174 Nukleotiden isoliert. Die Analyse der Sequenz NT-I-15-Klons zeigte, dass dieser Klon eine 86%ige Homologie zu dem nicht translatierten 3'-Bereich (UTR) der SDF-1 β -cDNA von Maus (vgl. Tashiro et al., 1993) aufweist. Bei Northern Blot-Versuchen unter stringenten Waschbedingungen hybridisierte NT-I-15 mit zwei Transkripten aus dem Ischiasnerv von erwachsenen Ratten (Figur 2). Während das kleinere Transkript mit etwa 3 Kb der Größe der SDF-1 β -mRNA entsprach, war das längere Transkript mit 5,5 Kb unbekannt. Dieses Transkript wurde SDF-1 γ genannt.

Die Isolierung von vollständigen Klonen für beide Transkripte wurde sowohl durch Screenen einer cDNA-Genbank als auch durch Umkehrtranskription-PCR (RT-PCR) angegangen. Durch Screenen einer cDNA-Genbank aus Ischiasnerv von Ratten mit einem 626 Nukleotide langen cDNA-Fragment des NT-I-15-Klons, das den Nukleotiden 734-1368 des 3'-UTR-Bereiches von SDF-1 β der Ratte entspricht, erhielt man einen vollständigen

cDNA-Klon mit einer Länge von 2819 Nukleotiden, der den vollständigen kodierenden Bereich von SDF-1 β enthält.

Durch erneutes Screenen der cDNA-Genbank mit dem 626 Nukleotide langen cDNA-Fragment von NT-1-15 erhielt man einen unvollständigen SDF-1 γ -Klon von etwa 3400 Nukleotiden (SDF-1-G6), der nicht nur den vollständigen 3'-UTR-Bereich und die letzten 4 Codons (90-93) von SDF-1 β , sondern auch eine neue (nicht-kodierende) Sequenz mit einer Länge von etwa 1 Kb stromaufwärts des Codons 90 enthielt. Es wurde dann angenommen, dass das im Northern Blot identifizierte Transkript mit einer Länge von 5,5 Kb eine alternativ gespleißte Isoform darstellt, die durch ein 2,5 Kb langes Insert zwischen den Codons 89 und 90 von SDF-1 β erzeugt wird. Zur Bestätigung dieser Hypothese wurde durch RT-PCR mit Antisense-Primern, die für die neue Sequenz am 5'-Ende des SDF-G6-Klons spezifisch sind (Primer GAS2 und GAS3), und einem Sense-Primer, der der Translationsinitiationsstelle von SDF-1 β entspricht (Primer MNSE2), ein neues Fragment erzeugt. Die Sequenzierung des amplifizierten PCR-Fragments zeigte ein Transkript, das ab Codon 89 stromabwärts eine andere Sequenz als SDF-1 β aufwies. Dieses Transkript kodierte für ein Peptid von 119 Aminosäuren, von denen die ersten 89 Aminosäuren mit den ersten 89 Aminosäuren von SDF-1 α und - β identisch waren. Anschließende Northern Blot-Analysen bestätigten, dass die erhaltene Sequenz das 5,5 Kb lange Transkript darstellte. cDNA-Sonden aus dem SDF-1 β und - γ gemeinsamen 3'-UTR-Bereich (Fig. 2A) oder aus dem allen SDF-Isoformen gemeinsamen 5'-Bereich der kodierenden Region (Fig. 2B) hybridisierten sowohl mit dem 3 Kb langem (SDF-1 β) als auch mit dem 5,5 Kb langem (SDF-1 γ) Transkript, während eine cDNA-Sonde, die für das 2,5 Kb lange Insert spezifisch war, nur mit dem 5,5 Kb SDF-1 γ -Transkript hybridisierte (Fig. 2C). Im Ischiasnerv von Ratten konnte keine SDF-1 α -mRNA mit einer Länge von 1,5 Kb nachgewiesen werden.

Beide Stränge der SDF-1 β -cDNA von Ratte wurden sequenziert. Bei SDF-1 γ wurde das neue Insert mit einer Länge von 2572 Nukleotiden und die flankierenden Bereiche mit den bekannten SDF-1 β -Sequenzen ebenfalls doppelt sequenziert. Die abgeleitete Aminosäuresequenz für SDF-1 β ergibt ein Peptid von 93 Aminosäuren mit einem theoretischem Molekulargewicht von 10,5 Kd. Die ersten 19 Aminosäuren stellen ein Signalpeptid für sezernierte Proteine dar. Die abgeleitete Aminosäuresequenz für SDF-1 β beinhaltet die ersten 89 Aminosäurereste von SDF-1 β und 30 zusätzliche Aminosäuren im Carboxy-

WO 01/92530

PCT/EP01/06250

21

terminalen Bereich, die keine Homologie zu SDF-1 β zeigen (vgl. Fig. 3). Das theoretische Molekulargewicht des 119 Aminosäuren langen SDF-1 γ Peptids ist 13,5 Kd. Die Aminosäuresequenz des SDF-1 β von Ratte zeigt eine starke Homologie (96,8%) zu dem entsprechenden Maus-Protein (98,9% unter Berücksichtigung konservativer Aminosäureaustausche). Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen der neuen SDF-1-Isoformen SDF-1 γ und SDF-1 β mit den bekannten SDF-1-Sequenzen wird in Figur 4 gezeigt.

Beispiel 2

Nachweis von SDF-1 β - und SDF-1 γ -mRNA in verschiedenen Geweben und Entwicklungsstadien

A. Northern Blot-Analyse

Je 10 μ g Gesamt-RNA wurden in 1,2%igen Agarosegelen, die 15% Formaldehyd enthielten, fraktioniert und dann durch Standardverfahren auf Nytran NY 13 N-Membranen (Schleicher und Schüll, Keene, NH) übertragen. Die Filter wurden mit UV-Licht bestrahlt und mit Methylblau gefärbt (Sambrook et al., 1989), in einer 0,5 M Natriumphosphat-Lösung (pH 7,0) mit 7% SDS vorhybridisiert und mit $1-5 \times 10^6$ cpm/ml einer 32 P-markierten cDNA-Sonde in derselben Lösung hybridisiert. cDNA-Fragmente entsprechend (i) dem gemeinsamen 3'-UTR-Bereich von SDF-1 β/γ (Nukleotide 743-1368 in SDF-1 β), (ii) dem allen SDF-1-Isoformen gemeinsamen kodierenden Bereich (Nukleotide 49-239) und (iii) einem 1702 Nukleotide langen Abschnitt des SDF-1 γ -spezifischen Inserts (Nukleotide 625-2327 in der SDF-1 γ -cDNA) wurden durch einseitig gerichtete PCR (Stürzl et al., 1991) radioaktiv markiert. Nach dem Hybridisieren wurden die Filter mindestens 15 Minuten lang bei 60°C in 2 x SSC/1% SDS und 15 Minuten lang bei 60°C in 0,1 x SSC/1% SDS gewaschen. Die Filter wurden entweder zusammen mit einem Röntgenfilm (X-Omat AR, Kodak) exponiert oder mit einem BAS-1050-Bioimager (Fuji) direkt quantifiziert.

B. Nachweis von SDF-1 β - und SDF-1 γ -mRNA in verschiedenen Geweben

Die in Figur 5 A gezeigten Northern Blot-Hybridisierungsversuche wurden mit Gesamt-RNA aus verschiedenen Geweben von erwachsenen Ratten und einem 602 Nukleotide langen Fragment aus dem gemeinsamen 3'-UTR-Bereich von SDF-1 β/γ , das mit 32 P-dCTP radioaktiv markiert worden war, durchgeführt. Die Verteilung der SDF-1 β - und

SDF-1 γ -mRNA über verschiedene Gewebe von erwachsenen Ratten zeigte ein komplementäres Muster. Während die β -Isoform vor allem in der Leber, der Niere, der Milz und dem Thymus nachgewiesen wurde, trat SDF-1 γ vorwiegend im Herz- und Lungengewebe sowie im reifen Gewebe des Nervensystems auf (Fig. 5). Die Tatsache, dass das SDF-1 β -Transkript vor allem im embryonalen und neonatalen Hirngewebe und im Ischiasnerv bevorzugt auftritt, deutet auf eine differentielle Regulation der SDF-1-Expression während der Entwicklung des Nervensystems hin. In Muskel- und Hodengewebe konnten weder SDF-1 β - noch SDF-1 γ -mRNA nachgewiesen werden (Fig. 5A).

C. Nachweis von SDF-1 β - und SDF-1 γ -mRNA im Gehirn und im Ischiasnerv im Laufe der Entwicklung

Gehirn:

Zur Untersuchung der entwicklungspezifischen Verteilung von SDF-1 β und SDF-1 γ wurde RNA aus Hirngewebe zu verschiedenen Stadien der Entwicklung in Ratten (von 17 Tage alten Embryonen (E17) bis zu erwachsenen Ratten) mit einem 602 Nukleotide langen Fragment des gemeinsamen 3'-UTR-Bereichs von SDF-1 β/γ geprobt. Im Hirngewebe von E17-Embryonen wurde vorwiegend SDF-1 β -mRNA nachgewiesen, die Transkriptmenge sank jedoch mit zunehmendem Alter und das Transkript konnte im Hirngewebe von erwachsenen Ratten nicht mehr nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu war die Menge an SDF-1 γ -Transkript bei E17-Embryonen sehr niedrig, sie nahm jedoch stetig zu und erreichte ein Maximum bei erwachsenen Ratten (Fig. 5B).

Ischiasnerv:

Aus Ischiasnerv von Ratten in verschiedenen Entwicklungsstadien (von einem Tag nach der Geburt (P1) bis zum Erreichen des Erwachsenenalters) wurde Gesamt-RNA isoliert. Im P1-Stadium wurde SDF-1 β -mRNA in kleinen Mengen nachgewiesen; die Transkriptmenge stieg im P4-P7-Stadium und sank im Nervengewebe von erwachsenen Ratten unter der Nachweisgrenze (Fig. 5C). SDF-1 γ -mRNA wurde erstmals im P4-Stadium beobachtet; die Transkriptmenge erreichte im P-14-Stadium ein Maximum und sank dann im Gewebe von erwachsenen Ratten auf ein mittleres Niveau (Fig. 5C).

SDF-1 β - und SDF-1 γ -mRNAs scheinen also während der Entwicklung und im Nervensystem der erwachsenen Ratte ein unterschiedliches Expressionsmuster zu zeigen. Während die SDF-1 β -Isoform überwiegend im embryonalen oder perinatalem ZNS und PNS

WO 01/92530

PCT/EP01/06250

23

auftritt, ist SDF-1 γ die wichtigste Variante im Nervensystem von erwachsenen Ratten (Fig. 5B,C). In dem Zeitraum zwischen dem 4. und dem 7. Tag nach der Geburt, in dem die Differenzierung der Gliazellen und die Neuronenreifung einsetzt, treten die SDF-1 β - und SDF-1 γ -Transkripte in nahezu gleichen Mengen auf.

D. Nachweis von SDF-1 β - und SDF-1 γ -mRNA nach einer Läsion des Ischiasnervs

Nach Verletzung des Ischiasnerv durch Quetschung wurden am distalen Ende des Nervs kleine Änderungen des SDF-1 β - und SDF-1 γ -mRNA-Musters beobachtet. Mittels "multiple quantitative bioimaging" von radioaktiven Northern Blot-Filtern wurde nach der Läsion eine vorübergehende Erhöhung der SDF-1 β -mRNA-Menge festgestellt, die zwei Tage nach der Nervenquetschung ein Maximum bei 175% erreichte; danach sanken die Werte, bis sie am 7. Tag nach der Verletzung das gleiche Niveau wie die Kontrolle erreichten. Für die SDF-1 γ -mRNA wurden nach der Nervenläsion keine signifikanten Änderungen festgestellt.

Beispiel 3

Zelluläre Lokalisierung des SDF-1 γ -Transkripts durch *in situ*-Hybridisierung

A. *In situ*-Hybridisierung

Die Gewebeproben wurden in Tissue Tec II (Miles, Napperville, IL) eingebettet, in Methybutan bei -70°C eingefroren und in 20 μ m starke Schnitte geschnitten. Die Schnitte wurden fixiert und anschließend acetyliert und 4 Stunden lang bei 55°C gemäß Angerer et al. (1987) vorhybridisiert. *In vitro*-Transkripte (i) eines Subklons des gemeinsamen 3'-UTR-Bereiches von SDF-1 β/γ (Nukleotide 1758-2199 in SDF-1 β), (ii) eines Subklons, der allen SDF-1-mRNA-Isoformen gemeinsamen 5'-UTR- und kodierenden Bereiche (Nukleotide 1-596 in der SDF-1 β -cDNA) und (iii) eines Subklons des SDF-1 γ -spezifischen Inserts (Nukleotide 681-1313 in der SDF-1 γ -cDNA) wurden mit Hilfe des DIG-RNA-Markierungskits von Boehringer Mannheim unter Verwendung von Digoxigenin-UTP erzeugt. Nach der Hybridisierung bei 55°C über Nacht wurde eine RNase A-Behandlung (20 μ g/ml in 0,6 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, pH 8) 20 Minuten lang bei 37°C durchgeführt. Die Schnitte wurden dann dreimal je 20 Minuten lang bei 50°C mit 2 x SSC und dreimal je 20 Minuten lang bei 50°C mit 0,2 x SSC gewaschen. Der Digoxigenin-Nachweis wurde nach den Anweisungen des Herstellers (Boehringer Mannheim) durchgeführt.

B. Zelluläre Lokalisierung des SDF-1 γ -Transkripts

Für die *in situ*-Hybridisierung wurden Antisense-Transkripte aus (a) dem gemeinsamen 3'-UTR-Bereich von SDF-1 β/γ , (b) dem allen SDF 1-Isoformen gemeinsamen 5'-UTR- und kodierenden Bereich und (c) dem SDF-1 γ -spezifischen Insert mit Digoxigenin-UTP markiert. Die Sense-Transkripte dienten als negative Kontrollen.

In ZNS von erwachsenen Ratten wurden sowohl mit der allen SDF-1-Isoformen gemeinsamen als auch mit der SDF-1 γ -spezifischen Sonde starke und ausgedehnte Hybridisierungssignale in Bereichen mit grauer Hirnsubstanz sowie in „Perlenketten“-ähnlichen Anreihungen von Oligodendrozyten in myelinisierten Nervenfasern wie etwa dem *Corpus callosum* beobachtet (Fig. 6A,B). Weitere Hybridisierungssignale traten vor allem in Verbindung mit Purkinje- und granulären Neuronen im Kleinhirn (Fig. 6D,E), in pyramidalen und granulären Neuronen im Hippocampus (Fig. 6G,H) sowie in Neuronen sämtlicher Hauptschichten des Neocortex (Fig. 7A,B), auf. Mit den entsprechenden Sense-Transkripten erhielt man keine Hybridisierungssignale (siehe Fig. 6C,F,I für die Sense-Sonden für SDF-1 γ).

Die mit dem SDF-1 γ -spezifischen Antisense-Transkript erhaltenen Signale waren nahezu identisch mit dem Hybridisierungsmuster, das mit der gemeinsamen SDF-1-Antisense-Sonde erhalten wurde, was darauf hindeutet, dass die SDF-1 γ -Isoform in Neuronen und Oligodendrozyten des Gehirns von erwachsenen Ratten exprimiert wird. SDF-1 β -Transkripte, soweit sie im Gehirn von erwachsenen Ratten auftreten, scheinen in den gleichen Bereichen und Zellpopulationen wie SDF-1 γ vorhanden zu sein.

In Längsschnitten des Ischiasnervs von erwachsenen Ratten erzeugt eine Antisense-Sonde aus dem gemeinsamen 3'-UTR-Bereich von SDF-1 β/γ spindelförmige Hybridisierungssignale, die der typischen Form von Schwann-Zellen in der Nähe der Axonfasern ähnelten (Fig. 8A,B). Die identische Lokalisierung der S-100-Immunreaktivität sowie der Hybridisierungssignale in Querschnitten des Ischiasnervs (siehe Pfeilspitzen) bestätigten die Expression von SDF-1 β/γ -mRNA in Schwann-Zellen (Fig. 8 D,E). Bei Verwendung einer SDF-1 γ -spezifischen Antisense-Sonde erhält man im Ischiasnerv von erwachsenen Ratten ein Markierungsmuster (Fig. 8H), das dem Hybridisierungsmuster des mit dem allen SDF-Isoformen gemeinsamen Antisense-Transkripts (Fig. 8G) stark ähnelte.

SDF-1 γ -mRNA (und vermutlich auch die SDF-1 β -Isoform) treten sowohl in Schwann-Zellen (siehe Pfeilspitzen) als auch in vaskulären Zellen (obere rechte Ecke in Fig. 8G,H) des Ischiasnervs auf. Die Ergebnisse der *in situ*-Hybridisierungsversuche stimmen mit den Ergebnissen der Northern Blot-Versuche der Figuren 2 und 5 überein. SDF-1 α -mRNA wurde mit Antisense-/Sense-Transkripten aus dem SDF-1 α -spezifischen 3'-UTR-Bereich weder im Gehirn noch im Ischiasnerv von erwachsenen Ratten nachgewiesen.

Beispiel 4

Expression von SDF-1 γ -Produkten in *Hansenula polymorpha*

A. hSDF-1 γ -Konstrukte

Zur Expression von SDF 1 γ in *Hansenula polymorpha* wurden drei verschiedene Konstrukte erzeugt, die zwecks besserer analytischer Zugänglichkeit mit einem His-Tag ausgestattet wurden. Die Konstrukte werden in Figur 13 gezeigt.

1. M-mhSDF-1 γ -H6 (Methionin/matures humanes SDF 1 γ /His-Tag). Bei diesem Fusionsprotein befindet sich die Sequenz des reifen humanen SDF-1 γ (Aminosäuren 20-119 in SEQ ID NO:12) hinter einem N-terminalen Methionin-Rest. Da keine Leader-Sequenz vorhanden ist, wurde eine cytosolische Lokalisierung erwartet. Am C-Terminus befinden sich sechs Histidin-Reste (His-Tag).
2. hSDF-1 γ -H6 (unreifes humanes SDF-1 γ /His-Tag). Dieses Konstrukt umfaßt Aminosäuren 1-119 von SDF-1 γ (SEQ ID NO:12), gefolgt von einem C-terminalen His-Tag. Es enthält somit die natürliche, in menschlichen Zellen erkannte Leader-Sequenz. Da mitunter Leader-Sequenzen auch in heterologen Wirtszellen erkannt werden, sollte mit diesem Konstrukt untersucht werden, ob *H. polymorpha* das authentische SDF-1 γ -Leader-Peptid erkennt.
3. MF α -mhSDF-1 γ -H6 (Prepro-Sequenz des Mating-Faktor α aus *Saccharomyces cerevisiae*/matures humanes SDF-1 γ /His-Tag). Hier befindet sich die Sequenz des reifen SDF-1 γ (Aminosäuren 20-119 in SEQ ID NO:12) hinter der in *H. polymorpha* häufig genutzten Prepro-Sequenz des Mating-Faktor α aus der verwandten Bierhefe *Saccharomyces cerevisiae*. Dieses Konstrukt sollte von *H. polymorpha* sezerniert werden.

B. Konstruktion von Expressionsplasmiden

Als Ausgangskonstrukt diente das Plasmid SDF-1 γ -PCRII-TOPO, das das 439 bps lange SDF-1 γ -Insert enthielt (Fig. 14). In einem ersten Schritt wurden der hSDF-1 γ -Sequenz durch PCR-Mutagenese sechs Kodons für einen C-terminalen His-Tag hinzugefügt (hSDF-1 γ -H6, Fig. 15).

Als Basisvektor für die spätere Expression von SDF-1 γ -Konstrukten in *H. polymorpha* wurde das integrative Plasmid pFPMT121 (Gellissen, 2000) eingesetzt, in dem das zu exprimierende fremde Gen unter der Kontrolle des *FMD*-Promotors steht. Auf der Grundlage dieses Plasmids wurden folgende Expressionsvektoren konstruiert:

1. pFPMT-M-mhSDF-1 γ -H6. Von dem M-mhSDF-1 γ -H6-ORF wurde mittels PCR ein DNA-Fragment generiert, bei dem die kodierende Sequenz von SDF-1 γ von einer *EcoRI*- (vor dem Startkodon) und einer *BamHI*-Restriktionsschnittstelle flankiert ist. Als Template-DNA diente hSDF-1 γ -H6 in PCRII-TOPO (Invitrogen, Groningen, NL). Das PCR-Produkt wurde mit *EcoRI/BamHI* verdaut und zwischen die entsprechenden Stellen des pFPMT121-Plasmids kloniert. Die Karte des resultierenden Plasmids pFPMT-M-mhSDF-1 γ -H6 wird in Fig. 16 gezeigt.
2. pFPMT-hSDF-1 γ -H6. Auch bei diesem Konstrukt wurde zunächst ein von einer *EcoRI*- und einer *BamHI*-Schnittstelle flankiertes PCR-Produkt erzeugt, wobei wiederum hSDF-1 γ -H6 in PCRII-TOPO als Template-DNA diente. Das mit *EcoRI* und *BamHI* verdautete PCR-Produkt wurde zwischen die entsprechenden Stellen des pFPMT121-Plasmids kloniert. Die Karte des resultierenden Plasmids pFPMT-hSDF-1 γ -H6 wird in Fig. 17 gezeigt.
3. pFPMT-MF α -mhSDF-1 γ -H6. Zur Generierung dieses Plasmids wurden zwei separate PCR-Produkte erzeugt (siehe Fig. 18). Das erste PCR-Produkt (PCR IA) umfaßte die Kodons der Prepro-Sequenz des Mating-Faktors α , flankiert von einer *EcoRI*-Schnittstelle (vor dem Startkodon) sowie am anderen Ende von Basen mit Homologie zu den ersten Kodons der reifen hSDF-1 γ -Sequenz. Das zweite PCR-Produkt (PCR IB) enthielt die Sequenz des reifen hSDF-1 γ , am vorderen Teil flankiert von Basen mit Homologie zum hinteren Teil der Prepro-Sequenz des Mating-Faktors α , am hinteren Teil flankiert von einer *BamHI*-Schnittstelle (hinter dem Stopkodon). Dann wurde eine weitere PCR-Reaktion

(PCR II) durchgeführt, bei der die Produkte der beiden oben beschriebenen PCR IA und IB gemischt wurden. Als Primer wurden der Hin-Primer aus PCR IA (der mit der *EcoRI*-Schnittstelle) und der Rück-Primer aus PCR IB (der mit der *BamHI*-Schnittstelle) eingesetzt. Das entstandene PCR-Produkt umfaßte die Prepro-Sequenz des Mating-Faktors α fusioniert mit der Sequenz des mhSDF-1 γ -H6, flankiert von *EcoRI*- (vor dem Startkodon) und *BamHI*-Schnittstellen (hinter dem Stopkodon). Nach Verdauung mit *EcoRI/BamHI* wurde das Fragment zwischen die entsprechenden Schnittstellen des pFPMT121-Plasmids kloniert. Die Karte des resultierenden Plasmids pFPMT-MF α -mhSDF-1 γ -H6 wird in Fig. 19 gezeigt.

C. Transformation von *H. polymorpha* mit den erzeugten Expressionsvektoren, Stammgenerierung und -identifizierung

Zur Herstellung kompetenter *H. polymorpha*-Zellen für die Elektroporation wurden 5 ml YPD-Medium wurden mit einer Einzelkolonie von *H. polymorpha* RB11 (*odc*, Orotidin-5-phosphat-decarboxylase-defizienter (Uracil-auxotropher) *H. polymorpha*-Stamm (Weydemann et al., 1995)) beimpft und 16 Std lang bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurden 100 ml YPD-Medium in einem 2 l-Erlen-Meyer-Kolben mit 3 ml dieser Vorkultur beimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8-1 bei 37°C inkubiert (Schüttelfrequenz 140 rpm). Die Zellernte erfolgte durch Zentrifugation der Kultur in 50 ml-Falcon-Röhrchen (4000 rpm; 6') in einer Beckmann-Zentrifuge. Nach Entfernung der Überstände wurden die Zellen in 20 ml 50 mM Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,5; vorgewärmt auf 37°C) resuspendiert, mit 0,5 ml 1 M DTT versetzt und 15' lang bei 37°C inkubiert (Wasserbad). Anschließend wurden die Zellen erneut abzentrifugiert (3000 rpm; 10', Beckmannzentrifuge) und mit 100 ml, anschließend mit 50 ml STM-Puffer (270 mM Saccharose; 10 mM Tris-HCl pH 7,5; 1 mM MgCl₂) gewaschen. Nach erneutem Abzentrifugieren wurden die Zellen in 0,5 ml STM-Puffer resuspendiert und als 60 μ l-Aliquots entweder direkt für Transformationen eingesetzt oder für spätere Verwendung bei -70°C eingefroren.

Kompetente Zellen von *H. polymorpha* RB11 wurden mit den drei erzeugten Expressionsplasmiden (siehe oben) wie folgt transformiert: 60 μ l kompetente *H. polymorpha*-Zellen wurden mit 1-2 μ g der einzuführenden zirkulären Plasmid-DNA versetzt und in Elektroporationsküvetten mit 2 mm Spaltbreite überführt. Die Elektroporation erfolgte bei 2 kV, 25 μ F und 200 Ohm. Anschließend wurden die Zellen in Reagenzgläser mit 1 ml YPD-Medium überführt und 1 Std. lang bei 37°C geschüttelt (Winkel 45°; 160 rpm). Nach

WO 01/92530

PCT/EP01/06250

26

dieser Erholung wurden je 330 µl der Zellen auf YNB-Agar-Platten (1% Glukose; ohne Uracil) ausplattiert. Die Platten wurden bei 37°C inkubiert, bis makroskopische Uracil-prototrophe Kolonien sichtbar wurden (ca. 1 Woche).

Anschließend wurden jeweils 36 Uracil-prototrophe Kolonien durch viermaliges Passagieren und zweimaliges Stabilisieren in stabile Stämme überführt. Zur Passagierung wurden je 2 ml YNB-Medium (1% Glukose) mit einzelnen Uracil-prototrophen Kolonien von den Transformanten-Platten angeimpft und 2 Tage lang bei 37°C inkubiert (Winkel 45°; Schüttelfrequenz 160 rpm). Je 150 µl der resultierenden Kulturen wurden in je 2 ml frisches YNB-Medium überführt und erneut 2 Tage lang inkubiert (s. o.). Dieser Vorgang wurde insgesamt viermal durchgeführt (= vier Passagen). Zur Stabilisierung wurden je 150 µl der Kulturen aus der letzten Passage in 2 ml YPD-Medium überführt und für 2 Tage bei 37°C inkubiert (s. o.). Anschließend wurden Aliquots dieser Kulturen auf YNB-Agar-Platten (1% Glukose; ohne Uracil) ausplattiert. Pro Ausstrich wurde eine einzelne Kolonie isoliert und als Stamm definiert.

D. Induktion der Expression und Nachweis von SDF-1 γ -Produkten

Nach Vereinzelung wurden alle Stämme einer MeOH-Induktion unterzogen und die intrazellulären löslichen Fraktionen wurden mittels Western-Blot bezüglich ihres Gehalts an hSDF-1 γ -Produkten analysiert. Zunächst wurden je 2 ml YPD-Medium in 10 ml-Reagenzglasern mit Einzelkolonien der zu testenden Stämme beimpft und anschließend wurden die Kulturen zur Induktion der Fremdgenexpression 16 Std. lang bei 37°C inkubiert (Winkel 45°; Schüttelfrequenz 160 rpm). Anschließend wurden 150 µl der resultierenden dichtgewachsenen Kulturen zum Beimpfen von je 3 ml YNB-Medium (1% Glycerin) eingesetzt. Nach 24 Std. Schütteln bei 37°C wurden die Zellen abzentrifugiert und in je 3 ml YNB-Medium (1% MeOH) resuspendiert. Die Fremdgenexpression wurde dann durch erneutes Schütteln 24 Stunden lang bei 37°C induziert.

Nach Abzentrifugation der Zellen aus den Induktionskulturen wurden zur Präparation von Kulturüberständen Aliquots der Überstände mit 4 x SAB (8% w/v SDS; 40% w/v Glycerin; 8 mM EDTA pH 6,8; 250 mM Tris pH 6,8; 0,04% w/v Bromphenolblau; 40% v/v α -Mercaptoethanol) versetzt und für 5' bei 95°C denaturiert.

Zur Präparation intrazellulärer löslicher Fraktionen wurden folgende Schritte auf Eis oder bei 4°C ausgeführt: Die Zellpellets aus den Induktionskulturen wurden in je 500 µl Extraktionspuffer (50 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,1% v/v Triton X-100 oder PBS-Puffer) resuspendiert und mit je 12,5 µl PMSF versetzt. Anschließend wurden die Proben in 1,5 ml-Eppendorf-Gefäße überführt. Nach Zugabe von 500 µl Glasperlen erfolgte der Zellaufschluss in einem Vibrax bei 2500 rpm. Die Überstände wurden in frische Eppendorf-Gefäße überführt und 10' lang bei 10.000 rpm (Eppendorf-Zentrifuge mit Kühlfunktion) zentrifugiert. Die Überstände dieser Zentrifugation stellten die sogenannte intrazelluläre lösliche Fraktion dar. Diese wurden für direkte Proteingelektrophorese mit ¼ Vol. 4 x SAB versetzt und 5' lang bei 95°C denaturiert, oder für weitere Verwendungen ohne SAB-Zusatz bei -20°C eingefroren.

Für die PNGaseF-Verdauung wurden je 8 µl der nativen intrazellulären löslichen Fraktion mit 1 µl 1% SDS versetzt und 5' lang bei 95°C inkubiert. Anschließend erfolgte Zugabe von 1 µl PNGaseF (2 u; Roche) oder H₂O. Nach Inkubation bei 37°C 16 Std. lang wurden 4 µl 4 x SAB hinzugefügt, die Proben 5' lang bei 95°C denaturiert und auf Proteingelen aufgetrennt.

Die Auftrennung der denaturierten Proben durch Proteingelektrophorese erfolgte auf 4-20%igen Tricine-SDS-Gelen (Novex) nach Herstellerangaben. Anschließend wurden die Proteinbanden in einer Semy-Dry-Blot-Apparatur (Trans-Blot SD; Biorad) nach Herstellerangaben auf Nitrocellulose-Membranen übertragen. Für die Western-Blots wurde als primäre Antikörper (-seren) ein His-Tag-spezifischer monoklonaler Antikörper aus Maus (RGS-His-Antikörper, Qiagen, Hilden, BRD) oder ein SDF-1-spezifisches polyklonales Serum aus Ziege (SDF-1 (C19); #sc6193; Santa Cruz Biotechnology, USA) eingesetzt. Die Western-Blots wurden mit den Western Breeze-Kits Maus oder Ziege (Novex) nach Herstellerangaben durchgeführt.

Auf diese Weise konnten für jedes der drei Konstrukte Stämme identifiziert werden, die signifikante Mengen des jeweiligen hSDF-1 γ -H6-Derivats produzierten. Für weitere Produktanalysen wurde der jeweils produktivste Stamm ausgewählt. Für pFPMT-M-mhSDF-1 γ -H6 war dies der Stamm g7-5/36; für pFPMT-hSDF-1 γ -H6 und pFPMT-MF α -mhSDF-1 γ -H6 wurden entsprechend die Stämme g8-28/7 und g9c-20/6 ausgewählt.

E. Produktanalysen

In den Kulturüberständen der Stämme g7-5/36, g8-28/7 und g9c-20/6 konnten mittels Western-Blot keine sezernierten SDF-1 γ -Produkte nachgewiesen werden. In der intrazellulären löslichen Fraktion dieser Stämme konnten SDF-1 γ -Produkte sowohl mit einem His-Tag-spezifischen Antikörper aus Maus als auch mit einem SDF-1-spezifischen Serum aus Ziege (SDF-1 (C19); #sc6193; Santa Cruz Biotechnology, USA) identifiziert werden (siehe Fig. 20 A, B). Die intrazelluläre lösliche Fraktion eines Kontrollstamms (ohne SDF-1 γ) zeigt nicht die als SDF-1 γ -Produkte identifizierten Produkte (Fig. 20, Spur 8 (A), Spur 1 (B)).

Die im Western-Blot beobachteten Molekulargewichte der SDF-1 γ -Hauptprodukte liegen generell etwas oberhalb der berechneten Molekulargewichten. M-mhSDF-1 γ -H6: 12,692 kDa berechnet, etwa 16 kDa beobachtet (Fig. 20, Spuren 2 und 3 (A), Spuren 3 und 4 (B)); hSDF-1 γ -H6: 14,529 kDa berechnet, etwa 17 kDa beobachtet (Fig. 20, Spuren 4 und 5 (A), Spuren 5 und 6 (B)); MF α -mhSDF-1 γ -H6: 21,468 kDa berechnet, etwa 30 kDa beobachtet (Fig. 20, Spuren 6 und 7 (A), Spuren 7 und 8 (B)). Da alle Hauptbanden sowohl mit dem His-Tag-spezifischen Antikörper als auch mit dem SDF-1-spezifischen Serum detektierbar sind, müssen die den Banden zugehörigen Proteine C-terminal intakt sein. Darüber hinaus zeigen die apparenten Molekulargewichte der verschiedenen Produkte die erwarteten relativen Abstufungen (M-mhSDF-1 γ -H6 < hSDF-1 γ -H6 < MF α -mhSDF-1 γ -H6; Fig. 20).

Die Aminosäure-Sequenzen von M-mhSDF-1 γ -H6 und hSDF-1 γ -H6 enthalten keine potentiellen N-Glycosylierungsstellen. Dementsprechend hat eine PNGaseF-Verdauung keinen Einfluß auf das apparente Molekulargewicht der jeweiligen Produkt-Hauptbande (Fig. 20, Spuren 2/3 und 4/5 (A), Spuren 3/4 und 5/6 (B)). MF α -mhSDF-1 γ -H6 hat drei N-Glycosylierungsstellen im Bereich der MF α -Prepro-Sequenz, die typischerweise im ER N-glycosyliert werden. Die fehlende Reduktion des apparenten Molekulargewichts des 30 kDa-Produkts nach PNGaseF-Verdauung deutet an, daß es sich bei diesem Produkt um die Prepro-Form handelt, die nicht in das ER eingeschleust wurde (Fig. 20, Spuren 6/7 (A), Spuren 7/8 (B)). Oberhalb von 30 kDa befinden sich drei schwache PNGaseF-sensitive Banden (Spur 7 (B)), die nach N-Deglycosylierung nach unterhalb von 30 kDa verschoben werden (Spur 8 (B)). Diese Banden können als an der Pro-

Sequenz N-glycosylierte Pro-Formen von MF α -mhSDF-1 γ -H6 interpretiert werden, bei denen die Pre-Sequenz während des Eintritts in das ER abgespalten wurde.

Beispiel 5

Wirkung von rekombinatem humanen SDF-1 γ auf die Calcium-Konzentration in Nervenzellen und Gliazellen

In diesem Beispiel wurde die Wirkung von rekombinatem humanem SDF-1 γ (M-mhSDF-1 γ -H6) in Zellextrakten von *Hansenula polymorpha* auf die Calcium-Konzentration in Nervenzellen und Gliazellen untersucht. Zur Bestimmung der Calcium-Konzentration wurde die Calcium-Imaging-Methode benutzt (siehe Köller et al., 2001).

Für die Ca-Imaging-Experimente wurden primäre Astrozyten und primäre Cortexneurone der Ratte (Stamm Wistar) aus neugeborenen Ratten (Postnataltag 0-1; Astrocyten) bzw. aus Rattenembryonen (Embryonaltag 15; Cortexneurone) wie von Köller et al. (2001) beschrieben präpariert und kultiviert. Nach 5-15 Tagen in Kultur wurden die Zellen *in vitro* 1 Std. lang mit dem Calcium-Indikator Fura-2 beladen. Das intrazelluläre Fura-2 reagiert mit freigesetztem Calcium zu Fura-Calcium, das bei einer anderen Wellenlänge (340 nm) absorbiert als Fura-2 (380 nm). Mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten (F340/F380) kann somit die relative intrazelluläre Calcium-Konzentration ermittelt und graphisch aufgetragen werden. Dieses Verfahren ermöglicht die Detektion intrazellulärer Calcium-Konzentrationsänderungen, die durch extrazelluläre Stimuli (z.B. Ligand/Rezeptor-Interaktionen) hervorgerufen werden.

Figur 21 zeigt das Ergebnis von Ca-Imaging-Experimenten, bei denen die Wirkung von SDF-1 α und SDF-1 γ auf die Ca-Konzentration in Astrozyten verglichen wurde. Nach Applikation von SDF-1 α (50 nM, R&D Systems, Wiesbaden, BRD) steigt die intrazelluläre Calciumkonzentration in kultivierten Astrozyten (Figur 21 A). Nach Applikation von Hefe-zell-extrakt mit rekombinatem SDF-1 γ (M-mhSDF-1 γ -H6) (35 μ g Gesamtprotein) kommt es zu einem intrazellulären Calciumanstieg in kultivierten Astrozyten (Figur 21 B). Die Antwort ist jedoch etwas geringer als die Antwort auf SDF-1 α .

Nach Applikation von Kontroll-Extrakt (22,4 μ g Protein von einem Zell-extrakt von *H. polymorpha* RB11-Zellen, die mit dem pPMT121-Plasmid ohne Insert transformiert wurden) bleibt der intrazelluläre Calciumanstieg in kultivierten Astrozyten aus (Figur 21 C).

Figur 21 D zeigt die quantitative Auswertung der intrazellulären Calciumanstiege bei SDF-1 γ und dem Kontroll-Extrakt bezogen auf den von SDF-1 α hervorgerufenen Calciumanstieg.

Ferner wurde getestet, ob die Vorinkubation der Zellen mit einem CXCR4-spezifischen Antikörper (monoklonaler Antikörper 12G5; R&D Systems, Wiesbaden, BRD) eine solche Calcium-Antwort reduzieren kann, wie es zuvor für die von SDF-1 α induzierte Calcium-Reaktion beobachtet wurde (für die methodischen Details zu den Ca-Imaging-Experimenten siehe Köller et al., 2001).

Figur 22 zeigt das Ergebnis eines Ca-Imaging-Experiments in Astrozyten für SDF-1 α (A) ohne und (B) mit Antikörper gegen CXCR4, Figur 23 zeigt das Ergebnis der entsprechenden Experimente für SDF-1 γ . Nach Applikation von SDF-1 α (50 nM; R&D Systems, Wiesbaden, BRD) steigt die intrazelluläre Calciumkonzentration in kultivierten Astrozyten stark an (Figur 22 A). Gibt man jedoch SDF-1 α nach 5 Min. Vorinkubation mit dem monoklonalen Antikörper 12G5, so zeigen kultivierte Astrozyten eine um ca. 50% verminderte intrazelluläre Calciumausschüttung (Figur 22 B). Diese Ergebnisse bestätigen Literaturbefunde, die zeigen, dass der Einfluß von SDF-1 α bzw. -1 β auf die intrazelluläre Calciumkonzentration in Astrozyten aus dem Zentralnervensystem durch den CXCR4-Rezeptor vermittelt wird.

Nach Applikation von 35 μ g Hefezellextrakt mit rekombinatem SDF-1 γ (M-mhSDF-1 γ -H6; Zellaufschluss in PBS-Puffer) kommt es zu einem messbaren intrazellulären Calciumanstieg in kultivierten Astrozyten (Figur 23 A). Anders als bei SDF-1 α führt die SDF-1 γ -Applikation bei kultivierten Astrozyten, die mit dem monoklonalen Antikörper 12G5 gegen den CXCR4-Rezeptor 5 Min. lang vorinkubiert wurden, zu einer stark erhöhten signifikanten intrazellulären Calciumausschüttung (Figur 23 B).

Auch Zellkulturen von Cortexneuronen aus dem Rattenhirn zeigen nach Vorinkubation mit dem CXCR4-Antikörper eine weitere Erhöhung der Calcium-Konzentration als Reaktion auf SDF-1 γ . Figur 24 zeigt das Ergebnis eines entsprechenden Ca-Imaging-Experiments in Cortexneuronen. Die Applikation sowohl von 35 μ g als auch von 124 μ g (Gesamtprotein) eines Hefezellextrakts mit rekombinatem SDF-1 γ (M-mhSDF-1 γ -H6) führt zu einem signifikanten Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration in kultivierten primären Cortexneuronen (Figur 24 A). Nach 5-minütiger Vorinkubation mit dem monoklonalen

WO 01/92530

PCT/EP01/06250

33

Antikörper 12G5 (Antikörper gegen CXCR4) bewirkt die Zugabe von SDF-1 γ eine stark erhöhte intrazelluläre Calciumausschüttung bei kultivierten primären Cortexneuronen (Figur 24 B).

Diese vorstehenden Ergebnisse belegen, dass sich die zellphysiologische Reaktion von Neuronen und Astrozyten aus dem Zentralnervensystem auf SDF-1 α bzw. -1 β von den Reaktionen auf das neue SDF-1 γ -Chemokin deutlich unterscheidet.

Beispiel 6

Wirkung des C-terminalen basischen Peptids aus SDF-1 γ und der davon abgeleiteten, synthetisch hergestellten Peptidspaltprodukte auf die intrazelluläre Ca-Konzentration in Astrozyten

Es wurde zunächst untersucht, wie sich die Zugabe eines basischen Peptids mit einer Aminosäuresequenz, die der Sequenz der letzten 30 Aminosäuren im C-terminalen Bereich von SDF-1 γ entspricht, auf die intrazelluläre Ca-Konzentration in Astrozyten auswirkt.

Figur 25 zeigt das Ergebnis eines Ca-Imaging-Experiments mit dem C-terminalen basischen Peptid von SDF-1 γ in Astrozyten. Die Applikation von 1 μ g/ml des synthetischen Peptids, das die C-terminalen 30 Aminosäuren von SDF-1 γ repräsentiert, führte zu einer nur schwachen Beeinflussung der intrazellulären Ca-Konzentration der kultivierten Astrocyten (Figur 25 A). Wurden die Astrozyten zuvor 5 Minuten lang mit dem monoklonalen Antikörper 12G5 (Antikörper gegen CXCR4) inkubiert, so kommt es in den primären Astrocyten zu einer stark erhöhten intrazellulären Calciumausschüttung bei Applikation des gleichen C-terminalen Peptides (Figur 25 B).

Wurde ein Ca-Imaging-Experiment mit den von dem C-terminalen Bereich von SDF-1 γ abgeleiteten Peptiden RREEKVG (Peptid 1, SEQ ID NO:5), KKEKIG (Peptid 2, SEQ ID NO:6), KKKRQ (Peptid 3, SEQ ID NO:8), KKRKAAQ (Peptid 4, SEQ ID NO:9) und KKKN (Peptid 5, SEQ ID NO:10) sowie mit den wie in Eipper et al (1992) beschriebenen amidierten Peptiden 1' (RREEKV(NH₂)) und 2' (KKEKI(NH₂)), so wurde festgestellt, dass die Zugabe der nicht-amidierten Peptide 1, 2 und 3 sowie der amidierten Peptide 1' und 2' zu einer Erhöhung der intrazellulären Ca-Konzentration in Astrozyten führten. In Figur 26 wird gezeigt, dass die Applikation von 1 mg/ml des Peptids 2 (KKEKIG; SEQ ID NO:6) (Fi-

gur 26 A) oder des Peptids 3 (KKKRQ; SEQ ID NO:8) (Figur 26 B) zu einem signifikanten Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration in kultivierten primären Astrocyten führt. Dagegen bewirkten die Peptide 4 und 5 keinen Anstieg der Ca-Konzentration in Astrozyten.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die putativen Neuropeptide in unterschiedlicher Weise die intrazelluläre Calcium-Konzentration modulieren können. Sie legen ebenfalls nahe, dass für die von SDF-1 γ hervorgerufene drastische Heraufregulation der intrazellulären Calcium-Konzentration nach Vorinkubation der Zellen mit dem Anti-CXCR4-Antikörper ausschließlich der C-terminale Bereich von SDF-1 γ verantwortlich ist, nicht aber der mit den Chemokinen SDF-1 α bzw. -1 β übereinstimmende Molekülabschnitt. Dieser Befund belegt die besondere und spezifische Funktion des C-Terminus von SDF-1 γ und bestätigt die Ergebnisse, die mit dem vollständigen SDF-1 γ -Molekül erhalten wurden.

Literatur

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. und Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403-410.
- Angerer, L.M., Stoler, M.H. und Angerer, R.C. (1987) In situ hybridization with RNA probes: An annotated recipe. In K.L. Valentino, R.H. Eberwine, J.D. Barchas (Hrsg.) In Situ Hybridization. Application to neurobiology, Oxford University Press, New York, 42-70.
- Chomczynski, P. und Sacchi, N. (1987) Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156-159.
- Devereux, J., et al. (1984) *Nucleic Acids Research* 12 (12): 387.
- Doranz, B.J., Orsini, M.J., Turner, J.D., Hoffman, T.L., Berson, J.F., Hoxie, J.A., Peiper, S.C., Brass, L.F. und Doms, R.W. (1999) Identification of CXCR4 domains that support coreceptor and chemokine receptor functions *J. Virol.* 73, 2752-2761.
- Eipper, B., Stoffers, D. und Xu, R. (1992) The biosynthesis of neuropeptides: peptide alpha amidation. *Annu. Rev. Neurosci.* 15, 57-85.
- Gellissen, G. (2000) Heterologous protein production in methylotrophic yeasts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54:741-750.
- Henikoff und Henikoff (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915-10919.
- Köller, H., Trimbom, M., von Giesen, H.-J., Schroeter, M. und Arendt, G. (2001) TNF α reduces glutamate induced intracellular Ca²⁺ increase in cultured cortical astrocytes. *Brain Research* 893:237-243.
- Loetscher, P., Gong, J.H., Dewald, B., Baggiolini, M. und Clark-Lewis, I. (1998) N-terminal peptides of stromal cell-derived factor-1 with CXC chemokine receptor 4 agonist and antagonist activities. *J. Biochem.* 273 (35):22279-83.
- Müller, H.W., Ignatius, M.J., Hangen, D.H. und Shooter, E.M. (1986) Expression of specific sheath cell proteins during peripheral nerve regeneration in mammals. *J. Cell Biol.* 102, 393-402.

WO 01/92530

PCT/EP01/06250

36

- Needleman und Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443-453.
- Pearson, W.R. (1990) Rapid and sensitive sequence comparison with FASTP and FASTA. *Methods Enzymol.* 183, 63-98.
- Rollins, B.J. (1997) Chemokines. *Blood* 90, 909-928.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: A laboratory Manual* 2. Ausgabe, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Sanger, N., Nicklen, S. und Coulson, A.R., (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 144-148.
- Shirozu, M., Nakano, T., Inazawa, J., Tashiro, K., Tada, H., Shinohara, T. und Honjo, T. (1995) Structure and chromosomal localization of the human stromal cell-derived factor 1 (SDF1) gene. *Genomics* 28, 495-500.
- Siegel, G., Agranoff, B. Albers, R.W., Molinoff, P. (1989) *Basic Neurochemistry*, Raven Press, New York.
- Stürzl, M., Roth, W.K., Viehweger, P. und Hoffschneider, H.Ü. (1991) Taq DNA-polymerase synthesized single stranded DNA hybridization probes and their application in Northern blotting and in-situ hybridization. In Rolfs, A., Schumacher, A.C., Marx, P. (Hrsg.) *PCR-Topics. Usage of Polymerase Chain Reaction in Genetic and Infectious Diseases*. Berlin, Springer-Verlag, 41-45.
- Tashiro, K. Tada, H., Heilker, R., Sherozou, M., Nakano, T. und Honjo, T. (1993) Signal sequence trap: a cloning strategy for secreted proteins and type I membrane proteins. *Science* 261, 600-602.
- Weydemann, U., Keup, P., Piontek, M., Strasser, A.W.M., Schweden, J., Gellissen, G., Janowicz, Z.A. (1995) High level secretion of hirudin by *Hansenula polymorpha* - authentic processing of three different preprohirudins. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 44: 844-849.

Patentansprüche

1. Nukleinsäure-Molekül mit einer Sequenz, umfassend:
 - (1) eine für ein Chemokin, einen Neuropeptid-Präkursor oder mindestens ein Neuropeptid kodierende Nukleinsäuresequenz, die aus folgenden Sequenzen ausgewählt ist:
 - (a) einer Nukleinsäuresequenz nach SEQ ID NO:1;
 - (b) einer Nukleinsäuresequenz, die ein Polypeptid mit einer Aminosäuresequenz nach SEQ ID NO:2 kodiert;
 - (c) einer Nukleinsäuresequenz, die mit der in (a) angegebenen Sequenz zu mindestens 60% identisch ist;
 - (d) einer Sequenz, die mit dem Gegenstrang der in (a) angegebenen Sequenz hybridisiert oder unter Berücksichtigung der Degeneration des genetischen Codes hybridisieren würde;
 - (e) einem durch Substitution, Addition, Inversion und/oder Deletion einer oder mehrerer Nukleotide erhaltenen Derivat einer der in (a) oder (b) angegebenen Sequenzen, das für ein Chemokin, einen Neuropeptid-Präkursor oder mindestens ein Neuropeptid kodiert;

oder

 - (2) eine komplementäre Sequenz zu einer der in (a) bis (e) angegebenen Nukleinsäuresequenzen.
2. Nukleinsäure-Molekül gemäß Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass die unter (1) (c) angegebene Nukleinsäuresequenz zu mindestens 80% identisch ist.
 3. Nukleinsäure-Molekül gemäß Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass die unter (1) (c) angegebene Nukleinsäuresequenz zu mindestens 90% identisch ist.

4. Nukleinsäure-Molekül gemäß Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass die unter (1) (c) angegebene Nukleinsäuresequenz zu mindestens 95% identisch ist.
5. Nukleinsäure-Molekül gemäß Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass es eine Nukleinsäuresequenz nach SEQ ID NO:3 umfasst.
6. Nukleinsäure-Molekül gemäß Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass es eine Nukleinsäuresequenz umfasst, die ein Polypeptid mit einer Aminosäuresequenz nach SEQ ID NO:4 kodiert.
7. Nukleinsäure-Molekül gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6, weiterhin umfassend einen zur Expression geeigneten Promotor, wobei die kodierende Nukleinsäuresequenz unter der Kontrolle des Promotors steht.
8. Nukleinsäure-Molekül gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7, weiterhin umfassend Sequenzen eines Vektors, die die Replikation des Nukleinsäure-Moleküls in einer Wirtszelle und/oder die Integration des Nukleinsäure-Moleküls in das Genom einer Wirtszelle ermöglichen.
9. Wirtszelle, enthaltend ein Nukleinsäure-Molekül gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei die Wirtszelle eine zur Expression des Nukleinsäure-Moleküls geeignete prokaryontische oder eukaryontische Zelle ist.
10. Wirtszelle gemäß Anspruch 9, **dadurch gekennzeichnet**, dass die prokaryontische Wirtszelle *E. coli* ist.
11. Wirtszelle gemäß Anspruch 9, **dadurch gekennzeichnet**, dass die eukaryontische Wirtszelle eine Pilz-, eine Insekten- oder eine Säugerzelle ist.
12. Wirtszelle gemäß Anspruch 11, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Wirtszelle die Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, die methylotrophe Hefe *Hansenula polymorpha*, die dimorphe Hefe *Axula adenivorans* oder der filamentöse Pilz *Sordaria macrospora* ist.
13. Wirtszelle gemäß Anspruch 11, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Wirtszelle eine CHO-, COS- oder HeLa-Zelle ist.

14. Polypeptid-Molekül, umfassend eine Aminosäuresequenz, die aus folgenden Sequenzen ausgewählt ist:
- (i) einer Aminosäuresequenz, die eine der Aminosäuresequenzen nach SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9 und/oder SEQ ID NO:10 und/oder eine Kombination aus zwei oder mehreren dieser Sequenzen umfaßt;
 - (ii) einer Aminosäuresequenz nach SEQ ID NO:4;
 - (iii) einer Aminosäuresequenz, die der Sequenz von Aminosäure 20 bis Aminosäure 119 in SEQ ID NO:4 entspricht;
 - (iv) einer Aminosäuresequenz nach SEQ ID NO:22;
 - (v) einer Aminosäuresequenz, die mit der in (i), (ii), (iii) oder (iv) angegebenen Sequenz zu mindestens 85% identisch ist.
15. Polypeptid-Molekül gemäß Anspruch 14, **dadurch gekennzeichnet**, dass die unter (v) angegebene Sequenz zu mindestens 90% identisch ist.
16. Polypeptid-Molekül gemäß Anspruch 14, **dadurch gekennzeichnet**, dass die unter (v) angegebene Sequenz zu mindestens 95% identisch ist.
17. Polypeptid-Molekül gemäß Anspruch 14, **dadurch gekennzeichnet**, dass es eine Aminosäuresequenz nach SEQ ID NO:12 oder SEQ ID NO:13 umfasst.
18. Fragment eines Polypeptid-Moleküls gemäß einem der Ansprüche 14 bis 17, das mindestens ein Neuropeptid umfasst.
19. Fragment gemäß Anspruch 18, umfassend mindestens eine der Aminosäuresequenzen nach SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9 und/oder SEQ ID NO:10.
20. Verfahren zum Herstellen eines Polypeptid-Moleküls und/oder eines Fragments davon gemäß einem der Ansprüche 14 bis 19, umfassend das Kultivieren einer Wirtszelle gemäß einem der Ansprüche 9 bis 13 unter zur Expression und eventuellen

Prozessierung geeigneten Bedingungen und gegebenenfalls das Aufreinigen des exprimierten Polypeptid-Moleküls oder Fragments.

21. Antikörper, der für ein Polypeptid-Molekül und/oder ein Fragment davon gemäß einem der Ansprüche 14 bis 19 spezifisch ist.
22. In vitro-Verfahren zum Nachweisen eines Polypeptid-Moleküls und/oder eines Fragments davon gemäß einem der Ansprüche 14 bis 19 in einer biologischen Probe, umfassend das Inkontaktbringen der Probe mit einem für das Polypeptid-Molekül und/oder das Fragment spezifischen Reagenz und das Nachweisen der Bindung.
23. Test-Kit zum Nachweisen eines Polypeptids und/oder eines Fragments davon gemäß einem der Ansprüche 14 bis 19, umfassend mindestens ein Reagenz, das für das Polypeptid und/oder das Fragment spezifisch ist.
24. Test-Kit gemäß Anspruch 23, **dadurch gekennzeichnet**, dass es mindestens einen für das Polypeptid-Molekül und/oder das Fragment spezifischen Antikörper gemäß Anspruch 21 umfasst.
25. In vitro-Verfahren zum Nachweisen einer ein Polypeptid-Molekül gemäß einem der Ansprüche 14 bis 17 kodierenden Nukleinsäure in einer biologischen Probe, umfassend:
 - das Inkontaktbringen der Probe mit einem Nukleinsäure-Molekül gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6 und/oder einem Fragment davon, wobei das Nukleinsäure-Molekül und/oder das Fragment eine nachweisbare Markierung tragen, und
 - das Nachweisen der Markierung.
26. Pharmazeutische Zusammensetzung, enthaltend mindestens ein Polypeptid-Molekül und/oder ein Fragment davon gemäß einem der Ansprüche 14 bis 19 und/oder ein pharmazeutisch verträgliches Salz eines solchen Polypeptid-Moleküls oder Fragments.
27. Pharmazeutische Zusammensetzung gemäß Anspruch 26, **dadurch gekennzeichnet**, dass sie weiterhin mindestens einen Antikörper enthält.

28. Pharmazeutische Zusammensetzung gemäß Anspruch 26 oder 27 zur therapeutischen Anwendung bei demyelinisierenden oder neurodegenerativen Erkrankungen oder bei Entwicklungsstörungen des Nervensystems.
29. Pharmazeutische Zusammensetzung gemäß Anspruch 26 oder 27 zur Vorbeugung oder Behandlung einer HIV-Infektion und insbesondere einer HIV-Enzephalopathie in Menschen.
30. Pharmazeutische Zusammensetzung gemäß Anspruch 26 oder 27 zur therapeutischen Anwendung bei Erkrankungen des hämatopoietischen Systems, des Immunsystems und des Herz/Kreislaufsystems.
31. Pharmazeutische Zusammensetzung, enthaltend mindestens ein für ein Polypeptid-Molekül und/oder ein Fragment davon gemäß einem der Ansprüche 14 bis 19 spezifisches Reagenz.
32. Pharmazeutische Zusammensetzung gemäß Anspruch 31, **dadurch gekennzeichnet, dass das Reagenz ein Antikörper ist.**
33. Pharmazeutische Zusammensetzung, enthaltend mindestens ein Nukleinsäure-Molekül gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8.
34. Pharmazeutische Zusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 31 bis 33 zur diagnostischen oder therapeutischen Anwendung bei demyelinisierenden oder neurodegenerativen Erkrankungen oder bei Entwicklungsstörungen des Nervensystems.
35. Pharmazeutische Zusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 31 bis 33 zur Diagnose oder Behandlung einer HIV-Infektion und insbesondere einer HIV-Enzephalopathie in Menschen.

Fig. 1

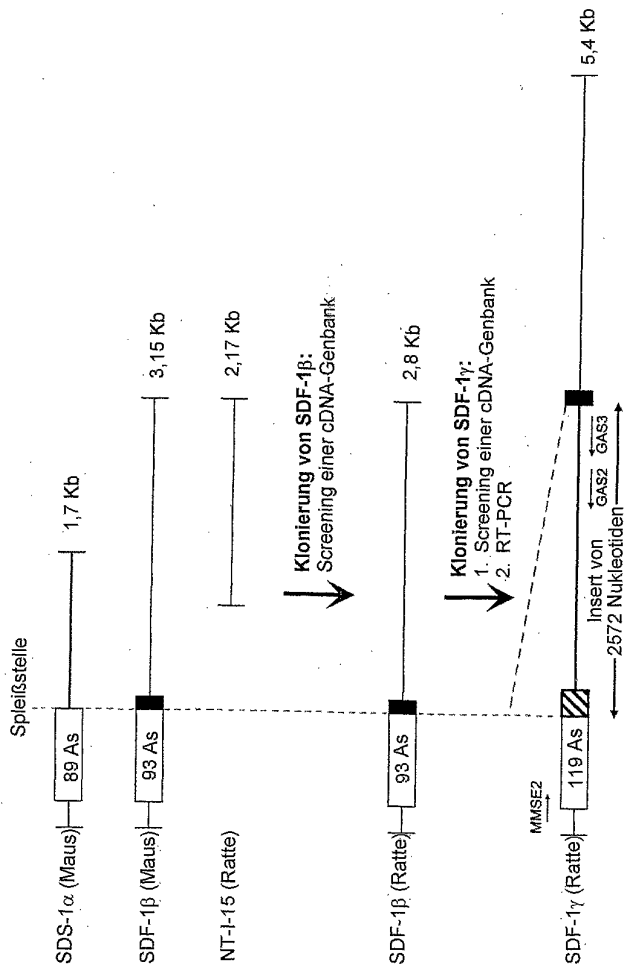


Fig. 2

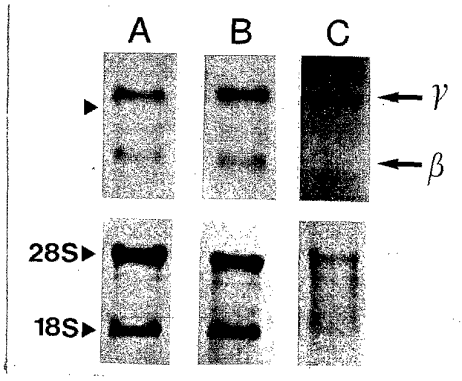


Fig. 3 (Fort.)

2953 TCTGAGTCACTGTTAGGGAGGGCCCATAGCCACTTCTCTGCTCCTGAGCAGGCTGA
3013 ASCCTTTCCAGGACTTCTCTTTGCBGTTTGCTACACTTTCCCATTTGATTTATATAGC
3073 AGATAACAGGTAATATTTTATTTTCAATTTAGTCTGATTTCCAAATGTCAATGTTGACA
3133 GGCCAGGCCACTATGTCATCTCCTTTGTTCTAGTATCTTTCCCATGAGGACCTTTTCT
3193 GAATAGTGGCTCCCAAGGTTTCTCTTTGAGCTGAGGCGAGGCTCACCTTTTCTGA
3253 TTAGAAACTGGGTGTTCTACCCCAAGGATTGCGAGGCTTTCCCAAGCTGAGGCAGGA
3313 GTGTGAGGTGAGGGAAGAGCGAGATCCACCCATCCCATGCTCTCTCTTCAATCCACC
3373 ATGCTCATCTCTCTCATCCATCACTGTGTCTGCAAGACTGCTCATGACCCGGAA
3433 AAGGACTCTCTCAGAGGACTCTTTACTCRAATGGGACAGCAGAGGAAAGGAA
3493 GTGCTGTGTTCCGCCAAACCTTCGGCGGTATATGCTCTGTTTGGAAATATGCTCT
3553 TTCACCCCTGCTCTGTGTGACCTCCATGACCAATGTCGTCTGTGCAATGCTCTTAA
3613 CCAAAATGGCAAGGCTGTGTATGAGTAAATGGCCCTGAGGCTCAGGTTTTCATGAAACA
3673 GCGCACTGCTCCCTGTTCACAGGCTCATTTGGACACACAGAGCCCAAGAAAGTGGT
3733 TTGCAACAGAGCTCAGCTCTAAGACTGTAGATCCCTTCATATTTTCGACTGTATASSTTTA
3793 AATGCTGGTCTTASSTTCTGAAACCGAATGCAATTTCTATGTAGNACTGACAGGTC
3853 TCAATCTTTCCAAATTTTAAAGCCATGAAATAAAGCATCAGCATTTGGCCCACT
3913 GGCCGGGCAATTTCTAGAAAGGGGAGAACCCCTACCTTTCTTAGGACAGCCGACAG
3973 CACGGNCCAGGAGTGNMNNNTCTTCTGAGTTTTATACAGCTCCCTGACCCTT
4033 TGACAAACGACAGTTAAGATCAGTATCTAGTCTTTCAGAGACAAAGATGGAGGGGTA
4093 AGAAGGGGAAGGGAAACGAGAAAGCTACCAAAAGATCCTCTCAAAGCNGTGTGTTGA
4153 GAGTGAACAGCTGTAGAAATGTTAGTGTATGTTGTTGTTGAGGGATTTCTATAAATAG
4213 TCATTCAGTTGATTTCCAGCGATTGAAATCCACCCAGCAGATTTGATCAATTT
4273 GGCAACAGCAACAAWCTAAATAATGTGAAGCCAGTTGGGRTAAGGGCATATGTTTGC
4333 TGACAGCTGGTCCCATGTTGATTCAGAAATATTTTAACTCTCTTGACATCGGGGCC
4393 CCCAAGAGAAATCTGGATTGCTGTGCAATGGCCACTTAGCATCTAATCAAGCTTTGA
4453 AGAAACAATAACAGCCTTGACCTTCNCTCCAGTTAGGGATCCTTTAAAGCTCTCTTC
4513 ACAGGAGGATAAAGAGACTGGGTAGAACTGGAGGAGATGAATTTGTTATCAATTC
4573 GCTGCTCAGATCMTTTCTAGAWGGAGACCTGCTCAGAGCAATGTGCANTWAAT
4633 AGRCTTTTACNTWGRAMCCTCTCCCCCTTNNCTCCCTGCTCTTCTTTCAA
4693 ATNACAAGNCCAGCAGTCTTGAATGTTGTTGACSCCCSACACCTAAGTCTCCTGAT
4753 GATCCTGGTGWCCCGAATTCCTTGGNCCGCAAGTAACTGCCAGGACGCGNAGTCC
4813 CTTTGTCAACAGCCTTTGCATCTGATAGGAAABGGGGTTGGAGACATAAGTCTGCT
4873 TTGTGTTGAANCCNAGATTNGTACSCCTGTGTTTACACTGTCTGCCTGCTCTCGGGNACA
4933 GTGGAAAGGAGTGCAGCCAGGTGGCAGACCCCTCTGATTCATTSCTGTTGGCTTTGA
4993 GGGAGGTTTGGAGCAAAAGCTCCATTTCTCTGTGGACTTSCCTGACCTTTAGSY
5053 CTCTCCATCGAGTTCTGTTATCTCTCATGGGTGATTTCTCGGGGCTCACCCAGGG
5113 CTTCTCACAAGAATCATNCTCNGCAGAGCTTCCAGTGTCTACCGAGCGATGTTTCSG
5173 TGTGCAATGGTGAATCTGTAATTTGTTTTCAGTCTCTCCAGATAATGTGAAAT
5233 GGTCCAGGAGAGGAGCTTCCATATACGAGTGTGCTTTCTTATCTCGTTTAAATA
5293 TATGACAGTTATTTGAGAGCCATTTCTACTTTGAAGTCAATCAATGAAATGATGAT
5353 CTTACCTACAATTTTCCATAAAGTCTGTATCGA

Figur 4

	<u>Signalpeptid</u>	<u>reifes Protein</u>	
SDF-1 α (Maus)	MDAKVAVLALVLAALCISDPGKPVLSYRCPCRFEEESHARAVKHKILNTPNCALQIV	-----	60
SDF-1 β (Maus)	60
SDF-1 β (Ratte)V.....	60
SDF-1 γ (Ratte)V.....	60
SDF-1 α (Maus)	ZRLKNNRQVCIDPKLKWIOEYLEKALNK	-----	89
SDF-1 β (Maus)RLKM	-----	93
SDF-1 β (Ratte)S.....D.....RLKM	-----	93
SDF-1 γ (Ratte)S.....D.....GRREKVGKKEIKKKRQKKRRAQKKKN	-----	119

WO 01/92530

6/28

PCT/EP01/06250

Fig. 5 A

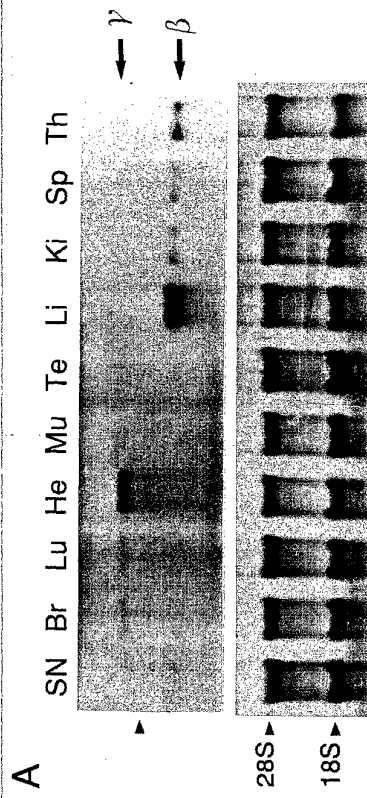
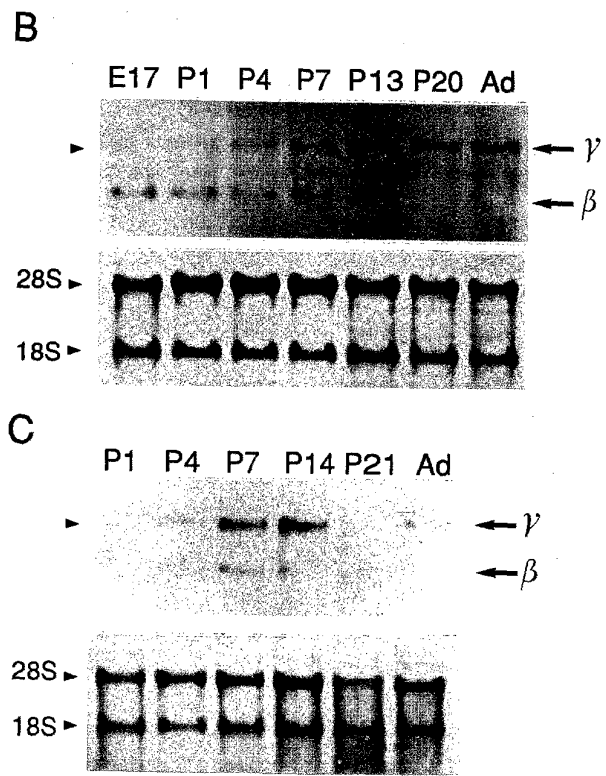


Fig. 5 B, C



WO 01/92530

8/28

PCT/EP01/06250

Fig. 6

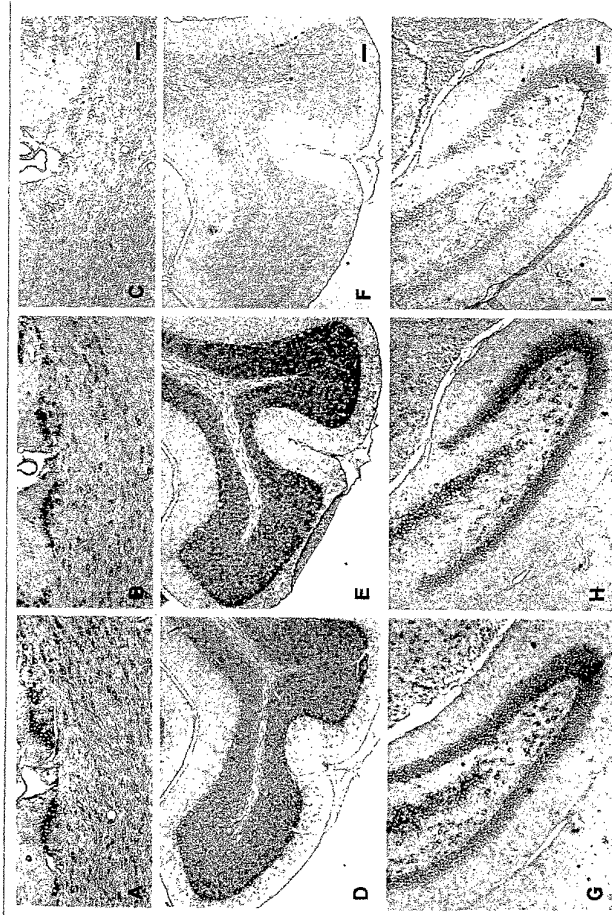


Fig. 7

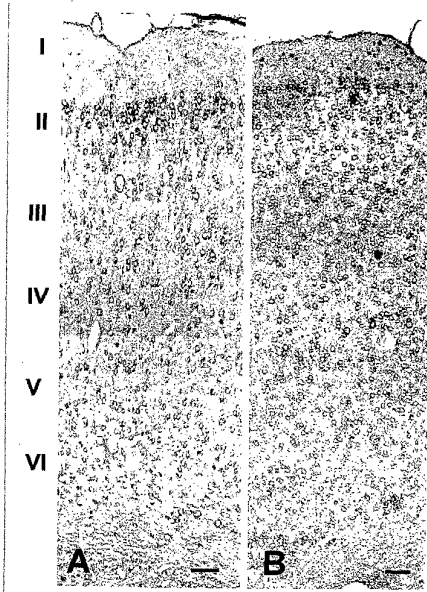
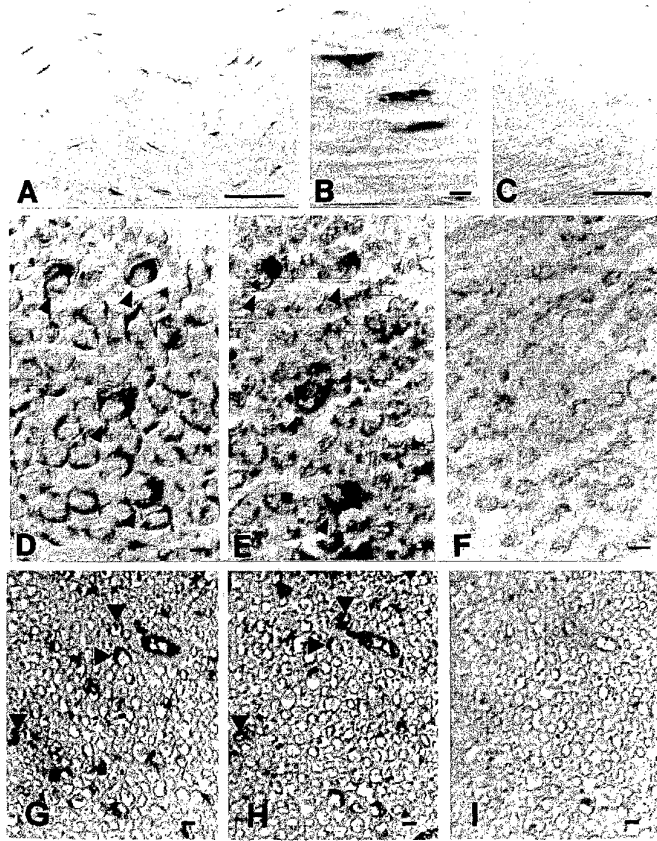


Fig. 8



WO 01/92530

11/28

PCT/EP01/06250

Fig. 9

Kodierender Bereich der Nukleinsäuresequenz und davon abgeleitete
Aminosäuresequenz von SDF-1 γ aus Ratte

```

5' ATG GAC GCC AAG GTC GTC GCC GTG CTG GCC CTG GTG CTG GCC GCG CTC TGC ATC
   ---
Met Asp Ala Lys Val Val Ala Val Leu Ala Leu Val Leu Ala Ala Leu Cys Ile

   63       72       81       90       99       108
AGT GAC GGT AAG CCA GTC AGC CTG AGC TAC AGA TGC CCC TGC CGA TTC TTT GAG
   ---
Ser Asp Gly Lys Pro Val Ser Leu Ser Tyr Arg Cys Pro Cys Arg Phe Phe Glu

  117     126     135     144     153     162
AGC CAT GTC GCC AGA GCC AAC GTC AAA CAT CTG AAA ATC CTC AAC ACT CCA AAC
   ---
Ser His Val Ala Arg Ala Asn Val Lys His Leu Lys Ile Leu Asn Thr Pro Asn

  171     180     189     198     207     216
TGT GCC CTT CAG ATT GTT GCA AGG CTG AAA AGC AAC AAC AGA CAA GTG TGC ATT
   ---
Cys Ala Leu Gln Ile Val Ala Arg Leu Lys Ser Asn Asn Arg Gln Val Cys Ile

  225     234     243     252     261     270
GAC CCG AAA TTA AAG TGG ATC CAA GAG TAC CTG GAC AAA GCC TTA AAC AAG GGG
   ---
Asp Pro Lys Leu Lys Trp Ile Gln Glu Tyr Leu Asp Lys Ala Leu Asn Lys Gly

  279     288     297     306     315     324
CGC AGA GAA GAA AAA GTG GGG AAA AAA GAA AAG ATA GGA AAA AAG AAG CGA CAG
   ---
Arg Arg Glu Glu Lys Val Gly Lys Lys Glu Lys Ile Gly Lys Lys Lys Arg Gln

  333     342     351     360
AAG AAG AGA AAG GCG GCC CAG AAA AAG AAA AAC TAG 3'
   ---
Lys Lys Arg Lys Ala Ala Gln Lys Lys Lys Asn ***

```

Fig. 10

Kodierender Bereich der Nukleinsäuresequenz und davon abgeleitete
Aminosäuresequenz von humanem SDF-1 γ

```

          9          18          27          36          45          54
5' ATG AAC GCC AAG GTC GTG GTC CTG GTC CTC GTG CTG ACC GCG CTC TGC CTC
-----
Met Asn Ala Lys Val Val Val Val Leu Val Leu Val Leu Thr Ala Leu Cys Leu

          63          72          81          90          99          108
AGC GAC GGG AAG CCC GTC AGC CTG AGC TAC AGA TGC CCA TGC CGA TTC TTC GAA
-----
Ser Asp Gly Lys Pro Val Ser Leu Ser Tyr Arg Cys Pro Cys Arg Phe Phe Glu

          117         126         135         144         153         162
AGC CAT GTT GCC AGA GCC AAC GTC AAG CAT CTC AAA ATT CTC AAC ACT CCA AAC
-----
Ser His Val Ala Arg Ala Asn Val Lys His Leu Lys Ile Leu Asn Thr Pro Asn

          171         180         189         198         207         216
TGT GCC CTT CAG ATT GTA GCC CGG CTG AAG AAC AAC AAC AGA CAA GTG TGC ATT
-----
Cys Ala Leu Gln Ile Val Ala Arg Leu Lys Asn Asn Asn Arg Gln Val Cys Ile

          225         234         243         252         261         270
GAC CCG AAG CTA AAG TGG ATT CAG GAG TAC CTG GAG AAA GCT TTA AAC AAG GGG
-----
Asp Pro Lys Leu Lys Trp Ile Gln Glu Tyr Leu Glu Lys Ala Leu Asn Lys Gly

          279         288         297         306         315         324
CGC AGA GAA GAA AAA GTG GGG AAA AAA GAA AAG ATA GGA AAA AAG AAG CGA CAG
-----
Arg Arg Glu Glu Lys Val Gly Lys Lys Glu Lys Ile Gly Lys Lys Lys Arg Gln

          333         342         351         360
AAG AAG AGA AAG GCT GCC CAG AAA AGG AAA AAC TAG 3'
-----
Lys Lys Arg Lys Ala Ala Gln Lys Arg Lys Asn ***

```


Fig. 12

Vergleich der Aminosäuresequenzen von humanem und Ratten-SDF-1 γ

hum	Met	Asn	Ala	Lys	Val	Val	Leu	Val	Leu	Val	Leu	Thr	Ala	Leu	Cys	Leu	18		
rat	Met	Asp	Ala	Lys	Val	Val	Ala	Leu	Val	Leu	Val	Ala	Ala	Leu	Cys	Ile	18		
hum	Ser	Asp	Gly	Lys	Pro	Val	Ser	Leu	Ser	Tyr	Arg	Cys	Pro	Cys	Arg	Phe	Glu	36	
rat	Ser	Asp	Gly	Lys	Pro	Val	Ser	Leu	Ser	Tyr	Arg	Cys	Pro	Cys	Arg	Phe	Glu	36	
hum	Ser	His	Val	Ala	Arg	Ala	Asn	Val	Lys	His	Leu	Lys	Ile	Leu	Asn	Thr	Pro	Asn	54
rat	Ser	His	Val	Ala	Arg	Ala	Asn	Val	Lys	His	Leu	Lys	Ile	Leu	Asn	Thr	Pro	Asn	54
hum	Cys	Ala	Leu	Gln	Ile	Val	Ala	Arg	Leu	Lys	Asn	Asn	Asn	Arg	Gln	Val	Cys	Ile	72
rat	Cys	Ala	Leu	Gln	Ile	Val	Ala	Arg	Leu	Lys	Ser	Asn	Asn	Arg	Gln	Val	Cys	Ile	72
hum	Asp	Pro	Lys	Leu	Lys	Trp	Ile	Gln	Glu	Tyr	Leu	Glu	Lys	Ala	Leu	Asn	Lys	Gly	90
rat	Asp	Pro	Lys	Leu	Lys	Trp	Ile	Gln	Glu	Tyr	Leu	Asp	Lys	Ala	Leu	Asn	Lys	Gly	90
hum	Arg	Arg	Glu	Glu	Lys	Val	Gly	Lys	Lys	Gln	Lys	Ile	Gly	Lys	Lys	Arg	Gln	108	
rat	Arg	Arg	Glu	Glu	Lys	Val	Gly	Lys	Lys	Gln	Lys	Ile	Gly	Lys	Lys	Arg	Gln	108	
hum	Lys	Lys	Arg	Lys	Ala	Ala	Gln	Lys	Arg	Lys	Asn	***						119	
rat	Lys	Lys	Arg	Lys	Ala	Ala	Gln	Lys	Lys	Lys	Asn	***						119	

Fig. 13

1. Konstrukte in PCRII-TOPO

hSDF-1 γ	1	19	20	119
hSDF-1 γ -H6	1	19	20	119 H6

2. Expressionsplasmide (pFPMT121-Derivate)

M-mhSDF-1 γ -H6	M	20	119	H6
hSDF-1 γ -H6	1	19	20	119 H6
MF α -mhSDF-1 γ -H6	MF α	20	119	H6

Fig. 14

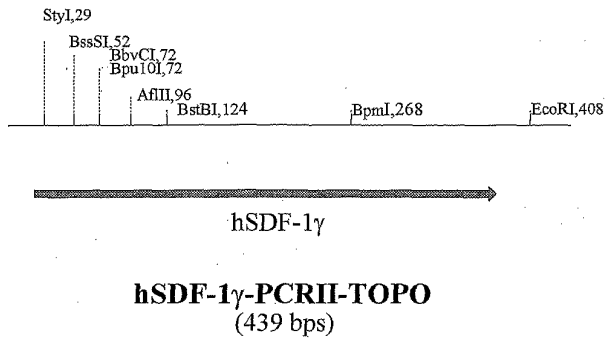


Fig. 15

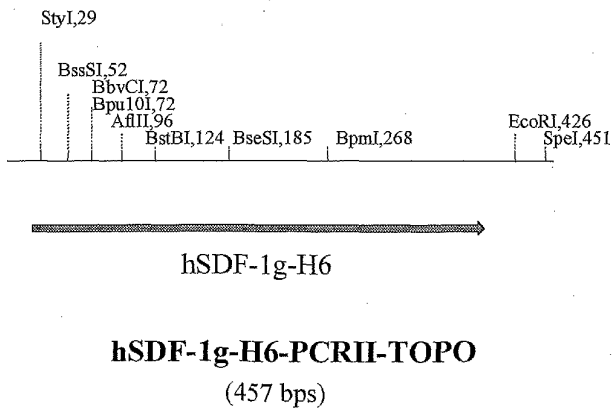


Fig. 16

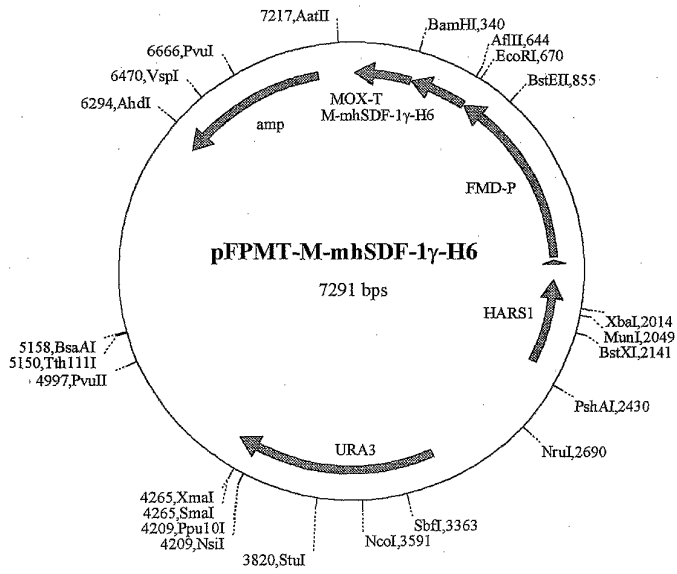


Fig. 17

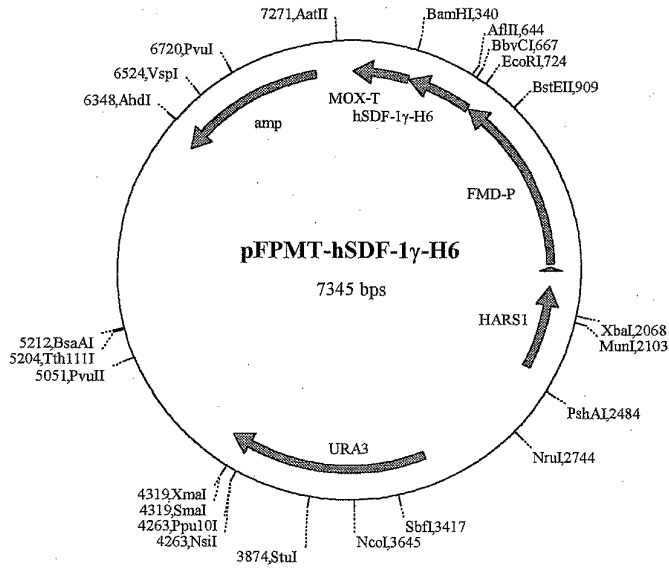


Fig. 18

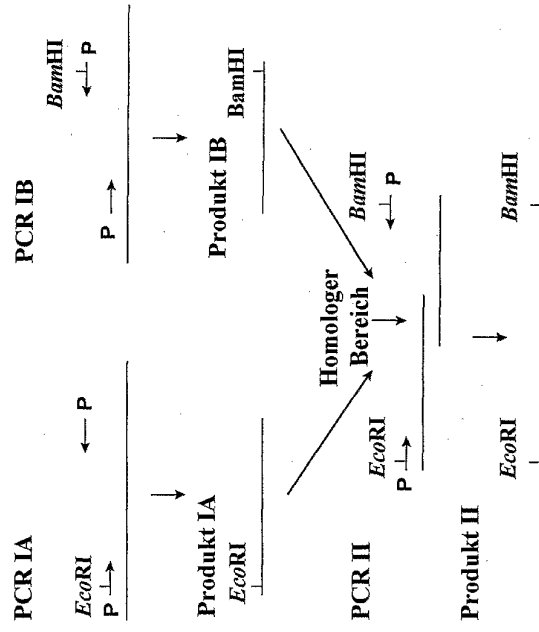
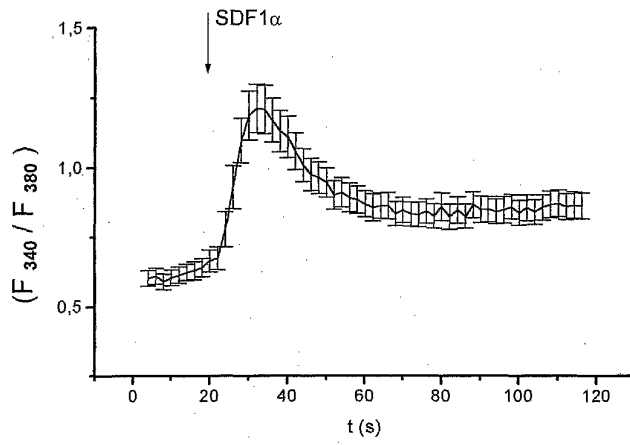


Fig. 21 A, B

A)



B)

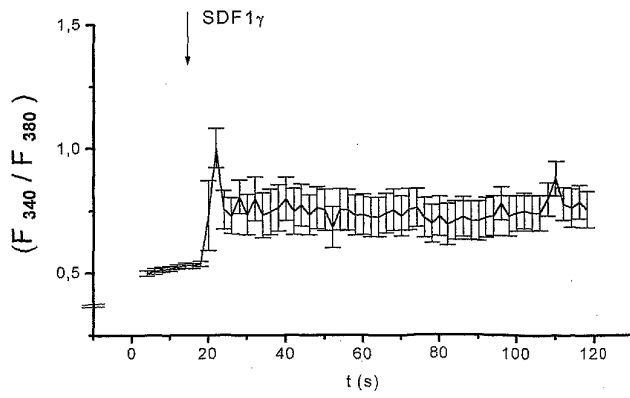
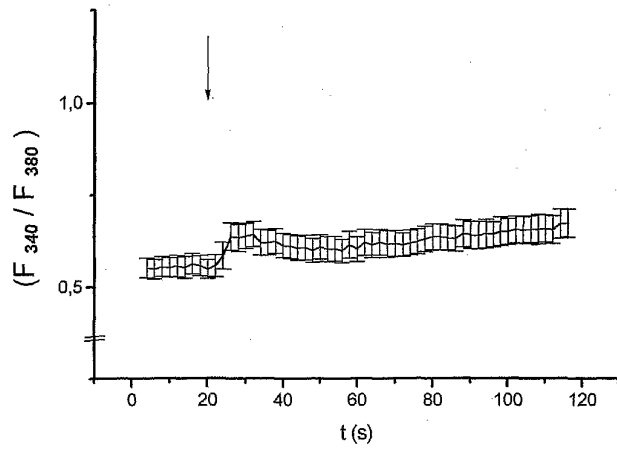


Fig. 21 C, D

C)



D)

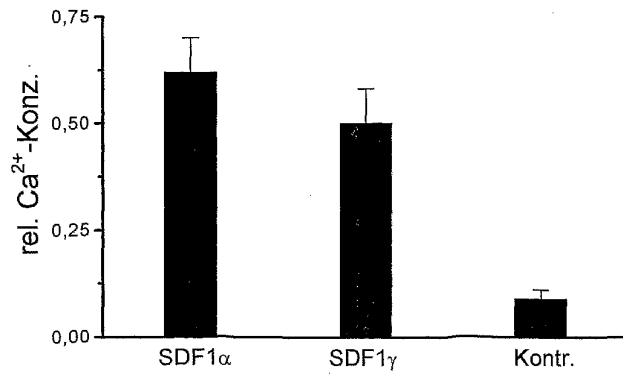


Fig. 22

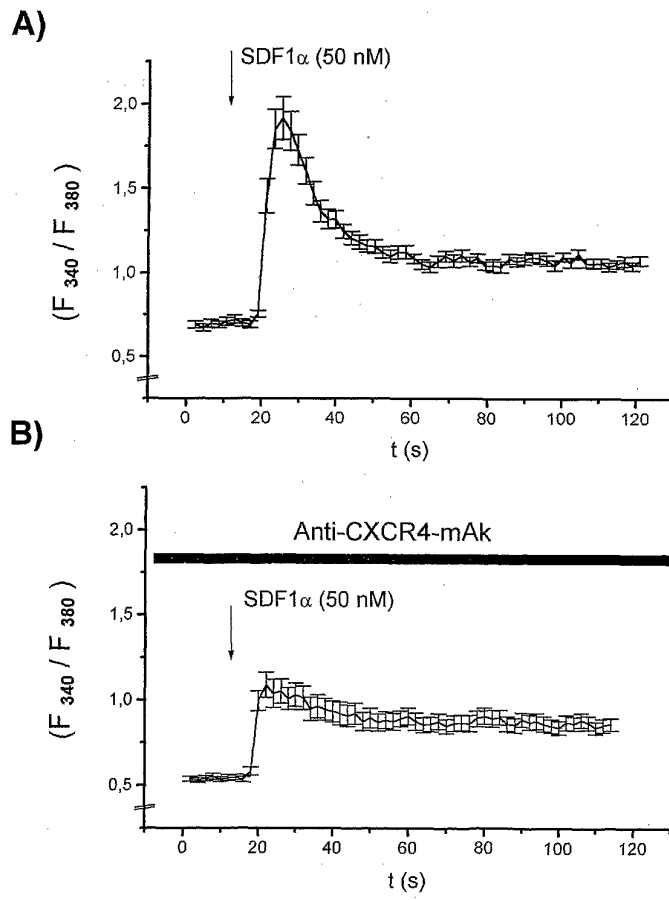


Fig. 23

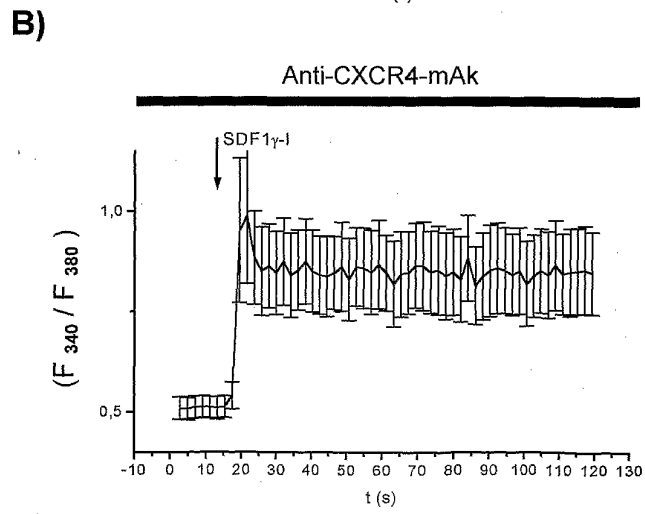
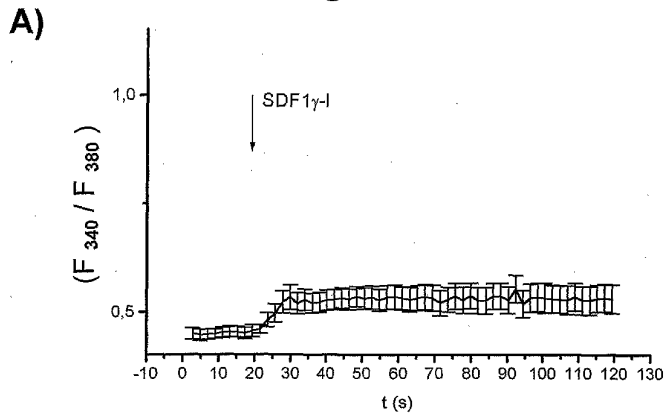


Fig. 24

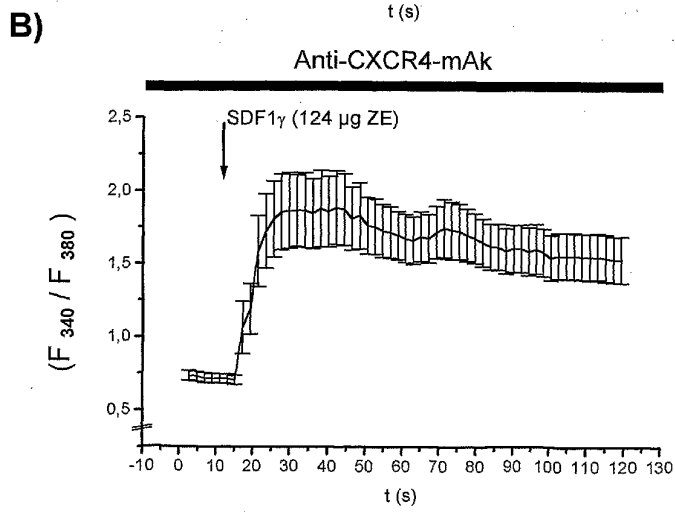
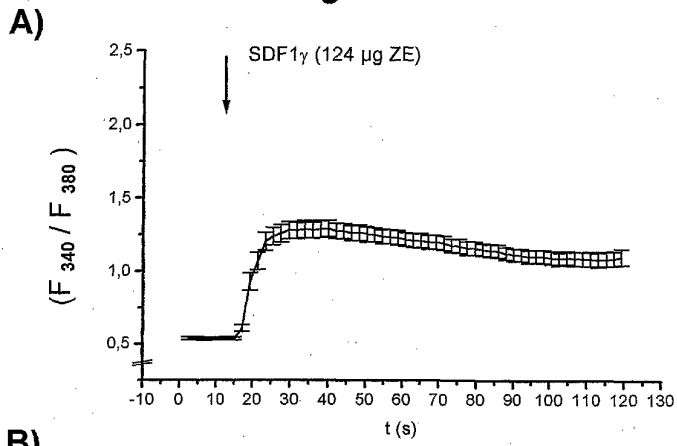


Fig. 25

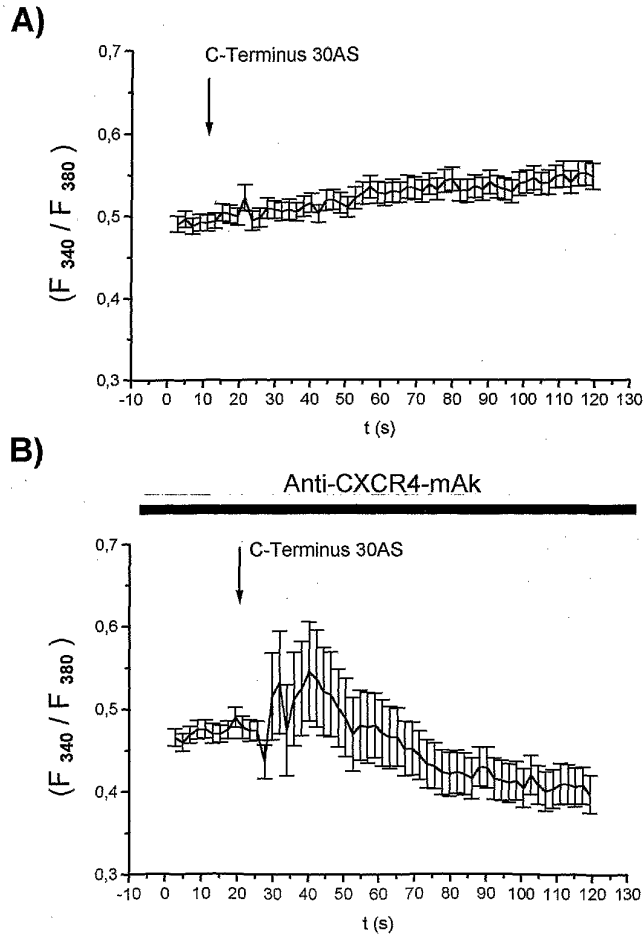
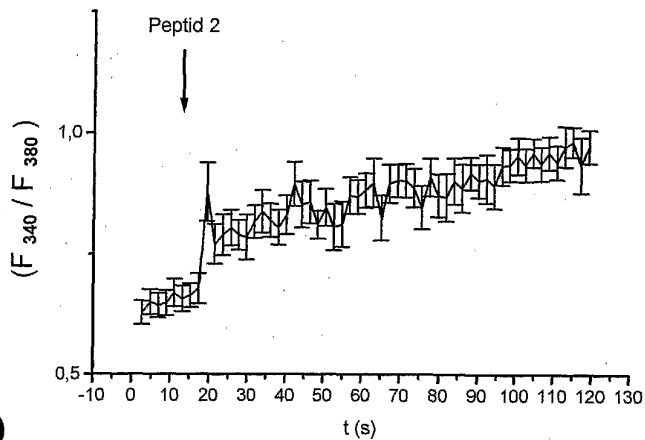
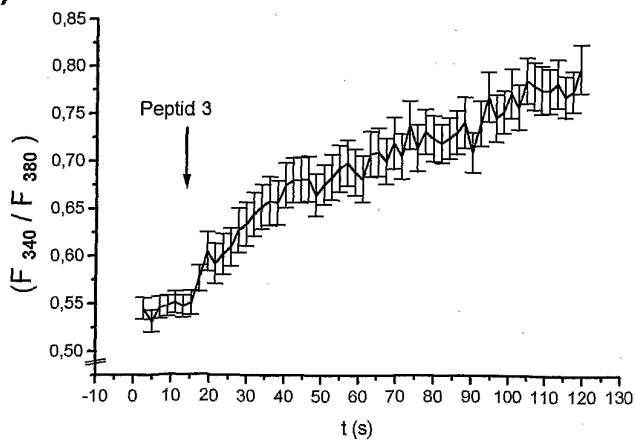


Fig. 26

A)



B)



WO 01/92530

PCT/EP01/06250

1

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Rhein Biotech Gesellschaft für neue biotechnologische Prozesse
und Produkte mbH

<120> Nukleinsäure-Molekül umfassend eine für ein Chemokin,
einen Neuropeptid-Präkursor oder mindestens ein
Neuropeptid kodierende Nukleinsäuresequenz

<130> PCT1385-1966

<140>
<141>

<150> DE 100 27 383.1
<151> 2000-06-02

<160> 22

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 90
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Konsensussequenz für den spezifischen Bereich von
SDF-1-gamma

<400> 1
ggggcagag aagaaaaagt ggggaaaaa gaaaagatag gaaaaaagaa ggcagagaag 60
aagagaaaagg ckgcccagaa aargaaaaac 90

<210> 2
<211> 30
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Konsensussequenz für den spezifischen Bereich von
SDF-1-gamma

<220>
<221> SITE
<222> (28)
<223> Xaa = Arg oder Lys

<400> 2
Gly Arg Arg Glu Glu Lys Val Gly Lys Lys Glu Lys Ile Gly Lys Lys
1 5 10 15
Lys Arg Gln Lys Lys Arg Lys Ala Ala Gln Lys Xaa Lys Asn
20 25 30

<210> 3
<211> 360
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

WO 01/92530

PCT/EP01/06250

2

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
 Konsensussequenz für den kodierenden Bereich von
 SDF-1-gamma

<400> 3
 atgacgcca aggtcgtsgy cgtgctggyc ctsgtgctgr cgcgctotg cmtcagyac 60
 ggkaagcmg tcagcctgag ctacagatgc ccmgccgat tcttygarag ccatgtygcc 120
 agagccaacg tcaarcacatc saaatyctc aacactocaa actgtyccct tcagattgtw 180
 gcmmgctga ararcaacaa cagacaagtg tgcattgacc cgaarytaaa gtggatycar 240
 gagtacctgg asaaagcytt aaacaagggg cgcagagaag aaaaagtygg gaaaaagaa 300
 aagatagaa aaaagaagcg acagaagaag agaaaggcky cccagaaaa gaaaactag 360

<210> 4
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
 Konsensussequenz für das SDF-1-gamma-Polypeptid

<220>
 <221> SITE
 <222> (7)
 <223> Xaa = Val oder Ala

<220>
 <221> SITE
 <222> (10)
 <223> Xaa = Val oder Ala

<220>
 <221> SITE
 <222> (14)
 <223> Xaa = Thr oder Ala

<220>
 <221> SITE
 <222> (18)
 <223> Xaa = Leu oder Ile

<220>
 <221> SITE
 <222> (65)
 <223> Xaa = Asn oder Ser

<220>
 <221> SITE
 <222> (84)
 <223> Xaa = Glu oder Asp

<220>
 <221> SITE
 <222> (117)
 <223> Xaa = Arg oder Lys

<400> 4
 Met Asx Ala Lys Val Val Xaa Val Leu Xaa Leu Val Leu Xaa Ala Leu
 1 5 10 15

WO 01/92530

PCT/EP01/06250

3

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

<210> 5
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Durch
 proteolytische Spaltung von SDF-1-gamma
 erhältliches Peptid

<400> 5
 Arg Arg Glu Glu Lys Val Gly
 1 5

<210> 6
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Durch
 proteolytische Spaltung von SDF-1-gamma
 erhältliches Peptid

<400> 6
 Lys Lys Glu Lys Ile Gly
 1 5

<210> 7
 <211> 90
 <212> PRT
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Durch
 proteolytische Spaltung von SDF-1-gamma
 erhältliches Peptid

WO 01/92530

PCT/EP01/06250

4

<400> 7
 Met Asx Ala Lys Val Val Xaa Val Leu Xaa Leu Val Leu Xaa Ala Leu
 1 5 10 15
 Cys Xaa Ser Asp Gly Lys Pro Val Ser Leu Ser Tyr Arg Cys Pro Cys
 20 25 30
 Arg Phe Phe Glu Ser His Val Ala Arg Ala Asn Val Lys His Leu Lys
 35 40 45
 Ile Leu Asn Thr Pro Asn Cys Ala Leu Gln Ile Val Ala Arg Leu Lys
 50 55 60
 Xaa Asn Asn Arg Gln Val Cys Ile Asp Pro Lys Leu Lys Trp Ile Gln
 65 70 75 80
 Glu Tyr Leu Xaa Lys Ala Leu Asn Lys Gly
 85 90

<210> 8
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Durch
 proteolytische Spaltung von SDF-1-gamma
 erhältliches Peptid

<400> 8
 Lys Lys Lys Arg Gln
 1 5

<210> 9
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Durch
 proteolytische Spaltung von SDF-1-gamma
 erhältliches Peptid

<400> 9
 Lys Lys Arg Lys Ala Ala Gln
 1 5

<210> 10
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Durch
 proteolytische Spaltung von SDF-1-gamma
 erhältliches Peptid

<220>
 <221> SITE

WO 01/92530

PCT/EP01/06250

5

<222> (2)
<223> Xaa = Arg oder Lys

<400> 10
Lys Xaa Lys Asn
1

<210> 11
<211> 5391
<212> DNA
<213> Rattus norvegicus

```

<400> 11
tgtcctcttg ctgtccagct ctgcagcctc cggcgcgccc tcccgccac gccatggagc 60
ccaagtcgt cgcctgctg gccctggctg tggccgcgct ctgcatcagt gacggttaagc 120
cagtcagcct gagctacaga tgccctgccc gattccttga gagccatgtc gccagagcca 180
acgtcaaca tctgaaatc ctcaacactc caaactgtgc ccttcagatt gttgcaagc 240
tgaaaagcaa caacagacaa gtgtgcattg accgaaaatt aaagtgatc caagagtacc 300
tgaaaagc cttaaacaag ggggcagag aagaaaaagt ggggaaaaa gaaagatag 360
gaaaaaagaa cgcacagaag aagagaaagg cggcccagaa aaagaaaaa tagttacgtg 420
ctctctgag atggaccaca gtacgtctgt ctctggcgct ttgtaacccc ccttcctctc 480
tcggggggca gaccacacac tccgggcaag tgctcagact gatgtaaac tcttccctct 540
tctgggggca gaccacacat cccaggyaag accccacacc cccgggcaga tgcctaggct 600
ttcctgcccc gggggccaca ccagctyctg tatttacgcy cttcttaagg ccttgcctctg 660
tctgctaagc tatgaagaaa gatgtcaga gactggggtg gaggctaagc cacagaggac 720
ctgctagcc tggcagcttg ccccgagctg agccccttg ccaggagttc acaaggctca 780
caactacaat cccatagag ccaagtggt ctgcttagcc aggaaagggc atgtgcttc 840
cctcaacca cactgccccc tbtggcttc tcaagtaact gactgtctct caggccacg 900
ggaagcttt ccaaatacct gggcctggg aagggaactt attcagccct gctgcccgg 960
ctgtggagc agcttggttt caacacagaa ggttatctgc agactgtgtt ggtgaaaag 1020
caggaagaat gaagtctcag agaaccgatg ttactgctt ctcaggaat ctttctcttg 1080
gaaatctac tttagatct taaacgggt cctcatggg gaggcagat gtgctctggg 1140
actttctgat gggccagcag ctccaggac tcttagctg tctcccccac ccttctcttg 1200
aacattccca ggtggtgtg ctatccggtc acaatgctt cctctctc acctgagaga 1260
tgtctcctt ctgtggattg ggttaaagct ctggaattac ctaatatccc aaccaccac 1320
cctcaactgg caatttttct ctagtctttt gttttgtct tctccattt tggattagaa 1380
ggatagagg caagctctg attttagcag tgttttgag aaaaaattt ttttctctat 1440
ctcatgtag cacacacaca cacacacaca cacacacaca cacacacaca cacacacaca 1500
tcttgtaacc cagacctctg ggtctaattt tcataattgg ggcagaaga agaatgac 1560
tgaagataca gcaatggat tgcaggggaa ggaaggccca gtgctctgtg tgcctagccc 1620
tcttgggtcc ctaagtctta ggtccttag aggtctaac attaaatag taagagcct 1680
tcatgtctct tgcctgggaa ggtctcacc agggagcttc agggagacc catgttacga 1740
actctatgc ttatctgga cagccctcct ggtccatacc ctctctcag atctgagga 1800
gcgggggtgg ctattgtgg cgtcttctca agcccagggt tactgtctgt tctctctgg 1860
gcagccagtt acagctctgt ctacgtggcc ttggctgat cctctctact gttgacaaa 1920
cactctgaa ggccagatct gtgcccaagc catagtctct cctagaatg gatgccagc 1980
ccctccagca cactgggaag gactgttggc ccttaacaac caaaggccat actgaggctg 2040
cctgagttg gaagaccact tccgaaatg cccctggact ctgctccca ccatccacc 2100
ctgactccta ggaattagag agtagaanaa cagtttgtt ottaggaacc acagcaagct 2160
cccaggacc ctctgtgctt atgaagccca tctaattggc agccccagcc tctggagag 2220
agtctcatg gaaatgctg agaagctgat ttctctaa gatgggtga aggtaggatg 2280
tgctctgta tgttctcagg caggtgagag aggtctctcc ttacagatc tagcataaac 2340
acctctgga agttctgca gctctagaga tcaacctctc agtgccaaga cctctctgg 2400
tgggtggga gcagccaaga gattccaagg aagagtgatt atttgatgaa ataacttgaa 2460
ttatatcaag agtgaatatt tgatgggaac tgctctctct ctggagttc tgaggcctgg 2520
ggatgccag gaaactcagg cacctctgtt tgggtgagtc gatgcatagt ctcaacacca 2580
gtgtcctaag gtttaaggcag tgtgcctgt catgtgttcc ttgtaccatg cctcctgtgc 2640
cagtggtgtt gccttagcct gtgcttgaca tgttcaccog tctctctctc ttgcccacc 2700
cacccagacc ctcaagatca gctctggctg tgccctccc tgccctccca ctctctcagg 2760
ccttggagag aagatggctc gactgcaagc tgaactaagg agtagggcct gtggctctg 2820
ccaggccaca cagcatccca ggcactgggt gagaatccgc cttaattgtt ctctctgtt 2880

```

WO 01/92530

PCT/EP01/06250

6

```

cttgtaaca ggaggctcaa gatgtgagag gtgtgagta gacgcctgag gaacttacag 2940
aaggagccta ggtctgaagt cagtggttag gaagggccca tagccacttc ctctgtccct 3000
gagcagggtt gaagccattt ccaagggact tgccttgcag ttgtctacac ttccaccatt 3060
tgattatata gcaagatata tggtaattat ttatttttca tttagtctga ttcccaatg 3120
tcattgtgta caggccaagg ccaactatgtc atctcccttg ttctagtatc ttcccatga 3180
aggacctttt ctgaatagtg gctcccaagg ttgtctctct tgagctgagg caggaggctc 3240
acctttttct gattagaaac tgggtgttcc taccccgaag gattgcaggg ctttcccaaa 3300
gctgaggcag cagtggtgag tcagggaaga gcgagatcca cccctatccc atgtctctct 3360
cttcatocca gctatgctcat ctctgtctca tccatcaccg tgtgtctgca agactgtctc 3420
catgaccgag aaaaaggact ctctcaagag gaactccottt actcaaaatg ggacagcaag 3480
aaggaaaagg aagtgtctgt tgttccgccc aaacccttcg cgcgtytatt gtctgttttg 3540
gaatattgtc tcttcaacct cctgctctct tgacctcca tgaccaatg ctgctgtgtg 3600
cacgtctctc aaccaaaatg caaaggctgt gtatgaggtg atggccctga ggtccagggt 3660
ttcatggaaa cagcgcaact tctccctgtt cacaggctca tttggacac acagagccca 3720
aagaaggtg ttttgcaaca gagctcagct ctaagactgt agatcctca tattttgta 3780
ctgttassst taatgtgtg gtcttassst tctggaacc gaatgcattc ttctattgag 3840
nactagcagg tctcagttct ttccaattat ttttaaaagc caatgaataa aagcatcagc 3900
atggggccca ctgggggggc atttctctag aaaggggaga accacctacc ttctcttagg 3960
acagccgacc agcacgggcc caggaagtgn nnnntcttc tgcagttttt atacaagctc 4020
ccctgccacc tttgacaac gcacagttaa gactcaatg ctagtctctc agagacaaa 4080
atggaggag taagaagggg aagggaaacg gagaagcta ccaaaagatc atcctcaaaa 4140
gonggtgttt gagagtgaac gagctgtaga atgtttatgt atgtgtgtgt ggtgaggat 4200
ttctataaat agtactcaaa gttgatttca cagcagatga aaaaaccaac cagcaagatt 4260
ttgatcaaat tgggacaaca gcaacaaawc taaaaatgtg aagccaagtg ggataagggg 4320
catatggttt gctgcagact ggttcccact gtggattcag aattatttta aactctctg 4380
acatccgggg ccccacaag agaaatctgg atgtctgtgc aatggccact tagcatctaa 4440
tccaagcttt gaaggaaaca aatcacagct tgcaccttcn ctccagttag ggaactttt 4500
aaagtctctc tcacagggag gataagaga ctgggtagaa actggaggga gatgaattg 4560
tgtatcaatt ccgtgctga cagtcatttt ctgagwggag acagcctgcc tagagcaaat 4620
tgcanttwa atagrcatt tacatnggna mngcctctcc ccacctnat ccccatgct 4680
cttcttttca aatnacaag ncacagcagt ccttgaatg tgtttgacsc cysacaccta 4740
actgtccctg atgatcctgg tgcwgcocng aattcccttg gncgccaagt aacctgcaag 4800
gcagcncagt ccttctgca ccagcctttg catctggata gggaaaagg ggttgagac 4860
atcagctctg ctttgtgtg aanccnagat tngtacsctg tgtttacact gtgctgcctg 4920
ctctccggna cagtggaag gaagtgcagc cgaggtggca gccctctctg atctattsc 4980
ggtcggcttt gagggagggt ttggagagca aaagctgca tccctctgtg ggaactgtcc 5040
gagccttag syctctcoat cgagtctctg ttatctctct atgggtgatt atctcggcg 5100
cgtaccaggg gctctctca cagaagtcac nctcngcag agcttgcaat gctcagcag 5160
cgatggtttc agtgttcat gtgtgtaata ctgtattttg ttccagttct gtctccaga 5220
taatgtgaaa atggtccagg agaagcgagc ttcctatagc cagtggtgct ttcttattc 5280
tcgtttttaa tatatgacag ttatttgaga gccattttct actttgaagt catatcaat 5340
aaaatgatgt atcttcacct acaatttttc ctaataaagt tctgtattcg a 5391

```

```

<210> 12
<211> 119
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 12
Met Asn Ala Lys Val Val Val Val Leu Val Leu Val Leu Thr Ala Leu
1 5 10 15
Cys Leu Ser Asp Gly Lys Pro Val Ser Leu Ser Tyr Arg Cys Pro Cys
20 25 30
Arg Phe Phe Glu Ser His Val Ala Arg Ala Asn Val Lys His Leu Lys
35 40 45
Ile Leu Asn Thr Pro Asn Cys Ala Leu Gln Ile Val Ala Arg Leu Lys
50 55 60

```

WO 01/92530

PCT/EP01/06250

7

Asn Asn Asn Arg Gln Val Cys Ile Asp Pro Lys Leu Lys Trp Ile Gln
65 70 75 80

Glu Tyr Leu Glu Lys Ala Leu Asn Lys Gly Arg Arg Glu Glu Lys Val
85 90 95

Gly Lys Lys Glu Lys Ile Gly Lys Lys Lys Arg Gln Lys Lys Arg Lys
100 105 110

Ala Ala Gln Lys Arg Lys Asn
115

<210> 13
<211> 119
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<400> 13
Met Asp Ala Lys Val Val Ala Val Leu Ala Leu Val Leu Ala Ala Leu
1 5 10 15

Cys Ile Ser Asp Gly Lys Pro Val Ser Leu Ser Tyr Arg Cys Pro Cys
20 25 30

Arg Phe Phe Glu Ser His Val Ala Arg Ala Asn Val Lys His Leu Lys
35 40 45

Ile Leu Asn Thr Pro Asn Cys Ala Leu Gln Ile Val Ala Arg Leu Lys
50 55 60

Ser Asn Asn Arg Gln Val Cys Ile Asp Pro Lys Leu Lys Trp Ile Gln
65 70 75 80

Glu Tyr Leu Asp Lys Ala Leu Asn Lys Gly Arg Arg Glu Glu Lys Val
85 90 95

Gly Lys Lys Glu Lys Ile Gly Lys Lys Lys Arg Gln Lys Lys Arg Lys
100 105 110

Ala Ala Gln Lys Lys Lys Asn
115

<210> 14
<211> 360
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 14
atgaacgccca aggtcgtggt cgtcgtggtc ctctgtctga cgcgctctg cctcagcgc 60
gggaagcccg tcagcctgag ctacagatgc ccatgccgat tcttcgaaag ccatgttgcc 120
agagccaacg tcaagcatct caaaattctc aacactccaa actgtgccct tcagattgta 180
gcccggctga agaacaacaa cagacaagtg tgcattgacc cgaagctaaa gtggattcag 240
gagtacctgg agaaagcttt aaacaagggg cgcagagaag aaaaagtggg gaaaaaagaa 300
aagataggaa aaaagaagcg acagaagaag agaaaggctg cccagaaaag gaaaaactag 360

<210> 15
<211> 360
<212> DNA
<213> Rattus norvegicus

WO 01/92530

PCT/EP01/06250

8

<400> 15
 atggagccca aggtcgtcgc cgtgctggcc ctgggtgctgg ccgctctctg catcagtgac 60
 ggtaagccaag toagcctgag ctacagatgc ccttgccgat tctttgagag ccatgctgcc 120
 agagccaacg toaacatct gaaaatcctc aacctccaa actgtgccct tcagattgtt 180
 gcaagctgga aaagcaacaa cacagaagtg tgcattgacc cgaatataa ttggatccaa 240
 gagtacctg acnaagcctt aaacaagggg cgcagagaag aaaagtggg gaaaaagaa 300
 aagatagaa aaaagagcg acagaagaag agaagggcg cccagaaaa gaaaaactag 360

<210> 16
 <211> 2819
 <212> DNA
 <213> Rattus norvegicus

<400> 16
 tgtcctcttg ctgtccagct ctgcagcctc cggcgcgccc tocccceac gccatggac 60
 ccaagtgctg cgcctgctg gccctggtgc tggcgcgct ctgcatcagt gacgtaagc 120
 cagtcagcct gagctacaga tgcctctgcc gattctttga gagccatgtc gccagagcca 180
 acgtcaacaa tctgaaatc ctcaacactc caaactgtgc ccttcagatt gttgcaagc 240
 tgaaaagcaa caacagacaa gtgtgcatg accgaaatt aaagtggatc caagagtacc 300
 ttgacaagc ctaaaacaag aggtcaaga tgtgagaggt gtgagcaga cgcctgagga 360
 acttcaagaa ggagcctagg tctgaagtoa gtgttaggga agggccata gccactcct 420
 ctgctctga gcagggctga agccatttcc aaggacttg ctttcagatt tgcataact 480
 tcaccatttg attatatagc aagatacatg gtaattattt tatttccatt tagtctgatt 540
 ctccaatgtc attggtgaca ggccaagggc actatgtoat ctctcttgtt ctatgatctt 600
 tcccattga atattgtctc tcaaacctcc tcccaggtt tctctcttgg agctgaggca 660
 ggaggtccac cttttctga ttagaaactg ggtgttcta ccccaggga ttgcagggtc 720
 ttcccacagc tgaggcagga gtgtgaggtc agggagagc gagatccacc tctacccca 780
 gctctctctc tcatccacc atgctcatct ctgtctcatc catcacctg tctctgcaag 840
 actgtctcca tgaccggaa aaaggactct ctcaagagga actcctttac tcaaatggg 900
 acagcaagaa ggaaaagaa gtgtctgttg tcccoccaa acccttcgag cgytatgtt 960
 ctgttttga atattgtctc tcaaacctcc tgcctctgtt gacctccatg accaatgtct 1020
 cgtctgtgca ctgtctctaa cccaaatgca aaggctgtgt atgagtaat ggcctgagg 1080
 tccaggtttt catggaaaca gcgcaactgc tccctgtcca caggctcatt ttggacacac 1140
 agagcccaaa gaaagtggt ttgcaacaga gctcagctct aagactgtag atccttcata 1200
 ttttctact gttasstta aattgtgggt tcttaesttc ctggaaccga atgcatctt 1260
 ctattgagna ctgacaggtc tcagttcttt ccaattattt ttaaaagcca atgaaataaa 1320
 gcctcagcat tgggcccact gggcgggcat tctctagaa agggagaac cactcactt 1380
 tccctaggac agccagccag cagcggccca ggaagtgnm nmctctctg cagttttat 1440
 acaagctccc ctgcccact ttgacaacgc acagttaga gtcagtatct agttctcaag 1500
 agacaagat ggaaggagta agaaggggaa gggaaacgga gaaagctacc aaaagatcat 1560
 cctcaaaagc nggtgttga gagtgaacga gctgtagaat tgttagtgat gttgtgtg 1620
 tgaaggtatt ctataaatag tcaatcaagt tgatttaca gcagatgaaa aatccaaaca 1680
 gcaagatttt gatcaaat ttgcaacagc acaaaawcta aaaatgtaa gccagttggg 1740
 ataaggggca tatggtttgc tgcagactgg tccccatgt ggattcagaa ttattttaa 1800
 ctctctgac atccggggcc cccacaagag aatctgtgat tgcctgcaa tggccactta 1860
 gacttaact caagcttga aggaacaaa tacagccttg cacctcmct ccagttagg 1920
 atcctttaa agtctcttc acagggagga taaagagact ggttagaacc tggagggaga 1980
 tgaattgtg tataaattcc gctgctgaca gtcatttct agawgagac agcctgcta 2040
 gagcaatgt gcaattwaat aggrcattta catngxarm gcctctccc accctnatcc 2100
 ccaatgctct trecttcaaa atnacaagnc acagcagtc ttgaatggtt gttgacscg 2160
 sacactaac tgtccctgat gatcctggt cwgccongaa ttccttggg gcgcaagtaa 2220
 cctccagc agccnagctc ctgtgtcacc agcctttgca tctggatag gaaaagggg 2280
 ttggagcact acagtctgct ttgtgtttaa nccnagattn gtacscctg tttacactg 2340
 gctgctgct ctccggncac gtgggaagga agtgcagcc aggtggcaga cccctctgat 2400
 tcaatctggt tcggcttga gggagggtt ggagagcaaa aggtgcatt cctctgtgg 2460
 acttgcctga gcccttaggy ctctccatcg agttctgtt atcttctcat ggggtattat 2520
 ctccggcggc tcaccagggg ctctccca caagctatnc ctccngcag cttgcaggt 2580
 ctacgcagc atggtttcag tgttgcaggt ggtgaatac gtattttgtt tcagttctgt 2640
 ctcccagata atgtgaaat ggtccagag aaggcagct cctatagca gttgtgtgt 2700
 tcttatctc gtttttaata tatgacagtt atttgagag ccaattctac ttgaaagta 2760
 tatcaatgaa aatgatgtat ctccactac aattttctc aataaagttc tgtattcga 2819

WO 01/92530

PCT/EP01/06250

9

<210> 17
 <211> 93
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus

 <400> 17
 Met Asp Ala Lys Val Val Ala Val Leu Ala Leu Val Leu Ala Ala Leu
 1 5 10 15
 Cys Ile Ser Asp Gly Lys Pro Val Ser Leu Ser Tyr Arg Cys Pro Cys
 20 25 30
 Arg Phe Phe Glu Ser His Val Ala Arg Ala Asn Val Lys His Leu Lys
 35 40 45
 Ile Leu Asn Thr Pro Asn Cys Ala Leu Gln Ile Val Ala Arg Leu Lys
 50 55 60
 Ser Asn Asn Arg Gln Val Cys Ile Asp Pro Lys Leu Lys Trp Ile Gln
 65 70 75 80
 Glu Tyr Leu Asp Lys Ala Leu Asn Lys Arg Leu Lys Met
 85 90

<210> 18
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Durch
 proteolytische Spaltung von SDF-1-beta
 erhaltliches Peptid

<400> 18
 Lys Arg Leu Lys Met
 1 5

<210> 19
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer MMSE2

<400> 19
 acgcatgga cgccaaggtc g 21

<210> 20
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer GAS2

<400> 20
 actgtaagga agaccctctc tcacc 25

WO 01/92530

PCT/EP01/06250

10

<210> 21
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer GAS3

<400> 21
 gttgagacta tgcacgact ccaac

25

<210> 22
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
 Aminosäuresequenz des reifen menschlichen
 SDF-1-gamma-Proteins mit einem C-terminalen
 Metionin (Konstrukt M-mhSDF-1-gamma)

<400> 22
 Met Asp Gly Lys Pro Val Ser Leu Ser Tyr Arg Cys Pro Cys Arg Phe
 1 5 10 15
 Phe Glu Ser His Val Ala Arg Ala Asn Val Lys His Leu Lys Ile Leu
 20 25 30
 Asn Thr Pro Asn Cys Ala Leu Gln Ile Val Ala Arg Leu Lys Asn Asn
 35 40 45
 Asn Arg Gln Val Cys Ile Asp Pro Lys Leu Lys Trp Ile Gln Glu Tyr
 50 55 60
 Leu Glu Lys Ala Leu Asn Lys Gly Arg Arg Glu Glu Lys Val Gly Lys
 65 70 75 80
 Lys Glu Lys Ile Gly Lys Lys Lys Arg Gln Lys Lys Arg Lys Ala Ala
 85 90 95
 Gln Lys Arg Lys Asn
 100

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PC1/E P 01/06250
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/19 C12N15/71 C12N15/79 C07K16/00 C07K14/52 C12Q1/68 A61K38/19 G01N33/53		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N C07K A61K C12Q G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) BIOSIS, STRAND, EPO-Internal, MEDLINE, EMBASE, BIOTECHNOLOGY ABS, CHEM ABS Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MARC GLEICHMANN ET AL.: "Cloning and characterization of SDF1-Gamma, a novel SDF-1 chemokine transcript with developmentally regulated expression in the nervous system" EUROPEAN JOURNAL OF NEUROSCIENCE, vol. 12, pages 1857-1866, XP002173374 June 2000 the whole document	1-35
X	WO 99 55915 A (UNIV IOWA RES FOUND ;US HEALTH (US); GINNS EDWARD I (US); PHILIBER) 4 November 1999 (1999-11-04) Seq ID 1 (15379-15471) 68% Identität mit beanspruchter Seq. ID 1, Komplementärstrang --- -/-	1
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "I" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 6 August 2001		Date of mailing of the international search report 17/08/2001
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Stolz, B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PC 1/EP 01/06250
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 657 468 A (ONO PHARMACEUTICAL CO) 14 June 1995 (1995-06-14) Seq. ID 1: 92% Identität mit beanspruchter Seq. ID 7 ---	14,15, 20-32,35
X	WO 99 20759 A (GENETICS INST) 29 April 1999 (1999-04-29) Seq. ID 1: 92% Identität mit beanspruchter Seq. ID 7 ---	14,15, 20-32,35
X	WO 00 06698 A (ENDRESS GREGORY A ;FLORENCE KIMBERLY A (US); HUMAN GENOME SCIENCES) 10 February 2000 (2000-02-10) Seq. ID 259 (aa 17- aa 23): 85% Identität mit beanspruchter Seq. ID 9 ---	14,18-27
X	KLUGBAUER N ET AL: "STRUCTURE AND FUNCTIONAL EXPRESSION OF A NEW MEMBER OF THE TETRODOTOXIN-SENSITIVE VOLTAGE-ACTIVATED SODIUM CHANNEL FAMILY FROM HUMAN NEUROENDOCRINE CELLS" EMBO JOURNAL,GB,OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, vol. 14, no. 6, 15 March 1995 (1995-03-15), pages 1084-1090, XP002069908 ISSN: 0261-4189 Fig. 1, Polypeptid umfassend Seq. ID 10 ---	14-16
X	WO 97 38004 A (JACKSON LAB ;SEQUANA THERAPEUTICS INC (US)) 16 October 1997 (1997-10-16) Polypeptid (Seq. ID 10, Seq. ID 4) umfassend Seq. ID 8 ---	14-16
X	DATABASE GENBANK 'Online! Acc. U09256, KIM S. ET AL.: XP002173551 umfasst beanspruchte Seq. ID 6 ---	14-16
P,X	DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; PREV200100088678 CZARDYBON ET AL.: "Distribution of the novel chemokine SDF-1 Gamma and CXCR-4 Receptor Transcripts in the Nervous System of Rat during Development. Nov. 2000" XP002173375 abstract --- -/--	1-35

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Int'l Application No. PCT/EP 01/06250
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
E	WO 01 44266 A (KARN JONATHAN ;RIBOTARGETS LTD (GB); WALKER STEPHEN (GB)) 21 June 2001 (2001-06-21) Seq. ID 15 umfasst beanspruchte Seq. ID 8 -----	14-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.
PCT/JP 01/06250

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9955915 A	04-11-1999	AU 3773099 A	16-11-1999
EP 0657468 A	14-06-1995	CA 2117953 A	15-04-1995
		CN 1110323 A, B	18-10-1995
		JP 7188294 A	25-07-1995
		JP 2001017191 A	23-01-2001
		KR 210308 B	15-07-1999
		US 5563048 A	08-10-1996
		US 5756084 A	26-05-1998
WO 9920759 A	29-04-1999	AU 1110599 A	10-05-1999
		EP 1025229 A	09-08-2000
		AU 6444098 A	18-09-1998
		EP 1012309 A	28-06-2000
WO 0006698 A	10-02-2000	AU 5134799 A	21-02-2000
		EP 1100869 A	23-05-2001
WO 9738004 A	16-10-1997	US 5770432 A	23-06-1998
		US 5686598 A	11-11-1997
		US 5705380 A	06-01-1998
		US 5776762 A	07-07-1998
		AU 2450797 A	29-10-1997
		CA 2251603 A	16-10-1997
		EP 0892807 A	27-01-1999
		JP 2000509255 T	25-07-2000
		US 6114502 A	05-09-2000
WO 0144266 A	21-06-2001	NONE	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT		Inhaltliches Aktenzeichen PCT/E/P 01/06250
A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 7 C12N15/19 C12N15/71 C12N15/79 C07K16/00 C07K14/52 C12Q1/68 A61K38/19 G01N33/53		
Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE Recherchiertes Mindestprüfstoß (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 7 C12N C07K A61K C12Q G01N		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoß gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) BIOSIS, STRAND, EPO-Internal, MEDLINE, EMBASE, BIOTECHNOLOGY ABS, CHEM ABS Data		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	MARC GLEICHMANN ET AL.: "Cloning and characterization of SDF1-Gamma, a novel SDF-1 chemokine transcript with developmentally regulated expression in the nervous system" EUROPEAN JOURNAL OF NEUROSCIENCE, Bd. 12, Seiten 1857-1866, XP002173374 June 2000 das ganze Dokument	1-35
X	WO 99 55915 A (UNIV IOWA RES FOUND ;US HEALTH (US); GINNS EDWARD I (US); PHILIBER) 4. November 1999 (1999-11-04) Seq ID 1 (15379-15471) 68% Identität mit beanspruchter Seq. ID 1, Komplementärstrang --- -/--	1
<input checked="" type="checkbox"/> Weiterem Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen <input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung bezeugt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist *T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sofern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist *X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden *Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist *Z* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 6. August 2001		Absenddatum des internationalen Recherchenberichts 17/08/2001
Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.O. 5810 Patentkan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel (+31-70) 340-2040, Tx: 31 651 epo nt, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Beauftragter Stolz, B

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT		Internationale Aktenzeichen PCT/EP 01/06250
C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EP 0 657 468 A (ONO PHARMACEUTICAL CO) 14. Juni 1995 (1995-06-14) Seq. ID 1: 92% Identität mit beanspruchter Seq. ID 7	14, 15, 20-32, 35
X	WO 99 20759 A (GENETICS INST) 29. April 1999 (1999-04-29) Seq. ID 1: 92% Identität mit beanspruchter Seq. ID 7	14, 15, 20-32, 35
X	WO 00 06698 A (ENDRESS GREGORY A ; FLORENCE KIMBERLY A (US); HUMAN GENOME SCIENCES) 10. Februar 2000 (2000-02-10) Seq. ID 259 (aa 17- aa 23): 85% Identität mit beanspruchter Seq. ID 9	14, 18-27
X	KLUGBADER N ET AL.: "STRUCTURE AND FUNCTIONAL EXPRESSION OF A NEW MEMBER OF THE TETRODOTOXIN-SENSITIVE VOLTAGE-ACTIVATED SODIUM CHANNEL FAMILY FROM HUMAN NEUROENDOCRINE CELLS" EMBO JOURNAL, GB, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, Bd. 14, Nr. 6, 15. März 1995 (1995-03-15), Seiten 1084-1090, XP002069908 ISSN: 0261-4189 Fig. 1, Polypeptid umfassend Seq. ID 10	14-16
X	WO 97 38004 A (JACKSON LAB ; SEQUANA THERAPEUTICS INC (US)) 16. Oktober 1997 (1997-10-16) Polypeptid (Seq. ID 10, Seq. ID 4) umfassend Seq. ID 8	14-16
X	DATABASE GENBANK 'Online! Acc. U09256, KIM S. ET AL.: XP002173551 umfasst beanspruchte Seq. ID 6	14-16
P, X	DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; PREV200100088678 CZARDYBON ET AL.: "Distribution of the novel chemokine SDF-1 Gamma and CXCR-4 Receptor Transcripts in the Nervous System of Rat during Development. Nov. 2000" XP002173375 Zusammenfassung	1-35
E	WO 01 44266 A (KARN JONATHAN ; RIBOTARGETS LTD (GB); WALKER STEPHEN (GB)) 21. Juni 2001 (2001-06-21) Seq. ID 15 umfasst beanspruchte Seq. ID 8	14-16

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT				Internationales Aktenzeichen	
Angaben zu Veröffentlichung, die zur selben Patentfamilie gehören				PCT/EP 01/06250	
Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung		
WO 9955915 A	04-11-1999	AU 3773099 A	16-11-1999		
EP 0657468 A	14-06-1995	CA 2117953 A	15-04-1995		
		CN 1110323 A, B	18-10-1995		
		JP 7188294 A	25-07-1995		
		JP 2001017191 A	23-01-2001		
		KR 210308 B	15-07-1999		
		US 5563048 A	08-10-1996		
		US 5756084 A	26-05-1998		
WO 9920759 A	29-04-1999	AU 1110599 A	10-05-1999		
		EP 1025229 A	09-08-2000		
		AU 6444098 A	18-09-1998		
		EP 1012309 A	28-06-2000		
WO 0006698 A	10-02-2000	AU 5134799 A	21-02-2000		
		EP 1100869 A	23-05-2001		
WO 9738004 A	16-10-1997	US 5770432 A	23-06-1998		
		US 5686598 A	11-11-1997		
		US 5705380 A	06-01-1998		
		US 5776762 A	07-07-1998		
		AU 2450797 A	29-10-1997		
		CA 2251603 A	16-10-1997		
		EP 0892807 A	27-01-1999		
		JP 2000509255 T	25-07-2000		
		US 6114502 A	05-09-2000		
WO 0144266 A	21-06-2001	KEINE			

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 25/00	A 6 1 P 25/00	4 C 0 8 5
A 6 1 P 25/28	A 6 1 P 25/28	4 H 0 4 5
A 6 1 P 31/18	A 6 1 P 31/18	
A 6 1 P 37/00	A 6 1 P 37/00	
C 0 7 K 14/52	C 0 7 K 14/52	
C 0 7 K 16/24	C 0 7 K 16/24	
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 P 21/02	K
C 1 2 P 21/02	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 Q 1/68	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/566	
/(C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 5/00	B
C 1 2 R 1:645)	A 6 1 K 37/02	
(C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 R 1:865)	C 1 2 R 1:645	
(C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 R 1:78)	C 1 2 R 1:865	
	C 1 2 N 1/19	
	C 1 2 R 1:78	

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, S D, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(72) 発明者 ハンス、ベルナー、ミューラー

ドイツ連邦共和国デュッセルドルフ、ヤコブ クナイプ シュトラッセ、8 8

(72) 発明者 フランク、ボッセ

ドイツ連邦共和国デュッセルドルフ、アム、ボタニッセン、ガルテン、7

(72) 発明者 マルク、グライヒマン

ドイツ連邦共和国テュービンゲン、ラッペンベルクハルデ、2 3

(72) 発明者 クレメンス、ギレン

ドイツ連邦共和国アーヘン、アルベルト アインシュタイン シュトラッセ、1 1 5

(72) 発明者 ヨハネス、アウエル

ドイツ連邦共和国シュバイゲン、オーター、グラフェンアッシャウ、アンゲルシュトラッセ、7

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA21 CA04 CA05 CA06 CA09 CA12 DA02 DA03
DA06 DA11 DA12 EA04 GA11 GA18 GA19 HA03 HA08 HA12
HA14
4B063 QA01 QA18 QQ03 QQ42 QR08 QR32 QR41 QR42 QR55 QR62
QR82 QS12 QS25 QS34 QS36 QS39 QX01 QX07
4B064 AG02 CA02 CA05 CA06 CA10 CA19 CC24 DA01 DA13
4B065 AA26X AA58X AA76X AA80X AA90X AA91Y AA93X AA93Y AB01 AC14
BA02 CA24 CA44 CA46

4C084	AA01	AA02	AA07	BA01	BA02	BA08	BA16	BA17	BA20	BA21
	CA18	CA28	DC50	MA02	NA14	ZA011	ZA021	ZA151	ZA361	ZA511
	ZB071	ZB111	ZB331	ZC551	ZC751					
4C085	AA13	AA14	BB11	CC03	CC23	CC26	CC28	DD62	EE01	EE03
4H045	AA10	AA11	AA20	AA30	BA10	CA40	DA01	DA75	DA86	EA21
	EA22	EA23	EA29	EA50	FA72	FA74				

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2004521607A5	公开(公告)日	2005-02-17
申请号	JP2002500722	申请日	2001-06-01
[标]申请(专利权)人(译)	NEURAXO BIOTEC		
申请(专利权)人(译)	Noirakuso , 生物技术 , 法理社会 , 手套 , Beshurenkuteru , GmbH与		
[标]发明人	ハンスベルナーミュラー フランクポッセ マルクグライヒマン クレメンスギレン ヨハネスアウエル		
发明人	ハンス、ベルナー、ミュラー フランク、ポッセ マルク、グライヒマン クレメンス、ギレン ヨハネス、アウエル		
IPC分类号	G01N33/53 A61K38/00 A61K39/395 A61K48/00 A61P7/00 A61P9/00 A61P25/00 A61P25/28 A61P31/18 A61P37/00 C07K14/52 C07K16/24 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/19 C12P21/02 C12Q1/68 C12R1/645 C12R1/865 G01N33/566 C12R1/78		
CPC分类号	A61K38/00 A61K48/00 A61P25/00 A61P25/28 C07K14/522		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K39/395.D A61K39/395.N A61P7/00 A61P9/00 A61P25/00 A61P25/28 A61P31/18 A61P37/00 C07K14/52 C07K16/24 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.K C12Q1/68.A G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 C12N5/00.B A61K37/02 C12R1/645 C12R1/865 C12R1/78		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA21 4B024/CA04 4B024/CA05 4B024/CA06 4B024/CA09 4B024/CA12 4B024/DA02 4B024/DA03 4B024/DA06 4B024/DA11 4B024/DA12 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/GA18 4B024/GA19 4B024/HA03 4B024/HA08 4B024/HA12 4B024/HA14 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ03 4B063/QQ42 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR41 4B063/QR42 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QR82 4B063/QS12 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QS39 4B063/QX01 4B063/QX07 4B064/AG02 4B064/CA02 4B064/CA05 4B064/CA06 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA26X 4B065/AA58X 4B065/AA76X 4B065/AA80X 4B065/AA90X 4B065/AA91Y 4B065/AA93X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA01 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/BA01 4C084/BA02 4C084/BA08 4C084/BA16 4C084/BA17 4C084/BA20 4C084/BA21 4C084/CA18 4C084/CA28 4C084/DC50 4C084/MA02 4C084/NA14 4C084/ZA011 4C084/ZA021 4C084/ZA151 4C084/ZA361 4C084/ZA511 4C084/ZB071 4C084/ZB111 4C084/ZB331 4C084/ZC551 4C084/ZC751 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB11 4C085/CC03 4C085/CC23 4C085/CC26 4C085/CC28 4C085/DD62 4C085/EE01 4C085/EE03 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA01 4H045/DA75 4H045/DA86 4H045/EA21 4H045/EA22 4H045/EA23 4H045/EA29 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74		
代理人(译)	耀希达凯贤治 中村KoTakashi		
优先权	10027383 2000-06-02 DE		
其他公开文献	JP2004521607A		
摘要(译)			

本发明涉及包含编码趋化因子，神经肽前体或至少一种神经肽的核酸序列的核酸分子，以及包含该核酸分子的宿主细胞。此外，本发明涉及用作趋化因子或神经肽或包含至少一种神经肽的多肽分子，以及包含至少一种神经肽的片段，以及制备所述多肽分子或其片段的方法。此外，本发明涉及抗体，检测方法和测试试剂盒以及药物组合物。本发明的目的是提供可用于诊断和/或治疗与SDF-1因子或其受体 (CXCR4) 缺陷有关的疾病的新手段。