(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 695 35 719 T2** 2009.03.19

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 739 350 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **695 35 719.0**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US95/00362**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **95 907 381.8**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1995/018819**
(86) PCT-Anmeldetag: **06.01.1995**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **13.07.1995**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **30.10.1996**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **27.02.2008**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **19.03.2009**

(51) Int Cl.[8]: ***C07H 21/04*** (2006.01)
C12N 15/19 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C07K 14/52 (2006.01)
C07K 16/24 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

179138	**07.01.1994**	**US**
190559	**01.02.1994**	**US**

(73) Patentinhaber:
Mochida Pharmaceutical Co. Ltd., Tokio/Tokyo, JP; Osaka Bioscience Institute, Suita, Osaka, JP

(74) Vertreter:
Grünecker, Kinkeldey, Stockmair & Schwanhäusser, 80802 München

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

(72) Erfinder:
GOODWIN, Raymond G., Seattle, WA 98119, US

(54) Bezeichnung: **FAS-ANTIGENBINDENDER LIGAND**

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

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

Beschreibung

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0001] Der als Apoptose bekannte programmierte Zelltod findet in der Embryogenese, Metamorphose, endokrinabhängigen Gewebeatrophie, im normalen Gewebeumsatz und beim Tod von Immun-Thymozyten (induziert durch ihren Antigen-Rezeptor-Komplex oder durch Glucocortocoide) statt (Itoh et al., Cell 66: 233, 1991). Während der Reifung von T-Zellen im Thymus werden T-Zellen, die körpereigene Antigene erkennen, durch den apoptotischen Vorgang zerstört, während andere positiv selektiert werden. Die Möglichkeit, dass manche T-Zellen, die bestimmte körpereigene Epitope (d. h. ineffizient prozessierte und präsentierte Antigendeterminanten eines bestimmten körpereigenen Proteins) erkennen, diesem Eliminierungsvorgang entkommen und anschließend eine Rolle bei Autoimmunerkrankungen spielen können, ist nahegelegt worden (Gammon et al., Immunology Today 12: 193, 1991).

[0002] Von einem als Fas bekannten Zelloberflächenantigen ist berichtet worden, dass es Apoptose vermittelt, und man glaubt, dass es bei der klonalen Deletion mit körpereigenem Material reagierender T-Zellen eine Rolle spielt (Itoh et al., Cell 66: 233, 1991; Watanabe-Fukunage et al., Nature 356: 314, 1992). Bei Fas handelt es sich um ein Molekül von 45 kDa, das auf aktivierten T-Zellen, B-Zellen und Neutrophilen exprimiert wird (Itoh, vorstehend). Hohe Fas-mRNA-Spiegel sind in Thymus, Leber, Herz, Lunge und Eierstöcken von Mäusen nachgewiesen worden (Watanabe-Fukunage et al., J. Immunol., 148: 1274, 1992). Es ist berichtet worden, dass die Vernetzung eines spezifischen Antikörpers mit Fas verschiedene Zelllinien dazu induziert, sich einer Apoptose zu unterziehen (Yonehara et al., J. Exp. Med., 169: 1747, 1989; Trauth et al., Science, 245: 301, 1989). Unter bestimmten Bedingungen kann die Bindung eines spezifischen monoklonalen Antikörpers an Fas jedoch stimulatorisch auf frisch isolierte T-Zellen wirken (Alderson et al., J. Exp. Med. 178: 2231, 1993).

[0003] Über die Klonierung von cDNA, die menschliches und Maus-Fas-Antigen kodiert, ist von Watanage-Fukunage et al. (J. Immunol., vorstehend) beziehungsweise Itoh et al., vorstehend, berichtet worden. Die durch die klonierten cDNAs kodierten Aminosäuresequenzen zeigen an, dass es sich bei sowohl menschlichen als auch Maus-Fas-Antigenen um Transmembranproteine handelt, die eine strukturelle Homologie zu Mitgliedern der Nervenwachstumsfaktor-Rezeptor-/Tumornekrosefaktor-Rezeptor(NGFR/TNFR)-Familie von Zelloberflächenrezeptoren aufweisen.

[0004] Mäuse, welche die als Lymphoproliferations(lpr)-Mutation bekannte autosomale rezessive Mutation tragen, weisen Fehler im Gen für Fas-Antigen auf und exprimieren kein normales funktionelles Fas-Protein, das zur Übertragung des apoptotischen Signals fähig ist (Watanabe-Fukunage et al., Nature 356: 314, 1992). Mäuse, die eine lpr-Mutation tragen, entwickeln lymphoproliferative Störungen, die durch die Anhäufung von $CD4^-$-$CD8^-$-Thymozyten in Lymphknoten und der Milz, Hypergammaglobulinämie, Autoantikörperproduktion, rheumatoiden Faktor, Arthritis und Glomerulonephritis gekennzeichnet sind (Watanabe-Fukunage et al., Nature, vorstehend).

[0005] Ein von dem in lpr-Mäusen vorgefundenen ununterscheidbares klinisches Syndrom wird durch Mäuse aufgezeigt, die ein mutantes Gen tragen, das als Mutation für die generalisierte lymphoproliferative Erkrankung (gld) bekannt ist (Watanabe-Fukunage et al., Nature, vorstehend). An den gld- und lpr-Mutationen sind unterschiedliche Gene beteiligt, die auf unterschiedlichen Chromosomen kartieren (Seldin et al., J. Exp. Med. 167: 688, 1988; Watson et al., Mammalian Genome 2: 158, 1992; Watanabe-Fukunage et al., Biochem. Genet. 29: 325, 1991, und Watanabe-Fukunage et al., J. Immunol., vorstehend).

[0006] Eine Untersuchung zur Existenz und Identität eines Moleküls (von Molekülen), das (die) mit dem Fas-Antigen interagiert (interagieren), ist wünschenswert, um weitere Erkenntnisse zur Entwicklung von körpereigener Toleranz durch das Immunsystem bereitzustellen und um ein Mittel zur Untersuchung der Ätiologie von Autoimmunerkrankungen bereitzustellen. cDNA, die ein Rattenprotein kodiert, das Fas bindet, ist kloniert worden (Suda et al., Cell, 75: 1169, 1993). Ein menschlicher Fas-Ligand würde für Verwendungen wie zum Beispiel Forschung am menschlichen Immunsystem und Entwicklung diagnostischer oder therapeutischer Mittel zur Verwendung bei Menschen bevorzugt. Vor der vorliegenden Erfindung war jedoch kein menschliches Protein bekannt, welches an das Fas-Antigen bindet.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0007] Die vorliegende Erfindung stellt neue Fas-Liganden(Fas-L)-Proteine, sowie isolierte DNA, welche die Fas-L-Proteine kodiert, Expressionsvektoren, welche die isolierte DNA umfassen, und ein Verfahren zur Her-

stellung von Fas-L durch Züchten von Wirtszellen, welche die Expressionsvektoren enthalten, unter Bedingungen, die zur Expression des Fas-L-Proteins geeignet sind, bereit. Bei Fas-L handelt es sich um ein Protein, welches an das als Fas bekannte Antigen (ein Zelloberflächenprotein) bindet. In bestimmten Ausführungsformen ist das Fas-L ein menschliches oder ein Maus-Protein. Gegen das Fas-L-Protein oder ein immunogenes Fragment davon gerichtete Antikörper werden auch bereitgestellt. Zu den Verwendungen der Antikörper gehört das Blockieren der Bindung von Fas-L an Fas. Biologische Aktivitäten, die durch eine derartige Bindung vermittelt werden, können somit gehemmt werden. Die vorliegende Erfindung stellt die folgenden Aspekte bereit:

1. Isolierte DNA, die ein menschliches Fas-L-Polypeptid kodiert, wobei das Fas-L-Polypeptid Fas binden kann und durch eine N-terminale Aminosäuresequenz MQQPFNYPYPQI gekennzeichnet ist und wobei das Fas-L-Polypeptid die Aminosäuresequenz der Reste 1–281 der SEQ ID NO: 2 umfasst.
2. Isolierte DNA gemäß Anspruch 1, wobei die DNA die Nucleotidsequenz der Nucleotide 93–938 der SEQ ID NO: 1 umfasst.
3. Isolierte DNA gemäß Anspruch 1, wobei die DNA die kodierende Region des cDNA-Inserts des rekombinanten Vektors umfasst, der im Stamm ATCC 69527 hinterlegt ist.
4. Isolierte DNA, die ein lösliches menschliches Fas-L-Polypeptid kodiert, wobei das Fas-L-Polypeptid die Aminosäuresequenz der Reste 106–281 der SEQ ID NO: 2 umfasst.
5. Isolierte DNA gemäß Anspruch 4, wobei die DNA die Nucleotidsequenz der Nucleotide 408–938 der SEQ ID NO: 1 umfasst.
6. Expressionsvektor, umfassend eine wie in einem der Ansprüche 1 bis 5 definierte DNA.
7. Verfahren zum Herstellen eines Fas-L-Polypeptids, umfassend das Züchten einer Wirtszelle, die mit einem wie in Anspruch 6 definierten Vektor transformiert ist, unter Bedingungen, die eine Expression von Fas-L fördern, und das Gewinnen des Fas-L-Polypeptids aus der Kultur.
8. Gereinigtes menschliches Fas-L-Protein, das durch eine N-terminale Aminosäuresequenz MQQPFNYPYPQI gekennzeichnet ist, wobei das Fas-L-Protein Fas binden kann und wobei das Protein die Aminosäuresequenz der Reste 1–281 der SEQ ID NO: 2 umfasst.
9. Lösliches menschliches Fas-L-Protein, umfassend die Aminosäuresequenz der Reste 106–281 der SEQ ID NO: 2.
10. Menschliches Fas-L-Protein nach Anspruch 8, das durch das cDNA-Insert des im Stamm ATCC 69527 hinterlegten rekombinanten Vektors kodiert wird.
11. Oligomer aus Fas-L-Polypeptiden, umfassend ein Polypeptid nach einem der Ansprüche 8 bis 10.
12. Oligomer gemäß Anspruch 11 in Form eines Dimers oder Trimers des Polypeptids nach einem der Ansprüche 8 bis 10.
13. Oligomer gemäß Anspruch 11 oder 12, das durch Disulfidbindungen zwischen Cysteinresten auf unterschiedlichen Fas-L-Polypeptiden gebildet oder als Fusionspolymere mit oder ohne Verknüpfungsgruppen aus Spacer-Aminosäuren exprimiert wird.
14. Oligomer gemäß Anspruch 11, wobei das Oligomer ein Dimer ist und durch Fusionieren von Fas-L an die Fc-Region eines Antikörpers erzeugt wird.
15. Isoliertes Nucleinsäuremolekül, umfassend mindestens etwa 14 Nucleotide der SEQ ID NO: 1, oder das DNA- oder RNA-Komplement davon.
16. Menschliches Fas-L-Polypeptid gemäß einem der Ansprüche 8 bis 10 zur Verwendung in der Medizin.
17. Antikörper, der mit menschlichem Fas-L gemäß einem der Ansprüche 8 bis 10 eine Immunreaktion eingehen kann, zur Verwendung in der Medizin.
18. Verwendung eines menschlichen Fas-L-Polypeptids gemäß einem der Ansprüche 8 bis 10 oder von DNA, die ein menschliches Fas-L-Polypeptid gemäß einem der Ansprüche 11 bis 14 kodiert, bei der Herstellung eines Mittels zur Behandlung einer Autoimmunerkrankung, der Transplantat-gegen-Wirt-Krankheit oder einer durch die Wechselwirkung von Fas-L und Fas vermittelten Erkrankung, ausgewählt aus systemischem Lupus erythematodes (SLE), rheumatoider Arthritis, der Lyme-Krankheit, idiopathischer $CD4^+$-T-Lymphozytopenie oder den Wirkungen einer Infektion mit menschlichem Immundefizienzvirus (HIV).
19. Verwendung gemäß Anspruch 18, wobei es sich bei der Autoimmunerkrankung um systemischen Lupus erythematodes (SLE), immunoblastische Lymphadenopathie (IBL), angioimmunoblastische Lymphadenopathie (AIL), Lymphogranulomatose X (LgX), rheumatoide Arthritis, Diabetes, multiple Sklerose oder Allergien handelt.
20. Verwendung eines Antikörpers, der mit menschlichem Fas-L gemäß einem der Ansprüche 8 bis 10 eine Immunreaktion eingehen kann und der die Bindung eines Fas-L-Polypeptids an Fas hemmt, bei der Herstellung eines Mittels zur Behandlung einer durch die Wechselwirkung von Fas-L und Fas vermittelten Erkrankung, ausgewählt aus systemischem Lupus erythematodes (SLE), rheumatoider Arthritis, der Lyme-Krankheit, idiopathischer $CD4^+$-T-Lymphozytopenie oder den Wirkungen einer Infektion mit menschlichem Immundefizienzvirus (HIV).
21. Pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend ein menschliches Fas-L-Polypeptid gemäß einem

der Ansprüche 8 bis 10 und gegebenenfalls einen pharmazeutisch verträglichen Exzipienten, ein pharmazeutisch verträgliches Verdünnungsmittel oder einen pharmazeutisch verträglichen Träger.

22. Pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend einen Antikörper, der mit einem menschlichem Fas-L-Polypeptid gemäß einem der Ansprüche 8 bis 10 eine Immunreaktion eingehen kann, und gegebenenfalls einen pharmazeutisch verträglichen Exzipienten, ein pharmazeutisch verträgliches Verdünnungsmittel oder einen pharmazeutisch verträglichen Träger.

AUSFÜHRLICHE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0008] DNA, die ein neues menschliches Polypeptid kodiert, das als Ligand für das als Fas bekannte Zelloberflächenantigen wirken kann, ist in Übereinstimmung mit der vorliegenden Erfindung isoliert worden. Maus-Fas-L-DNA wird ebenfalls bereitgestellt. Auch werden Expressionsvektoren, welche die Fas-Liganden(Fas-L)-DNA umfassen, und Verfahren zur Herstellung rekombinanter Fas-L-Polypeptide durch Züchten von Wirtszellen, welche die Expressionsvektoren enthalten, unter Bedingungen, die zur Expression von Fas-L geeignet sind, und durch Gewinnen des exprimierten Fas-L bereitgestellt. Im Wesentlichen homogenes, gereinigtes Fas-L-Protein wird auch durch die vorliegende Erfindung umfasst.

[0009] Die vorliegende Erfindung stellt auch menschliches oder Maus-Fas-L oder antigene Fragmente davon bereit, die als Immunogene wirken können, um Antikörper zu erzeugen, die für die Fas-L-Immunogene spezifisch sind. Somit können monoklonale Antikörper hergestellt werden, die für Fas-L oder antigene Fragmente davon spezifisch sind.

[0010] Bei dem hierin offenbarten neuen Protein handelt es sich um einen Liganden für Fas, ein Zelloberflächenprotein, das ein Mitglied der TNF/NGF-Rezeptor-Superfamilie ist. Man glaubt, dass Fas bei der klonalen Deletion mit körpereigenem Material reagierender T-Zellen eine Rolle spielt. Mäuse, die Mutationen tragen, welche die Produktion von fehlerhaftem Fas-Antigen verursachen, leiden an einem Autoimmunsyndrom. Eine Verwendung des Fas-Liganden der vorliegenden Erfindung ist als Forschungswerkzeug zur Untersuchung von Autoimmunstörungen und zur Untersuchung der Rollen, die Fas und Fas-L beim Induzieren der Toleranz gegen körpereigenes Material spielen können. Die Fas-L-Polypeptide der vorliegenden Erfindung können auch in in-vitro-Assays zum Nachweis von Fas oder Fas-L oder deren Wechselwirkungen eingesetzt werden.

[0011] Das Fas-L-Protein kann als Proteinreinigungsreagens eingesetzt werden. An einem festen Trägermaterial befestigtes Fas-L ist zur Reinigung von Fas-Protein durch Affinitätschromatographie nützlich. Fas-L findet auch eine Verwendung beim Überwachen der biologischen Aktivität von Fas-Proteinen, wie nachstehend ausführlicher beschrieben wird.

[0012] Die Isolierung einer cDNA, die menschliches Fas-L kodiert, wird im nachstehenden Beispiel 2 beschrieben. Der E. coli-Stamm DH4α, der mit dem Klonierungsvektor pBLUESCRIPT®SK, der diese Fas-L-cDNA enthält, transformiert ist, wurde am 5. Januar 1994 bei der American Type Culture Collection hinterlegt, und ihm wurde die Hinterlegungsnr. 69527 zugewiesen. Die Hinterlegung wurde unter den Bedingungen des Budapester Vertrages durchgeführt.

[0013] Die Nucleotidsequenz der in Beispiel 2 isolierten menschlichen Fas-L-DNA wird in der SEQ ID NO: 1 vorgelegt. Die durch sie kodierte Aminosäuresequenz wird in der SEQ ID NO: 2 vorgelegt. Dieses menschliche Fas-L-Protein umfasst eine N-terminale zytoplasmatische Domäne (Aminosäuren 1–80), eine Transmembranregion (Aminosäuren 81–105) und eine extrazelluläre Domäne (Aminosäuren 106–281). Die extrazelluläre Domäne enthält die Rezeptorbindungsregion.

[0014] Wie hierin verwendet, schließt der Begriff "Fas-L" membrangebundene Proteine (die eine zytoplasmatische Domäne, eine Transmembranregion und eine extrazelluläre Domäne umfassen) sowie verkürzte Proteine, welche die Fas-bindende Eigenschaft beibehalten, ein. In einer Ausführungsform umfassen lösliche Fas-L-Polypeptide die ganze extrazelluläre Domäne eines Fas-L-Proteins oder einen Teil davon, aber ihnen fehlt die Transmembranregion, die eine Rückhaltung des Polypeptids auf einer Zellmembran verursachen würde. Zweckmäßigerweise wird ein heterologes Signalpeptid an den N-Terminus fusioniert, so dass das lösliche Fas-L nach der Expression sezerniert wird. Die löslichen Fas-L-Polypeptide, die eingesetzt werden können, behalten die Fähigkeit bei, das Fas-Antigen zu binden. Lösliches Fas-L kann auch einen Teil der Transmembranregion oder einen Teil der zytoplasmatischen Domäne oder andere Sequenzen einschließen, vorausgesetzt, dass das lösliche Fas-L-Protein sezerniert werden kann.

[0015] Lösliches Fas-L kann identifiziert (und von seinen nicht löslichen, membrangebundenen Gegenspie-

lern unterschieden) werden, indem intakte Zellen, die das gewünschte Protein exprimieren, vom Kulturmedium getrennt werden, z. B. durch Zentrifugation, und das Medium (der Überstand) auf die Anwesenheit des gewünschten Proteins hin analysiert wird. Das Kulturmedium kann unter Verwendung von Verfahren analysiert werden, die denjenigen ähnlich oder gleich sind, die in den nachstehenden Beispielen beschrieben werden. Die Anwesenheit von Fas-L im Medium zeigt an, dass das Protein aus den Zeilen sezerniert wurde und es sich somit um eine lösliche Form des gewünschten Proteins handelt. Lösliches Fas-L kann eine natürlich vorkommende Form dieses Proteins sein.

[0016] Die Verwendung löslicher Formen von Fas-L ist für bestimmte Anwendungen zweckmäßig. Die Reinigung der Proteine aus rekombinanten Wirtszellen wird erleichtert, da die löslichen Protein aus den Zellen sezerniert werden. Ferner sind lösliche Proteine im Allgemeinen zur intravenösen Verbreichung besser geeignet.

[0017] Verkürztes Fas-L, einschließlich löslicher Polypeptide, kann mit jeder von etlichen herkömmlichen Techniken hergestellt werden. Im Falle rekombinanter Proteine kann ein DNA-Fragment, das ein gewünschtes Fragment kodiert, in einen Expressionsvektor kloniert werden. Alternativ dazu kann eine gewünschte DNA-Sequenz unter Verwendung bekannter Techniken chemisch synthetisiert werden. DNA-Fragmente können auch durch Restriktionsendonukleaseverdau einer klonierten DNA-Sequenz voller Länge hergestellt und durch Elektrophorese auf Agarosegelen isoliert werden. Linker, die eine oder mehrere Restriktionsendonuklease-Spaltungsstellen enthalten, können eingesetzt werden, um das gewünschte DNA-Fragment in einen Expressionsvektor einzufügen, oder das Fragment kann an darin natürlich vorliegenden Spaltungsstellen verdaut werden. Das wohlbekannte Polymerasekettenreaktions-Verfahren kann auch eingesetzt werden, um eine DNA-Sequenz zu isolieren, die ein gewünschtes Proteinfragment kodiert.

[0018] Bei einem anderen Ansatz kann eine enzymatische Behandlung (z. B. unter Verwendung der Exonuclease Bal 31) eingesetzt werden, um terminale Nucleotide von einem DNA-Fragment zu deletieren, um ein Fragment mit einem bestimmten gewünschten Terminus zu erhalten. Zu den im Handel erhältlichen Linkern gehören solche, die an die glatten Enden ligiert werden können, die durch Verdau mit Bal 31 produziert werden und die eine oder mehrere Restriktionsendonuclease-Spaltungsstellen enthalten. Alternativ dazu können Oligonucleotide synthetisiert werden, die den N- oder C-Terminus eines DNA-Fragment bis zu einem gewünschten Punkt rekonstruieren. Das Oligonucleotid kann eine Restriktionsendonuclease-Spaltungsstelle stromaufwärts der gewünschten kodierenden Sequenz enthalten und ein Initiationscodon (ATG) am N-Terminus der kodierenden Sequenz positionieren.

[0019] Die Fas-L-DNA der vorliegenden Erfindung schließt cDNA, chemisch synthetisierte DNA, durch PCR isolierte DNA, genomische DNA und Kombinationen davon ein. Genomische Fas-L-DNA kann unter Verwendung von Standardtechniken durch Hybridisierung an die hierin offenbarte Fas-L-cDNA isoliert werden. Von der Fas-L-DNA transkribierte RNA wird auch durch die vorliegende Erfindung umfasst.

[0020] Bestimmte Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung stellen isolierte DNA bereit, die eine Nucleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus den Nucleotiden 93–938 (kodierende Region) oder 408–938 (die die extrazelluläre Domäne kodieren) der SEQ ID NO: 1, umfasst. DNAs, die biologisch aktive Fragmente des Proteins der SEQ ID NO: 2 kodieren, werden auch bereitgestellt.

[0021] Auch hierin bereitgestellt werden gereinigte Fas-L-Polypeptide, sowohl rekombinante als auch nicht rekombinante. Varianten und Derivate nativer Fas-L-Proteine, welche die gewünschte biologische Aktivität beibehalten, liegen auch im Umfang der vorliegenden Erfindung. Fas-L-Varianten können durch Mutationen von Nucleotidsequenzen erhalten werden, die zum Beispiel native Fas-L-Polypeptide kodieren. Eine Fas-L-Variante, wie hierin bezeichnet, ist ein Polypeptid, das im Wesentlichen zu einem nativen Fas-L homolog ist, das aber wegen einer oder einer Vielfalt von Deletionen, Insertionen oder Substitutionen eine andere Aminosäuresequenz als die des nativen Fas-L aufweist. Erfindungsgemäße, Fas-L kodierende DNA-Sequenzen umfassen Sequenzen, die im Vergleich zu einer nativen Fas-L-DNA eine oder mehrere Additionen, Deletionen oder Substitutionen von Nucleotiden umfassen, die aber ein Fas-L-Protein kodieren, das einem nativen Fas-L-Protein im Wesentlichen biologisch äquivalent ist.

[0022] Die variante Aminosäure- oder DNA-Sequenz ist vorzugsweise mindestens 90% zu einer nativen Fas-L-Sequenz identisch. Der Homologiegrad (Prozentsatz der Identität) zwischen einer nativen und einer mutanten Sequenz kann zum Beispiel durch Vergleichen der beiden Sequenzen unter Verwendung des von Devereux et al. (Nucl. Acids Res. 12: 387, 1984) beschriebenen und von der Genetics Computer Gruppe der Universität Wisconsin (UWGCG) erhältlichen Computerprogramms GAP, Version 6.0, bestimmt werden. Das Programm GAP benutzt das Angleichungsverfahren von Needleman und Wunsch (J. Mol. Biol. 48: 443, 1970),

wie von Smith und Waterman (Adv. Appl. Math 2: 482, 1981) revidiert. Kurz gesagt definiert das Programm GAP Ähnlichkeit als Anzahl abgeglichener Symbole (d. h. Nucleotide oder Aminosäuren) die ähnlich sind, geteilt durch die Gesamtzahl der Symbole in der kürzeren der beiden Sequenzen. Die bevorzugten Default-Parameter für das Programm GAP schließen (1) eine unäre Vergleichsmatrix (die einen Wert von 1 für Identitäten und 0 für Nichtidentitäten enthält) für Nucleotide und die gewichtete Vergleichsmatrix von Gribskov und Burgess, Nucl. Acids Res. 14: 6745, 1986, wie von Schwartz und Dayhoff, Hrsg., Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, S. 353–358, 1979, beschrieben, (2) eine Strafe von 3,0 für jede Lücke und eine zusätzliche Strafe von 0,10 für jedes Symbol in jeder Lücke und (3) keine Strafe für Lücken am Ende ein.

[0023] Veränderungen der nativen Aminosäuresequenz können mit jeder von etlichen bekannten Techniken erreicht werden. Mutationen können an bestimmten Loci durch Synthetisieren von Oligonucleotiden eingeführt werden, die eine mutante Sequenz, flankiert von Restriktionsstellen, enthalten, die eine Ligierung an Fragmente der nativen Sequenz ermöglichen. Nach der Ligierung kodiert die so erhaltene rekonstruierte Sequenz ein Analogon mit der gewünschten Aminosäureinsertion, -substitution oder -deletion.

[0024] Alternativ dazu können Oligonucleotid-gesteuerte ortsspezifische Mutageneseverfahren eingesetzt werden, um ein verändertes Gen bereitzustellen, das bestimmte Kodons aufweist, die gemäß der benötigten Substitution, Deletion oder Insertion verändert sind. Beispielhafte Verfahren zum Herstellen der vorstehend dargelegten Veränderungen werden von Walder et al. (Gene 42: 133, 1986); Bauer et al. (Gene 37: 73, 1985); Craik (BioTechniques, Januar 1985, 12–19); Smith et al. (Genetic Engineering: Principles and Methods, Plenum Press, 1981) und den US-Patenten Nr. 4.518.584 und 4.737.462 offenbart, die hierin durch Bezugnahme aufgenommen sind.

[0025] Varianten können konservativ substitutierte Sequenzen umfassen, was bedeutet, dass ein bestimmter Aminosäurerest durch einen Rest mit ähnlichen physikochemischen Kennzeichen ersetzt ist. Beispiele für konservative Substitutionen schließen die Substitution eines aliphatischen Restes für einen anderen, wie zum Beispiel Ile, Val, Leu oder Ala für einen anderen oder Substitutionen eines polaren Restes für einen anderen, wie zum Beispiel zwischen Lys und Arg, Glu und Asp oder Gln und Asn, ein. Andere derartige konservative Substitutionen, zum Beispiel Substitutionen gesamter Regionen mit ähnlichen Hydrophobizitätskennzeichen, sind wohlbekannt.

[0026] Fas-L kann auch durch Bildung kovalenter oder aggregativer Konjugate mit anderen chemischen Einheiten, wie zum Beispiel Glycosylgruppen, Lipiden, Phosphat-, Acetylgruppen und dergleichen, modifiziert werden, um Fas-L-Derivate zu erzeugen. Kovalente Derivate von Fas-L können durch Verknüpfen der chemischen Einheiten mit funktionellen Gruppen an Aminosäureseitenketten von Fas-L oder am N-Terminus oder C-Terminus eines Fas-L-Polypeptids oder dessen extrazellulärer Domäne hergestellt werden. Andere Derivate von Fas-L innerhalb des Umfangs dieser Erfindung schließen kovalente oder aggregative Konjugate von Fas-L oder seinen Fragmenten mit anderen Proteinen oder Polypeptiden ein, wie zum Beispiel durch Synthese in rekombinanter Kultur als N-terminale oder C-terminale Fusionen. Zum Beispiel kann das Konjugat eine Signal- oder Leaderpolypeptidsequenz (z. B. den Leader des α-Faktors von Saccharomyces) am N-Terminus eines Fas-L-Polypeptids umfassen. Das Signal- oder Leaderpeptid steuert die Übertragung des Konjugats von seinem Syntheseort zu einem Ort innerhalb oder außerhalb der Zellmembran oder Zellwand kotranslational oder posttranslational.

[0027] Fas-L-Polypeptidfusionen können Peptide umfassen, die zugefügt werden, um die Reinigung und Identifizierung von Fas-L zu erleichtern. Derartige Peptide schließen zum Beispiel poly-His oder die antigenen Identifizierungspeptide ein, die im US-Patent Nr. 5.011.912 und in Hopp et al., Bio/Technology 6: 1204, 1988, beschrieben werden. Ein derartiges Peptid ist das Flag®-Peptid Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys (DYKDDDDK) (SEQ ID NO: 3), das hoch antigen ist und ein Epitop bereitstellt, das durch einen spezifischen monoklonalen Antikörper reversibel gebunden wird, was einen schnellen Assay und eine leichte Reinigung von exprimiertem rekombinantem Protein ermöglicht. Diese Sequenz wird auch spezifisch an dem Rest, welcher der Asp-Lys-Paarung unmittelbar folgt, durch mukosale Enterokinase aus Rindern gespalten. Fusionsproteine, die dieses Peptid als Cap tragen, können auch gegen einen intrazellulären Abbau in E. coli resistent sein. Ein als 4E11 bezeichnetes Maus-Hybridom produziert einen monoklonalen Antikörper, der das Peptid DYKDDDDK (SEQ ID NO: 3) in Anwesenheit bestimmter zweiwertiger Metallkationen bindet (wie im US-Patent 5.011.912 beschrieben) und ist bei der American Type Culture Collection unter der Hinterlegungsnr. HB 9259 hinterlegt worden. Monoklonale Antikörper, die an das Flag®-Peptid binden, sind von der Eastman Kodak Co., Scientific Imaging Systems Division, New Haven, Connecticut, erhältlich.

[0028] Die vorliegende Erfindung schließt ferner Fas-L-Polypeptide mit oder ohne assoziierte Glycosylierung im nativen Muster ein. Fas-L, das in Hefe oder Säugerexpressionssystemen (z. B. COS-7-Zellen) exprimiert wird, kann einem nativen Fas-L-Polypeptid in Molekulargewicht und Glycosylierungsmuster ähnlich oder signifikant verschieden davon sein, je nach der Wahl des Expressionssystems. Eine Expression von Fas-L-Polypeptiden in bakteriellen Expressionssystemen, wie z. B. E. coli, stellt nicht glykosylierte Moleküle bereit.

[0029] DNA-Konstrukte, die verschiedene Additionen oder Substitutionen von Aminosäureresten oder -sequenzen oder Deletionen terminaler oder interner Reste oder Sequenzen, die für eine biologische Aktivität oder Bindung nicht nötig sind, kodieren, können hergestellt werden. Zum Beispiel können N-Glykosylierungsstellen in der extrazellulären Domäne von Fas-L modifiziert werden, um eine Glycosylierung auszuschließen, während sie die Expression eines homogenen Analogons mit reduziertem Kohlenhydrat unter Verwendung eines Hefe-Expressionssystems ermöglichen. N-Glycosylierungsstellen in eukaryotischen Polypeptiden sind durch ein Aminosäuretriplett, Asn-X-Y, gekennzeichnet, wobei es sich bei X um jede Aminosäure außer Pro handelt und es sich bei Y um Ser oder Thr handelt. Derartige Stellen findet man in menschlichem Fas-L an den Aminosäuren 76–78, 184–186, 250–252 und 260–262 der SEQ ID NO: 2. Geeignete Modifikationen der Nucleotidsequenz, die dieses Triplett kodiert, führen zu Substitutionen, Additionen oder Deletionen, welche die Befestigung von Kohlenhydratresten an der Asn-Seitenkette verhindern. Bekannte Verfahren zum Inaktivieren von N-Glycosylierungsstellen in Proteinen schließen diejenigen ein, die im US-Patent 5.071.972 und in EP 276.846 beschrieben werden.

[0030] In einem anderen Beispiel können Sequenzen, die Cys-Reste kodieren, die für die biologische Aktivität nicht unbedingt notwendig sind, verändert werden, um zu verursachen, dass die Cys-Reste deletiert oder durch andere Aminosäuren ersetzt werden, was die Bildung inkorrekter intramolekularer Disulfidbrücken bei der Renaturierung verhindert. Andere Varianten werden durch eine Modifikation benachbarter zweibasiger Aminosäurereste hergestellt, um die Expression in Hefesystemen zu erhöhen, in denen eine KEX2-Proteaseaktivität vorhanden ist. EP 212.914 offenbart die Verwendung von ortsspezifischer Mutagenese, um Prozessierungsstellen für KEX2-Protease in einem Protein zu inaktivieren. Prozessierungsstellen für KEX2-Potease werden inaktiviert, indem man Reste deletiert, addiert oder substituiert, um Arg-Arg-, Arg-Lys- und Lys-Arg-Paare zu verändern, um das Auftreten dieser benachbarten basischen Reste zu eliminieren. Derartige Prozessierungsstellen für KEX2-Protease findet man an den Resten 38–39, 43–44, 73–74 und 144–145 der SEQ ID NO: 2. Lys-Lys-Paarungen sind deutlich weniger empfänglich für eine KEX2-Spaltung und eine Umwandlung von Arg-Lys oder Lys-Arg in Lys-Lys stellt einen konservativen und bevorzugten Ansatz zum Inaktivieren von KEX2-Stellen dar.

[0031] Natürlich vorkommende Fas-L-Varianten werden auch durch die vorliegende Erfindung umfasst. Beispiele für derartige Varianten sind Proteine, die sich aus alternativen mRNA-Spleißing-Ereignissen ergeben (da Fas-L durch ein Multi-Exon-Gen kodiert wird) oder aus einer proteolytischen Spaltung des Fas-L-Proteins, wobei die Fas-bindende Eigenschaft beibehalten wird. Alternatives Spleißen von mRNA kann ein verkürztes, aber biologisch aktives Fas-L-Protein ergeben, wie zum Beispiel eine natürlich vorkommende lösliche Form des Proteins. Variationen, die einer Proteolyse zuzuschreiben sind, schließen zum Beispiel Unterschiede in den N- oder C-Termini nach einer Expression in unterschiedlichen Wirtszelltypen auf Grund der proteolytischen Entfernung von einer oder mehreren terminalen Aminosäuren von dem Fas-L-Protein ein. Fas-L-Proteine mit Aminosäuresequenzen, die am N- oder C-Terminus um ein bis fünf Aminosäuren verkürzt sind, sind durch die vorliegende Erfindung umfasst. Zusätzlich kann eine proteolytische Spaltung eine lösliche Form von Fas-L aus einer membrangebundenen Form des Proteins freisetzen.

[0032] Auf Grund der Degeneriertheit des genetischen Codes können sich zwei DNA-Sequenzen unterscheiden, aber die gleiche Aminosäuresequenz kodieren. Die vorliegende Erfindung stellt somit isolierte DNA-Sequenzen bereit, die biologisch aktives Fas-L kodieren, ausgewählt aus DNA, welche die kodierende Region einer cDNA für natives menschliches oder Maus-Fas-L oder Fragmente davon umfasst, und DNA, die als Ergebnis des genetischen Codes in Bezug auf die native Fas-L-DNA-Sequenz degeneriert ist. Eine Ausführungsform der vorliegenden Erfindung stellt DNA bereit, welche die kodierende Region der Nucleotidsequenz von SEQ ID NO: 1 umfasst, sowie DNA-Sequenzen, die in Bezug darauf degeneriert sind.

[0033] Varianten, welche die erforderliche Fähigkeit besitzen, Fas zu binden, können durch jeden geeigneten Assay identifiziert werden. Die biologische Aktivität von Fas-L kann zum Beispiel durch Kompetition um die Bindung an die Ligandenbindungsdomäne von Fas (d. h. kompetitive Bindungsassays) bestimmt werden.

Assays

[0034] Eine Art von kompetitivem Bindungsassay für ein Fas-L-Polypeptid verwendet ein radioaktiv markiertes, lösliches menschliches Fas-L und intakte Zellen, die Zelloberflächen-Fas exprimieren. Anstelle von intakten Zellen könnte man lösliches Fas substituieren (wie zum Beispiel ein Fas/Fc-Fusionsprotein), das durch eine Wechselwirkung von Protein A oder Protein G mit der Fc-Region des Fusionsproteins an eine feste Phase gebunden ist. Eine andere Art von kompetitivem Bindungsassay benutzt radioaktiv markiertes lösliches Fas, wie zum Beispiel ein Fas/Fc-Fusionsprotein, und intakte Zellen, die Fas-L exprimieren. Alternativ dazu könnte lösliches Fas-L an eine feste Phase gebunden sein.

[0035] Kompetitive Bindungsassays können unter Verwendung von Standardmethodik durchgeführt werden. Qualitative Ergebnisse können durch kompetitive Bindungsassays mit Autoradiographieplatten erhalten werden oder Scatchard-Plots können benutzt werden, um quantitative Ergebnisse zu erzeugen.

[0036] Kompetitive Bindungsassays mit intakten Zellen, die Fas exprimieren, können mit zwei Verfahren durchgeführt werden. In einem ersten Verfahren lässt man Zellen, die endogenes Zelloberflächen-Fas exprimieren, entweder in Suspension oder durch Anheftung an Gewebekulturplatten wachsen. Anhaftende Zellen können durch Behandlung mit einer zehn Minuten langen 5 mM EDTA-Behandlung bei 37°C entfernt werden. In einem zweiten Verfahren können transfizierte Zellen, die membrangebundenes rekombinantes Fas exprimieren, verwendet werden. COS-Zellen oder eine andere Säugerzelle können mit cDNA für menschliches Fas in einem geeigneten Vektor transfiziert werden, um Fas voller Länge mit einer extrazellulären Region zu exprimieren.

[0037] Alternativ dazu kann lösliches Fas an eine feste Phase, wie zum Beispiel eine Säulenchromatographiematrix oder ein ähnliches Substrat, gebunden werden. Die Bindung an eine feste Phase kann zum Beispiel erreicht werden, indem man ein Fas/Fc-Fusionsprotein herstellt und es an eine Protein A oder Protein G enthaltende Matrix bindet.

[0038] Ein anderes Mittel zum Messen der biologischen Aktivität von Fas-L (einschließlich Varianten) ist, konjugiertes, lösliches Fas (zum Beispiel ^{125}I-Fas/Fc) in Kompetitionsassays zu benutzen, die den vorstehend beschriebenen ähnlich sind. In diesem Fall werden jedoch intakte Zellen, die Fas-L exprimieren, oder lösliches, an ein festes Substrat gebundenes Fas-L verwendet, um die Kompetition um eine Bindung von konjugiertem, löslichem Fas an Fas-L durch ein Probe zu messen, die eine mutmaßliche Fas-L-Variante enthält.

Oligomere

[0039] Die vorliegende Erfindung umfasst Fas-L-Polypeptide in Form von Oligomeren, wie zum Beispiel Dimeren oder Trimeren. Oligomere können durch Disulfidbindungen zwischen Cysteinresten auf unterschiedlichen Fas-L-Polypeptiden gebildet werden. In einer Ausführungsform der Erfindung wird ein Fas-L-Dimer erzeugt, indem Fas-L an die Fc-Region eines Antikörpers (IgG1) fusioniert wird. Der Begriff „Fc-Polypeptid" schließt native und Mutein-Formen sowie verkürzte Fc-Polypeptide, welche die Scharnier-Region enthalten, die eine Dimerisierung fördert, ein. Das Fc-Polypeptid wird vorzugsweise an ein lösliches Fas-L (das nur die extrazelluläre Domäne umfasst) fusioniert. Die Herstellung von Fusionsproteinen, die heterologe Polypeptide umfassen, die an verschiedene Teilstücke antikörperabgeleiteter Polypeptide (einschließlich der Fc-Domäne) fusioniert sind, ist z. B. von Ashkenazi et al. (PNAS USA 88: 10535, 1991) und Byrn et al. (Nature 344: 667, 1990) beschrieben worden, die hiermit durch Referenz aufgenommen sind.

[0040] Eine Genfusion, die das Fas-L/Fc-Fusionsprotein kodiert, wird in einen geeigneten Expressionsvektor eingefügt. Man lässt die Fas-L/Fc-Fusionsproteine weitgehend wie Antikörpermoleküle zusammengehen, worauf sich Interketten-Disulfidbindungen zwischen Fc-Polypeptiden bilden, was ein zweiwertiges Fas-L ergibt. In anderen Ausführungsformen kann Fas-L für das variable Teilstück einer schweren oder leichten Kette eines Antikörpers substituiert werden. Falls Fusionsproteine sowohl mit der schweren als auch der leichten Kette eines Antikörpers gemacht werden, ist es möglich, ein Fas-L-Oligomer mit bis zu vier extrazellulären Fas-L-Regionen zu bilden. Alternativ dazu kann man zwei lösliche Fas-L-Polypeptide mit einem Peptidlinker, wie zum Beispiel denjenigen, die im Patent 5,073,627 der Vereinigten Staaten beschrieben sind (das hiermit durch Bezugnahme aufgenommen ist), verknüpfen.

[0041] Die vorliegende Erfindung stellt Oligomere von extrazellulären Domänen von Fas-L oder Fragmenten davon bereit, die durch Disulfidwechselwirkungen verknüpft sind oder als Fusionspolymere mit oder ohne Spacer-Aminosäure-Verknüpfungsgruppen exprimiert werden. Zum Beispiel kann ein Dimer eines Fas-L-Mo-

leküls durch eine Verknüpfungsgruppe mit einer IgG Fc-Region verknüpft sein.

Expressionssysteme

[0042] Die vorliegende Erfindung stellt rekombinante Expressionsvektoren zur Expression von Fas-L und Wirtszellen, die mit den Expressionsvektoren transformiert sind, bereit. Jedes geeignete Expressionssystem kann eingesetzt werden. Die Vektoren schließen eine DNA ein, die ein Fas-L-Polypeptid einschließt, funktionell verbunden mit geeigneten transkriptionellen oder translationalen regulatorischen Nucleotidsequenzen, wie zum Beispiel solchen, die von einem Säuger-, mikrobiellen, viralen oder Insektengen abgeleitet sind. Beispiele für regulatorische Sequenzen schließen transkriptionelle Promotoren, Operatoren oder Enhancer, eine ribosomale mRNA-Bindungsstelle und geeignete Sequenzen ein, welche die Initiation und Termination von Transkription und Translation kontrollieren. Nucleotidsequenzen sind funktionell verbunden, wenn die regulatorische Sequenz funktionell mit der Fas-L-DNA-Sequenz in Beziehung steht. Somit ist eine Promotor-Nucleotidsequenz mit einer Fas-L-DNA-Sequenz funktionell verbunden, wenn die Promotor-Nucleotidsequenz die Transkription der Fas-L-DNA-Sequenz kontrolliert. Die Fähigkeit, in den gewünschten Wirtszellen zu replizieren, die normalerweise durch einen Replikationsursprung verliehen wird, und ein Selektionsgen, durch das Transformanten identifiziert werden, kann zusätzlich in den Expressionsvektor eingegliedert werden.

[0043] Zusätzlich können Sequenzen, die geeignete Signalpeptide kodieren, die nicht von dem Fas-L-Gen abstammen, in Expressionsvektoren eingebaut werden. Zum Beispiel kann eine DNA-Sequenz für ein Signalpeptid (ein sekretorischer Leader) im gleichen Leserahmen an die Fas-L-Sequenz fusioniert werden, so dass das Fas-L anfänglich als Fusionsprotein translatiert wird, welches das Signalpeptid umfasst. Ein Signalpeptid, das in den beabsichtigten Wirtszellen funktionell ist, erhöht die extrazelluläre Sekretion des Fas-L-Polypeptids. Das Signalpeptid wird bei der Sekretion des Fas-L aus der Zelle von dem Fas-L-Polypeptid abgespalten.

[0044] Geeignete Wirtszellen zur Expression von Fas-L-Polypeptiden schließen Prokaryoten, Hefe oder höhere eukaryotische Zellen ein. Geeignete Klonierungs- und Expressionsvektoren zur Verwendung mit Bakterien-, Pilz-, Hefe- und Säugerzellwirten werden zum Beispiel in Pouwels et al. Cloning Vectors: A Laborstory Manual, Elsevier, New York (1985), beschrieben. Zellfreie Translationssysteme könnten auch eingesetzt werden, um Fas-L-Polypeptide unter Verwendung von RNAs herzustellen, die von hierin offenbarten DNA-Konstrukten abgeleitet sind.

[0045] Prokaryoten schließen gramnegative oder grampositive Organismen, zum Beispiel E. coli oder Bacilli, ein. Geeignete prokaryotische Wirtszellen zur Transformation schließen zum Beispiel E. coli, Bacillus subtilis, Salmonella typhimurium und verschiedene andere Spezies innerhalb der Genera Pseudomonas, Streptomyces und Staphylococcus ein. In einer prokaryotischen Wirtszelle, wie zum Beispiel E. coli, kann ein Fas-L-Polypeptid einen N-terminalen Methioninrest enthalten, um die Expression des rekombinanten Polypeptids in der prokaryotischen Wirtszelle zu erleichtern. Das N-terminale Met kann von dem exprimierten rekombinanten Fas-L-Polypeptid abgespalten werden.

[0046] Expressionsvektoren zur Verwendung in prokaryotischen Wirtszellen umfassen im Allgemeinen ein oder mehrere phänotypisch selektierbare Markergene. Bei einem phänotypisch selektierbaren Markergen handelt es sich zum Beispiel um ein Gen, das ein Protein kodiert, welches eine Antibiotikaresistenz verleiht oder welches einen autotrophen Bedarf deckt. Beispiele für nützliche Expressionsvektoren für prokaryotische Wirtszellen schließen diejenigen ein, die aus im Handel erhältlichen Plasmiden, wie zum Beispiel dem Klonierungsvektor pBR322 (ATCC 37017) abgeleitet sind. pBR322 enthält Gene für Ampicillin- und Tetracyclinresistenz und stellt somit einfache Mittel zum Identifizieren transformierter Zellen bereit. Ein geeigneter Promotor und eine Fas-L-DNA-Sequenz werden in den Vektor pBR322 eingefügt. Andere im Handel erhältliche Vektoren schließen zum Beispiel pKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden) und pGEM1 (Promega Biotec, Madison, WI, USA) ein.

[0047] Promotorsequenzen, die für rekombinante, prokaryotische Wirtszell-Expressionsvektoren häufig verwendet werden, schließen β-Lactamase (Penicillinase), das Lactose-Promotorsystem (Chang et al., Nature 275: 615, 1978, und Goeddel et al., Nature 281: 544, 1979), das Tryptophan(trp)-Promotorsystem (Goeddel et al., Nucl. Acids Res. 8: 4057, 1980; und EP-A-36776) und den tac-Promotor (Maniatis, Molecular Cloning: A Laborstory Manual, Cold Spring Harbor Laborstory, S. 412, 1982) ein. Ein besonders nützliches prokaryotisches Wirtszell-Expressionssystem setzt einen Promotor des Phagen λ P_L und eine thermolabile Repressorsequenz cl875ts ein. Von der American Type Culture Collection erhältliche Plasmidvektoren, die Derivate des λ P_L-Promotors einschließen, schließen das Plasmid pHUB2 (das im E. coli-Stamm JMB9 (ATCC 37092) vorliegt) und pPLc28 (das im E. coli-Stamrn RR1 (ATCC 53082) vorliegt) ein.

[0048] Fas-L kann alternativ dazu in Hefe-Wirtszellen exprimiert werden, vorzugsweise vom Genus Saccharomyces (z. B. S. cerevisiae). Andere Hefegenera, wie zum Beispiel Pichia oder Kluyveromyces, können auch eingesetzt werden. Hefevektoren enthalten oft eine Replikationsursprungssequenz aus einem 2µ Hefeplasmid, eine autonom replizierende Sequenz (ARS), eine Promotorregion, Sequenzen zur Polyadenylierung, Sequenzen zur Transkriptionstermination und ein selektierbares Markergen. Geeignete Promotorsequenzen für Hefevektoren schließen unter anderem Promotoren für Metallothionein, 3-Phosphoglyceratkinase (Hitzeman et al., J. Biol. Chem. 255: 2073, 1980) oder andere glykolytische Enzyme (Ness et al., J. Adv. Enzyme Reg. 7: 149, 1968, und Holland et al., Biochem. 17: 4900, 1978), wie zum Beispiel Enolase, Glyceraldehyd-3-phosphatdehydrogenase, Hexokinase, Pyruvatdecarboxylase, Phosphofructokinase, Glucose-6-phosphatisomerase, 3-Phosphoglyceratmutase, Pyruvatkinase, Triosephosphatisomerase, Phosphoglucoseisomerase und Glucokinase, ein. Andere geeignete Vektoren und Promotoren zur Verwendung bei der Hefeexpression werden in Hitzeman, EPA-73.657, weiter beschrieben. Eine andere Alternative ist der von Russell et al. (J. Biol. Chem. 258: 2674, 1982) und Beier et al. (Nature 300: 724, 1982) beschriebene Glucose-reprimierbare ADH2-Promotor. Shuttle-Vektoren, die sowohl in Hefe als auch E. coli replizierbar sind, können durch Einfügen von DNA-Sequenzen aus pBR322 zur Selektion und Replikation in E. coli (dem Amp^r-Gen und einem Replikationsursprung) in die vorstehend beschriebenen Hefevektoren konstruiert werden.

[0049] Die Leadersequenz des α-Faktors von Hefe kann eingesetzt werden, um die Sekretion des Fas-L-Polypeptids zu steuern. Die Leadersequenz des α-Faktors wird oft zwischen die Promotorsequenz und die Sequenz des Strukturgens eingefügt. Siehe z. B. Kurjan et al., Cell 30: 933, 1982, und Bitter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 5330, 1984. Andere Leadersequenzen, die zum Erleichtern der Sekretion rekombinanter Polypeptide aus Hefewirten geeignet sind, sind Fachleuten bekannt. Eine Leadersequenz kann in der Nähe ihres 3'-Endes modifiziert werden, um eine oder mehrere Restriktionsstellen zu enthalten. Dies erleichtert eine Fusion der Leadersequenz an das Strukturgen.

[0050] Hefetransformationsprotokolle sind Fachleuten bekannt. Ein derartiges Protokoll wird von Hinnen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 1929, 1978, beschrieben. Das Protokoll von Hinnen et al. selektiert auf Trp^+-Transformanten in einem selektiven Medium, wobei das selektive Medium aus 0,67% Hefe-Stickstoffbase, 0,5% Casaminosäuren, 2% Glucose, 10 µg/ml Adenin und 20 µg/ml Uracil besteht.

[0051] Hefe-Wirtszellen, die mit Vektoren transformiert sind, die eine ADH2 Promotorsequenz enthalten, kann man zum Induzieren der Expression in einem „reichen" Medium wachsen lassen. Ein Beispiel für ein reiches Medium ist eines, das aus 1% Hefeextrakt, 2% Pepton und 1% Glucose besteht, ergänzt mit 80 µg/ml Adenin und 80 µg/ml Uracil. Eine Derepression des ADH2 Promotors findet statt, wenn die Glucose aus dem Medium verbraucht ist.

[0052] Säuger- oder Insektenwirtszellkultursysteme könnten auch eingesetzt werden, um rekombinante Fas-L-Polypeptide zu exprimieren. Eine Übersicht über Baculovirus-Systeme zur Produktion heterologer Proteine in Insektenzellen wird von Luckow und Summers, Bio/Technology 6: 47 (1988), gegeben. Etablierte Zelllinien aus Säugerursprung können auch eingesetzt werden. Beispiele für geeignete Säugerwirtszelllinien schließen die COS-7 Affennierenzelllinie (ATCC CRL 1651) (Gluzman et al., Cell 23: 175, 1981), L-Zellen, C127-Zellen, 3T3-Zellen (ATCC CCL 163), Eierstockzellen des chinesischen Hamsters (CHO), HeLa-Zellen und BHK-Zelllinien (ATCC CRL 10) und die Zelllinie CVI/EBNA, die aus der Nierenzelllinie CVI der afrikanischen grünen Meerkatze (ATCC CCL 70) wie von McMahan et al. (EMBO J. 10: 2821, 1991) beschrieben abgeleitet wurde, ein.

[0053] Transkriptionelle und translationale Kontrollsequenzen für Expressionsvektoren für Säugerwirtszellen können aus viralen Genomen ausgeschnitten werden. Häufig verwendete Promotorsequenzen und Enhancersequenzen sind aus Polyomavirus, Adenovirus 2, Simian Virus 40 (SV40) und menschlichem Cytomegalovirus abgeleitet. DNA-Sequenzen, die aus dem viralen SV40-Genom abgeleitet sind, zum Beispiel der Ursprung, frühe und späte Promotor, Enhancer, Spleiß- und Polyadenylierungsstellen von SV40 können verwendet werden, um andere genetische Elemente zur Expression einer Strukturgensequenz in einer Säugerwirtszelle bereitzustellen. Virale frühe und späte Promotoren sind besonders nützlich, weil beide aus einem viralen Genom leicht als Fragment erhalten werden, das auch einen viralen Replikationsursprung enthalten kann (Fiers et al., Nature 273: 113, 1978). Kleinere oder größere SV40-Fragmente können auch verwendet werden, vorausgesetzt, die ungefähr 250 bp lange Sequenz, die sich von der Hind III Stelle bis zu der Bgl I Stelle erstreckt, die im viralen Replikationsursprung von SV40 liegt, ist eingeschlossen.

[0054] Beispielhafte Expressionsvektoren zur Verwendung in Säugerwirtszellen können wie von Okayama und Berg (Mol. Cell. Biol. 3: 280, 1983) offenbart konstruiert werden. Ein nützliches System zur stabilen Ex-

pression von Säuger-cDNAs auf hohem Niveau in C127 Maus-Milchdrüsenepithelzellen können im Wesentlichen wie von Cosman et al. (Mol. Immunol. 23: 935, 1986) beschrieben konstruiert werden. Ein nützlicher Vektor zur hohen Expression, PMLSV N1/N4, der von Cosman et al., Nature 312: 768, 1984, beschrieben wurde, ist als ATCC 39890 hinterlegt worden. Zusätzliche nützliche Säugerexpressionsvektoren werden in EP-A-0367566 und in der PCT-Anmeldung WO 91/18982 beschrieben, die hierin durch Bezugnahme aufgenommen sind. Die Vektoren können von Retroviren abgeleitet sein. Zur Expression von Fas-L, einem Protein des Typs II, dem eine native Signalsequenz fehlt, kann eine heterologe Signalsequenz zugefügt werden, wie zum Beispiel die im Patent 4.965.195 der Vereinigten Staaten beschriebene Signalsequenz für Interleukin-7 (IL-7), die in Cosman et al., Nature 312: 768 (1984) beschriebene Signalsequenz für den Interleukin-2-Rezeptor, das in EP 367.566 beschriebene Signalpepetid des Interleukin-4-Rezeptors; das im US-Patent 4.968.607 beschriebene Signalpeptid des Typ I Interleukin-1-Rezeptors und das in EP 460.846 beschriebene Signalpeptid des Typ II Interleukin-1-Rezeptors.

Gereinigtes Fas-L-Protein

[0055] Die vorliegende Erfindung stellt gereinigte menschliche und Maus-Fas-L-Proteine bereit, die durch rekombinante Expressionssysteme wie vorstehend beschrieben produziert werden können oder aus natürlich vorkommenden Zellen gereinigt werden können. Der gewünschte Reinheitsgrad hängt von der beabsichtigten Verwendung des Proteins ab. Ein relativ hoher Reinheitsgrad wird gewünscht, wenn das Protein zum Beispiel in vivo verabreicht werden soll. Zweckmäßigerweise werden Fas-L-Polypeptide so gereinigt, dass keine Proteinbanden, die anderen Proteinen entsprechen, bei einer Analyse durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nachweisbar sind. Ein Fachmann auf dem einschlägigen Gebiet wird erkennen, dass auf Grund von differentieller Glycosylierung, differentieller posttranslationaler Prozessierung und dergleichen, wie vorstehend diskutiert, mehrere Banden, die einem Fas-L-Protein entsprechen, durch SDS-PAGE sichtbar gemacht werden können. Eine Herstellung von Fas-L-Protein wird als gereinigt betrachtet, sofern keine Banden, die anderen Proteinen (nicht Fas-L) entsprechen, sichtbar gemacht werden. Am meisten bevorzugt wird das Fas-L im Wesentlichen bis zur Homogenität gereinigt, wie durch eine einzelne Proteinbande bei einer Analyse durch SDS-PAGE angezeigt wird. Die Proteinbande kann durch Silberfärbung oder (falls das Protein radioaktiv markiert ist) durch Autoradiographie sichtbar gemacht werden.

[0056] In einer Ausführungsform handelt es sich bei dem Fas-L-Protein um ein menschliches Protein, das durch die N-terminale Aminosäuresequenz MQQPFNYPYPQI (die Aminosäuren 1–12 der SEQ ID NO: 2) gekennzeichnet ist. Ein derartiges Protein wird durch eine DNA kodiert, die durch die 5'-terminale Sequenz ATGCAGCAGCCCTTCAATTACCCATATCCCCAGATC (Nucleotide 93–128 der SEQ ID NO: 1) gekennzeichnet ist.

[0057] Ein Verfahren zum Herstellen des Fas-L-Proteins umfasst das Züchten einer Wirtszelle, die mit einem Expressionsvektor transformiert ist, der eine DNA-Sequenz umfasst, die Fas-L kodiert, unter solchen Bedingungen, dass Fas-L exprimiert wird. Das Fas-L-Protein wird dann aus Kulturmedium oder Zellextrakten gewonnen, je nach dem eingesetzten Expressionssystem. Wie der Fachmann erkennen wird, variieren Verfahren zur Reinigung des rekombinanten Fas-L gemäß solcher Faktoren wie der Art der eingesetzten Wirtszellen und ob das Fas-L in das Kulturmedium sezerniert wird oder nicht.

[0058] Zum Beispiel kann das Kulturmedium, wenn Expressionsysteme eingesetzt werden, die das rekombinante Protein sezernieren, zuerst unter Verwendung eines im Handel erhältlichen Proteinkonzentrationsfilters, zum Beispiel einer Amicon oder Millipore Pellicon Ultrafiltrationseinheit, konzentriert werden. Nach dem Konzentrationsschritt kann das Konzentrat auf eine Reiningungsmatrix, wie zum Beispiel ein Gelfiltrationsmedium, aufgetragen werden. Alternativ dazu kann ein Anionenaustauscherharz eingesetzt werden, zum Beispiel eine Matrix oder ein Substrat mit anhängenden Diethylaminoethyl(DEAE)-Gruppen. Bei den Matrizen kann es sich um Acrylamid, Agarose, Dextran, Cellulose oder andere Arten handeln, die häufig bei der Proteinreinigung eingesetzt werden. Alternativ dazu kann ein Kationenaustauschschritt eingesetzt werden. Geeignete Kationenaustauscher schließen verschiedene unlösliche Matrizen ein, die Sulfopropyl- oder Carboxymethylgruppen umfassen. Sulfopropylgruppen werden bevorzugt. Schließlich können ein oder mehrere Schritte mit Umkehrphasen-Hochleistungs-Flüssigchromatographie (RP-HPLC), die hydrophope RP-HPLC-Medien einsetzen (z. B. Silikagel mit anhängenden Methyl- oder anderen aliphatischen Gruppen), eingesetzt werden, um Fas-L weiter zu reinigen. Manche oder alle vorangegangenen Reinigungsschritte können in verschiedenen Kombinationen eingesetzt werden, um ein im Wesentlichen homogenes rekombinantes Protein bereitzustellen.

[0059] Es ist auch möglich, eine Affinitätssäule zu benutzen, welche die ligandenbindende Domäne von Fas umfasst, um exprimierte Fas-L-Polypeptide affinitätszureinigen. Fas-L-Polypeptide können in einem Elutions-

puffer mit hohem Salz von einer Affinitätssäule entfernt und dann zur Verwendung in einen Puffer mit niedrigerem Salz dialysiert werden. Alternativ dazu kann die Affinitätssäule einen Antikörper umfassen, der Fas-L bindet. Beispiel 3 beschreibt ein Verfahren zum Einsetzen des erfindungsgemäßen Fas-L-Proteins, um gegen Fas-L gerichtete monoklonale Antikörper zu erzeugen.

[0060] In einer Bakterienkultur hergestelltes rekombinantes Protein kann durch anfängliches Aufbrechen der Wirtszellen, Zentrifugation, Extraktion aus Zellpellets, falls es sich um ein unlösliches Polypeptid handelt, oder aus der überstehenden Flüssigkeit, falls es sich um ein lösliches Polypeptid handelt, gefolgt von einem oder mehreren Konzentrations-, Aussalz-, Ionenaustausch-, Affinitätsreinigungs- oder Größenausschlusschromatographie-Schritten isoliert werden. Schließlich kann RP-HPLC für Endreinigungsschritte eingesetzt werden. Mikrobielle Zellen können mit jedem günstigen Verfahren, einschließlich Einfrier-Auftau-Zyklen, Sonifizierung, mechanischem Aufbrechen oder der Verwendung von Mitteln, die Zellen lysieren, aufgebrochen werden.

[0061] Transformierte Hefe-Wirtszellen werden vorzugsweise eingesetzt, um Fas-L als sezerniertes Polypeptid zu exprimieren. Dies vereinfacht die Reinigung. Ein sezerniertes rekombinantes Polypeptid aus einer Hefe-Wirtszell-Fermentation kann durch Verfahren gereinigt werden, die denjenigen analog sind, die von Urdal et al. (J. Chromatog. 296: 171, 1984) offenbart wurden. Urdal et al. beschreiben zwei aufeinanderfolgende Schritte mit Umkehrphasen-HPLC zur Reinigung von rekombinantem menschlichem IL-2 auf einer präparativen HPLC-Säule.

Antikörper

[0062] Antikörper, die mit den hierin offenbarten Fas-L-Polypeptiden eine Immunreaktion eingehen können, werden bereitgestellt. Polyklonale und monoklonale Antikörper können mit herkömmlichen Techniken hergestellt werden. Siehe zum Beispiel Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses, Kennet et al. (Hrsg.), Plenum Press, New York (1980), und Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow und Land (Hrsg.), Cold Spring Harbor Laborstory Press, Cold Spring Harbor, NY (1988). Die Herstellung monoklonaler Antikörper, die mit Fas-L eine Immunreaktion eingehen können, wird im nachstehenden Beispiel 3 weiter veranschaulicht.

[0063] Die erfindungsgemäßen Fas-L-Proteine oder antigenen Fragmente davon können als Immunogene eingesetzt werden, um polyklonale oder monoklonale Antikörper, die für die Fas-L-Immunogene spezifisch sind, zu erzeugen. In einer Ausführungsform ist das Immunogen ein lösliches Fas-L-Polypeptid. Zellen, die rekombinantes Fas-L auf der Zelloberfläche exprimieren, können auch als Immunogene eingesetzt werden. Als weitere Alternative ist das Immunogen ein Fusionsprotein, das ein Fas-L-Polypeptid umfasst (z. B. ein Fusionsprotein, das die extrazelluläre Domäne von Fas-L und ein Polypeptid der Fc-Region eines Antikörpers umfasst).

[0064] Antigen-bindende Fragmente derartiger Antikörper, die durch herkömmliche Techniken hergestellt werden können, werden auch durch die vorliegende Erfindung umfasst. Beispiele für derartige Fragmente schließen Fab-, F(ab')-, und $F(ab')_2$-Fragmente ein, sind aber nicht darauf beschränkt. Antikörperfragmente und -derivate, die durch gentechnische Verfahren hergestellt werden, werden auch bereitgestellt.

[0065] Die monoklonalen Antikörper der vorliegenden Erfindung schließen chimäre Antikörper, z. B. humanisierte Versionen von monoklonalen Maus-Antikörpern, ein. Derartige humanisierte Antikörper können durch bekannte Techniken hergestellt werden, und bieten den Vorteil einer reduzierten Immunogenität, wenn die Antikörper an Menschen verabreicht werden. In einer Ausführungsform umfasst ein humanisierter monoklonaler Antikörper die variable Region eines Maus-Antikörpers (oder nur die antigenbindende Stelle davon) und eine aus einem menschlichen Antikörper abgeleitete konstante Region. Alternativ dazu kann ein humanisiertes Antikörperfragment die antigenbindende Stelle eines monoklonalen Maus-Antikörpers und ein von einem menschlichen Antikörper abgeleitetes Fragment einer variablen Region (ohne die antigenbindende Stelle) umfassen. Verfahren zur Herstellung chimärer und weiter veränderter monoklonaler Antikörper schließen die in Riechmann et al. (Nature 332: 323, 1988), Liu et al. (PNAS 84: 3439, 1987), Larrick et al. (Bio/Technology 7: 934, 1989) und Winter und Harris (TIPS 14: 139, Mai 1993) beschriebenen ein.

[0066] Eine Ausführungsform der vorliegenden Erfindung richtet sich auf monoklonale Antikörper, welche die Bindung von Fas-L an das Zelloberflächen-Fas-Antigen blockieren. Monoklonale Antikörper können in herkömmlichen Assays auf ihre Fähigkeit, die Bindung von Fas-L an Zellen, die das Fas-Antigen tragen, zu blockieren, durchmustert werden.

[0067] Eigenschaften und Verwendungen von Fas-L und Antikörpern, die Fas-L binden Es ist berichtet worden, dass das Fas-Antigen Apoptose vermittelt, und man glaubt, dass es bei der klonalen Deletion von mit körpereigenem Material reagierenden T-Zellen eine Rolle spielt (Itoh et al., Cell 66: 233, 1991; Watanabe-Fukunage et al., Nature 356: 314, 1992). Mäuse, welche die lpr-Mutation tragen, produzieren kein funktionelles Fas-Protein, welches das apoptotische Signal transduzieren kann (Watanabe-Fukunage et al., Nature, vorstehend). Diese Mäuse entwickeln lymphoproliferative Störungen, die durch die Anhäufung von $CD4^-$-$CD8^-$-Thymozyten in Lymphknoten und der Milz, Hypergammaglobulinämie, Autoantikörperproduktion, rheumatoiden Faktor, Arthritis und Glomerulonephritis gekennzeichnet sind (Watanabe-Fukunage et al., Nature, vorstehend). Alderson et al. (J. Exp. Med., 178: 2231, 1993) berichten, dass das Fas-Protein zusätzlich zu einer Rolle bei der Induktion von Apoptose in bestimmten transformierten Zelllinien eine wichtige Rolle bei der Aktivierung und Proliferation normaler T-Zellen spielen kann.

[0068] Untersuchungen, welche das Fas-L und die anti-Fas-L-Antikörper der vorliegenden Erfindung einsetzen, können somit einen weiteren Einblick in die Entwicklung von Toleranz gegen körpereigenes Material durch das Immunsystem und die Ätiologie von Autoimmunerkrankungen bereitstellen. Die Wechselwirkung von Fas mit Fas-L und der Mechanismus der Signaltransduktion können untersucht werden. Die Antikörper können verwendet werden, um die Wechselwirkung von Fas mit Fas-L zu blockieren. Fas-L und Antikörper, die damit reagieren, können verwendet werden, um biologische Wirkungen zu fördern bzw. zu hemmen, die durch die Bindung von Fas-L an Fas vermittelt werden. Das Fas-L und die Antikörper können somit verwendet werden, um derartige biologische Wirkungen in vitro oder in vivo zu regulieren.

[0069] Die Fas-L-DNA und das Fas-L-Protein der vorliegenden Erfindung sind als Forschungswerkzeuge beim Erhellen der Ätiologie von Autoimmunstörungen nützlich. Derartige Störungen schließen systemischen Lupus erythematodes (SLE), immunoblastische Lymphadenopathie (IBL), angioimmunoblastische Lymphadenopathie (AIL), Lymphogranulomatose X (LgX), rheumatoide Arthritis, Diabetes, multiple Sklerose und Allergien ein, sind aber nicht darauf beschränkt. Die Verwendung von Fas-L bei der Behandlung der Transplantat-gegen-Wirt-Krankheit kann auch untersucht werden.

[0070] Fas-L kann eingesetzt werden, um in Zellen, die das Fas-Antigen tragen, Apoptose zu induzieren. Das Fas-L ist somit ein Forschungsreagens, das bei Untersuchungen der Mechanismen, durch die Apoptose stattfindet, nützlich ist.

[0071] Das erfindungsgemäße Fas-L kann beim Entwickeln von Behandlungen für Störungen verwendet werden, die (direkt oder indirekt) durch Fas-L vermittelt werden. Alternativ dazu kann eine therapeutisch wirksame Menge an gereinigtem Fas-L-Protein einem Patienten verabreicht werden, der an einer Störung leidet, die durch fehlerhaftes Fas-L oder unzureichende Mengen von Fas-L verursacht wird. Als weitere Alternative können die Fas-L-DNA-Sequenzen beim Entwickeln eines Gentherapie-Ansatzes zum Behandeln derartiger Störungen eingesetzt werden.

[0072] Die vorliegende Erfindung stellt pharmazeutische Zusammensetzungen bereit, die gereinigtes Fas-L und einen physiologisch verträglichen Träger, ein physiologisch verträgliches Verdünnungsmittel oder einen physiologisch verträglichen Exzipienten umfassen. Derartige Träger, Exzipienten und Verdünnungsmittel sind bei den eingesetzten Dosierungen und Konzentrationen nicht toxisch für die Empfänger. Derartige Zusammensetzungen können Puffer, Antioxidantien, wie zum Beispiel Ascorbinsäure, Polypeptide mit niedrigem Molekulargewicht (weniger als etwa 10 Reste), Proteine, Aminosäuren, Kohlenhydrate einschließlich Glucose, Saccharose oder Dextrine, Chelatbildner wie zum Beispiel EDTA, Glutathion und andere Stabilisatoren und Exzipienten, die häufig in pharmazeutischen Zusammensetzungen eingesetzt werden, umfassen. Neutrale, gepufferte Kochsalzlösung oder mit konspezifischem Serumalbumin gemischte Kochsalzlösung sind beispielhafte geeignete Verdünnungsmittel. Die Zusammensetzung kann unter Verwendung geeigneter Exzipientenlösungen (z. B. Saccharose) als Verdünnungsmitteln als Lyophilisat formuliert werden. Zusätzliche Beispiele für geeignete Träger und ihre Formulierungen werden in Remington's Pharmaceutical Sciences, 16. Ausgabe, 1980, Mack Publishing Company, beschrieben. Geeignete Dosierungen und die Häufigkeit der Verabreichung hängen natürlich von solchen Faktoren wie der Art und dem Schweregrad der Indikation, die behandelt wird, der gewünschten Reaktion, der Größe und dem Zustand des Patienten und so weiter ab.

[0073] Für eine therapeutische Verwendung sollen erfindungsgemäße gereinigte Proteine an einen Patienten, vorzugsweise einen Menschen, zur Behandlung auf eine Weise, die für die Indikation geeignet ist, verabreicht werden. Somit können die pharmazeutischen Zusammensetzungen zum Beispiel durch Bolusinjektion, kontinuierliche Infusion, verlängerte Freisetzung aus Implantaten oder eine andere geeignete Technik verabreicht werden.

[0074] Das in den pharmazeutischen Zusammensetzungen eingesetzte Fas-L-Protein ist vorzugsweise so gereinigt, dass das Fas-L-Protein im Wesentlichen frei von anderen Proteinen natürlichen oder endogenen Ursprungs ist, wobei es vorzugsweise weniger als etwa 1% der Masse an Proteinverunreinigungen enthält, die aus Herstellungsverfahren übrig sind. Derartige Zusammensetzungen können jedoch andere Proteine, die als Stabilisatoren, Träger, Exzipienten oder Kotherapeutika zugegeben werden, enthalten. Das Fas-L-Protein wird vorzugsweise im Wesentlichen zur Homogenität gereinigt, d. h. es ist als eine einzelne Proteinbande nachweisbar, wenn es durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese analysiert wird.

[0075] Die erfindungsgemäßen Fas-L-Polypeptide können auch in in-vitro-Assays zum Nachweis von Fas oder Fas-L oder deren Wechselwirkungen eingesetzt werden. Das erfindungsgemäße Fas-L kann in einem Bindungsassay verwendet werden, um Zellen nachzuweisen, die Fas exprimieren. Zum Beispiel kann Fas-L oder eine extrazelluläre Domäne oder ein Fragment davon an eine nachweisbare Einheit, wie zum Beispiel ^{125}I, konjugiert werden. Eine radioaktive Markierung mit ^{125}I kann durch eine von mehreren Standardmethodiken durchgeführt werden, die ein funktionelles ^{125}I-Fas-L-Molekül ergeben, das mit hoher spezifischer Aktivität markiert ist. Alternativ dazu kann eine andere nachweisbare Einheit, wie zum Beispiel ein Enzym, das eine kolorimetrische oder fluorimetrische Reaktion katalysieren kann, Biotin oder Avidin, verwendet werden. Zellen, die auf Fas-Expression getestet werden sollen, können mit markiertem Fas-L in Kontakt gebracht werden. Nach einer Inkubation wird ungebundenes markiertes Fas-L entfernt und Bindung wird unter Verwendung der nachweisbaren Einheit gemessen.

[0076] Die hierin offenbarten Fas-Ligandenproteine können auch eingesetzt werden, um die biologische Aktivität eines Fas-Proteins in Bezug auf die Bindungsaffinität für Fas-L zu messen. Um dies zu veranschaulichen kann Fas-L in einer Untersuchung der Bindungsaffinität eingesetzt werden, um die biologische Aktivität eines Fas-Proteins zu messen, das bei unterschiedlichen Temperaturen aufbewahrt worden oder in unterschiedlichen Zelltypen hergestellt worden ist. Die biologische Aktivität eines Fas-Proteins kann somit sichergestellt werden, bevor es zum Beispiel in einer Forschungsuntersuchung verwendet wird.

[0077] Fas-L-Proteine finden eine Verwendung als Reagenzien, die von denjenigen eingesetzt werden können, die „Qualitätssicherungs"-Untersuchungen ausführen, z. B. um die Halbwertszeit und Stabilität eines Fas-Proteins unter unterschiedlichen Bedingungen zu überwachen. Fas-Liganden können verwendet werden, um zu bestimmen, ob die biologische Aktivität nach der Modifikation eines Fas-Proteins (z. B. chemischer Modifikation, Verkürzung, Mutation usw.) beibehalten wird. Die Bindungsaffinität des modifizierten Fas-Proteins für ein Fas-L wird mit der eines nicht modifizierten Fas-Proteins verglichen, um jegliche nachteilige Auswirkung der Modifikation auf die biologische Aktivität von Fas nachzuweisen.

[0078] Eine andere Verwendung eines Fas-Liganden ist als Reagens bei Proteinreinigungsverfahren. Fas-L oder Fas-L/Fc-Fusionsproteine können mit herkömmlichen Techniken an einem festen Trägermaterial befestigt und verwendet werden, um Fas durch Affinitätschromatographie zu reinigen. Erfindungsgemäße Antikörper können zum Beispiel verwendet werden, um die Wirkungen des Hemmens der biologischen Aktivität von Fas-L zu untersuchen, um die Anwesenheit von Fas-L in vitro oder in vivo nachzuweisen, und bei einer Affinitätschromatographie zum Reinigen von Fas-L. Erfindungsgemäße Antikörper finden auch eine Verwendung, wenn eine Hemmung der Fas-L-vermittelten Apoptose von Fas-Antigen tragenden Zellen gewünscht wird. Antikörper (vorzugsweise monoklonale Antiköper), welche die Bindung von endogenem Fas-L an das Fas-Antigen auf den Zellen blockieren, werden für diesen Zweck eingesetzt. In einer Ausführungsform binden die Antikörper an Zelloberflächen-Fas-L und hemmen eine Bindung des Zelloberflächen-Fas-L an Fas-Antigen auf Zielzellen.

[0079] Eine Ausführungsform der Erfindung richtet sich auf Weisen zum Behandeln von Störungen, die durch die Wechselwirkung von Fas-L und Fas vermittelt werden, umfassend das Bereitstellen einer Zusammensetzung, die eine therapeutisch wirksame Menge eines Antikörpers umfasst, der die Bindung eines Fas-L an Fas hemmt, und ein geeignetes Verdünnungsmittel oder einen geeigneten Träger für die Verabreichung an einen Patienten, der an einer derartigen Erkrankung leidet. Bei dem Antikörper handelt es sich vorzugsweise um einen monoklonalen Antikörper. Erkrankungen, für die eine therapeutische Behandlung mit erfindungsgemäßen, für Fas-L spezifischen Antikörpern hilfreich sein können, schließen SLE, rheumatoride Arthritis, die Lyme-Krankheit, idiopathische $CD4^+$-T-Lymphozytopenie oder die Wirkungen einer Infektion mit menschlichem Immundefizienzvirus (HIV) ein, sind aber nicht darauf beschränkt.

[0080] Aktivierte menschliche T-Zellen werden nach Auslösen durch den CD3/T-Zell-Rezeptorkomplex dazu induziert, sich einem programmierten Zelltod (Apoptose) zu unterziehen, ein Vorgang, der aktivierungsinduzierter Zelltod (AICD) genannt wird. AICD ist in T-Zellen beobachtet worden, die aus HIV-infizierten, aber nicht aus nicht infizierten Individuen frisch isoliert wurden (Groux et al., J Exp. Med., 175: 331, 1992; Meyaard et al.,

Science, 257: 217, 1992). Somit kann Apoptose bei der Verarmung von $CD4^+$-T-Zellen und dem Fortschreiten von AIDS bei HIV-infizierten Individuen eine Rolle spielen.

[0081] Damit Fas-L bei der T-Zell-Verarmung in einer HIV-Infektion eine Rolle spielen kann, müssen zwei Kriterien erfüllt werden. Erstens muss Fas-L exprimiert werden und deshalb müssen T-Zellen aktiviert werden, indem sie Antigen augesetzt werden. Zweitens müssen T-Zellen „vorbereitet" werden, um für eine Fas-vermittelte Apoptose empfänglich zu werden. Bei HIV^+-Patienten kann eine derartige Vorbereitung von T-Zellen durch das Vernetzen von CD4 durch GP-120/anti-GP-120-Komplexe zustande kommen. Es ist gezeigt worden, dass derartige Komplexe normale $CD4^+$-T-Zellen dazu vorbereiten, sich in vitro einem AICD zu unterziehen, und dass sie verursachen, dass sich T-Zellen in Mäusen, die ein menschliches $CD4^-$-Transgen exprimieren, einer Apoptose unterziehen (Wang et al, Eur. J. Immunol., 24 : 1553, 1994). Zusätzlich unterziehen sich $CD4^+$-T-Zellen in Mäusen, die mit einem Antikörper gegen CD4 behandelt wurden, apoptotischem Zelltod, aber dieses Phänomen findet in Fas-defizienten LPR-Mäusen nicht statt (Wang et al., Eur. J. Immunol., 24: 1549, 1994). Der in aktivierten normalen menschlichen T-Zellen (wie zum Beispiel PL-1-Zellen) und in frisch isolierten T-Zellen aus HIV^+-Individuen beobachtete AICD ist qualitativ identisch. Eine therapeutische Intervention für HIV-infizierte Individuen mit einem Antikörper, der die Wechselwirkung von Fas-L mit Fas hemmt, kann somit möglich sein.

[0082] Für eine therapeutische Verwendung sollen erfindungsgemäße gereinigte Antikörper einem Patienten, wie zum Beispiel einem Menschen, zur Behandlung auf eine Weise verabreicht werden, die für die Indikation geeignet ist. Zusammensetzungen, die einen Antikörper, der Fas-L bindet, und ein geeignetes Verdünnungsmittel oder einen geeigneten Träger umfassen, werden hierin bereitgestellt. Verdünnungsmittel, Träger und andere Bestandteile geeigneter Zusammensetzungen sind wie vorstehend beschrieben. In einer Ausführungsform umfasst eine pharmazeutische Zusammensetzung eine therapeutisch wirksame Menge eines monoklonalen Antikörpers, der eine Bindung von Fas-L an Zelloberflächen-Fas-Antigen hemmt, und ein geeignetes Verdünnungsmittel oder einen geeigneten Träger.

Nucleinsäurefragmente

[0083] Die vorliegende Erfindung stellt ferner Fragmente der hierin vorgelegten Fas-L-Nucleotidsequenzen bereit. In einer Ausführungsform umfassen derartige Fragmente mindestens etwa 14 aufeinanderfolgende Nucleotide der menschlichen Fas-L-cDNA, die in Beispiel 1 isoliert (und als ATCC 69527 hinterlegt) wurde. Derartige Fragmente können mindestens 14 Nucleotide der kodierenden Region der DNA-Sequenz der SEQ ID NO: 1 umfassen. DNA- und RNA-Komplemente der Fragmente werden hierin bereitgestellt, zusammen mit sowohl einzelsträngigen als auch doppelsträngigen Formen der Fas-L-DNA.

[0084] Zu den Verwendungen derartiger Fas-L-Nucleinsäurefragmente gehört die Verwendung als Sonde. Als Beispiel kann eine Sonde, die der extrazellulären Domäne von Fas-L entspricht, eingesetzt werden. Die Sonden finden beim Nachweisen der Anwesenheit von Fas-L-Nucleinsäuren in in-vitro-Assays und in Verfahren, wie zum Beispiel Northern- und Southern-Blots, Verwendung. Zelltypen, die Fas-L exprimieren, können ebenfalls identifiziert werden. Derartige Verfahren sind wohlbekannt und der Fachmann kann je nach der jeweiligen beabsichtigten Anwendung eine Sonde geeigneter Länge wählen.

[0085] Andere nützliche Fragmente der Fas-L-Nucleinsäuren sind Antisense- oder Sense-Oligonucleotide, die eine einzelsträngige Nucleinsäuresequenz (entweder RNA oder DNA) umfassen, die an Zielsequenzen von Fas-L mRNA (Sense) oder Fas-L DNA (Antisense) binden kann. Antisense- oder Sense-Oligonucleotide gemäß der vorliegenden Erfindung umfassen ein Fragment der kodierenden Region der cDNA für Fas-L. Ein derartiges Fragment umfasst im Allgemeinen mindestens etwa 14 Nucleotide, vorzugsweise 14 bis etwa 30 Nucleotide. Die Fähigkeit, ein Antisense- oder Sense-Oligonucleotid zu erzeugen, beruhend auf einer cDNA-Sequenz für ein bestimmtes Protein, wird zum Beispiel in Stein und Cohen, Cancer Res. 48: 2659, 1988, und van der Krol et al., Bio-Techniques 6: 958, 1988, beschrieben.

[0086] Eine Bindung von Antisense- oder Sense-Oligonucleotiden an Nucleinsäure-Zielsequenzen führt zur Bildung von Duplexen, welche die Translation (RNA) oder Transkription (DNA) auf eine von mehreren Weisen blockieren, einschließlich erhöhtem Abbau der Duplexe, vorzeitiger Termination von Transkription oder Translation oder auf andere Weise. Die Antisense-Oligonucleotide können somit verwendet werden, um die Expression von Fas-L-Proteinen zu blockieren. Antisense- oder Sense-Oligonucleotide umfassen ferner Oligonucleotide mit modifizierten Zucker-Phosphodiester-Gerüsten (oder anderen Zuckerverknüpfungen, wie zum Beispiel den in WO 91/06629 beschriebenen), und wobei derartige Zuckerverknüpfungen gegen endogene Nucleasen resistent sind. Derartige Oligonucleotide mit resistenten Zuckerverknüpfungen sind in vivo stabil (d. h.

sie können einem enzymatischen Abbau widerstehen), behalten aber eine Sequenzspezifität bei, um an Nucleotid-Zielsequenzen zu binden. Andere Beispiele für Sense- oder Antisense-Oligonucleotide schließen diejenigen Oligonucleotide ein, die kovalent mit organischen Einheiten, wie zum Beispiel den in WO 90/10448 beschriebenen, und anderen Einheiten, welche die Affinität des Oligonucleotids für eine Nucleinsäure-Zielsequenz erhöhen, wie zum Beispiel poly-(L-Lysin), verknüpft sind. Darüberhinaus können interkalierende Mittel, wie zum Beispiel Ellipticin, und alkylierende Mittel oder Metallkomplexe an Sense- oder Antisense-Oligonucleotiden befestigt werden, um Bindungsspezifitäten der Antisense- oder Sense-Oligonucleotide für die Nucleotid-Zielsequenz zu modifizieren. Antisense- oder Sense-Oligonucleotide können durch jedes Genübertragungsverfahren, einschließlich zum Beispiel $CaPO_4$-vermittelter DNA-Transfektion, Elektroporation oder anderer Genübertragungsvektoren, wie zum Beispiel Epstein-Barr-Virus, in eine Zelle eingeführt werden, welche die Nucleinsäure-Zielsequenz enthält. Antisense- oder Sense-Oligonucleotide werden vorzugsweise durch Einfügen des Antisense- oder Sense-Oligonucleotids in einen geeigneten retroviralen Vektor, dann In-Kontakt-Bringen der Zelle entweder in vivo oder ex vivo mit dem Retrovirus-Vektor, der die eingefügte Sequenz enthält, in eine Zelle eingeführt, welche die Nucleinsäure-Zielsequenz enthält. Geeignete retrovirale Vektoren schließen das Maus-Retrovirus M-MuLV, N2 (ein aus M-MuLV abgeleitetes Retrovirus) oder die als DCT5A, DCT5B und DCT5C bezeichneten Doppelkopie-Vektoren (siehe die PCT-Anmeldung WO 90/13641) ein, sind aber nicht darauf beschränkt. Alternativ dazu können andere Promotorsequenzen verwendet werden, um das Oligonucleotid zu exprimieren.

[0087] Sense- oder Antisense-Oligonucleotide können auch durch Bildung eines Konjugats mit einem ligandenbindenden Molekül, wie in WO 91/04753 beschrieben, in eine Zelle eingeführt werden, welche die Nucleotid-Zielsequenz enthält. Geeignete ligandenbindende Moleküle schließen Zelloberflächenrezeptoren, Wachstumsfaktoren, andere Cytokine oder andere Liganden, die an Zelloberflächenrezeptoren binden, ein, sind aber nicht darauf beschränkt. Vorzugsweise stört die Konjugation des ligandenbindenden Moleküls die Fähigkeit des ligandenbindenden Moleküls, an das ihm entsprechende Molekül oder seinen Rezeptor zu binden oder den Eintritt des Sense- oder Antisense-Oligonucleotids oder dessen konjugierter Version in die Zelle zu blockieren, nicht.

[0088] Alternativ dazu kann ein Sense- oder ein Antisense-Oligonucleotid durch Bildung eines Oligonucleotid-Lipid-Komplexes, wie in WO 90/10448 beschrieben, in eine Zelle eingeführt werden, welche die Nucleinsäure-Zielsequenz enthält. Der Sense- oder Antisense-Oligonucleotid-Lipid-Komplex wird vorzugsweise innerhalb der Zelle durch eine endogene Lipase dissoziiert.

[0089] Die folgenden Beispiele werden bereitgestellt, um spezifische Ausführungsformen zu veranschaulichen, und nicht, um den Umfang der Erfindung zu beschränken.

BEISPIEL 1: Isolierung der Maus-Fas-L-DNA

[0090] Ein 180 bp großes Fragment der Maus-Fas-L-DNA wurde durch eine Polymerasekettenreaktion (PCR) folgendermaßen isoliert. Bei der Matrize in der PCR handelte es sich um cDNA, die aus RNA hergestellt wurde, die aus peripheren Maus-Blutlymphozyten (PBL) abgeleitet wurde, die 18 Stunden lang mit Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA, Sigma Chemical Co.) stimuliert worden waren. Bei den 5'- und 3'-Primern handelte es sich um Oligonucleotide, die auf der Fas-L DNA-Sequenz aus Ratten von Suda et al. (Cell, 75: 1169, 1993) beruhten. Die Primer definieren ein 180 bp großes Fragment in der Nähe des 3'-Endes der Fas-L DNA. Die PCR wurde mit herkömmlichen Verfahren ausgeführt. Siehe zum Beispiel Saiki et al., Science 239: 487 (1988); Recombinant DNA Methodology, Wu et al., Hrsg., Academic Press, Inc., San Diego (1989), S. 189–196, und PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Innis et al., Hrsg., Academic Press, Inc. (1990).

[0091] Das 180 bp große Fas-L DNA-Fragment von Mäusen, das durch PCR isoliert und amplifiziert wurde, umfasste die Nucleotide 643–822 der in SEQ ID NO: 4 vorgelegten Maus-Fas-L-DNA-Sequenz. Dieses DNA-Fragment wurde zur Verwendung als Sonde mit ^{32}P markiert. Ein Kit zur Markierung von DNA mit Random-Priming (Amersham, Arlington Heights, Illinois) wurde verwendet, um die Sonde radioaktiv zu markieren.

[0092] Eine Maus-Fas-L-DNA voller Länge wurde folgendermaßen isoliert. Eine als SC9 bezeichnete Maus-Hybridom-Zelllinie wurde durch Fusion der T-Zell-Hybridomzelllinie BW5147 mit der von Lynch, D., und R. Miller (J. Exp. Med. 179: 31, 1994) beschriebenen Linie ∝B10.5 CTL erzeugt. Die ∝B10.5 CTL Zellen wurden vor der Fusion mit PMA und Ionomycin stimuliert (in 500 ng/ml PMA und 3 µg/ml Ionomycin zwei Stunden lang bei 37°C gezüchtet). Die Hybridomzelllinie SC9 wurde auf Expression von Fas-L selektiert. Kurz gesagt wurden Zellen, die sich aus der Fusion ergaben, auf Expression von Fas-L analysiert, was einen Assays für Bindung an ein lösliches Fas/Fc-Fusionsprotein einschloss. SC9 wurde durch fluoreszenzaktivierte Zellsortierung

(FACS), beruhend auf einer Bindung der Zellen an Fas/Fc, isoliert.

[0093] Die SC9-Zellen wurden wie vorstehend mit PMA und Ionomycin stimuliert und RNA wurde aus ihnen extrahiert. cDNA wurde mit herkömmlichen Techniken aus der RNA hergestellt und in den Phagenvektor λgt10 eingefügt und verpackt (Gigapak® Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA). Die so erhaltene cDNA-Bank wurde unter Verwendung des vorstehend hergestellten 180 bp großen Maus-Fas-L-DNA-Fragmentes als Sonde durchmustert.

[0094] Ein positiver Klon wurde isoliert und die Nucleotidsequenz des cDNA-Inserts wurde bestimmt. Diese Maus-Fas-L-Nucleotidsequenz wird in der SEQ ID NO: 4 vorgelegt, und die dadurch kodierte Aminosäuresequenz wird in der SEQ ID NO: 5 vorgelegt. Das Protein umfasst eine zytoplasmatische Domäne (Aminosäuren 1–78), eine Transmembranregion (Aminosäuren 79–103) und eine extrazelluläre Domäne (Aminosäuren 104–279).

BEISPIEL 2: Isolierung von menschlicher Fas-L DNA

[0095] cDNA für menschliches Fas-L wurde aus einer cDNA-Bank isoliert, die aus stimulierten menschlichen peripheren Blutlymphozyten abgeleitet wurde. Das Verfahren war folgendermaßen.

[0096] Periphere Blutlymphozyten (PBL) wurden aus normalen menschlichen Freiwilligen erhalten und mit 10 ng/ml OKT3 (einem anti-CD3-Antikörper) und 10 ng/ml menschlichem IL-2 sechs Tage lang behandelt. Die PBL-Zellen wurden gewaschen und mit 500 ng/ml Ionomycin (Calbiochem) und 10 ng/ml PMA vier Stunden lang stimuliert. Messenger-RNA wurde aus den stimulierten PBL-Zellen isoliert. An der mRNA-Matrize synthetisierte cDNA wurde gemäß den Anleitungen des Herstellers in λgt10 Phagenvektoren (Gigapak® Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA) verpackt. Rekombinante Phagen wurden dann auf dem E. coli-Stamm KW251 ausplattiert und unter Verwendung von Standard-Plaque-Hybridisierungstechniken durchmustert.

[0097] Die ^{32}P-markierte, in Beispiel 1 hergestellte 180 bp große Maus-Fas-L-Sonde wurde über Nacht bei 37°C mit den rekombinanten DNA-Phagen hybridisiert. Der Hybridisierung folgte zweimaliges Waschen mit 6 × SSC bei Raumtemperatur, dann zweimaliges Waschen mit 2 × SSC/0,1% SDS bei 55°C. Positive (hybridisierende) Plaques wurden durch Autoradiographie sichtbar gemacht.

[0098] Zwei der positiven Plaques wurden gereinigt und die Inserts wurden durch PCR amplifiziert. Oligonucleotide, welche die Klonierungsstelle (die EcoRI-Stelle von λgt10, in welche die cDNA eingefügt worden war) flankieren, wurden als Primer für die PCR eingesetzt. Die cDNA-Inserts der rekombinanten Phagen von beiden positiven Plaques waren etwa 2,0 kb lang. Die PCR-Produkte von einem Klon wurden mit EcoRI verdaut und das gewünschte Fragent (welches das cDNA-Insert enthielt) wurde in einen EcoRI-verdauten Klonierungsvektor pBLUESCRIPT®SK (Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA) ligiert. Zellen des E. coli-Stammes DH5α, die den so erhaltenen rekombinanten Vektor (als menschliches Fas-L/pBS bezeichnet) enthielten, wurden am 5. Januar 1994 bei der American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA, hinterlegt und ihnen wurde die Hinterlegungsnr. ATCC 69527 zugewiesen. Die Hinterlegung wurde gemäß den Bedingungen des Budapester Vertrages durchgeführt.

[0099] Die DNA-Sequenz dieser menschlichen Fas-L DNA wird in der SEQ ID NO: 1 vorgelegt. Die durch die isolierte DNA kodierte Aminosäuresequenz wird in der SEQ ID NO: 2 vorgelegt. Dieses menschliche Fas-L Protein umfasst eine N-terminale zytoplasmatische Domäne (Aminosäuren 1–80), eine Transmembranregion (Aminosäuren 81–105) und eine extrazelluläre Domäne (Aminosäuren 106–281). Wie dem Fachmann selbstverständlich ist, wird die Transmembranregion in Übereinstimmung mit herkömmlichen Kriterien zum Identifizieren dieser Art von hydrophober Domäne identifiziert. Die genauen Grenzen der Transmembranregion können geringfügig von den vorstehend vorgelegten abweichen (am wahrscheinlichsten um nicht mehr als fünf Aminosäuren an jedem Ende). Computerprogramme, die zur Identifizierung derartiger hydrophober Regionen in Proteinen nützlich sind, stehen zur Verfügung.

[0100] Die DNA-Sequenz der kodierenden Region für menschliches Fas-L (Nucleotide 93–938 der SEQ ID NO: 1) ist zu 82,89% mit der in Suda et al. (Cell, 75: 1169, 1993) vorgelegten DNA-Sequenz der kodierenden Region des Ratten-Fas-L identisch. Die Aminosäuresequenz für menschliches Fas-L der SEQ ID NO: 2 ist zu 77,98% mit der des Ratten-Fas-L identisch. Das Ausmaß der Homologie zwischen menschlichem und Ratten-Fas-L war vor der Isolierung der hierin offenbarten cDNA für menschliches Fas-L weder bekannt noch vorhersagbar.

[0101] Die cDNA für menschliches Fas-L wurde durch Verdau mit SalI und NotI aus pBLUESCRIPT®SK ausgeschnitten. Das gewünschte Fragment wurde isoliert und in einen Säugerexpressionsvektor, pDC409, ligiert, der mit SalI und NotI verdaut worden war.

[0102] pDC409 ist von einem Expressionsvektor abgeleitet, der als pDC406 bezeichnet wird, und unterscheidet sich von pDC406 darin, dass eine BglII-Stelle außerhalb der MCS deletiert worden ist, so dass die BglII-Stelle der MCS nur einmal vorkommt. Zwei PmeI-Stellen und eine SrfI-Stelle sind zu der MCS hinzugefügt worden, und drei Stopp-Codons (TAG) sind stromabwärts der MCS angebracht worden, um in allen drei Leserahmen zu funktionieren. Ein T7-Primer/Promotor ist hinzugefügt worden, um bei dem DNA-Sequenzierungsvorgang zu helfen.

[0103] Das Plasmid pDC406, das von McMahan et al. (EMBO J. 10: 2821, 1991) und in der PCT-Anmeldung WO 91/18982 beschrieben worden ist (die hiermit durch Bezugnahme aufgenommen werden), ist ein Expressionsvektor zur Verwendung in Säugerzellen, ist aber auch in E. coli-Zellen replizierbar.

[0104] pDC406 enthält von SV40, Epstein-Barr-Virus und pBR322 abgeleitete Replikationsursprünge und ist ein Derivat von HAV-EO, das von Dower et al., J. Immunol. 142: 4314 (1989) beschrieben worden ist. pDC406 unterscheidet sich von HAV-EO durch die Deletion eines Introns, das in der dreiteiligen Adenovirus 2 Leadersequenz in HAV-EO vorliegt. DNA, die in eine multiple Klonierungsstelle (die etliche Restriktionsendonucleasespaltungsstellen enthält) eingefügt wird, wird unter Verwendung regulatorischer Elemente transkribiert und translatiert, die von HIV und Adenovirus abgeleitet sind. Der Vektor enthält ein Gen, das Ampicillinresistenz verleiht.

[0105] Der rekombinante Vektor (pDC409, der menschliche Fas-L DNA enthält) wurde in die Affennierenzelllinie CV-1/EBNA-1 (ATCC CRL 10478) transfiziert. Die Zelllinie CV-1/EBNA wurde durch Transfektion der Zelllinie CV-1 (ATCC CCL 70) mit einem Gen abgeleitet, welches das Kernantigen-1 des Epstein-Barr-Virus (EBNA-1) kodiert, das EBNA-1, angetrieben von dem menschlichen intermediate-early CMV Enhancer/Promoter, wie von McMahan et al., vorstehend, beschrieben, konstitutiv exprimiert. Das Gen EBNA-1 ermöglicht eine episomale Replikation von Expressionsvektoren, wie zum Beispiel pDC409, die den EBV Replikationsursprung enthalten.

[0106] CV1-EBNA-1 Zellen, die mit dem rekombinanten Vektor transformiert sind, werden in Rollerflaschen gezüchtet, um eine Expression des Fas-L Proteins zu gestatten. Andere geeignete Säugerexpressionsvektoren können für pDC409 substituiert werden.

BEISPIEL 3

[0107] Dieses Beispiel veranschaulicht die Herstellung monoklonaler Antikörper gegen Fas-L. Fas-L wird in Säugerwirtszellen, wie zum Beispiel COS-7 oder CV1/EBNA Zellen, exprimiert und unter Verwendung von Affinitätschromatographie mit Fas/Fc wie hierin beschrieben gereinigt. Bei dem Fas-L kann es sich um das hierin beschriebene menschliche oder Maus-Fas-L oder um ein immunogenes Fragment davon, z. B. die extrazelluläre Domäne davon, handeln.

[0108] Gereinigtes Fas-L kann verwendet werden, um unter Verwendung herkömmlicher Techniken, z. B. derjenigen Techniken, die im US-Patent 4.411.993 beschrieben werden, monoklonale Antikörper gegen Fas-L zu erzeugen. Kurz gesagt werden Mäuse mit Fas-L als Immunogen, das in vollständigem Freundschem Adjuvans emulgiert ist, immunisiert, und es wird in Mengen, die von 10–100 µg reichen, subkutan oder intraperitoneal injiziert. Zehn bis zwölf Tage später werden die immunisierten Tiere mit zusätzlichem Fas-L aufgefrischt, das in unvollständigem Freundschem Adjuvans emulgiert ist. Mäuse werden danach mit einem wöchentlichen oder zweiwöchentlichen Immunisierungsplan periodisch aufgefrischt. Serumproben werden zum Testen durch Dot-Blot-Assay oder ELISA (enzymverbundenen Immunadsorptionsassay) auf Fas-L Antikörper periodisch durch retroorbitale Blutentnahme oder Schwanzspitzenschnitt entnommen.

[0109] Nach dem Nachweis eines geeigneten Antikörpertiters wird positiven Tieren eine letzte intravenöse Injektion von Fas-L in Kochsalzlösung gegeben. Drei bis vier Tage später werden die Tiere getötet, Milzzellen geerntet und Milzzellen mit einer Maus-Myelomzelllinie (z. B. NS 1 oder Ag 8.653) fusioniert. Fusionen erzeugen Hybridomzellen, die in mehreren Mikrotiterplatten in einem selektiven HAT-Medium (Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin) ausplattiert werden, um die Proliferation von nicht fusionierten Zellen, Myelomhybriden und Milzzellhybriden zu hemmen.

[0110] Die Hybridomzellen werden durch Anpassungen der in Engvall et al., Immunochem. 8: 871, 1971, und im US-Patent 4.703.004 offenbarten Techniken durch ELISA auf Reaktivität gegen gereinigtes Fas-L durchmustert. Positive Hybridomzellen können intraperitoneal in syngene BALG/c-Mäuse injiziert werden, um Ascites zu produzieren, die hohe Konzentrationen monoklonaler anti-Fas-L Antikörper enthalten. Alternativ dazu kann man Hybridomzellen durch verschiedene Techniken in vitro in Kolben oder Rollerflaschen wachsen lassen. In Maus-Ascites hergestellte monoklonale Antikörper können durch Ammoniumsulfatpräzipitation, gefolgt von Gelausschlusschromatographie, gereinigt werden. Alternativ dazu kann auch eine Affinintätschromatographie verwendet werden, die auf der Bindung von Antikörper an Protein A oder Protein G beruht, sowie eine Affinitätschromatographie, die auf einer Bindung an Fas-L beruht.

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:
- (A) NAME: Immunex Corporation
- (B) STRASSE: 51 University Street
- (C) STADT: Seattle
- (D) BUNDESSTAAT: WA
- (E) LAND: USA
- (F) POSTLEITZAHL: 98101

(ii) TITEL DER ERFINDUNG: Fas-Antigen-bindender Ligand

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 5

(iv) COMPUTERLESBARE FORM:
- (A) MEDIUM: Diskette
- (B) COMPUTER: IBM, PC-kompatibel
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release 1.0, Version 1.30 (EPO)

(v) DATEN DER VORLIEGENDEN ANMELDUNG:
ANMELDENUMMER: EP 95907381.8

(vi) DATEN DER VORANMELDUNG:
- (A) ANMELDENUMMER: US 08/179.138
- (B) ANMELDEDATUM: 7. Januar 1994

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
- (A) LÄNGE: 1841 Basenpaare
- (B) ART: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA zu mRNA

(ix) MERKMAL:
- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE: 93..938

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

```
GAATTCCGGG TCCCGTCCTT GACACCTCAG CCTCTACAGG ACTGAGAAGA AGTAAAACCG      60

TTTGCTGGGG CTGGCCTGAC TCACCAGCTG CC ATG CAG CAG CCC TTC AAT TAC       113
                                    Met Gln Gln Pro Phe Asn Tyr
                                      1               5

CCA TAT CCC CAG ATC TAC TGG GTG GAC AGC AGT GCC AGC TCT CCC TGG       161
Pro Tyr Pro Gln Ile Tyr Trp Val Asp Ser Ser Ala Ser Ser Pro Trp
         10                  15                  20

GCC CCT CCA GGC ACA GTT CTT CCC TGT CCA ACC TCT GTG CCC AGA AGG       209
Ala Pro Pro Gly Thr Val Leu Pro Cys Pro Thr Ser Val Pro Arg Arg
     25                  30                  35

CCT GGT CAA AGG AGG CCA CCA CCA CCA CCG CCA CCG CCA CCA CTA CCA       257
Pro Gly Gln Arg Arg Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Leu Pro
 40                  45                  50                  55
```

```
CCT CCG CCG CCG CCG CCA CCA CTG CCT CCA CTA CCG CTG CCA CCC CTG      305
Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Leu Pro Pro Leu Pro Leu Pro Pro Leu
                60                  65                  70

AAG AAG AGA GGG AAC CAC AGC ACA GGC CTG TGT CTC CTT GTG ATG TTT      353
Lys Lys Arg Gly Asn His Ser Thr Gly Leu Cys Leu Leu Val Met Phe
            75                  80                  85

TTC ATG GTT CTG GTT GCC TTG GTA GGA TTG GGC CTG GGG ATG TTT CAG      401
Phe Met Val Leu Val Ala Leu Val Gly Leu Gly Leu Gly Met Phe Gln
        90                  95                  100

CTC TTC CAC CTA CAG AAG GAG CTG GCA GAA CTC CGA GAG TCT ACC AGC      449
Leu Phe His Leu Gln Lys Glu Leu Ala Glu Leu Arg Glu Ser Thr Ser
    105                 110                 115

CAG ATG CAC ACA GCA TCA TCT TTG GAG AAG CAA ATA GGC CAC CCC AGT      497
Gln Met His Thr Ala Ser Ser Leu Glu Lys Gln Ile Gly His Pro Ser
120                 125                 130                 135

CCA CCC CCT GAA AAA AAG GAG CTG AGG AAA GTG GCC CAT TTA ACA GGC      545
Pro Pro Pro Glu Lys Lys Glu Leu Arg Lys Val Ala His Leu Thr Gly
                140                 145                 150

AAG TCC AAC TCA AGG TCC ATG CCT CTG GAA TGG GAA GAC ACC TAT GGA      593
Lys Ser Asn Ser Arg Ser Met Pro Leu Glu Trp Glu Asp Thr Tyr Gly
            155                 160                 165

ATT GTC CTG CTT TCT GGA GTG AAG TAT AAG AAG GGT GGC CTT GTG ATC      641
Ile Val Leu Leu Ser Gly Val Lys Tyr Lys Lys Gly Gly Leu Val Ile
        170                 175                 180

AAT GAA ACT GGG CTG TAC TTT GTA TAT TCC AAA GTA TAC TTC CGG GGT      689
Asn Glu Thr Gly Leu Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Val Tyr Phe Arg Gly
    185                 190                 195

CAA TCT TGC AAC AAC CTG CCC CTG AGC CAC AAG GTC TAC ATG AGG AAC      737
Gln Ser Cys Asn Asn Leu Pro Leu Ser His Lys Val Tyr Met Arg Asn
200                 205                 210                 215

TCT AAG TAT CCC CAG GAT CTG GTG ATG ATG GAG GGG AAG ATG ATG AGC      785
Ser Lys Tyr Pro Gln Asp Leu Val Met Met Glu Gly Lys Met Met Ser
                220                 225                 230

TAC TGC ACT ACT GGG CAG ATG TGG GCC CGC AGC AGC TAC CTG GGG GCA      833
Tyr Cys Thr Thr Gly Gln Met Trp Ala Arg Ser Ser Tyr Leu Gly Ala
            235                 240                 245

GTG TTC AAT CTT ACC AGT GCT GAT CAT TTA TAT GTC AAC GTA TCT GAG      881
Val Phe Asn Leu Thr Ser Ala Asp His Leu Tyr Val Asn Val Ser Glu
        250                 255                 260

CTC TCT CTG GTC AAT TTT GAG GAA TCT CAG ACG TTT TTC GGC TTA TAT      929
Leu Ser Leu Val Asn Phe Glu Glu Ser Gln Thr Phe Phe Gly Leu Tyr
    265                 270                 275

AAG CTC TAA GAGAAGCACT TTGGGATTCT TTCCATTATG ATTCTTTGTT              978
Lys Leu
280

ACAGGCACCG AGAATGTTGT ATTCAGTGAG GGTCTTCTTA CATGCATTTG AGGTCAAGTA   1038

AGAAGACATG AACCAAGTGG ACCTTGAGAC CACAGGGTTC AAAATGTCTG TAGCTCCTCA   1098

ACTCACCTAA TGTTTATGAG CCAGACAAAT GGAGGAATAT GACGGAAGAA CATAGAACTC   1158
```

```
TGGGCTGCCA TGTGAAGAGG GAGAAGCATG AAAAAGCAGC TACCAGGTGT TCTACACTCA   1218

TCTTAGTGCC TGAGAGTATT TAGGCAGATT GAAAAGGACA CCTTTTAACT CACCTCTCAA   1278

GGTGGGCCTT GCTACCTCAA GGGGGACTGT CTTTCAGATA CATGGTTGTG ACCTGAGGAT   1338

TTAAGGGATG GAAAAGGAAG ACTAGAGGCT TGCATAATAA GCTAAAGAGG CTGAAAGAGG   1398

CCAATGCCCC ACTGGCAGCA TCTTCACTTC TAAATGCATA TCCTGAGCCA TCGGTGAAAC   1458

TAACAGATAA GCAAGAGAGA TGTTTTGGGG ACTCATTTCA TTCCTAACAC AGCATGTGTA   1518

TTTCCAGTGC AATTGTAGGG GTGTGTGTGT GTGTGTGTGT GTGTGTGTGT GTATGACTAA   1578

AGAGAGAATG TAGATATTGT GAAGTACATA TTAGGAAAAT ATGGGTTGCA TTTGGTCAAG   1638

ATTTTGAATG CTTCCTGACA ATCAACTCTA ATAGTGCTTA AAAATCATTG ATTGTCAGCT   1698

ACTAATGATG TTTTCCTATA ATATAATAAA TATTTATGTA GATGTGCATT TTTGTGAAAT   1758

GAAAACATGT AATAAAAAGT ATATGTTAGG ATACAAATAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA   1818

AAAAAAAAAA AAAACCGGAA TTC                                           1841
```

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
- (A) LÄNGE: 281 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

```
Met Gln Gln Pro Phe Asn Tyr Pro Tyr Pro Gln Ile Tyr Trp Val Asp
 1               5                  10                  15

Ser Ser Ala Ser Ser Pro Trp Ala Pro Pro Gly Thr Val Leu Pro Cys
            20                  25                  30

Pro Thr Ser Val Pro Arg Arg Pro Gly Gln Arg Arg Pro Pro Pro Pro
        35                  40                  45

Pro Pro Pro Pro Pro Leu Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Leu Pro
    50                  55                  60

Pro Leu Pro Leu Pro Pro Leu Lys Lys Arg Gly Asn His Ser Thr Gly
65                  70                  75                  80

Leu Cys Leu Leu Val Met Phe Phe Met Val Leu Val Ala Leu Val Gly
                85                  90                  95

Leu Gly Leu Gly Met Phe Gln Leu Phe His Leu Gln Lys Glu Leu Ala
            100                 105                 110

Glu Leu Arg Glu Ser Thr Ser Gln Met His Thr Ala Ser Ser Leu Glu
        115                 120                 125

Lys Gln Ile Gly His Pro Ser Pro Pro Pro Glu Lys Lys Glu Leu Arg
    130                 135                 140

Lys Val Ala His Leu Thr Gly Lys Ser Asn Ser Arg Ser Met Pro Leu
145                 150                 155                 160
```

```
Glu Trp Glu Asp Thr Tyr Gly Ile Val Leu Leu Ser Gly Val Lys Tyr
                165                 170                 175

Lys Lys Gly Gly Leu Val Ile Asn Glu Thr Gly Leu Tyr Phe Val Tyr
            180                 185                 190

Ser Lys Val Tyr Phe Arg Gly Gln Ser Cys Asn Asn Leu Pro Leu Ser
        195                 200                 205

His Lys Val Tyr Met Arg Asn Ser Lys Tyr Pro Gln Asp Leu Val Met
    210                 215                 220

Met Glu Gly Lys Met Met Ser Tyr Cys Thr Thr Gly Gln Met Trp Ala
225                 230                 235                 240

Arg Ser Ser Tyr Leu Gly Ala Val Phe Asn Leu Thr Ser Ala Asp His
                245                 250                 255

Leu Tyr Val Asn Val Ser Glu Leu Ser Leu Val Asn Phe Glu Glu Ser
            260                 265                 270

Gln Thr Phe Phe Gly Leu Tyr Lys Leu
        275                 280
```

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
- (A) LÄNGE: 8 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

```
Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
1               5
```

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
- (A) LÄNGE: 1171 Basenpaare
- (B) ART: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(x) MERKMAL:
- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE: 31..870

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

```
GAAGGAAACC CTTTCCTGGG GCTGGGTGCC ATG CAG CAG CCC ATG AAT TAC CCA      54
                                 Met Gln Gln Pro Met Asn Tyr Pro
                                   1               5

TGT CCC CAG ATC TTC TGG GTA GAC AGC AGT GCC ACT TCA TCT TGG GCT      102
Cys Pro Gln Ile Phe Trp Val Asp Ser Ser Ala Thr Ser Ser Trp Ala
     10                  15                  20

CCT CCA GGG TCA GTT TTT CCC TGT CCA TCT TGT GGG CCT AGA GGG CCG      150
Pro Pro Gly Ser Val Phe Pro Cys Pro Ser Cys Gly Pro Arg Gly Pro
 25                  30                  35                  40

GAC CAA AGG AGA CCG CCA CCT CCA CCA CCA CCT GTG TCA CCA CTA CCA      198
Asp Gln Arg Arg Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Val Ser Pro Leu Pro
                 45                  50                  55

CCG CCA TCA CAA CCA CTC CCA CTG TCG CCA CTG ACC CCT CTA AAG AAG      246
Pro Pro Ser Gln Pro Leu Pro Leu Ser Pro Leu Thr Pro Leu Lys Lys
            60                  65                  70

AAG GAC CAC AAC ACA AAT CTG TGG CTA CCG GTG GTA TTT TTC ATG GTT      294
Lys Asp His Asn Thr Asn Leu Trp Leu Pro Val Val Phe Phe Met Val
        75                  80                  85

CTG GTG GGT CTG GTT GGA ATG GGA TTA GGA ATG TAT CAG CTC TTC CAC      342
Leu Val Gly Leu Val Gly Met Gly Leu Gly Met Tyr Gln Leu Phe His
     90                  95                  100

CTG CAG AAG GAA CTG GCA GAA CTC CGT GAG TTC ACC AAC CAA AGC CTT      390
Leu Gln Lys Glu Leu Ala Glu Leu Arg Glu Phe Thr Asn Gln Ser Leu
105                 110                 115                 120

AAA GTA TCA TCT TTT GAA AAG CAA ATA GCC AAC CCC AGT ACA CCC TCT      438
Lys Val Ser Ser Phe Glu Lys Gln Ile Ala Asn Pro Ser Thr Pro Ser
                125                 130                 135

GAA AAA AAA GAG CCG AGG AGT GTG GCC CAT TTA ACA GGG AAC CCC CAC      486
Glu Lys Lys Glu Pro Arg Ser Val Ala His Leu Thr Gly Asn Pro His
            140                 145                 150

TCA AGG TCC ATC CCT CTG GAA TGG GAA GAC ACA TAT GGA ACC GCT CTG      534
Ser Arg Ser Ile Pro Leu Glu Trp Glu Asp Thr Tyr Gly Thr Ala Leu
        155                 160                 165

ATC TCT GGA GTG AAG TAT AAG AAA GGT GGC CTT GTG ATC AAC GAA ACT      582
Ile Ser Gly Val Lys Tyr Lys Lys Gly Gly Leu Val Ile Asn Glu Thr
    170                 175                 180

GGG TTG TAC TTC GTG TAT TCC AAA GTA TAC TTC CGG GGT CAG TCT TGC      630
Gly Leu Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Val Tyr Phe Arg Gly Gln Ser Cys
185                 190                 195                 200

AAC AAC CAG CCC CTA AAC CAC AAG GTC TAT ATG AGG AAC TCT AAG TAT      678
Asn Asn Gln Pro Leu Asn His Lys Val Tyr Met Arg Asn Ser Lys Tyr
                205                 210                 215

CCT GAG GAT CTG GTG CTA ATG GAG GAG AAG AGG TTG AAC TAC TTC ACT      726
Pro Glu Asp Leu Val Leu Met Glu Glu Lys Arg Leu Asn Tyr Phe Thr
            220                 225                 230

ACT GGA CAG ATA TGG GCC CAC AGC AGC TAC CTG GGG GCA GTA TTC AAT      774
Thr Gly Gln Ile Trp Ala His Ser Ser Tyr Leu Gly Ala Val Phe Asn
        235                 240                 245
```

```
CTT ACC AGT GCT GAC CAT TTA TAT GTC AAC ATA TCT CAA CTC TCT CTG      822
Leu Thr Ser Ala Asp His Leu Tyr Val Asn Ile Ser Gln Leu Ser Leu
    250                 255                 260

ATC AAT TTT GAG GAA TCT AAG ACC TTT TTC GGC TTG TAT AAG CTT TAA      870
Ile Asn Phe Glu Glu Ser Lys Thr Phe Phe Gly Leu Tyr Lys Leu
265                 270                 275                 280

AAGAAAAAGC ATTTTAAAAT GATCTACTAT TCTTTATCAT GGGCACCAGG AATATTGTCT    930

TGAATGAGAG TCTTCTTAAG ACCTATTGAG ATTAATTAAG ACTACATGAG CCACAAAGAC    990

CTCATGACCG CAAGGTCCAA CAGGTCAGCT ATTTCATTTT CTCGAGGTCC ATGGAGTGGT   1050

CCTTAATGCC TGCATCATGA GCCAGATGGA AGGAGGTCTG TGACTGAGGG GACATAAAGC   1110

TTGGGGCTGC TGTGTGACAA TGCAGAGGCA CAGAGGAAAG AACTGTCTGA TGTTAAATGG   1170

C                                                                   1171
```

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
- (A) LÄNGE: 279 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

```
Met Gln Gln Pro Met Asn Tyr Pro Cys Pro Gln Ile Phe Trp Val Asp
  1               5                  10                  15

Ser Ser Ala Thr Ser Ser Trp Ala Pro Pro Gly Ser Val Phe Pro Cys
             20                  25                  30

Pro Ser Cys Gly Pro Arg Gly Pro Asp Gln Arg Arg Pro Pro Pro Pro
         35                  40                  45

Pro Pro Pro Val Ser Pro Leu Pro Pro Pro Ser Gln Pro Leu Pro Leu
     50                  55                  60

Ser Pro Leu Thr Pro Leu Lys Lys Lys Asp His Asn Thr Asn Leu Trp
 65                  70                  75                  80

Leu Pro Val Val Phe Phe Met Val Leu Val Gly Leu Val Gly Met Gly
                 85                  90                  95

Leu Gly Met Tyr Gln Leu Phe His Leu Gln Lys Glu Leu Ala Glu Leu
            100                 105                 110

Arg Glu Phe Thr Asn Gln Ser Leu Lys Val Ser Ser Phe Glu Lys Gln
        115                 120                 125

Ile Ala Asn Pro Ser Thr Pro Ser Glu Lys Lys Glu Pro Arg Ser Val
    130                 135                 140

Ala His Leu Thr Gly Asn Pro His Ser Arg Ser Ile Pro Leu Glu Trp
145                 150                 155                 160

Glu Asp Thr Tyr Gly Thr Ala Leu Ile Ser Gly Val Lys Tyr Lys Lys
                165                 170                 175
```

```
Gly Gly Leu Val Ile Asn Glu Thr Gly Leu Tyr Phe Val Tyr Ser Lys
            180                 185                 190

Val Tyr Phe Arg Gly Gln Ser Cys Asn Asn Gln Pro Leu Asn His Lys
        195                 200                 205

Val Tyr Met Arg Asn Ser Lys Tyr Pro Glu Asp Leu Val Leu Met Glu
    210                 215                 220

Glu Lys Arg Leu Asn Tyr Phe Thr Thr Gly Gln Ile Trp Ala His Ser
225                 230                 235                 240

Ser Tyr Leu Gly Ala Val Phe Asn Leu Thr Ser Ala Asp His Leu Tyr
                245                 250                 255

Val Asn Ile Ser Gln Leu Ser Leu Ile Asn Phe Glu Glu Ser Lys Thr
            260                 265                 270

Phe Phe Gly Leu Tyr Lys Leu
        275
```

Patentansprüche

1. Isolierte DNA, die ein menschliches Fas-L-Polypeptid kodiert, wobei das Fas-L-Polypeptid Fas binden kann und durch eine N-terminale Aminosäuresequenz MQQPFNYPYPQI gekennzeichnet ist und wobei das Fas-L-Polypeptid die Aminosäuresequenz der Reste 1–281 der SEQ ID NO: 2 umfasst.

2. Isolierte DNA gemäß Anspruch 1, wobei die DNA die Nucleotidsequenz der Nucleotide 93–938 der SEQ ID NO: 1 umfasst.

3. Isolierte DNA gemäß Anspruch 1, wobei die DNA die kodierende Region des cDNA-Inserts des rekombinanten Vektors umfasst, der im Stamm ATCC 69527 hinterlegt ist.

4. Isolierte DNA, die ein lösliches menschliches Fas-L-Polypeptid kodiert, wobei das Fas-L-Polypeptid die Aminosäuresequenz der Reste 106–281 der SEQ ID NO: 2 umfasst.

5. Isolierte DNA gemäß Anspruch 4, wobei die DNA die Nucleotidsequenz der Nucleotide 408–938 der SEQ ID NO: 1 umfasst.

6. Expressionsvektor, umfassend eine wie in einem der Ansprüche 1 bis 5 definierte DNA.

7. Verfahren zum Herstellen eines Fas-L-Polypeptids, umfassend das Züchten einer Wirtszelle, die mit einem wie in Anspruch 6 definierten Vektor transformiert ist, unter Bedingungen, die eine Expression von Fas-L fördern, und das Gewinnen des Fas-L-Polypeptids aus der Kultur.

8. Gereinigtes menschliches Fas-L-Protein, das durch eine N-terminale Aminosäuresequenz MQQPFNYPYPQI gekennzeichnet ist, wobei das Fas-L-Protein Fas binden kann und wobei das Protein die Aminosäuresequenz der Reste 1–231 der SEQ ID NO: 2 umfasst.

9. Lösliches menschliches Fas-L-Protein, umfassend die Aminosäuresequenz der Reste 106–281 der SEQ ID NO: 2.

10. Menschliches Fas-L-Protein nach Anspruch 8, das durch das cDNA-Insert des im Stamm ATCC 69527 hinterlegten rekombinanten Vektors kodiert wird.

11. Oligomer aus Fas-L-Polypeptiden, umfassend ein Polypeptid nach einem der Ansprüche 8 bis 10.

12. Oligomer gemäß Anspruch 11 in Form eines Dimers oder Trimers des Polypeptids nach einem der Ansprüche 8 bis 10.

13. Oligomer gemäß Anspruch 11 oder 12, das durch Disulfidbindungen zwischen Cysteinresten auf unterschiedlichen Fas-L-Polypeptiden gebildet oder als Fusionspolymere mit oder ohne Verknüpfungsgruppen aus Spacer-Aminosäuren exprimiert wird.

14. Oligomer gemäß Anspruch 11, wobei das Oligomer ein Dimer ist und durch Fusionieren von Fas-L an

die Fc-Region eines Antikörpers erzeugt wird.

15. Isoliertes Nucleinsäuremolekül, umfassend mindestens etwa 14 Nucleotide der SEQ ID NO: 1, oder das DNA- oder RNA-Komplement davon.

16. Menschliches Fas-L-Polypeptid gemäß einem der Ansprüche 8 bis 10 zur Verwendung in der Medizin.

17. Antikörper, der mit menschlichem Fas-L gemäß einem der Ansprüche 8 bis 10 eine Immunreaktion eingehen kann, zur Verwendung in der Medizin.

18. Verwendung eines menschlichen Fas-L-Polypeptids gemäß einem der Ansprüche 8 bis 10 oder von DNA, die ein menschliches Fas-L-Polypeptid gemäß einem der Ansprüche 11 bis 14 kodiert, bei der Herstellung eines Mittels zur Behandlung einer Autoimmunerkrankung, der Transplantat-gegen-Wirt-Krankheit oder einer durch die Wechselwirkung von Fas-L und Fas vermittelten Erkrankung, ausgewählt aus systemischem Lupus erythematodes (SLE), rheumatoider Arthritis, der Lyme-Krankheit, idiopathischer $CD4^+$-T-Lymphozytopenie oder den Wirkungen einer Infektion mit menschlichem Immundefizienzvirus (HIV).

19. Verwendung gemäß Anspruch 18, wobei es sich bei der Autoimmunerkrankung um systemischen Lupus erythematodes (SLE), immunoblastische Lymphadenopathie (IBL), angioimmunoblastische Lymphadenopathie (AIL), Lymphogranulomatose X (LgX), rheumatoide Arthritis, Diabetes, multiple Sklerose oder Allergien handelt.

20. Verwendung eines Antikörpers, der mit menschlichem Fas-L gemäß einem der Ansprüche 8 bis 10 eine Immunreaktion eingehen kann und der die Bindung eines Fas-L-Polypeptids an Fas hemmt, bei der Herstellung eines Mittels zur Behandlung einer durch die Wechselwirkung von Fas-L und Fas vermittelten Erkrankung, ausgewählt aus systemischem Lupus erythematodes (SLE), rheumatoider Arthritis, der Lyme-Krankheit, idiopathischer $CD4^+$-T-Lymphozytopenie oder den Wirkungen einer Infektion mit menschlichem Immundefizienzvirus (HIV).

21. Pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend ein menschliches Fas-L-Polypeptid gemäß einem der Ansprüche 8 bis 10 und gegebenenfalls einen pharmazeutisch verträglichen Exzipienten, ein pharmazeutisch verträgliches Verdünnungsmittel oder einen pharmazeutisch verträglichen Träger.

22. Pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend einen Antikörper, der mit einem menschlichem Fas-L-Polypeptid gemäß einem der Ansprüche 8 bis 10 eine Immunreaktion eingehen kann, und gegebenenfalls einen pharmazeutisch verträglichen Exzipienten, ein pharmazeutisch verträgliches Verdünnungsmittel oder einen pharmazeutisch verträglichen Träger.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen