



(10) **DE 698 32 178 T3** 2012.03.29

(12) **Übersetzung der geänderten europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 005 488 B2**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **698 32 178.2**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US98/02239**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **98 90 8474.4**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1998/035986**

(86) PCT-Anmeldetag: **11.02.1998**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **20.08.1998**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **07.06.2000**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **02.11.2005**

(97) Veröffentlichungstag
des geänderten Patents beim EPA: **14.12.2011**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **29.03.2012**

(51) Int Cl.: **C07K 14/435** (2006.01)

C07K 14/715 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

C12N 15/19 (2006.01)

Patentschrift wurde im Einspruchsverfahren geändert

(30) Unionspriorität:

799861 **13.02.1997** **US**

815255 **12.03.1997** **US**

829536 **28.03.1997** **US**

869852 **04.06.1997** **US**

883036 **26.06.1997** **US**

(73) Patentinhaber:

Immunex Corp., Thousand Oaks, Calif., US

(74) Vertreter:

Huss, Flosdorff & Partner GbR, 82467, Garmisch-Partenkirchen, DE

(84) Benannte Vertragsanstalten:

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

(72) Erfinder:

RAUCH, Charles, Bainbridge Island, US;
WALCZAK, Henning, Dr., 69120, Heidelberg, DE

(54) Bezeichnung: **TRAIL BINDENDER REZEPTOR**

Beschreibung**HINTERGRUND DER ERFINDUNG**

[0001] Ein als TNF-verwandter, Apoptose induzierender Ligand (TRAIL) bekanntes Protein gehört zur Tumornekrosefaktor-Familie der Liganden (Wiley et al., Immunity, 3:673–682, 1995). TRAIL hat seine Fähigkeit demonstriert, die Apoptose bestimmter transformierter Zellen, einschließlich einer Reihe von verschiedenen Krebszellarten sowie viral infizierten Zellen, zu induzieren (PCT-Anmeldung 97/01633 und Wiley et al., siehe oben).

[0002] Eine Identifizierung des/der TRAIL bindenden Rezeptorprotein(s/e) würde sich bei der weiteren Untersuchung der biologischen Aktivitäten von TRAIL nützlich erweisen. Vor der vorliegenden Erfindung wurde jedoch noch nicht über einen Rezeptor für TRAIL berichtet.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0003] Die vorliegende Erfindung ist auf ein neuartiges, als TRAIL-Rezeptor (TRAIL-R) bezeichnetes Protein gerichtet, das sich an ein als TNF-verwandter, Apoptose induzierender Ligand (TRAIL) bekanntes Protein bindet. Es wird DNA (wie in den Ansprüchen definiert), die TRAIL-R codiert, und es werden Expressionsvektoren, die solche DNA aufweisen, bereitgestellt. Ein Verfahren zur Herstellung von TRAIL-R-Polypeptiden, welches das Kultivieren von Wirtszellen, die mit einem rekombinanten, TRAIL-R codierenden Expressionsvektor transformiert wurden, unter Bedingungen, die die Expression von TRAIL-R fördern, und anschließend die Wiedergewinnung der exprimierten TRAIL-R-Polypeptide aus der Kultur aufweist. Es werden auch Antikörper bereitgestellt, die gegen TRAIL-R gerichtet und immunreaktiv zu einem TRAIL-R Polypeptid sind, welches an den TNF-vermittelten Apoptose-induzierenden Liganden (TRAIL) bindet, wobei TRAIL-R dadurch gekennzeichnet ist, dass es die Aminosäuresequenz VPANEGD aufweist, oder an ein Antigen-bindendes Fragment des Antikörpers bindet, wobei der Antikörper unter Verwendung von TRAIL-R-Protein als Immunogen herstellbar ist, und das TRAIL-R-Protein gewinnbar aus Jurkat Zellen ist, nämlich durch Disruptur der Zellen und einem anschließenden Reinigungsschritt welcher Affinitätschromatographie einschließt und eine TRAIL-enthaltende Chromatographie-Matrix, sowie Umkehrphasen HPLC anwendet.

KURZE BESCHREIBUNG DER FIGUREN

[0004] [Fig. 1](#) zeigt die Nucleotidsequenz eines humanen TRAIL-Rezeptor-DNA-Fragmentes sowie die damit codierte Aminosäuresequenz. Dieses DNA-Fragment wird in Beispiel 3 beschrieben.

[0005] [Fig. 2](#) zeigt die Ergebnisse der in Beispiel 7 beschriebenen Untersuchung. In der Untersuchung blockierte ein lösliches TRAIL-R/Fc-Fusionsprotein die TRAIL-induzierte Apoptose von Jurkat-Zellen.

[0006] [Fig. 3](#) zeigt die Ergebnisse des in Beispiel 8 beschriebenen Experimentes. Es wurde demonstriert, dass die angegebenen Verbindungen die Apoptose der Zellen hemmen, die den TRAIL-Rezeptor exprimieren.

AUSFÜHRLICHE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0007] Es wird ein neuartiges, TRAIL-Rezeptor (TRAIL-R) genanntes Protein hierin bereitgestellt. TRAIL-R bindet an das Cytokin, das TNF-verwandter, Apoptose induzierender Ligand (TRAIL) genannt wird. Bestimmte Verwendungen von TRAIL-R beruhen auf dieser Fähigkeit, TRAIL zu binden, wie weiter unten diskutiert wird. TRAIL-R findet zum Beispiel in der Hemmung der biologischen Aktivitäten von TRAIL oder in der Reinigung von TRAIL durch Affinitätschromatographie Verwendung.

[0008] Die Nucleotidsequenz der codierenden Region einer humanen TRAIL-Rezeptor-DNA wird in SEQ ID Nr:1 gezeigt. Die Aminosäuresequenz, die von der DNA-Sequenz der SEQ ID Nr:1 codiert wird, wird in SEQ ID Nr:2 gezeigt. Diese Sequenzinformationen identifizieren das TRAIL-Rezeptor-Protein als Mitglied der Tumornekrosefaktorrezeptor(TNF-R)-Familie von Rezeptoren (rezensiert in Smith et al., Cell 76:959–962, 1994). Die extrazelluläre Domäne enthält cysteinreiche Wiederholung; es wurde berichtet, dass solche Motive wichtig für die Ligandenbindung in anderen Rezeptoren dieser Familie sind. TRAIL-R enthält eine sogenannte "Todesdomäne" (death domain) in der Cytoplasmaregion; solche Domänen sind in bestimmten anderen Rezeptoren mit der Transduktion von apoptotischen Signalen verbunden. Diese und andere Merkmale des Proteins werden unten detaillierter besprochen.

[0009] In einer Ausführungsform der Erfindung sind die obgenannten Antikörper monoklonale Antikörper.

[0010] Es wurde humanes TRAIL-R-Protein gereinigt, wie in Beispiel 1 beschrieben ist. In Beispiel 2 werden Aminosäuresequenz Informationen angeführt, die aus Fragmenten von TRAIL-R abgeleitet sind. Eine Ausführungsform der Erfindung ist auf ein gereinigtes humanes TRAIL-R-Protein gerichtet, das in der Lage ist, TRAIL zu binden, wobei das TRAIL-R dadurch gekennzeichnet ist, dass es die Aminosäuresequenz VPANEGD (die Aminosäuren 327 bis 333 der SEQ ID NR. 2) aufweist. In einer anderen Ausführungsform weist TRAIL-R zusätzlich die Sequenz ETLRQCFDDFADLVPFDSWEPLMRKLGMDNEIKVAKAEAAAGHRDTLXTML (die Aminosäuren 336 bis 386 der SEQ ID NR. 2, mit einer unbekannten Aminosäure, die als X angegeben wird) auf. Es werden auch TRAIL-R-Fragmente bereitgestellt, die nur eine dieser charakteristischen Aminosäuresequenzen aufweisen.

[0011] Die Nucleotidsequenz eines TRAIL-R-DNA-Fragmentes und die dadurch codierte Aminosäuresequenz werden in [Fig. 1](#) (SEQ ID NR. 3 und SEQ ID NR. 4) gezeigt, siehe Beispiel 3. Die in [Fig. 1](#) gezeigte Aminosäuresequenz besitzt Merkmale der sogenannten "Todesdomänen", die in der Cytoplasmaregion bestimmter anderer Rezeptorproteine gefunden werden. Es ist berichtet worden, dass solche Domänen mit der Transduktion von apoptotischen Signalen verknüpft sind. Cytoplasmatische Todesdomänen sind im Fas-Antigen (Itoha und Nagata, J. Biol. Chem. 268:10932, 1993), TNF-Rezeptor Typ I (Tartaglia et al., Cell 74:845, 1993), DR3 (Chinnaiyan et al., Science 274:990–992, 1996) und CAR-1 (Brojatsch et al., Cell 87:845–855, 1996) identifiziert worden. Die Rolle dieser Todesdomänen bei der Initiierung der intrazellulären apoptotischen Signalkaskade wird weiter unten besprochen.

[0012] SEQ ID NR. 1 zeigt die Nucleotidsequenz der codierenden Region einer humanen TRAIL-Rezeptor-DNA, einschließlich eines Start-Codons (ATG) und eines Stoppcodons (TAA). Die von der DNA der SEQ ID NR. 1 codierte Aminosäuresequenz wird in SEQ ID NR. 2 gezeigt. Das in [Fig. 1](#) abgebildete Fragment entspricht der Region von TRAIL-R, die in SEQ ID NR. 2 als Aminosäuren 336 bis 386 gezeigt wird.

[0013] Das TRAIL-R-Protein der SEQ ID NR. 2 schließt eine N-endständige hydrophobe Region ein, die als Signalpeptid fungiert, gefolgt von einer extrazellulären Domäne, einer transmembranen Region, die die Aminosäuren 211 bis 231 aufweist, und einer C-terminalen cytoplasmatischen Domäne. Mittels Computeranalyse wird vorausberechnet, dass das Signalpeptid den Resten 1 bis 51 der SEQ ID NR. 2 entspricht. Die Spaltung des Signalpeptids würde also ein reifes Protein ergeben, das die Aminosäuren 52 bis 440 der SEQ ID NR. 2 aufweist. Das berechnete Molekulargewicht für ein reifes Protein, das die Reste 52 bis 440 der SEQ ID NR. 2 enthält, beträgt etwa 43 Kilodalton. Die nächsten wahrscheinlichsten, mit dem Computer vorausberechneten Spaltstellen von Signalpeptidasen (in absteigender Reihenfolge) treten nach den Aminosäuren 50 und 58 der SEQ ID NR. 2 auf.

[0014] In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung ist der N-terminale Rest eines reifen TRAIL-R-Proteins der Isoleucinrest an Position 56 der SEQ ID NR. 2. Sequenzen mehrerer tryptischer Verdauungspeptidfragmente von TRAIL-R wurden mit einer Kombination von N-terminaler Sequenzierung und Nano-ES MS/MS (Nano-Elektrospray-Tandem-Massenspektrometrie) bestimmt. Die N-terminale Aminosäure von einem der Peptidfragmente war das Isoleucin an Position 56 der SEQ ID NR. 2. Da diesem Fragment kein Trypsinspaltungsort voranging, kann der (Ile)56-Rest dem N-terminalen Rest entsprechen, der von der Spaltung des Signalpeptids resultiert.

[0015] Eine weitere Ausführungsform der Erfindung richtet sich auf reifes TRAIL-R, das die Aminosäure 54 als N-terminalen Rest besitzt. In einer Zubereitung von TRAIL-R (einem löslichen TRAIL-R/Fc-Fusionsprotein, das in CV1-EBNA-Zellen exprimiert wird) wurde das Signalpeptid nach dem Rest 53 der SEQ ID NR. 2 gespalten.

[0016] Der Fachmann wird erkennen, dass das Molekulargewicht bestimmter Zubereitungen von TRAIL-R-Protein je nach solchen Faktoren wie dem Grad der Glykosylierung variieren kann. Das Glykosylierungsmuster einer speziellen Zubereitung von TRAIL-R kann sich zum Beispiel je nach der Art der Zellen, in denen das Protein exprimiert wird, ändern. Weiters kann eine gegebene Zubereitung mehrere unterschiedlich glykosylierte Arten des Proteins beinhalten. Es werden TRAIL-R-Polypeptide mit oder ohne assoziierte Glykosylierung nach nativem Muster bereitgestellt. Expression von TRAIL-R-Polypeptiden in bakteriellen Expressionssystemen, wie zum Beispiel E. coli, liefert unglykosylierte Moleküle.

[0017] In einer Ausführungsform wird das Protein durch ein Molekulargewicht innerhalb des Bereichs von etwa 50 bis 55 Kilodalton charakterisiert, was das Molekulargewicht für eine Zubereitung von nativem humanem

TRAIL-R voller Länge ist. Das Molekulargewicht kann durch SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) bestimmt werden.

[0018] Beispiel 1 zeigt eine Methode zur Reinigung eines TRAIL-R-Proteins. Jurkat-Zellen werden zertrümmert, und der nachfolgende Reinigungsprozess schließt Affinitätschromatographie (unter Verwendung einer TRAIL enthaltenden Chromatographiematrix) und die Umkehrphasen-HPLC ein.

[0019] TRAIL-R-Polypeptide der vorliegenden Erfindung können mit jedem geeigneten alternativen Verfahren unter Verwendung bekannter Proteinreinigungsmethoden gereinigt werden. In einem alternativen Verfahren weist die Chromatographiematrix statt dessen einen Antikörper auf, der TRAIL-R bindet. Andere Zellarten, die TRAIL-R exprimieren (z. B. die in Beispiel 2 beschriebenen PS-1-Zellen), können statt der Jurkat-Zellen verwendet werden. Die Zellen können mit jedem der zahlreichen bekannten Verfahren, einschließlich Gefrier-Auftau-Zyklen, Sonikation, mechanischer Zertrümmerung oder durch die Verwendung von Zelllysierenden Mitteln, zerstört werden.

[0020] Der gewünschte Reinheitsgrad hängt vom beabsichtigten Verwendungszweck des Proteins ab. Ein relativ hoher Reinheitsgrad wird zum Beispiel gewünscht, wenn das Protein in vivo verabreicht werden soll. Vorteilhafterweise werden TRAIL-R-Polypeptide so gereinigt, dass keine anderen Proteinen (nicht-TRAIL-R) entsprechenden Proteinbanden bei der Analyse durch SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) nachweisbar sind. Fachleute auf dem entsprechenden Gebiet werden erkennen, dass mehrere Banden, die dem TRAIL-R-Protein entsprechen, durch SDS-PAGE auf Grund unterschiedlicher Glykosylierung, unterschiedlicher posttranslatorischer Verarbeitung und dergleichen sichtbar sein können. TRAIL-R wird vorzugsweise bis zur weitgehenden Homogenität gereinigt, wie sie durch eine einzige Proteinbande bei Analyse durch SDS-PAGE angezeigt wird. Die Proteinbande kann durch Silberfärbung, Coomassie-Blau-Färbung oder (wenn das Protein radioaktiv markiert ist) durch Autoradiografie sichtbar gemacht werden.

[0021] Die vorliegende Erfindung umfasst TRAIL-R in verschiedenen Formen, wozu auch diejenigen gehören, die natürlich vorkommen oder durch verschiedene Verfahren erzeugt werden, wie zum Beispiel unter Verwendung rekombinanter DNA-Technologie. Solche Formen von TRAIL-R beinhalten, jedoch ohne darauf beschränkt zu sein, Fragmente, Derivate, Varianten und Oligomere von TRAIL-R sowie Fusionsproteine, die TRAIL-R oder Fragmente davon enthalten, wie in den Ansprüchen dargelegt ist.

[0022] Durch Modifizierung von TRAIL-R ist es möglich, Derivate davon durch Bildung kovalenter oder Aggregatkonjugate mit anderen chemischen Resten, wie zum Beispiel Glycosylgruppen, Lipide, Phosphate, Acetylgruppen und dergleichen, zu erzeugen. Kovalente Derivate von TRAIL-R können durch Verbinden der chemischen Reste mit funktionellen Gruppen an TRAIL-R-Aminosäureseitenketten oder am N-Terminus oder C-Terminus eines TRAIL-R-Polypeptids hergestellt werden. Konjugate, die diagnostische (nachweisbare) oder therapeutische, an TRAIL-R befestigte Mittel aufweisen, werden hierin betrachtet, wie unten detaillierter besprochen wird.

[0023] Andere Derivate von TRAIL-R, die im Geltungsbereich dieser Erfindung liegen, schließen kovalente oder Aggregatkonjugate von TRAIL-R-Polypeptiden mit anderen Proteinen oder Polypeptiden ein, wie zum Beispiel durch Synthese in rekombinanter Kultur als N-terminale oder C-terminale Fusionen. Beispiele für Fusionsproteine werden unten in Verbindung mit TRAIL-R-Oligomeren besprochen. Weiters können TRAIL-R enthaltende Fusionsproteine Peptide aufweisen, die zur leichteren Reinigung und Identifizierung von TRAIL-R hinzugefügt werden. Solche Peptide schließen zum Beispiel Poly-His oder die antigenen Identifizierungspeptide, die im US-Patent Nr. 5,011,912 und in Hopp et al., Bio/Technology 6:1204, 1988, beschrieben werden, ein. Ein solches Peptid ist das Flag®-Peptid, Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys, welches stark antigen ist und ein Epitop bereitstellt, das reversibel durch einen spezifischen monoklonalen Antikörper gebunden ist, was einen schnellen Test und eine einfache Reinigung des exprimierten rekombinanten Proteins ermöglicht. Ein 4E11 genanntes, Mäuse-Hybridom erzeugt einen monoklonalen Antikörper, der das Flag®-Peptid in Gegenwart bestimmter zweiwertiger Metall-Kationen bindet, wie im US-Patent Nr. 5,011,912 beschrieben ist. Die 4E11-Hybridom-Zelllinie wurde in der American Type Culture Collection unter Zugangsnummer HB 9259 hinterlegt. Monoklonale Antikörper, die das Flag®-Peptid binden, können von der Eastman Kodak Co., Scientific Imaging Systems Division, New Haven, Connecticut, bezogen werden.

[0024] Es werden sowohl zellmembrangebundene als auch lösliche (sezernierte) Formen von TRAIL-R hierin bereitgestellt. Löslicher TRAIL-R kann durch Abtrennen der intakten Zellen, die ein TRAIL-R-Polypeptid exprimieren, aus dem Kulturmedium, z. B. durch Zentrifugieren und Untersuchen des Mediums (Überstandes) auf

Vorliegen des gewünschten Proteins, identifiziert (und vom nicht-löslichen membrangebundenen Gegenstück unterschieden) werden.

[0025] Das Vorliegen von TRAIL-R im Medium zeigt an, dass das Protein aus den Zellen sezerniert wurde und daher eine lösliche Form des gewünschten Proteins ist.

[0026] Löslichen Formen von Rezeptorproteinen fehlt normalerweise die Transmembranregion, welche die Rückhaltung des Proteins an der Zelloberfläche verursachen würde. In einer Ausführungsform der Erfindung weist ein lösliches TRAIL-R-Polypeptid die extrazelluläre Domäne des Proteins auf. Ein lösliches TRAIL-R-Polypeptid kann die cytoplasmatische Domäne oder einen Teil davon einschließen, solange das Polypeptid aus der Zelle, in der es gebildet wird, sezerniert wird. Ein Beispiel für ein lösliches TRAIL-R ist ein lösliches humanes TRAIL-R, das die Aminosäuren 52 bis 210 der SEQ ID NR. 2 aufweist. Andere lösliche TRAIL-R-Polypeptide weisen, ohne jedoch darauf beschränkt zu sein, Polypeptide bestehend aus den Aminosäuren x bis 210 der SEQ ID NR. 2 auf, wobei x eine ganze Zahl von 51 bis 59 ist.

[0027] Lösliche Formen von TRAIL-R besitzen bestimmte Vorteile gegenüber der membrangebundenen Form des Proteins. Die Reinigung des Proteins aus rekombinanten Wirtszellen wird erleichtert, da die löslichen Proteine aus den Zellen sezerniert werden. Weiters sind lösliche Proteine im allgemeinen für bestimmte Anwendungen, z. B. für die intravenöse Verabreichung, besser geeignet.

[0028] Es werden TRAIL-R-Fragmente hierin bereitgestellt. Solche Fragmente können mit jedem von einer Reihe von herkömmlichen Verfahren hergestellt werden. Gewünschte Peptidfragmente können chemisch synthetisiert werden. Eine Alternative schließt die Erzeugung von TRAIL-R-Fragmenten durch enzymatische Verdauung ein, z. B. durch die Behandlung des Proteins mit einem Enzym, von dem bekannt ist, dass es Proteine an Stellen, die durch bestimmte Aminosäurereste definiert sind, spaltet. Ein anderes geeignetes Verfahren schließt das Isolieren und Amplifizieren eines DNA-Fragmentes, das ein gewünschtes Polypeptidfragment codiert, durch die Polymerasekettenreaktion (PCR) ein. Oligonucleotide, die die gewünschten Termini des DNA-Fragmentes festlegen, werden als 5'- und 3'-Primer in der PCR eingesetzt.

[0029] Beispiele für Fragmente sind jene, die in den Ansprüchen dargelegt werden. Fragmente, die von der cytoplasmatischen Domäne abgeleitet sind, werden in Untersuchungen zur TRAIL-R-vermittelten Signaltransduktion und bei der Regulierung von zellulären Prozessen, die mit der Transduktion biologischer Signale verknüpft sind, verwendet. Spezielle Ausführungsformen sind auf TRAIL-R-Polypeptidfragmente ausgerichtet, die die Fähigkeit der Bindung an TRAIL behalten. Solch ein Fragment kann ein lösliches TRAIL-R-Polypeptid sein, wie oben beschrieben ist.

[0030] Es werden natürlich vorkommende Varianten des TRAIL-R-Proteins der SEQ ID NR. 2 hierin bereitgestellt. Solche Varianten beinhalten zum Beispiel Proteine, die aus alternierenden mRNA-Spleißereignissen oder aus der proteolytischen Spaltung des TRAIL-R-Proteins resultieren. Das alternierende Spleißen von mRNA kann zum Beispiel ein verkürztes, biologisch aktives TRAIL-R-Protein ergeben, wie zum Beispiel eine natürlich vorkommende lösliche Form des Proteins. Variationen, die der Proteolyse zuzuschreiben sind, beinhalten zum Beispiel Unterschiede in den N- oder C-Termini bei Expression in verschiedenen Arten von Wirtszellen auf Grund der proteolytischen Entfernung von einer oder mehreren endständigen Aminosäuren von dem TRAIL-R-Protein (im allgemeinen 1–5 endständige Aminosäuren). TRAIL-R-Proteine, bei denen Unterschiede in der Aminosäuresequenz dem genetischen Polymorphismus zuzuschreiben sind (allelische Variation zwischen Individuen, die das Protein erzeugen), werden ebenfalls hierin betrachtet.

[0031] Der Fachmann wird auch erkennen, dass die Position(en), an der/denen das Signalpeptid gespalten wird, sich von der/denen unterscheiden kann, die vom Computerprogramm vorherberechnet wurde(n), und auch auf Grund solcher Faktoren, wie der Art der Wirtszellen, die bei der Expression eines rekombinanten TRAIL-R-Polypeptid eingesetzt wurden, variieren kann. Eine Proteinpräparation kann eine Mischung von Proteinmolekülen enthalten, die unterschiedliche N-terminale Aminosäuren besitzen, was aus der Spaltung des Signalpeptids an mehr als einem Ort resultiert. Wie oben besprochen, beinhalten spezielle Ausführungsformen von reifen, hierin bereitgestellten TRAIL-R-Proteinen, ohne jedoch darauf beschränkt zu sein, Proteine, die den Rest an Position 51, 52, 54, 56 oder 59 der SEQ ID NR. 2 als N-terminale Aminosäure besitzen.

[0032] Bezüglich der Diskussion über verschiedene Domänen von TRAIL-R-Protein hierin wird der Fachmann erkennen, dass die oben beschriebenen Grenzen solcher Regionen des Proteins ungefähre Grenzen sind. Zur Erläuterung sei gesagt, dass die Grenzen der Transmembranregion (die mit für diesen Zweck verfügbaren Computerprogrammen vorherberechnet werden können) sich von den oben beschriebenen unterscheiden

können. So werden lösliche TRAIL-R-Polypeptide, bei denen der C-Terminus der extrazellulären Domäne sich von dem so identifizierten Rest oben unterscheidet, hierin behandelt.

[0033] Sonden, die auf der humanen DNA-Sequenz der SEQ ID NR. 3 oder SEQ ID NR. 1 beruhen, können zum Durchsuchen von cDNA-Bibliotheken verwendet werden, die aus anderen Säugetierarten unter Verwendung herkömmlicher interspezifischer Hybridisierungsverfahren abgeleitet wurden.

[0034] TRAIL-R-DNA-Sequenzen können von den hierin offenbarten nativen Sequenzen abweichen. Auf Grund der bekannten Degeneriertheit des genetischen Codes, bei der mehr als ein Codon dieselbe Aminosäure codieren kann, kann eine DNA-Sequenz von der in SEQ ID NR. 1 gezeigten abweichen und trotzdem ein TRAIL-R-Protein codieren, das die Aminosäuresequenz der SEQ ID NR. 2 besitzt. Solche abweichenden DNA-Sequenzen können aus stillen Mutationen (z. B. solchen, die bei der PCR-Amplifikation auftreten) resultieren oder können das Ergebnis einer bewussten Mutagenese einer nativen Sequenz sein. Daher sind unter den hierin bereitgestellten DNA-Sequenzen native TRAIL-R-Sequenzen (z. B. cDNA, die die in SEQ ID NR. 1 gezeigte Nucleotidsequenz aufweist) und DNA, die als Folge des genetischen Codes zu einer nativen TRAIL-R-DNA-Sequenz degeneriert ist.

[0035] Unter den hierin beschriebenen TRAIL-R-Polypeptiden gibt es Varianten von nativen TRAIL-R-Polypeptiden, die eine biologische Aktivität eines nativen TRAIL-R beibehalten. Solche Varianten beinhalten Polypeptide, die im Wesentlichen homolog zu nativem TRAIL-R sind, die aber wegen einer oder mehrerer Deletionen, Insertionen oder Substitutionen eine andere Aminosäuresequenz als die eines nativen TRAIL-R besitzen. Bestimmte Ausführungsformen weisen, ohne jedoch darauf beschränkt zu sein, TRAIL-R-Polypeptide auf, die eine bis zehn Deletionen, Insertionen oder Substitutionen von Aminosäureresten enthalten, im Vergleich zu einer nativen TRAIL-R-Sequenz. Die hierin beschriebenen TRAIL-R-codierenden DNAs beinhalten Varianten, die sich wegen einer oder mehrerer Deletionen, Insertionen oder Substitutionen von einer nativen TRAIL-R-DNA-Sequenz unterscheiden, die aber ein biologisch aktives TRAIL-R-Polypeptid codieren. Eine biologische Aktivität von TRAIL-R ist die Fähigkeit, TRAIL zu binden.

[0036] Es werden Nucleinsäuremoleküle hierin beschrieben, die in der Lage sind, mit DNA der SEQ ID NR. 1 oder SEQ ID NR. 3 unter mäßig stringenten oder hoch stringenten Bedingungen zu hybridisieren und die ein biologisch aktives TRAIL-R codieren. Solche hybridisierenden Nucleinsäuren beinhalten, ohne jedoch darauf beschränkt zu sein, verschiedene DNA-Sequenzen und DNA, die von nicht menschlichen Arten, z. B. nicht menschlichen Säugetieren, abgeleitet wurden.

[0037] Mäßig stringente Bedingungen schließen die Bedingungen, die zum Beispiel in Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2. Ausgabe, Bd. 1, S. 101–104, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, beschrieben wurden, ein. Bedingungen mäßiger Stringenz, wie von Sambrook et al. definiert, schließen die Verwendung einer Vorwaschlösung von 5X SSC, 0,5% SDS, 1,0 mM EDTA (pH 8,0) und Hybridisierungsbedingungen von etwa 55°C, 5X SSC über Nacht ein. Hoch stringente Bedingungen schließen höhere Hybridisierungs- und Waschttemperaturen ein. Eine Ausführungsform der Erfindung ist auf DNA-Sequenzen gerichtet, die mit der DNA der SEQ ID NR. 1 oder 3 unter hoch stringenten Bedingungen hybridisieren, wobei die besagten Bedingungen die Hybridisierung bei 68°C, gefolgt von der Waschung in 0,1X SSC/0,1% SDS bei 63–68°C beinhalten.

[0038] In bestimmten Ausführungsformen der Erfindung unterscheidet sich ein abweichendes TRAIL-R-Polypeptid in der Aminosäuresequenz von einem nativen TRAIL-R, ist aber bei einer biologischen Aktivität im Wesentlichen äquivalent zu einem nativen TRAIL-R. Ein Beispiel ist ein abweichendes TRAIL-R, das TRAIL mit im Wesentlichen derselben Bindungsaffinität bindet wie ein natives TRAIL-R. Die Bindungsaffinität kann mit herkömmlichen Verfahren gemessen werden, wie z. B. im US-Patent Nr. 5,512,457 beschrieben.

[0039] Abweichende Aminosäuresequenzen können konservative Substitution(en) enthalten, was bedeutet, dass ein oder mehrere Aminosäurereste eines nativen TRAIL-R durch einen unterschiedlichen Rest ersetzt werden, aber dass das konservativ substituierte TRAIL-R-Polypeptid eine gewünschte biologische Aktivität des nativen Proteins (z. B. die Fähigkeit, TRAIL zu binden) behält. Eine gegebene Aminosäure kann durch einen Rest ersetzt werden, der ähnliche physikalisch-chemische Merkmale besitzt. Beispiele für konservative Substitutionen beinhalten die Substitution eines aliphatischen Rests durch einen anderen, wie zum Beispiel Ile, Val, Leu oder Ala durch eine andere, oder Substitutionen eines polaren Rests durch einen anderen, wie zum Beispiel zwischen Lys und Arg; Glu und Asp oder Gln und Asn. Andere konservative Substitutionen, z. B. die die Substitutionen ganzer Regionen mit ähnlichen Hydrophobizitätsmerkmalen einschließen, sind gut bekannt.

[0040] In einem weiteren Beispiel für Varianten können Sequenzen, die Cys-Reste codieren, welche für die biologische Aktivität nicht wesentlich sind, geändert werden, um so zu bewirken, dass die Cys-Reste gelöscht oder durch andere Aminosäuren ersetzt werden, wodurch die Bildung fehlerhafter intermolekularer Disulfidbrücken bei der Renaturierung verhindert wird. Bestimmte Rezeptoren der TNF-R-Familie enthalten cysteinreiche Wiederholungsmotive in ihren extrazellulären Domänen (Marsters et al., J. Biol. Chem. 267:5747–5750, 1992). Von diesen Wiederholungen nimmt man an, dass sie für die Ligandenbindung wichtig sind. Zur Erläuterung sei angeführt, dass Marsters et al., siehe oben, berichteten, dass lösliche TNF-R Typ 1 Polypeptide, denen eine der Wiederholungen fehlt, eine zehnfache Verringerung in der Bindungsaffinität zu TNF α und TNF β zeigten; die Deletion der zweiten Wiederholung führte zu einem vollständigen Verlust der nachweisbaren Bindung der Liganden. Das menschliche TRAIL-R der SEQ ID NR. 2 enthält zwei solche cysteinreichen Wiederholungen, wobei die erste die Reste 94 bis 137 und die zweite die Reste 138 bis 178 enthält. Cysteinreste innerhalb dieser cysteinreichen Domänen bleiben vorteilhafterweise in den TRAIL-R-Varianten ungeändert, wenn die Beibehaltung der TRAIL-R-Bindungsaktivität gewünscht wird.

[0041] Andere Varianten werden durch Modifizierung benachbarter zweibasischer Aminosäurereste hergestellt, um die Expression in Hefesystemen zu verstärken, in denen KEX2-Proteaseaktivität vorhanden ist. EP 212,914 offenbart die Verwendung der ortsspezifischen Mutagenese zur Inaktivierung der KEX2-Proteaseverarbeitungsstelle in einem Protein. Die KEX2-Proteaseverarbeitungsstellen werden durch Deletieren, Addieren oder Substituieren von Resten inaktiviert, um Arg-Arg-, Arg-Lys- und Lys-Arg-Paare zu indeln, um das Auftreten dieser benachbarten basischen Reste zu beseitigen. Reifes menschliches TRAIL-R enthält solche benachbarten basischen Restpaare bei den Aminosäuren 72–73, 154–155, 322–323, 323–324 und 359–360 der SEQ ID NR. 2. Lys-Lys-Paarungen sind wesentlich weniger anfällig für die KEX2-Spaltung, und die Umwandlung von Arg-Lys oder Lys-Arg in Lys-Lys stellt eine konservative und bevorzugte Herangehensweise an die Inaktivierung von KEX2-Stellen dar.

[0042] TRAIL-R-Polypeptide, einschließlich Varianten und Fragmenten davon, können auf biologische Aktivität in einem geeigneten Test untersucht werden. Die Fähigkeit eines TRAIL-R-Polypeptids, TRAIL zu binden, kann in herkömmlichen Bindungstests bestätigt werden, wofür Beispiele unten beschrieben werden.

Expressionssysteme

[0043] Die vorliegende Erfindung stellt auch rekombinante Klonierungs- und Expressionsvektoren, die TRAIL-R-DNA enthalten, sowie die Wirtszellen, die die rekombinanten Vektoren enthalten, bereit. Expressionsvektoren, die TRAIL-R-DNA aufweisen, können zur Herstellung von durch die DNA codierten TRAIL-R-Polypeptiden verwendet werden. Ein Verfahren zum Herstellen von TRAIL-R-Polypeptiden, welches das Kultivieren von Wirtszellen, die mit einem rekombinanten, TRAIL-R codierenden Expressionsvektor transformiert sind, unter Bedingungen, die die Expression von TRAIL-R fördern, und anschließend die Rückgewinnung der exprimierten TRAIL-R-Polypeptide aus der Kultur aufweist. Der Fachmann wird erkennen, dass das Verfahren zur Reinigung des exprimierten TRAIL-R in Abhängigkeit von solchen Faktoren, wie der Art der verwendeten Wirtszellen und ob das TRAIL-R membrangebunden oder eine lösliche Form ist, die aus der Wirtszelle sezerniert wird, variieren wird.

[0044] Es kann jedes geeignete Expressionssystem eingesetzt werden. Die Vektoren enthalten eine DNA, die ein TRAIL-R-Polypeptid codiert, das funktionsfähig mit geeigneten regulatorischen Transkriptions- oder Translation-Nucleotidsequenzen verbunden ist, wie zum Beispiel denjenigen, die aus einem Säugetier-, Mikroben-, Virus- oder Insekten-Gen abgeleitet wurden. Beispiele für regulatorische Sequenzen sind Transkriptionspromotoren, Operatoren oder Verstärker, eine ribosomale mRNA-Bindungsstelle und geeignete Sequenzen, die die Transkriptions- und Translations-initiierung und -termination regulieren. Nucleotidsequenzen werden funktionsfähig verbunden, wenn sich die regulatorische Sequenz funktionell auf die TRAIL-R-DNA-Sequenz bezieht. So wird eine Promotor-Nucleotidsequenz funktionsfähig mit einer TRAIL-R-DNA-Sequenz verbunden, wenn die Promotor-Nucleotidsequenz die Transkription der TRAIL-R-DNA-Sequenz kontrolliert. Ein Replikationsstartpunkt, der die Fähigkeit zur Replikation in den gewünschten Wirtszellen verleiht, und ein Selektionsgen, durch welches Transformanten identifiziert werden, werden im allgemeinen in den Expressionsvektor integriert.

[0045] Weiters kann eine Sequenz, die ein geeignetes Signalpeptid (nativ oder heterolog) codiert, in Expressionsvektoren integriert werden. Eine DNA-Sequenz für ein Signalpeptid (sekretorische Leitsequenz) kann im Raster mit der TRAIL-R-Sequenz fusioniert werden, so dass der TRAIL-R anfänglich als Fusionsprotein, das das Signalpeptid enthält, translatiert wird. Ein Signalpeptid, das in der vorgesehenen Wirtszelle funktionsfähig ist, fördert die extrazelluläre Sekretion des TRAIL-R-Polypeptids. Das Signalpeptid wird bei Sekretion des TRAIL-R aus der Zelle vom TRAIL-R-Polypeptid abgespalten.

[0046] Geeignete Wirtszellen für die Expression von TRAIL-R-Polypeptiden schließen Prokaryonten, Hefe oder höhere eukaryotische Zellen ein. Säugetier- oder Insektenzellen werden im Allgemeinen für die Verwendung als Wirtszellen bevorzugt. Geeignete Klonierungs- und Expressionsvektoren zur Verwendung mit bakteriellen, Pilz-, Hefe- und Säugetier-zellulären Wirten werden zum Beispiel in Pouwels et al., Cloning Vectors: A Laboratory Manual, Elsevier, New York (1985), beschrieben. Zellfreie Translationssysteme könnten ebenfalls zur Herstellung von TRAIL-R-Polypeptiden unter Verwendung von RNAs, die aus hierin offenbarten DNA-Konstrukten abgeleitet wurden, eingesetzt werden.

[0047] Prokaryonten schließen gram-negative oder gram-positive Organismen, zum Beispiel *E. coli* oder *Bacilli*, ein. Geeignete prokaryotische Wirtszellen für die Transformation schließen zum Beispiel *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium* und verschiedene andere Arten innerhalb der Gattungen *Pseudomonas*, *Streptomyces* und *Staphylococcus* ein. In einer prokaryotischen Wirtszelle, wie zum Beispiel *E. coli*, kann ein TRAIL-R-Polypeptid einen N-terminalen Methioninrest zur Erleichterung der Expression des rekombinanten Polypeptids in der prokaryotischen Wirtszelle enthalten. Das N-terminale Met kann vom exprimierten rekombinanten TRAIL-R-Polypeptid abgespalten werden.

[0048] Expressionsvektoren zur Verwendung in prokaryotischen Wirtszellen beinhalten im allgemeinen ein oder mehrere phänotypische selektierbare Markergene. Ein phänotypisches selektierbares Markergen ist, zum Beispiel, ein Gen, das ein Protein codiert, welches Antibiotikaresistenz verleiht oder für einen autotrophen Bedarf sorgt. Beispiele für nützliche Expressionsvektoren für prokaryotische Wirtszellen sind diejenigen, die aus kommerziell erhältlichen Plasmiden abgeleitet werden, wie zum Beispiel dem Klonierungsvektor pBR322 (ATCC 37017). pBR322 enthält Gene für die Ampicillin- und Tetracyclinresistenz und liefert so ein einfaches Mittel zur Identifizierung transformierter Zellen. Ein geeigneter Promotor und eine TRAIL-R-DNA-Sequenz werden in den pBR322-Vektor eingeführt. Andere kommerziell erhältliche Vektoren sind zum Beispiel pKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden) und pGEM1 (Promega Biotec, Madison, WI, USA).

[0049] Häufig für rekombinante prokaryotische Wirtszell-Expressionsvektoren verwendete Promotorsequenzen sind u. a. β -Lactamase (Penicillinase), das Lactose-Promotorsystem (Chang et al., Nature 275:615, 1978, und Goeddel et al., Nature 281:544, 1979), Tryptophan (trp)-Promotorsystem (Goeddel et al., Nucl. Acids Res. 8:4057, 1980, und EP-A-36776) und der tac-Promotor (Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, S. 412, 1982). Ein besonders nützliches prokaryotisches Wirtszell-Expressionssystem verwendet einen Phagen λ -P_L-Promotor und eine cl857ts thermolabile Repressorsequenz. Von der American Type Culture Collection erhältliche Plasmidvektoren, die Derivate des λ -P_L-Promotors enthalten, schließen das Plasmid pHUB2 (im *E. coli* JMB9, ATCC 37092, vorhanden) und pPLc28 (im *E. coli* RR1, ATCC 53082, vorhanden) ein.

[0050] TRAIL-R kann alternativ in Hefewirtszellen exprimiert werden, vorzugsweise der Gattung *Saccharomyces* (z. B. *S. cerevisiae*). Andere Hefe-Gattungen, wie zum Beispiel *Pichia* oder *Kluyveromyces*, können ebenfalls eingesetzt werden. Hefektoren enthalten oft einen Startpunkt der Replikationssequenz von einem 2 μ Hefe-Plasmid, eine autonom replizierende Sequenz (ARS), eine Promotorregion, Sequenzen für die Polyadenylierung, Sequenzen für die Transkriptionstermination und ein selektierbares Markergen. Geeignete Promotorsequenzen für Hefektoren sind u. a. Promotoren für Metallothionein, 3-Phosphoglyceratkinase (Hitzemann 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-Phosphat-isomerase, 3-Phosphoglyceratmutase, Pyruvatkinase, Triosephosphatisomerase, Phosphoglucoseisomerase und Glucokinase. Andere geeignete Vektoren und Promotoren zur Verwendung bei der Hefeexpression werden weiters in Hitzeman, EPA-73,657, beschrieben. Eine weitere Alternative ist der durch Glucose hemmbare ADH2-Promotor, der von Russell et al. (J. Biol. Chem. 258:2674, 1982) und Beier et al. (Nature 300:724, 1982) beschrieben wird. Shuttle-Vektoren, die sowohl in Hefe als auch in *E. coli* replizierbar sind, können durch Einfügen von DNA-Sequenzen aus pBR322 zur Selektion und Replikation in *E. coli* (Amp^r-Gen und Replikationsstartpunkt) in die oben beschriebenen Hefektoren konstruiert werden.

[0051] Die Hefe- α -Faktor-Leitsequenz kann zur Lenkung der Sekretion des TRAIL-R-Polypeptids eingesetzt werden. Die α -Faktor-Leitsequenz wird oft zwischen der Promotorsequenz und der Strukturgensequenz eingefügt. Siehe z. B. Kurjan et al., Cell 30:933, 1982, und Bitter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:5330, 1984. Andere Leitsequenzen, die sich zur Erleichterung der Sekretion rekombinanter Polypeptide aus Hefewirten eignen, sind den Fachleuten auf diesem Gebiet bekannt. Eine Leitsequenz kann in der Nähe ihres 3'-Endes so modifiziert werden, dass sie eine oder mehrere Restriktionsstellen enthält. Dies erleichtert die Fusion der Leitsequenz mit dem Strukturgen.

[0052] Hefe-Transformationsprotokolle sind den Fachleuten auf diesem Gebiet bekannt. Ein solches Protokoll wird von Hinnen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:1929, 1978, beschrieben. Das Protokoll von Hinnen et al. wählt nach Trp⁺-Transformanten in einem Selektionsmedium aus, wobei das Selektionsmedium aus 0,67% Hefestickstoffbasis, 0,5% Caseinhydrolysat, 2% Glucose, 10 µg/ml Adenin und 20 µg/ml Uracil besteht. Hefewirtszellen, die mit Vektoren, welche eine ADH2 Promotorsequenz enthalten, transformiert wurden, können in einem „reichen“ Medium zur Induzierung der Expression gezüchtet werden. Ein Beispiel für ein reiches Medium ist jenes, das aus 1% Hefeextrakt, 2% Pepton und 1% Glukose, ergänzt mit 80 µg/ml Adenin und 80 µg/ml Uracil, besteht. Die Derepression des ADH2-Promotors tritt auf, wenn die Glucose im Medium erschöpft ist.

[0053] Säugetier- oder Insekten-Wirtszellkultursysteme können ebenfalls eingesetzt werden, um rekombinante TRAIL-R-Polypeptide zu exprimieren. Ein Überblick über Bacculovirus-Systeme zur Herstellung von heterologen Proteinen in Insektenzellen wird von Luckow und Summers, *Bio/Technology* 6:47 (1988), gegeben. Etablierte Zelllinien, die von Säugetieren abstammen, können ebenfalls eingesetzt werden. Beispiele für geeignete Säugetierwirtszelllinien sind u. a. die COS-7-Linie von Affennierenzellen (ATCC CRL 1651) (Gluzman et al., *Cell* 23:175, 1981), L-Zellen, C127-Zellen, 3T3-Zellen (ATCC CCL 163), Ovarialzellen des chinesischen Hamsters (CHO-Zellen), HeLa-Zellen und BHK-Zelllinien (ATCC CRL 10) und die CV1/EBNA-Zelllinie, die aus der Nierenzelllinie CV1 des afrikanischen grünen Affen abgeleitet wurde, wie von McMahan et al. (*EMBO J.* 10:2821, 1991) beschrieben wird.

[0054] Transkription- und Translation-Kontrollsequenzen für Säugetierwirtszell-Expressionsvektoren können aus viralen Genomen herausgeschnitten werden. Häufig verwendete Promotorsequenzen und Verstärkersequenzen werden aus Polyoma-Virus, Adenovirus 2, Simian-Virus 40 (SV40) und humanem Zytomegalovirus abgeleitet. Aus dem SV40-Virusgenom abgeleitete DNA-Sequenzen, zum Beispiel SV40-Ursprung, früher und später Promotor, Verstärker, Spleiß- und Polyadenylierungsstellen, können dazu verwendet werden, andere genetische Elemente zur Expression einer Strukturgenesequenz in einer Säugetierwirtszelle bereitzustellen. Virale frühe und späte Promotoren sind besonders nützlich, weil beide leicht aus einem Virusgenom als Fragment, das auch einen viralen Replikationsstartpunkt enthalten kann (Fiers et al., *Nature* 273:113, 1978), gewonnen werden können. Kleinere oder größere SV40-Fragmente können ebenfalls verwendet werden, vorausgesetzt, dass die annähernd 250 bp große Sequenz, die sich von der Hind III-Stelle bis zu der im SV40-Virusreplikationsstartpunkt gelegenen Bgl I-Stelle erstreckt, enthalten ist.

[0055] Expressionsvektoren zur Verwendung in Säugetierwirtszellen können so konstruiert werden, wie zum Beispiel von Okayama und Berg (*Mol. Cell. Biol.* 3:280, 1983) beschrieben wird. Ein nützliches System zur stabilen Expression auf hohem Niveau von Säugetier-cDNAs in C127 murinen Brustepithelzellen können im Wesentlichen so konstruiert werden, wie von Cosman et al. (*Mol. Immunol.* 23:935, 1986) beschrieben wird. Ein starker Expressionsvektor, PMLSV N1/N4, beschrieben von Cosman et al., *Nature* 312:768, 1984, wurde als ATCC 39890 deponiert. Zusätzliche Säugetierexpressionsvektoren werden in EP-A-0367566 und in WO 91/18982 beschrieben. Alternativ kann der Vektor aus einem Retrovirus abgeleitet werden. Die Überexpression von TRAIL-R voller Länge hat zur Bläschenbildung in Membranen (membrane blebbing) und Kernkondensation transfizierter CV-1/EBNA-Zellen geführt, was anzeigt, dass der Mechanismus für den Zelltod die Apoptose war. Für Wirtszellen, in denen eine solche TRAIL-R-vermittelte Apoptose auftritt, kann ein geeigneter Apoptoseinhibitor in das Expressionssystem aufgenommen werden.

[0056] Zur Hemmung der TRAIL-R-vermittelten Apoptose von Wirtszellen, die rekombinantes TRAIL-R exprimieren, können die Zellen mit einem Expressionsvektor cotransfiziert werden, der ein als Apoptoseinhibitor fungierendes Polypeptid codiert. Expressionsvektoren, die solche Polypeptide codieren, können mit herkömmlichen Verfahren hergestellt werden. Ein anderer Weg schließt die Addition eines Apoptoseinhibitors zum Kulturmedium ein. Die Verwendung von Pockenvirus CrmA, Baculovirus P35, einem C-terminalen Fragment von FADD und dem Tripeptid-Derivat zVAD-fmk, um die Todesrate von Wirtszellen zu reduzieren, wird in Beispiel 6 und 8 erläutert.

[0057] zVAD-fmk (Benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-Fluormethylketon) ist eine Tripeptidbasierende Verbindung, die von Enzyme System Products, Dublin, California, bezogen werden kann. Wie in Beispiel 8 erläutert ist, kann zVAD-fmk dem Medium, in dem TRAIL-R exprimierende Zellen kultiviert werden, zugesetzt werden.

[0058] Das 38 Kilodalton große aus Kuhpocken abgeleitete Protein, dass später CrmA genannt wurde, wird in Pickup et al. (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:7698–7702, 1986) beschrieben. Sequenzinformationen für CrmA werden in **Fig. 4** von Pickup et al., siehe oben, dargestellt. Ein Ansatz zum Herstellen und Reinigen von CrmA-Protein wird in Ray et al. (*Cell* 69:597–604, 1992) beschrieben.

[0059] Ein 35 Kilodalton großes Protein, das vom Nuclear Polyhedrosis-Virus *Autographa californica*, einem Baculovirus, codiert wird, wird in Friesen und Miller (J. Virol. 61:2264–2272, 1987) beschrieben. Sequenzinformationen für dieses Protein, das hierin als Baculovirus p35 bezeichnet wird, werden in Fig. 5 von Friesen und Miller, siehe oben, dargestellt.

[0060] Das die Todesdomäne enthaltende cytoplasmatische Protein FADD (auch als MORT 1 bekannt) wird in Boldin et al. (J. Biol. Chem. 270:7795–7798, 1995) beschrieben. Es wurde berichtet, dass FADD direkt oder indirekt sich mit der cytoplasmatischen Todesdomäne bestimmter Rezeptoren verknüpft, die die Apoptose vermitteln (Boldin et al., Cell 85:803–815, Juni 1996; Hsu et al., Cell 84:299–308, Januar 1996).

[0061] In einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung werden verkürzte FADD-Polypeptide, die die Todesdomäne (im C-terminalen Teil des Proteins) enthalten, denen aber die N-terminale Region fehlt, der die Apoptoseeffektorfunktionen zugeschrieben wurden, zur Reduzierung der Apoptose eingesetzt. Die Verwendung bestimmter FADD-Deletionsmutanten-Polypeptide, die am N-Terminus verkürzt sind, um den Zelltod von Zellen, die andere Apoptose induzierende Rezeptoren exprimieren, zu inhibieren, wird in Hsu et al. (Cell 84:299–308, 1996) beschrieben.

[0062] Der Ansatz wird in Beispiel 8 erläutert, welches ein geeignetes FADD-dominant negatives (FADD-DN) Polypeptid verwendet, das eine Aminosäuresequenz besitzt, die den Aminosäuren 117 bis 245 der MORT1-Aminosäuresequenz entspricht, welche in Boldin et al. (J. Biol. Chem. 270:7795–7798, 1995) dargestellt wird. In Beispiel 8 wurden Zellen mit einem TRAIL-R codierenden Expressionsvektor und mit einem Expressionsvektor, der das oben beschriebene Flag®-Peptid, welches mit dem N-Terminus des FADD-DN-Polypeptids fusioniert ist, codiert, cotransfiziert.

[0063] Unabhängig von der Bindung an die Theorie ist eine mögliche Erklärung, dass die C-terminalen Fragmente von FADD sich mit der intrazellulären Todesdomäne des Rezeptors verbinden, ihnen aber der N-terminale Teil des Proteins, der zur Ausführung der Apoptose notwendig ist, fehlt (Hsu et al., Cell 84:299–308, Januar 1996; Boldin et al., Cell 85:803–815, Juni 1996). Das verkürzte FADD kann dadurch die Verbindung des endogenen FADD voller Länge mit der Todesdomäne des Rezeptors blockieren; folglich wird die Apoptose, die durch solches endogenes FADD eingeleitet wird, gehemmt.

[0064] Andere Apoptoseinhibitoren, die in Expressionssystemen der vorliegenden Erfindung nützlich sind, können in konventionellen Testverfahren identifiziert werden. Ein solcher Test, bei dem Verbindungen auf die Fähigkeit untersucht werden, die Apoptose von TRAIL-R exprimierenden Zellen zu reduzieren, wird in Beispiel 8 beschrieben.

[0065] Pockenvirus CrmA, Baculovirus P35 und zVAD-fmk sind virale Caspaseinhibitoren. Andere Caspaseinhibitoren können auf die Fähigkeit getestet werden, den TRAIL-R-vermittelten Zelltod zu reduzieren.

[0066] Die Verwendung von CrmA, Baculovirus P35 und bestimmten Peptidderivaten (einschließlich zVAD-fmk) als Inhibitoren der Apoptose in bestimmten Zellen/Systemen wird in Sarin et al. (J. Exp. Med. 184:2445–2450, Dezember 1996) diskutiert. Die Rolle von Proteasen der Interleukin-1 β -Umwandlungsenzym (ICE)-Familie in Signaltransduktionskaskaden, die zum programmierten Zelltod führen, und die Verwendung von Inhibitoren solcher Proteasen zur Blockierung der Apoptose wird in Sarin et al., siehe oben, und Muzio et al., Cell 85:817–827, 1996, diskutiert.

[0067] Apoptoseinhibitoren brauchen im allgemeinen nicht zur Expression von TRAIL-R-Polypeptiden eingesetzt zu werden, denen die cytoplasmatische Domäne fehlt (d. h. denen die Region der an der Signaltransduktion beteiligten Region fehlt). Daher brauchen Expressionssysteme zur Herstellung löslicher TRAIL-R-Polypeptide, die nur die extrazelluläre Domäne (oder ein Fragment davon) aufweisen, keinen der oben beschriebenen Apoptoseinhibitoren zu enthalten.

[0068] In Bezug auf die Signalpeptide, die bei der Herstellung von TRAIL-R eingesetzt werden, kann das native Signalpeptid von TRAIL-R durch ein heterologes Signalpeptid oder eine Leitsequenz, falls gewünscht, ersetzt werden. Die Wahl des Signalpeptids oder der Leitsequenz kann von solchen Faktoren, wie der Art der Wirtszellen, in denen das rekombinante TRAIL-R produziert werden soll, abhängen. Zur Erläuterung sei gesagt, dass Beispiele für heterologe Signalpeptide, die in Säugetierwirtszellen funktionstüchtig sind, die Signalsequenz für Interleukin-7 (IL-7), die im US-Patent 4,965,195 beschrieben wird; die Signalsequenz für Interleukin-2-Rezeptor, die in Cosman et al., Nature 312:768 (1984) beschrieben ist; das Interleukin-4-Rezeptorsignalpeptid, das in EP 367,566 beschrieben wird; das im US-Patent 4,968,607 beschriebene Typ I Inter-

leukin-1-Rezeptorsignalpeptid und das in EP 460,846 beschriebene Typ II Interleukin-1-Rezeptorsignalpeptid einschließen.

Oligomere Formen von TRAIL-R

[0069] Erfasst von der vorliegenden Erfindung werden Oligomere, die TRAIL-R-Polypeptide enthalten. TRAIL-R-Oligomere können in der Form von kovalent gebundenen oder nicht kovalent gebundenen Dimeren, Trimeren oder höheren Oligomeren vorliegen.

[0070] Eine Ausführungsform der Erfindung ist auf Oligomere gerichtet, die mehrere TRAIL-R-Polypeptide, die durch kovalente oder nicht kovalente Interaktionen zwischen Peptidresten, die mit den TRAIL-R-Polypeptiden fusioniert sind, verbunden sind, aufweisen. Solche Peptide können Peptidlinker (Spacer) oder Peptide sein, die die Eigenschaft besitzen, die Oligomerisierung zu fördern. Leucin-Zipper und bestimmte Polypeptide, die von Antikörpern abgeleitet sind, sind unter den Peptiden, die die Oligomerisierung von daran angehefteten TRAIL-R-Polypeptiden fördern können, wie unten detaillierter beschrieben ist.

[0071] In speziellen Ausführungsformen weisen die Oligomere zwei bis vier TRAIL-R-Polypeptide auf. Die TRAIL-R-Reste des Oligomers können lösliche Polypeptide sein, wie oben beschrieben ist.

[0072] Als Alternative wird ein TRAIL-R-Oligomer unter Verwendung von Polypeptiden hergestellt, die von Immunglobulinen abgeleitet wurden. Die Herstellung von Fusionsproteinen, die bestimmte heterologe Polypeptide aufweisen, welche mit verschiedenen Teilen von aus Antikörpern abgeleiteten Polypeptiden (einschließlich der Fc-Domäne) fusioniert sind, wurde beschrieben, z. B. von Ashkenazi et al. (PNAS USA 88:10535, 1991) ; Byrn et al. (Nature 344:677, 1990) und Hollenbaugh und Aruffo ("Construction of Immunglobulin Fusion Proteins" in Current Protocols in Immunology, Ergänzung 4, S. 10.19.1–10.19.11, 1992).

[0073] Eine Ausführungsform der Erfindung ist auf ein TRAIL-R-Dimer gerichtet, das zwei Fusionsproteine enthält, welche durch die Fusion von TRAIL-R mit der Fc-Region eines Antikörpers erzeugt wurden. Eine Genfusion, die das TRAIL-R/Fc-Fusionsprotein codiert, wird in einen geeigneten Expressionsvektor eingeführt. TRAIL-R/Fc-Fusionsproteine werden in Wirtszellen exprimiert, die mit dem rekombinanten Expressionsvektor transformiert wurden, und konnten sich ganz ähnlich wie Antikörpermoleküle zusammenschließen, woraufhin sich Disulfidbrücken zwischen den Fc-Resten bilden, um ein zweiwertiges TRAIL-R zu ergeben.

[0074] Es werden Fusionsproteine hierin bereitgestellt, die ein TRAIL-R-Polypeptid enthalten, welches mit einem aus einem Antikörper abgeleiteten Fc-Polypeptid fusioniert ist. DNA, die solche Fusionsproteine codiert, sowie Dimere, die zwei Fusionsproteine enthalten, welche über Disulfidbrücken zwischen den Fc-Anteilen derselben verbunden sind, werden ebenfalls bereitgestellt. Der Begriff "Fc-Polypeptid", wie hierin verwendet, beinhaltet native und Muteinformen von Polypeptiden, die von der Fc-Region eines Antikörpers abgeleitet sind. Verkürzte Formen solcher Polypeptide, die die Gelenkregion (hinge region), welche die Dimerisation fördern, enthalten, werden ebenfalls einbezogen.

[0075] Ein geeignetes Fc-Polypeptid, das in der PCT-Anmeldung WO 93/10151 beschrieben wird, ist ein einkettiges Polypeptid, das sich von der N-terminalen Gelenkregion bis zum nativen C-Terminus der Fc-Region eines menschlichen IgG1-Antikörpers erstreckt. Ein weiteres nützliches Fc-Polypeptid ist das Fc-Mutein, das im US-Patent 5,457,035 und in Baum et al. (EMBO J. 13:3992–4001, 1994) beschrieben wird. Die Aminosäuresequenz dieses Muteins ist identisch mit der der nativen Fc-Sequenz, welche in WO 93/10151 vorgestellt wird, außer dass Aminosäure 19 von Leu in Ala, Aminosäure 20 von Leu in Glu und Aminosäure 22 von Gly in Ala geändert wurde. Das Mutein weist eine verringerte Affinität für Fc-Rezeptoren auf.

[0076] In anderen Ausführungsformen kann TRAIL-R für den variablen Teil einer Antikörperschweren oder -leichten Kette verwendet werden. Wenn Fusionsproteine sowohl mit schweren als auch mit leichten Ketten eines Antikörpers hergestellt werden, ist es möglich, ein TRAIL-R-Oligomer mit immerhin vier extrazellulären TRAIL-R-Regionen zu bilden.

[0077] Alternativ ist das Oligomer ein Fusionsprotein, das mehrere TRAIL-R-Polypeptide, mit oder ohne Peptidlinker (Spacer-Peptide), aufweist. Unter den geeigneten Peptidlinkern sind die in den US-Patenten 4,751,180 und 4,935,233 beschriebenen. Eine DNA-Sequenz, die einen gewünschten Peptidlinker codiert, kann zwischen und innerhalb desselben Leserasters wie die DNA-Sequenzen, die TRAIL-R codieren, eingefügt werden, wobei jedes geeignete konventionelle Verfahren verwendet werden kann. Zum Beispiel kann ein chemisch synthetisiertes Oligonucleotid, das den Linker codiert, zwischen Sequenzen, die TRAIL-R codieren, ligiert wer-

den. In speziellen Ausführungsformen weist ein Fusionsprotein zwei bis vier lösliche TRAIL-R-Polypeptide, die durch Peptidlinker getrennt sind, auf.

[0078] Ein weiteres Verfahren zum Herstellen von oligomerem TRAIL-R beinhaltet die Verwendung eines Leucin-Zippers. Leucin-Zipper-Domänen sind Peptide, welche die Oligomerisation von Proteinen, in welchen sie gefunden werden, fördern. Leucin-Zipper-Domänen wurden ursprünglich in mehreren DNA-bindenden Proteinen identifiziert (Landschulz et al., Science 240:1759, 1988), und sie wurden seit dem in einer Reihe von verschiedenen Proteinen gefunden. Unter den bekannten Leucin-Zippnern gibt es natürlich vorkommende Peptide und Derivate derselben, die dimerisieren oder trimerisieren. Beispiele für Leucin-Zipper-Domänen, die für die Herstellung löslicher oligomerer Proteine geeignet sind, werden in der PCT-Anmeldung WO 94/10308 beschrieben; und der Leucin-Zipper, der von dem oberflächenaktiven Lungenprotein D (SPD) abgeleitet ist, wie in Hoppe et al. (FEBS Letters 344:191, 1994) beschrieben ist. Die Verwendung eines modifizierten Leucin-Zippers, der eine stabile Trimerisierung eines heterologen Proteins ermöglicht, das damit fusioniert ist, wird in Fanslow et al. (Semin. Immunol. 6:267–278, 1994) beschrieben. Rekombinante Fusionsproteine, die ein lösliches TRAIL-R-Polypeptid, welches mit einem Leucin-Zipper-Peptid fusioniert ist, aufweisen, werden in geeigneten Wirtszellen exprimiert, und das sich bildende lösliche oligomere TRAIL-R wird aus dem Kulturüberstand gewonnen.

[0079] Oligomerer TRAIL-R besitzt zweiwertige, dreiwertige usw. Bindungsstellen für TRAIL. Die oben beschriebenen Fusionsproteine, die Fc-Anteile (und daraus gebildete Oligomere) aufweisen, bieten den Vorteil der leichteren Reinigung durch Affinitätschromatographie über Protein A- oder Protein G-Säulen. DNA-Sequenzen, die oligomeren TRAIL-R oder für die Herstellung von TRAIL-R-Oligomeren nützliche Fusionsproteine codieren, werden hierin bereitgestellt.

Tests

[0080] TRAIL-R-Proteine (einschließlich Fragmenten, Varianten, Oligomeren und anderen Formen von TRAIL-R) können in einem geeigneten Test, wie zum Beispiel einem herkömmlichen Bindungstest, auf die Fähigkeit untersucht werden, TRAIL zu binden. Zur Veranschaulichung: TRAIL-R kann mit einem nachweisbaren Reagens (z. B. Radionuklid, Chromophor, Enzym, das eine colorimetrische oder fluorimetrische Reaktion und dergleichen katalysiert) markiert werden. Das markierte TRAIL-R wird in Kontakt mit TRAIL exprimierenden Zellen gebracht. Die Zellen werden dann gewaschen, um ungebundenes markiertes TRAIL-R zu entfernen, und das Vorliegen von zellgebundener Markierung wird mit einer geeigneten Technik, die entsprechend der Art der Markierung gewählt wird, bestimmt.

[0081] Ein Beispiel für ein Bindungstestverfahren ist folgendes. Es wird ein rekombinanter Expressionsvektor, der TRAIL-cDNA enthält, konstruiert, wie z. B. in der PCT-Anmeldung WO 97/01633 beschrieben ist. DNA- und Aminosäuresequenzinformationen für menschliches und Mäuse-TRAIL werden in WO 97/01633 dargestellt. TRAIL enthält eine N-terminale cytoplasmatische Domäne, eine Transmembranregion und eine C-terminale extrazelluläre Domäne. CV1-EBNA-1-Zellen in 10 cm² großen Schalen werden mit dem rekombinanten Expressionsvektor transfiziert. CV1-EBNA-1-Zellen (ATCC CRL 10478) exprimieren konstitutiv EBV-Kernantigen-1, angetrieben vom unmittelbar frühen CMV Enhancer/Promotor. CV1-EBNA-1 wurde von der Nierenzelllinie CV-1 (ATCC CCL 70) afrikanischer grüner Affen abgeleitet, wie von McMahan et al. (EMBO J. 10:2821, 1991) beschrieben ist.

[0082] Die transfizierten Zellen werden 24 Stunden lang kultiviert, und die Zellen in jeder Schale werden dann auf eine Platte mit 24 Vertiefungen aufgeteilt. Nach der Kultivierung für weitere 48 Stunden werden die transfizierten Zellen (etwa 4×10^4 Zellen/Vertiefung) mit BMNFD medium gewaschen, was ein Bindemedium ist (RPMI 1640, das 25 mg/ml Rinderserumalbumin, 2 mg/ml Natriumazid, 20 mM Hepes pH 7,2 enthält), dem 50 mg/ml fettfreie Trockenmilch zugesetzt wurde. Die Zellen werden dann 1 Stunde bei 37°C mit verschiedenen Konzentrationen eines löslichen TRAIL-R/Fc-Fusionsproteins inkubiert. Die Zellen werden dann gewaschen und mit einer konstanten Sättigungskonzentration eines ¹²⁵I-Maus-Antihuman-IgG im Bindemedium unter sanfter Agitation für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Nach ausgiebigem Waschen werden die Zellen durch Trypsinierung freigesetzt.

[0083] Das oben eingesetzte Maus-Antihuman-IgG ist gegen die Fc-Region von menschlichem IgG gerichtet und kann von Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA, bezogen werden. Der Antikörper wird unter Verwendung der Standard-Chloramin-T-Methode radioiodiert. Der Antikörper bindet sich an den Fc-Anteil eines an die Zellen gebundenen TRAIL-R/Fc-Proteins. In allen Tests wird die unspezifische Bindung

von ^{125}I -Antikörper in Abwesenheit von TRAIL-R/Fc sowie in Gegenwart von TRAIL-R/Fc und einem 200fachen molaren Überschuss von unmarkiertem Maus-Antihuman-IgG-Antikörper untersucht.

[0084] Zellgebundener ^{125}I -Antikörper wird mit einem Packard Autogamma-Zähler quantifiziert. Affinitätsberechnungen (Scatchard, Ann. N. Y. Acad. Sci. 51:660, 1949) wurden auf RS/1 (BBN Software, Boston, MA), welches auf einem Microvax-Computer lief, ausgeführt.

[0085] Eine weitere geeignete Art von Bindungstest ist ein kompetitiver Bindungstest. Zur Veranschaulichung: Die biologische Aktivität einer TRAIL-R-Variante kann durch Untersuchen der Fähigkeit der Variante, mit einem nativen TRAIL-R um die Bindung an TRAIL zu konkurrieren, bestimmt werden.

[0086] Kompetitive Bindungstests können mit herkömmlicher Methodik ausgeführt werden. Die Reagenzien, die in kompetitiven Bindungstests eingesetzt werden können, schließen radiomarkiertes TRAIL-R und intakte Zellen, die TRAIL (endogen oder rekombinant) auf der Zelloberfläche exprimieren, ein. Zum Beispiel kann ein radiomarkiertes lösliches TRAIL-R-Fragment dazu verwendet werden, um mit einer löslichen TRAIL-R-Variante um die Bindung an Zelloberflächen-TRAIL zu konkurrieren. Anstelle intakter Zellen kann man ein lösliches TRAIL/Fc-Fusionsprotein, das durch die Wechselwirkung von Protein A oder Protein G (auf der festen Phase) mit dem Rest an eine feste Phase gebunden ist, Fc einsetzen. Zu den verfügbaren Chromatographiesäulen, die Protein A und Protein G enthalten, gehören die von Pharmacia Biotech, Inc., Piscataway, NJ. Eine weitere Art von kompetitivem Bindungstest verwendet radiomarkiertes lösliches TRAIL, wie zum Beispiel lösliches TRAIL/Fc-Fusionsprotein, und intakte, TRAIL-R exprimierende Zellen. Qualitative Ergebnisse können durch kompetitive Autoradiographieplatten-Bindungstests erhalten werden, während Scatchard-Plots (Scatchard, Ann. N. Y. Acad. Sci. 51:660, 1949) zum Gewinnen quantitativer Ergebnisse genutzt werden können.

[0087] Eine weitere Art von Test für die biologische Aktivität beinhaltet das Testen eines TRAIL-R-Polypeptids auf die Fähigkeit, die TRAIL-vermittelte Apoptose von Zielzellen zu blockieren, wie zum Beispiel die menschliche leukämische T-Zelllinie, die als Jurkat-Zellen bekannt sind. Die TRAIL-vermittelte Apoptose der Zelllinie, die als Jurkat-Klon E6-1 (ATCC TIB 152) bezeichnet wird, wird in Testverfahren demonstriert, die in der PCT-Anmeldung WO 97/01633 beschrieben werden.

Verwendungen von TRAIL-R

[0088] Zu den Verwendungen von TRAIL-R gehören, ohne jedoch auf diese beschränkt zu sein, folgende. Bestimmte dieser Verwendungen von TRAIL-R ergeben sich aus seiner Fähigkeit, TRAIL zu binden.

[0089] TRAIL-R findet als Proteinreinigungsmittel Verwendung. TRAIL-R-Polypeptide können an ein festes Trägermaterial angeheftet und zur Reinigung von TRAIL-Proteinen durch Affinitätschromatographie verwendet werden. In speziellen Ausführungsformen wird ein TRAIL-R-Polypeptid (in einer hierin beschriebenen Form, die TRAIL binden kann) mit konventionellen Verfahren an ein festes Trägermaterial angeheftet. Beispielsweise stehen Chromatographiesäulen, welche funktionelle Gruppen enthalten, die mit funktionellen Gruppen auf Aminosäureseitenketten von Proteinen reagieren, zur Verfügung (Pharmacia Biotech, Inc., Piscataway, NJ). In einer Alternative wird ein TRAIL-R/Fc-Protein durch Wechselwirkung mit dem Fc-Anteil an Protein A oder Protein G enthaltende Chromatographiesäulen angeheftet.

[0090] TRAIL-R-Proteine finden auch Verwendung zur Messung der biologischen Aktivität von TRAIL-Proteinen in Bezug auf ihre Bindungsaffinität zu TRAIL-R. TRAIL-R-Proteine können daher von denjenigen verwendet werden, die "Qualitätssicherungsuntersuchungen" durchführen, z. B. zur Überwachung der Lagerfähigkeit und Stabilität von TRAIL-Protein unter verschiedenen Bedingungen. Zur Erläuterung sei gesagt, dass TRAIL-R in einer Bindungsaffinitätsstudie zur Messung der biologischen Aktivität eines TRAIL-Protein eingesetzt werden kann, das bei verschiedenen Temperaturen gelagert oder in verschiedenen Zellarten produziert wurde. TRAIL-R kann auch zur Bestimmung verwendet werden, ob die biologische Aktivität nach einer Modifizierung eines TRAIL-Proteins (z. B. durch chemische Modifizierung, Verkürzung, Mutation, usw.) beibehalten wird. Die Bindungsaffinität des modifizierten TRAIL-Proteins zu TRAIL-R wird mit der von einem unmodifizierten TRAIL-Protein verglichen, um jegliche negative Auswirkungen der Modifikation auf die biologische Aktivität von TRAIL festzustellen. Die biologische Aktivität eines TRAIL-Proteins kann so ermittelt werden, bevor es zum Beispiel in einer Forschungsstudie verwendet wird.

[0091] TRAIL-R findet auch bei der Reinigung oder Identifizierung von Zellen Verwendung, die TRAIL auf der Zelloberfläche exprimieren. TRAIL-R-Polypeptide werden an eine feste Phase, wie zum Beispiel eine Säulen-chromatographiematrix oder ein ähnliches Substrat, gebunden. Zum Beispiel können magnetische Mikroku-

geln mit TRAIL-R beschichtet in einem Inkubationsgefäß durch ein Magnetfeld gehalten werden. Suspensionen von Zellmischungen, die TRAIL exprimierende Zellen enthalten, werden in Kontakt mit der festen Phase, welche TRAIL-R darauf aufweisen, gebracht. Zellen, die TRAIL auf der Zelloberfläche exprimieren, binden sich an das fixierte TRAIL-R, und ungebundene Zellen werden dann gewaschen.

[0092] Alternativ kann TRAIL-R mit einem nachweisbaren Rest konjugiert werden, dann mit Zellen, die auf TRAIL-Expression getestet werden sollen, inkubiert werden. Nach der Inkubation wird ungebundener markierter TRAIL-R entfernt, und das Vorhandensein oder Fehlen des nachweisbaren Restes auf den Zellen wird ermittelt.

[0093] In einer weiteren Alternative werden Mischungen von Zellen, von denen angenommen wird, dass sie TRAIL-Zellen enthalten, mit biotinyliertem TRAIL-R inkubiert. Die Inkubationszeiten betragen normalerweise mindestens eine Stunde, um eine ausreichende Bindung sicherzustellen. Die sich ergebende Mischung wird dann durch eine Säule geschickt, die mit Avidin beschichteten Kügelchen gepackt ist, wodurch die hohe Affinität von Biotin zu Avidin eine Bindung der gewünschten Zellen an die Kügelchen bereitgestellt wird. Verfahren zur Verwendung von Avidin-beschichteten Kügelchen sind bekannt (siehe Berenson et al., J. Cell Biochem. 10D: 239, 1986). Das Waschen zur Entfernung von ungebundenem Material und die Freisetzung der gebundenen Zellen werden mittels herkömmlicher Verfahren ausgeführt.

[0094] TRAIL-R-Polypeptide finden auch Verwendung als Träger zur Zufuhr von daran angehefteten Wirkstoffen zu TRAIL tragenden Zellen. TRAIL exprimierende Zellen sind jene, die in Wiley et al. (Immunity, 3:673–682, 1995) identifiziert wurden. TRAIL-R-Proteine können daher dazu verwendet werden, diagnostische oder therapeutische Wirkstoffe zu solchen Zellen (oder zu anderen Zellarten, von denen festgestellt wurde, dass sie TRAIL auf der Zelloberfläche exprimieren) in in vitro- oder in vivo-Verfahren zu liefern.

[0095] Nachweisbare (diagnostische) und therapeutische Wirkstoffe, die an ein TRAIL-R-Polypeptid angeheftet werden können, schließen, ohne jedoch darauf beschränkt zu sein, Toxine, andere cytotoxische Wirkstoffe, Medikamente, Radionuklide, Chromophore, Enzyme, die eine colorimetrische oder fluorometrische Reaktion katalysieren, und dergleichen ein, wobei der spezielle Wirkstoff entsprechend der beabsichtigten Anwendung gewählt wird. Zu den Toxinen gehören Ricin, Abrin, Diphtherietoxin, Pseudomonas aeruginosa-Exotoxin A, ribosomale Inaktivierungsproteine, Mycotoxine, wie zum Beispiel Trichothecene und Derivate und Fragmente (z. B. Einzelketten) davon. Radionuklide, die sich für den Diagnostikgebrauch eignen, schließen, ohne jedoch darauf beschränkt zu sein, ¹²³I, ¹³¹I, ^{99m}Tc, ¹¹¹In und ⁷⁶Br ein. Beispiele für Radionuklide, die sich für den therapeutischen Gebrauch eignen, sind ¹³¹I, ²¹¹At, ⁷⁷Br, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ²¹²Pb, ²¹²Bi, ¹⁰⁹Pd, ⁶⁴Cu und ⁶⁷Cu.

[0096] Solche Wirkstoffe können an das TRAIL-R mit jedem geeigneten herkömmlichen Verfahren angeheftet werden. TRAIL-R, welches ein Protein ist, weist funktionelle Gruppen auf Aminosäure-Seitenketten auf, die mit funktionellen Gruppen auf einem gewünschten Wirkstoff reagieren können, um zum Beispiel kovalente Bindungen zu bilden. Alternativ kann das Protein oder der Wirkstoff derivatisiert werden, um eine gewünschte reaktive funktionelle Gruppe zu erzeugen oder anzuheften. Die Derivatisierung kann die Befestigung eines der bifunktionellen Kopplungsreagenzien einschließen, die zur Befestigung verschiedener Moleküle an Proteinen zur Verfügung stehen (Pierce Chemical Company, Rockford, Illinois). Es sind eine Reihe von Verfahren zur Radiomarkierung von Proteinen bekannt. Radionuklidmetalle können an TRAIL-R zum Beispiel unter Verwendung eines geeigneten bifunktionellen Chelatbildners befestigt werden.

[0097] Konjugate, die TRAIL-R und einen geeigneten diagnostischen oder therapeutischen Wirkstoff (vorzugsweise kovalent gebunden) aufweisen, werden auf diese Weise hergestellt. Die Konjugate werden in einer Menge, die für die spezielle Anwendung geeignet ist, verabreicht oder auf andere Weise eingesetzt.

[0098] TRAIL-R-DNA und Polypeptide der vorliegenden Erfindung können für die Entwicklung von Behandlungen für alle Störungen verwendet werden, die (direkt oder indirekt) durch defekte oder unzureichende Mengen an TRAIL-R vermittelt werden. TRAIL-R-Polypeptide können einem Säugetier, das an einer solchen Störung leidet, verabreicht werden. Alternativ dazu kann ein Gentherapieansatz benutzt werden. Die Offenlegung von nativen TRAIL-R-Nucleotidsequenzen hierin erlaubt die Detektion defekter TRAIL-R-Gene und die Auswechslung derselben gegen normale TRAIL-R-codierende Gene. Defekte Gene können in in vitro-Diagnostiktests und durch Vergleich einer hierin offengelegten nativen TRAIL-R-Nucleotidsequenz mit der eines TRAIL-R-Gens, die von einer Person gewonnen wurde, bei der das Vorliegen eines Defekts in diesem Gen vermutet wird, festgestellt werden.

[0099] Eine weitere Verwendung des Proteins der vorliegenden Erfindung ist als ein Forschungswerkzeug zur Untersuchung der biologischen Auswirkungen, die aus der Hemmung der TRAIL/TRAIL-R-Wechselwirkungen auf unterschiedliche Zellarten resultieren. TRAIL-R-Polypeptide können auch bei in vitro-Tests zum Nachweis von TRAIL oder TRAIL-R oder der Wechselwirkungen davon eingesetzt werden.

[0100] TRAIL-R kann zur Hemmung einer biologischen Aktivität von TRAIL, in in vitro- oder in vivo-Verfahren, eingesetzt werden. Ein gereinigtes TRAIL-R-Polypeptid kann dazu verwendet werden, die Bindung von TRAIL an endogenes Zelloberflächen-TRAIL-R zu hemmen. Biologische Effekte, die aus der Bindung von TRAIL an endogene Rezeptoren resultieren, werden 50 gehemmt. Es können verschiedene Formen von TRAIL-R eingesetzt werden, einschließlich zum Beispiel der oben beschriebenen TRAIL-R-Fragmente, Oligomere, Derivate und Varianten, die in der Lage sind, TRAIL zu binden. In einer Ausführungsform wird ein lösliches TRAIL-R dazu eingesetzt, um eine biologische Aktivität von TRAIL zu hemmen, z. B. die TRAIL-vermittelte Apoptose spezieller Zellen zu hemmen.

[0101] TRAIL-R kann einem Säugetier verabreicht werden, um eine TRAIL-vermittelte Störung zu behandeln. Solche TRAIL-vermittelten Störungen beinhalten Zustände, die durch TRAIL (direkt oder indirekt) verursacht oder verschlimmert werden.

[0102] TRAIL-R kann in der Behandlung von thrombocytischen Mikroangiopathien nützlich sein. Eine solche Störung ist die thrombotisch thrombozytopenische Purpura (TTP) (Kwann, H. C., Semin. Hematol. 24:71, 1987; Thompson et al., Blood, 80:1890, 1992). Wachsende TTP assoziierte Mortalitätsraten sind von den U. S. Centers for Disease Control berichtet worden (Torok et al., Am. J. Hematol. 50:84, 1995).

[0103] Plasma von Patienten, die an TTP leiden (einschließlich HIV⁺- und HIV⁻-Patienten), induziert die Apoptose von menschlichen Endothelzellen von dermaletem mikrovaskulärem Ursprung, nicht aber diejenigen mit Ursprung in den großen Gefäßen (Laurence et al., Blood, 87:3245, 15. April 1996). Daher nimmt man an, dass Plasma von TTP-Patienten einen oder mehrere Faktoren enthält, die direkt oder indirekt die Apoptose induzieren. Wie in der PCT-Anmeldung WO 97/01633 (die hiermit als Referenz aufgenommen wird) beschrieben ist, ist TRAIL im Serum von TTP-Patienten vorhanden und kann eine Rolle bei der Induzierung der Apoptose von mikrovaskulären Endothelzellen spielen.

[0104] Eine weitere thrombotische Mikroangiopathie ist das hämolytisch-urämische Syndrom (HUS) (Moake, J. L., Lancet, 343:393, 1994; Melnyk et al. (Arch. Intern. Med., 155:2077, 1995; Thompson et al., siehe oben). Eine Ausführungsform der Erfindung ist auf die Verwendung von TRAIL-R zur Behandlung des Zustandes gerichtet, der oft als "Erwachsenen-HUS" bezeichnet wird (obwohl er auch Kinder treffen kann). Eine Störung, die als Kindheits-/Diarrhöeassoziertes HUS bekannt ist, besitzt eine andere Ätiologie als das Erwachsenen-HUS.

[0105] Andere Zustände, die durch die Verklumpung kleiner Blutgefäße gekennzeichnet sind, können mit TRAIL-R behandelt werden. Solche Zustände beinhalten, ohne jedoch auf diese beschränkt zu sein, die folgenden. Man glaubt, dass Herzprobleme, die man bei etwa 5–10% pädiatrischer AIDS-Patienten sieht, die Verklumpung kleiner Blutgefäße einschließt. Über den Zusammenbruch der Mikrovaskulatur im Herzen wurde bei Patienten mit Multipler Sklerose berichtet. Als weiteres Beispiel wird die Behandlung des systemischen Lupus erythematosus (SLE) ins Auge gefasst.

[0106] In einer Ausführungsform wird das Blut oder Plasma eines Patienten in Kontakt mit TRAIL-R außerhalb des Körpers gebracht. Das TRAIL-R kann mit herkömmlichen Verfahren an eine geeignete Chromatographiematrix gebunden werden. Das Blut oder Plasma des Patienten fließt durch eine Chromatographiesäule, die an die Matrix gebundenes TRAIL-R enthält, bevor es in den Patienten zurückgeführt wird. Der immobilisierte Rezeptor bindet TRAIL und entfernt so TRAIL-Protein aus dem Blut des Patienten.

[0107] Alternativ kann TRAIL-R in vivo an einen Patienten verabreicht werden, der an einer thrombotischen Mikroangiopathie leidet. In einer Ausführungsform wird dem Patienten eine lösliche Form von TRAIL-R verabreicht.

[0108] Die vorliegende Erfindung stellt also TRAIL-R zur Behandlung einer thrombotischen Mikroangiopathie bereit. Ein TRAIL-R-Polypeptid kann in in vivo- oder ex vivo-Verfahren (außerhalb des Körpers) eingesetzt werden, um TRAIL-vermittelte Schäden an (z. B. durch die Apoptose von) mikrovaskulären Endothelzellen zu hemmen.

[0109] TRAIL-R kann in Verbindung mit anderen Wirkstoffen, die zur Behandlung einer bestimmten Störung nützlich sind, eingesetzt werden. In einer in vitro-Studie, die von Laurence et al. (Blond, 87:3245, 1996) publiziert wurde, wurde eine gewisse Verringerung der TTP-Plasma-vermittelten Apoptose von mikrovaskulären Endothelzellen unter Verwendung eines Anti-Fas blockierenden Antikörpers, von Aurintricarbonsäure oder normalem Plasma, das an Kryopräzipitat dezimiert war, erreicht.

[0110] Daher kann ein Patient mit einem Wirkstoff, der die Fas-Ligand-vermittelte Apoptose von Endothelzellen hemmt, in Verbindung mit einem Wirkstoff behandelt werden, der die TRAIL-vermittelte Apoptose von Endothelzellen hemmt. In einer Ausführungsform werden einem Patienten, der an einer durch thrombotische Mikroangiopathie gekennzeichneten Störung, wie zum Beispiel TTP oder HUS, leidet, sowohl TRAIL-R als auch Anti-Fas blockierende Antikörper verabreicht. Beispiele für blockierende monoklonale Antikörper, die gegen das Fas-Antigen (CD95) gerichtet sind, werden in der PCT-Anmeldungsschrift Nr. WO 95/10540 beschrieben.

[0111] Eine weitere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist auf die Verwendung von TRAIL-R zur Verringerung des TRAIL-vermittelten Todes von T-Zellen in HIV-Patienten gerichtet. Die Rolle der T-Zellen-Apoptose bei der Entwicklung von AIDS war Gegenstand einer Reihe von Untersuchungen (siehe zum Beispiel Meyaard et al., Science 257:217–219, 1992; Groux et al., J. Exp. Med. 175:331, 1992, und Oyaizu et al., in Cell Activation and Apoptosis in HIV Infection, Andrieu und Lu, Hrsg., Plenum Press, New York, 1995, S. 101–114). Bestimmte Forscher haben die Rolle der Fas-vermittelten Apoptose untersucht; die Beteiligung von Interleukin-1 β -Converting Enzyme (ICE) wurde ebenfalls erkundet (Estaquier et al., Blood 87:4959–4966, 1996; Mitra et al., Immunology 87:581–585, 1996; Katsikis et al., J. Exp. Med. 181:2029–2036, 1995). Es ist möglich, dass die T-Zell-Apoptose durch mehrere Mechanismen erfolgt.

[0112] Man nimmt an, dass zumindest ein Teil des bei HIV⁺-Patienten festgestellten T-Zelltodes durch TRAIL vermittelt wird. Ohne Bindung an die Theorie nimmt man an, dass ein solcher TRAIL-vermittelter T-Zelltod durch den Mechanismus, der als aktivierungsinduzierter Zelltod (AICD) bekannt ist, erfolgt.

[0113] Aktivierte menschliche T-Zellen werden induziert, um den programmierten Zelltod (Apoptose) bei Auslösung durch den CD3/T-Zellrezeptorkomplex zu durchlaufen, ein Prozess, der aktivierungsinduzierter Zelltod (AICD) genannt wird. Es wurde über den AICD von CD4⁺-T-Zellen, die aus HIV-infizierten asymptomatischen Personen isoliert wurden, berichtet (Groux et al., siehe oben). Daher kann AICD eine Rolle in der Verarmung von CD4⁺-T-Zellen und dem Fortschreiten zu AIDS in HIV-infizierten Personen spielen.

[0114] Die vorliegende Erfindung stellt TRAIL-R (vorzugsweise ein Lösliches TRAIL-R-Polypeptid) zur Hemmung des TRAIL-vermittelten T-Zelltodes in HIV⁺-Patienten bereit. In einer Ausführungsform ist der Patient asymptomatisch, wenn die Behandlung mit TRAIL-R beginnt. Wenn gewünscht, können vor der Behandlung einem HIV⁺-Patienten T-Zellen aus peripherem Blut entnommen und auf die Empfänglichkeit für den TRAIL-vermittelten Zelltod mit herkömmlichen Verfahren getestet werden.

[0115] In einer Ausführungsform wird Blut oder Plasma eines Patienten außerhalb des Körpers in Kontakt mit TRAIL-R gebracht. Das TRAIL-R kann mit konventionellen Verfahren an eine geeignete Chromatographiematrix gebunden werden. Das Blut oder Plasma des Patienten fließt durch eine Chromatographiesäule, die TRAIL-R an die Matrix gebunden enthält, bevor es in den Patienten zurückgeführt wird. Das immobilisierte TRAIL-R bindet TRAIL und entfernt so TRAIL-Protein aus dem Blut des Patienten.

[0116] Bei der Behandlung von HIV⁺-Patienten kann TRAIL-R in Kombination mit anderen Inhibitoren der T-Zell-Apoptose eingesetzt werden. Die Fas-vermittelte Apoptose ist auch in Zusammenhang mit dem Verlust von T-Zellen in HIV⁺-Patienten gebracht worden (Katsikis et al., J. Exp. Med. 181:2029–2036, 1995). Daher kann ein Patient, der empfänglich sowohl für den Fas-Ligand (Fas-L)-vermittelten als auch den TRAIL-vermittelten T-Zelltod ist, kann sowohl mit einem Wirkstoff, der TRAIL/TRAIL-R-Wechselwirkungen blockiert, als auch mit einem Wirkstoff, der Fas-L/Fas-Wechselwirkungen blockiert, behandelt werden. Geeignete Wirkstoffe zur Blockierung der Bindung von Fas-L an Fas beinhalten, ohne jedoch auf diese beschränkt zu sein, lösliche Fas-Polypeptide; oligomere Formen von löslichen Fas-Polypeptiden (z. B. Dimere von sFas/Fc), Anti-Fas-Antikörper, die Fas binden, ohne das biologische Signal zu übertragen, das zu Apoptose führt; Anti-Fas-L-Antikörper, die die Bindung von Fas-L an Fas blockieren, und Muteine von Fas-L, die Fas binden, aber nicht das biologische Signal übertragen, das zu Apoptose führt. Die Antikörper, die bei dem Verfahren eingesetzt werden, sind vorzugsweise monoklonale Antikörper. Beispiele für geeignete Wirkstoffe zum Blockieren der Fas-L/Fas-Wechselwirkungen, einschließlich blockierender Anti-Fas-monoklonaler Antikörper, werden in WO 95/10540 beschrieben.

[0117] Es werden hierin Zusammensetzungen, die eine wirksame Menge eines TRAIL-R-Polypeptids der vorliegenden Erfindung enthalten, in Kombination mit anderen Komponenten, wie zum Beispiel einem physiologisch akzeptablen Verdünnungsmittel, Träger oder Hilfsstoff, bereitgestellt. TRAIL-R kann gemäß bekannten Verfahren formuliert werden, die zur Herstellung pharmazeutisch nutzbarer Zusammensetzungen verwendet werden können. TRAIL-R kann in einer Beimischung verwendet werden, entweder als der alleinige Wirkstoff oder mit anderen bekannten Wirkstoffen, die für eine gegebene Indikation geeignet sind, mit pharmazeutisch akzeptablen Verdünnungsmitteln (z. B. Kochsalzlösung, Tris-HCl, Acetat und phosphatgepufferten Lösungen), Konservierungsmitteln (z. B. Thimerosal, Benzylalkohol, Parabens), Emulgatoren, Lösungsvermittlern, Adjuvantien und/oder Trägern. Geeignete Formulierungen für pharmazeutische Zusammensetzungen schließen jene in Remington's Pharmaceutical Sciences, 16. Ausg. 1980. Mack Publishing Company, Easton, PA, beschriebenen ein.

[0118] Weiters können solche Zusammensetzungen TRAIL-R enthalten, das einen Komplex mit Polyethylenglycol (PEG), Metallionen bildet oder in Polymerverbindungen, wie zum Beispiel Polyessigsäure, Polyglycolsäure, Hydrogelen, Dextran usw. eingebaut oder in Liposomen, Mikroemulsionen, Mizellen, ein- oder mehrschichtigen Vesikeln, Erythrozyten-Ghosts oder Sphäroblasten integriert wird. Solche Zusammensetzungen beeinflussen den physikalischen Zustand, Löslichkeit, Stabilität, Rate der in vivo-Freisetzung und Rate der in vivo-Klärung von TRAIL-R und werden daher entsprechend der beabsichtigten Anwendung ausgewählt. Auf der Oberfläche einer Zelle exprimiertes TRAIL-R kann ebenfalls Verwendung finden.

[0119] Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung können ein TRAIL-R-Polypeptid in jeder hierin beschriebenen Form enthalten. In speziellen Ausführungsformen weist die Zusammensetzung ein lösliches TRAIL-R-Polypeptid oder ein Oligomer, das ein lösliches TRAIL-R-Polypeptid aufweist, auf.

[0120] TRAIL-R in einer beliebigen geeigneten Weise verabreicht werden, z. B. topisch, parenteral oder durch Inhalation. Der Begriff "parenteral" schließt die Injektion z. B. auf subkutanem, intravenösem oder intramuskulärem Weg, einschließlich der lokalen Verabreichung, z. B. an der Stelle einer Krankheit oder Verletzung, ein. Die nachhaltige Freisetzung aus Implantaten wird ebenfalls erwogen. Ein Fachmann auf dem entsprechenden Gebiet wird erkennen, dass geeignete Dosierungen abhängig von solchen Faktoren, wie die Art der zu behandelnden Störung, Körpergewicht, Alter und allgemeiner Zustand des Patienten und Verabreichungsweg, variieren werden. Vorläufige Dosen können auf Grund von Tierversuchen bestimmt werden; die Anpassung von Dosierungen für die Verabreichung an Menschen wird gemäß den im Fachgebiet akzeptierten Verfahren vorgenommen.

[0121] Zusammensetzungen, die TRAIL-R-Nucleinsäuren in physiologisch akzeptablen Formulierungen aufweisen, werden ebenfalls erwogen. TRAIL-R-DNA kann zum Beispiel für die Injektion formuliert werden.

Antikörper

[0122] Es werden hierin Antikörper bereitgestellt, die gegen TRAIL-R gerichtet und immunreaktiv zu einem TRAIL-R Polypeptid sind, welches an den TNF-vermittelten Apoptose-induzierenden Liganden (TRAIL) bindet, wobei TRAIL-R dadurch gekennzeichnet ist, dass es die Aminosäuresequenz VPANEGD aufweist, oder an ein Antigen-bindendes Fragment des Antikörpers bindet, wobei der Antikörper unter Verwendung von TRAIL-R-Protein als Immunogen herstellbar ist, und das TRAIL-R-Protein gewinnbar aus Jurkat Zellen ist, nämlich durch Disruptur der Zellen und einem anschließenden Reinigungsschritt welcher Affinitätschromatographie einschließt und eine TRAIL-enthaltende Chromatographie-Matrix, sowie Umkehrphasen HPLC anwendet. Solche Antikörper binden speziell TRAIL-R, indem die Antikörper über die Antigen-Bindungsstelle des Antikörpers (im Gegensatz zu der unspezifischen Bindung) an TRAIL-R binden.

[0123] Das TRAIL-R-Protein, das so wie in Beispiel 1 beschrieben hergestellt wird, kann als Immunogen bei der Herstellung von Antikörpern, die immunreaktiv damit sind, eingesetzt werden.

[0124] Polyklonale und monoklonale Antikörper können mit herkömmlichen Verfahren 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 Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA (1988). Die Herstellung von monoklonalen Antikörpern, die gegen TRAIL-R gerichtet sind, wird in Beispiel 4 weiter erläutert.

[0125] Antigen-bindende Fragmente solcher Antikörper, die mit herkömmlichen Verfahren hergestellt werden können, werden ebenfalls von der vorliegenden Erfindung erfasst. Beispiele für solche Fragmente schließen,

ohne jedoch auf diese beschränkt zu sein, Fab- und F(ab')₂-Fragmente ein. Antikörperfragmente und -derivate, die mit Verfahren der Gentechnik erzeugt wurden, werden ebenfalls bereitgestellt.

[0126] Die monoklonalen Antikörper der vorliegenden Erfindung schließen chimärische Antikörper, z. B. humanisierte Versionen von murinen monoklonalen Antikörpern ein. Solche humanisierten Antikörper können mit bekannten Verfahren hergestellt werden und bieten den Vorteil verringerter Immunogenität, wenn die Antikörper an Menschen verabreicht werden. In einer Ausführungsform weist ein humanisierter monoklonaler Antikörper die variable Region eines murinen Antikörpers (oder nur die Antigen-Bindungsstelle davon) und eine konstante Region, die aus einem menschlichen Antikörper abgeleitet wurde, auf. Alternativ kann ein humanisiertes Antikörperfragment die Antigen-Bindungsstelle eines murinen monoklonalen Antikörpers und ein Fragment einer variablen Region (dem die Antigen-Bindungsstelle fehlt), das aus einem menschlichen Antikörper abgeleitet ist, aufweisen. Verfahren zur Herstellung von chimären oder weiteren gentechnisch hergestellten monoklonalen Antikörpern schließen jene, 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 and Harris (TIPS 14:139, May 1993) beschrieben sind, ein.

[0127] Zu den Verwendungen der Antikörper gehört die Verwendung in Tests zum Nachweis von TRAIL-R-Polypeptiden, entweder in vitro oder in vivo. Die Antikörper können auch in der Reinigung von TRAIL-R-Proteinen durch Immunaффinitätschromatographie eingesetzt werden.

[0128] Die Antikörper, die zusätzlich die Bindung von TRAIL-R an TRAIL blockieren können, können zur Hemmung einer biologischen Aktivität, welche aus einer solchen Bindung resultiert, eingesetzt werden. Solche blockierenden Antikörper können mittels jedes geeigneten Testverfahrens, wie zum Beispiel durch die Prüfung der Antikörper auf die Fähigkeit, die Bindung von TRAIL an TRAIL-R exprimierende Zellen zu hemmen, identifiziert werden. Beispiele für solche Zellen sind die Jurkat-Zellen und PS1-Zellen, die in Beispiel 2 unten beschrieben werden. Alternativ können blockierende Antikörper in Tests auf die Fähigkeit, einen biologischen Effekt zu hemmen, der aus der Bindung von TRAIL an Zielzellen resultiert, identifiziert werden. Antikörper können auf die Fähigkeit getestet werden, zum Beispiel die TRAIL-vermittelte Lyse von Jurkat-Zellen zu hemmen.

[0129] Solch ein Antikörper kann in einem in vitro-Verfahren eingesetzt oder in vivo verabreicht werden, um eine TRAIL-vermittelte biologische Aktivität zu hemmen. Störungen, die durch die Wechselwirkung von TRAIL mit Zelloberflächen-TRAIL-Rezeptor (direkt oder indirekt) verursacht oder verschlimmert werden, können so behandelt werden. Ein therapeutisches Verfahren beinhaltet die in vivo-Verabreichung eines blockierenden Antikörpers an ein Säugetier in einer Menge, die ausreicht, eine TRAIL-vermittelte biologische Aktivität zu hemmen. Störungen, die durch TRAIL direkt oder indirekt verursacht oder verschlimmert werden, werden so behandelt. Monoklonale Antikörper werden im allgemeinen für die Verwendung in solchen therapeutischen Verfahren bevorzugt. In einer Ausführungsform wird ein antigenbindendes Antikörperfragment eingesetzt.

[0130] Ein blockierender Antikörper, der gegen TRAIL-R gerichtet ist, kann durch TRAIL-R in dem oben beschriebenen Verfahren zum Behandeln von thrombotischer Microangiopathie, z. B. in der Behandlung von TTP oder HUS, ersetzt werden.

[0131] Antikörper, die gegen TRAIL-R gerichtet und immunreaktiv zu einem TRAIL-R Polypeptid sind, welches an den TNF-vermittelten Apoptose-induzierenden Liganden (TRAIL) bindet, wobei TRAIL-R dadurch gekennzeichnet ist, dass es die Aminosäuresequenz VPANEGD aufweist, oder an ein Antigen-bindendes Fragment des Antikörpers bindet, wobei der Antikörper unter Verwendung von TRAIL-R-Protein als Immunogen herstellbar ist, und das TRAIL-R-Protein gewinnbar aus Jurkat Zellen ist, nämlich durch Disruptur der Zellen und einem anschließenden Reinigungsschritt welcher Affinitätschromatographie einschließt und eine TRAIL-enthaltende Chromatographie-Matrix, sowie Umkehrphasen HPLC anwendet, jene Antikörper die gegen TRAIL-R gezüchtet werden, können auf agonistische (d. h. Liganden imitierende) Eigenschaften durchsucht werden. Solche Antikörper induzieren bei Bindung an Zelloberflächen-TRAIL-R biologische Effekte (z. B. die Transduktion von biologischen Signalen) ähnlich den biologischen Effekten, die bei Bindung von TRAIL an Zelloberflächen-TRAIL-R induziert werden. Agonistische Antikörper können dazu verwendet werden, die Apoptose bestimmter Krebszellen oder viral infizierter Zellen zu induzieren, wie für TRAIL berichtet wurde. Die Fähigkeit von TRAIL, Krebszellen (einschließlich, ohne jedoch darauf beschränkt zu sein, Leukämie, Lymphoma und Melanomzellen) und viral infizierte Zellen abzutöten, wird in Wiley et al. (Immunity 3:673–682, 1995) und in der PCT-Anmeldung WO 97/01633 beschrieben.

[0132] Es werden Zusammensetzungen, die einen gegen TRAIL-R gerichteten Antikörper und ein physiologisch akzeptables Verdünnungsmittel, Hilfsstoff oder Träger enthalten, hierin bereitgestellt. Geeignete Kom-

ponenten solcher Zusammensetzungen sind in den oben beschriebenen TRAIL-R-Protein enthaltenden Zusammensetzungen beschrieben.

[0133] Es werden hierin auch Konjugate bereitgestellt, die einen nachweisbaren (z. B. diagnostischen) oder therapeutischen Wirkstoff aufweisen, der an einen Antikörper angeheftet ist, der gegen TRAIL-R gerichtet und immunreaktiv zu einem TRAIL-R Polypeptid ist, welches an den TNF-vermittelten Apoptose-induzierenden Liganden (TRAIL) bindet, wobei TRAIL-R dadurch gekennzeichnet ist, dass es die Aminosäuresequenz VPA-NEGD aufweist, oder an ein Antigen-bindendes Fragment des Antikörpers bindet, wobei der Antikörper unter Verwendung von TRAIL-R-Protein als Immunogen herstellbar ist, und das TRAIL-R-Protein gewinnbar aus Jurkat Zellen ist, nämlich durch Disruptur der Zellen und einem anschließenden Reinigungsschritt welcher Affinitätschromatographie einschließt und eine TRAIL-enthaltende Chromatographie-Matrix, sowie Umkehrphasen HPLC anwendet. Beispiele für solche Wirkstoffe werden oben angeführt. Die Konjugate finden in vitro- oder in vivo-Verfahren Verwendung.

Nucleinsäuren

[0134] Die vorliegende Erfindung stellt TRAIL-R-Nucleinsäuren bereit. Solche Nucleinsäuren schließen, ohne jedoch darauf beschränkt zu sein, DNA, die das in Beispiel 2 beschriebene Peptid codiert, ein. Solche DNAs können mit dem Wissen über den genetischen Code identifiziert werden. Andere Nucleinsäuren der vorliegenden Erfindung schließen isolierte DNAs, welche die in SEQ ID NR. 1 oder in den Ansprüchen dargestellte Nucleotidsequenz aufweisen, ein.

[0135] Die vorliegende Erfindung stellt isolierte Nucleinsäuren, die in der Herstellung von TRAIL-R-Polypeptiden nützlich sind, z. B. in den oben besprochenen rekombinanten Expressionssystemen, bereit. Solche Nucleinsäuren schließen, ohne jedoch darauf beschränkt zu sein, die menschliche TRAIL-R-DNA der SEQ ID NR. 1 ein. Nucleinsäuremoleküle der vorliegenden Erfindung weisen TRAIL-R-DNA sowohl in der einsträngigen als auch in der doppelsträngigen Form sowie das RNA-Komplement davon, auf. TRAIL-R-DNA schließt zum Beispiel cDNA, genomische DNA, chemisch synthetisierte DNA, durch PCR amplifizierte DNA und Kombinationen davon, ein. Genomische DNA kann mit herkömmlichen Verfahren isoliert werden, z. B. unter Verwendung der cDNA der SEQ ID NR. 1 oder 3 oder eines geeigneten Fragmentes davon als Sonde.

[0136] Es werden DNAs, die TRAIL-R in einer der hierin behandelten Formen (z. B. TRAIL-R voller Länge oder wie in den Ansprüchen dargelegt) codieren, bereitgestellt. Spezielle Ausführungsformen von TRAIL-R-codierenden DNAs schließen DNA, die menschliches TRAIL-R voller Länge der SEQ ID NR. 2 (einschließlich des N-terminalen Signalpeptids) codiert, und eine DNA, die reifes menschliches TRAIL-R voller Länge codiert, ein. Andere Ausführungsformen schließen DNA, die löslichen TRAIL-R codiert (z.B. die die extrazelluläre Domäne des Proteins der SEQ ID NR. 2 codiert, entweder mit oder ohne das Signalpeptid) ein.

[0137] Die hierin bereitgestellten Nucleinsäuren schließen DNA und RNA-Komplemente der vorerwähnten Fragmente, zusammen mit entweder einsträngigen oder doppelsträngigen Formen der TRAIL-R-DNA, ein.

[0138] Zu den Verwendungen von TRAIL-R-Nucleinsäure Fragmenten gehören Sonden oder Primer. Unter Einsatz des Wissens über den genetischen Code in Verbindung mit den in Beispiel 2 angeführten Aminosäuresequenzen können Sätze von degenerierten Oligonucleotiden hergestellt werden. Solche Oligonucleotide werden als Primer, z. B. in Polymerasekettenreaktionen (PCR), verwendet, mit denen TRAIL-R-DNA-Fragmente isoliert und amplifiziert werden.

[0139] Weitere nützliche Fragmente der TRAIL-R-Nucleinsäuren schließen Gegensinn- oder Sinn-Oligonucleotide, welche eine einsträngige Nucleinsäuresequenz (entweder RNA oder DNA) aufweisen, welche in der Lage sind, an die Ziel-TRAIL-R-mRNA-(Sinn) oder TRAIL-R-DNA-(Gegensinn) Sequenzen zu binden, ein. Die Fähigkeit, ein Gegensinn- oder ein Sinn-Oligonucleotid auf der Basis einer cDNA-Sequenz abzuleiten, die ein gegebenes Protein codiert, wird zum Beispiel in Stein und Cohen (Cancer Res. 48:2659, 1988) und van der Krol et al. (BioTechniques 6:958, 1988) beschrieben.

[0140] Die Bindung von Gegensinn- oder Sinn-Oligonucleotiden an Ziel-Nucleinsäuresequenzen führt zur Bildung von Duplexformen, die die Transkription oder Translation der Zielsequenz mit einem von mehreren Mitteln, einschließlich verstärktem Abbau der Duplexformen, vorzeitiger Termination der Transkription oder Translation, oder durch andere Mittel blockieren. Die Gegensinn-Oligonucleotide können daher zur Blockierung der Expression von TRAIL-R-Proteinen verwendet werden. Gegensinn- oder Sinn-Oligonucleotide weisen weiters Oligonucleotide, die modifizierte Zucker-Phosphodiester-Rückgrate (oder andere Zuckerbindeglieder, wie die

in WO 91/06629 beschriebenen) besitzen und wobei solche Zuckerbindeglieder resistent gegenüber endogenen Nucleasen sind, auf. Solche Oligonucleotide mit resistenten Zuckerbindegliedern sind in vivo stabil (d. h. in der Lage sind, dem enzymatischen Abbau zu widerstehen), behalten aber die Sequenzspezifität, sich an Ziel-Nucleotidsequenzen binden zu können, bei.

[0141] Weitere Beispiele für Sinn- oder Gegensinn-Oligonucleotide sind jene Oligonucleotide, die kovalent an organische Reste, wie zum Beispiel den in WO 90/10448 beschriebenen, und andere Reste gebunden sind, die die Affinität des Oligonucleotids für eine Ziel-Nucleinsäuresequenz, wie zum Beispiel Poly-(L-Lysin), erhöhen. Weiters können Einlagerungsmittel, wie zum Beispiel Ellipticin, und Alkylanzien oder Metallkomplexe können an Sinn- oder Gegensinn-Oligonucleotide angeheftet werden, um die Bindungsspezifitäten des Gegensinn- oder Sinn-Oligonucleotids für die Ziel-Nucleotidsequenz zu modifizieren.

[0142] Gegensinn- oder Sinn-Oligonucleotide können in eine Zelle, die die Ziel-Nucleinsäuresequenz enthält, mit jedem Genübertragungsverfahren, einschließlich zum Beispiel der CaPO_4 -vermittelten DNA-Transfektion, Elektroporation, oder durch Verwendung von Genübertragungsvektoren, wie zum Beispiel des Epstein-Barr-Virus, eingeführt werden. In einem bevorzugten Verfahren wird ein Gegensinn- oder Sinn-Oligonucleotid in einen geeigneten retroviralen Vektor eingefügt. Eine Zelle, die die Ziel-Nucleinsäuresequenz enthält, wird entweder in vivo oder ex vivo (außerhalb des Körpers) in Kontakt mit dem rekombinanten retroviralen Vektor gebracht. Geeignete retrovirale Vektoren schließen, ohne jedoch darauf beschränkt zu sein, die aus dem murinen Retrovirus M-MuLV, N2 (einem von M-MuLV abgeleiteten Retrovirus) abgeleiteten Viren oder die Doppelkopie-Vektoren, die mit DCT5A, DCT5B und DCT5C bezeichnet werden (siehe WO 90/13641), ein.

[0143] Sinn- oder Gegensinn-Oligonucleotide können auch durch Bildung eines Konjugats mit einem Liganden bindenden Molekül, wie in WO 91/04753 beschrieben ist, in eine Zelle eingeführt werden, die die Ziel-Nucleotidsequenz enthält. Geeignete Liganden bindende Moleküle schließen, ohne jedoch darauf beschränkt zu sein, Zelloberflächenrezeptoren, Wachstumsfaktoren, andere Cytokine oder andere Liganden, die an Zelloberflächenrezeptoren binden können, ein. Vorzugsweise stört die Konjugation des Liganden bindenden Moleküls im Wesentlichen nicht die Fähigkeit des Liganden bindenden Moleküls, sich an sein entsprechendes Molekül oder seinen entsprechenden Rezeptor zu binden, oder blockiert das Eindringen des Sinn- oder Gegensinn-Oligonucleotids oder seiner konjugierten Version in die Zelle nicht.

[0144] Alternativ kann ein Sinn- oder Gegensinn-Oligonucleotid durch Bildung eines Oligonucleotid-Lipid-Komplexes in eine Zelle eingeführt werden, die die Ziel-Nucleinsäuresequenz enthält, wie in WO 90/10448 beschrieben ist. Der Sinn- oder Gegensinn-Oligonucleotid-Lipid-Komplex wird vorzugsweise in der Zelle durch eine endogene Lipase dissoziiert.

[0145] Die folgenden Beispiele sind bereitgestellt, um spezielle Ausführungsformen der Erfindung weiter zu erläutern und dürfen nicht als Einschränkung für den Geltungsbereich der vorliegenden Erfindung ausgelegt werden.

BEISPIEL 1: Reinigung von TRAIL-R-Protein

[0146] Ein humanes TRAIL-Rezeptor-(TRAIL-R-)Protein wurde mit folgendem Verfahren hergestellt. TRAIL-R wurde aus den Zellmembranen von Jurkat-Zellen, einer humanen akuten Leukämie T-Zelllinie, isoliert. Jurkat-Zellen wurden gewählt, weil ein spezielles Band aus oberflächenbiotinylierten Jurkat-Zellen unter Verwendung von Flag®-TRAIL, das kovalent an Affi-Gel-Kügelchen (Biorad Laborstories, Richmond, CA) gebunden ist, affinitätspräzipitiert werden kann. Das präzipitierte Band besitzt ein Molekulargewicht von etwa 52 kD. Ein kleineres spezielles Band von etwa 42 kD war ebenfalls vorhanden, was möglicherweise ein proteolytisches Abbauprodukt oder eine weniger glykosylierte Form von TRAIL-R erklärt.

[0147] Annähernd 50 Milliarden Jurkat-Zellen wurden durch Zentrifugieren (80 ml Zellpellet) gewonnen, einmal mit PBS gewaschen, dann auf flüssigem Stickstoff schockgefroren. Plasmamembranen wurden nach dem Verfahren Nr. 3 isoliert, das in Maeda et al., Biochim. et Biophys. Acta, 731:115, 1983, beschrieben wurde. Dabei gab es fünf Modifizierungen:

1. Die folgenden Proteaseinhibitoren wurden allen Lösungen in den angegebenen Konzentrationen beigegeben: Aprotinin, 150 nM; EDTA, 5 mM; Leupeptin, 1 µM; pA-PMSF, 20 µM; Pefabloc, 500 µM; Pepstatin A, 1 µM; PMSF, 500 µM.
2. Dithiothreitol wurde nicht verwendet.

3. DNAase wurde in der Homogenisierungslösung nicht verwendet.
4. 1,25 ml Homogenisierungspuffer wurden pro ml Zellpellet verwendet.
5. Die Homogenisierung wurde durch fünf Durchläufe durch einen Mattglas-Dounce-Homogenisator erreicht.

[0148] Nach der Isolierung der Zellmembranen wurden Proteine durch Resuspendierung der isolierten Membranen in 50 ml PBS, das 1% Octylglucosid und alle oben genannten Proteaseinhibitoren in den oben angegebenen Konzentrationen enthielt, löslich gemacht. Die sich ergebende Lösung wurde dann während einer dreißigminütigen Inkubation bei 4°C wiederholt in eine strudelnde Bewegung (Vortex) versetzt. Die Lösung wurde dann bei 20.000 U/min in einem SW28-Rotor in einer LE-80 Beckman-Ultrazentrifuge (Beckman Instruments, Inc., Palo Alto, CA) bei 4°C 30 Minuten lang zentrifugiert, um den Überstand (den Membranextrakt) zu erhalten.

Chromatographie

[0149] Der erste Schritt der Reinigung von TRAIL-R aus dem oben hergestellten Membranextrakt war die Affinitätschromatographie. Der Membranextrakt wurde zuerst auf eine Anti-Flag®-M2-Affi-gel-Säule (10 mg monoklonaler Antikörper M2, gekoppelt an 2 ml Affi-gel-Kügelchen) aufgebracht, um jedes nicht spezifisch bindende Material zu absorbieren. Der Durchfluss wurde dann auf eine Flag®-TRAIL-Affi-gel-Säule (10 mg rekombinantes Protein, gekoppelt an 1 ml Affi-gel-Kügelchen) aufgebracht.

[0150] Der Affi-gel-Träger ist ein N-Hydroxysuccinimidester eines derivatisierten, vernetzten Agarosegelkügelchens (von Biorad Laborstories, Richmond, CA, erhältlich). Wie oben besprochen, stellt das Flag®-Peptid, Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Lys, ein Epitop, das durch spezifische monoklonale Antikörper reversibel gebunden ist, was einen schnellen Test und leichte Reinigung des exprimierten rekombinanten Proteins ermöglicht, bereit. M2 ist ein monoklonaler Antikörper, der Flag® bindet. Monoklonale Antikörper, die das Flag®-Peptid binden, sowie andere Reagenzien zur Herstellung und Verwendung von Flag®-Fusionsproteinen sind von Eastman Kodak Co., Scientific Imaging Systems Division, New Haven, Connecticut, erhältlich. Die Herstellung von Flag®-TRAIL-Fusionsproteinen (die Flag®, fusioniert zu einem löslichen TRAIL-Polypeptid, aufweisen) wird weiters in der PCT-Anmeldung WO 97/01633 beschrieben, die hiermit als Referenz aufgenommen wird.

[0151] Die Säule wurde mit 25 ml von jedem der folgenden Puffer in der angegebenen Reihenfolge gewaschen:

1. PBS, das 1% Octylglucosid enthält
2. PBS
3. PBS, das zusätzlich 200 mM NaCl enthält
4. PBS

[0152] Das gebundene Material wurde mit 50 mM Na-Citrat (pH 3) in 1 ml-Fractionen eluiert und sofort mit 300 µl von 1 M Tris-HCl (pH 8,5) pro Fraktion neutralisiert. Die TRAIL-Bindungsaktivität jeder Fraktion wurde mit einem TRAIL-R-spezifischen ELISA, wie unten beschrieben ist, bestimmt. Fractionen mit hoher TRAIL-Bindungsaktivität wurden zusammengeführt, in 0,1% Trifluoressigsäure (TFA) gebracht und anschließend in einer Kapillar-Umkehrphasen-HPLC-Säule [500 µm Innendurchmesser X 25 cm Quarzglas-Kapillarsäule, gepackt mit 5 µm Vydac C₄-Material (Vydac, Hesperia, CA)] unter Verwendung eines linearen Gradienten (2% pro Minute) von 0% bis 100% Acetonitril in Wasser, das 0,1% TFA enthielt, chromatographiert. Fractionen, die eine hohe TRAIL-Bindungsaktivität besaßen, wurden dann wie oben bestimmt, zusammengefasst und, falls gewünscht, gefriergetrocknet.

TRAIL-R-spezifischer ELISA:

[0153] Serielle Verdünnungen von TRAIL-R-haltigen Proben (in 50 mM NaHCO₃, mit NaOH auf pH 9 eingestellt) wurden auf Linbro/Titertek 96 Flachboden-EIA-Mikrotitrationsplatten (ICN Biochemicals Inc., Aurora, OH) mit 100 µl Vertiefung aufgetragen. Nach der Inkubation von 16 Stunden bei 4°C wurden die Vertiefungen sechs mal mit 200 µl PBS mit einem Zusatz von 0,05% Tween-20 (PBS-Tween) gewaschen. Die Vertiefungen wurden dann mit Flag®-TRAIL mit 1 µg/ml in PBS-Tween mit 5% fetalem Kälberserum (FCS) 90 Minuten lang (100 µl pro Vertiefung) inkubiert, gefolgt von der Waschung wie oben. Als Nächstes wurde jede Vertiefung mit dem Anti-Flag® monoklonalen Antikörper M2 mit 1 µg/ml in PBS-Tween mit einem Zusatz von 5% FCS 90 Minuten lang (100 µl pro Vertiefung) inkubiert, gefolgt von der Waschung wie oben. Anschließend wurden die Vertiefungen mit einem polyklonalen Ziegen-Anti-mIgG1-spezifischen, Meerrettichperoxidase-konjugierten Antikörper (Verdünnung von 1:5000 der handelsüblichen Stammlösung in PBS-Tween mit 5% FCS) 90 Minuten lang (100 µl pro Vertiefung) inkubiert. Der HRP-konjugierte Antikörper wurde von Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, Alabama) bezogen. Die Vertiefungen wurden dann sechs Mal wie oben gewaschen.

[0154] Zur Entwicklung des ELISA wurde eine Substratmischung [100 µl pro Vertiefung einer 1:1-Vormischung aus dem TMB Peroxidasesubstrat und Peroxidaselösung B (Kirkegaard Perry Laborstories, Gaithersburg, Maryland)] in die Vertiefungen gefüllt. Nach ausreichender Farbreaktion wurde die enzymatische Reaktion durch Zusetzen von 2 N H₂SO₄ (50 µl pro Vertiefung) beendet. Die Farbintensität (die die TRAIL-Bindungsaktivität anzeigt) wurde durch Messen der Extinktion bei 450 nm in einem V Max-Plattenlesegerät (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) bestimmt.

BEISPIEL 2: Aminosäuresequenz

(a) TRAIL-R aus Jurkat-Zellen gereinigt

[0155] Aus Jurkat-Zellen isoliertes TRAIL-R-Protein wurde mit Trypsin verdaut, wobei konventionelle Verfahren verwendet wurden. Die Aminosäuresequenzanalyse wurde an einem der Peptidfragmente, die durch die tryptische Verdauung erzeugt wurden, ausgeführt: Es wurde festgestellt, dass das Fragment die folgende Sequenz enthielt, die den Aminosäuren 327 bis 333 der in SEQ ID NR. 2 dargestellten Sequenz entspricht: VPA-NEGD.

(b) TRAIL-R aus PS1-Zellen gereinigt

[0156] TRAIL-R-Protein wurde auch aus PS-1-Zellen isoliert. PS-1 ist eine humane B Zelllinie, die spontan nach der tödlichen Bestrahlung von humanen Lymphozyten aus peripherem Blut (PBLs) entstand. Das TRAIL-R-Protein wurde mit Trypsin verdaut, wobei konventionelle Verfahren verwendet wurden. Die Aminosäuresequenzanalyse wurde an Peptidfragmenten ausgeführt, die durch die tryptische Verdauung erzeugt wurden. Es wurde festgestellt, dass eins der Fragmente die folgende Sequenz enthielt, die wie das in (a) dargestellte Fragment den Aminosäuren 327 bis 333 der in SEQ ID NR. 2 dargestellten Sequenz entspricht: VPANEGD.

BEISPIEL 3: DNA- und Aminosäuresequenzen

[0157] Die Aminosäuresequenz von weiteren tryptischen Peptidverdauungsfragmenten von TRAIL-R wurde bestimmt. Es wurden degenerierte Oligonucleotide auf der Basis der Aminosäuresequenz von zwei der Peptide hergestellt. Ein TRAIL-R-DNA-Fragment wurde mit der Polymerasekettenreaktion (PCR) isoliert und amplifiziert, wobei die degenerierten Oligonucleotide als 5'- und 3'-Primer verwendet wurden. Die PCR wurde gemäß konventionellen Verfahren ausgeführt, wobei cDNA aus der in Beispiel 2 beschriebenen PS-1-Zelllinie als Matrize verwendet wurde. Die Nucleotidsequenz des isolierten TRAIL-R-DNA-Fragmentes (ohne die Teile, die den Primern entsprechen) und die damit codierte Aminosäuresequenz werden in [Fig. 1](#) (SEQ ID NR. 3 und 4) dargestellt. Die Sequenz des durch PCR isolierten gesamten TRAIL-R-DNA-Fragmentes entspricht den Nukleotiden 988 bis 1164 der SEQ ID NR. 1, die die Aminosäuren 330 bis 388 der SEQ ID NR. 2 codieren.

[0158] Die Aminosäuresequenz der SEQ ID NR. 4 weist eine beträchtliche Homologie zu den sogenannten Todesdomänen auf, die in bestimmten anderen Rezeptoren gefunden werden. Die cytoplasmatische Region des Fas- und TNF-Rezeptors Typ I enthält jeweils eine Todesdomäne, die mit der Transduktion eines Apoptose-signals verbunden ist (Tartaglia et al. Cell 74:845, 1993; Itoh und Nagata, J. Biol. Chem. 268:10932, 1993). Daher glaubt man, dass die in SEQ ID NR. 4 dargestellte Sequenz in der cytoplasmatischen Domäne von TRAIL-R zu finden ist.

[0159] Eine Sonde, die aus dem oben isolierten Fragment abgeleitet ist, wurde zur Durchsuchung einer cDNA-Bibliothek (aus humanen Vorhautfibroblasten abgeleitete cDNA im λgt 10-Vektor) verwendet, und eine menschliche TRAIL-R-cDNA wurde isoliert. Die Nucleotidsequenz der codierenden Region dieser cDNA wird in SEQ ID NR. 1 dargestellt, und die damit codierte Aminosäuresequenz wird in SEQ ID NR. 2 gezeigt.

BEISPIEL 4: TRAIL-R bindende monoklonale Antikörper

[0160] Dieses Beispiel erläutert ein Verfahren zur Herstellung monoklonaler Antikörper, die gegen TRAIL-R gerichtet und immunreaktiv zu einem TRAIL-R Polypeptid sind, welches an den TNF-vermittelten Apoptose-induzierenden Liganden (TRAIL) bindet, wobei TRAIL-R dadurch gekennzeichnet ist, dass es die Aminosäuresequenz VPANEGD aufweist, oder an ein Antigen-bindendes Fragment des Antikörpers bindet, wobei der Antikörper unter Verwendung von TRAIL-R-Protein als Immunogen herstellbar ist, und das TRAIL-R-Protein gewinnbar aus Jurkat Zellen ist, nämlich durch Disruptur der Zellen und einem anschließenden Reinigungsschritt welcher Affinitätschromatographie einschließt und eine TRAIL-enthaltende Chromatographie-Matrix, sowie Umkehrphasen HPLC anwendet, wobei herkömmliche Verfahren verwendet werden, wie zum Beispiel die

im US-Patent 4,411,993 beschrieben. Kurz gesagt, werden Mäuse mit TRAIL-R-Immunogen, das in vollständigem Freund-Adjuvans emulgiert ist und in Mengen im Bereich von 10 bis 100 µg subkutan oder intraperitoneal injiziert wird, immunisiert. Zehn bis zwölf Tage später erhalten die immunisierten Tiere mit zusätzlichem Schub mit TRAIL-R, das in vollständigem Freund-Adjuvans emulgiert ist. Mäuse erhalten regelmäßig in einem wöchentlichen oder zweiwöchentlichen Immunisierungszeitplan neue Schübe. Serumproben werden regelmäßig durch retroorbitale Blutung oder Schwanzspitzenexzision abgenommen, um sie durch Dot-Blot-Test, ELISA (enzymgebundener-immunosorbierender Test) oder Hemmung der TRAIL-Bindung auf TRAIL-R-Antikörper zu untersuchen.

[0161] Nach dem Nachweis eines geeigneten Antikörpertiters erhalten positive Tiere eine letzte intravenöse Injektion von TRAIL-R in Kochsalzlösung. Drei bis vier Tage später werden die Tiere geopfert, Milzzellen gewonnen und die Milzzellen mit einer Mause-Myelomzelllinie fusioniert, z. B. NS1 oder vorzugsweise P3x63 Ag8.653 (ATCC CRL 1580). Fusionen erzeugen Hybridomzellen, die in mehrere Mikrotiterplatten in einem HAT (Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin)-selektiven Medium gebracht werden, um die Proliferation von nicht fusionierten Zellen, Myelomhybriden und Milzzellhybriden zu hemmen.

[0162] Die Hybridomzellen werden mittels ELISA auf Reaktivität gegenüber gereinigtem TRAIL-R durch Anpassungen der Verfahren, die in Engvall et al., Immunochem. 8:871, 1971, und im US-Patent 4,703,004 offenlegt wurden, durchsucht. Ein bevorzugtes Durchsuchungsverfahren ist das Antikörpereinfangverfahren, das in Beckmann et al. (J. Immunol. 144:4212, 1990) beschrieben ist. Positive Hybridomzellen können intraperitoneal in isogenetische BALB/c-Mäuse injiziert werden, um Ascites zu erzeugen, die hohe Konzentrationen an monoklonalen Anti-TRAIL-R-Antikörpern enthält. Alternativ können Hybridomzellen in vitro mit verschiedenen Verfahren in Flaschen oder in Rollerflaschen erzeugt werden. Monoklonale Antikörper, die in Maus-Ascites erzeugt wurden, können durch Ammoniumsulfatausfällung und anschließende Gel-Ausschlusschromatographie gereinigt werden. Alternativ kann auch die Affinitätschromatographie, die auf der Bindung von Antikörpern an Protein A oder Protein G beruht, verwendet werden, genau so wie die auf der Bindung an TRAIL-R beruhende Affinitätschromatographie.

BEISPIEL 5: Northern Blot-Analyse

[0163] Die Gewebsverteilung von TRAIL-R-mRNA wurde wie folgt durch Northern Blot-Analyse untersucht. Ein aliquoter Anteil einer radiomarkierten Sonde (dieselbe radiomarkierte Sonde, die zur Durchsuchung der cDNA-Bibliothek in Beispiel 3 verwendet wurde) wurde zu zwei verschiedenen humanen multiplen Gewebe-Northern Blots (Clontech, Palo Alto, CA; Biochain, Palo Alto, CA) hinzugefügt. Die Hybridisierung wurde über Nacht bei 63°C in 50% Formamid durchgeführt, wie vorher beschrieben wurde (March et al., Nature 315: 641–647, 1985). Die Blots wurden dann mit 2X SSC, 0,1% SDS bei 68°C 30 Minuten gewaschen. Eine Glycerolaldehydphosphatdehydrogenase(GAPDH)-spezifische Sonde wurde zur Standardisierung der RNA-Beladungen verwendet.

[0164] Ein einzelnes Transkript von 4,4 Kilobasen (kb) war in allen untersuchten Geweben vorhanden, einschließlich Milz, Thymus, peripheren Blutlymphozyten (PBLs), Prostata, Hoden, Eierstock, Uterus, Plazenta und mehreren Gewebe entlang des Verdauungstraktes (einschließlich Speiseröhre, Magen, Zwölffingerdarm, Leerdarm/Krummdarm, Dickdarm, Mastdarm und dem Dünndarm). Die Zellen und Gewebe mit den höchsten Werten an TRAIL-R-mRNA sind PBLs, Milz und Eierstock, wie durch Vergleich mit Kontrollhybridisierungen mit einer GAPDH-spezifischen Sonde gezeigt wurde.

BEISPIEL 6: Bindungsuntersuchung

[0165] Humanes TRAIL-R voller Länge wurde exprimiert und auf die Fähigkeit, an TRAIL zu binden, getestet. Die Bindungsuntersuchung wurde folgendermaßen durchgeführt.

[0166] Es wurde ein Fusionsprotein, das ein Leucin-Zipper-Peptid, welches zum N-Terminus eines löslichen TRAIL-Proteins (LZ-TRAIL) fusioniert war, enthielt, in der Untersuchung verwendet. Ein Expressionskonstrukt wurde, im Wesentlichen so wie für die Herstellung des Flag®-TRAIL-Expressionskonstruktes in Wiley et al. (Immunity, 3: 673–682, 1995) beschrieben ist, hergestellt, außer dass DNA, die das Flag®-Peptid codiert, durch eine Sequenz, die einen modifizierten Leucin-Zipper, der die Trimerisierung ermöglicht, codiert, ersetzt wurde. Das Konstrukt, im Expressionsvektor pDC409, codierte eine Leitsequenz, die aus humanem Cytomegalievirus abgeleitet wurde, gefolgt vom Leucin-Zipper-Rest, der mit dem N-Terminus eines löslichen TRAIL-Polypeptids fusioniert war. Das TRAIL-Polypeptid weist die Aminosäuren 95–281 von menschlichem TRAIL (einem Frag-

ment der extrazellulären Domäne), wie in Wiley et al. (siehe oben) beschrieben ist, auf. Das LZ-TRAIL wurde in CHO-Zellen exprimiert und aus dem Kulturüberstand gereinigt.

[0167] Der mit pDC409 bezeichnete Expressionsvektor ist ein Säugetier-Expressionsvektor, der von dem in McMahan et al. (EMBO J. 10: 2821–2832, 1991) beschriebenen Vektor pDC406 abgeleitet wurde. Zu den dem pDC409 (im Vergleich zu pDC406) hinzugefügten Merkmalen gehören zusätzliche einmalig vorhandene Restriktionsstellen in der Mehrfachklonierungsstelle (MCS), drei Stoppcodons (eines in jedem Leseraster), die sich stromabwärts von der MCS befinden, und ein T7-Polymerasepromotor, stromabwärts von der MCS, der das Sequenzieren von der in die MCS eingefügter DNA erleichtert.

[0168] Für die Expression von humanem TRAIL-R-Protein voller Länge wurde die gesamte codierende Region (d. h. die DNA-Sequenz, die in der SEQ ID NR. 1 dargestellt wird) durch die Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert. Die bei der PCR eingesetzte Matrize war der cDNA-Klon, der aus einer humanen Vorhaut-Fibroblasten cDNA-Bibliothek isoliert wurde, wie in Beispiel 3 beschrieben ist. Die isolierte und amplifizierte DNA wurde in den Expressionsvektor pDC409 eingefügt, um ein als pDC409-TRAIL-R bezeichnetes Konstrukt zu erhalten.

[0169] CrmA-Protein wurde eingesetzt, um die Apoptose von Wirtszellen, die rekombinantes TRAIL-R exprimieren, zu hemmen, wie oben und in Beispiel 8 besprochen. Ein als pDC409-CrmA bezeichneter Expressionsvektor enthält DNA, die Pockenvirus-CrmA in pDC409 codiert. Das aus Kuhpocken abgeleitete 38 Kilodalton große Protein, das anschließend als CrmA bezeichnet wurde, wird in Pickup et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 7698–7702, 1986) beschrieben.

[0170] CV-1/EBNA-Zellen wurden mit pDC409-TRAIL-R zusammen mit pDC409-CrmA oder mit pDC409-CrmA allein cotransfiziert. Die Zellen wurden in DMEM kultiviert, das mit 10% fötalem Rinderserum, Penicillin, Streptomycin und Glutamin ergänzt wurde. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen nichtenzymatisch losgelöst und vor der Analyse durch Fluoreszenz-aktivierte Zellabtastung (FACS) mit LZ-TRAIL (5 µg/ml), einem biotinylierten monoklonalen Anti-LZ-Antikörper (5 µg/ml) und phycoerythrin-konjugiertem Streptavidin (1:400) inkubiert. Die cytometrische Analyse wurde auf einem FACScan (Beckton Dickinson, San Jose, CA, USA) durchgeführt.

[0171] Die CV-1/EBNA-Zellen, die mit TRAIL-R und CrmA codierenden Vektoren cotransfiziert wurden, zeigten eine beträchtlich erhöhte Bindung von LZ-TRAIL im Vergleich zu den Zellen, die mit dem CrmA-codierenden Vektor allein transfiziert wurden.

BEISPIEL 7: TRAIL-R blockiert die TRAIL-induzierte Apoptose von Zielzellen

[0172] TRAIL-R wurde auf die Fähigkeit getestet, die TRAIL-induzierte Apoptose von Jurkat-Zellen zu blockieren. Das in der Untersuchung eingesetzte TRAIL-R lag in der Form eines Fusionsproteins vor, das mit sTRAIL-R/Fc bezeichnet wurde, welches die extrazelluläre Domäne von humanem TRAIL-R, fusioniert mit dem N-Terminus eines aus menschlichem IgG1 abgeleiteten Fc-Polypeptids, aufweist.

[0173] CV1-EBNA-Zellen wurden mit einem rekombinanten Expressionsvektor transfiziert, der eine das sTRAIL-R/Fc-Protein codierende Genfusion in dem in Beispiel 6 beschriebenen Vektor pDC409 enthielt, und wurden kultiviert, um so die Expression des Fusionsproteins zu ermöglichen. Das sTRAIL-R/Fc Fusionsprotein wurde aus dem Kulturüberstand gewonnen. Verfahren zur Fusionierung von DNA, die ein IgG1-Fc-Polypeptid codiert, mit DNA, die ein heterologes Protein codiert, werden in Smith et al. (Cell 73: 1349–1360, 1993) beschrieben; analoge Verfahren wurden hierin eingesetzt.

[0174] Ein als TNF-R2-Fc bezeichnetes Fusionsprotein, das als Kontrolle eingesetzt wurde, weist die extrazelluläre Domäne des als p75 oder p80 TNF-R bekannten TNF-Rezeptorproteins (Smith et al., Science 248: 1019–1023, 1990; Smith et al., Cell 76: 959–962, 1994) auf, welche mit einem Fc-Polypeptid fusioniert ist. Ein monoklonaler Maus-Antikörper, der ein gegen humanes TRAIL gerichteter blockierender Antikörper ist, wurde ebenfalls in der Untersuchung eingesetzt.

[0175] Jurkat-Zellen wurden mit unterschiedlichen oder konstanten Konzentrationen an LZ-TRAIL (dem in Beispiel 6 beschriebenen Fusionsprotein LZ-TRAIL) in Abwesenheit oder Gegenwart von unterschiedlichen Konzentrationen an sTRAIL-R-Fc, TNF-R2-Fc oder dem monoklonalen TRAIL-spezifischen Antikörper inkubiert. Der Zelltod wurde mit Hilfe einer MTT-Zelllebensfähigkeitsuntersuchung quantifiziert (MTT ist 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolbromid), wie vorher beschrieben (Mosmann, J. Immunol. Methods 65:

55– 63, 1983). Die Ergebnisse werden in [Fig. 2](#) gezeigt, die den prozentualen Zelltod für Jurkat-Zellen darstellt, die unbehandelt (Δ) waren oder mit unterschiedlichen (\blacktriangle) oder konstanten (\circ , \bullet , \square , \blacksquare) Konzentrationen an LZ-TRAIL (13 ng/ml) in Abwesenheit (\bullet) oder Gegenwart von unterschiedlichen Konzentrationen an TRAIL-R2-Fc (\blacksquare), TNF-R2-Fc (\square) oder dem Anti-TRAIL-Antikörper (\circ) behandelt wurden. Unterschiedliche Konzentrationen für alle Substanzen begannen bei 10 μ g/ml und wurden seriell verdünnt.

[0176] Der monoklonale Anti-Trail-Antikörper und sTRAIL-R/Fc blockierten jeweils die TRAIL-induzierte Apoptose in einer dosisabhängigen Weise, während TNF-R2-Fc dies nicht tat. Daher ist die extrazelluläre Domäne von TRAIL-R in der Lage, sich an TRAIL zu binden und die TRAIL-vermittelte Apoptose von Zielzellen zu hemmen.

BEISPIEL 8: TRAIL-R-induzierte Apoptose wird durch Caspaseinhibitoren und FADD-DN blockiert

[0177] CV-1/EBNA-Zellen wurden mittels des DEAE-Dextran-Verfahrens mit Expressionsplasmiden für TRAIL-R (pDC409-TRAIL-R) zusammen mit einem dreifachen Überschuss an leerem Expressionsvektor (pDC 409) in Gegenwart oder Abwesenheit von z-VAD-fmk (10 μ M, im Kulturmedium) oder zusammen mit einem dreifachen Überschuss an Expressionsvektor pDC409-CrmA, pDC409-p35 oder pDC409-FADD-DN transfiziert. Zusätzlich wurden 400 ng/Objektträger eines Expressionsvektors für das E. coli lacZ-Gen zusammen mit allen DNA-Mischungen cotransfiziert. Die transfizierten Zellen wurden in Kammern, die auf Objektträgern montiert sind, kultiviert.

[0178] Der Säugetier-Expressionsvektor pDC409 und der pDC409-TRAIL-R-Vektor, der humanes TRAIL-R voller Länge codiert, werden in Beispiel 6 beschrieben. Das Tripeptidderivat zVAD-fmk (Benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-fluormethylketon) ist von Enzyme System Products, Dublin, Kalifornien, erhältlich.

[0179] Das 38 Kilodalton große von Kuhpocken abgeleitete Protein, das anschließend CrmA genannt wurde, wird in Pickup et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 7698–7702, 1986) beschrieben. Sequenzinformationen für CrmA werden in [Fig. 4](#) von Pickup et al., siehe oben, angeführt.

[0180] Ein 35 Kilodalton großes Protein, das von dem Nuclear Polyhedrosis-Virus Autographa californica, einem Baculovirus, codiert wird, wird in Friesen und Miller (J. Virol. 61: 2264– 2272, 1987) beschrieben. Sequenzinformationen für dieses Protein, das hierin als Baculovirus p35 bezeichnet wird, werden in [Fig. 5](#) von Friesen und Miller, siehe oben, angeführt.

[0181] FADD (auch als MORT1 bezeichnet) wird in Boldin et al. (J. Biol. Chem. 270: 7795–7798, 1995) beschrieben. Das als FADD-DN (FADD dominant negativ) bezeichnete Protein ist ein C-terminales Fragment von FADD, das die Todesdomäne enthält. DNA, die FADD-DN codiert, fusioniert mit einem N-terminalen Flag[®]-Epitop-Tag (oben beschrieben), wurde in den Expressionsvektor pDC409 eingefügt, der in Beispiel 6 beschrieben wird, und bildete pDC409-FADD-DN. Das FADD-DN-Polypeptid entspricht den Aminosäuren 117 bis 245 der in Boldin et al., siehe oben, dargestellten MORT1-Aminosäuresequenz.

[0182] 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit Glutaraldehyd fixiert und mit X-gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid) inkubiert. Zellen, die β -Galactosidase exprimieren, färben sich blau ein. Eine Verringerung des Prozentsatzes gefärbter Zellen zeigt einen Verlust an β -Galactosidase-Expression an und korreliert mit dem Tod von Zellen, die das/die mit dem lacZ-Gen cotransfizierte(n) Protein(e) exprimieren.

[0183] Die Ergebnisse werden in [Fig. 3](#) dargestellt, wobei die eingezeichneten Werte den Mittelwert und die Standardabweichung von mindestens drei getrennten Experimenten darstellen. Pockenvirus-CrmA, Baculovirus p35, FADD-DN und z-VAD-fmk verringerten jeweils effektiv den Tod von transfizierten Zellen, die TRAIL-R exprimieren.

Auflistung der Sequenzen

<110> Immunex Corporation

<120> TRAIL-bindender Rezeptor

<130> P21913EP

<140> 98908474.4

<141> 1998-02-11

<150> US08/799,861

<151> 1997-02-13

<150> US08/815,255

<151> 1997-03-12

<150> US08/829,536

<151> 1997-03-28

<150> US08/869,852

<151> 1997-06-04

<150> US08/883,036

<151> 1997-06-26

<160> 7

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 1323

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1323)

<400> 1

atg	gaa	caa	cgg	gga	cag	aac	gcc	ccg	gcc	gct	tcg	ggg	gcc	cgg	aaa	48
Met	Glu	Gln	Arg	Gly	Gln	Asn	Ala	Pro	Ala	Ala	Ser	Gly	Ala	Arg	Lys	
1				5				10					15			

agg	cac	ggc	cca	gga	ccc	agg	gag	gcg	cgg	gga	gcc	agg	cct	ggg	ccc	96
Arg	His	Gly	Pro	Gly	Pro	Arg	Glu	Ala	Arg	Gly	Ala	Arg	Pro	Gly	Pro	
			20					25					30			

cgg gtc ccc aag acc ctt gtg ctc gtt gtc gcc gcg gtc ctg ctg ttg	144
Arg Val Pro Lys Thr Leu Val Leu Val Val Ala Ala Val Leu Leu Leu	
35 40 45	
gtc tca gct gag tct gct ctg atc acc caa caa gac cta gct ccc cag	192
Val Ser Ala Glu Ser Ala Leu Ile Thr Gln Gln Asp Leu Ala Pro Gln	
50 55 60	
cag aga gcg gcc cca caa caa aag agg tcc agc ccc tca gag gga ttg	240
Gln Arg Ala Ala Pro Gln Gln Lys Arg Ser Ser Pro Ser Glu Gly Leu	
65 70 75 80	
tgt cca cct gga cac cat atc tca gaa gac ggt aga gat tgc atc tcc	288
Cys Pro Pro Gly His His Ile Ser Glu Asp Gly Arg Asp Cys Ile Ser	
85 90 95	
tgc aaa tat gga cag gac tat agc act cac tgg aat gac ctc ctt ttc	336
Cys Lys Tyr Gly Gln Asp Tyr Ser Thr His Trp Asn Asp Leu Leu Phe	
100 105 110	
tgc ttg cgc tgc acc agg tgt gat tca ggt gaa gtg gag cta agt ccg	384
Cys Leu Arg Cys Thr Arg Cys Asp Ser Gly Glu Val Glu Leu Ser Pro	
115 120 125	
tgc acc acg acc aga aac aca gtg tgt cag tgc gaa gaa ggc acc ttc	432
Cys Thr Thr Thr Arg Asn Thr Val Cys Gln Cys Glu Glu Gly Thr Phe	
130 135 140	
cgg gaa gaa gat tct cct gag atg tgc cgg aag tgc cgc aca ggg tgt	480
Arg Glu Glu Asp Ser Pro Glu Met Cys Arg Lys Cys Arg Thr Gly Cys	
145 150 155 160	
ccc aga ggg atg gtc aag gtc ggt gat tgt aca ccc tgg agt gac atc	528
Pro Arg Gly Met Val Lys Val Gly Asp Cys Thr Pro Trp Ser Asp Ile	
165 170 175	
gaa tgt gtc cac aaa gaa tca ggt aca aag cac agt ggg gaa gcc cca	576
Glu Cys Val His Lys Glu Ser Gly Thr Lys His Ser Gly Glu Ala Pro	
180 185 190	
gct gtg gag gag acg gtg acc tcc agc cca ggg act cct gcc tct ccc	624
Ala Val Glu Glu Thr Val Thr Ser Ser Pro Gly Thr Pro Ala Ser Pro	
195 200 205	
tgt tct ctc tca ggc atc atc ata gga gtc aca gtt gca gcc gta gtc	672
Cys Ser Leu Ser Gly Ile Ile Ile Gly Val Thr Val Ala Ala Val Val	
210 215 220	

ttg att gtg gct gtg ttt gtt tgc aag tct tta ctg tgg aag aaa gtc	720
Leu Ile Val Ala Val Phe Val Cys Lys Ser Leu Leu Trp Lys Lys Val	
225 230 235 240	
ctt cct tac ctg aaa ggc atc tgc tca ggt ggt ggt ggg gac cct gag	768
Leu Pro Tyr Leu Lys Gly Ile Cys Ser Gly Gly Gly Gly Asp Pro Glu	
245 250 255	
cgt gtg gac aga agc tca caa cga cct ggg gct gag gac aat gtc ctc	816
Arg Val Asp Arg Ser Ser Gln Arg Pro Gly Ala Glu Asp Asn Val Leu	
260 265 270	
aat gag atc gtg agt atc ttg cag ccc acc cag gtc cct gag cag gaa	864
Asn Glu Ile Val Ser Ile Leu Gln Pro Thr Gln Val Pro Glu Gln Glu	
275 280 285	
atg gaa gtc cag gag cca gca gag cca aca ggt gtc aac atg ttg tcc	912
Met Glu Val Gln Glu Pro Ala Glu Pro Thr Gly Val Asn Met Leu Ser	
290 295 300	
ccc ggg gag tca gag cat ctg ctg gaa ccg gca gaa gct gaa agg tct	960
Pro Gly Glu Ser Glu His Leu Leu Glu Pro Ala Glu Ala Glu Arg Ser	
305 310 315 320	
cag agg agg agg ctg ctg gtt cca gca aat gaa ggt gat ccc act gag	1008
Gln Arg Arg Arg Leu Leu Val Pro Ala Asn Glu Gly Asp Pro Thr Glu	
325 330 335	
act ctg aga cag tgc ttc gat gac ttt gca gac ttg gtg ccc ttt gac	1056
Thr Leu Arg Gln Cys Phe Asp Asp Phe Ala Asp Leu Val Pro Phe Asp	
340 345 350	
tcc tgg gag ccg ctc atg agg aag ttg ggc ctc atg gac aat gag ata	1104
Ser Trp Glu Pro Leu Met Arg Lys Leu Gly Leu Met Asp Asn Glu Ile	
355 360 365	
aag gtg gct aaa gct gag gca gcg ggc cac agg gac acc ttg tac acg	1152
Lys Val Ala Lys Ala Glu Ala Ala Gly His Arg Asp Thr Leu Tyr Thr	
370 375 380	
atg ctg ata aag tgg gtc aac aaa acc ggg cga gat gcc tct gtc cac	1200
Met Leu Ile Lys Trp Val Asn Lys Thr Gly Arg Asp Ala Ser Val His	
385 390 395 400	
acc ctg ctg gat gcc ttg gag acg ctg gga gag aga ctt gcc aag cag	1248
Thr Leu Leu Asp Ala Leu Glu Thr Leu Gly Glu Arg Leu Ala Lys Gln	
405 410 415	

aag att gag gac cac ttg ttg agc tct gga aag ttc atg tat cta gaa 1296
 Lys Ile Glu Asp His Leu Leu Ser Ser Gly Lys Phe Met Tyr Leu Glu
 420 425 430

ggg aat gca gac tct gcc atg tcc taa 1323
 Gly Asn Ala Asp Ser Ala Met Ser
 435 440

<210> 2
 <211> 440
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2

Met Glu Gln Arg Gly Gln Asn Ala Pro Ala Ala Ser Gly Ala Arg Lys
 1 5 10 15

Arg His Gly Pro Gly Pro Arg Glu Ala Arg Gly Ala Arg Pro Gly Pro
 20 25 30

Arg Val Pro Lys Thr Leu Val Leu Val Val Ala Ala Val Leu Leu Leu
 35 40 45

Val Ser Ala Glu Ser Ala Leu Ile Thr Gln Gln Asp Leu Ala Pro Gln
 50 55 60

Gln Arg Ala Ala Pro Gln Gln Lys Arg Ser Ser Pro Ser Glu Gly Leu
 65 70 75 80

Cys Pro Pro Gly His His Ile Ser Glu Asp Gly Arg Asp Cys Ile Ser
 85 90 95

Cys Lys Tyr Gly Gln Asp Tyr Ser Thr His Trp Asn Asp Leu Leu Phe
 100 105 110

Cys Leu Arg Cys Thr Arg Cys Asp Ser Gly Glu Val Glu Leu Ser Pro
 115 120 125

Cys Thr Thr Thr Arg Asn Thr Val Cys Gln Cys Glu Glu Gly Thr Phe
 130 135 140

Arg Glu Glu Asp Ser Pro Glu Met Cys Arg Lys Cys Arg Thr Gly Cys
 145 150 155 160

Pro Arg Gly Met Val Lys Val Gly Asp Cys Thr Pro Trp Ser Asp Ile
 165 170 175

Glu Cys Val His Lys Glu Ser Gly Thr Lys His Ser Gly Glu Ala Pro	180	185	190
Ala Val Glu Glu Thr Val Thr Ser Ser Pro Gly Thr Pro Ala Ser Pro	195	200	205
Cys Ser Leu Ser Gly Ile Ile Ile Gly Val Thr Val Ala Ala Val Val	210	215	220
Leu Ile Val Ala Val Phe Val Cys Lys Ser Leu Leu Trp Lys Lys Val	225	230	235
Leu Pro Tyr Leu Lys Gly Ile Cys Ser Gly Gly Gly Gly Asp Pro Glu	245	250	255
Arg Val Asp Arg Ser Ser Gln Arg Pro Gly Ala Glu Asp Asn Val Leu	260	265	270
Asn Glu Ile Val Ser Ile Leu Gln Pro Thr Gln Val Pro Glu Gln Glu	275	280	285
Met Glu Val Gln Glu Pro Ala Glu Pro Thr Gly Val Asn Met Leu Ser	290	295	300
Pro Gly Glu Ser Glu His Leu Leu Glu Pro Ala Glu Ala Glu Arg Ser	305	310	315
Gln Arg Arg Arg Leu Leu Val Pro Ala Asn Glu Gly Asp Pro Thr Glu	325	330	335
Thr Leu Arg Gln Cys Phe Asp Asp Phe Ala Asp Leu Val Pro Phe Asp	340	345	350
Ser Trp Glu Pro Leu Met Arg Lys Leu Gly Leu Met Asp Asn Glu Ile	355	360	365
Lys Val Ala Lys Ala Glu Ala Ala Gly His Arg Asp Thr Leu Tyr Thr	370	375	380
Met Leu Ile Lys Trp Val Asn Lys Thr Gly Arg Asp Ala Ser Val His	385	390	395
Thr Leu Leu Asp Ala Leu Glu Thr Leu Gly Glu Arg Leu Ala Lys Gln	405	410	415
Lys Ile Glu Asp His Leu Leu Ser Ser Gly Lys Phe Met Tyr Leu Glu	420	425	430
Gly Asn Ala Asp Ser Ala Met Ser	435	440	

<210> 3
 <211> 157
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (3)..(155)

<400> 3

```

ct gag act ctg aga cag tgc ttc gat gac ttt gca gac ttg gtg ccc 47
  Glu Thr Leu Arg Gln Cys Phe Asp Asp Phe Ala Asp Leu Val Pro
    1             5             10             15

ttt gac tcc tgg gag ccg ctc atg agg aag ttg ggc ctc atg gac aat 95
  Phe Asp Ser Trp Glu Pro Leu Met Arg Lys Leu Gly Leu Met Asp Asn
                20             25             30

gag ata aag gtg gct aaa gct gag gca gcg ggc cac agg gac acc ttg 143
  Glu Ile Lys Val Ala Lys Ala Glu Ala Ala Gly His Arg Asp Thr Leu
                35             40             45

tnc acn atg ctg at 157
  Xaa Xaa Met Leu
    50

```

<210> 4
 <211> 51
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 4

```

Glu Thr Leu Arg Gln Cys Phe Asp Asp Phe Ala Asp Leu Val Pro Phe
  1             5             10             15

Asp Ser Trp Glu Pro Leu Met Arg Lys Leu Gly Leu Met Asp Asn Glu
  20             25             30

Ile Lys Val Ala Lys Ala Glu Ala Ala Gly His Arg Asp Thr Leu Xaa
  35             40             45

Xaa Met Leu
  50

```

<210> 5
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Flag peptide

<400> 5

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
 1 5

<210> 8
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 6

Val Pro Ala Asn Glu Gly Asp
 1 5

<210> 7
 <211> 51
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 7

Glu Thr Leu Arg Gln Cys Phe Asp Asp Phe Ala Asp Leu Val Pro Phe
 1 5 10 15

Asp Ser Trp Glu Pro Leu Met Arg Lys Leu Gly Leu Met Asp Asn Glu
 20 25 30

Ile Lys Val Ala Lys Ala Glu Ala Ala Gly His Arg Asp Thr Leu Xaa
 35 40 45

Thr Met Leu
 50

Patentansprüche

1. Gereinigtes Rezeptor-Polypeptid für TNF-bezogenen Apoptose-induzierenden Liganden (TRAIL-R), welches an einen TNF-bezogenen Apoptose-induzierenden Liganden (TRAIL) bindet, wobei TRAIL-R als die Aminosäuresequenz VPANEGD umfassend gekennzeichnet ist.

2. TRAIL-R-Polypeptid nach Anspruch 1, wobei das vorerwähnte Polypeptid ferner durch ein Molekulargewicht von etwa 50 bis 55 Kilodalton charakterisiert ist, wie es durch SDS-Polacrylamidgel-Elektrophorese bestimmt ist.

3. TRAIL-R-Polypeptid nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, wobei das vorerwähnte Polypeptid ferner dadurch charakterisiert ist, dass es die Aminosäuresequenz ETLRQCFFDFADLVPFDSWEPLMRKLGMDNEIK-VAKAEAAGHRDTLKTML enthält.

4. Gereinigtes TRAIL-R-Polypeptid, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus:

- (a) dem TRAIL-R Polypeptid der SEQ ID Nr:2, und
- (b) einem Polypeptid, bestehend aus Aminosäuren x bis 440 von SEQ ID Nr:2, wobei x eine ganze Zahl von 51 bis 59 ist, und
- (c) einem Polypeptid, bestehend aus Aminosäuren 54 bis 440 von SEQ ID Nr:2.

5. TRAIL-R-Polypeptid, wobei das vorerwähnte Polypeptid ein löslicher TRAIL-R ist, bestehend aus Aminosäuren x bis 210 von SEQ ID Nr:2, wobei x eine ganze Zahl von 51 bis 59 ist.

6. TRAIL-R-Polypeptid nach Anspruch 5, das die Aminosäuren 52 bis 210 von SEQ ID Nr:2 aufweist.

7. Oligomer, das zwei bis vier TRAIL-R-Polypeptide nach Anspruch 4 oder zwei bis vier TRAIL-R-Polypeptide nach Anspruch 5 oder Anspruch 6 aufweist.

8. Zusammensetzung, die ein TRAIL-R-Polypeptid nach Anspruch 4, 5 oder 6 und ein physiologisch akzeptables Verdünnungsmittel, Exzipienten oder Träger aufweist.

9. Isolierte TRAIL-R-DNA, codierend für ein TRAIL-R Polypeptid, wobei das TRAIL-R Polypeptid an TNF-bezogenen Apoptose-induzierenden Liganden (TRAIL) bindet, wobei die vorerwähnte DNA die Nukleotidsequenz von SEQ ID Nr.3 aufweist.

10. Isolierte TRAIL-R-DNA, wobei die vorerwähnte DNA für ein Polypeptid codiert, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus:

- (a) dem TRAIL-R-Polypeptid der SEQ ID Nr:2, und
- (b) einem Polypeptid, das aus Aminosäuren x bis 440 von SEQ ID Nr:2 besteht, wobei x eine ganze Zahl von 51 bis 59 ist, und
- (c) einem Polypeptid, das aus Aminosäuren 54 bis 440 von SEQ ID Nr:2 besteht.

11. Isolierte TRAIL-R-DNA, wobei die vorerwähnte DNA für ein Polypeptid codiert, das ein löslicher TRAIL-R ist, bestehend aus Aminosäuren X bis 210 von SEQ ID Nr:2, wobei x eine ganze Zahl von 51 bis 59 ist.

12. TRAIL-R-DNA nach Anspruch 11, wobei die vorerwähnte DNA für ein Polypeptid codiert, das die Aminosäuren 52 bis 210 von SEQ ID Nr:2 aufweist.

13. Expressionsvektor, welcher eine DNA aufweist, die für ein Polypeptid aus der Gruppe bestehend aus:

- (a) dem TRAIL-R Polypeptide von SEQ ID Nr:2, und
- (b) einem Polypeptid bestehend aus Aminosäuren x bis 440 von SEQ ID Nr:2, wobei x eine ganze Zahl zwischen 51 und 59 ist, und
- (c) einem Polypeptid bestehend aus Aminosäuren 54 bis 440 von SEQ ID Nr:2, kodiert.

14. Wirtszelle, die mit einem Expressionsvektor nach Anspruch 13 transformiert ist.

15. Antikörper, der gegen ein TRAIL-R-Polypeptid nach einem der Ansprüche 1 bis 3 gerichtet und damit immunreaktiv ist, oder ein antigenbindendes Fragment des vorerwähnten Antikörpers, wobei der Antikörper unter Verwendung eines TRAIL-R Proteins als Immunogen erhältlich ist, wobei das TRAIL-R Protein von Jurkat Zellen durch Zerstörung der Zellen und eine darauffolgende Reinigung einschließlich Affinitätschromatographie erhältlich ist, wobei man eine Chromatographiematrix, welche TRAIL enthält, und Reverse Phase HPLC einsetzt.

16. Antikörper nach Anspruch 15, wobei der Antikörper ein monoklonaler Antikörper ist.

17. Zusammensetzung, die einen Antikörper nach Anspruch 15 oder Anspruch 16 und ein physiologisch akzeptables Verdünnungsmittel, Exzipienten oder Träger enthält.

Es folgen 3 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

FIGUR 1

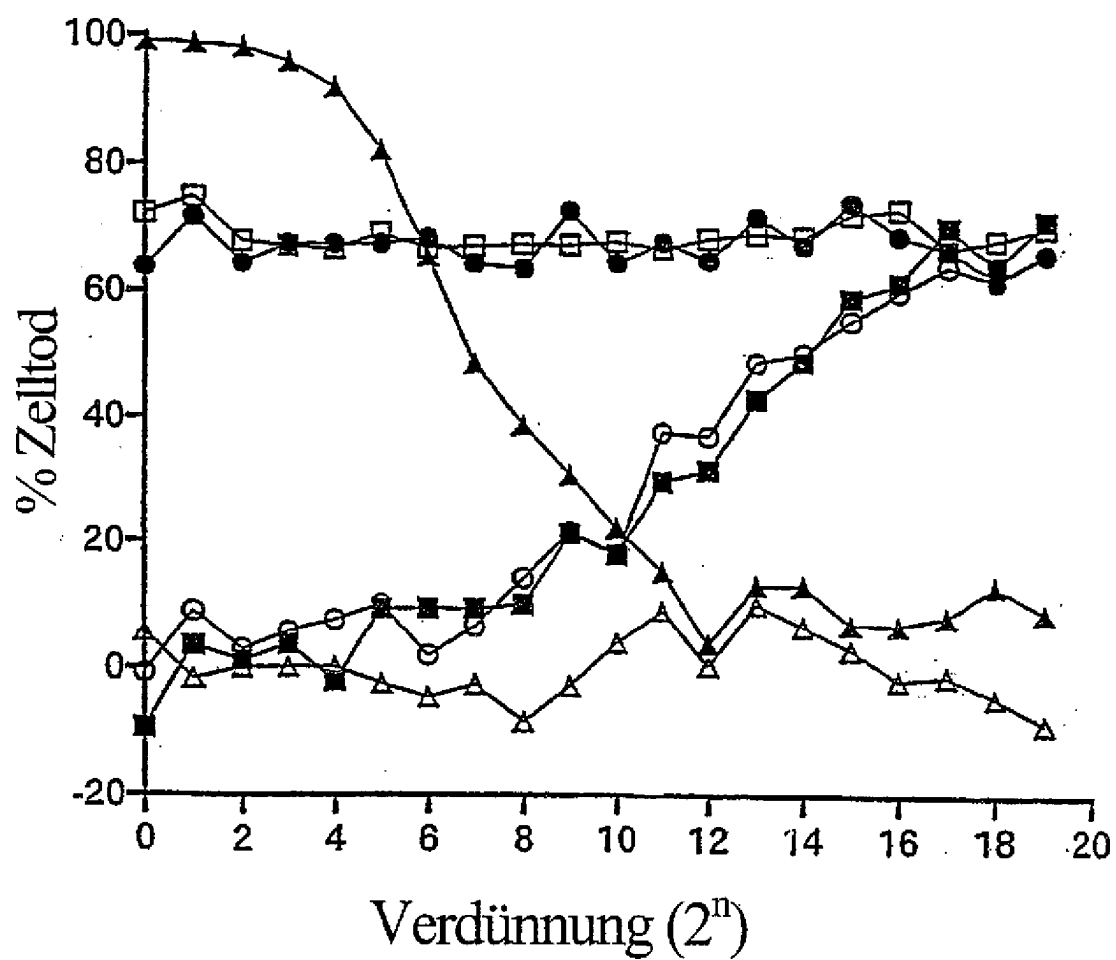
```
1  CTGAGACTCTGAGACAGTGCTTCGATGACTTTGCAGACTT 40
   -----+-----+-----+-----+
   GACTCTGAGACTCTGTACGAAGCTACTGAAACGTCTGAA
       E T L R Q C F D D F A D L

41  GGTGCCCTTTGACTCCTGGGAGCCGCTCATGAGGAAGTTG 80
   -----+-----+-----+-----+
   CCACGGGAAACTGAGGACCCTCGGCGAGTACTCCTTCAAC
       V P F D S W E P L M R K L

81  GGCCTCATGGACAATGAGATAAAGGTGGCTAAAGCTGAGG 120
   -----+-----+-----+-----+
   CCGGAGTACCTGTTACTCTATTTCCACCGATTTGACTCC
       G L M D N E I K V A K A E A

121 CAGCGGGCCACAGGGACACCTTGTNCACNATGCTGAT 157
   -----+-----+-----+-----+
   GTCGCCCCGGTGTCCCTGTGGAACANGTGNTACGACTA
       A G H R D T L X T M L
```

FIGUR 2



FIGUR 3

