



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 698 37 996 T2** 2008.02.28

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 007 659 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **698 37 996.9**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US98/00153**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **98 901 699.3**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1998/030694**

(86) PCT-Anmeldetag: **13.01.1998**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **16.07.1998**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **14.06.2000**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **27.06.2007**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **28.02.2008**

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

C12N 15/63 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C07K 14/715 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

35496 P 14.01.1997 US

(73) Patentinhaber:

Human Genome Sciences, Inc., Rockville, Md., US

(74) Vertreter:

Vossius & Partner, 81675 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

**GENTZ, Reiner L., Silver Spring, MD 20904, US; NI,
Jian, Rockville, MD 20853, US; EBNER, Reinhard,
Gaithersburg, MD 20878, US; YU, Guo-Liang, San
Mateo, CA 94403, US; RUBEN, Steven M., Olney,
MD 20832, US; FENG, Ping, Gaithersburg, MD
20878, US**

(54) Bezeichnung: **TUMORNEKROSEFAKTOR-REZEPTOREN 6 ALPHA& 6 BETA**

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

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

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft neue menschliche Gene, die Polypeptide codieren, die Mitglieder der TNF-Rezeptorfamilie sind. Genauer gesagt werden isolierte Nucleinsäuremoleküle bereitgestellt, die menschliche Polypeptide codieren, die als Tumornekrosefaktor-Rezeptor-6 α & -6 β , hier nachstehend manchmal als „TNFR-6 α , & -6 β “ oder allgemein als „TNFR-Polypeptide“ bezeichnet werden. Es werden auch TNFR-Polypeptide sowie Vektoren, Wirtszellen und rekombinante Verfahren zur Herstellung derselben bereitgestellt. Die Erfindung betrifft ferner Durchmusterungsverfahren zur Identifizierung von Agonisten und Antagonisten der TNFR-Polypeptid-Aktivität. Es werden auch diagnostische und therapeutische Verfahren bereitgestellt, die derartige Zusammensetzungen nutzen.

Hintergrund der Erfindung

[0002] Viele biologische Vorgänge, beispielsweise die Reaktion auf bestimmte Stimuli und natürliche biologische Prozesse, werden von Faktoren wie Cytokinen gesteuert. Viele Cytokine wirken über Rezeptoren, indem sie den Rezeptor besetzen und eine intrazelluläre Antwort hervorrufen.

[0003] Beispielsweise sind die Tumornekrosefaktoren (TNF) alpha und beta Cytokine, die über TNF-Rezeptoren wirken, um zahlreiche biologische Prozesse zu regulieren, einschließlich des Schutzes gegen Infektionen, der Induktion von Schock und inflammatorischen Erkrankungen. Die TNF-Moleküle gehören zur „TNF-Liganden“-Superfamilie und wirken mit ihren Rezeptoren oder Gegenliganden, der „TNF-Rezeptor-Superfamilie“, zusammen. Bisher wurden neun Mitglieder der TNF-Liganden-Superfamilie identifiziert und zehn Mitglieder der TNF-Rezeptor-Superfamilie charakterisiert.

[0004] Unter den Liganden sind TNF- α , Lymphotoxin- α (LT- α , auch als TNF- β bekannt), LT- β (findet man im Heterotrimer-LT-(α 2- β)-Komplex), FasL, CD40L, CD27L, CD30L, 4-1BBL, OX40L und Nervenwachstumsfaktor (NGF) eingeschlossen. Die Superfamilie der TNF-Rezeptoren schließt den p55TNF-Rezeptor, p75TNF-Rezeptor, das TNF-Rezeptor-verwandte Protein, FAS-Antigen oder APO-1, CD40, CD27, CD30, 4-1BB, OX40, p75 mit niedriger Affinität und den NGF-Rezeptor ein (Meager, A., *Biologicals*, 22: 291-295 (1994)).

[0005] Viele Mitglieder der TNF-Liganden-Superfamilie werden durch aktivierte T-Zellen exprimiert, was bedeutet, dass sie für die T-Zell-Interaktionen mit anderen Zelltypen notwendig sind, die der Zellontogenität und den Zellfunktionen unterliegen (Meager, A., a.a.O.).

[0006] Aufgrund der Identifizierung und Erzeugung von Mutanten gewann man beträchtliche Einsicht in wesentliche Funktionen von mehreren Mitgliedern der TNF-Rezeptor-Familie, die die Expression dieser Proteine aufheben. Beispielsweise verursachen natürlich auftretende Mutationen im FAS-Antigen und dessen Liganden lymphoproliferative Erkrankungen (Watanabe-Fukunaga, R, et al., *Nature* 356: 314 (1992)), die vielleicht ein Versagen des programmierten Zelltods widerspiegelt. Mutationen des CD40-Liganden verursachen einen mit dem X-Chromosom im Zusammenhang stehenden Immunschwächezustand, der durch hohe Immunglobulin M- und niedrige Immunglobulin G-Spiegel im Plasma charakterisiert ist, was eine fehlerhafte T-Zell-abhängige B-Zellaktivierung anzeigt (Allen, R.C. et al., *Science* 259: 990 (1993)). Zielgerichtete Mutationen des Nervenwachstumsfaktor-Rezeptors mit niedriger Affinität verursachen eine Störung, die durch eine fehlerhafte sensorische Erneuerung der peripheren Strukturen charakterisiert wird (Lee, K.F. et al., *Cell* 69: 737 (1992)).

[0007] TNF und LT- α sind in der Lage, an zwei TNF-Rezeptoren zu binden (die 55 und 75 kd-TNF-Rezeptoren). Viele biologische Effekte, die durch TNF und LT- α hervorgerufen werden, die durch ihre Rezeptoren agieren, schließen hämorrhagische Nekrose von transplantierten Tumoren, Cytotoxizität, eine Rolle beim endotoxischen Schock, Entzündung, Immunregulation, Proliferation und antivirale Reaktionen sowie den Schutz gegen schädliche Wirkung von ionisierender Strahlung ein. TNF und LT- α sind an der Pathogenese einer breiten Palette von Erkrankungen beteiligt, einschließlich endotoxischen Schocks, zerebraler Malaria, Tumoren, Autoimmunerkrankungen, AIDS und Transplantat-Wirtsabstoßung (Beutler, B. und Von Huffer, C., *Science* 264: 667-668 (1994)). Mutationen im p55-Rezeptor verursachen eine erhöhte Anfälligkeit für mikrobielle Infektionen.

[0008] Außerdem wurde über eine Domäne mit etwa 80 Aminosäuren in der Nähe des C-Terminus von TNFR1 (p55) und Fas als „Todesdomäne“ berichtet, die für die Übermittlung von Signalen für den programmierten Zelltod verantwortlich ist (Tartaglia et al., *Cell* 74: 845 (1993)).

[0009] Apoptose oder programmierter Zelltod ist ein physiologischer Prozess, der für die normale Entwicklung

und Homöostase von multizellulären Organismen wesentlich ist (H. Steller, Science 267, 1445-1449 (1995)). Die Störungen bei der Apoptose tragen zur Pathogenese mehrerer menschlicher Erkrankungen einschließlich Krebs, neurodegenerativer Störungen und des erworbenen Immunschwäche-Syndroms bei (C. B. Thompson, Science 267, 1456-1462 (1995)). Kürzlich wurde viel Aufmerksamkeit auf die Signalübermittlung und biologische Funktion von zwei Zelltod-Oberflächenrezeptoren, Fas/APO-1 und TNFR-1 gerichtet (J.L. Cleveland, J.N. Ihle, Cell 81, 479-482 (1995); A. Fraser, G. Evan, Cell 85, 781-784 (1996); S. Nagata, P. Golstein, Science 267, 1449-56 (1995)). Beide sind Mitglieder der TNF-Rezeptorfamilie, die auch unter anderem TNFR-2, NGFR mit niedriger Affinität, CD40 und CD30 einschließen (C.A. Smith, et al., Science 248, 1019-23 (1990); M. Tewari, V.M. Dixit, in Modular Texts in Molecular and Cell Biology M. Purton, Heldin, Carl, Herausg. (Chapman und Hall, London, 1995). Während Familienmitglieder durch das Vorliegen von cysteinreichen Wiederholungen in ihren extrazellulären Domänen definiert werden, haben Fas/APO-1 und TNFR-1 auch eine Region mit intrazellulärer Homologie gemeinsam, die dementsprechend als die „Todesdomäne“ bezeichnet wird, die entfernt mit dem Drosophila-Selbstmord-Gen, reaper, verwandt ist (P. Golstein, D. Marguet, V. Depraetere, Cell 81, 185-6 (1995); K. White et al., Science 264, 677-83 (1994)). Diese gemeinsame Todesdomäne legt nahe, dass die beiden Rezeptoren mit einem verwandten Satz von signalübermittelnden Molekülen interagieren, die bis vor kurzem nicht identifiziert waren. Die Aktivierung von Fas/APO-1 rekrutiert das die Todesdomäne enthaltende Adaptermolekül FADD/MORT1 (A.M. Chinnaiyan, K. O'Rourke, M. Tewari, V. M. Dixit, Cell 81, 505-12 (1995); M. P. Boldin, et al., J. Biol Chem 270, 7795-8 (1995); F.C. Kischkel, et al., EMBO 14, 5579-5588 (1995)), das wiederum FLICS/MACH1, ein Mitglied der ICE/CED-3-Familie der proapoptotischen Proteasen, bindet und vermutlich aktiviert (M. Muzio et al., Cell 85, 817-827 (1996); M.P. Boldin, T.M. Goncharov, Y.V. Goltsev, D. Wallach, Cell 85, 803-815 (1996)). Während die zentrale Rolle von Fas/APO-1 darin besteht, den Zelltod auszulösen, kann TNFR-1 eine Reihe von diversen biologischen Aktivitäten übermitteln, von denen viele von dessen Fähigkeit stammen, NF- κ B zu aktivieren (L.A. Tartaglia, D.V. Goeddel, Immunol Today 13, 151-3 (1992)). Demzufolge rekrutiert TNFR-1 das multivalente Adaptermolekül TRADD, das wie FADD ebenfalls eine Todesdomäne enthält (H. Hsu, J. Xiong, D. V. Goeddel, Cell 81, 495-504 (1995); H. Hsu, H.B. Shu, M.P. Pan, D.V. Goeddel, Cell 84, 299-308 (1996)). Aufgrund seiner Verbindungen mit zahlreichen Signalmolekülen, einschließlich FADD, TRAF2 und RIP, kann TRADD sowohl die Apoptose als auch die NF- κ B-Aktivierung übermitteln (H. Hsu, H.-B. Shu, M.-P. Pan, D.V. Goeddel, Cell 84, 299-308 (1996); H. Hsu, J. Huang, H.-B. Shu, V. Baichwal, D.V. Goeddel, Immunity 4, 387-396 (1996)). Im EMBL-Datenbankeintrag Zugangsnummer AA 025673 ist eine cDNA-Sequenz mit 467 nt offenbart.

[0010] Die Effekte der Liganden und Rezeptoren der TNF-Familie unterscheiden sich und beeinflussen zahlreiche Funktionen, sowohl normale als auch anormale, in den biologischen Prozessen des Säugersystems. Es gibt daher einen klaren Bedarf zur Identifizierung und Charakterisierung von derartigen Rezeptoren und Liganden, die die biologische Aktivität, sowohl die normale als auch in Krankheitszuständen, beeinflussen. Es gibt insbesondere einen Bedarf, neue Mitglieder der TNF-Rezeptorfamilie zu isolieren und zu charakterisieren.

Zusammenfassung der Erfindung

[0011] Die vorliegende Erfindung stellt isolierte Nucleinsäuremoleküle bereit, die ein Polynucleotid umfassen, das mindestens einen Teil eines TNFR-6 α oder -6 β -Polypeptids codiert, das die vollständigen, in SEQ ID NO: 2 bzw. 4 dargestellten Aminosäuresequenzen oder die vollständige Aminosäuresequenz besitzt, die von einem cDNA-Clon codiert wird, der als Plasmid-DNA als ATCC-Hinterlegungsnummer 97810 bzw. 97809 hinterlegt ist. Die durch die Sequenzierung der hinterlegten TNFR-6 α oder -6 β -Clone bestimmte Nucleotidsequenz, die in den [Fig. 1](#) und 2 (SEQ ID NO: 1 bzw. 3) dargestellt sind, enthalten offene Leserahmen, die die vollständigen Polypeptide mit 300 bzw. 170 Aminosäureresten, einschließlich eines Start-Codons, das ein N-terminales Methionin an den Nucleotidpositionen 25-27 und 73-75 in SEQ ID NO: 1 bzw. 3 codiert.

[0012] Den TNFR-Proteinen der vorliegenden Erfindung ist Sequenzhomologie mit anderen TNF-Rezeptoren gemeinsam. Die Spleiß-Varianten TNFR-6 α und -6 β zeigen den höchsten Grad an Sequenzhomologie mit den Translationsprodukten der menschlichen mRNAs für TNFR-I und -II ([Fig. 3](#)) (SEQ ID NO: 5 bzw. 6), die auch multiple konservierte cysteinreiche Domänen einschließen.

[0013] Die TNFR-6 α - und -6 β -Polypeptide besitzen vorhergesagte Leader-Sequenzen mit jeweils 30 Aminosäuren, und die Aminosäuresequenz der vorhergesagten reifen TNFR-6 α und -6 β -Polypeptide sind auch in den [Fig. 1](#) und 2 als Aminosäurereste 31-300 (SEQ ID NO: 2) bzw. 31-170 (SEQ ID NO: 4) dargestellt.

[0014] Daher stellt ein erfindungsgemäßer Aspekt ein isoliertes Nucleinsäuremolekül bereit, umfassend ein Polynucleotid mit einer Nucleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus (a) einer Nucleotidsequenz, die ein TNFR-Polypeptid codiert, das die vollständige Aminosäuresequenz in SEQ ID NO: 2 oder 4 be-

sitzt, oder wie von dem in der ATCC-Hinterlegungsnummer 97810 oder 97809 enthaltenen cDNA-Clon codiert; (b) einer Nucleotidsequenz, die ein reifes TNFR-Polypeptid codiert, das die vollständige Aminosäuresequenz an den Positionen 31-300 in SEQ ID NO: 2 oder 31-170 in SEQ ID NO: 4 besitzt, oder wie von dem in der ATCC-Hinterlegungsnummer 97810 oder 97809 enthaltenen cDNA-Clon codiert; (c) einer Nucleotidsequenz, die eine lösliche extrazelluläre Domäne eines TNFR-Polypeptids codiert, das die Aminosäuresequenz an Positionen 31-283 in SEQ ID NO: 2 oder 31-166 in SEQ ID NO: 4 besitzt, oder wie von dem in ATCC-Hinterlegungsnummer 97810 oder 97809 enthaltenen cDNA-Clon codiert; und (d) einer Nucleotidsequenz, die zu irgendeiner der vorstehenden Nucleotidsequenzen in (a), (b) oder (c) komplementär ist.

[0015] Weitere erfindungsgemäße Ausführungsformen schließen isolierte Nucleinsäuremoleküle ein, die ein Polynucleotid umfassen, das eine Nucleotidsequenz umfasst, die zu mindestens 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% mit irgendeiner der vorstehenden Nucleotidsequenzen in (a), (b), (c) und (d) identisch ist, oder ein Polynucleotid, das unter stringenten Hybridisierungsbedingungen mit einem vorstehenden Polynucleotid in (a), (b), (c) oder (d) hybridisiert. Dieses hybridisierende Polynucleotid hybridisiert unter stringenten Hybridisierungsbedingungen nicht mit einem Polynucleotid, das eine Nucleotidsequenz besitzt, die nur aus A-Resten oder nur aus T-Resten besteht. Eine zusätzliche erfindungsgemäße Nucleotidsequenz-Ausführungsform betrifft ein isoliertes Nucleinsäuremolekül, umfassend ein Polynucleotid, das die Aminosäuresequenz eines Epitop tragenden Teils eines TNFR-Polypeptids, das eine vorstehende Aminosäuresequenz in (a) (b) oder (c) besitzt, codiert.

[0016] Die vorliegende Erfindung betrifft auch rekombinante Vektoren, die die isolierten Nucleinsäuremoleküle der vorliegenden Erfindung einschließen, und Wirtszellen, die die rekombinanten Vektoren enthalten, sowie Verfahren, derartige Vektoren und Wirtszellen herzustellen und sie zur Herstellung der TNFR-Polypeptide oder -Peptide durch rekombinante Verfahren zu verwenden.

[0017] Die Erfindung stellt ferner ein isoliertes TNFR-Polypeptid bereit, umfassend eine Aminosäuresequenz, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus (a) der Aminosäuresequenz eines TNFR-Polypeptids mit der vollständigen Länge, das die vollständige in SEQ ID NO: 2 oder 4 dargestellte Aminosäuresequenz besitzt, oder wie von dem in der ATCC-Hinterlegungsnummer 97810 oder 97809 enthaltenen cDNA-Clon codiert; (b) der Aminosäuresequenz eines reifen TNFR-Polypeptids, das die Aminosäuresequenz an den Positionen 31-300 in SEQ ID NO: 2 oder 31-170 in SEQ ID NO: 4 besitzt, oder wie von dem in der ATCC-Hinterlegungsnummer 97810 oder 97809 enthaltenen cDNA-Clon codiert oder (c) der Aminosäuresequenz einer löslichen extrazellulären Domäne eines TNFR-Polypeptids, das die Aminosäuresequenz an den Positionen 31 bis 283 in SEQ ID NO: 2 oder 31 bis 166 in SEQ ID NO: 4 besitzt, oder wie von dem in ATCC-Hinterlegungsnummer 97810 oder 97809 enthaltenen cDNA-Clon codiert.

[0018] Die Polypeptide der vorliegenden Erfindung schließen auch Polypeptide ein, die eine Aminosäuresequenz besitzen, die zu mindestens 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% mit denjenigen vorstehend in (a) (b) oder (c) beschriebenen identisch sind, sowie Polypeptide, die eine Aminosäuresequenz mit mindestens 95% Ähnlichkeit zu den vorstehenden besitzen.

[0019] Eine zusätzliche Ausführungsform dieses erfindungsgemäßen Aspekts betrifft ein Peptid oder Polypeptid, das die Aminosäuresequenz eines Epitop-tragenden Teils eines TNFR-Polypeptids umfasst, das eine vorstehend in (a) (b) oder (c) beschriebene Aminosäuresequenz besitzt. Peptide oder Polypeptide, die die Aminosäuresequenz eines Epitop tragenden Teils eines erfindungsgemäßen TNFR-Polypeptids besitzen, schließen Teile solcher Polypeptide mit mindestens sechs oder sieben, vorzugsweise mindestens neun, und stärker bevorzugt mindestens etwa 30 Aminosäuren bis 50 Aminosäuren ein, obwohl Epitop tragende Polypeptide jeder Länge bis zu und einschließlich der gesamten Aminosäuresequenz eines erfindungsgemäßen, vorstehend beschriebenen Polypeptids ebenfalls in der Erfindung enthalten sind.

[0020] In einer anderen Ausführungsform stellt die Erfindung einen isolierten Antikörper bereit, der an ein TNFR-Polypeptid, das eine vorstehend in (a) (b) oder (c) beschriebene Aminosäuresequenz besitzt, spezifisch bindet. Die Erfindung stellt ferner Verfahren zur Isolierung von Antikörpern bereit, die an ein TNFR-Polypeptid mit einer Aminosäuresequenz, wie hier beschrieben, spezifisch binden. Derartige Antikörper sind, wie nachstehend beschrieben, diagnostisch und therapeutisch nützlich.

[0021] Von Tumornekrosefaktor (TNF)-Familie-Liganden ist bekannt, dass sie unter den am meisten pleiotropen Cytokinen zu finden sind, die eine große Anzahl zellulärer Antworten, einschließlich Cytotoxizität, antiviraler Aktivität, immunregulatorischer Aktivitäten und der Transkriptionsregulation mehrerer Gene induzieren. Die Erfindung stellt auch Arzneimittel, umfassend TNFR-Polypeptide, insbesondere menschliche TNFR-Polypep-

tide bereit, die beispielsweise eingesetzt werden können, um Infektionskrankheiten, einschließlich HIV-Infektion, endotoxischen Schock, Krebs, Autoimmunerkrankungen, Transplantat-Wirt-Abstoßung, akuter Transplantatabstoßung, chronische Transplantatabstoßung, neurodegenerativen Erkrankungen, myelodysplastische Syndrome, ischämische Verletzung, toxininduzierte Lebererkrankung, septischer Schock, Kachäxie und Anorexie zu behandeln. Verfahren zur Behandlung von Individuen, die TNFR-Polypeptide benötigen, werden ebenfalls bereitgestellt.

[0022] Die Erfindung stellt ferner Zusammensetzungen bereit, die ein TNFR-Polynucleotid oder ein TNFR-Polypeptid zur Verabreichung an Zellen *in vitro*, an Zellen *ex vivo* und an Zellen *in vivo* oder an einen multizellulären Organismus umfassen. In bestimmten bevorzugten Ausführungsformen dieses erfindungsgemäßen Aspekts, umfassen die Zusammensetzungen ein TNFR-Polynucleotid zur Expression eines TNFR-Polypeptids in einem Wirtsorganismus zur Behandlung der Krankheit. In dieser Hinsicht wird die Expression in einem menschlichen Patienten zur Behandlung einer Dysfunktion in Verbindung mit der anormalen endogenen Aktivität eines TNFR-Polypeptids besonders bevorzugt.

[0023] In einem anderen Aspekt wird ein Durchmusterungstest für Agonisten und Antagonisten beschrieben, der die Bestimmung des Effekts beinhaltet, den eine Kandidatenverbindung auf die TNFR-Polypeptid-Bindung an einen TNF-Familie-Liganden hat. Das Verfahren beinhaltet insbesondere das Inkontaktbringen des TNF-Familie-Liganden mit einem TNFR-Polypeptid und einer Kandidatenverbindung und die Bestimmung, ob die TNFR-Polypeptid-Bindung an den TNF-Familie-Liganden aufgrund des Vorliegens einer Kandidatenverbindung erhöht oder erniedrigt wird. In diesem Test zeigt eine Erhöhung der Bindung eines TNFR-Polypeptids über die Standardbindung hinaus, dass die Kandidatenverbindung ein Agonist der TNFR-Polypeptid-Bindungsaktivität ist und eine Erniedrigung der Bindung eines TNFR-Polypeptids im Vergleich zum Standard zeigt, dass die Verbindung ein Antagonist der TNFR-Polypeptid-Bindungsaktivität ist.

[0024] TNF-6 α und -6 β werden in Endothelzellen, Keratinocyten, normalem Prostata- und Prostatatumorgewebe exprimiert. Für zahlreiche Erkrankungen dieser Gewebe oder Zellen, insbesondere des Immunsystems, können signifikant höhere oder niedrigere Spiegel der TNFR-Genexpression in bestimmten Geweben (z.B. Krebsgewebe) oder Körperflüssigkeiten (z.B. Serum, Plasma, Urin, Synovialflüssigkeit oder Spinatflüssigkeit), die von einem Individuum entnommen wurden, das an einer derartigen Erkrankung leidet, im Verhältnis zu einem „Standard“-TNFR-Genexpressionsspiegel, d.h. dem TNFR-Genexpressionsspiegel, in gesundem Gewebe aus Individuen, die an keiner Immunsystemerkrankung leiden, nachgewiesen werden. Daher stellt die Erfindung ein *in-vitro*-Dignoseverfahren bereit, das während der Diagnose einer derartigen Erkrankung nützlich ist, das beinhaltet: (a) Testen des TNFR-Genexpressionsspiegels in Zellen oder in Körperflüssigkeiten eines Individuums; (b) Vergleichen des TNFR-Genexpressionsspiegels mit einem Standard-TNFR-Genexpressionsspiegel, wobei ein Anstieg oder eine Abnahme des getesteten TNFR-Genexpressionsspiegels im Vergleich zum Standardexpressionsspiegel ein Indikator für die Erkrankung des Immunsystems ist.

[0025] Die Erfindung beschreibt ferner ein Verfahren zur Behandlung eines Individuums, das einen erhöhten Spiegel der TNFR-Polypeptid-Aktivität im Körper benötigt, umfassend die Verabreichung einer Zusammensetzung an ein derartiges Individuum, umfassend die Verabreichung einer Zusammensetzung umfassend eine therapeutisch wirksame Menge eines erfindungsgemäßen, isolierten TNFR-Polypeptids oder eines Agonisten davon.

[0026] Die Erfindung beschreibt auch ein Verfahren zur Behandlung eines Individuums, das einen erniedrigten Spiegel der TNFR-Aktivität im Körper benötigt, umfassend eine therapeutisch wirksame Menge eines TNFR-Antagonisten. Bevorzugte Antagonisten zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung sind TNFR-spezifische Antikörper.

Kurze Beschreibung der Figuren

[0027] [Fig. 1](#) zeigt die Nucleotidsequenz (SEQ ID NO: 1) und die abgeleitete Aminosäuresequenz (SEQ ID NO: 2) von TNFR-6 α .

[0028] Die [Fig. 2A](#) und B zeigen die Nucleotidsequenz (SEQ ID NO: 3) und die abgeleitete Aminosäuresequenz (SEQ ID NO: 4) von TNFR-6 β .

[0029] Die [Fig. 3A](#) bis D zeigen eine Anordnung, die durch das Clustal-Verfahren unter Verwendung des Megaline-Programms im DNASTAR-Programmpaket erzeugt wurde, wobei die Aminosäuresequenzen von TNFR-6 α („TNFR-6a“) und TNFR-6 β („TNFR-6b“) mit anderen TNF-Rezeptoren verglichen wurden, wie folgt:

TNFR1 (SEQ ID NO: 5); TNFR2 (SEQ ID NO: 6); NGFR (SEQ ID NO: 7); LTbR (SEQ ID NO: 8); FAS (SEQ ID NO: 9); CD27 (SEQ ID NO: 10); CD30 (SEQ ID NO: 11); CD40 (SEQ ID NO: 12); 4-1BB (SEQ ID NO: 13); OX40 (SEQ ID NO: 14); VC22 (SEQ ID NO: 15) und CRMB (SEQ ID NO: 16).

[0030] Die [Fig. 4](#) und [Fig. 5](#) zeigen getrennte Analysen der TNFR-6 α - bzw. -6 β -Aminosäuresequenzen. Alpha-, Beta-, Turn- und Coil-Regionen; Hydrophilität und Hydrophobizität; amphipathische Regionen; flexible Regionen; antigene Index- und Oberflächenwahrscheinlichkeit sind dargestellt. In den „Jameson-Wolf-Antigenizitätsindex“-Diagrammen ist die Position der hochantigenen Regionen der Proteine angegeben, d.h. die Regionen, von denen die erfindungsgemäßen, Epitop-tragenden Peptide erhalten werden können.

[0031] [Fig. 6](#) zeigt die Nucleotidsequenzen HELDI06R und HCEOW38R, die mit den SEQ ID NO:1 und 3 verwandt sind.

Detaillierte Beschreibung

[0032] Die vorliegende Erfindung stellt isolierte Nucleinsäuremoleküle bereit, umfassend ein Polynucleotid, das ein TNFR-6 α - oder -6 β -Polypeptid codiert, wobei „(ein) TNFR-Polypeptid(e)“ allgemein die in SEQ ID NO: 2 bzw. 4 dargestellten Aminosäuresequenzen besitzt/besitzen, die durch Sequenzierung von clonierten cDNAs bestimmt wurden. Die in den [Fig. 1](#) und [Fig. 2A](#) und B (SEQ ID NO: 1 und 3) dargestellten Nucleotidsequenzen wurden durch Sequenzieren der HPHA52- und HTPCH84-Clone erhalten, die am 22. November 1996 bei der American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209 hinterlegt wurden, und denen die Hinterlegungsnummern ATCC 97810 bzw. 97809 gegeben wurden. Die hinterlegten Clone sind im pBluescript SK(-)-Plasmid (Stratagene, La Jolla, KA) enthalten.

[0033] Die TNFR-6 α - und -6 β -Proteine der vorliegenden Erfindung sind Spleißvarianten, denen eine identische Nucleotid- und Aminosäuresequenz über die 142 N-terminalen Reste der entsprechenden Proteine gemeinsam ist. Die Aminosäuresequenzen dieser Proteine besitzen eine etwa 23%-ige Ähnlichkeit mit dem Translationsprodukt der menschlichen TNFR-2 mRNA ([Fig. 3](#)) (SEQ ID NO: 6) und haben mehrfach konservierte, cysteinreiche Domänen damit gemeinsam. Wichtiger noch ist, dass diesen Proteinen eine wesentliche Sequenzähnlichkeit über ihre extrazellulären Domänen, einschließlich vier sich wiederholender, cysteinreicher Motive mit signifikanter Homologie zwischen den Untereinheiten, gemeinsam ist. Man glaubt, dass TNFR-2 die menschliche T-Zellproliferation ausschließlich durch TNF (PCT WO/94/09137) vermittelt.

Nucleinsäuremoleküle

[0034] Wenn nicht anders angegeben, wurden alle hier durch Sequenzieren eines DNA-Moleküls bestimmten Nucleotidsequenzen unter Verwendung eines automatisierten DNA-Sequenziergeräts (wie das Modell 373 von Applied Biosystems, Inc., Foster City, KA) bestimmt, und alle Aminosäuresequenzen der durch die hier bestimmten DNA-Moleküle codierten Polypeptide wurden durch Translation einer wie vorstehend bestimmten DNA-Sequenz vorhergesagt. Daher kann, wie im Fachgebiet für jede durch diesen automatisierten Ansatz bestimmte DNA bekannt ist, jede hier bestimmte Nucleinsäure einige Fehler enthalten. Durch Automatisierung bestimmte Nucleotidsequenzen sind typischerweise zu mindestens etwa 90%, noch typischer zu mindestens etwa 95% bis mindestens etwa 99,9% zu der eigentlichen Nucleotidsequenz des sequenzierten DNA-Moleküls identisch. Die eigentliche Sequenz kann durch andere Ansätze einschließlich manueller, im Fachgebiet gut bekannter Sequenzierverfahren genauer bestimmt werden. Wie auch im Fachgebiet bekannt ist, verursacht eine einzelne Insertion oder Deletion in einer bestimmten Nucleotidsequenz im Vergleich zur eigentlichen Sequenz eine Verschiebung des Leserahmens bei der Translation der Nucleotidsequenz, so dass sich die vorhergesagte Aminosäuresequenz, die von der bestimmten Nucleotidsequenz codiert wird, vollkommen von der Aminosäuresequenz unterscheidet, die tatsächlich von dem sequenzierten DNA-Molekül codiert wird, ausgehend von einer derartigen Insertions- oder Deletionsstelle.

[0035] Mit „Nucleotidsequenz“ eines Nucleinsäuremoleküls oder Polynucleotids ist für ein DNA-Molekül oder Polynucleotid eine Sequenz aus Desoxyribonucleotiden, und für ein RNA-Molekül oder Polynucleotid, die entsprechende Sequenz aus Ribonucleotiden (A, G, C und U) gemeint, wobei jedes Thymidindesoxyribonucleotid (T) in der spezifizierten Desoxyribonucleotidsequenz durch das Ribonucleotid Uridin (U) ersetzt ist.

[0036] Unter Verwendung der hier bereitgestellten Informationen, wie die Nucleotidsequenzen in den [Fig. 1](#) und [Fig. 2A](#) und B, (SEQ ID NO: 1 und 3), kann ein TNFR-Polypeptid codierendes Nucleinsäuremolekül der vorliegenden Erfindung unter Verwendung von Standard-Clonierungs- und Durchmusterungsverfahren, wie diejenigen zur Clonierung von cDNAs unter Verwendung von mRNA als Ausgangsmaterial erhalten werden.

Zur Veranschaulichung der Erfindung wurden die TNFR-6 α - und -6 β -Clone ([Fig. 1](#) bzw. [Fig. 2A](#) und B) in cDNA-Genbanken aus den folgenden Geweben identifiziert: Endothelzellen, Keratinocyten, normales Prostatagewebe und Prostatatumorgewebe.

[0037] Die bestimmten Nucleotidsequenzen der TNFR-cDNAs der [Fig. 1](#) und [Fig. 2A](#) und B (SEQ ID NO: 1 und 3) enthalten offene Leserahmen, die Proteine mit 300 und 170 Aminosäureresten mit einem Start-Codon an den Nucleotidpositionen 25-27 und 73-75 der Nucleotidsequenzen in den [Fig. 1](#) bzw. 2 (SEQ ID NO: 1 und 3) codieren.

[0038] Die offenen Leserahmen der TNFR-6 α - und -6 β -Gene haben eine Sequenzhomologie mit dem Translationsprodukt der menschlichen mRNA für TNFR-2 gemeinsam, einschließlich der löslichen extrazellulären Domäne der Reste von etwa 31-283 von SEQ ID NO: 2 bzw. 31-166 von SEQ ID NO: 4.

[0039] Wie ein Fachmann weiß, können aufgrund der Möglichkeiten der vorstehend diskutierten Sequenzierfehler die tatsächlichen vollständigen TNFR-Polypeptide, die von den hinterlegten cDNAs codiert werden, die etwa 300 und 170 Aminosäuren umfassen, etwas kürzer oder länger sein. Allgemeiner können die eigentlichen offenen Leserahmen irgendwo im Bereich zwischen +/-20 Aminosäuren, wahrscheinlicher im Bereich zwischen +/-10 derjenigen Aminosäuren liegen, die für das erste Methionin-Codon vom N-Terminus vorhergesagt werden, wie dargestellt in den [Fig. 1](#) und [Fig. 2A](#) und B (SEQ ID NO: 1 und 3), das sich im Leserahmen mit den in der jeweiligen Figur dargestellten translatierten Sequenzen befindet. Man weiß ferner, dass abhängig von den analytischen Kriterien, die zur Identifizierung verschiedener funktionaler Domänen verwendet werden, die genaue „Adresse“ der extrazellulären und Transmembrandomäne(n) der TNFR-Polypeptide von den vorstehenden vorhergesagten Positionen sich etwas unterscheiden kann. Beispielsweise kann die genaue Position der extrazellulären Domäne in SEQ ID NO: 2 etwas variieren (z.B. kann sich die Adresse um 1 bis etwa 20 Reste, wahrscheinlicher um 1 bis etwa 5 Reste verschieben), abhängig von den verwendeten Kriterien, um die Domäne zu definieren. Auf jeden Fall stellt die Erfindung, wie weiter nachstehend diskutiert, ferner Polypeptide bereit, die verschiedene Reste besitzen, die vom N-Terminus des vollständigen Polypeptids deletiert wurden, einschließlich Polypeptide, denen eine oder mehrere Aminosäuren vom N-Terminus der hier beschriebenen extrazellulären Domäne fehlen, die die löslichen Formen der extrazellulären Domänen der TNFR-6 α - & -6 β -Proteine ausmachen.

Leader- und reife Sequenzen

[0040] Die Aminosäuresequenzen der vollständigen TNFR-Proteine schließen eine Leader-Sequenz und ein reifes Protein ein, wie in SEQ ID NO: 2 und 4 dargestellt. Genauer gesagt stellt die vorliegende Erfindung Nucleinsäuremoleküle bereit, die reife Formen der TNFR-Proteine codieren. Daher haben nach der Signalthypothese, sobald der Export der wachsenden Proteinkette über das raue endoplasmatische Reticulum initiiert wurde, Proteine, die von Säugerzellen sekretiert werden, eine Signal- oder sekretorische Leader-Sequenz, die von dem vollständigen Polypeptid abgespalten wird, so dass eine sekretierte „reife“ Form des Proteins produziert wird. Die meisten Säugerzellen und sogar Insektenzellen spalten sekretierte Proteine mit derselben Spezifität ab. In einigen Fällen ist jedoch die Spaltung eines sekretierten Proteins nicht ganz einheitlich, was zu zwei oder mehr reifen Spezies des Proteins führt. Ferner war bereits lange bekannt, dass die Spaltungsspezifität eines sekretierten Proteins letztendlich von der Primärstruktur des vollständigen Proteins bestimmt wird, d.h. sie ist in der Aminosäuresequenz des Polypeptids inhärent. Daher stellt die vorliegende Erfindung eine Nucleinsäuresequenz bereit, die ein reifes TNFR-Polypeptid codiert, das die Aminosäuresequenz besitzt, die von einem als ATCC Hinterlegungsnummer 97810 oder 97809 identifizierten cDNA-Clon codiert wird. Mit den „reifen“ TNFR-Polypeptiden, die die Aminosäuresequenz besitzen, die von einem cDNA-Clon in den ATCC Hinterlegungsnummer 97810 oder 97809 codiert wird, ist/sind die reife(n) Form(en) des Proteins gemeint, die durch Expression des vollständigen offenen Leserahmens, der von der menschlichen DNA-Sequenz des in dem hinterlegten Vektor enthaltenen Clons codiert wird, in einer Säugerzelle (z.B. COS-Zellen, wie nachstehend beschrieben) produziert wird/werden.

[0041] Außerdem stehen Verfahren zur Vorhersage zur Verfügung, ob ein Protein einen sekretorischen Leader sowie einen Spaltungspunkt für jene Leader-Sequenz besitzt. Beispielsweise nutzt das Verfahren von McGeoch (Virus Res. 3: 271-286 (1985)) Informationen über eine kurze N-terminale geladene Region und eine darauffolgende ungeladene Region des vollständigen (ungespaltene) Proteins. Das Verfahren von Heinje (Nucleic Acids Res. 14: 4683-4690 (1986)) nutzt Informationen über die Reste, die die Spaltungsstelle umgeben, typischerweise die Reste -13 bis +2, wobei +1 den Aminoterminus des reifen Proteins angibt. Die Genauigkeit der Vorhersage der bekannten Spaltungspunkte der sekretorischen Säuger-Proteine für jedes dieser Verfahren liegt im Bereich von 75-80% (von Heinje, a.a.O.). Jedoch liefern die beiden Verfahren nicht immer

denselben/dieselben vorhergesagte(n) Spaltstelle(n) für ein bestimmtes Protein.

[0042] In dem vorliegenden Fall wurde die abgeleitete Aminosäuresequenz der vollständigen TNFR-Polypeptide durch ein Computerprogramm „PSORT“ analysiert, zur Verfügung gestellt von Dr. Kenta Nakai vom Institute for Chemical Research, Kyoto University (vgl. K. Nakai und M. Kanehisa, Genomics 14: 897-911 (1992)), das ein auf der Aminosäuresequenz basierendes Expertensystem zur Vorhersage der zellulären Lokalisierung eines Proteins ist. Als Teil dieser computergestützten Vorhersage der Lokalisierung werden die Verfahren von McGeoch und von Heinje mit eingebracht. Die Analyse der TNFR-Aminosäuresequenzen durch dieses Programm lieferte die folgenden Ergebnisse: TNFR-6 α - & -6 β codieren reife Polypeptide mit den Aminosäuresequenzen der Reste 31-300 bzw. 31-170 von SEQ ID NO: 2 bzw. 4.

[0043] Wie angegeben, können die Nucleinsäuremoleküle der vorliegenden Erfindung in Form von RNA, wie mRNA, oder in Form von DNA vorliegen, einschließlich beispielsweise cDNA und genomischer DNA, die durch Clonieren oder synthetische Herstellung erhalten wird. Die DNA kann doppelsträngig oder einzelsträngig sein. Einzelsträngige DNA oder RNA kann der codierende Strang sein, auch bekannt als der Sense-Strang, oder sie kann der nicht-codierende Strang sein, auch als der Anti-Sense-Strang bezeichnet.

[0044] Mit „isoliertem/isolierten“ Nucleinsäuremolekül(en) ist ein Nucleinsäuremolekül, DNA oder RNA gemeint, das von seiner nativen Umgebung entfernt wurde. Beispielsweise rekombinante DNA-Moleküle, die in einem Vektor enthalten sind, werden als isoliert für die Zwecke der vorliegenden Erfindung betrachtet. Weitere Beispiele isolierter DNA-Moleküle schließen rekombinante DNA-Moleküle, die in heterologen Wirtszellen gehalten werden, oder (teilweise oder wesentlich) gereinigte DNA-Moleküle in Lösung ein. Isolierte RNA-Moleküle schließen in-vivo- oder in-vitro-RNA-Transkripte der DNA-Moleküle der vorliegenden Erfindung ein. Isolierte Nucleinsäuremoleküle nach der vorliegenden Erfindung schließen ferner solche Moleküle ein, die synthetisch hergestellt werden.

[0045] Isolierte Nucleinsäuremoleküle der vorliegenden Erfindung schließen DNA-Moleküle ein, die einen offenen Leserahmen (ORF) mit einem Start-Codon an den Positionen 25-27 bzw. 73-75 der in SEQ ID NO: 1 bzw. 3 dargestellten Nucleinsäuresequenzen besitzen.

[0046] Es sind auch DNA-Moleküle eingeschlossen, die die codierende Sequenz für die vorhergesagten reifen TNFR-Polypeptide umfassen, dargestellt an den Positionen 31-300 bzw. 31-170 von SEQ ID NO: 2 bzw. 4.

[0047] Außerdem schließen erfindungsgemäße, isolierte Nucleinsäuremoleküle DNA-Moleküle ein, die eine Sequenz umfassen, die sich im Wesentlichen von denjenigen unterscheidet, die vorstehend beschrieben wurden, die aber aufgrund der Degenerierung des genetischen Codes noch ein TNFR-Protein codieren. Natürlich sind der genetische Code und die speziesspezifischen Codepräferenzen im Fachgebiet gut bekannt. Daher wäre es Routine für den Fachmann, die vorstehend beschriebenen, degenerierten Varianten zu erzeugen, beispielsweise, um die Codonexpression für einen bestimmten Wirt zu optimieren (z.B. Verändern der Codons in menschlicher mRNA in diejenigen, die von einem bakteriellen Wirt wie E. coli bevorzugt werden).

[0048] In einem anderen Aspekt stellt die Erfindung isolierte Nucleinsäuremoleküle bereit, die ein TNFR-Polypeptid mit einer Aminosäuresequenz codieren, die von dem cDNA-Clon codiert wird, der in dem Plasmid enthalten ist, das als ATCC-Hinterlegungsnummer 97810 oder 97809 hinterlegt ist. Vorzugsweise codiert dieses Nucleinsäuremolekül das reife Polypeptid, das von dem vorstehend beschriebenen hinterlegten cDNA-Clon codiert wird.

[0049] Die Erfindung stellt ferner ein isoliertes Nucleinsäuremolekül bereit, das die in [Fig. 1](#) oder den [Fig. 2A](#) und B (SEQ ID NO: 1 oder 3) dargestellte Nucleotidsequenz oder die Nucleotidsequenz der TNFR-cDNAs besitzt, die in den vorstehend beschriebenen hinterlegten cDNA-Clonen enthalten ist, oder ein Nucleinsäuremolekül, das eine Sequenz besitzt, die zu einer der vorstehenden Sequenzen komplementär ist. Derartige isolierte Moleküle, insbesondere DNA-Moleküle, sind als Sonden für die Genkartierung durch in-situ-Hybridisierung mit Chromosomen und zum Nachweis der Expression der TNFR-Gene in menschlichem Gewebe, beispielsweise durch Northern-Blot-Analyse, nützlich.

[0050] Die vorliegende Erfindung ist ferner auf Nucleinsäuremoleküle gerichtet, die Teile der hier beschriebenen Nucleotidsequenzen codieren, sowie auf Fragmente der hier beschriebenen isolierten Nucleinsäuremoleküle. Die Erfindung stellt insbesondere Polynucleotide bereit, die eine Nucleotidsequenz besitzen, die den Anteil von SEQ ID NO: 1 oder 3 repräsentiert, der aus den Positionen 25-924 bzw. 73-582 von SEQ ID NO: 1 bzw. 3 besteht. Es werden auch Polynucleotide in Erwägung gezogen, die TNFR-Polypeptide codieren, denen ein

aminoterminalen Methionin fehlt, wobei derartige Polynucleotide eine Nucleotidsequenz besitzen, die den Anteil von SEQ ID NO: 1 und 3 repräsentiert, der aus den Positionen 28-924 bzw. 76-582 besteht. Polypeptide, die von derartigen Polynucleotiden codiert werden, werden ebenfalls bereitgestellt, wobei derartige Polynucleotide eine Aminosäuresequenz an den Positionen 2-300 bzw. 2-170 von SEQ ID NO: 2 bzw. 4 umfassen.

[0051] Außerdem stellt die Erfindung Nucleinsäuremoleküle bereit, die Nucleinsäuren besitzen, die zu erheblichen Anteilen von SEQ ID NO: 1 und 3 verwandt sind, wie folgt: HELDI06R (SEQ ID NO: 17) und HCEOW38R (SEQ ID NO: 18) sind sowohl mit SEQ ID NO: 1 als auch mit 3 verwandt. Polypeptidfragmente der SEQ ID NO: 1 und 3, die nicht SEQ ID NO: 19 oder 20 oder Unterfragmente von entweder SEQ ID NO: 19 oder 20 sind, werden bevorzugt. Die Sequenzen von HELDI06R und HCEOW38R sind in [Fig. 6](#) dargestellt.

[0052] Mit einem Fragment eines isolierten Nucleinsäuremoleküls, das die Nucleotidsequenz der hinterlegten cDNA oder die in den [Fig. 1](#) oder 2 (SEQ ID NOS: 1 oder 3) dargestellten Nucleotidsequenz besitzt, sind allgemeine Fragmente gemeint, die mindestens etwa 15 nt, und stärker bevorzugt mindestens etwa 20 nt, noch mehr bevorzugt mindestens etwa 30 nt, und sogar noch mehr bevorzugt mindestens etwa 40 nt lang sind, die als diagnostische Sonden und Primer nützlich sind, wie hier diskutiert wird. Natürlich sind größere Fragmente mit einer Länge von 50-300 nt gemäß der vorliegenden Erfindung ebenfalls nützlich genauso wie Fragmente, die den meisten, wenn nicht allen Nucleotidsequenzen der hinterlegten cDNAs, oder wie in den [Fig. 1](#) und [Fig. 2A](#) und B, (SEQ ID NO: 1 und 3) dargestellt, entsprechen. Besonders bevorzugt sind Fragmente, die mindestens 500 Nucleotide umfassen, die zu mindestens 95% identisch mit 500 aufeinanderfolgenden Nucleotiden, dargestellt in SEQ ID NO: 1, sind. Mit einem Fragment von einer Länge mit mindestens 20 nt sind beispielsweise Fragmente gemeint, die 20 oder mehr aufeinanderfolgende Basen aus der Nucleotidsequenz einer hinterlegten cDNA oder der Nucleotidsequenz, wie sie in den [Fig. 1](#) und [Fig. 2A](#) und B (SEQ ID NO: 1 und 3) dargestellt ist, einschließen. Bevorzugte Nucleinsäurefragmente der vorliegenden Erfindung schließen Nucleinsäuremoleküle ein, die Epitop tragende Teile der TNFR-Polypeptide codieren, wie in den [Fig. 4](#) und [Fig. 5](#) identifiziert und nachstehend detaillierter beschrieben.

[0053] In einem anderen Aspekt stellt die Erfindung ein isoliertes Nucleinsäuremolekül bereit, das ein Polynucleotid umfasst, das unter stringenten Hybridisierungsbedingungen mit einem Teil des Polynucleotids in einem erfindungsgemäßen, vorstehend beschriebenen Nucleinsäuremolekül hybridisiert, beispielsweise einem cDNA-Clon, der in ATCC-Hinterlegungsnr. 97810 oder 97809 enthalten ist. Mit „stringenten Hybridisierungsbedingungen“ ist eine Inkubation bei 42°C in einer Lösung gemeint, umfassend: 50% Formamid, 5 × SSC (750 mM NaCl, 75mM Trisnatriumcitrat), 50 mM Natriumphosphat (pH 7,6), 5 × Denhardt-Lösung, 10% Dextransulfat und 20 µg/ml denaturierte, gescherte Lachssperma-DNA, gefolgt von Waschen der Filter in 0,1 × SSC bei etwa 65°C.

[0054] Mit einem Polynucleotid, das mit einem „Teil“ eines Polynucleotids hybridisiert, ist entweder ein Polynucleotid (entweder DNA oder RNA) gemeint, das mit mindestens etwa 15 Nucleotiden (nt) und stärker bevorzugt mit mindestens etwa 20 nt, noch mehr bevorzugt mit mindestens etwa 30 nt, und sogar stärker bevorzugt etwa 30-70 (z.B. 50) nt des Referenzpolynucleotids hybridisiert. Diese sind als diagnostische Sonden und Primer nützlich, wie vorstehend und detailliert nachstehend diskutiert.

[0055] Mit einem Teil eines Polynucleotids „mit einer Länge von mindestens 20 nt“ sind beispielsweise 20 oder mehr aufeinanderfolgende Basen aus der Nucleotidsequenz eines Referenzpolynucleotids (z.B. eine hinterlegte cDNA oder eine Nucleotidsequenz, wie in den [Fig. 1](#) und [Fig. 2A](#) und B (SEQ ID NO: 1 und 3) dargestellt) gemeint. Natürlich wäre ein Polynucleotid, das nur mit einer Poly A-Sequenz (wie dem 3'-terminalen Poly A-Trakt einer TNFR-cDNA) oder an einen komplementären Abschnitt von T- (oder U-Resten) hybridisiert, nicht in ein erfindungsgemäßes Polynucleotid eingeschlossen, das verwendet wird, um mit einem Teil einer erfindungsgemäßen Nucleinsäure zu hybridisieren, da ein derartiges Polynucleotid mit jedem Nucleinsäuremolekül hybridisieren würde, das einen Poly(A)-Abschnitt oder ein Komplement davon (z.B. praktisch jedem doppelsträngigen cDNA-Clon) enthält.

[0056] Wie angegeben, können Nucleinsäuren der vorliegenden Erfindung, die ein TNFR-Polynucleotid codieren, einschließen, sind aber nicht begrenzt auf diejenigen Sequenzen, die die Aminosäuresequenz des reifen Polypeptids selbst codieren; und auf die codierende Sequenz für das reife Polypeptid und zusätzliche Sequenzen, wie diejenigen, die die Leader- oder sekretorischen Sequenzen mit etwa 26-35 Aminosäuren codieren, wie eine Prä-, Pro- oder Präpro-Proteinsequenz; die codierende Sequenz des reifen Polypeptids mit oder ohne den vorstehend erwähnten, zusätzlichen codierenden Sequenzen.

[0057] Ebenfalls codiert von den erfindungsgemäßen Nucleinsäuren werden die vorstehenden Proteinse-

quenzen zusammen mit zusätzlichen nicht-codierenden Sequenzen, einschließlich beispielsweise, jedoch nicht begrenzt auf Introns und nicht-codierende 5'- und 3'-Sequenzen, wie die transkribierten, nicht-translatierten Sequenzen, die eine Rolle bei der Transkription, mRNA-Prozessierung spielen, einschließlich Spleiß- und Polyadenylierungssignale, beispielsweise, Ribosomenbindung und Stabilität der mRNA; eine zusätzliche codierende Sequenz, die zusätzliche Aminosäuren codiert, wie diejenigen, die zusätzliche Funktionalitäten bereitstellen.

[0058] Daher kann die Sequenz, die das Polypeptid codiert, an eine Markersequenz wie eine Sequenz, die ein Peptid codiert, das die Reinigung des fusionierten Peptids erleichtert, fusioniert werden. In bestimmten bevorzugten Ausführungsformen dieses erfindungsgemäßen Aspekts, ist die Markeramino-säuresequenz ein Hexahistidinpeptid, wie die Markierung, die unter anderem in einem pQE-Vektor (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, KA, 91311) bereitgestellt wird, von denen viele im Handel erhältlich sind. Wie in Gentz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 821-824 (1989) beschrieben, sorgt das Hexahistidin für die bequeme Reinigung des Fusionsproteins. Die „HA“-Markierung ist ein anderes für die Reinigung nützliches Peptid, das einem Epitop entspricht, welches vom Influenza-Hämagglutinin-Protein stammt, das von Wilson et al., Cell 37: 767 (1984) beschrieben wurde. Wie nachstehend diskutiert, schließen andere derartige Fusionsproteine ein TNFR-5, -6 α oder -6 β , fusioniert an Fc am N- oder C-Terminus, ein.

Varianten und mutierte Polynucleotide

[0059] Die vorliegende Erfindung beschreibt ferner Varianten der Nucleinsäuremoleküle der vorliegenden Erfindung, die Teile, Analoga oder Derivate eines TNFR-Polypeptids codieren. Varianten können natürlich auftreten wie eine natürliche allele Variante. Mit einer „allelen Variante“ wird eine von mehreren verschiedenen Formen eines Gens beschrieben, das einen bestimmten Ort auf einem Chromosom eines Organismus besetzt. Genes 11, Lewin, 13., Herausg., John Wiley & Sons, New York (1985).

[0060] Nicht-natürlich auftretende Varianten können unter Verwendung von im Fachgebiet bekannten Mutagenesetechniken hergestellt werden.

[0061] Derartige Varianten schließen diejenigen ein, die durch Nucleotidsubstitutionen, -deletionen oder -additionen hergestellt werden. Die Substitutionen, Deletionen oder Additionen können ein oder mehrere Nucleotide beinhalten. Die Varianten können in den codierenden Regionen, nicht-codierenden Regionen oder beiden geändert werden. Änderungen in den codierenden Regionen können konservative oder nicht-konservative Aminosäuresubstitutionen, -deletionen oder -additionen produzieren. Darunter werden insbesondere stille Substitutionen, Additionen oder Deletionen bevorzugt, die die Eigenschaften und Aktivitäten des TNFR-Polypeptids oder Teilen davon nicht ändern. In dieser Hinsicht sind auch insbesondere konservative Substitutionen bevorzugt.

[0062] Stark bevorzugt sind Nucleinsäuremoleküle, die ein reifes Protein mit einer in SEQ ID NO: 2 und 4 dargestellten Aminosäuresequenz codieren, oder die reifen TNFR-Polypeptidsequenzen besitzen, die von den hinterlegten cDNA-Clonen codiert werden.

[0063] Am stärksten bevorzugt werden Nucleinsäuremoleküle, die die extrazelluläre Domäne eines Proteins, das die in den SEQ ID NO: 2 und 4 dargestellte Aminosäuresequenz besitzt, oder die extrazelluläre Domäne einer TNFR-Aminosäuresequenz codieren, die von einem hinterlegten cDNA-Clon codiert wird.

[0064] Weitere Ausführungsformen schließen ein isoliertes Nucleinsäuremolekül ein, das ein Polynucleotid umfasst, das eine Nucleotidsequenz besitzt, die zu mindestens 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% mit einem Polynucleotid identisch ist, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus: (a) einer Nucleotidsequenz, die ein TNFR-Polypeptid codiert, das die vollständige Aminosäuresequenz in SEQ ID NO: 2 oder 4 besitzt, oder wie von dem in der ATCC-Hinterlegungs-nr. 97810 oder 97809 enthaltenen cDNA-Clon codiert; (b) einer Nucleotidsequenz, die ein reifes TNFR-Polypeptid codiert, das eine Aminosäuresequenz an den Positionen 31-300 bzw. 31-170 in SEQ ID NO: 2 bzw. in SEQ ID NO: 4 besitzt, oder wie von dem in der ATCC-Hinterlegungs-nr. 97810 oder 97809 enthaltenen cDNA-Clon codiert; (c) einer Nucleotidsequenz, die eine lösliche extrazelluläre Domäne eines TNFR-Polypeptids codiert, das die Aminosäuresequenz an den Positionen 31-283 bzw. 31-166 von SEQ ID NO: 2 bzw. SEQ ID NO: 4 besitzt; und (d) einer Nucleotidsequenz, die zu irgendeiner der vorstehenden Nucleotidsequenzen in (a), (b) oder (c) komplementär ist.

[0065] Weitere erfindungsgemäße Ausführungsformen schließen isolierte Nucleinsäuremoleküle ein, die ein Polynucleotid umfassen, das eine Nucleotidsequenz besitzt, die zu mindestens 95%, 96%, 97%, 98% oder

99% mit irgendeiner der vorstehenden Nucleotidsequenzen in (a), (b) (c) oder (d) identisch ist, oder ein Polynucleotid, das unter stringenten Hybridisierungsbedingungen mit einem vorstehenden Polynucleotid in (a), (b), (c) oder (d) hybridisiert. Dieses hybridisierende Polynucleotid hybridisiert unter stringenten Hybridisierungsbedingungen nicht mit einem Polynucleotid, das eine Nucleotidsequenz besitzt, die nur aus A-Resten oder nur aus T-Resten besteht. Eine zusätzliche erfindungsgemäße Nucleinsäure-Ausführungsform betrifft ein isoliertes Nucleinsäuremolekül, umfassend ein Polynucleotid, das die Aminosäuresequenz eines Epitop tragenden Teils eines TNFR-Polypeptids codiert, das eine vorstehende Aminosäuresequenz in (a), (b) (c) oder (d) besitzt.

[0066] Die vorliegende Erfindung betrifft auch rekombinante Vektoren, die die isolierten Nucleinsäuremoleküle der vorliegenden Erfindung einschließen, und Wirtszellen, die die rekombinanten Vektoren enthalten, sowie Verfahren derartige Vektoren und Wirtszellen herzustellen, und sie zur Herstellung der TNFR-Polypeptide oder Peptide durch rekombinante Verfahren zu verwenden.

[0067] Mit einem Polynucleotid, das eine Nucleotidsequenz besitzt, die zu mindestens 95% mit einer Referenznucleotidsequenz „identisch“ ist, die ein TNFR-Polypeptid codiert, ist gemeint, dass die Nucleotidsequenz des Polypeptids mit der Referenzsequenz identisch ist, mit der Ausnahme, dass die Polynucleotidsequenz bis zu fünf Punktmutationen pro jeweils 100 Nucleotide der Referenznucleotidsequenz, die das TNFR-Polypeptid codiert, einschließt. Mit anderen Worten, um ein Polynucleotid zu erhalten, das eine Nucleotidsequenz besitzt, die zu mindestens 95% mit einer Referenznucleotidsequenz identisch ist, können bis zu 5% der Nucleotide in der Referenzsequenz deletiert oder mit einem anderen Nucleotid substituiert sein, oder zahlreiche Nucleotide bis zu 5% der Gesamtnucleotide in der Referenzsequenz können in die Referenzsequenz eingebaut sein. Diese Mutationen der Referenzsequenz können an den 5'- oder 3'-terminalen Positionen der Referenznucleotidsequenz oder irgendwo zwischen jenen terminalen Positionen auftreten, entweder einzeln zwischen die Nucleotide in die Referenzsequenz oder in einer oder mehreren aufeinanderfolgenden Gruppen in die Referenzsequenz eingefügt.

[0068] Ob irgendein bestimmtes Nucleinsäuremolekül zu mindestens 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% mit beispielsweise einer in den in den [Fig. 1](#) und [Fig. 2A](#) und B dargestellten Nucleotidsequenz oder den Nucleotidsequenzen eines hinterlegten cDNA-Clons identisch ist, kann in der Praxis unter Verwendung von bekannten Computerprogrammen, wie dem Bestfit-Programm (Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 für Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, WI 53711) bestimmt werden. Bestfit verwendet den lokalen Homologie-Algorithmus von Smith und Waterman, *Advances in Applied Mathematics* 2: 482-489 (1981), um den besten Homologieabschnitt zwischen zwei Sequenzen zu finden. Zur Bestimmung, ob eine bestimmte Sequenz beispielsweise zu 95% mit einer Referenzsequenz nach der vorliegenden Erfindung identisch ist, werden die Parameter bei der Verwendung von Bestfit oder irgendeinem anderen Sequenz-Alignment-Programm natürlich so eingestellt, dass der Prozentsatz der Identität über die Gesamtlänge der Referenznucleotidsequenz berechnet wird und dass Lücken in der Homologie von bis zu 5% der Gesamtanzahl der Nucleotide in der Referenzsequenz erlaubt sind.

[0069] Die vorliegende Anwendung beschreibt ferner Nucleinsäuremoleküle, die zu mindestens 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% mit einer in den in den [Fig. 1](#) und [Fig. 2A](#) und B (SEQ ID NO: 1 und 3) dargestellten Nucleinsäuresequenz oder der Nucleinsäuresequenz eines hinterlegten cDNA-Clons identisch sind, unabhängig davon, ob sie ein Polypeptid mit TNFR-Aktivität codieren. Das liegt daran, dass sogar dort wo ein bestimmtes Nucleinsäuremolekül kein Polypeptid mit TNFR-Aktivität codiert, ein Fachman noch wüsste, wie das Nucleinsäuremolekül zu verwenden ist, beispielsweise als Hybridisierungssonde oder als Polymerasekettenreaktions (PCR)-Primer. Die Verwendungen der in der vorliegenden Erfindung beschriebenen Nucleinsäuremoleküle, die kein Polypeptid mit TNFR-Aktivität codieren, schließen unter anderem ein, (1) Isolieren eines TNFR-Gens oder allen Varianten davon in einer cDNA-Genbank; (2) in-situ-Hybridisierung (z.B. „FISH“) mit Spreitung der Metaphasenchromosomen, um den präzisen Ort des TNFR-Gens auf dem Chromosom bereitzustellen, wie bei Verma et al., *Human Chromosomes: A Manual of Basic Techniques*, Pergamon Press, New York (1988) beschrieben; und Northern-Blot-Analyse zum Nachweisen der TNFR-mRNA-Expression in spezifischen Geweben.

[0070] Bevorzugt werden jedoch Nucleinsäuremoleküle, die zu mindestens 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% mit einer in den in den [Fig. 1](#) und [Fig. 2A](#) und B (SEQ ID NO: 1 und 3) dargestellten Nucleinsäuresequenz oder der Nucleinsäuresequenz eines hinterlegten cDNA-Clons identisch sind, die tatsächlich Polypeptide mit TNFR-Protein-Aktivität codieren. Mit einem „Polypeptid mit TNFR-Protein-Aktivität“ sind Polypeptide gemeint, die Aktivität zeigen, die ähnlich, aber nicht unbedingt identisch mit einer Aktivität einer reifen Form oder extrazellulären Formen eines erfindungsgemäßen TNFR-6 α - oder -6 β -Proteins ist, wie in einem bestimmten biologischen Test gemessen. Die TNF-Familie-Liganden induzieren verschiedene zelluläre Antworten, indem sie an

TNF-Familie-Rezeptoren binden, einschließlich TNFR-6 α und -6 β der vorliegenden Erfindung. Man glaubt, dass Zellen, die die TNFR-Proteine exprimieren, eine starke zelluläre Antwort auf TNFR I-Rezeptor-Liganden, einschließlich B-Lymphocyten (CD 19+), sowohl CD4- als auch CD8+-T-Lymphocyten, Monocyten und Endothelzellen besitzen. Mit einer „zellulären Antwort auf einen TNF-Familie-Liganden“ ist jede genotypische, phänotypische, und/oder morphologische Änderung auf eine Zelle, Zelllinie, Gewebekultur oder Patienten gemeint, der durch einen TNF-Familie-Liganden induziert wird. Wie angegeben, schließen derartige zelluläre Reaktionen nicht nur normale physiologische Reaktionen auf einen TNF-Familie-Liganden, sondern auch Krankheiten ein, die mit erhöhter Zellproliferation oder der Hemmung der erhöhten Zellproliferation, wie durch die Hemmung der Apoptose, assoziiert sind.

[0071] Durchmusterungstests für das Vorstehende sind im Fachgebiet bekannt. Ein derartiger Durchmusterungstest beinhaltet die Verwendung von Zellen, die den Rezeptor (beispielsweise transfizierte CHO-Zellen) in einem System exprimieren, das extrazelluläre pH-Wertänderungen misst, die durch Rezeptoraktivierung verursacht werden, wie beispielsweise bei Science 246: 181-296 (Oktober 1989) beschrieben. Beispielsweise kann ein TNF-Familie-Ligand mit einer Zelle in Kontakt gebracht werden, die die reife Form des Rezeptorpolypeptids der vorliegenden Erfindung exprimiert, z.B. können Signalübermittlung oder pH-Wertänderungen gemessen werden, um zu bestimmen, ob das TNFR-Polypeptid aktiv ist.

[0072] Natürlich erkennt ein Fachmann aufgrund der Degenerierung des genetischen Codes sofort, dass viele Nucleinsäuremoleküle, die eine Sequenz besitzen, die zu mindestens 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% mit der Nucleinsäuresequenz eines hinterlegten cDNA-Clons oder der in [Fig. 1](#) oder in den [Fig. 2A](#) und B (SEQ ID NO: 1 und 3) dargestellten Nucleinsäuresequenz identisch sind, ein Polypeptid codieren, das „TNFR-Protein-Aktivität“ besitzt. Tatsächlich ist dies für den Fachmann auch ohne die Durchführung des vorstehend beschriebenen Vergleichstests klar, da degenerierte Varianten dieser Nucleotidsequenzen alle dasselbe Polypeptid codieren. Es wird im Fachgebiet ferner erkannt, dass für derartige Nucleinsäuremoleküle, die keine degenerierten Varianten sind, eine angemessene Anzahl ebenfalls ein Polypeptid mit TNFR-Protein-Aktivität codiert. Das liegt daran, dass dem Fachmann die Aminosäuresubstitutionen bekannt sind, die entweder weniger wahrscheinlich oder wahrscheinlich die Proteinfunktion nicht signifikant beeinflussen (z.B. Ersetzen einer aliphatischen Aminosäure mit einer zweiten aliphatischen Aminosäure), wie weiter nachstehend beschrieben.

Vektoren und Wirtszellen

[0073] Die vorliegende Erfindung betrifft auch Vektoren, die isolierte DNA-Moleküle der vorliegenden Erfindung einschließen, Wirtszellen, die gentechnisch mit den rekombinanten Vektoren verändert werden und die Herstellung von TNFR-Polypeptiden oder Fragmenten davon durch rekombinante Verfahren. Der Vektor kann beispielsweise ein Phagen-, Plasmid-, viraler oder retroviraler Vektor sein. Retrovirale Vektoren können replikationskompetent oder replikationsdefekt sein. Im letzteren Fall erfolgt die Virusvermehrung im Allgemeinen nur in komplementierenden Wirtszellen.

[0074] Die Polynucleotide können in einen Vektor eingebaut werden, der einen selektiven Marker zur Vermehrung in einem Wirt enthält. Im Allgemeinen wird ein Plasmidvektor in ein Präzipitat, wie Calciumphosphatpräzipitat, oder in einen Komplex mit einem geladenen Lipid eingeführt. Falls der Vektor ein Virus ist, kann er in vitro unter Verwendung einer geeigneten Verpackungszelllinie verpackt werden und dann in Wirtszellen transduziert werden.

[0075] Das DNA-Insert sollte funktional an einen geeigneten Promotor wie den Lambda-Phagen-PL-Promotor, die E. coli lac-, trp-, phoA- und tac-Promotoren, die frühen und späten SV40-Promotoren und die Promotoren der retroviralen LTRs gebunden sein, um einige zu nennen. Dem Fachmann sind andere geeignete Promotoren bekannt.

[0076] Die Expressionskonstrukte enthalten ferner Stellen zur Transkriptionsinitiation, -termination und, in der transkribierten Region, eine ribosomale Bindungsstelle zur Translation. Der codierende Anteil der von den Konstrukten exprimierten Transkripte schließt vorzugsweise ein Translationsstartcodon am Anfang und ein Terminationscodon (UAA, UGA oder UAG) ein, das zweckmäßig am Ende des zu translatierenden Polypeptids positioniert ist.

[0077] Wie angegeben, schließen die Expressionsvektoren vorzugsweise mindestens einen Selektionsmarker ein. Derartige Marker schließen Dihydrofolatreduktase, G418 oder Neomycin-Resistenz für die eukaryontische Zellkultur und Tetracyclin, Kanamycin- oder Ampicillin-Resistenzgene zur Züchtung in E. coli und anderen Bakterien ein. Repräsentative Beispiele geeigneter Wirte schließen ein, sind aber nicht begrenzt auf Bak-

terienzellen wie *E. coli*-, *Streptomyces*- und *Salmonella typhimurium*-Zellen; Pilzzellen wie Hefezellen; Insektenzellen wie *Drosophila* S2- und *Spodoptera* Sf9-Zellen; tierische Zellen wie CHO-, COS-, 293- und Bowes-Melanom-Zellen; und Pflanzenzellen. Geeignete Kulturmedien und Bedingungen für die vorstehend beschriebenen Wirtszellen sind im Fachgebiet bekannt. Unter den zur Verwendung in Bakterien bevorzugten Vektoren sind pQE70, pQE60 und pQE-9, erhältlich von QIAGEN, Inc., a.a.O.; Phagescript-Vektoren, Bluescript-Vektoren, pNH8A, pNH16a, pNH18A, pNH46A, erhältlich von Stratagene; und ptrc99a, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5, erhältlich von Pharmacia, eingeschlossen. Unter den bevorzugten eukaryontischen Vektoren sind pWLNEO, pSV2CAT, pOG44, pXT1 und pSG erhältlich von Stratagene; und pSVK3, pBPV, pMSG und pSVL, erhältlich von Pharmacia. Andere geeignete Vektoren sind für den Fachmann leicht ersichtlich. Die Einführung des Konstrukts in die Wirtszelle kann durch Calciumphosphat-Transfektion DEAE-Dextran-vermittelte Transfektion, die kationische Lipid-vermittelte Transfektion, Elektroporation, Transduktion, Infektion oder andere Verfahren erfolgen. Derartige Verfahren werden in vielen Standard-Laborhandbüchern wie Davis et al., *Basic Methods In Molecular Biology* (1986) beschrieben. Die Polypeptide können in einer modifizierten Form, wie einem Fusionsprotein, exprimiert werden, und können nicht nur Sekretionssignale, sondern auch zusätzliche heterologe funktionale Regionen einschließen. Beispielsweise kann eine Region mit zusätzlichen Aminosäuren, insbesondere geladenen Aminosäuren dem N-Terminus des Polypeptids hinzugefügt werden, um die Stabilität und Persistenz in der Wirtszelle während der Reinigung oder während der anschließenden Handhabung und Lagerung zu verbessern. Es können dem Polypeptid auch Peptideinheiten hinzugefügt werden, um die Reinigung zu erleichtern. Derartige Regionen können vor der Endreinigung des Polypeptids entfernt werden. Das Hinzufügen von Peptideinheiten zu den Polypeptiden, um unter anderem Sekretion oder Exkretion zur Verbesserung der Stabilität und Erleichterung der Reinigung zu erzeugen, ist bekannt und es sind Routineverfahren im Fachgebiet. Ein bevorzugtes Fusionsprotein umfasst eine heterologe Region aus Immunglobulin, die nützlich ist, Proteine zu stabilisieren und zu reinigen. Beispielsweise offenbart EP-A-O 464 533 (Kanadisches Gegenstück 2045869) Fusionsproteine, die verschiedene Anteile der konstanten Region von Immunglobulinmolekülen zusammen mit einem anderen menschlichen Protein oder einem Teil davon umfasst. In vielen Fällen ist der Fc-Anteil in einem Fusionsprotein absolut vorteilhaft zur Verwendung in der Therapie und Diagnose und führt daher beispielsweise zu verbesserten pharmakokinetischen Eigenschaften (EP-A 0232 262). Andererseits wäre es für einige Verwendungen wünschenswert, in der Lage zu sein, den Fc-Anteil zu deletieren, nachdem das Fusionsprotein in der beschriebenen vorteilhaften Weise exprimiert, nachgewiesen und gereinigt wurde. Dies ist der Fall, wenn der Fc-Anteil sich als Hindernis zur Verwendung bei der Therapie und Diagnose erweist, beispielsweise, wenn das Fusionsprotein als Antigen für Immunisierungen verwendet werden soll. Bei der Identifizierung von Arzneistoffen wurden beispielsweise menschliche Proteine, wie hIL-5, mit den Fc-Anteilen zum Zweck der Durchmusterungstests mit hohem Durchsatz fusioniert, um Antagonisten von hIL-5 zu identifizieren. Vgl. D. Bennett et al., *J. Molecular Recognition* 8: 52-58 (1995) und K. Johanson et al., *J. Biol. Chem.* 270: 9459-9471 (1995).

[0078] Die TNFR-Proteine können aus rekombinanten Zellkulturen durch gut bekannte Verfahren, einschließlich Ammoniumsulfat- oder Ethanolpräzipitation, Säureextraktion, Anionen- oder Kationenaustausch-Chromatographie, Phosphocellulose-Chromatographie, hydrophober Interaktionschromatographie, Affinitätschromatographie, Hydroxylapatit-Chromatographie und Lektin-Chromatographie gewonnen und gereinigt werden. Am meisten bevorzugt wird die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie („HPLC“) zur Reinigung verwendet. Polypeptide der vorliegenden Erfindung schließen ein: Produkte, die aus natürlichen Quellen, einschließlich Körperflüssigkeiten, Geweben und Zellen gereinigt wurden, ob direkt isoliert oder gezüchtet; Produkte aus chemisch-synthetischen Verfahren und Produkte, die durch rekombinante Techniken aus einem prokaryontischen oder eukaryontischen Wirt, einschließlich beispielsweise Bakterien-, Hefe-, höhere Pflanzen-, Insekten und Säugerzellen hergestellt werden. Abhängig von dem in einem rekombinanten Produktionsverfahren verwendeten Wirt, können die Polypeptide der vorliegenden Erfindung glycosyliert oder nicht-glycosyliert sein. Außerdem können die erfindungsgemäßen Polypeptide auch einen am Anfang modifizierten Methioninrest einschließen, in einigen Fällen als Folge der wirtsvermittelten Prozesse.

Polypeptide und Fragmente

[0079] Die Erfindung stellt ferner isolierte TNFR-Polypeptide, die Aminosäuresequenzen besitzen, die von den hinterlegten cDNAs codiert werden, oder die Aminosäuresequenzen in SEQ ID NO: 2 und 4, oder ein Peptid oder Polypeptid bereit, das einen Teil der vorstehenden Polypeptide umfasst.

Varianten- und mutierte Polypeptide

[0080] Um die Merkmale eines TNFR-Polypeptids zu verbessern oder zu ändern, kann Protein-Engineering verwendet werden. Rekombinante DNA-Technologie, die dem Fachmann bekannt ist, kann verwendet werden,

um neue mutierte Proteine oder „Muteine“, einschließlich einzelner oder mehrfacher Aminosäuresubstitutionen, -deletionen, -additionen oder Fusionsproteine zu erzeugen. Derartige modifizierte Polypeptide können z.B. erhöhte Aktivität oder erhöhte Stabilität zeigen. Außerdem können sie mit höheren Ausbeuten gereinigt werden und zeigen bessere Löslichkeit als das entsprechende natürliche Polypeptid, zumindest unter bestimmten Reinigungs- und Lagerbedingungen.

N-terminale und C-terminale Deletionsmutanten

[0081] Beispielsweise ist für viele Proteine, einschließlich der extrazellulären Domäne eines membranassoziierten Proteins oder der/den reifen Form(en) eines sekretierten Proteins, im Fachgebiet bekannt, dass eine oder mehrere Aminosäuren aus dem N-Terminus oder C-Terminus ohne den wesentlichen Verlust der biologischen Funktion deletiert werden können. Beispielsweise berichteten Ron et al., J. Biol. Chem., 268: 2984-2988 (1993) über modifizierte KGF-Proteine, die eine Heparinbindungsaktivität besaßen, auch wenn 3, 8 oder 27 aminoterminalen Aminosäurereste fehlten. Da die erfindungsgemäßen Proteine Mitglieder der TNFR-Polypeptidfamilie sind, können in dem vorliegenden Fall, Deletionen der N-terminalen Aminosäuren bis zum Cystein an Position 49 von SEQ ID NO: 2 und 4 (TNFR-6 α und -6 β) ein Teil der biologischen Aktivität wie die Regulation der Proliferation und Apoptose der lymphoiden Zellen beibehalten werden. Von Polypeptiden mit weiteren N-terminalen Deletionen, einschließlich des C49-Rests in SEQ ID NO: 2 und 4 würde man nicht erwarten, dass sie derartige biologische Aktivitäten beibehalten, weil bekannt ist, dass diese Reste in einem TNFR-verwandten Polypeptid zur Bildung einer Disulfidbrücke benötigt werden, um die strukturelle Stabilität bereitzustellen, die für die Rezeptorbindung und Signalübermittlung benötigt wird.

[0082] Wenn jedoch sogar die Deletion von einer oder mehrerer Aminosäuren aus dem N-Terminus eines Proteins zu einer Modifizierung des Verlusts von einer oder mehreren biologischen Funktionen des Proteins führt, können andere biologische Aktivitäten noch bestehen bleiben. Daher wird die Fähigkeit des verkürzten Proteins, Antikörper zu induzieren und/oder an Antikörper zu binden, die die vollständige oder die extrazelluläre Domäne des TNFR-Proteins erkennen, im Allgemeinen bestehen bleiben, wenn weniger als die Mehrheit der Reste des vollständigen Proteins oder der extrazellulären Domäne vom N-Terminus entfernt werden. Ob ein bestimmtes Polypeptid, dem die N-terminalen Reste eines vollständigen Proteins fehlen, derartige immunologische Aktivitäten beibehält, kann leicht durch hier und anderweitig beschriebene, im Fachgebiet bekannte Routineverfahren bestimmt werden.

[0083] Demzufolge stellt die vorliegende Erfindung ferner Polypeptide mit einem oder mehr Resten, die vom Aminoterminus der Aminosäuresequenz des in SEQ ID NO: 2 und 4 dargestellten TNFR bis zum Cysteinrest an Positionsnummer 49 deletiert sind, und Polynucleotide, die derartige Polypeptide codieren, bereit. Die vorliegende Erfindung stellt insbesondere TNFR 5-Polypeptide bereit, die die Aminosäuresequenz der Reste m-300 und n-170 von SEQ ID NO: 2 bzw. 4 umfassen, wobei m und n ganze Zahlen im Bereich von 1-49 sind, wobei 49 die Position des ersten Cysteinrests vom N-Terminus der vollständigen TNFR-6 α - und -6 β -Polypeptide ist (dargestellt in den SEQ ID NO: 2 bzw. 4), von denen man glaubt, dass sie für die Aktivität der TNFR-6 α und -6 β -Proteine erforderlich sind.

[0084] Genauer gesagt stellt die Erfindung Polynucleotide bereit, codierend Polypeptide mit der Aminosäuresequenz der Reste: 1-300, 2-300, 3-300, 4-300, 5-300, 6-300, 7-300, 8-300, 9-300, 10-300, 11-300, 12-300, 13-300, 14-300, 15-300, 16-300, 17-300, 18-300, 19-300, 20-300, 21-300, 22-300, 23-300, 24-300, 25-300, 26-300, 27-300, 28-300, 29-300, 30-300, 31-300, 32-300, 33-300, 34-300, 35-300, 36-300, 37-300, 38-300, 39-300, 40-300, 41-300, 42-300, 43-300, 44-300, 45-300, 46-300, 47-300, 48-300 und 49-300 von SEQ ID NO: 2; und 1-170, 2-170, 3-170, 4-170, 5-170, 6-170, 7-170, 8-170, 9-170, 10-170, 11-170, 12-170, 13-170, 14-170, 15-170, 16-170, 17-170, 18-170, 19-170, 20-170, 21-170, 22-170, 23-170, 24-170, 25-170, 26-170, 27-170, 28-170, 29-170, 30-170, 31-170, 32-170, 33-170, 34-170, 35-170, 36-170, 37-170, 38-170, 39-170, 40-170, 41-170, 42-170, 43-170, 44-170, 45-170, 46-170, 47-170, 48-170 und 49-170 von SEQ ID NO: 4.

[0085] Polynucleotide, die diese Polypeptide codieren, werden ebenfalls bereitgestellt.

[0086] Auf ähnliche Weise sind viele Beispiele von biologisch funktionalen C-terminalen Deletionsmuteinen bekannt. Beispielsweise zeigt Interferon gamma zehnmal höhere Aktivitäten durch Deletieren von 8-10 Aminosäureresten vom Carboxyterminus des Proteins (Döbeli et al., J. Biotechnology 7: 199-216 (1988)). Da das erfindungsgemäße Protein ein Mitglied der TNFR-Polypeptidfamilie ist, können im vorliegenden Fall Deletionen der C-terminalen Aminosäuren bis zum Cystein an Position 193 bzw. 132 von SEQ ID NO: 2 bzw. 4, etwas biologische Aktivität wie die Regulation der Proliferation und Apoptose der lymphoiden Zellen beibehalten. Man würde nicht erwarten, dass Polypeptide mit weiteren C-terminalen Deletionen, einschließlich der Cysteine an

den Positionen 193 bzw. 132 von SEQ ID NO: 2 bzw. 4 derartige biologische Aktivitäten beibehalten, weil bekannt ist, dass diese Reste in TNFR-verwandten Polypeptiden für die Bildung von Disulfidbrücken benötigt werden, um die strukturelle Stabilität bereitzustellen, die für die Rezeptorbindung benötigt wird.

[0087] Wenn jedoch sogar die Deletion von einer oder mehrerer Aminosäuren aus dem C-Terminus eines Proteins zu einer Modifizierung des Verlusts von einer oder mehreren biologischen Funktionen des Proteins führt, können andere biologische Aktivitäten noch bestehen bleiben. Daher wird die Fähigkeit des verkürzten Proteins, Antikörper zu induzieren und/oder an Antikörper zu binden, die die vollständige oder die reife Form des Proteins erkennen, im Allgemeinen bestehen bleiben, wenn weniger als die Mehrheit der Reste des vollständigen Proteins oder der extrazellulären Domäne vom C-Terminus entfernt werden. Ob ein bestimmtes Polypeptid, dem die C-terminalen Reste eines vollständigen Proteins fehlen, derartige immunologische Aktivitäten beibehält, kann leicht durch hier und anderweitig beschriebene, im Fachgebiet bekannte Routineverfahren bestimmt werden.

[0088] Demzufolge stellt die vorliegende Erfindung ferner Polypeptide, die einen oder mehrere Reste aus dem Carboxyterminus der Aminosäuresequenz von TNFR-6 α und -6 β , die in SEQ ID NO: 2 und 4 dargestellt sind, bis zum Cysteinrest an Position 193 und 132 von SEQ ID NO: 2 bzw. 4 besitzen, und Polynucleotide bereit, die derartige Polypeptide codieren. Die vorliegende Erfindung stellt insbesondere Polypeptide bereit, die die Aminosäuresequenz der Reste 1-y und 1-z der Aminosäuresequenz in SEQ ID NO: 2 bzw. 4 besitzen, wobei y irgendeine ganze Zahl im Bereich von 193-300 und z irgendeine ganze Zahl im Bereich von 132-170 ist. Polynucleotide, die diese Polypeptide codieren, werden ebenfalls bereitgestellt.

[0089] Die Erfindung stellt auch Polypeptide bereit, bei denen eine oder mehrere Aminosäuren sowohl vom Amino- als auch vom Carboxylende deletiert wurden, welche im Allgemeinen so beschrieben werden können, dass sie die Reste m-y von SEQ ID NO: 2 und n-z von SEQ ID NO 4 besitzen, wobei m, n, y und z ganze Zahlen sind, wie vorstehend beschrieben.

[0090] Ebenfalls eingeschlossen ist eine Nucleotidsequenz, die ein Polypeptid codiert, das aus einem Teil einer vollständigen TNFR-Aminosäuresequenz besteht, die von einem cDNA-Clon codiert wird, der in der ATCC-Hinterlegungsnummer 97810 oder 97809 enthalten ist, wobei dieser Anteil ausschließt: 1 bis etwa 49 Aminosäuren vom Aminoterminus der vollständigen Aminosäuresequenz, die von dem cDNA-Clon codiert wird, der in der ATCC-Hinterlegungsnummer 97810 bzw. 97809 enthalten ist, oder 1 bis etwa 107 oder 58 Aminosäuren vom Carboxyterminus der vollständigen Aminosäuresequenz, die von dem cDNA-Clon codiert wird, der in der ATCC-Hinterlegungsnummer 97810 bzw. 97809 enthalten ist, oder jeder Kombination der vorstehenden aminoterminalen und carboxyterminalen Deletionen, der vollständigen Aminosäuresequenz, die von dem cDNA-Clon codiert wird, der in der ATCC-Hinterlegungsnummer 97810 oder 97809 enthalten ist. Es werden auch Polynucleotide bereitgestellt, die alle vorstehenden Deletionsmutanten-Polypeptidformen codieren.

Andere Mutanten

[0091] Zusätzlich zu den terminalen Deletionsformen des vorstehend diskutierten Proteins erkennt ein Fachmann auch, dass einige Aminosäuresequenzen der TNFR-Polypeptide ohne signifikanten Effekt auf die Struktur oder Funktion der Proteine variiert werden können. Falls derartige Unterschiede in der Sequenz in Erwägung gezogen werden, sollte man sich daran erinnern, dass es kritische Bereiche auf dem Protein gibt, die die Aktivität bestimmen.

[0092] Daher schließt die Erfindung ferner Variationen der TNFR-Polypeptide, die eine wesentliche TNFR-Polypeptidaktivität zeigen oder die Regionen des TNFR-Proteins beinhalten, wie die nachstehend diskutierten Proteinanteile ein. Derartige Mutanten schließen Deletionen, Insertionen, Inversionen, Wiederholungen, und Typensubstitutionen ein, die nach den im Fachgebiet bekannten allgemeinen Regeln ausgewählt werden, so dass sie wenig Auswirkung auf die Aktivität haben. Beispielsweise werden die Leitlinien im Hinblick darauf, wie phänotypisch stille Aminosäuresubstitutionen hergestellt werden, bei Bowie, J. U. et al., „Deciphering the Message in Protein Sequences: Tolerance to Amino Acid Substitutions“, Science 247: 1306-1310 (1990) bereitgestellt, wobei die Autoren angeben, dass es zwei Hauptherangehensweisen zur Untersuchung der Toleranz, eine Aminosäuresequenz zu ändern, gibt. Das erste Verfahren stützt sich auf den Evolutionsprozess, bei dem Mutationen durch natürliche Selektion entweder akzeptiert oder abgelehnt werden. Der zweite Ansatz verwendet gentechnische Verfahren, um Aminosäureänderungen an spezifischen Positionen eines clonierten Gens einzuführen und Selektionen oder Durchmusterungen, um Sequenzen zu identifizieren, die die Funktionalität aufrechterhalten. Wie die Autoren angeben, haben diese Studien gezeigt, dass Proteine überraschend tolerant gegenüber Aminosäuresubstitutionen sind. Die Autoren geben ferner an, welche Aminosäu-

reaustausche wahrscheinlich an einer bestimmten Position des Proteins erlaubt sind. Die meisten verborgenen Aminosäurereste erfordern unpolare Seitenketten, während wenige Merkmale der Oberflächenseitenketten im Allgemeinen konserviert sind. Andere derartige phänotypisch stille Substitutionen werden bei Bowie J. U. et al., vorstehend und den darin zitierten Referenzen beschrieben. Als konservative Substitutionen werden typischerweise das gegenseitige Ersetzen der aliphatischen Aminosäuren Ala, Val, Leu und Ile; der Austausch der Hydroxylreste Ser und Thr, der gegenseitige Austausch der Säurereste Asp und Glu, die Substitution zwischen den Amidresten Asn und Gln, der Austausch der basischen Reste Lys und Arg und das Ersetzen zwischen den aromatischen Resten Phe, Tyr betrachtet. Daher kann das Fragment, Derivat oder Analogon des Polypeptids von SEQ ID NO: 2, 4 oder 6, oder das, welches von einer hinterlegten cDNA codiert wird, (i) eines sein, in dem ein oder mehrere Aminosäurereste mit einem konservierten oder nicht-konservierten Aminosäurerest (vorzugsweise einem konservierten Aminosäurerest) substituiert sind, und ein derartiger substituiertes Aminosäurerest kann von dem genetischen Code codiert sein oder nicht, oder (ii) eines sein, in dem ein oder mehrere Aminosäurereste eine Substituentengruppe einschließen oder (iii) eines sein, in dem das reife oder lösliche extrazelluläre Polypeptid mit einer anderen Verbindung fusioniert ist, wie eine Verbindung, die die Halbwertszeit des Polypeptids (beispielsweise Polyethylenglycol) erhöht, oder (iv) eines, in dem zusätzliche Aminosäuren mit der vorstehenden Form des Polypeptids, wie einem Peptid der IgG-Fc-Fusionsregion oder einer Leader- oder sekretorischen Sequenz oder einer Sequenz fusioniert ist, die zur Reinigung der vorstehenden Form der Polypeptid- oder Proproteinsequenz verwendet wird. Derartige Fragmente, Derivate und Analoga werden als im Anwendungsbereich des Fachmanns aufgrund der hier aufgeführten Ausführungen betrachtet.

[0093] Daher kann das TNFR der vorliegenden Erfindung eine oder mehrere Aminosäuresubstitutionen, Deletionen oder Additionen einschließen, entweder aufgrund von natürlichen Mutationen oder menschlicher Manipulation. Wie angegeben, sind die Änderungen vorzugsweise von geringfügiger Natur, wie konservative Aminosäuresubstitutionen, die die Faltung oder die Aktivität des Proteins nicht signifikant beeinflussen (vgl. Tabelle 1).

TABELLE 1 Konservative Aminosäuresubstitutionen

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

[0094] Aminosäuren in den TNFR-Proteinen der vorliegenden Erfindung, die für die Funktion wesentlich sind, können durch im Fachgebiet bekannte Verfahren, wie ortsgerichtete Mutagenese oder Alanin-Scanning-Mutagenese identifiziert werden (Cunningham und Wells, Science 244: 1081-1085 (1989)). Das letztere Verfahren führt einzelne Alaninmutationen an jedem Rest im Molekül ein. Die sich ergebenden mutierten Moleküle werden dann auf biologische Aktivität wie Rezeptorbindung oder in vitro oder in vivo proliferative Aktivität getestet.

[0095] Von speziellem Interesse sind Substitutionen von geladenen Aminosäuren mit anderen geladenen oder neutralen Aminosäuren, die Proteine mit sehr wünschenswerten, verbesserten Merkmalen wie weniger Aggregation erzeugen. Die Aggregation kann nicht nur die Aktivität herabsetzen, sondern auch bei der Herstellung pharmazeutischer Formulierungen problematisch sein, da Aggregate immunogen sein können (Pinckard et al., Clin. Exp. Immunol. 2: 331-340 (1967); Robbins et al., Diabetes 36: 838-845 (1987); Cleland et al.,

Crit. Rev. Therapeutic Drug Carrier Systems 10: 307-377 (1993)).

[0096] Das Ersetzen von Aminosäuren kann auch die Selektivität der Bindung eines Liganden an Zelloberflächenrezeptoren ändern. Beispielsweise beschreiben Ostade et al., *Nature* 361: 266-268 (1993) bestimmte Mutationen, die zur selektiven Bindung von TNF α an nur eine der beiden bekannten Typen von TNF-Rezeptoren führen. Stellen, die für die Liganden-Rezeptorbindung kritisch sind, können ebenfalls durch strukturelle Analyse wie Kristallisierung, Kernmagnetresonanz oder Photoaffinitätsmarkierung bestimmt werden. (Smith et al., *J. Mol. Biol.* 224:899-904 (1992) und de Vos et al., *Science* 255: 306-312 (1992)).

[0097] Da TNFR-6 α und -6 β Mitglieder der TNF-Rezeptor-verwandten Proteinfamilie sind, werden, um zu modulieren anstatt die biologischen Aktivitäten von TNFR vollkommen zu eliminieren, vorzugsweise Mutationen in Sequenzen hergestellt, die Aminosäuren in der TNFR-konservierten, extrazellulären Domäne codieren, in Resten innerhalb dieser Region, die nicht unter den Mitgliedern der TNF-Rezeptorfamilie konserviert sind, stärker bevorzugt. Durch die vorliegende Erfindung werden auch isolierte Polynucleotide beschrieben, die Nucleinsäuresequenzen umfassen, die die vorstehenden TNFR-Mutanten codieren.

[0098] Die Polypeptide der vorliegenden Erfindung werden vorzugsweise in einer isolierten Form bereitgestellt und sind vorzugsweise im Wesentlichen gereinigt. Eine rekombinant hergestellte Version der TNFR-Polypeptide kann im Wesentlichen durch das bei Smith und Johnson, *Gene* 67: 31-40 (1988) beschriebene Einschnitt-Verfahren gereinigt werden. Erfindungsgemäße Polypeptide können auch aus natürlichen oder rekombinanten Quellen unter Verwendung von erfindungsgemäßen anti-TNFR-6 α - und -6 β -Antikörpern in Verfahren gereinigt werden, die im Fachgebiet der Proteinreinigung gut bekannt sind.

[0099] Die Erfindung stellt ferner isolierte TNFR-Polypeptide bereit, umfassend eine Aminosäuresequenz, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus (a) der Aminosäuresequenz eines TNFR-Polypeptids mit der vollständigen Länge, das die in SEQ ID NO: 2 oder 4 dargestellte vollständige Aminosäuresequenz oder wie von dem in der ATCC-Hinterlegungsnr. 97810 oder 97809 enthaltenen cDNA-Clon codiert, besitzt; (b) die Aminosäuresequenz eines reifen TNFR-Polypeptids, das die Aminosäuresequenz an den Positionen 31-300 in SEQ ID NO: 2 oder 31-170 in SEQ ID NO: 4 oder wie von dem in der ATCC-Hinterlegungsnr. 97810 oder 97809 enthaltenen cDNA-Clon codiert, besitzt; oder (c) die Aminosäuresequenz einer löslichen extrazellulären Domäne eines TNFR-Polypeptids, das die Aminosäuresequenz an den Positionen 31-283 in SEQ ID NO: 2 oder 31-166 in SEQ ID NO: 4, oder wie von dem in ATCC-Hinterlegungsnr. 97810 oder 97809 enthaltenen cDNA-Clon codiert, besitzt.

[0100] Weitere Polypeptide der vorliegenden Erfindung schließen Polypeptide ein, die zu mindestens 95% Ähnlichkeit und noch mehr bevorzugt zu mindestens 96%, 97%, 98% oder 99% Ähnlichkeit mit denjenigen besitzt, die vorstehend beschrieben wurden. Die erfindungsgemäßen Polypeptide umfassen auch diejenigen, die zu mindestens 95% identisch sind, noch mehr bevorzugt zu mindestens 96%, 97%, 98% oder 99% mit dem von der hinterlegten cDNA codierten Polypeptid oder dem Polypeptid von SEQ ID NO: 2 oder 4 identisch sind, und schließen auch Teile von derartigen Polypeptiden mit mindestens 30 Aminosäuren und noch mehr bevorzugt mit mindestens 50 Aminosäuren ein.

[0101] Mit „% Ähnlichkeit“ für zwei Polypeptide ist ein Ähnlichkeitsgrad gemeint, der durch Vergleichen der Aminosäuresequenzen der beiden Polypeptide unter Verwendung des Bestfit-Programms (Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 für Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, WI 53711) und der Standardeinstellungen zur Bestimmung der Ähnlichkeit erzeugt wird. Bestfit verwendet den lokalen Homologiealgorithmus von Smith und Waterman (*Advances in Applied Mathematics* 2: 482-489, 1981), um den besten Abschnitt der Ähnlichkeit zwischen zwei Sequenzen zu finden.

[0102] Mit einem Polypeptid, das eine Aminosäuresequenz besitzt, die beispielsweise zu mindestens 95% „identisch“ mit einer Referenzamino-säuresequenz eines TNFR-Polypeptids ist, ist gemeint, dass die Aminosäuresequenz des Polypeptids zur Referenzsequenz identisch ist, mit Ausnahme, dass die Polypeptidsequenz bis zu fünf Aminosäureänderungen pro jeweils 100 Aminosäuren der Referenzamino-säure des TNFR-Polypeptids einschließen kann. Mit anderen Worten, um ein Polypeptid mit einer Aminosäuresequenz zu erhalten, die zu mindestens 95% identisch mit einer Referenzamino-säuresequenz ist, können bis zu 5% der Aminosäurereste in der Referenzsequenz deletiert oder durch eine andere Aminosäure substituiert werden, oder etliche Aminosäuren bis zu 5% der Gesamtamino-säurereste in der Referenzsequenz können in die Referenzsequenz eingebaut werden. Diese Änderungen der Referenzsequenz können an den amino- oder carboxterminalen Positionen der Referenzamino-säuresequenz oder irgendwo zwischen jenen terminalen Positionen auftreten, die entweder einzeln zwischen den Resten in der Referenzsequenz oder in einer oder mehreren aufeinander fol-

genden Gruppen innerhalb der Referenzsequenz eingefügt sind.

[0103] Ob irgendein bestimmtes Nucleinsäuremolekül zu mindestens 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% mit beispielsweise der in SEQ ID NO: 2 oder 4 dargestellten Aminosäuresequenz oder einer Aminosäuresequenz, die von einem hinterlegten cDNA-Clon codiert wird, identisch ist, kann in der Praxis konventionell unter Verwendung von bekannten Computerprogrammen wie dem Bestfit-Programm (Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 für Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, WI 53711) bestimmt werden. Zur Bestimmung, ob eine bestimmte Sequenz beispielsweise zu 95% mit einer Referenzsequenz nach der vorliegenden Erfindung identisch ist, werden die Parameter bei der Verwendung von Bestfit oder irgendeinem anderen Sequenzalignment-Programm natürlich so eingestellt, dass der Prozentsatz der Identität über die Gesamtlänge der Referenznucleotidsequenz berechnet wird und dass Lücken in der Homologie von bis zu 5% der Gesamtanzahl der Nucleotide in der Referenzsequenz erlaubt sind.

[0104] Das Polypeptid der vorliegenden Erfindung könnte als molekularer Gewichtsmarker auf SDS-PAGE-Gelen oder auf Molekularsiebgelfiltrationssäulen unter Verwendung von dem Fachmann gut bekannter Verfahren verwendet werden.

[0105] Wie nachstehend im Detail beschrieben, können die Polypeptide der vorliegenden Erfindung auch verwendet werden, um polyclonale oder monoclonale Antikörper zu erzeugen, die in Tests zum Nachweis der TNFR-Expression, wie nachstehend beschrieben, oder als Agonisten und Antagonisten nützlich sind, die die TNFR-Proteinfunktion erhöhen oder hemmen können. Ferner können derartige Polypeptide im Hefe-Zwei-Hybrid-System verwendet werden, um TNFR-Protein bindende Proteine „einzufangen“, die ebenfalls Kandidaten-Agonisten und -Antagonisten nach der vorliegenden Erfindung sind. Das Hefe-Zwei-Hybrid-System wird bei Fields und Song, Nature 340: 245-246 (1989) beschrieben.

Epitop tragende Anteile

[0106] In einem anderen Aspekt stellt die Erfindung ein Peptid oder Polypeptid bereit, das einen Epitop tragenden Anteil eines erfindungsgemäßen Polypeptids umfasst. Das Epitop dieses Polypeptidanteils ist ein immunogenes oder antigenes Epitop eines erfindungsgemäßen Polypeptids. Ein „immunogenes Epitop“ wird als Teil eines Proteins definiert, das eine Antikörperreaktion hervorruft, wenn das gesamte Protein das Immunogen ist. Andererseits wird eine Region eines Proteinmoleküls, an die ein Antikörper binden kann, als „antigenes Epitop“ definiert. Die Anzahl immunogener Epitope eines Proteins ist im Allgemeinen geringer als die Anzahl antigenen Epitope. Vgl. beispielsweise Geysen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 3998-4002 (1983).

[0107] Was die Selektion von Peptiden oder Polypeptiden anbelangt, die ein antigenes Epitop tragen (d.h. die eine Region eines Proteinmoleküls enthalten, an das ein Antikörper binden kann), so ist im Fachgebiet gut bekannt, dass relativ kurze synthetische Peptide, die einen Teil einer Proteinsequenz nachahmen, üblicherweise in der Lage sind, ein Antiserum zu erzeugen, dass mit dem teilweise nachgeahmten Protein reagiert. Vgl. beispielsweise Sutcliffe, J. G., Shinnick, T. M., Green, N. und Learner, R. A. (1983) „Antibodies that react with predetermined sites on proteins,” Science, 219: 660-666. Peptide, die in der Lage sind, proteinreaktive Seren zu erzeugen, sind häufig in der Primärsequenz eines Proteins repräsentiert, können durch eine Reihe von einfachen chemischen Regeln charakterisiert werden und sind weder auf immundominante Regionen von intakten Proteinen (d.h. immunogene Epitope) noch auf die Amino- oder Carboxylenden beschränkt. Erfindungsgemäße, antigene, Epitop-tragende Peptide und Polypeptide sind daher nützlich, um Antikörper, einschließlich monoclonaler Antikörper, zu erzeugen, die an ein erfindungsgemäßes Polypeptid spezifisch binden. Vgl. beispielsweise Wilson et al., Cell 37: 767-778 (1984) auf S. 777.

[0108] Erfindungsgemäße, antigene, Epitop tragende Peptide und Polypeptide enthalten vorzugsweise eine Sequenz von mindestens neun und am meisten bevorzugt zwischen 15 bis etwa 30 Aminosäuren, die innerhalb der Aminosäuresequenz eines erfindungsgemäßen Polypeptids enthalten sind, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus: von Ala-31 bis Thr-46, von Phe-57 bis Thr 117, von Cys-132 bis Thr-175, von Gly-185 bis Thr-194, von Val-205 bis Asp-217, von Pro-239 bis Leu-264 und von Ala-283 bis Pro-298 in SEQ ID NO:2; und von Ala-31 bis Thr-46, von Phe-57 bis Gln-80, von Glu-86 bis His-106, von Thr-108 bis Phe-119, von His-129 bis Val-138 und von Gly-142 bis Pro-166 in SEQ NO: 4. Bei diesen Polypeptidfragmenten wurde, wie in den [Fig. 4](#) und [Fig. 5](#) vorstehend dargestellt, durch die Analyse des Jameson-Wolf-Antigenizitätsindex bestimmt, dass sie antigene Epitope der TNFR-6 α - bzw. -6 β -Polypeptide tragen.

[0109] Die erfindungsgemäßen, Epitop-tragenden Peptide und Polypeptide können durch jegliche konventionellen Mittel hergestellt werden. Vgl. z.B. Houghten, R. A. (1985) „General method for the rapid solid-phase

synthesis of large numbers of peptides: specificity of antigen-antibody interaction at the level of individual amino acids." Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 5131-5135; dieses „Simultane multiple Peptidsynthese (SMPS)“-Verfahren wird ferner im US-Patent Nr. 4.631.211 zu Houghten et al. (1986) beschrieben.

[0110] Die erfindungsgemäßen, Epitop tragenden Peptide und Polypeptide werden verwendet, um Antikörper nach im Fachgebiet gut bekannten Verfahren zu induzieren. Vgl. beispielsweise Sutcliffe et al., a.a.O.; Wilson et al., vorstehend.; Chow, M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 910-914 und Bittle, F. J. et al., J. Gen. Virol. 66: 2347-2354 (1985). Erfindungsgemäße, immunogene Epitop tragenden Peptide und Polypeptide, d.h. jene Teile eines Proteins, die eine Antikörperreaktion hervorrufen, wenn das ganze Protein das Immunogen ist, werden nach im Fachgebiet bekannten Verfahren identifiziert. Vgl. beispielsweise Geysen et al., vorstehend. Ferner beschreibt noch US-Patent Nr. 5,194,392 zu Geysen (1990) ein allgemeines Verfahren zum Nachweisen oder Bestimmen der Sequenz von Monomeren (Aminosäuren oder andere Verbindungen), die ein topologisches Äquivalent des Epitops ist (d.h. ein „Mimotop“), das zu einem bestimmten Paratop (Antigenbindungsstelle) eines Antikörpers von Interesse komplementär ist. US-Patent Nr. 4,433,092 von Geysen (1989) beschreibt noch allgemeiner ein Verfahren zum Nachweisen oder Bestimmen einer Sequenz aus Monomeren, die ein topologisches Äquivalent eines Liganden ist, der zur Ligandenbindungsstelle eines bestimmten Rezeptors von Interesse komplementär ist. Auf ähnliche Weise offenbart US-Patent Nr. 5,480,971 von Houghten, R. A. et al. (1996) über peralkylierte Oligopeptidgemische lineare C1-C7-Alkyl peralkylierte Oligopeptide sowie Sets und Banken derartiger Peptide sowie Verfahren zur Verwendung derartiger Oligonucleotidsätze und Banken zur Bestimmung der Sequenz eines peralkylierten Oligopeptids, das vorzugsweise an ein Akzeptormolekül von Interesse bindet. Daher können nicht-Peptid-Analoga der erfindungsgemäßen Epitop tragenden Peptide auch durch diese Verfahren routinemäßig hergestellt werden.

Fusionsproteine

[0111] Wie ein Fachmann weiß, können TNFR-Polypeptide der vorliegenden Erfindung und die vorstehend beschriebenen Epitop tragenden Fragmente davon mit Teilen der konstanten Domäne von Immunglobulinen (IgG) kombiniert werden, was zu chimären Polypeptiden führt. Diese Fusionsproteine erleichtern die Reinigung und zeigen eine erhöhte Halbwertszeit in vivo. Dies wurde z.B. für chimäre Proteine, die aus den ersten beiden Domänen des menschlichen CD4-Polypeptids bestehen, und verschiedene Domänen der konstanten Regionen der schweren oder leichten Ketten der Säuger-Immunglobuline gezeigt (EP A 394,827; Traunecker et al., Nature 331: 84-86 (1988)). Fusionsproteine, die eine durch Disulfide verbundene dimere Struktur aufgrund des IgG-Anteils besitzen, können ebenfalls bei der Bindung und Neutralisierung anderer Moleküle effektiver sein als das monomere TNFR-Protein oder Proteinfragment allein (Fountoulakis et al., J. Biochem. 270: 3958-3964 (1995)).

Antikörper

[0112] TNFR-Protein-spezifische Antikörper zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung können gegen die intakten TNFR-6α- und -6β-Proteine oder ein antigenes Polypeptidfragment davon erzeugt werden. Diese können zusammen mit einem Trägerprotein, wie einem Albumin, einem Tiersystem (wie Kaninchen oder Maus), oder falls es lang genug ist (mindestens etwa 25 Aminosäuren), ohne einen Träger gebildet werden.

[0113] Wie hier verwendet, bedeutet der Begriff „Antikörper“ (Ak) oder „monoclonaler Antikörper“ (Mak), dass intakte Moleküle sowie Antikörperfragmente (wie beispielsweise Fab- und F(ab')₂-Fragmente) eingeschlossen sind, die in der Lage sind, an ein TNFR-Protein spezifisch zu binden. Fab- und F(ab')₂-Fragmente, denen das Fc-Fragment des intakten Antikörpers fehlt, werden schneller aus der Zirkulation genommen und können weniger unspezifische Gewebefixierung eines intakten Antikörpers aufweisen (Wahl et al., J. Nucl. Med. 24: 316-325 (1983)). Daher werden diese Fragmente bevorzugt.

[0114] Die Antikörper der vorliegenden Erfindung können durch irgendeines der vielfältigen Verfahren hergestellt werden. Beispielsweise können Zellen, die das TNFR-Protein oder ein antigenes Fragment davon exprimieren, einem Tier verabreicht werden, um die Produktion von Seren, die polyclonale Antikörper enthalten, zu induzieren. In einem bevorzugten Verfahren wird eine Zubereitung eines TNFR-Proteins hergestellt und gereinigt, um sie im Wesentlichen frei von natürlichen Kontaminanten zu machen. Eine derartige Zubereitung wird dann in ein Tier eingeführt, um polyclonale Antiseren mit größerer spezifischer Aktivität zu produzieren.

[0115] In dem am meisten bevorzugten Verfahren sind die Antikörper der vorliegenden Erfindung monoclonale Antikörper. Derartige monoclonale Antikörper können unter Verwendung der Hybridom-Technologie hergestellt werden (Köhler et al., Nature 256: 495 (1975); Köhler et al., Eur. J. Immunol. 6: 511 (1976); Köhler et al., Eur.

J. Immunol. 6: 292 (1976); Hammerling et al., in: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas, Elsevier, N.Y., (1981). S. 563-681). Im Allgemeinen beinhalten derartige Verfahren die Immunisierung eines Tieres (vorzugsweise einer Maus) mit einem TNFR-Proteinantigen oder stärker bevorzugt mit einer TNFR-Protein-exprimierenden Zelle. Geeignete Zellen können durch ihre Kapazität, TNFR-6 α - und -6 β -Proteinantikörper zu binden, erkannt werden. Derartige Zellen können in jedem geeigneten Gewebekulturmedium gezüchtet werden; es ist jedoch vorzuziehen, Zellen in Earle modifiziertem Eagle-Medium, ergänzt mit 10% fötalem Rinderserum (inaktiviert bei etwa 56°C) und mit etwa 10g/l nicht-essentiellen Aminosäuren, etwa 1.000 E/ml Penicillin und etwa 100 μ g/ml Streptomycin ergänzt, zu züchten. Die Splenocyten derartiger Mäuse werden extrahiert und mit einer geeigneten Myelomzelllinie fusioniert. Jede geeignete Myelomzelllinie kann nach der vorliegenden Erfindung verwendet werden; jedoch ist vorzuziehen, die Eltern-Myelomzelllinie (SP20), erhältlich von der American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, zu verwenden. Nach der Fusion werden die sich ergebenden Hybridomzellen selektiv in HAT-Medium gehalten und dann durch limitierende Verdünnung cloniert, wie von Wands et al. (Gastroenterology 80: 225-232 (1981)) beschrieben. Die durch eine derartige Selektion erhaltenen Hybridomzellen werden dann getestet, um Clone zu identifizieren, die Antikörper sekretieren, die das gewünschte TNFR-Antigen sekretieren können.

[0116] Alternativ können zusätzliche Antikörper, die an das TNFR-Antigen binden können, in einem Zwei-Schritt-Verfahren durch die Verwendung von anti-ideotypischen Antikörpern produziert werden. Ein derartiges Verfahren nutzt die Tatsache, dass Antikörper selbst Antigene sind, und dass es daher möglich ist, einen Antikörper zu erhalten, der an einen zweiten Antikörper bindet. Gemäß diesem Verfahren werden TNFR-spezifische Antikörper verwendet, um ein Tier, vorzugsweise eine Maus, zu immunisieren. Die Splenocyten eines derartigen Tieres werden dann verwendet, um Hybridomzellen zu produzieren, und die Hybridomzellen werden durchmustert, um Clone zu identifizieren, die einen Antikörper produzieren, dessen Fähigkeit an den TNFR-spezifischen Antikörper zu binden, durch das TNFR-Protein-Antigen blockiert ist. Derartige Antikörper umfassen anti-idiotypische Antikörper gegen den TNFR-Protein-spezifischen Antikörper und können zur Immunisierung eines Tieres verwendet werden, um die Bildung von weiteren TNFR-Protein-spezifischen Antikörpern zu induzieren.

[0117] Man ist sich bewusst, dass Fab und F(ab')₂ und andere Fragmente der Antikörper der vorliegenden Erfindung nach den hier offenbarten Verfahren verwendet werden können. Derartige Fragmente werden typischerweise durch proteolytische Spaltung unter Verwendung von Enzymen wie Papain (um Fab-Fragmente zu produzieren) oder Pepsin (um F(ab')₂-Fragmente zu produzieren) produziert. Alternativ können TNFR-Protein-bindende Fragmente durch die Anwendung rekombinanter DNA-Technologie oder durch synthetische Chemie produziert werden.

[0118] Für die in-vivo-Verwendung von anti-TNFR bei Menschen kann es vorzuziehen sein, „humanisierte“ chimäre monoclonale Antikörper zu verwenden. Derartige Antikörper können unter Verwendung von genetischen Konstrukten produziert werden, die von Hybridomzellen stammen, die die vorstehend beschriebenen monoclonalen Antikörper produzieren. Verfahren zur Herstellung chimärer Antikörper sind im Fachgebiet bekannt. Vgl. für einen Übersichtsartikel Morrison, Science 229: 1202 (1985); Oi et al., BioTechniques 4: 214 (1986); Cabilly et al., US-Patent Nr. 4,816,567; Taniguchi et al., EP 171496; Morrison et al., EP 173494; Neuberger et al., WO 8601533; Robinson et al., WO 8702671; Boulianne et al., Nature 312: 643 (1984); Neuberger et al., Nature 314: 268 (1985).

Das Immunsystem betreffende Störungen

Diagnose

[0119] Die hier genannten Erfinder haben entdeckt, dass TNFR-6 α und -6 β in hämatopoetischen und transformierten Geweben exprimiert werden. Für zahlreiche das Immunsystem betreffende Störungen können im Wesentlichen veränderte (erhöhte oder erniedrigte) Spiegel der TNFR-Genexpression in Immunsystemgewebe oder anderen Zellen oder Körperflüssigkeiten (z.B. Serum und Plasma), das/die von einem Individuum entnommen wurde(n), das an einer derartigen Störung leidet, im Verhältnis zu einem „Standard“-TNFR-Genexpressionsspiegel, d.h. dem TNFR-Expressionsspiegel in Immunsystemgeweben oder Körperflüssigkeiten von einem Individuum, dass nicht an einer Störung des Immunsystems leidet, nachgewiesen werden. Daher stellt die Erfindung während der Diagnose einer Immunsystemstörung ein nützliches, diagnostisches Verfahren bereit, das die Messung des Expressionsspiegels des Gens, das das TNFR-Protein im Immunsystemgewebe oder anderen Zellen oder Körperflüssigkeit von einem Individuum codiert, und den Vergleich des gemessenen Genexpressionsspiegels mit einem Standard-TNFR-Genexpressionsspiegel beinhaltet, wobei eine Zunahme oder Abnahme im Genexpressionsspiegel im Vergleich zum Standard eine Immunsystemstörung anzeigt.

[0120] Man glaubt insbesondere, dass bestimmte Gewebe in Säugern mit Krebs signifikant erniedrigte Spiegel des TNFR-Proteins und mRNA, die den TNFR codiert, exprimieren, wenn mit einem entsprechenden „Standard“-Spiegel verglichen wird. Ferner glaubt man, dass erniedrigte Spiegel eines TNFR-Proteins in bestimmten Körperflüssigkeiten (z.B. Serum und Plasma) aus Säugern mit einem derartigen Krebs beim Vergleich mit Serum von Säugern derselben Spezies, die nicht an Krebs leiden, nachgewiesen werden können.

[0121] Daher stellt die Erfindung ein in-vitro-Diagnoseverfahren bereit, das während der Diagnose einer Immunsystemstörung, einschließlich Krebs, nützlich ist, das die Messung des Expressionsspiegels des Gens, das das TNFR-Protein im Immunsystemgewebe oder anderen Zellen oder Körperflüssigkeiten aus einem Individuum codiert, und das Vergleichen des gemessenen Genexpressionsspiegels mit einem Standard-TNFR-Genexpressionsspiegel beinhaltet, wobei eine Zunahme oder Abnahme im Genexpressionsspiegel im Vergleich zum Standard eine Immunsystemstörung anzeigt.

[0122] Wo eine Diagnose einer Störung im Immunsystem, einschließlich der Diagnose eines Tumors, nach herkömmlichen Verfahren bereits gestellt wurde, ist die vorliegende Erfindung als Prognoseindikator nützlich, wobei Patienten, die eine erniedrigte Genexpression zeigen, ein schlechteres klinisches Ergebnis im Vergleich zu Patienten erhalten, die das Gen mit einem Spiegel exprimieren, der näher am Standard-Spiegel liegt.

[0123] Mit „Testen des Expressionsspiegels des Gens, das ein TNFR-Protein codiert“, ist das qualitative oder quantitative Messen oder Abschätzen des Spiegels des TNFR-6 α und/oder -6 β -Proteins oder des Spiegels der mRNA, die das TNFR-6 α - und/oder -6 β -Protein codiert, in einer ersten biologischen Probe entweder direkt (z.B. durch Bestimmen oder Abschätzen des absoluten Proteinspiegels oder mRNA-Spiegels) oder relativ (z.B. durch Vergleichen mit dem TNFR-Proteinspiegel oder dem mRNA-Spiegel in einer zweiten biologischen Probe) gemeint. Vorzugsweise wird der TNFR-Proteinspiegel oder der mRNA-Spiegel in der ersten biologischen Probe gemessen oder abgeschätzt und mit einem Standard-TNFR-Proteinspiegel oder mRNA-Spiegel verglichen, wobei der Standard von einer zweiten biologischen Probe genommen wird, die von einem Individuum erhalten wird, das nicht an der Störung leidet, oder durch durchschnittliche Spiegel aus einer Population von Individuen bestimmt wird, die nicht an einer Störung des Immunsystems leiden. Wie man im Fachgebiet weiß, können sie, sobald die Standard-TNFR-Proteinspiegel oder mRNA-Spiegel bekannt sind, wiederholt als Standard zum Vergleich verwendet werden.

[0124] Mit „biologischer Probe“ ist jede biologische Probe gemeint, die von einem Individuum, einer Körperflüssigkeit, Zelllinie, Gewebekultur oder einer anderen Quelle, die TNFR-Protein oder mRNA enthält, erhalten wird. Wie angegeben, schließen biologische Proben Körperflüssigkeiten (wie Serum, Plasma, Urin, Synovialflüssigkeit und Spinatflüssigkeit) ein, die freie extrazelluläre Domäne(n) (oder lösliche Form(en)) eines TNFR-Proteins, Immunsystemgewebe und andere Gewebequellen enthalten, von denen herausgefunden wurde, dass sie die vollständige oder extrazelluläre Domäne eines TNFR exprimieren. Verfahren zum Erhalten von Gewebebiopsien und Körperflüssigkeiten von Säugern sind im Fachgebiet gut bekannt. Wo die biologische Probe mRNA einschließen soll, ist eine Gewebebiopsie die bevorzugte Quelle.

[0125] Die Erfindung zieht auch die Verwendung eines Gens der vorliegenden Erfindung zur Diagnose von Mutationen in einem TNFR-Gen in Betracht. Falls beispielsweise eine Mutation in einem der Gene der vorliegenden Erfindung vorliegt, würden die Bedingungen zu mangelnder Produktion der Rezeptorpolypeptide der vorliegenden Erfindung führen. Ferner würden Mutationen, die die Rezeptorpolypeptidaktivität erhöhen, zu Krankheiten führen, die mit einer Überexpression des Rezeptorpolypeptids, z.B. endotoxischem Schock, assoziiert sind. Mutationen in den Genen können durch Vergleichen der Sequenz des defekten Gens mit derjenigen eines Normalen nachgewiesen werden. Folglich kann man überprüfen, dass ein mutiertes Gen mit einem Krankheitszustand oder der Anfälligkeit für einen Krankheitszustand assoziiert ist. D.h. ein mutiertes Gen, das zur Unterexpression der Rezeptorpolypeptide der vorliegenden Erfindung führt, wäre mit dem Unvermögen von TNF, Tumorstadium zu hemmen, assoziiert.

[0126] Andere Immunsystemstörungen, die durch die vorstehenden Tests diagnostiziert werden können, schließen Hypersensitivität, Allergie, Infektionskrankheiten, Wirt-Transplantat-Abstoßung, Immunschwäche, Autoimmunerkrankungen und dergleichen ein.

[0127] Individuen, die Mutationen in den Genen der vorliegenden Erfindung tragen, können auf der DNA-Ebene durch eine Vielzahl von Verfahren nachgewiesen werden. Zur Diagnose verwendete Nucleinsäuren können, unter anderen Geweben, aus Patientenzellen wie aus Blut, Urin, Speichel und Gewebebiopsien erhalten werden. Die genomische DNA kann direkt zum Nachweis verwendet werden oder kann enzymatisch unter Verwendung von PCR (Saiki et al., Nature 324: 163-166 (1986)) vor der Analyse enzymatisch amplifiziert werden.

RNA oder cDNA kann auch für denselben Zweck verwendet werden. Als Beispiel können PCR-Primer verwendet werden, die komplementär zur Nucleinsäure der vorliegenden Erfindung sind, um Mutationen in den menschlichen Genen der vorliegenden Erfindung zu identifizieren und zu analysieren. Beispielsweise können Deletionen und Insertionen durch eine Änderung der Größe des amplifizierten Produkts im Vergleich zum normalen Genotyp nachgewiesen werden. Punktmutationen können durch Hybridisierung von amplifizierter DNA mit radiomarkierter RNA oder alternativ mit radiomarkierten Antisense-DNA-Sequenzen der vorliegenden Erfindung identifiziert werden. Perfekt gepaarte Sequenzen können von fehlgepaarten Duplexen durch RNase A-Spaltung oder durch Unterschiede in den Schmelztemperaturen unterschieden werden. Eine derartige Diagnose wäre besonders nützlich für den prenatalen oder neonatalen Test.

[0128] Sequenzunterschiede zwischen dem Referenzgen und den „Mutanten“ können durch das direkte DNA-Sequenzierverfahren aufgedeckt werden. Außerdem können clonierte DNA-Abschnitte als Sonden verwendet werden, um spezifische DNA-Abschnitte nachzuweisen. Die Sensitivität dieses Verfahrens wird stark erhöht, wenn es mit PCR kombiniert wird. Beispielsweise ein Sequenzier-Primer, der mit einem doppelsträngigen PCR-Produkt oder einem einzelsträngigen Matrizenmolekül verwendet wird, das durch ein modifiziertes PCR-Produkt erzeugt wird. Die Sequenzbestimmung erfolgt durch herkömmliche Verfahren mit radiomarkierten Nucleotiden oder durch automatisierte Sequenzierverfahren mit Fluoreszenzmarkierungen.

[0129] Sequenzänderungen an spezifischen Positionen können durch Nuclease-Schutztests wie RNase- und S1-Schutz oder dem chemischen Spaltungsverfahren (beispielsweise Cotton et al., PNAS, 85: 4397-4401 (1985)) aufgedeckt werden.

[0130] Das Testen der TNFR-Proteinspiegel in einer biologischen Probe kann unter Verwendung von auf Antikörper basierenden Techniken erfolgen. Die TNFR-Proteinexpression in Geweben kann beispielsweise mit klassischen immunhistologischen Verfahren untersucht werden (Jalkanen, M., et al., J. Cell. Biol. 101: 976-985 (1985); Jalkanen, M., et al., J. Cell. Biol. 105: 3087-3096 (1987)). Andere auf Antikörper basierenden Verfahren, die zum Nachweisen der TNFR-Genexpression nützlich sind, schließen Immuntests wie den enzymgekoppelten Immunsorbent-Test (ELISA) und den Radioimmuntest (RIA) ein. Geeignete Antikörpertestmarkierungen sind im Fachgebiet bekannt und schließen Enzymmarkierungen wie Glucoseoxidase und Radioisotope wie Jod (^{125}I , ^{121}I), Kohlenstoff (^{14}C), Schwefel (^{35}S), Tritium (^3H), Indium (^{112}In) und Technetium ($^{99\text{m}}\text{Tc}$) und Fluoreszenzmarkierungen wie Fluorescein und Rhodamin und Biotin ein.

[0131] Zusätzlich zum Testen der TNFR-Proteinspiegel in einer biologischen Probe, die von einem Individuum erhalten wurde, können TNFR-Proteine auch durch in-vivo bildgebende Verfahren nachgewiesen werden. Antikörpermarkierungen oder Marker für in-vivo bildgebende Verfahren von TNFR-Proteinen schließen diejenigen ein, die durch Röntgenographie, NMR oder ESR nachweisbar sind. Für die Röntgenographie schließen geeignete Markierungen Radioisotope wie Barium oder Cäsium ein, die nachweisbare Strahlung emittieren, aber für den Probanden offenkundig unschädlich sind. Geeignete Markierungen für NMR und ESR schließen diejenigen mit einem charakteristischen Spin wie Deuterium ein, die in den Antikörper durch Markierung von Nährstoffen für die relevanten Hybridome eingebaut werden können.

[0132] Ein TNFR-spezifischer Antikörper oder ein Antikörperfragment, der/das mit einer geeigneten nachweisbaren bildgebenden Einheit wie einem Radioisotop (beispielsweise ^{131}I , ^{112}In , $^{99\text{m}}\text{Tc}$), einer radioopaken Substanz oder einem Material markiert wurde, das durch Kernmagnetresonanz nachweisbar ist, wird in den Säuger eingeführt (beispielsweise parenteral, subkutan oder intraperitoneal), damit er auf eine Immunsystemstörung untersucht werden kann. Es ist im Fachgebiet klar, dass die Größe des Probanden und das verwendete bildgebende System die Menge der bildgebenden Einheit bestimmt, die erforderlich ist, um diagnostische Bilder zu liefern. Im Falle einer Radioisotopeinheit wird bei einem menschlichen Probanden die Menge an Radioaktivität normalerweise in einem Bereich von etwa 5 bis 20 Millicurie $^{99\text{m}}\text{Tc}$ injiziert. Der markierte Antikörper oder das Antikörperfragment häuft sich dann bevorzugt an der Position der Zellen an, die TNFR-Protein enthalten. In-vivo-Tumor-Imaging wird bei S.W. Burchiel et al., „Immunopharmacokinetics of Radiolabeled Antibodies and Their Fragments“ (Kapitel 13 in Tumor Imaging: The Radiochemical Detection of Cancer, S.W. Burchiel und B. A. Rhodes, Herausgeb., Masson Publishing Inc. (1982)) beschrieben.

Behandlung

[0133] Es ist bekannt, dass sich die Tumornekrosefaktor (TNF)-Familie-Liganden unter den am meisten pleiotropen Cytokinen befinden, die viele zelluläre Antworten, einschließlich Cytotoxizität, anti-viraler Aktivität, immunregulatorischer Aktivitäten und der Transkriptionsregulation mehrerer Gene induzieren (Goeddel, D.V. et al., „Tumor Necrosis Factors: Gene Structure and Biological Activities“, Symp. Quant. Biol. 51: 597-609 (1986),

Cold Spring Harbor; Beutler, B., und Cerami, A., Annu. Rev. Biochem. 57: 505-518 (1988); Old, L.J., Sci. Am. 258: 59-75 (1988); Fiers, W., FERS Lett. 285: 199-224 (1991)). Die TNF-Familie-Liganden induzieren derartige zelluläre Antworten durch Binden an die TNF-Familie-Rezeptoren. Zellen, die ein TNFR-Polypeptid exprimieren und eine starke zelluläre Antwort auf TNFR-6 α - und -6 β -Liganden zeigen, schließen Lymphocyten, Endothelzellen, Keratinocyten und Prostatagewebe ein. Mit „einer zellulären Antwort auf TNF-Familie-Liganden“ ist jede genotypische, phänotypische und/oder morphologische Änderung auf eine Zelle, eine Zelllinie, ein Gewebe, eine Gewebekultur oder einen Patienten gemeint, die durch einen TNF-Familie-Liganden induziert wird. Wie angegeben, schließen derartige zelluläre Antworten nicht nur normale physiologische Reaktionen auf TNF-Familie-Liganden ein, sondern auch Krankheiten ein, die mit erhöhter Apoptose oder der Hemmung von Apoptose assoziiert sind.

[0134] Krankheiten, die mit erhöhtem Zellüberleben oder der Hemmung von Apoptose assoziiert sind, schließen Krebs (wie follikuläre Lymphome, Karzinome mit p53-Mutationen und hormonabhängige Tumoren wie Brustkrebs, Prostatakrebs, Kaposi-Sarkom und Eierstockkrebs), Autoimmunerkrankungen (wie systemischen Lupus erythematosus und mit dem Immunsystem im Zusammenhang stehende Glomerulonephritis, rheumatoide Arthritis) und Virusinfektionen (wie Herpes-Viren, Pocken-Viren und Adenoviren), Informationen über Transplantat-Wirts-Abstoßung, akute Transplantatabstoßung und chronische Transplantatabstoßung ein. Krankheiten, die mit erhöhter Apoptose assoziiert sind, schließen AIDS; neurodegenerative Krankheiten (wie Alzheimer-Erkrankung, Parkinson-Krankheit, amyotrophe Lateralsklerose, Retinitis pigmentosa, cerebrale Degeneration); myelodysplastische Syndrome (wie aplastische Anämie), ischämische Verletzung (wie diejenige, die durch einen Myocardinfarkt, Schlaganfall und eine Reperusionsverletzung verursacht wird), toxininduzierte Lebererkrankung (wie diejenige, die durch Alkohol verursacht wird) septischen Schock, Kachäxie und Anorexie ein.

[0135] Daher beschreibt die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Erhöhung der durch einen TNF-Familie-Liganden induzierten Apoptose, das die Verabreichung an eine Zelle beinhaltet, die das TNFR-Polypeptid, eine wirksame Menge an TNFR-Polypeptid, ein Analogon oder einen Agonisten exprimiert, der die TNFR-vermittelte Signalgebung erhöhen kann. Die TNFR-vermittelte Signalgebung wird vorzugsweise erhöht, um eine Krankheit zu behandeln, bei der eine erniedrigte Apoptose gezeigt wird. Antagonisten können lösliche Formen von TNFR und monoclonale Antikörper einschließen, die gegen das TNFR-Polypeptid gerichtet sind.

[0136] Mit „Agonist“ sind natürlich auftretende und synthetische Verbindungen gemeint, die die Apoptose erhöhen oder potenzieren können. Mit „Antagonist“ sind natürlich auftretende und synthetische Verbindungen gemeint, die die Apoptose hemmen können. Ob irgendein Kandidaten-„Agonist“ oder Kandidaten-„Antagonist“ der vorliegenden Erfindung die Apoptose erhöhen oder hemmen kann, kann unter Verwendung von im Fachgebiet bekannten Tests auf die zellulären Antworten auf TNF-Familien-Liganden/Rezeptoren, einschließlich derjenigen, die detaillierter nachstehend beschrieben werden, bestimmt werden.

[0137] Ein derartiges Durchmusterungsverfahren beinhaltet die Verwendung von Melanophoren, die transfiziert werden, um den Rezeptor der vorliegenden Erfindung zu exprimieren. Ein derartiges Durchmusterungsverfahren wird in PCT WO 92/01810, veröffentlicht am 6. Februar 1992, beschrieben. Ein derartiger Test kann beispielsweise zum Durchmustern einer Verbindung verwendet werden, die die Aktivierung des Rezeptorpolypeptids der vorliegenden Erfindung durch Inkontaktbringen der Melanophorzellen, die den Rezeptor sowohl mit einem TNF-Familie-Liganden als auch den Kandidaten-Antagonisten (oder Agonisten) codieren, hemmt (oder erhöht). Die Hemmung oder Erhöhung des von dem Liganden erzeugten Signals zeigt an, dass die Verbindung ein Antagonist oder Agonist des Liganden/Rezeptorsignalweges ist.

[0138] Andere Durchmusterungsverfahren schließen die Verwendung von Zellen ein, die den Rezeptor (beispielsweise transfizierte CHO-Zellen) in einem System exprimieren, das extrazelluläre durch Rezeptoraktivierung verursachte pH-Wertänderungen misst, beispielsweise wie in Science 246: 181-296 (Oktober 1989) beschrieben. Beispielsweise können Verbindungen mit einer Zelle in Kontakt gebracht werden, die das Rezeptorpolypeptid der vorliegenden Erfindung exprimiert, und eine Antwort des zweiten Botenstoffes, z.B. Signalübermittlung oder pH-Wertänderungen, kann gemessen werden, um zu bestimmen, ob die potenzielle Verbindung den Rezeptor aktiviert oder hemmt.

[0139] Ein weiteres derartiges Durchmusterungsverfahren beinhaltet das Einführen der RNA, die den Rezeptor codiert, in Xenopus-Oocyten, um den Rezeptor übergangsweise zu exprimieren. Die Rezeptor-Oocyten können dann mit dem Rezeptorliganden und einer zu durchmusternden Verbindung in Kontakt gebracht werden, worauf sich der Nachweis der Hemmung oder Aktivierung eines Calciumsignals im Falle der Durchmusterung nach Verbindungen anschließt, von denen man glaubt, dass sie die Aktivierung des Rezeptors hem-

men.

[0140] Ein weiteres Durchmusterungsverfahren beinhaltet das Exprimieren eines Konstrukts in Zellen, wobei der Rezeptor an eine Phospholipase C oder D gebunden ist. Derartige Zellen schließen Endothelzellen, glatte Muskelzellen, embryonale Nierenzellen etc. ein. Die Durchmusterung kann, wie hier vorstehend beschrieben, durch Nachweisen der Aktivierung des Rezeptors oder Hemmung der Aktivierung des Rezeptors aus dem Phospholipase-Signal erfolgen.

[0141] Ein anderes Verfahren beinhaltet das Durchmustern nach Verbindungen, die die Aktivierung des Antagonisten-Rezeptorpolypeptids der vorliegenden Erfindung hemmen, indem die Hemmung der Bindung des markierten Liganden an Zellen bestimmt wird, die den Rezeptor an dessen Oberfläche besitzen. Ein derartiges Verfahren beinhaltet das Transfizieren einer eukaryontischen Zelle mit DNA, die den Rezeptor codiert, so dass die Zelle den Rezeptor auf seiner Oberfläche exprimiert, und das Inkontaktbringen der Zelle mit einer Verbindung in Gegenwart einer markierten Form eines bekannten Liganden. Der Ligand kann z.B. durch Radioaktivität markiert sein. Die Menge des markierten, an die Rezeptoren gebundenen Liganden wird z.B. durch Messen der Radioaktivität der Rezeptoren gemessen. Falls die Verbindung an den Rezeptor bindet, wie durch die Verringerung eines markierten Liganden bestimmt, der an die Rezeptoren bindet, wird die Bindung des markierten Liganden gehemmt.

[0142] Weitere Durchmusterungstests für Agonisten und Antagonisten der vorliegenden Erfindung werden bei Tartaglia, L.A. und Goeddel, D.V., J. Biol. Chem. 267(7): 4304-4307(1992) beschrieben.

[0143] Daher wird in einem weiteren Aspekt ein Durchmusterungsverfahren beschrieben, das bestimmt ob ein Kandidaten-Agonist oder -Antagonist eine zelluläre Antwort auf einen TNF-Familie-Liganden erhöhen oder hemmen kann. Das Verfahren beinhaltet das Inkontaktbringen von Zellen, die das TNFR-Polypeptid exprimieren, mit einer Kandidatenverbindung und einem TNFR-Familie-Liganden, wobei eine zelluläre Antwort getestet wird, und das Vergleichen der zellulären Antwort mit einer zellulären Standardantwort, wobei der Standard getestet wird, wenn der Kontakt mit dem Liganden in Abwesenheit der Kandidatenverbindung hergestellt wird, wobei eine erhöhte zelluläre Antwort über dem Standard anzeigt, dass die Kandidatenverbindung ein Agonist des Liganden/Rezeptorsignalwegs ist und eine verringerte zelluläre Antwort im Vergleich zum Standard anzeigt, dass die Kandidatenverbindung ein Antagonist des Liganden/Rezeptorsignalwegs ist. Mit „Testen einer zellulären Antwort“ ist eine qualitative oder quantitative Messung einer zellulären Antwort auf eine Kandidatenverbindung und/oder einen TNF-Familie-Liganden (z.B. Bestimmen oder Abschätzen eines Anstiegs oder einer Abnahme der T-Zellproliferation oder tritierte Thymidinmarkierung) gemeint. Mit der Erfindung kann eine Zelle, die das TNFR-Polypeptid exprimiert, entweder mit einem endogen oder exogen verabreichten TNF-Familien-Liganden in Kontakt gebracht werden.

[0144] Agonisten, wie in der vorliegenden Erfindung beschrieben, schließen natürlich auftretende und synthetische Verbindungen wie beispielsweise TNF-Familie-Liganden-Peptidfragmente; den transformierenden Wachstumsfaktor, Neurotransmitter (wie Glutamat, Dopamin, N-Methyl-D-aspartat), Tumor-Suppressoren (p53), cytolytische T-Zellen und Antimetaboliten ein. Bevorzugte Agonisten schließen Chemotherapeutika wie beispielsweise Cisplatin, Doxorubicin, Bleomycin, Cytosinarabinosid, Nitrogen-Mustard, Methotrexat und Vincristin ein. Andere schließen Ethanol und Amyloid-Peptid ein (Science 267: 1457-1458 (1995)). Weitere bevorzugte Agonisten schließen polyclonale und monoclonale Antikörper ein, die gegen das TNFR-Polypeptid oder ein Fragment davon erzeugt wurden. Derartige Agonisten-Antikörper, die gegen einen TNF-Familie-Rezeptor erzeugt wurden, sind bei Tartaglia, L.A., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 9292-9296 (1991) und Tartaglia, L.A. und Goeddel, D.V., J. Biol. Chem. 267(7): 4304-4307 (1992) offenbart. Vgl. auch PCT-Anmeldung WO 94/09137.

[0145] Antagonisten, wie in der vorliegenden Erfindung beschrieben, schließen natürlich auftretende und synthetische Verbindungen wie beispielsweise den CD40-Liganden, neutrale Aminosäuren, Zink, Östrogen, Androgene, Virusgene (wie Adenovirus E1B, Baculovirus p35 und IAP, Kuhpocken-Virus crmA, Epstein-Barr-Virus BHRF1, LMP-1, afrikanisches Schweinefieber-Virus LMW5-HL und Herpesvirus γ 34.5), Calpain-Inhibitoren, Cysteinprotease-Inhibitoren und Tumorpromotoren (wie PMA, Phenobarbital und Hexachlorcyclohexan) ein. Andere Antagonisten schließen polyclonale und monoclonale Antikörper ein, die gegen das TNFR-Polypeptid oder ein Fragment davon erzeugt wurden. Derartige Antagonisten-Antikörper, die gegen einen TNF-Familien-Rezeptor erzeugt wurden, sind bei Tartaglia, L.A. und Goeddel, D.V., J. Biol. Chem. 267(7): 4304-4307 (1992) und Tartaglia, L.A. et al., Cell 73: 213-216 (1993) beschrieben. Vgl. auch PCT-Anmeldung WO 94/09137.

[0146] Andere potenzielle, in der vorliegenden Erfindung beschriebene Antagonisten schließen Antisense-Moleküle ein. Antisense-Technologie kann verwendet werden, um die Genexpression durch Antisense-DNA oder -RNA oder durch Dreifachhelixbildung zu kontrollieren. Antisense-Techniken werden beispielsweise bei Okano, J. *Neurochem.* 56: 560 (1991); Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression, CRC Press, Boca Raton, FL (1988), diskutiert. Die Dreifachhelixbildung wird beispielsweise bei Lee et al., *Nucleic Acids Research* 6: 3073 (1979); Cooney et al., *Science* 241: 456 (1988) und Dervan et al., *Science* 251:1360 (1991), diskutiert. Die Verfahren basieren auf der Bindung eines Polynucleotids an eine komplementäre DNA oder RNA.

[0147] Beispielsweise kann der codierende 5'-Anteil eines Polynucleotids, das das reife Polypeptid der vorliegenden Erfindung codiert, verwendet werden, um ein Antisense-RNA-Oligonucleotid mit einer Länge von 10 bis 40 Basenpaaren zu konstruieren. Ein DNA-Oligonucleotid wird so konstruiert, dass es komplementär zu einer Region des an der Transkription beteiligten Gens ist, damit die Transkription und die Produktion des Rezeptors verhindert werden. Das Antisense-RNA-Oligonucleotid hybridisiert mit der mRNA in vivo und blockiert die Translation des mRNA-Moleküls in das Rezeptorpolypeptid.

[0148] Die vorstehend beschriebenen Oligonucleotide können auch an Zellen so verabreicht werden, so dass die Antisense-RNA oder -DNA in vivo exprimiert werden kann, um die Produktion des Rezeptors zu hemmen.

[0149] Weitere in der vorliegenden Erfindung beschriebene Antagonisten schließen lösliche Formen von TNFR ein, d.h. TNFR-Fragmente, die die Liganden-bindende Domäne der extrazellulären Region des Rezeptors mit der vollständigen Länge einschließen. Derartige lösliche Formen des Rezeptors, die natürlich vorkommend oder synthetisch sein können, antagonisieren die TNFR-vermittelte Signalgebung durch Konkurrenz mit dem Zelloberflächen-TNFR zur Bindung an TNF-Familie-Liganden. Daher sind lösliche Formen des Rezeptors, die die Liganden-bindende Domäne einschließen, neue Cytokine, die die durch TNF-Familie-Liganden induzierte Tumornekrose hemmen können. Andere derartige Cytokine sind im Fachgebiet bekannt und schließen Fas B (eine lösliche Form des Maus-Fas-Rezeptors) ein, der physiologisch wirkt, um die vom Fas-Liganden induzierte Apoptose zu begrenzen (Hughes, D.P. und Crispe, I.N., *J. Exp. Med.* 182: 1395-1401 (1995)).

[0150] Wie angegeben, können polyclonale und monoclonale Antikörper-Agonisten oder Antagonisten nach der vorliegenden Erfindung nach den Verfahren erzeugt werden, die bei Tartaglia, L.A. und Goeddel, D.V., *J. Biol. Chem.* 267(7): 4304-4307 (1992); Tartaglia, L.A. et al., *Cell* 73: 213-216 (1993) und der PCT-Anmeldung WO 94/09137 offenbart werden. Der Begriff „Antikörper“ (AK) oder „monoclonaler Antikörper“ (mAK) wie hier verwendet, bedeutet, dass intakte Moleküle sowie Fragmente davon (wie beispielsweise Fab und F(ab')₂-Fragmente) eingeschlossen sind, die ein Antigen binden können. Fab und F(ab')₂-Fragmenten fehlt das Fc-Fragment des intakten Antikörpers, sie werden schneller aus der Zirkulation entfernt und können weniger unspezifische Gewebebindung eines intakten Antikörpers aufweisen (Wahl et al., *J. Nucl. Med.* 24: 316-325 (1983)).

[0151] Antikörper nach der vorliegenden Erfindung können von einer ganzen Vielfalt an Verfahren hergestellt werden, die vorstehend beschrieben werden und im Fachgebiet bekannt sind.

[0152] Proteine und andere Verbindungen, die die extrazellulären Domänen binden, werden auch als Agonisten und Antagonisten nach der vorliegenden Erfindung beschrieben. Derartige bindende Verbindungen können unter Verwendung des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems „eingefangen“ werden (Fields und Song, *Nature* 340: 245-246 (1989)). Eine modifizierte Version des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems wurde von Roger Brent und seinen Kollegen beschrieben (Gyuris, J. et al., *Cell* 75: 791-803 (1993); Zervos, A.S. et al., *Cell* 72: 223-232 (1993)).

[0153] Mit einem „TNF-Familie-Liganden“ sind natürlich vorkommende, rekombinante und synthetische Liganden gemeint, die an ein Mitglied der TNF-Rezeptorfamilie binden können und den Liganden/Rezeptor-Signalweg induzieren können. Mitglieder der TNF-Ligandenfamilie schließen ein, sind aber nicht begrenzt auf die TNFR-6α- & -6β-Liganden, TNF-α, Lymphotoxin-α (LT-α, auch bekannt als TNF-β), LT-β, FasL, CD40, CD27, CD30, 4-1BB, OX40, TRAIL und den Nervenwachstumsfaktor (NGF).

[0154] Repräsentative therapeutische Anwendungen der vorliegenden Erfindung werden nachstehend detaillierter diskutiert. Der Zustand der Immunschwäche, der AIDS definiert, ist zu einer Abnahme der Anzahl und Funktion der CD4⁺-T-Lymphocyten sekundär. Jüngste Berichte schätzen, dass der tägliche Verlust an CD4⁺-T-Zellen zwischen $3,5 \times 10^7$ und 2×10^9 Zellen (Wei, X., et al., *Nature* 373: 117-122 (1995)) beträgt. Man glaubt, dass ein Grund für die CD4⁺-T-Zellen-Verarmung beim Szenario der HIV-Infektion die HIV-induzierte Apoptose ist. Tatsächlich wurde der HIV-induzierte apoptotische Zelltod nicht nur in vitro gezeigt, sondern was noch wichtiger ist, in infizierten Individuen (Ameisen, J.C., *AIDS* 8: 1197-1213 (1994); Finkel, T.H. und Banda,

N.K., Curr. Opin. Immunol. 6: 605-615(1995); Muro-Cacho, C.A. et al., J. Immunol. 154: 5555-5566 (1995)). Ferner sind Apoptose und CD4⁺-T-Lymphozyten-Verarmung in verschiedenen AIDS-Tiermodellen eng korreliert (Brunner, T., et al., Nature 373: 441-444 (1995); Gougeon, M.L., et al., AIDS Res. Hum. Retroviruses 9: 553-563 (1993)), und Apoptose wird in denjenigen Tiermodellen nicht beobachtet, bei denen die Virusreplikation nicht zu AIDS führt (Gougeon, M.L. et al., AIDS Res. Hum. Retroviruses 9: 553-563 (1993)). Weitere Daten geben an, dass nicht-infizierte, aber stimulierte oder aktivierte T-Lymphocyten aus HIV-infizierten Individuen eine Apoptose durchlaufen, nachdem sie auf den TNF-Familie-Liganden FasL getroffen sind. Unter Verwendung von monocytischen Zelllinien, die nach der HIV-Infektion zum Tod führen, wurde gezeigt, dass die Infektion der U937-Zellen mit HIV zur de-novo-Expression von FasL führt, und dass FasL die HIV-induzierte Apoptose vermittelt (Badley, A.D. et al., J. Virol. 70: 199-206 (1996)). Ferner war der TNF-Familie-Ligand in nicht-infizierten Makrophagen nachweisbar, und seine Expression wurde nach der HIV-Infektion hochreguliert, was zur selektiven Abtötung von nicht-infizierten CD4-T-Lymphocyten führte (Badley, A.D. et al., J. Virol. 70: 199-206 (1996)). Daher wird durch die Erfindung ein Verfahren zur Behandlung von HIV⁺-Individuen bereitgestellt, das die Verabreichung eines Antagonisten der vorliegenden Erfindung beinhaltet, um das selektive Abtöten der CD4-T-Lymphocyten zu verringern. Arten der Verabreichungen und Dosierungen werden nachstehend detailliert diskutiert.

[0155] Bei der Abstoßung eines Transplantats wurde das Immunsystem eines Empfängertieres zuvor nicht stimuliert, um zu reagieren, da das Immunsystem meistens nur durch Umweltantigene stimuliert wird. Gewebe von anderen Mitgliedern derselben Spezies wurden nicht auf dieselbe Art präsentiert, wie beispielsweise Viren und Bakterien präsentiert wurden. Im Falle der Allotransplantatabstoßung werden immunsuppressive Therapieschemen konzipiert, um das Immunsystem daran zu hindern, das Effektorstadium zu erreichen. Jedoch kann das Immunprofil der Fremdtransplantatabstoßung dem Wiederauftreten der Krankheit mehr ähneln als der Allotransplantatabstoßung. Im Falle des Wiederauftretens der Krankheit wurde das Immunsystem bereits aktiviert, wie durch Zerstörung der nativen Inselzellen nachgewiesen. Daher befindet sich das Immunsystem beim Wiederauftreten der Krankheit bereits im Effektorstadium. Agonisten der vorliegenden Erfindung können die Immunantwort sowohl gegen Allotransplantate als auch gegen Xenotransplantate supprimieren, da aktivierte und in Effektorzellen differenzierte Lymphocyten das TNFR-Polypeptid exprimieren und daher für Verbindungen empfänglich sind, die die TNFR-Aktivität erhöhen. Daher beschreibt die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Erzeugung von immunprivilegierten Geweben. Antagonisten der vorliegenden Erfindung werden als verwendbar bei der Behandlung der entzündlichen Darmerkrankung beschrieben.

Formulierungen

[0156] Die TNFR-Polypeptid-Zusammensetzung wird auf eine Weise formuliert und dosiert, die mit der guten medizinischen Praxis im Einklang steht, wobei der klinische Zustand des einzelnen Patienten (insbesondere die Nebenwirkungen der Behandlung mit TNFR-6 α - oder -6 β -Polypeptid allein), der Verabreichungsort der TNFR-Polypeptid-Zusammensetzung, das Verabreichungsverfahren, der Zeitplan der Verabreichung und andere Faktoren, die dem behandelnden Arzt bekannt sind, in Betracht gezogen werden. Die „wirksame Menge“ des TNFR-Polypeptids für die hier genannten Zwecke wird daher durch derartige Überlegungen bestimmt.

[0157] Als allgemeiner Vorschlag liegt die verabreichte pharmazeutisch wirksame Gesamtmenge des TNFR-Polypeptids parenteral pro Dosis im Bereich von etwa 1 μ g/kg/Tag bis 10 mg/kg/Tag des Körpergewichts des Patienten, obwohl dies, wie vorstehend angemerkt, dem therapeutischen Ermessen unterliegt. Stärker bevorzugt beträgt diese Dosis mindestens 0,01 mg/kg/Tag, und am meisten bevorzugt für Menschen zwischen etwa 0,01 und 1 mg/kg/Tag für das Hormon. Falls das TNFR-Polypeptid kontinuierlich verabreicht wird, wird es typischerweise mit einer Dosierungsrate von etwa 1 μ g/kg/Stunde bis etwa 50 μ g/kg/Stunde entweder durch 1-4 Injektionen pro Tag oder durch kontinuierliche subkutane Infusionen, beispielsweise unter Verwendung einer Mini-Pumpe, verabreicht. Ein Beutel mit einer intravenösen Lösung kann ebenfalls verwendet werden. Die Länge der benötigten Behandlung, um Änderungen zu beobachten, und das Intervall, das auf die Behandlung für auftretende Reaktionen folgt, scheint abhängig vom gewünschten Effekt zu variieren.

[0158] Arzneimittel, die das erfindungsgemäße TNFR enthalten, können oral, rektal, parenteral, intrazisternal, intravaginal, intraperitoneal, topisch (wie durch Pulver, Salben, Tropfen oder transdermale Pflaster), buccal oder als Mund- oder Nasenspray verabreicht werden. Mit „pharmazeutisch verträglichem Träger“ ist ein nicht-toxischer fester, halbfester oder flüssiger Füllstoff, Verdünnungsmittel, Verkapselungsmaterial oder Formulierungshilfsmittel jeglicher Art gemeint. Der Begriff „parenteral“, wie hier verwendet, betrifft die Verabreichungsarten, die intravenös, intramuskulär, intraperitoneal, intrasternal, subkutan und intraartikuläre Injektion und Infusion einschließen.

[0159] Das TNFR-Polypeptid wird auch durch Systeme mit anhaltender Freisetzung in geeigneter Weise verabreicht. Geeignete Beispiele von Zusammensetzungen für die anhaltende Freisetzung schließen semipermeable Polymermatizes in Form von geformten Partikeln z.B. Filme oder Mikrokapseln ein. Matizes für die anhaltende Freisetzung schließen Polylactide (US-Pat. Nr. 3,773,919, EP 58,481), Copolymere aus L-Glutaminsäure und Gamma-ethyl-L-glutamat (Sidman, U. et al., Biopolymers 22: 547-556 (1983)); Poly (2-hydroxyethylmethacrylat) (R. Langer et al., J. Biomed. Mater. Res. 15: 167-277 (1981) und R. Langer, Chem. Tech. 12: 98-105 (1982)); Ethylenvinylacetat (R. Langer et al., Id.) oder Poly-D-(-)-3-hydroxybuttersäure (EP 133,988) ein. TNFR-Polypeptidzusammensetzungen für die anhaltende Freisetzung schließen auch in Liposomen eingebettete TNFR-Polypeptide ein. Liposomen, die TNFR-Polypeptide enthalten, werden durch an sich bekannte Verfahren hergestellt: DE 3,218,121; Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 82: 3688-3692 (1985); Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 77: 4030-4034 (1980); EP 52,322; EP 36,676; EP 88,046; EP 143,949; EP 142,641; Japanische Pat. Appl. 83-118008; US-Pat. Nr. 4,485,045 und 4,544,545; und EP 102,324. Gewöhnlich sind die Liposomen vom kleinen (etwa 200-800 Angstrom) unilamellaren Typus, in dem der Lipidgehalt größer als etwa 30 Mol-Prozent Cholesterin ist, wobei das ausgewählte Verhältnis für die optimale TNFR-Polypeptid-Therapie eingestellt wird.

[0160] Für die parenterale Verabreichung wird in einer Ausführungsform das TNFR-Polypeptid allgemein formuliert, indem es zu dem gewünschte Grad an Reinheit, in einer injizierbaren Einheitendosierungsform (Lösung, Suspension oder Emulsion) mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger gemischt wird, d.h. einer, der für die Empfänger bei den verwendeten Dosierungen und Konzentrationen nicht toxisch ist und mit anderen Bestandteilen der Formulierung kompatibel ist. Beispielsweise schließt die Formulierung vorzugsweise keine nicht-oxidierende Agenzien und anderen Verbindungen ein, von denen bekannt ist, dass sie für die Polypeptide schädlich sind.

[0161] Im Allgemeinen werden die Formulierungen durch einheitliches und nahes Inkontaktbringen des TNFR-Polypeptids mit flüssigen Trägern oder fein verteilten festen Trägern oder beiden hergestellt. Dann wird das Produkt, falls notwendig, in die gewünschte Formulierung gebracht. Vorzugsweise ist der Träger ein parenteraler Träger, stärker bevorzugt eine Lösung, die mit dem Blut des Empfängers isotonisch ist. Beispiele eines derartigen Trägervehikels schließen Wasser, Salzlösung, Ringer-Lösung und Dextrose-Lösung ein.

[0162] Nicht-wässrige Vehikel wie nicht-flüchtige Öle und Ethyloleat sowie Liposomen sind hier ebenfalls nützlich.

[0163] Der Träger enthält entsprechend geringe Mengen an Zusatzstoffen wie Substanzen, die die Isotonizität oder chemische Stabilität erhöhen. Derartige Materialien sind bei den verwendeten Dosierungen und Konzentrationen für die Empfänger nicht toxisch und schließen Puffer wie Phosphat, Citrat, Succinat, Essigsäure und andere organische Säuren oder ihre Salze; Antioxidantien wie Ascorbinsäure; Polypeptide mit niedrigem Molekulargewicht (weniger als etwa zehn Reste), z.B. Polyarginin oder Tripeptide; Proteine wie Serumalbumin, Gelatine oder Immunglobuline, hydrophile Polymere wie Polyvinylpyrrolidon; Aminosäuren wie Glycin und Glutaminsäure, Asparaginsäure oder Arginin; Monosaccharide, Disaccharide und andere Kohlenhydrate, einschließlich Cellulose oder dessen Derivate, Glucose, Mannose oder Dextrine; Chelat-bildende Agenzien wie EDTA; Zuckeralkohole wie Mannit oder Sorbit; Gegenionen wie Natrium; und/oder nicht-ionische oberflächenaktive Mittel wie Polysorbate, Poloxamere oder PEG ein.

[0164] Das TNFR-Polypeptid wird in solchen Vehikeln typischerweise bei einer Konzentration von etwa 0,1 mg/ml bis 100 mg/ml, vorzugsweise 1-10 mg/ml, bei einem pH-Wert von etwa 3 bis 8 formuliert. Es ist klar, dass die Verwendung bestimmter der vorstehenden Exzipienten, Träger oder Stabilisatoren zur Bildung von TNFR-Polypeptidsalzen führt.

[0165] Für die therapeutische Verabreichung zu verwendende TNFR-Polypeptide müssen steril sein. Die Sterilität wird leicht durch Filtration über Sterilfiltrationmembranen erreicht (z.B. 0,2 Mikron-Membranen). Therapeutische TNFR-Polypeptid-Zusammensetzungen werden im Allgemeinen in einen Behälter mit einer sterilen Zugangsöffnung gegeben, beispielsweise einen Beutel mit intravenöser Lösung oder ein Gefäß mit einem Stopfen, der mit einer hypodermischen Injektionsnadel durchstoßen werden kann.

[0166] TNFR-Polypeptide werden normalerweise in Einheiten oder Behältern zur Mehrfachsdosierung, versiegelten Ampullen oder Gefäßen als wässrige Lösung oder als lyophilisierte Formulierung zur Rekonstitution gelagert. Als Beispiel für eine lyophilisierte Formulierung werden 10 ml-Gefäße mit 5 ml sterilfiltrierter 1%-iger (Gew. %/Vol. %) wässriger TNFR-Polypeptid-Lösung gefüllt, und das sich ergebende Gemisch wird lyophilisiert. Die Infusionslösung wird durch Rekonstituieren des lyophilisierten TNFR-Polypeptids unter Verwendung von

bakteriostatischem Wasser zur Injektion hergestellt.

[0167] Die Erfindung stellt auch eine pharmazeutische Verpackung oder einen Kit bereit, umfassend einen oder mehrere Behälter, die mit einem oder mehreren Inhaltsstoffen des erfindungsgemäßen Arzneimittels gefüllt sind. Einem derartigen Behälter/Derartigen Behältern kann ein Hinweis in der Form beigelegt sein, die von einer Behörde vorgeschrieben wird, welche die Herstellung, die Verwendung oder den Verkauf der Arzneimittel oder biologischen Produkte regelt, wobei der Hinweis die Genehmigung durch die Behörde für die Herstellung, Verwendung oder den Verkauf für die Verabreichung am Menschen wiedergibt. Zusätzlich können die Polypeptide der vorliegenden Erfindung zusammen mit anderen therapeutischen Verbindungen verwendet werden.

Chromosomentests

[0168] Die Nucleinsäuremoleküle der vorliegenden Erfindung sind auch zur Chromosomenidentifizierung wertvoll. Die Sequenz wird als spezifisches Ziel verwendet und kann mit einem bestimmten Ort auf einem einzelnen menschlichen Chromosom hybridisieren. Außerdem besteht ein aktueller Bedarf zur Identifizierung bestimmter Stellen auf dem Chromosom. Es stehen derzeit wenige Chromosomen-markierende Reagenzien, basierend auf aktuellen Sequenzdaten (Wiederholungspolymorphismen) zur Markierung von Chromosomenorten zur Verfügung. Die Kartierung von DNAs auf Chromosomen nach der vorliegenden Erfindung ist ein wichtiger erster Schritt bei der Korrelation jener Sequenzen mit Genen, die mit Krankheiten assoziiert sind.

[0169] In bestimmten bevorzugten Ausführungsformen werden in diesem Zusammenhang die hier offenbarten cDNAs verwendet, um genomische DNA eines TNFR-Proteingens zu klonieren. Dies kann unter Verwendung einer Vielfalt von gut bekannten Techniken und Genbanken erfolgen, die im Allgemeinen im Handel erhältlich sind. Die genomische DNA wird dann für die in-situ-Chromosomenkartierung unter Verwendung von gut bekannten Techniken für diesen Zweck verwendet.

[0170] Zudem können die Sequenzen in einigen Fällen auf Chromosomen kartiert werden, indem PCR-Primer (vorzugsweise 15-25 bp) aus der cDNA hergestellt werden. Die Computeranalyse der nicht-translatierten 3'-Region des Gens wird verwendet, um Primer schnell auszuwählen, die nicht mehr als ein Exon in der genomischen DNA umfassen, wobei ansonsten der Amplifizierungsprozess erschwert werden würde. Diese Primer werden dann zur PCR-Durchmusterung von somatischen Zellhybriden verwendet, die einzelne menschliche Chromosomen enthalten. Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung („FISH“) eines cDNA-Clons mit einer Spreitung der Metaphasenchromosomen kann verwendet werden, um in einem Schritt einen präzisen Chromosomenort zu liefern. Diese Technik kann mit Sonden aus der cDNA verwendet werden, die so kurz wie 50 oder 60 bp sind. Für einen Übersichtsartikel dieser Technik vgl. Verma et al., Human Chromosomes: A Manual Of Basic Techniques, Pergamon Press, New York (1988).

[0171] Sobald eine Sequenz auf einem präzisen Chromosomenort kartiert wurde, kann die physikalische Position der Sequenz auf dem Chromosom mit Daten der genetischen Karte korreliert werden. Derartige Daten findet man beispielsweise bei V. McKusick, Mendelian Inheritance In Man, erhältlich online über Johns Hopkins University, Welch Medical Library. Die Beziehung zwischen den Genen und Krankheiten, die auf derselben Chromosomenregion kartiert wurden, werden dann über Kopplungsanalyse (gemeinsame Vererbung von physikalisch benachbarten Genen) identifiziert.

[0172] Anschließend ist es erforderlich, die Unterschiede in der cDNA oder der genomischen Sequenz zwischen betroffenen und nicht betroffenen Individuen zu bestimmen. Falls eine Mutation in einigen oder allen betroffenen Individuen, aber in keinem normalen Individuum beobachtet wird, dann ist die Mutation wahrscheinlich das verursachende Agens der Krankheit.

[0173] Nachdem die Erfindung allgemein beschrieben wurde, wird man dieselbige leichter durch Bezugnahme auf die folgenden Beispiele verstehen, die mittels Veranschaulichung bereitgestellt werden, und nicht als limitierend gedacht sind.

Beispiele

Beispiel 1: Expression und Reinigung von TNFR-6α und -6β in E. coli

[0174] Der bakterielle Expressionsvektor pQE60 wird für die bakterielle Expression in diesem Beispiel verwendet (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, KA, 91311). pQE60 codiert die Ampicillin-Antibiotikaresistenz („Ampr“) und enthält einen bakteriellen Replikationsursprung („ori“), einen IPTG-induzierbaren Pro-

motor, eine ribosomale Bindungsstelle („RBS“), sechs Codons, die Histinreste codieren, die eine Affinitätsreinigung unter Verwendung von Nickelnitrilotriessigsäure („Ni-NTA“)-Affinitätsharz zulassen, vertrieben von QIAGEN, Inc., a.a.O., und geeignete Restriktionsenzym-schnittstellen. Diese Elemente sind so angeordnet, dass ein DNA-Fragment, das ein Polypeptid codiert, so eingebaut wird, damit jenes Polypeptid mit den sechs, kovalent an den Carboxyterminus jenes Polypeptids gebundenen His-Resten (d.h. eine „6 × His-Markierung“) produziert wird. In diesem Beispiel ist jedoch die Polypeptid-codierende Sequenz so eingebaut, dass die Translation der sechs His-Codons verhindert wird und daher das Polypeptid ohne 6 × His-Markierung produziert wird.

[0175] Die DNA-Sequenzen, die die gewünschten Anteile von TNFR-6α- und -6β-Proteinen codieren, die die reifen Formen der TNFR-6α- und -6β-Aminosäuren umfassen, werden aus den hinterlegten cDNA-Clonen unter Verwendung von PCR-Oligonucleotidprimern amplifiziert, die sich an die aminoterminalen Sequenzen der gewünschten Anteile der TNFR-6α- oder -6β-Proteine und an Sequenzen in den hinterlegten Konstrukten 3' zur cDNA-codierenden Sequenz anlagern. Zusätzliche Nucleotide, die Restriktionsenzym-schnittstellen enthalten, um die Clonierung in den pQE60-Vektor zu erleichtern, werden an die 5'- bzw. 3'-Sequenzen hinzugefügt.

[0176] Zur Clonierung der reifen Form des TNFR-6α-Proteins besitzt der 5'-Primer die Sequenz 5' CGC-CCATGGCAGAAACACCCACCTAC 3' (SEQ ID NO: 19), die die unterstrichene NcoI-Restriktionsenzym-schnittstelle enthält. Einem Fachmann wäre natürlich bewusst, dass die Position in der proteincodierenden Sequenz, an der der 5' Primer beginnt, variiert werden kann, um einen gewünschten Anteil des vollständigen Proteins zu amplifizieren, der kürzer oder länger als die reife Form ist. Der 3' Primer besitzt die Sequenz 5' CG-CAAGCTTCTCTTTTCAGTGCAAGTG 3' (SEQ ID NO: 20), die die unterstrichene HindIII-Restriktionsenzym-schnittstelle enthält. Zur Clonierung der reifen Form des TNFR-6β-Proteins besitzt der 5'-Primer die Sequenz der vorstehenden SEQ ID NO: 19 und der 3' Primer besitzt die Sequenz 5' CGCAAGCTTCTCTCCTCAG-CTCCTGCAGTG 3' (SEQ ID NO: 21), die die unterstrichene HindIII-Restriktionsenzym-schnittstelle enthält.

[0177] Die amplifizierten TNFR-6α und -6β-DNA-Fragmente und der Vektor pQE60 werden mit NcoI und HindIII gespalten, und die gespaltenen DNAs werden dann ligiert. Die Insertion der TNFR-6α und -6β-DNA in den gespaltenen pQE60-Vektor platziert die TNFR-6α und -6β-Protein-codierende Region einschließlich seines assoziierten Stopp-Codons stromabwärts des IPTG-induzierbaren Promotors und in den Leserahmen mit einem Start-AUG. Das assoziierte Stopp-Codon verhindert die Translation der sechs Histidin-Codons stromabwärts des Insertionspunkts.

[0178] Das Ligierungsgemisch wird in kompetenten E. coli-Zellen unter Verwendung von Standardverfahren wie diejenigen, die bei Sambrook et al., Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 2. Aufl.; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1989) beschrieben werden, transformiert. E. coli-Stamm M15/rep4, der Mehrfachkopien des Plasmids pREP4 enthält, das den lac-Repressor exprimiert und Kanamycin-Resistenz („Kanr“) verleiht, wird bei der Durchführung des hier beschriebenen, veranschaulichenden Beispiels verwendet. Dieser Stamm, der nur einer von vielen ist, die für die Expression des TNFR-6α oder -6β-Proteins geeignet sind, ist im Handel von QIAGEN, Inc., a.a.O., erhältlich. Transformanten werden durch ihre Fähigkeit, auf LB-Platten in Gegenwart von Ampicillin und Kanamycin zu wachsen, identifiziert. Plasmid-DNA wird aus resistenten Kolonien isoliert und die Identität der clonierten DNA durch Restriktionsanalyse, PCR und DNA-Sequenzierung bestätigt.

[0179] Clone, die die gewünschten Konstrukte enthalten, werden über Nacht („Ü/N“) in Flüssigkultur in LB-Medien, ergänzt sowohl mit Ampicillin (100 µg/ml) als auch mit Kanamycin (25 µg/ml), gezüchtet. Die Ü/N-Kultur wird verwendet, um eine größere Kultur bei einer Verdünnung von etwa 1:25 bis 1:250 anzupflanzen. Die Zellen werden zu einer optischen Dichte bei 600 nm („OD600“) zwischen 0,4 und 0,6 gezüchtet. Dann wird Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid („IPTG“) bis zu einer Endkonzentration von 1 mM zugegeben, um die Transkription von dem lac-Repressor sensitiven Promotor zu induzieren, indem der lacI-Repressor inaktiviert wird. Die Zellen werden anschließend 3 bis 4 Stunden weiter inkubiert. Dann werden die Zellen durch Zentrifugation geerntet.

[0180] Um das TNFR-6α- und -6β-Polypeptid zu reinigen, werden die Zellen dann 3-4 Stunden bei 4°C in 6M Guanidin-HCl, pH 8, gerührt. Die Zelltrümmer werden durch Zentrifugation entfernt, und der Überstand, der den TNFR-6α und -6β enthält, wird gegen 50 mM Na-Acetatpuffer pH 6, ergänzt mit 200 mM NaCl, dialysiert. Alternativ kann das Protein erfolgreich rückgefaltet werden, indem es gegen 500 mM NaCl, 20% Glycerin, 25 mM Tris/HCl pH 7,4, enthaltend Proteaseinhibitoren, dialysiert wird. Nach der Renaturierung kann das Protein durch Zonenaustausch-, hydrophobe Interaktions- und Größenausschlusschromatographie gereinigt werden. Alternativ kann ein Affinitätschromatographie-Schritt wie eine Antikörpersäule verwendet werden, um reines

TNFR-6 α und -6 β -Protein zu erhalten. Das gereinigte Protein wird bei 4°C aufbewahrt oder bei -80°C eingefroren.

[0181] Das folgende alternative Verfahren kann verwendet werden, um TNFR-6 α oder -6 β , exprimiert in *E. coli*, zu reinigen, wenn er in Form von Einschlusskörperchen vorliegt. Wenn nicht anders spezifiziert, werden alle folgenden Schritte bei 4°-10°C durchgeführt.

[0182] Nach Beendigung der Produktionsphase der *E. coli*-Fermentation wird die Zellkultur auf 4-10°C heruntergekühlt und die Zellen werden durch kontinuierliche Zentrifugation bei 15.000 Upm (Heraeus Sepatech) geerntet. Auf der Basis der erwarteten Ausbeute des Proteins pro Gewichtseinheit der Zellpaste und der erforderlichen Menge an gereinigtem Protein wird eine geeignete Menge an Zellpaste, bezogen auf das Gewicht, in einer Pufferlösung, enthaltend 100 mM Tris, 50 mM EDTA, pH 7,4, suspendiert. Die Zellen werden zu einer homogenen Suspension unter Verwendung eines Scherkraft-Mischers dispergiert.

[0183] Die Zellen wurden dann lysiert, indem die Lösung zweimal bei 4000-6000 psi durch einen Hochdruck-homogenisator (Microfluidics, Corp. oder APV Gaulin, Inc.) geschickt wurde. Das Homogenat wird dann mit NaCl-Lösung bis zu einer Endkonzentration von 0,5 M NaCl gemischt, worauf sich eine 15-minütige Zentrifugation bei 7000 \times g anschließt. Das sich ergebende Pellet wird unter Verwendung 0,5 M NaCl, 100 mM Tris, 50 mM EDTA, pH 7,4 erneut gewaschen.

[0184] Die sich ergebenden gewaschenen Einschlusskörperchen werden 2-4 Stunden mit 1,5 M Guanidinhydrochlorid (GuHCl) solubilisiert. Nach der 15-minütigen Zentrifugation bei 7000 \times g wird das Pellet verworfen, und der TNFR-6 α oder -6 β -Polypeptid-enthaltende Überstand wird über Nacht bei 4°C inkubiert, um weitere GuHCl-Extraktion zu erlauben.

[0185] Nach der Hochgeschwindigkeitszentrifugation (30.000 \times g), um unlösliche Partikel zu entfernen, wird das GuHCl-solubilisierte Protein rückgefaltet, indem der GuHCl-Extrakt mit 20 Volumen Puffer, enthaltend 50 mM Natrium, pH 4,5, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA durch starkes Rühren schnell gemischt wird. Die rückgefaltete verdünnte Proteinlösung wird 12 Stunden bei 4°C ohne Mischen vor weiteren Reinigungsschritten aufbewahrt.

[0186] Um die rückgefaltete TNF-Rezeptor-Polypeptidlösung zu klären, wird eine zuvor hergestellte Tangential-Filtrationseinheit, ausgestattet mit einem 0,16 μ m Membranfilter mit geeigneter Oberflächenfläche (z.B. Filtron), äquilibriert mit 40 mM Natriumacetat, pH 6,0, verwendet. Die filtrierte Probe wird auf ein Kationenaustauscherharz (z.B. Poros HS-50, Perseptive Biosystems) geladen. Die Säule wird mit 40 mM Natriumacetat, pH 6,0, gewaschen und mit 250 mM, 500 mM, 1000 mM und 1500 mM NaCl in demselben Puffer schrittweise eluiert. Die Absorption bei 280 nm des Effluents wird ständig überwacht. Fraktionen werden gesammelt und durch SDS-PAGE weiter analysiert.

[0187] Fraktionen, die das TNF-Rezeptor-Polypeptid enthalten, werden dann vereinigt und mit 4 Volumen Wasser gemischt. Die verdünnte Probe wird dann auf einen zuvor hergestellten Satz von hintereinander liegenden Säulen mit starken Anionen-(Poros HQ-50, Perseptive Biosystems) und schwachen Anionen-(Poros CM-20, Perseptive Biosystems) Austauschharzen geladen. Die Säulen werden mit 40 mM Natriumacetat, pH 6,0, äquilibriert. Beide Säulen werden mit 40 mM Natriumacetat, pH 6,0, 200 mM NaCl gewaschen. Die CM-20-Säule wird dann unter Verwendung eines linearen Gradienten mit 10 Säulenvolumen mit einem Bereich von 0,2 M NaCl, 50 mM Natriumacetat, pH 6,0, bis 1 M NaCl, 50 mM Natriumacetat, pH 6,5, eluiert. Fraktionen werden unter konstanter A280-Überwachung des Effluents gesammelt. Fraktionen, die das TNFR-6 α - oder -6 β -Polypeptid enthalten (beispielsweise bestimmt durch 16% SDS-PAGE), werden dann vereinigt.

[0188] Das sich ergebende TNF-Rezeptor-Polypeptid zeigt mehr als 95% Reinheit nach den vorstehenden Rückfaltungs- und Reinigungsschritten. Es werden keine kontaminierenden Hauptbanden bei dem Comma-sie-Blau gefärbtem 16%-igen SDS-PAGE-Gel beobachtet, wenn 5 μ g des gereinigten Proteins aufgetragen werden. Das gereinigte Protein wird auch auf Endotoxin/LPS-Kontaminierung getestet, und der LPS-Gehalt beträgt typischerweise gemäß den LAL-Tests weniger als 0,1 ng/ml.

Beispiel 2: Clonierung und Expression der TNFR-6 α - und -6 β -Proteine in einem Baculovirus-Expressionssystem

[0189] In diesem veranschaulichenden Beispiel wird der Plasmid-Shuttle-Vektor pA2 verwendet, um die clonierte DNA, die das vollständige Protein codiert, einschließlich seiner natürlich assoziierten sekretorischen Signal (Leader)-Sequenz in ein Baculovirus einzubauen, um das reife TNFR-6 α - oder -6 β -Protein unter Verwen-

derung von Standardverfahren zu exprimieren, wie bei Summers et al., A Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Cell Culture Procedures, Texas Agricultural Experimental Station Bulletin Nr. 1555 (1987) beschrieben. Dieser Expressionsvektor enthält den starken Polyhedrin-Promoter des *Autographa californica*-Kernpolyedervirus (AcMNPV), gefolgt von praktischen Restriktionsenzymststellen wie BamHI, XbaI und Asp718. Die Polyadenylierungsstelle des Affen-Virus 40 („SV40“) wird für die effiziente Polyadenylierung verwendet. Für die einfache Selektion des rekombinanten Virus enthält das Plasmid das beta-Galactosidase-Gen aus *E. coli* unter der Kontrolle eines schwachen *Drosophila*-Promoters in derselben Orientierung, gefolgt vom Polyadenylierungssignal des Polyhedrin-Gens. Die eingebauten Gene werden auf beiden Seiten von Virussequenzen für zellvermittelte homologe Rekombination mit viraler Wildtyp-DNA flankiert, um ein lebensfähiges Virus zu erzeugen, das das klonierte Polynucleotid exprimiert.

[0190] Viele andere Baculovirus-Vektoren, wie pAc373, pVL941 und pAcIM1, könnten anstelle des vorstehenden Virus verwendet werden, wie dem Fachmann sogleich bewusst ist, solange das Konstrukt geeignet lokalisierte Signale zur Transkription, Translation, Sekretion und dergleichen, einschließlich eines Signalpeptids in einem AUG, das im Leserahmen liegt, bereitstellt. Derartige Vektoren werden beispielsweise bei Luckow et al., *Virology* 170: 31-39 (1989) beschrieben.

[0191] Die cDNA-Sequenz, die das TNFR-6 α - oder 6 β -Protein mit der vollständigen Länge in einem hinterlegten Clon codiert, einschließlich des AUG-Startcodons und der natürlich assoziierten Leader-Sequenz, dargestellt in SEQ ID NO: 2 oder 4 wird, wird unter Verwendung von Oligonucleotidprimern, die den 5'- und 3'-Sequenzen der Gene entsprechen, amplifiziert. Der 5'-Primer für TNFR-6 α - und -6 β besitzt die Sequenz 5' CGCGGATCCGCCATCATGAGGGCGTGGAGGGGCCAG 3' (SEQ ID NO: 22), die die unterstrichene BamHI-Restriktionsenzymststelle enthält. Alle vorstehend beschriebenen Primer codieren ein effizientes Signal zur Initiation der Translation in eukaryontischen Zellen, wie von Kozak, M., *J. Mol. Biol.* 196: 947-950 (1987) beschrieben. Der 3'-Primer für TNFR-6 α besitzt die Sequenz 5' CGCGGTACCTCTTTCAGTGCAAGTG 3' (SEQ ID NO: 23), die die unterstrichene Asp718-Restriktionsenzymststelle enthält. Der 3'-Primer für TNFR-6 β besitzt die Sequenz 5' CGCGGTACCTCTCAGCTCCTGCAGTG 3' (SEQ ID NO: 24), die die unterstrichene Asp718-Restriktionsenzymststelle enthält.

[0192] Das amplifizierte Fragment wird aus einem 1%-igen Agarosegel unter Verwendung eines im Handel erhältlichen Kits („GeneClean“, BIO 101 Inc., La Jolla, KA) isoliert. Das Fragment wird dann mit dem geeigneten Restriktionsenzym für jeden der verwendeten Primer gespalten, wie vorstehend spezifiziert, und wiederum auf einem 1%-igen Agarosegel isoliert.

[0193] Das Plasmid wird mit denselben Restriktionsenzymen gespalten und kann fakultativ unter Verwendung von Kalbsdarm-Phosphatase unter Verwendung von im Fachgebiet bekannten Verfahren dephosphoryliert werden. Die DNA wird dann aus 1%-igen Agarosegel unter Verwendung eines im Handel erhältlichen Kits („GeneClean“, BIO 101 Inc., La Jolla, KA) gereinigt.

[0194] Das Fragment und das dephosphorylierte Plasmid werden mit T4-DNA-Ligase ligiert. *E. coli* HB 101 oder andere geeignete *E. coli*-Wirtszellen wie XL1-Blue (Statagene Cloning Systems, La Jolla, KA) werden mit dem Ligierungsgemisch transformiert und auf Kulturplatten ausplattiert. Bakterien, die das Plasmid mit dem menschlichen TNFR-Rezeptorgen enthalten, werden identifiziert, indem DNA aus Einzelclonen unter Verwendung der unmittelbar vorstehenden Enzyme gespalten wird und dann das Spaltungsprodukt durch Gelelektrophorese analysiert wird. Die Sequenz des klonierten Fragments wird durch DNA-Sequenzierung bestätigt. Das Plasmid wird hier als pA2-TNFR-6 α oder pA2-TNFR-6 β (zusammen pA2-TNFR) bezeichnet.

[0195] Fünf μ g des Plasmids pA2-TNFR werden gemeinsam mit 1,0 μ g einer im Handel erhältlichen linearisierten Baculovirus-DNA („BaculoGold™-Baculovirus-DNA“, Pharmingen, San Diego, KA) unter Verwendung des Lipofektionsverfahren transfiziert, beschrieben von Felgner et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 7413-7417 (1987). Ein μ g BaculoGold™-Baculovirus-DNA und 5 μ g Plasmid pA2-TNFR werden in einer sterilen Vertiefung einer Mikrotiterplatte, enthaltend 50 μ l serumfreies Grace-Medium (Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD), gemischt. Anschließend werden 10 μ l Lipofektin plus 90 μ l Grace-Medium zugegeben und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wird das Transfektionsgemisch tropfenweise zu Sf9-Insektenzellen (ATCC CRL 1711) gegeben, die in einer 35 mm-Gewebekulturplatte mit 1 ml Grace-Medium ohne Serum angesät werden. Diese Platte wird dann 5 Stunden bei 27°C inkubiert. Die Transfektionslösung wird dann von der Platte entfernt, und 1 ml Grace-Insekten-Medium, ergänzt mit 10% fötalem Kälberserum, wird zugegeben. Die Züchtung wird dann 4 Tage bei 27°C fortgesetzt.

[0196] Nach vier Tagen wird der Überstand gesammelt, und ein Plaquetest wird durchgeführt, wie bei Sum-

mers und Smith, a.a.O, beschrieben. Ein Agarosegel mit „Blue Gal“ (Life Technologies Inc., Gaithersburg) wird verwendet, um die einfache Identifizierung und Isolierung von gal-exprimierenden Clonen zu erlauben, die blaugefärbte Plaques erzeugen. (Eine detaillierte Beschreibung eines „Plaquetests“ dieser Art kann man auch im Benutzerhandbuch für Insektenkultur und Baculovirologie, vertrieben von Life Technologies Inc., Gaithersburg, Seiten 9-10 finden). Nach geeigneter Inkubation werden blaugefärbte Plaques mit der Spitze eines Mikropipettors (z.B. Eppendorf) aufgenommen. Der Agar, der die rekombinanten Viren enthält, wird dann in einem Mikrozentrifugenröhrchen resuspendiert, das 200 µl Grace-Medium enthält, und die Suspension, die das rekombinante Baculovirus enthält, wird verwendet, um Sf9-Zellen zu infizieren, die in 35 mm-Schalen angesät wurden. Vier Tage später werden die Überstände dieser Kulturschalen geerntet, und dann werden sie bei 4°C gelagert.

[0197] Um die Expression des TNF-Rezeptorgens zu überprüfen, werden Sf9-Zellen in Grace-Medium, ergänzt mit 10% hitzeinaktiviertem FBS, gezüchtet. Die Zellen werden mit dem rekombinanten Baculovirus bei einer Multiplizität der Infektion ("MOI") von etwa 2 infiziert. Falls radiomarkierte Proteine gewünscht werden, wird das Medium 6 Stunden später entfernt und mit SF900 II-Medium ohne Methionin und Cystein (erhältlich von Life Technologies Inc., Rockville, MD) ersetzt. Nach 42 Stunden werden 5 µCi ³⁵S-Methionin und 5 µCi ³⁵S-Cystein (erhältlich von Amersham) zugegeben. Die Zellen werden 16 Stunden weiter inkubiert und werden dann durch Zentrifugation geerntet. Die Proteine im Überstand sowie die intrazellulären Proteine werden durch SDS-PAGE analysiert, gefolgt von einer Autoradiographie (falls radiomarkiert).

[0198] Die Mikrosequenzierung der Aminosäuresequenz des Aminoterminus des gereinigten Proteins kann verwendet werden, um die aminoterminal Sequenz der reifen Form des TNF-Rezeptorproteins zu bestimmen.

Beispiel 3: Clonierung und Expression von TNFR-6α und -6β in Säugerzellen

[0199] Ein typischer Säuger-Expressionsvektor enthält das Promotorelement, das die Initiation der Transkription der mRNA, die proteincodierende Sequenz und Signale vermittelt, die für die Termination der Transkription und die Polyadenylierung des Transkripts erforderlich sind. Zusätzliche Elemente schließen Enhancer, Kozak-Sequenzen und dazwischenliegende Sequenzen ein, die von Donor- und Akzeptorstellen zum RNA-Spleißen flankiert werden. Eine hoch effiziente Transkription kann mit den frühen und späten Promotoren von SV40, den langen terminalen Wiederholungssequenzen (LTRs) aus Retroviren, z.B. RSV, HTLV, HIV und dem frühen Promotor des Cytomegalievirus (CMV) erreicht werden. Jedoch können zelluläre Elemente ebenfalls verwendet werden (z.B. der menschliche Aktin-Promotor). Geeignete Expressionsvektoren zur Verwendung der Umsetzung der vorliegenden Erfindung schließen Vektoren wie pSVL und pMSG (Pharmacia, Uppsala, Schweden), pRSVcat (ATCC 37152), pSV2dhfr (ATCC 37146) und pBC12MI (ATCC 67109) ein. Säugerwirtszellen, die verwendet werden könnten, schließen Hela-, 293-, H9- und Jurkat-Zellen, Maus-NIH3T3-Zellen und C127-Zellen, Cos 1-Zellen, Cos 7- und CV1-Zellen, Wachtel-QC1-3-Zellen, Maus L-Zellen und Chinesische Hamsterovarien (CHO)-Zellen ein.

[0200] Alternativ kann das Gen in stabilen Zelllinien exprimiert werden, die das Gen in ein Chromosom integriert enthalten. Die gemeinsame Transfektion mit einem selektierbaren Marker wie dhfr, gpt, Neomycin, Hygromycin erlaubt die Identifizierung und Isolierung der transfizierten Zellen.

[0201] Das transfizierte Gen kann auch amplifiziert werden, um große Mengen des codierten Proteins zu exprimieren. Der DHFR (Dihydrofolatreduktase)-Marker ist nützlich, um Zelllinien zu entwickeln, die mehrere hundert oder sogar tausend Kopien des Gens von Interesse tragen. Ein anderer nützlicher Selektionsmarker ist das Enzym Glutamin-Synthase (GS) (Murphy et al., Biochem J. 227: 277-279 (1991); Bebbington et al., Bio/Technology 10: 169-175 (1992)). Bei Verwendung dieser Marker werden die Säugerzellen in Selektionsmedium gezüchtet, und die Zellen mit der größten Resistenz werden selektiert. Diese Zelllinien enthalten die amplifizierte Gene/das amplifizierte Gen in ein Chromosom integriert. Chinesische Hamsterovarien (CHO)- und NSO-Zellen werden häufig für die Produktion der Proteine verwendet.

[0202] Die Expressionsvektoren pC1 und pC4 enthalten den starken Promotor (LTR) des Rous-Sarkom-Virus (Cullen et al., Molecular and Cellular Biology, 438-447 (März, 1985)) plus ein Fragment des CMV-Enhancers (Koshart et al., Cell 41: 521-530 (1985)). Mehrfachclonierungsstellen, z.B. mit den Restriktionsenzymsschnittstellen BamHI, XbaI und Asp718 erleichtern die Clonierung des Gens von Interesse. Die Vektoren enthalten zusätzlich das 3'-Intron, das Polyadenylierungs- und Terminationssignal des Ratten-Präproinsulins.

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

[0203] Das Expressionsplasmid, pTNFR- α -HA und - β -HA, wird durch Clonierung eines Teils der cDNA, die die reife Form des TNF-Rezeptor-Proteins codiert, in den Expressionsvektor pcDNA1/Amp oder pcDNAIII (der von Invitrogen, Inc. erhalten werden kann) hergestellt.

[0204] Der Expressionsvektor pcDNA1/Amp enthält: (1) einen E. coli-Replikationsursprung, der zur Vermehrung in E. coli und anderen prokaryontischen Zellen effektiv ist; (2) ein Ampicillin-Resistenzgen zur Selektion von plasmidhaltenden prokaryontischen Zellen; (3) einen SV40-Replikationsursprung, zur Vermehrung in eukaryontischen Zellen; (4) einen CMV-Promotor, einen Polylinker, ein SV40-Intron; (5) mehrere Codons, die ein Hämagglutinin-Fragment (d.h. eine „HA“-Markierung, um die Reinigung zu erleichtern) codieren, gefolgt von einem Terminationscodon und Polyadenylierungssignal, die so angeordnet sind, dass eine cDNA in geeigneter Weise unter die Expressionskontrolle des CMV-Promotors gestellt werden kann und funktional an das SV40-Intron und das Polyadenylierungssignal mittels Restriktionsenzymschnittstellen im Polylinker gebunden wird. Die HA-Markierung entspricht einem Epitop, das vom Influenza-Hämagglutinin-Protein stammt, das von Wilson et al., Cell 37: 767 (1984) beschrieben wird. Die Fusion der HA-Markierung an das Zielprotein erlaubt den einfachen Nachweis und die Gewinnung des rekombinanten Proteins mit einem Antikörper, der das HA-Epitop erkennt. pcDNAIII enthält zusätzlich den selektierbaren Neomycin-Marker.

[0205] Ein DNA-Fragment, das das vollständige TNF-Rezeptorpolypeptid codiert, wird in den Polylinkerbereich des Vektors cloniert, so dass die rekombinante Proteinexpression vom CMV-Promotor gelenkt wird. Die Plasmidkonstruktionsstrategie ist wie folgt: Die TNF-Rezeptor-cDNA eines hinterlegten Clons wird unter Verwendung von Primern amplifiziert, die praktische Restriktionsenzymschnittstellen enthalten, genauso wie vorstehend für die Konstruktion von Vektoren zur Expression eines TNF-Rezeptors in E. coli beschrieben. Geeignete Primer können vom Fachmann leicht konstruiert werden.

[0206] Das PCR-amplifizierte DNA-Fragment und der Vektor pcDNA1/Amp werden mit XbaI und EcoRI gespalten und dann ligiert. Das Ligierungsgemisch wird in den E. coli-Stamm SURF (erhältlich von Stratagene Cloning Systems, 11099 North Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037) transformiert, und die transformierte Kultur wird auf Ampicillinmedienplatten ausplattiert, die dann inkubiert werden, um Wachstum auf Ampicillin-resistenten Kolonien zu erlauben. Plasmid-DNA wird aus resistenten Kolonien isoliert und durch Restriktionsanalyse oder andere Mittel auf das Vorliegen des Fragments, das die TNFR- 6α - und - 6β -Polypeptide codiert, untersucht.

[0207] Zur Expression von rekombinanten TNFR- 6α und - 6β werden COS-Zellen mit einem Expressionsvektor, wie vorstehend beschrieben, unter Verwendung von DEAE-DEXTRAN transfiziert, wie beispielsweise bei Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989) beschrieben. Die Zellen werden inkubiert unter Bedingungen zur Expression von TNFR durch den Vektor.

[0208] Die Expression des pTNFR- α -HA- und - 6β -HA-Fusionsproteins wird durch Radiomarkierung und Immunpräzipitation unter Verwendung von Verfahren nachgewiesen, die beispielsweise bei Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, 2. Aufl.; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1988) beschrieben werden. Dazu wurden die Zellen zwei Tage nach der Transfektion durch Inkubation 8 Stunden in ^{35}S -Cystein-enthaltenden Medien markiert. Die Zellen und die Medien werden gesammelt, und die Zellen werden gewaschen und dann mit Detergens-enthaltendem RIPA-Puffer lysiert: 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0,1% SDS, 1% NP-40, 0,5% DOC, 50 mM TRIS, pH 7,5, wie von Wilson et al., vorstehend zitiert, beschrieben. Die Proteine werden aus den Zelllysaten und aus dem Kulturmedium unter Verwendung eines HA-spezifischen monoclonalen Antikörpers präzipitiert. Die präzipitierten Proteine werden dann durch SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert. Im Zelllysat ist ein Expressionsprodukt der erwarteten Größe zu sehen, das nicht in den Negativkontrollen zu sehen ist.

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

[0209] Der Vektor pC4 wird für die Expression der TNFR- 6α - und - 6β -Polypeptide verwendet. Plasmid pC4 ist ein Derivat von Plasmid pSV2-dhfr (ATCC Hinterlegungsnr. 37146). Das Plasmid enthält das Maus-DHFR-Gen unter der Kontrolle des frühen SV40-Promotors. Chinesische Hamster-Ovarien- oder andere Zellen, denen Dihydrofolataktivität fehlt, die mit diesen Plasmiden transfiziert werden, können selektiert werden, indem die Zellen in einem selektierbaren Medium (Alpha ohne MEM, Life Technologies), ergänzt mit dem Chemotherapeutikum Methotrexat gezüchtet werden. Die Amplifizierung der DHFR-Gene in Zellen, die gegen-

über Methotrexat (MTX) resistent sind, wurde gut dokumentiert (vgl. z.B. Alt, F. W., Kellems, R. M., Bertino, J. R. und Schimke, R. T., 1978, J. Biol. Chem. 253: 1357-1370, Hamlin, J. L. und Ma, C. 1990, Biochem. et Biophys. Acta. 1097: 107-143, Page, M. J. und Sydenham, M. A. 1991, Biotechnology 9: 64-68). Zellen, die in ansteigenden MTX-Konzentrationen gezüchtet werden, entwickeln Resistenz gegenüber dem Medikament durch Überproduktion des Zielenzym DHFR als Ergebnis der Amplifizierung des DHFR-Gens. Falls ein zweites Gen an das DHFR-Gen gebunden ist, wird es gewöhnlich gemeinsam amplifiziert und überexprimiert. Es ist im Fachgebiet bekannt, dass dieser Ansatz verwendet werden kann, um Zelllinien zu entwickeln, die mehr als 1.000 Kopien der/des amplifizierten Gens/Gene tragen. Anschließend, wenn das Methotrexat abgezogen wird, werden Zelllinien erhalten, die das amplifizierte Gen in einem oder mehreren Chromosomen der Wirtszellen integriert enthalten.

[0210] Plasmid pC4 enthält zur Expression des Gens von Interesse den starken Promotor der langen terminalen Wiederholungssequenz (LTR) des Rous-Sarkom-Virus (Cullen, et al., Molecular and Cellular Biology, März 1985: 438-447) plus einem Fragment, das aus dem Enhancer des sehr frühen Gens des menschlichen Cytomegalievirus (CMV) isoliert wurde (Boshardt et al., Cell 41: 521-530 (1985)). Stromabwärts des Promotors befinden sich folgende einzelne Restriktionsenzymststellen, die die Integration der Gene zulassen: BamHI, XbaI und Asp718. Hinter diesen Clonierungsstellen enthält das Plasmid die 3'-Intron- und Polyadenylierungsstelle des Ratten-Präproinsulingens. Andere Promotoren mit hoher Effizienz können ebenfalls für die Expression verwendet werden, z.B. der menschliche α -Aktin-Promotor, die frühen oder späten SV40-Promotoren oder die langen terminalen Wiederholungssequenzen aus anderen Retroviren, z.B. HIV und HTLV. Die „Tet-Off- und Tet-On“-Genexpressionsysteme von Clontech und ähnliche Systeme können verwendet werden, um das TNF-Rezeptorpolypeptid auf regulierte Weise in Säugerzellen zu exprimieren (Gossen, M. & Bujard, H. 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:5547-5551). Zur Polyadenylierung der mRNA können andere Signale, z.B. aus dem menschlichen Wachstumshormon oder Globingene ebenfalls verwendet werden. Stabile Zelllinien, die ein Gen von Interesse tragen, das in die Chromosomen integriert ist, können ebenfalls bei der gemeinsamen Transfektion mit selektierbaren Markern wie gpt, G418 oder Hygromycin ausgewählt werden. Es ist vorteilhaft, am Anfang mehr als einen selektierbaren Marker z.B. G418 plus Methotrexat, zu verwenden.

[0211] Das Plasmid pC4 wird mit den Restriktionsenzymen gespalten, die für die spezifischen Primer geeignet sind, die verwendet werden, um den TNF-Rezeptor der Wahl, wie nachstehend dargestellt, zu amplifizieren, und dann wird es unter Verwendung von Kalbsdarmphosphatase durch im Fachgebiet bekannte Verfahren dephosphoryliert. Der Vektor wird dann aus einem 1%-igen Agarosegel isoliert.

[0212] Die DNA-Sequenz, die das TNF-Rezeptorpolypeptid codiert, wird unter Verwendung von Oligonucleotidprimern, die den 5'- und 3'-Sequenzen des gewünschten Anteils des Gens entsprechen, amplifiziert. Der 5'-Primer für TNFR-6 α - und -6 β , der die unterstrichene BamHI-Restriktionsenzymststelle enthält, besitzt die folgende Sequenz: 5' CGCGGATCCGCCATCATGAGGGCGTGGAGGGGCCAG 3' (SEQ ID NO: 22). Der 3'-Primer für TNFR-6 α besitzt die Sequenz 5' CGCGGTACCTCTTTTCAGTGCAAGTG 3' (SEQ ID NO: 23), die die unterstrichene Asp718-Restriktionsenzymststelle enthält. Der 3'-Primer für TNFR-6 β besitzt die Sequenz 5' CGCGGTACCTCCTCAGCTCCTGCAGTG 3' (SEQ ID NO: 24), die die unterstrichene Asp718-Restriktionsenzymststelle enthält.

[0213] Das amplifizierte Fragment wird mit den Endonucleasen gespalten, die an den/der gentechnisch veränderten Restriktionstelle(n) schneiden, und dann wird es wiederum auf einem 1%-igen Agarosegel gereinigt. Das isolierte Fragment und der dephosphorylierte Vektor werden dann mit T4-DNA-Ligase ligiert. E. coli HB 101- oder XL-1 Blue-Zellen werden dann transformiert, und die Bakterien, die das in Plasmid pC4 eingebaute Fragment enthalten, werden unter Verwendung von beispielsweise der Restriktionsenzymanalyse identifiziert.

[0214] Ovarienzellen vom chinesischen Hamster, denen ein aktives DHFR-Gen fehlt, werden zur Transfektion verwendet. Fünf μ g des Expressionsplasmids pC4 werden mit 0,5 μ g Plasmid pSVneo unter Verwendung von Lipofektin gemeinsam transfiziert (Feigner et al., a.a.O.). Das Plasmid pSV2-neo enthält einen dominanten selektierbaren Marker, das neo-Gen aus Tn5, welches ein Enzym codiert, das Resistenz gegenüber einer Gruppe von Antibiotika, einschließlich, G418 verleiht. Die Zellen werden in Alpha ohne MEM, ergänzt mit 1 mg/ml G418 angesät. Nach 2 Tagen werden die Zellen trypsinisiert und in Hybridom-Clonierungsplatten (Greiner, Germany) in Alpha ohne MEM, ergänzt mit 10, 25 oder 50 ng/ml Methotrexat plus 1 mg/ml G418, angesät. Nach etwa 10-14 Tagen werden Einzelclone trypsinisiert und dann in Petrischalen mit 6 Vertiefungen oder 10 ml-Kolben angesät, wobei verschiedene Methotrexat-Konzentrationen (50 nM, 100 nM, 200 nM, 400 nM, 800 nM) verwendet werden. Clone, die bei den höchsten Methotrexat-Konzentrationen wachsen, werden dann auf neue Platten mit 6 Vertiefungen übertragen, die sogar noch höhere Methotrexat-Konzentrationen (1 μ M, 2 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 20 μ M) enthalten. Dasselbe Verfahren wird wiederholt, bis Clone erhalten werden, die bei einer Konzentration

ration von 100-200 µM wachsen. Die Expression des gewünschten Genprodukts wird beispielsweise durch SDS-PAGE- und Western-Blot- oder durch Umkehrphasen-HPLC-Analyse analysiert.

Beispiel 4: Gewebeverteilung der TNF-Rezeptor-mRNA-Expression

[0215] Die Northern-Blot-Analyse wird durchgeführt, um die TNFR-6α- oder -6β-Genexpression in menschlichen Geweben unter Verwendung von Verfahren zu untersuchen, die unter anderen von Sambrook et al., vorstehend zitiert, beschrieben werden. Eine cDNA-Sonde, die die gesamte Nucleotidesequenz eines TNF-Rezeptorproteins (SEQ ID NO: 1 oder 3) enthält, wird mit ³²P unter Verwendung des rediprime™-DNA-Markierungssystems (Amersham Life Science) nach den Anweisungen des Herstellers markiert. Nach der Markierung wird die Sonde unter Verwendung einer CHROMA SPIN-100™-Säule (Clontech Laboratories, Inc.) nach der Vorschriftsnummer PT1200-1 des Herstellers gereinigt. Die gereinigte, markierte Sonde wird dann verwendet, um verschiedene menschliche Gewebe auf TNF-Rezeptor-mRNA zu untersuchen.

[0216] Northern (MTN)-Blots von verschiedenen Geweben, die verschiedene menschliche Gewebe (H) oder menschliche Immunsystemgewebe (IM) enthalten, sind von Clontech erhältlich und werden mit der markierten Probe unter Verwendung von ExpressHyb™-Hybridisierungslösung (Clontech) nach der Vorschriftsnummer PT1190-1 untersucht. Nach der Hybridisierung und dem Waschen werden die Blots aufgelegt und mit einem Film bei -70°C über Nacht exponiert, und die Filme werden nach Standardverfahren entwickelt.

Patentansprüche

1. Polynucleotid, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus

- (a) Polynucleotiden, die mindestens die reife Form des Polypeptids codieren, das die in [Fig. 1](#) oder [Fig. 2A](#) und B gezeigte abgeleitete Aminosäuresequenz hat;
- (b) Polynucleotiden mit der in [Fig. 1](#) oder [Fig. 2A](#) und B gezeigten codierenden Sequenz, die mindestens die reife Form des Polypeptids codieren;
- (c) Polynucleotiden, die das Polypeptid codieren, das die Aminosäuresequenz mindestens der reifen Form des Polypeptids hat, das von der in ATCC 97810 oder 97809 enthaltenen cDNA codiert wird;
- (d) Polynucleotiden, die die codierende Sequenz der cDNA haben, die in ATCC 97810 oder 97809 enthalten ist, die mindestens die reife Form des Polypeptids codiert;
- (e) Polynucleotiden, die ein Fragment, dessen Länge mindestens 30 Aminosäuren beträgt, oder einen Epitop tragenden Teil eines Polypeptids codieren, das von einem beliebigen Polynucleotid aus (a) bis (d) codiert wird;
- (f) Polynucleotiden, die einen Epitop tragenden Teil eines TNFR-Polypeptids codieren, umfassend Aminosäurereste ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus: von Ala-31 bis Thr-46 in [Fig. 1](#), von Phe-57 bis Thr-117 in [Fig. 1](#), von Cys-132 bis Thr-175 in [Fig. 1](#), von Gly-185 bis Thr-194 in [Fig. 1](#), von Val-205 bis Asp-217 in [Fig. 1](#), von Pro-239 bis Leu-264 in [Fig. 1](#) und von Ala-283 bis Pro-298 in [Fig. 1](#); von Ala-31 bis Thr-46 in [Fig. 2A](#) und B, von Phe-57 bis Gln-80 in [Fig. 2A](#) und B, von Glu-86 bis His-106 in [Fig. 2A](#) und B, von Thr-108 bis Phe-119 in [Fig. 2A](#) und B, von His-129 bis Val-138 in [Fig. 2A](#) und B und von Gly-142 bis Pro-166 in [Fig. 2A](#) und B;
- (g) Polynucleotiden, die ein Polypeptid codieren, das in der Lage ist, den Fas-Liganden zu binden, und die zu mindestens 95% identisch sind mit einer Sequenz ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus:

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

- (i) ANMELDER: Human Genome Sciences, Inc. et al.
- (ii) TITEL DER ERFINDUNG: TUMORNEKROSEFAKTOR-REZEPTOREN 6
ALPHA & 6 BETA
- (iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 24
- (iv) KORRESPONDENZADRESSE:
 - (A) ADRESSAT: HUMAN GENOME SCIENCES, INC.,
 - (B) STRASSE: 9410 KEY WEST AVENUE
 - (C) STADT: ROCKVILLE
 - (D) STAAT: MD
 - (E) LAND: USA
 - (F) PLZ: 20850
- (v) COMPUTERLESBARE FORM
 - (A) ART DES MEDIUMS: Diskette
 - (B) COMPUTER: IBM PC kompatibel
 - (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
 - (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30
- (vi) AKTUELLE ANMELDEDATEN
 - (A) ANMELDENUMMER: PCT/US98/00153
 - (B) ANMELDUNGSDATUM: 1. Jan. 98
 - (C) KLASSIFIZIERUNG:
- (viii) ANGABEN für ANWALT/VERTRETER:
 - (A) NAME: BROOKES, ANDERS A
 - (B) REGISTRIERNUMMER: 36,373
 - (C) REFERENZ-/AKTENNUMMER: PF454PCT

(ix) TELEKOMMUNIKATION:

(A) TELEFON: (301) 309-8504

(B) TELEFAX: (301) 309-8512

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 1:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 1077 BASENPAARE

(B) TYP: NUCLEINSÄURE

(C) STRANGFORM: EINZELSTRANG

(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(ii) MOLEKÜLART: DNA (genomisch)

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS

(B) POSITION: 25..924

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG SEQ ID NR: 1:

GCTCTCCCTG CTCCAGCAAG GACC ATG AGG GCG CTG GAG GGG CCA GGC CTG	51
Met Arg Ala Leu Glu Gly Pro Gly Leu	
1 5	
TCG CTG CTG TGC CTG GTG TTG GCG CTG CCT GCC CTG CTG CCG GTG CCG	99
Ser Leu Leu Cys Leu Val Leu Ala Leu Pro Ala Leu Leu Pro Val Pro	
10 15 20 25	
GCT GTA CGC GGA GTG GCA GAA ACA CCC ACC TAC CCC TGG CGG GAC GCA	147
Ala Val Arg Gly Val Ala Glu Thr Pro Thr Tyr Pro Trp Arg Asp Ala	
30 35 40	

GAG ACA GGG GAG CGG CTG GTG TGC GCC CAG TGC CCC CCA GGC ACC TTT Glu Thr Gly Glu Arg Leu Val Cys Ala Gln Cys Pro Pro Gly Thr Phe 45 50 55	195
GTG CAG CGG CCG TGC CGC CGA GAC AGC CCC ACG ACG TGT GGC CCG TGT Val Gln Arg Pro Cys Arg Arg Asp Ser Pro Thr Thr Cys Gly Pro Cys 60 65 70	243
CCA CCG CGC CAC TAC ACG CAG TTC TGG AAC TAC CTG GAG CGC TGC CGC Pro Pro Arg His Tyr Thr Gln Phe Trp Asn Tyr Leu Glu Arg Cys Arg 75 80 85	291
TAC TGC AAC GTC CTC TGC GGG GAG CGT GAG GAG GAG GCA CGG GCT TGC Tyr Cys Asn Val Leu Cys Gly Glu Arg Glu Glu Glu Ala Arg Ala Cys 90 95 100 105	339
CAC GCC ACC CAC AAC CGT GCC TGC CGC TGC CGC ACC GGC TTC TTC GCG His Ala Thr His Asn Arg Ala Cys Arg Cys Arg Thr Gly Phe Phe Ala 110 115 120	387
CAC GCT GGT TTC TGC TTG GAG CAC GCA TCG TGT CCA CCT GGT GCC GGC His Ala Gly Phe Cys Leu Glu His Ala Ser Cys Pro Pro Gly Ala Gly 125 130 135	435
GTG ATT GCC CCG GGC ACC CCC AGC CAG AAC ACG CAG TGC CAG CCG TGC Val Ile Ala Pro Gly Thr Pro Ser Gln Asn Thr Gln Cys Gln Pro Cys 140 145 150	483
CCC CCA GGC ACC TTC TCA GCC AGC AGC TCC AGC TCA GAG CAG TGC CAG Pro Pro Gly Thr Phe Ser Ala Ser Ser Ser Ser Ser Ser Glu Gln Cys Gln 155 160 165	531
CCC CAC CGC AAC TGC ACG GCC CTG GGC CTG GCC CTC AAT GTG CCA GGC Pro His Arg Asn Cys Thr Ala Leu Gly Leu Ala Leu Asn Val Pro Gly 170 175 180 185	579
TCT TCC TCC CAT GAC ACC CTG TGC ACC AGC TGC ACT GGC TTC CCC CTC Ser Ser Ser His Asp Thr Leu Cys Thr Ser Cys Thr Gly Phe Pro Leu 190 195 200	627
AGC ACC AGG GTA CCA GGA GCT GAG GAG TGT GAG CGT GCC GTC ATC GAC Ser Thr Arg Val Pro Gly Ala Glu Glu Cys Glu Arg Ala Val Ile Asp 205 210 215	675
TTT GTG GCT TTC CAG GAC ATC TCC ATC AAG AGG CTG CAG CGG CTG CTG Phe Val Ala Phe Gln Asp Ile Ser Ile Lys Arg Leu Gln Arg Leu Leu 220 225 230	723
CAG GCC CTC GAG GCC CCG GAG GGC TGG GGT CCG ACA CCA AGG GCG GGC Gln Ala Leu Glu Ala Pro Glu Gly Trp Gly Pro Thr Pro Arg Ala Gly 235 240 245	771
CGC GCG GCC TTG CAG CTG AAG CTG CGT CGG CGG CTC ACG GAG CTC CTG Arg Ala Ala Leu Gln Leu Lys Leu Arg Arg Arg Leu Thr Glu Leu Leu 250 255 260 265	819
GGG GCG CAG GAC GGG GCG CTG CTG GTG CGG CTG CTG CAG GCG CTG CGC Gly Ala Gln Asp Gly Ala Leu Leu Val Arg Leu Leu Gln Ala Leu Arg 270 275 280	867
GTG GCC AGG ATG CCC GGG CTG GAG CGG AGC GTC CGT GAG CGC TTC CTC Val Ala Arg Met Pro Gly Leu Glu Arg Ser Val Arg Glu Arg Phe Leu 285 290 295	915
CCT GTG CAC TGATCCTGGC CCCCTCTTAT TTATCTACATA TCCTTGGCAC Pro Val His 300	964
CCCACTTGCA CTGAAAGAGG CTTTTTTTATA AATAGAAGAA ATGAGGTTTC TTAAAGCTTA	1024
TTTTTATAAAA GCTTTTTCAT AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAA	1077

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 2:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 300 AMINOSÄUREN

(B) TYP: AMINOSÄURE

(C) STRANGFORM: EINZELSTRANG

(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(ii) MOLEKÜLART: PROTEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG SEQ ID NR: 2:

```

Met Arg Ala Leu Glu Gly Pro Gly Leu Ser Leu Leu Cys Leu Val Leu
 1           5           10           15
Ala Leu Pro Ala Leu Leu Pro Val Pro Ala Val Arg Gly Val Ala Glu
          20           25           30
Thr Pro Thr Tyr Pro Trp Arg Asp Ala Glu Thr Gly Glu Arg Leu Val
      35           40           45
Cys Ala Gln Cys Pro Pro Gly Thr Phe Val Gln Arg Pro Cys Arg Arg
      50           55           60
Asp Ser Pro Thr Thr Cys Gly Pro Cys Pro Pro Arg His Tyr Thr Gln
 65           70           75           80
Phe Trp Asn Tyr Leu Glu Arg Cys Arg Tyr Cys Asn Val Leu Cys Gly
          85           90           95
Glu Arg Glu Glu Glu Ala Arg Ala Cys His Ala Thr His Asn Arg Ala
      100           105           110
Cys Arg Cys Arg Thr Gly Phe Phe Ala His Ala Gly Phe Cys Leu Glu
      115           120           125
His Ala Ser Cys Pro Pro Gly Ala Gly Val Ile Ala Pro Gly Thr Pro
      130           135           140
Ser Gln Asn Thr Gln Cys Gln Pro Cys Pro Pro Gly Thr Phe Ser Ala
      145           150           155           160
Ser Ser Ser Ser Ser Glu Gln Cys Gln Pro His Arg Asn Cys Thr Ala
          165           170           175
Leu Gly Leu Ala Leu Asn Val Pro Gly Ser Ser Ser His Asp Thr Leu
          180           185           190
Cys Thr Ser Cys Thr Gly Phe Pro Leu Ser Thr Arg Val Pro Gly Ala
      195           200           205
Glu Glu Cys Glu Arg Ala Val Ile Asp Phe Val Ala Phe Gln Asp Ile
      210           215           220
Ser Ile Lys Arg Leu Gln Arg Leu Leu Gln Ala Leu Glu Ala Pro Glu
      225           230           235           240
Gly Trp Gly Pro Thr Pro Arg Ala Gly Arg Ala Ala Leu Gln Leu Lys
          245           250           255
Leu Arg Arg Arg Leu Thr Glu Leu Leu Gly Ala Gln Asp Gly Ala Leu
          260           265           270
Leu Val Arg Leu Leu Gln Ala Leu Arg Val Ala Arg Met Pro Gly Leu
          275           280           285
Glu Arg Ser Val Arg Glu Arg Phe Leu Pro Val His
      290           295           300

```

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 3:

(iii) SEQUENZMERKMALE:

- (A) LÄNGE: 1667 BASENPAARE
 (B) TYP: NUCLEINSÄURE
 (C) STRANGFORM: EINZELSTRANG
 (E) TOPOLOGIE: LINEAR

(iv) MOLEKÜLART: DNA (genomisch)

(ix) MERKMAL:

(C) NAME/SCHLÜSSEL: CDS

(D) POSITION: 73..582

(xii) SEQUENZBESCHREIBUNG SEQ ID NR: 3:

TGGCATGTCG GTCAGGCACA GCAGGGTCCT GTGTCCGCGC TGAGCCGCGC TCTCCCTGCT	60
CCAGCAAGGA CC ATG AGG GCG CTG GAG GGG CCA GGC CTG TCG CTG CTG Met Arg Ala Leu Glu Gly Pro Gly Leu Ser Leu Leu	108
1 5 10	
TGC CTG GTG TTG GCG CTG CCT GCC CTG CTG CCG GTG CCG GCT GTA CGC Cys Leu Val Leu Ala Leu Pro Ala Leu Leu Pro Val Pro Ala Val Arg	156
15 20 25	
GGA GTG GCA GAA ACA CCC ACC TAC CCC TGG CGG GAC GCA GAG ACA GGG Gly Val Ala Glu Thr Pro Thr Pro Trp Arg Asp Ala Glu Thr Gly	204
30 35 40	
GAG CGG CTG GTG TGC GCC CAG TGC CCC CCA GGC ACC TTT GTG CAG CGG Glu Arg Leu Val Cys Ala Gln Cys Pro Pro Gly Thr Phe Val Gln Arg	252
45 50 55 60	
CCG TGC CGC CGA GAC AGC CCC ACG ACG TGT GGC CCG TGT CCA CCG CGC Pro Cys Arg Arg Asp Ser Pro Thr Thr Cys Gly Pro Cys Pro Pro Arg	300
65 70 75	
CAC TAC ACG CAG TTC TGG AAC TAC CTG GAG CGC TGC CGC TAC TGC AAC His Tyr Thr Gln Phe Trp Asn Tyr Leu Glu Arg Cys Arg Tyr Cys Asn	348
80 85 90	
GTC CTC TGC GGG GAG CGT GAG GAG GAG GCA CGG GCT TGC CAC GCC ACC Val Leu Cys Gly Glu Arg Glu Glu Glu Ala Arg Ala Cys His Ala Thr	396
95 100 105	
CAC AAC CGT GCC TGC CGC TGC CGC ACC GGC TTC TTC GCG CAC GCT GGT His Asn Arg Ala Cys Arg Cys Arg Thr Gly Phe Phe Ala His Ala Gly	444
110 115 120	
TTC TGC TTG GAG CAC GCA TCG TGT CCA CCT GGT GCC GGC GTG ATT GCC Phe Cys Leu Glu His Ala Ser Cys Pro Pro Gly Ala Gly Val Ile Ala	492
125 130 135 140	
CCG GGT GAG AGC TGG GCG AGG GGA GGG GCC CCC AGG AGT GGT GGC CGG Pro Gly Glu Ser Trp Ala Arg Gly Gly Ala Pro Arg Ser Gly Gly Arg	540
145 150 155	
AGG TGT GGC AGG GGT CAG GTT GCT GGT CCC AGC CTT GCA CCC Arg Cys Gly Arg Gly Gln Val Ala Gly Pro Ser Leu Ala Pro	582
160 165 170	
TGAGCTAGGA CACCAGTTCC CCTGACCCTG TTCTTCCCTC CTGGCTGCAG GCACCCCCAG	642
CCAGAACACG CAGTGCCAGC CGTGCCCCC AGGCACCTTC TCAGCCAGCA GCTCCAGCTC	702
AGAGCAGTGC CAGCCCCACC GCAACTGCAC GGCCCTGGGC CTGGCCCTCA ATGTGCCAGG	762

CTCTTCCTCC CATGACACCC TGTGCACCAG CTGCACTGGC TTCCCCCTCA GCACCAGGGT	822
ACCAGGTGAG CCAGAGGCCT GAGGGGGCAG CACACTGCAG GCCAGGCCCA CTTGTGCCCT	882
CACTCCTGCC CCTGCACGTG CATCTAGCCT GAGGCATGCC AGCTGGCTCT GGAAGGGGC	942
CACAGTGGAT TTGAGGGGTC AGGGGTCCCT CCACTAGATC CCCACCAAGT CTGCCCTCTC	1002
AGGGGTGGCT GAGAATTTGG ATCTGAGCCA GGGCACAGCC TCCCCTGGAG AGCTCTGGGA	1062
AAGTGGGCAG CAATCTCCTA ACTGCCCGAG GGAAGGTGG CTGGCTCCTC TGACACGGGG	1122
AAACCGAGGC CTGATGGTAA CTCTCCTAAC TGCCTGAGAG GAAGGTGGCT GCCTCCTCTG	1182
ACATGGGGAA ACCGAGGCC AATGTTAACC ACTGTTGAGA AGTCACAGGG GGAAGTGACC	1242
CCCTTAACAT CAAGTCAGGT CCGGTCCATC TGCAGGTCCC AACTCGCCCC TTCCGATGGC	1302
CCAGGAGCCC CAAGCCCTTG CCTGGGCCCC CTGCTCTCTT GCAGCCAAGG TCCGAGTGGC	1362
CGCTCCTGCC CCCTAGGCCT TTGCTCCAGC TCTCTGACCG AAGGCTCCTG CCCCTTCTCC	1422
AGTCCCCATC GTTGCCTGC CCTCTCCAGC ACGGCTCACT GCACAGGGAT TTCTCTCTCC	1482
TGCAAACCCC CCGAGTGGGG CCCAGAAAGC AGGGTACCTG GCAGCCCCCG CCAGTGTGTG	1542
TGGGTGAAAT GATCGGACCG CTGCCTCCCC ACCCCACTGC AGGAGCTGAG GAGTGTGAGC	1602
GTGCCGTCAT CGACTTTGTG GCTTCCAGG ACATCTCCAT CAAGAGGAGC GGCTGCTGCA	1662
GGCCC	1667

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 4:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 170 AMINOSÄUREN

(B) TYP: AMINOSÄURE

(C) STRANGFORM: EINZELSTRANG

(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(ii) MOLEKÜLART: PROTEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG SEQ ID NR: 4:

```

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

```

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 5:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 455 AMINOSÄUREN

(B) TYP: AMINOSÄURE

(C) STRANGFORM: EINZELSTRANG

(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(ii) MOLEKÜLART: PROTEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG SEQ ID NR: 5:


```

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

```

Gly Glu Leu Glu Gly Thr Thr Thr Lys Pro Leu Ala Pro Asn Pro Ser
 260 265 270
 Phe Ser Pro Thr Pro Gly Phe Thr Pro Thr Leu Gly Phe Ser Pro Val
 275 280 285
 Pro Ser Ser Thr Phe Thr Ser Ser Ser Thr Tyr Thr Pro Gly Asp Cys
 290 295 300
 Pro Asn Phe Ala Ala Pro Arg Arg Glu Val Ala Pro Pro Tyr Gln Gly
 305 310 315 320
 Ala Asp Pro Ile Leu Ala Thr Ala Leu Ala Ser Asp Pro Ile Pro Asn
 325 330 335
 Pro Leu Gln Lys Trp Glu Asp Ser Ala His Lys Pro Gln Ser Leu Asp
 340 345 350
 Thr Asp Asp Pro Ala Thr Leu Tyr Ala Val Val Glu Asn Val Pro Pro
 355 360 365
 Leu Arg Trp Lys Glu Phe Val Arg Arg Leu Gly Leu Ser Asp His Glu
 370 375 380
 Ile Asp Arg Leu Glu Leu Gln Asn Gly Arg Cys Leu Arg Glu Ala Gln
 385 390 395 400
 Tyr Ser Met Leu Ala Thr Trp Arg Arg Arg Thr Pro Arg Arg Glu Ala
 405 410 415
 Thr Leu Glu Leu Leu Gly Arg Val Leu Arg Asp Met Asp Leu Leu Gly
 420 425 430
 Cys Leu Glu Asp Ile Glu Glu Ala Leu Cys Gly Pro Ala Ala Leu Pro
 435 440 445
 Pro Ala Pro Ser Leu Leu Arg
 450 455

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 6:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 461 AMINOSÄUREN

(B) TYP: AMINOSÄURE

(C) STRANGFORM: EINZELSTRANG

(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(ii) MOLEKÜLART: PROTEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG SEQ ID NR: 6:

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

```

Gly Ser Arg Cys Ser Ser Asp Gln Val Glu Thr Gln Ala Cys Thr Arg
      100      105      110
Glu Gln Asn Arg Ile Cys Thr Cys Arg Pro Gly Trp Tyr Cys Ala Leu
      115      120      125
Ser Lys Gln Glu Gly Cys Arg Leu Cys Ala Pro Leu Arg Lys Cys Arg
      130      135      140
Pro Gly Phe Gly Val Ala Arg Pro Gly Thr Glu Thr Ser Asp Val Val
      145      150      155      160
Cys Lys Pro Cys Ala Pro Gly Thr Phe Ser Asn Thr Thr Ser Ser Thr
      165      170      175
Asp Ile Cys Arg Pro His Gln Ile Cys Asn Val Val Ala Ile Pro Gly
      180      185      190
Asn Ala Ser Arg Asp Ala Val Cys Thr Ser Thr Ser Pro Thr Arg Ser
      195      200      205
Met Ala Pro Gly Ala Val His Leu Pro Gln Pro Val Ser Thr Arg Ser
      210      215      220
Gln His Thr Gln Pro Thr Pro Glu Pro Ser Thr Ala Pro Ser Thr Ser
      225      230      235      240
Phe Leu Leu Pro Met Gly Pro Ser Pro Pro Ala Glu Gly Ser Thr Gly
      245      250      255
Asp Phe Ala Leu Pro Val Gly Leu Ile Val Gly Val Thr Ala Leu Gly
      260      265      270
Leu Leu Ile Ile Gly Val Val Asn Cys Val Ile Met Thr Gln Val Lys
      275      280      285
Lys Lys Pro Leu Cys Leu Gln Arg Glu Ala Lys Val Pro His Leu Pro
      290      295      300
Ala Asp Lys Ala Arg Gly Thr Gln Gly Pro Glu Gln Gln His Leu Leu
      305      310      315      320
Ile Thr Ala Pro Ser Ser Ser Ser Ser Leu Glu Ser Ser Ala Ser
      325      330      335
Ala Leu Asp Arg Arg Ala Pro Thr Arg Asn Gln Pro Gln Ala Pro Gly
      340      345      350
Val Glu Ala Ser Gly Ala Gly Glu Ala Arg Ala Ser Thr Gly Ser Ser
      355      360      365
Asp Ser Ser Pro Gly Gly His Gly Thr Gln Val Asn Val Thr Cys Ile
      370      375      380
Val Asn Val Cys Ser Ser Ser Asp His Ser Ser Gln Cys Ser Ser Gln
      385      390      395      400
Ala Ser Ser Thr Met Gly Asp Thr Asp Ser Ser Pro Ser Glu Ser Pro
      405      410      415
Lys Asp Glu Gln Val Pro Phe Ser Lys Glu Glu Cys Ala Phe Arg Ser
      420      425      430
Gln Leu Glu Thr Pro Glu Thr Leu Leu Gly Ser Thr Glu Glu Lys Pro
      435      440      445
Leu Pro Leu Gly Val Pro Asp Ala Gly Met Lys Pro Ser
      450      455      460

```

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 7:

(i) SEQUENZMERKMALE:

- (A) LÄNGE: 427 AMINOSÄUREN
 (B) TYP: AMINOSÄURE
 (C) STRANGFORM: EINZELSTRANG
 (D) TOPOLOGIE: LINEAR

(ii) MOLEKÜLART: PROTEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG SEQ ID NR: 7:

```

Met Gly Ala Gly Ala Thr Gly Arg Ala Met Asp Gly Pro Arg Leu Leu
1      5      10      15
Leu Leu Leu Leu Leu Gly Val Ser Leu Gly Gly Ala Lys Glu Ala Cys
20      25      30
Pro Thr Gly Leu Tyr Thr His Ser Gly Glu Cys Cys Lys Ala Cys Asn
35      40      45
Leu Gly Glu Gly Val Ala Gln Pro Cys Gly Ala Asn Gln Thr Val Cys
50      55      60
Glu Pro Cys Leu Asp Ser Val Thr Phe Ser Asp Val Val Ser Ala Thr
65      70      75      80
Glu Pro Cys Lys Pro Cys Thr Glu Cys Val Gly Leu Gln Ser Met Ser
85      90      95
Ala Pro Cys Val Glu Ala Asp Asp Ala Val Cys Arg Cys Ala Tyr Gly
100     105     110
Tyr Tyr Gln Asp Glu Thr Thr Gly Arg Cys Glu Ala Cys Arg Val Cys
115     120     125
Glu Ala Gly Ser Gly Leu Val Phe Ser Cys Gln Asp Lys Gln Asn Thr
130     135     140
Val Cys Glu Glu Cys Pro Asp Gly Thr Tyr Ser Asp Glu Ala Asn His
145     150     155     160
Val Asp Pro Cys Leu Pro Cys Thr Val Cys Glu Asp Thr Glu Arg Gln
165     170     175
Leu Arg Glu Cys Thr Arg Trp Ala Asp Ala Glu Cys Glu Glu Ile Pro
180     185     190
Gly Arg Trp Ile Thr Arg Ser Thr Pro Pro Glu Gly Ser Asp Ser Thr
195     200     205
Ala Pro Ser Thr Gln Glu Pro Glu Ala Pro Pro Glu Gln Asp Leu Ile
210     215     220
Ala Ser Thr Val Ala Gly Val Val Thr Thr Val Met Gly Ser Ser Gln
225     230     235     240
Pro Val Val Thr Arg Gly Thr Thr Asp Asn Leu Ile Pro Val Tyr Cys
245     250     255
Ser Ile Leu Ala Ala Val Val Val Gly Leu Val Ala Tyr Ile Ala Phe
260     265     270
Lys Arg Trp Asn Ser Cys Lys Gln Asn Lys Gln Gly Ala Asn Ser Arg
275     280     285
Pro Val Asn Gln Thr Pro Pro Pro Glu Gly Glu Lys Leu His Ser Asp
290     295     300

```

```

Ser Gly Ile Ser Val Asp Ser Gln Ser Leu His Asp Gln Gln Pro His
305          310          315          320

Thr Gln Thr Ala Ser Gly Gln Ala Leu Lys Gly Asp Gly Gly Leu Tyr
          325          330          335

Ser Ser Leu Pro Pro Ala Lys Arg Glu Glu Val Glu Lys Leu Leu Asn
          340          345          350

Gly Ser Ala Gly Asp Thr Trp Arg His Leu Ala Gly Glu Leu Gly Tyr
          355          360          365

Gln Pro Glu His Ile Asp Ser Phe Thr His Glu Ala Cys Pro Val Arg
          370          375          380

Ala Leu Leu Ala Ser Trp Ala Thr Gln Asp Ser Ala Thr Leu Asp Ala
385          390          395          400

Leu Leu Ala Ala Leu Arg Arg Ile Gln Arg Ala Asp Leu Val Glu Ser
          405          410          415

Leu Cys Ser Glu Ser Thr Ala Thr Ser Pro Val
          420          425

```

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 8:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 415 AMINOSÄUREN

(B) TYP: AMINOSÄURE

(C) STRANGFORM: EINZELSTRANG

(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(ii) MOLEKÜLART: PROTEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG SEQ ID NR: 8:

```

Met Arg Leu Pro Arg Ala Ser Ser Pro Cys Gly Leu Ala Trp Gly Pro
1          5          10          15

Leu Leu Leu Gly Leu Ser Gly Leu Leu Val Ala Ser Gln Pro Gln Leu
          20          25          30

Val Pro Pro Tyr Arg Ile Glu Asn Gln Thr Cys Trp Asp Gln Asp Lys
          35          40          45

Glu Tyr Tyr Glu Pro Met His Asp Val Cys Cys Ser Arg Cys Pro Pro
          50          55          60

Gly Glu Phe Val Phe Ala Val Cys Ser Arg Ser Gln Asp Thr Val Cys
65          70          75          80

Lys Thr Cys Pro His Asn Ser Tyr Asn Glu His Trp Asn His Leu Ser
          85          90          95

Thr Cys Gln Leu Cys Arg Pro Cys Asp Ile Val Leu Gly Phe Glu Glu
          100          105          110

Val Ala Pro Cys Thr Ser Asp Arg Lys Ala Glu Cys Arg Cys Gln Pro
          115          120          125

Gly Met Ser Cys Val Tyr Leu Asp Asn Glu Cys Val His Cys Glu Glu
          130          135          140

Glu Arg Leu Val Leu Cys Gln Pro Gly Thr Glu Ala Glu Val Thr Asp
          145          150          155          160

Glu Ile Met Asp Thr Asp Val Asn Cys Val Pro Cys Lys Pro Gly His

```

165								170				175			
Phe	Gln	Asn	Thr	Ser	Ser	Pro	Arg	Ala	Arg	Cys	Gln	Pro	His	Thr	Arg
			180					185					190		
Cys	Glu	Ile	Gln	Gly	Leu	Val	Glu	Ala	Ala	Pro	Gly	Thr	Ser	Tyr	Ser
		195					200					205			
Asp	Thr	Ile	Cys	Lys	Asn	Pro	Pro	Glu	Pro	Gly	Ala	Met	Leu	Leu	Leu
	210					215					220				
Ala	Ile	Leu	Leu	Ser	Leu	Val	Leu	Phe	Leu	Leu	Phe	Thr	Thr	Val	Leu
225					230					235					240
Ala	Cys	Ala	Trp	Met	Arg	His	Pro	Ser	Leu	Cys	Arg	Lys	Leu	Gly	Thr
				245					250					255	
Leu	Leu	Lys	Arg	His	Pro	Glu	Gly	Glu	Glu	Ser	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala
			260					265					270		
Pro	Arg	Ala	Asp	Pro	His	Phe	Pro	Asp	Leu	Ala	Glu	Pro	Leu	Leu	Pro
		275					280					285			
Met	Ser	Gly	Asp	Leu	Ser	Pro	Ser	Pro	Ala	Gly	Pro	Pro	Thr	Ala	Pro
	290					295					300				
Ser	Leu	Glu	Glu	Val	Val	Leu	Gln	Gln	Gln	Ser	Pro	Leu	Val	Gln	Ala
305					310					315					320
Arg	Glu	Leu	Glu	Ala	Glu	Pro	Gly	Glu	His	Gly	Gln	Val	Ala	His	Gly
				325				330						335	
Ala	Asn	Gly	Ile	His	Val	Thr	Gly	Gly	Ser	Val	Thr	Val	Thr	Gly	Asn
			340					345					350		
Ile	Tyr	Ile	Tyr	Asn	Gly	Pro	Val	Leu	Gly	Gly	Thr	Arg	Gly	Pro	Gly
		355				360						365			
Asp	Pro	Pro	Ala	Pro	Pro	Glu	Pro	Pro	Tyr	Pro	Thr	Pro	Glu	Glu	Gly
	370					375					380				
Ala	Pro	Gly	Pro	Ser	Glu	Leu	Ser	Thr	Pro	Tyr	Gln	Glu	Asp	Gly	Lys
385					390					395					400
Ala	Trp	His	Leu	Ala	Glu	Thr	Glu	Thr	Leu	Gly	Cys	Gln	Asp	Leu	
				405				410						415	

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 9:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 335 AMINOSÄUREN

(B) TYP: AMINOSÄURE

(C) STRANGFORM: EINZELSTRANG

(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(ii) MOLEKÜLART: PROTEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG SEQ ID NR: 9:


```

Met Leu Gly Ile Trp Thr Leu Leu Pro Leu Val Leu Thr Ser Val Ala
1      5      10      15
Arg Leu Ser Ser Lys Ser Val Asn Ala Gln Val Thr Asp Ile Asn Ser
20      25      30
Lys Gly Leu Glu Leu Arg Lys Thr Val Thr Thr Val Glu Thr Gln Asn
35      40      45

Leu Glu Gly Leu His His Asp Gly Gln Phe Cys His Lys Pro Cys Pro
50      55      60
Pro Gly Glu Arg Lys Ala Arg Asp Cys Thr Val Asn Gly Asp Glu Pro
65      70      75      80
Asp Cys Val Pro Cys Gln Glu Gly Lys Glu Tyr Thr Asp Lys Ala His
85      90      95
Phe Ser Ser Lys Cys Arg Arg Cys Arg Leu Cys Asp Glu Gly His Gly
100     105     110
Leu Glu Val Glu Ile Asn Cys Thr Arg Thr Gln Asn Thr Lys Cys Arg
115     120     125
Cys Lys Pro Asn Phe Phe Cys Asn Ser Thr Val Cys Glu His Cys Asp
130     135     140
Pro Cys Thr Lys Cys Glu His Gly Ile Ile Lys Glu Cys Thr Leu Thr
145     150     155     160
Ser Asn Thr Lys Cys Lys Glu Glu Gly Ser Arg Ser Asn Leu Gly Trp
165     170     175
Leu Cys Leu Leu Leu Leu Pro Ile Pro Leu Ile Val Trp Val Lys Arg
180     185     190
Lys Glu Val Gln Lys Thr Cys Arg Lys His Arg Lys Glu Asn Gln Gly
195     200     205
Ser His Glu Ser Pro Thr Leu Asn Pro Glu Thr Val Ala Ile Asn Leu
210     215     220
Ser Asp Val Asp Leu Ser Lys Tyr Ile Thr Thr Ile Ala Gly Val Met
225     230     235     240
Thr Leu Ser Gln Val Lys Gly Phe Val Arg Lys Asn Gly Val Asn Glu
245     250     255
Ala Lys Ile Asp Glu Ile Lys Asn Asp Asn Val Gln Asp Thr Ala Glu
260     265     270
Gln Lys Val Gln Leu Leu Arg Asn Trp His Gln Leu His Gly Lys Lys
275     280     285
Glu Ala Tyr Asp Thr Leu Ile Lys Asp Leu Lys Lys Ala Asn Leu Cys
290     295     300
Thr Leu Ala Glu Lys Ile Gln Thr Ile Ile Leu Lys Asp Ile Thr Ser
305     310     315     320
Asp Ser Glu Asn Ser Asn Phe Arg Asn Glu Ile Gln Ser Leu Val
325     330     335

```

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 10:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 260 AMINOSÄUREN

(B) TYP: AMINOSÄURE

(C) STRANGFORM: EINZELSTRANG

(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(ii) MOLEKÜLART: PROTEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG SEQ ID NR: 10:

```

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

```

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 11:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 595 AMINOSÄUREN

(B) TYP: AMINOSÄURE

(C) STRANGFORM: EINZELSTRANG

(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(ii) MOLEKÜLART: PROTEIN

(x) SEQUENZBESCHREIBUNG SEQ ID NR: 11:

Met	Arg	Val	Leu	Leu	Ala	Ala	Leu	Gly	Leu	Leu	Phe	Leu	Gly	Ala	Leu
1			5					10					15		
Arg	Ala	Phe	Pro	Gln	Asp	Arg	Pro	Phe	Glu	Asp	Thr	Cys	His	Gly	Asn
			20					25					30		

Pro Ser His Tyr Tyr Asp Lys Ala Val Arg Arg Cys Cys Tyr Arg Cys
 35 40 45
 Pro Met Gly Leu Phe Pro Thr Gln Gln Cys Pro Gln Arg Pro Thr Asp
 50 55 60
 Cys Arg Lys Gln Cys Glu Pro Asp Tyr Tyr Leu Asp Glu Ala Asp Arg
 65 70 75 80
 Cys Thr Ala Cys Val Thr Cys Ser Arg Asp Asp Leu Val Glu Lys Thr
 85 90 95
 Pro Cys Ala Trp Asn Ser Ser Arg Val Cys Glu Cys Arg Pro Gly Met
 100 105 110
 Phe Cys Ser Thr Ser Ala Val Asn Ser Cys Ala Arg Cys Phe Phe His
 115 120 125
 Ser Val Cys Pro Ala Gly Met Ile Val Lys Phe Pro Gly Thr Ala Gln
 130 135 140
 Lys Asn Thr Val Cys Glu Pro Ala Ser Pro Gly Val Ser Pro Ala Cys
 145 150 155 160
 Ala Ser Pro Glu Asn Cys Lys Glu Pro Ser Ser Gly Thr Ile Pro Gln
 165 170 175
 Ala Lys Pro Thr Pro Val Ser Pro Ala Thr Ser Ser Ala Ser Thr Met
 180 185 190
 Pro Val Arg Gly Gly Thr Arg Leu Ala Gln Glu Ala Ala Ser Lys Leu
 195 200 205
 Thr Arg Ala Pro Asp Ser Pro Ser Ser Val Gly Arg Pro Ser Ser Asp
 210 215 220
 Pro Gly Leu Ser Pro Thr Gln Pro Cys Pro Glu Gly Ser Gly Asp Cys
 225 230 235 240
 Arg Lys Gln Cys Glu Pro Asp Tyr Tyr Leu Asp Glu Ala Gly Arg Cys
 245 250 255
 Thr Ala Cys Val Ser Cys Ser Arg Asp Asp Leu Val Glu Lys Thr Pro
 260 265 270
 Cys Ala Trp Asn Ser Ser Arg Thr Cys Glu Cys Arg Pro Gly Met Ile
 275 280 285
 Cys Ala Thr Ser Ala Thr Asn Ser Cys Ala Arg Cys Val Pro Tyr Pro
 290 295 300
 Ile Cys Ala Ala Glu Thr Val Thr Lys Pro Gln Asp Met Ala Glu Lys
 305 310 315 320
 Asp Thr Thr Phe Glu Ala Pro Pro Leu Gly Thr Gln Pro Asp Cys Asn
 325 330 335
 Pro Thr Pro Glu Asn Gly Glu Ala Pro Ala Ser Thr Ser Pro Thr Gln
 340 345 350
 Ser Leu Leu Val Asp Ser Gln Ala Ser Lys Thr Leu Pro Ile Pro Thr
 355 360 365
 Ser Ala Pro Val Ala Leu Ser Ser Thr Gly Lys Pro Val Leu Asp Ala
 370 375 380
 Gly Pro Val Leu Phe Trp Val Ile Leu Val Leu Val Val Val Gly
 385 390 395 400
 Ser Ser Ala Phe Leu Leu Cys His Arg Arg Ala Cys Arg Lys Arg Ile

405								410				415			
Arg	Gln	Lys	Leu	His	Leu	Cys	Tyr	Pro	Val	Gln	Thr	Ser	Gln	Pro	Lys
420								425				430			
Leu	Glu	Leu	Val	Asp	Ser	Arg	Pro	Arg	Arg	Ser	Ser	Thr	Gln	Leu	Arg
435								440				445			
Ser	Gly	Ala	Ser	Val	Thr	Glu	Pro	Val	Ala	Glu	Glu	Arg	Gly	Leu	Met
450								455				460			
Ser	Gln	Pro	Leu	Met	Glu	Thr	Cys	His	Ser	Val	Gly	Ala	Ala	Tyr	Leu
465								470				475			
Glu	Ser	Leu	Pro	Leu	Gln	Asp	Ala	Ser	Pro	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser	Ser
485								490				495			
Pro	Arg	Asp	Leu	Pro	Glu	Pro	Arg	Val	Ser	Thr	Glu	His	Thr	Asn	Asn
500								505				510			
Lys	Ile	Glu	Lys	Ile	Tyr	Ile	Met	Lys	Ala	Asp	Thr	Val	Ile	Val	Gly
515								520				525			
Thr	Val	Lys	Ala	Glu	Leu	Pro	Glu	Gly	Arg	Gly	Leu	Ala	Gly	Pro	Ala
530								535				540			
Glu	Pro	Glu	Leu	Glu	Glu	Glu	Leu	Glu	Ala	Asp	His	Thr	Pro	His	Tyr
545								550				555			
Pro	Glu	Gln	Glu	Thr	Glu	Pro	Pro	Leu	Gly	Ser	Cys	Ser	Asp	Val	Met
565								570				575			
Leu	Ser	Val	Glu	Glu	Gly	Lys	Glu	Asp	Pro	Leu	Pro	Thr	Ala	Ala	
580								585				590			
Ser	Gly	Lys													
595															

- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 12:
 - (i) SEQUENZMERKMALE:
 - (A) LÄNGE: 277 AMINOSÄUREN
 - (B) TYP: AMINOSÄURE
 - (C) STRANGFORM: EINZELSTRANG
 - (D) TOPOLOGIE: LINEAR
 - (ii) MOLEKÜLART: PROTEIN
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG SEQ ID NR: 12:

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

Ser Glu Thr Asp Thr Ile Cys Thr Cys Glu Glu Gly Trp His Cys Thr
 100 105 110
 Ser Glu Ala Cys Glu Ser Cys Val Leu His Arg Ser Cys Ser Pro Gly
 115 120 125
 Phe Gly Val Lys Gln Ile Ala Thr Gly Val Ser Asp Thr Ile Cys Glu
 130 135 140
 Pro Cys Pro Val Gly Phe Phe Ser Asn Val Ser Ser Ala Phe Glu Lys
 145 150 155 160
 Cys His Pro Trp Thr Ser Cys Glu Thr Lys Asp Leu Val Val Gln Gln
 165 170 175
 Ala Gly Thr Asn Lys Thr Asp Val Val Cys Gly Pro Gln Asp Arg Leu
 180 185 190
 Arg Ala Leu Val Val Ile Pro Ile Ile Phe Gly Ile Leu Phe Ala Ile
 195 200 205
 Leu Leu Val Leu Val Phe Ile Lys Lys Val Ala Lys Lys Pro Thr Asn
 210 215 220
 Lys Ala Pro His Pro Lys Gln Glu Pro Gln Glu Ile Asn Phe Pro Asp
 225 230 235 240
 Asp Leu Pro Gly Ser Asn Thr Ala Ala Pro Val Gln Glu Thr Leu His
 245 250 255
 Gly Cys Gln Pro Val Thr Gln Glu Asp Gly Lys Glu Ser Arg Ile Ser
 260 265 270
 Val Gln Glu Arg Gln
 275

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 13:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 255 AMINOSÄUREN

(B) TYP: AMINOSÄURE

(C) STRANGFORM: EINZELSTRANG

(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(ii) MOLEKÜLART: PROTEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG SEQ ID NR: 13:

```

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

```

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 14:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 277 AMINOSÄUREN

(B) TYP: AMINOSÄURE

(C) STRANGFORM: EINZELSTRANG

(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(ii) MOLEKÜLART: PROTEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG SEQ ID NR: 14:


```

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

```

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 15:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 349 AMINOSÄUREN

(B) TYP: AMINOSÄURE

(C) STRANGFORM: EINZELSTRANG

(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(ii) MOLEKÜLART: PROTEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG SEQ ID NR: 15:

```

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

Thr Val Ser Ser Ala Asp Lys Cys Glu Pro Val Pro Asn Asn Thr Phe
165     170     175
Asn Tyr Ile Asp Val Glu Ile Thr Leu Tyr Pro Val Asn Asp Thr Ser
180     185     190
Cys Thr Arg Thr Thr Thr Thr Gly Leu Ser Glu Ser Ile Leu Thr Ser
195     200     205
Glu Leu Thr Ile Thr Met Asn His Thr Asp Cys Asn Pro Val Phe Arg
210     215     220
Glu Glu Tyr Phe Ser Val Leu Asn Lys Val Ala Thr Ser Gly Phe Phe
225     230     235     240
Thr Gly Glu Asn Arg Tyr Gln Asn Ile Ser Lys Val Cys Thr Leu Asn
245     250     255
Phe Glu Ile Lys Cys Asn Asn Lys Gly Ser Ser Phe Lys Gln Leu Thr
260     265     270
Lys Ala Lys Asn Asp Asp Gly Met Met Ser His Ser Glu Thr Val Thr
275     280     285
Leu Ala Gly Asp Cys Leu Ser Ser Val Asp Ile Tyr Ile Leu Tyr Ser
290     295     300
Asn Thr Asn Ala Gln Asp Tyr Glu Thr Asp Thr Ile Ser Tyr Arg Val
305     310     315     320
Gly Asn Val Leu Asp Asp Asp Ser His Met Pro Gly Ser Cys Asn Ile
325     330     335
His Lys Pro Ile Thr Asn Ser Lys Pro Thr Arg Phe Leu
340     345

```

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 16:

(i) SEQUENZMERKMALE:

- (A) LÄNGE: 355 AMINOSÄUREN
- (B) TYP: AMINOSÄURE
- (C) STRANGFORM: EINZELSTRANG
- (D) TOPOLOGIE: LINEAR

(ii) MOLEKÜLART: PROTEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG SEQ ID NR: 16:

```

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

Gly Tyr Tyr Cys Phe Leu Lys Gly Ser Ser Gly Cys Lys Ala Cys Val
115     120     125
Ser Gln Thr Lys Cys Gly Ile Gly Tyr Gly Val Ser Gly His Thr Pro
130     135     140
Thr Gly Asp Val Val Cys Ser Pro Cys Gly Leu Gly Thr Tyr Ser His
145     150     155     160
Thr Val Ser Ser Val Asp Lys Cys Glu Pro Val Pro Ser Asn Thr Phe
165     170     175
Asn Tyr Ile Asp Val Glu Ile Asn Leu Tyr Pro Val Asn Asp Thr Ser
180     185     190
Cys Thr Arg Thr Thr Thr Thr Gly Leu Ser Glu Ser Ile Ser Thr Ser
195     200     205
Glu Leu Thr Ile Thr Met Asn His Lys Asp Cys Asp Pro Val Phe Arg
210     215     220
Asn Gly Tyr Phe Ser Val Leu Asn Glu Val Ala Thr Ser Gly Phe Phe
225     230     235     240
Thr Gly Gln Asn Arg Tyr Gln Asn Ile Ser Lys Val Cys Thr Leu Asn
245     250     255
Phe Glu Ile Lys Cys Asn Asn Lys Asp Ser Tyr Ser Ser Ser Lys Gln
260     265     270
Leu Thr Lys Thr Lys Asn Asp Asp Asp Ser Ile Met Pro His Ser Glu
275     280     285
Ser Val Thr Leu Val Gly Asp Cys Leu Ser Ser Val Asp Ile Tyr Ile
290     295     300
Leu Tyr Ser Asn Thr Asn Thr Gln Asp Tyr Glu Thr Asp Thr Ile Ser
305     310     315     320
Tyr His Val Gly Asn Val Leu Asp Val Asp Ser His Met Pro Gly Arg
325     330     335
Cys Asp Thr His Lys Leu Ile Thr Asn Ser Asn Ser Gln Tyr Pro Thr
340     345     350
His Phe Leu
355

```

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 17:

(i) SEQUENZMERKMALE:

- (A) LÄNGE: 497 BASENPAARE
- (B) TYP: NUCLEINSÄURE
- (C) STRANGFORM: EINZELSTRANG
- (D) TOPOLOGIE: LINEAR

(iii) MOLEKÜLART: DNA (genomisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG SEQ ID NR: 17:

```

GGCACGAGCA GGGTCCTGTN TCCGCCCTGA GCCGCGCTCT NCCTGCTCCA GCAAGGACCA      60
TGAGGGCGCT GGAGGGGCCA GGCTGTGCGC TGCTGTCCTG GTGTGCGC TGCTGCCCT      120
GCTGCCGGTG CCGGCTGTAC GCGGAGTGGC AGAAACACNN ACNTACCCCT GGCGGGACGN      180
AGAGACAGGG GAGCGGCTGG TGTNTNCCCA NTGCCCCAG GCACCTTTNT GCAGCGGCCG      240
TGCCGNCGAG ACAGCCCCAC GACGTGTGGC CCGTNTCCAC CGCGCCACTA CACGCATTCT      300
GGAACACCT GGAGCGCTGN CCTTACTNCA ACGTCCTCTG CGGGGAGCGT NAGGAGGAGG      360
CACGGGTTTN CCACGNCAAC CACAACCGNG GNTTACCGTN GCCGNACCGG TTTCTTCGNG      420
GCAAGTTGGT TTTTNNTTTG GAGNAAGGAT TCGTGTNCA ATTNATTGAC GNAGTGATTN      480
NNCNCGGGAA ACTNAAA      497

```

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 18:

(i) SEQUENZMERKMALE:

- (A) LÄNGE: 191 BASENPAARE
- (B) TYP: NUCLEINSÄURE
- (C) STRANGFORM: EINZELSTRANG
- (D) TOPOLOGIE: LINEAR

(iv) MOLEKÜLART: DNA (genomisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG SEQ ID NR: 18:

```

CGCAACTGCA CGGCCCTGGG ACTGGCCCTC AATGTGCCAG GNTCTTCCTC CCATGACACC      60
CTGTGCACCA GCTGCACTGG CTTCCCCCTC AGCACCAGGG TACCANGAGC TGAGGAGTGT      120
GAGCNTGCCG TCATCGACTT TTTGGCTTTC CAGGACATCT CCATCAAGAGG CTGCAGCGG      180
CTGCTCANGC C
191

```

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 19:

(i) SEQUENZMERKMALE:

- (A) LÄNGE: 26 BASENPAARE
- (B) TYP: NUCLEINSÄURE
- (C) STRANGFORM: EINZELSTRANG

(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(ii) MOLEKÜLART: DNA (genomisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG SEQ ID NR: 19:

CGCCCATGGC AGAAACACCC ACCTAC

26

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 20:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 26 BASENPAARE

(B) TYP: NUCLEINSÄURE

(C) STRANGFORM: EINZELSTRANG

(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(ii) MOLEKÜLART: DNA (genomisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG SEQ ID NR: 20:

CGCAAGCTTC TCTTTCAGTG CAAGTG

26

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 21:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 28 BASENPAARE

(B) TYP: NUCLEINSÄURE

(C) STRANGFORM: EINZELSTRANG

(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(ii) MOLEKÜLART: DNA (genomisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG SEQ ID NR: 21:

CGCAAGCTTC TCCTCAGCTC CTGCAGTG

28

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 22:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 36 BASENPAARE

(B) TYP: NUCLEINSÄURE

(C) STRANGFORM: EINZELSTRANG

(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(ii) MOLEKÜLART: DNA (genomisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG SEQ ID NR: 22:

CGCGGATCCG CCATCATGAG GCGGTGGAGG GGCCAG

36

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 23:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 26 BASENPAARE

(B) TYP: NUCLEINSÄURE

(C) STRANGFORM: EINZELSTRANG

(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(ii) MOLEKÜLART: DNA (genomisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG SEQ ID NR: 23:

CGCGGTACCC TCTTTCAGTG CAAGTG

26

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 24:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 28 BASENPAARE

(B) TYP: NUCLEINSÄURE

(C) STRANGFORM: EINZELSTRANG

(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(ii) MOLEKÜLART: DNA (genomisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG SEQ ID NR: 24:

CGCGGTACCC TCCTCAGCTC CTGCAGTG

28

(i) einer Nucleotidsequenz, die ein Polypeptid codiert, das die Aminosäuresequenzreste m-300 von [Fig. 1](#) umfasst, wobei m eine ganze Zahl im Bereich von 1 bis 49 ist;

(ii) einer Nucleotidsequenz, die ein Polypeptid codiert, das die Aminosäuresequenzreste n-170 von [Fig. 2A](#) und B umfasst, wobei n eine ganze Zahl im Bereich von 1 bis 49 ist;

(iii) einer Nucleotidsequenz, die ein Polypeptid codiert, das die Aminosäuresequenzreste 1-y von [Fig. 1](#) um-

fasst, wobei y eine ganze Zahl im Bereich von 193 bis 300 ist;

(iv) einer Nucleotidsequenz, die ein Polypeptid codiert, das die Aminosäuresequenzreste 1-z von [Fig. 2A](#) und B umfasst, wobei z eine ganze Zahl im Bereich von 132 bis 170 ist; und

(v) einer Nucleotidsequenz, die ein Polypeptid codiert, das die Aminosäuresequenz codiert, die aus den Resten m-y von [Fig. 1](#) oder n-z von [Fig. 2A](#) und B besteht, wobei m, n, y und z in (i), (ii), (iii) und (iv) vorstehend definiert sind;

(h) Polynucleotiden, die ein Polypeptid codieren, das in der Lage ist, den Fas-Liganden zu binden, und die eine Nucleotidsequenz umfassen, die zu mindestens 95% identisch ist mit einer Sequenz ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus:

(i) einer Nucleotidsequenz, die ein Polypeptid codiert, das aus einem Teil einer vollständigen TNFR-Aminosäuresequenz besteht, die von dem in ATCC-Hinterlegungsnr. 97810 oder 97809 enthaltenen cDNA-Clon codiert wird, wobei der Teil 1 bis etwa 48 Aminosäuren von dem Aminoende der vollständigen Aminosäuresequenz ausschließt, die von dem in ATCC-Hinterlegungsnr. 97810 oder 97809 enthaltenen cDNA-Clon codiert wird;

(ii) einer Nucleotidsequenz, die ein Polypeptid codiert, das aus einem Teil einer vollständigen TNFR-Aminosäuresequenz besteht, die von dem in ATCC-Hinterlegungsnr. 97810 oder 97809 enthaltenen cDNA-Clon codiert wird, wobei der Teil 1 bis etwa 107 und 1 bis etwa 38 Aminosäuren des Carboxyendes der vollständigen Aminosäuresequenz ausschließt, die von dem in ATCC-Hinterlegungsnr. 97810 bzw. 97809 enthaltenen cDNA-Clon codiert wird; und

(iii) einer Nucleotidsequenz, die ein Polypeptid codiert, das aus einem Teil einer vollständigen TNFR-Aminosäuresequenz besteht, die von dem in ATCC-Hinterlegungsnr. 97810 oder 97809 enthaltenen cDNA-Clon codiert wird, wobei der Teil eine Kombination beliebiger Aminoende- und Carboxyende-Deletionen für die entsprechenden Clone in (i) und (ii) vorstehend einschließt;

(i) Polynucleotiden, die ein Polypeptid codieren, das in der Lage ist, den Fas-Liganden zu binden, und die eine Aminosäuresequenz umfassen, die zu mindestens 95% identisch ist mit

(i) einem Polypeptid, das von einem beliebigen Polynucleotid aus (a) bis (e) codiert wird; oder

(ii) der Aminosäuresequenz eines reifen TNFR-Polypeptids, das die Aminosäuresequenz an Positionen 31-300 in [Fig. 1](#) oder 31-170 in [Fig. 2A](#) und B hat, oder das von dem in ATCC-Hinterlegungsnr. 97810 oder 97809 enthaltenen cDNA-Clon codiert wird; oder

(iii) der Aminosäuresequenz einer löslichen extrazellulären Domäne eines TNFR-Polypeptids, das die Aminosäuresequenz an Positionen 31-283 in [Fig. 1](#) oder 31-166 in [Fig. 2A](#) und B hat, oder das von dem in ATCC-Hinterlegungsnr. 97810 oder 97809 enthaltenen cDNA-Clon codiert wird;

(j) Polynucleotiden, die mindestens 15 Nucleotide eines beliebigen Polynucleotids aus (a) bis (i) umfassen und die ein TNFR-Polypeptid codieren;

(k) Polynucleotiden, dessen komplementärer Strang unter stringenten Hybridisierungsbedingungen mit einem beliebigen Polynucleotid aus (a) bis (j) hybridisiert und unter stringenten Hybridisierungsbedingungen nicht mit einem Polynucleotid hybridisiert, das eine Nucleotidsequenz hat, die nur aus A-Resten oder nur aus T-Resten besteht; und

(l) Polynucleotiden, die die lösliche extrazelluläre Domäne eines Polypeptids codieren, das von einem beliebigen Polynucleotid aus (a) bis (j) codiert wird;

oder der komplementäre Strang eines solchen Polynucleotids.

2. Polynucleotid nach Anspruch 1, das eine DNA ist.

3. Polynucleotid nach Anspruch 1, das eine RNA ist.

4. Polynucleotid nach einem der Ansprüche 1 bis 3, das ferner eine heterologe Polynucleotidsequenz umfasst.

5. Polynucleotid nach Anspruch 4, wobei die heterologe Polynucleotidsequenz ein Polypeptid codiert.

6. Polynucleotid nach Anspruch 5, wobei das Polypeptid eine konstante Immunoglobulin-Domäne oder ein Teil davon ist.

7. Polynucleotid nach Anspruch 6, wobei die Domäne eine Fc-Domäne ist.

8. Verfahren zur Herstellung eines rekombinanten Vektors, umfassend das Einführen eines Polynucleotids nach einem der Ansprüche 1 bis 7 in einen Vektor.

9. Vektor, der das Polynucleotid nach einem der Ansprüche 1 bis 7 enthält, oder Vektor, der nach dem Verfahren von Anspruch 8 hergestellt wird.

10. Vektor nach Anspruch 9, bei dem das Polynucleotid funktionell mit Expressionskontrollsequenzen verknüpft ist, die die Expression in prokaryontischen oder eukaryontischen Wirtszellen erlauben.
11. Verfahren zur Herstellung einer rekombinanten Wirtszelle, umfassend das Einführen des Vektors nach Anspruch 9 oder 10 in eine Wirtszelle.
12. Wirtszelle, die mit dem Polynucleotid nach einem der Ansprüche 1 bis 7 oder mit dem Vektor nach Anspruch 9 oder 10 gentechnisch verändert ist oder nach dem Verfahren von Anspruch 11 hergestellt wird.
13. Verfahren zur Herstellung eines TNFR-Polypeptids, das umfasst: Züchten der Wirtszelle nach Anspruch 12 und Gewinnen des Polypeptids, das von dem Polynucleotid codiert wird, aus der Kultur.
14. Polypeptid, das die von einem Polynucleotid nach einem der Ansprüche 1 bis 7 codierte Aminosäuresequenz umfasst.
15. Antikörper, der an das Polypeptid nach Anspruch 14 spezifisch bindet.
16. Antikörper nach Anspruch 15, der polyclonal, monoclonal oder humansiert ist.
17. Antikörperfragment, das an das Polypeptid nach Anspruch 14 spezifisch bindet, das ein Fab- oder F(ab)₂-Fragment ist.
18. Antikörperfragment nach Anspruch 17, das humansiert ist.
19. Arzneimittel, umfassend das Polynucleotid nach einem der Ansprüche 1 bis 3, das Polypeptid nach Anspruch 14 oder eine DNA, die das Polypeptid codiert und in vivo exprimieren kann.
20. Arzneimittel nach Anspruch 19, das gegebenenfalls einen pharmazeutisch verträglichen Träger umfasst.
21. Diagnostische Zusammensetzung, die das Polynucleotid nach einem der Ansprüche 1 bis 3 oder den Antikörper oder das Antikörperfragment nach einem der Ansprüche 15 bis 18 umfasst.
22. In vitro-Verfahren zum Nachweis einer das Immunsystem betreffenden Störung oder von Krebs, umfassend: Messen der Konzentration des Polynucleotids nach einem der Ansprüche 1 bis 3 oder des Polypeptids nach Anspruch 14 im Immunsystemgewebe oder in anderen Zellen oder in Körperflüssigkeit eines Individuums; und Vergleichen dieser gemessenen Konzentration mit einer Standardkonzentration, die im Immunsystemgewebe oder in anderen Zellen oder in Körperflüssigkeit von Individuen beobachtet wird, die keine solche Störung haben; wobei ein Anstieg oder eine Abnahme der Polynucleotid- oder Polypeptidkonzentration im Vergleich zu der Standardkonzentration ein Indikator für eine das Immunsystem betreffende Störung oder Krebs ist.

Es folgen 22 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

GCTCTCCCTGCTCCAGCAAGGACCATGAGGGCGCTGGAGGGGCCAGGCCTGTCGCTGCTG
M R A L E G P G L S L L
 TGCCTGGTGTGGCGCTGCCTGCCCTGCTGCCGGTGCCGGCTGTACGCGGAGTGGCAGAA
C L V L A L P A L L P V P A V R G V A E
 ACACCCACCTACCCCTGGCGGGACGCAGAGACAGGGGAGCGGCTGGTGTGCGCCAGTGC
 T P T Y P W R D A E T G E R L V C A Q C
 CCCCCAGGCACCTTTGTGCAGCGGCCGTGCCGCCGAGACAGCCCCACGACGTGTGGCCCG
 P P G T F V Q R P C R R D S P T T C G P
 TGTCCACCGCGCCACTACACGCAGTTCTGGAACCTACCTGGAGCGCTGCCGCTACTGCAAC
 C P P R H Y T Q F W N Y L E R C R Y C N
 GTCCTCTGCGGGGAGCGTGAGGAGGAGGCACGGGCTTGCCACGCCACCCACAACCGTGCC
 V L C G E R E E E A R A C H A T H N R A
 TGCCGCTGCCGCACCGGCTTCTTCGCGCACGCTGGTTTCTGCTTGAGCAGCATCGTGT
 C R C R T G F F A H A G F C L E H A S C
 CCACCTGGTGCCGGCGTGATTGCCCGGGCACCCCCAGCCAGAACACGCAGTGCCAGCCG
 P P G A G V I A P G T P S Q N T Q C Q P
 TGCCCCCAGGCACCTTCTCAGCCAGCAGCTCCAGCTCAGAGCAGTGCCAGCCCCACCGC
 C P P G T F S A S S S S S E Q C Q P H R
 AACTGCACGGCCCTGGGCCTGGCCCTCAATGTGCCAGGCTCTTCCTCCCATGACACCTG
 N C T A L G L A L N V P G S S S H D T L
 TGCACCAGCTGCACTGGCTTCCCCCTCAGCACCAGGGTACCAGGAGCTGAGGAGTGTGAG
 C T S C T G F P L S T R V P G A E E C E
 CGTGCCGTCATCGACTTTGTGGCTTTCCAGGACATCTCCATCAAGAGGCTGCAGCGGCTG
 R A V I D F V A F Q D I S I K R L Q R L
 CTGCAGGCCCTCGAGGCCCCGGAGGGCTGGGCTCCGACACCAAGGGCGGGCCGCGGGCC
 L Q A L E A P E G W G P T P R A G R A A
 TTGCAGCTGAAGCTGCGTCGGCGGCTCACGGAGCTCCTGGGGGCGCAGGACGGGGCGCTG
 L Q L K L R R R L T E L L G A Q D G A L
 CTGGTGCGGCTGCTGCAGGCGCTGCGCGTGGCCAGGATGCCCGGGCTGGAGCGGAGCGTC
 L V R L L Q A L R V A R M P G L E R S V
 CGTGAGCGCTTCTCCCTGTGCACTGATCCTGGCCCCCTTTATTTATTCTACATCCTTG
 R E R F L P V H *
 GCACCCCACTTGCACTGAAAGAGGCTTTTTTTTAAATAGAAGAAATGAGGTTTCTTAAAG
 CTTATTTTTATAAAGCTTTTTCATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

FIG. 1

TGGCATGTCTGGTCAGGCACAGCAGGGTCCTGTGTCCGCGCTGAGCCGCGCTCTCCCTGCT
 CCAGCAAGGACCATGAGGGCGCTGGAGGGGCCAGGCCTGTGCTGCTGTGCCTGGTGTG
M R A L E G P G L S L L C L V L
 GCGCTGCCTGCCCTGCTGCCGGTGCCGGCTGTACGCGGAGTGGCAGAAACACCCACCTAC
A L P A L L P V P A V R G V A E T P T Y
 CCCTGGCGGGACGCAGAGACAGGGGAGCGGCTGGTGTGCGCCAGTGCCCCCAGGCACC
 P W R D A E T G E R L V C A Q C P P G T
 TTTGTGCAGCGGCCGTGCCGCCGAGACAGCCCCACGACGTGTGGCCCGTGTCCACCGCGC
 F V Q R P C R R D S P T T C G P C P P R
 CACTACACGCAGTTCTGGAACCTGGAGCGCTGCCGCTACTGCAACGTCTCTGCGGG
 H Y T Q F W N Y L E R C R Y C N V L C G
 GAGCGTGAGGAGGAGGCACGGGCTTGCCACGCCACCCACAACCGTGCCTGCCGCTGCCGC
 E R E E E A R A C H A T H N R A C R C R
 ACCGGCTTCTTCGCGCACGCTGGTTTCTGCTTGAGACACGCATCGTGTCCACCTGGTGCC
 T G F F A H A G F C L E H A S C P P G A
 GGCGTGATTGCCCCGGGTGAGAGCTGGGCGAGGGGAGGGGCCCCAGGAGTGGTGGCCGG
 G V I A P G E S W A R G G A P R S G G R
 AGGTGTGGCAGGGGTGAGTTGCTGGTCCCAGCCTTGACCCCTGAGCTAGGACACCAAGTT
 R C G R G Q V A G P S L A P *
 CCCCTGACCCTGTTCTTCCCTCCTGGCTGCAGGCACCCCCAGCCAGAACACGCAGTGCCA
 GCCGTGCCCCCAGGCACCTTCTCAGCCAGCAGCTCCAGCTCAGAGCAGTGCCAGCCCCA
 CCGCAACTGCACGGCCCTGGGCCTGGCCCTCAATGTGCCAGGCTCTTCCTCCCATGACAC
 CCTGTGCACCAGCTGCACTGGCTTCCCCCTCAGCACCAGGGTACCAGGTGAGCCAGAGGC
 CTGAGGGGGCAGCACACTGCAGGCCAGGCCCACTTGTGCCCTCACTCCTGCCCTGCACG
 TGCATCTAGCCTGAGGCATGCCAGCTGGCTCTGGGAAGGGGCCACAGTGGATTTGAGGGG
 TCAGGGGTCCCTCCACTAGATCCCCACCAAGTCTGCCCTCTCAGGGGTGGCTGAGAATTT
 GGATCTGAGCCAGGGCACAGCCTCCCCTGGAGAGCTCTGGGAAAGTGGGCAGCAATCTCC

FIG.2A

TAACTGCCCGAGGGGAAGGTGGCTGGCTCCTCTGACACGGGGAAACCGAGGCCTGATGGT
 AACTCTCCTAACTGCCTGAGAGGAAGGTGGCTGCCTCCTCTGACATGGGGAAACCGAGGC
 CCAATGTTAACCCTGTTGAGAAGTCACAGGGGAAGTGACCCCTTAACATCAAGTCAG
 · GTCCGGTCCATCTGCAGGTCCCACTCGCCCTTCCGATGGCCAGGAGCCCCAAGCCCT
 TGCCTGGGCCCCCTTGCTCTTGACGCAAGGTCCGAGTGGCCGCTCCTGCCCCCTAGGC
 CTTTGCTCCAGCTCTCTGACCGAAGGCTCCTGCCCCCTTCTCCAGTCCCCATCGTTGCACT
 GCCCTCTCCAGCACGGCTCACTGCACAGGGATTCTCTCTCTGCAAACCCCCGAGTGG
 GGCCCAGAAAGCAGGGTACCTGGCAGCCCCCGCCAGTGTGTGTGGGTGAAATGATCGGAC
 CGCTGCCTCCCCACCCCACTGCAGGAGCTGAGGAGTGTGAGCGTGCCGTCATCGACTTTG
 TGGCTTCCAGGACATCTCCATCAAGAGGAGCGGCTGCTGCAGGCCC

FIG.2B

I	M	-	G	L	S	T	V	P	D	L	L	P	L	V	L	E	L	V	G	I	Y	P	S	G	V	I	G	L	V	P	H	L	G	D	R	E	-	TNFR1						
I	M	A	P	V	A	V	A	A	L	A	V	G	L	E	L	W	A	A	H	A	L	P	A	Q	V	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	TNFR2						
I	M	G	A	G	A	T	G	R	A	M	D	-	-	-	G	P	R	L	L	L	L	L	G	V	S	L	G	G	A	K	E	-	A	C	P	-	-	NGFR						
I	M	-	R	L	P	R	-	A	S	S	P	C	G	L	A	V	G	P	L	L	L	L	G	L	S	G	L	L	V	A	S	O	P	Q	L	V	P	P	-	L16R				
I	M	L	G	T	V	T	-	-	-	-	-	-	-	-	L	P	L	V	L	T	S	V	-	A	R	L	S	S	K	S	V	N	A	Q	V	T	D	I	N	S	K	G	L	FAS
I	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	W	L	C	V	L	G	T	L	V	G	L	S	-	A	T	P	A	P	K	S	C	P	-	-	CD27					
I	M	R	V	L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	L	A	L	G	L	F	L	G	A	L	R	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	CD30			
I	M	V	R	L	P	L	-	-	-	-	-	-	-	-	C	V	L	-	W	G	L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	CD40			
I	M	G	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S	C	Y	N	I	V	A	T	L	L	V	C	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4-1BB		
I	M	C	V	G	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	G	P	C	A	A	L	L	L	G	L	G	L	S	T	V	T	G	L	H	C	V	-	-	-	-	Ox40			
I	M	K	S	V	-	L	Y	E	Y	I	-	-	-	-	L	F	L	S	C	I	I	I	N	G	R	D	A	A	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	VC22		
I	M	K	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	L	L	L	S	C	I	I	I	N	S	D	I	T	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	CRMB		
I	M	R	A	L	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	P	G	L	S	L	L	C	L	V	L	A	L	P	A	L	L	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	TNFR-6a		
I	M	R	A	L	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	P	G	L	S	L	L	C	L	V	L	A	L	P	A	L	L	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	TNFR-6b	

FIG.3A

39	-	-	K	R	D	S	V	C	P	Q	G	K	Y	I	H	-	-	P	Q	N	S	I	C	C	T	K	C	H	K	G	T	Y	L	Y	N	D	C	P	G	T	N	F	R	I			
32	-	-	Y	-	A	P	E	P	G	S	T	C	R	L	R	E	Y	Y	D	Q	T	A	Q	M	C	C	S	K	C	S	P	G	Q	H	A	K	V	F	C	-	-	T	N	F	R	2	
34	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	L	Y	T	H	S	G	E	-	C	C	K	A	C	N	L	G	E	G	V	A	Q	P	C	G	A	N	G	F	R	
36	-	-	Y	R	I	E	N	Q	T	C	W	D	Q	D	K	E	Y	Y	E	P	M	H	D	V	C	C	S	R	C	P	P	G	E	F	V	F	A	V	C	-	-	L	T	b	R		
36	E	L	R	K	T	V	T	T	I	-	-	-	-	-	-	E	G	L	H	H	D	G	Q	F	C	H	K	P	C	P	P	G	E	R	K	A	R	D	C	T	V	F	A	S			
29	-	-	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	H	Y	V	A	Q	G	K	L	C	C	Q	M	C	E	P	G	T	F	L	V	K	D	C	D	Q	C	D	27			
22	-	-	D	R	P	F	E	D	T	C	H	G	N	P	S	H	Y	Y	D	K	A	V	R	R	C	C	Y	R	C	P	M	G	L	F	P	T	Q	Q	C	P	Q	C	D	30			
24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	K	Q	Y	L	-	-	I	N	S	Q	C	C	S	L	C	Q	P	G	Q	K	L	V	S	D	C	-	-	C	D	40		
21	-	-	T	R	S	L	Q	D	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	S	N	C	P	A	G	T	F	-	-	-	-	-	-	-	-	4-1	B		
33	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D	T	Y	P	S	N	D	R	-	C	C	H	E	C	R	P	G	N	G	M	V	S	R	C	S	R	O	X	40			
28	-	-	P	N	G	K	C	K	D	T	E	Y	K	R	H	N	-	-	-	-	-	-	-	L	C	C	L	S	C	P	P	G	T	Y	A	S	R	L	C	D	S	V	C	22			
26	-	-	S	N	G	K	C	K	D	N	E	Y	K	R	H	-	-	-	-	-	-	-	-	L	C	C	L	S	C	P	P	G	T	Y	A	S	R	L	C	D	S	C	R	M	B		
27	-	-	V	R	G	V	A	E	T	P	T	Y	P	W	R	D	A	-	E	T	G	E	R	L	V	C	A	Q	C	P	P	G	T	F	V	Q	R	P	C	-	-	T	N	F	R	-	6a
27	-	-	V	R	G	V	A	E	T	P	T	Y	P	W	R	D	A	-	E	T	G	E	R	L	V	C	A	Q	C	P	P	G	T	F	V	Q	R	P	C	-	-	T	N	F	R	-	6b

FIG.3B

75	P	-	G	Q	D	T	D	C	R	-	E	C	-	E	S	G	S	-	F	T	A	S	E	N	H	L	R	H	C	L	S	C	S	K	-	C	R	K	E	M	G	TNFR1
68	T	K	T	S	D	I	V	C	-	D	S	C	-	E	D	S	T	Y	T	Q	L	W	N	W	V	P	E	C	L	S	C	G	S	R	-	C	S	S	D	Q	V	TNFR2
60	N	Q	-	T	-	V	-	C	-	E	P	C	-	L	D	S	V	I	F	S	D	V	V	S	A	T	E	P	C	K	P	C	T	-	E	C	V	G	L	Q	S	NGFR
73	S	R	S	Q	D	T	V	C	-	K	T	C	-	P	H	N	S	Y	N	E	H	W	N	H	L	S	T	C	Q	L	C	R	P	-	C	D	I	V	L	G	LTbR	
76	H	-	G	D	E	P	D	C	-	V	-	P	C	-	E	G	K	E	Y	T	D	K	A	H	F	S	S	K	C	R	R	C	R	L	-	C	D	E	G	H	G	FAS
56	H	R	K	A	-	A	Q	C	-	D	-	P	C	-	P	G	V	S	F	S	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	CD27
61	R	-	-	-	P	T	D	C	-	C	R	K	Q	C	-	E	P	D	Y	Y	L	D	E	A	D	R	C	T	A	C	V	I	C	S	-	-	-	-	R	D	D	CD30
52	T	E	F	T	E	T	E	C	-	L	P	C	-	C	G	E	S	E	F	L	D	I	W	N	R	E	T	H	C	H	Q	H	K	Y	-	C	D	P	N	L	G	CD40
40	N	R	N	Q	-	-	I	C	-	S	P	C	-	C	P	P	N	S	F	S	S	A	-	G	G	Q	R	T	C	D	I	C	R	-	Q	C	-	-	-	K	G	4-1BB
59	S	Q	N	T	-	V	-	Q	C	-	P	C	-	G	P	G	F	Y	N	D	V	V	S	S	K	-	P	C	K	P	C	T	-	W	C	-	N	L	R	S	OX40	
60	K	T	N	T	-	-	Q	C	-	T	P	C	-	G	S	G	T	F	T	G	R	N	N	H	L	P	A	C	L	S	C	N	G	R	C	N	S	N	Q	V	VC22	
58	K	T	N	T	N	T	Q	C	-	T	P	C	-	A	S	D	T	F	T	S	R	N	N	H	L	P	A	C	L	S	C	N	G	R	C	D	S	N	Q	V	CRMB	
63	R	R	D	S	P	T	T	C	-	G	P	C	-	P	P	R	H	Y	T	Q	F	W	N	Y	L	E	R	C	R	Y	C	N	V	L	C	G	E	R	E	E	TNFR-6a	
63	R	R	D	S	P	T	T	C	-	G	P	C	-	P	P	R	H	Y	T	Q	F	W	N	Y	L	E	R	C	R	Y	C	N	V	L	C	G	E	R	E	E	TNFR-6b	

FIG.3C

111	-	Q	V	E	I	S	S	C	T	V	D	R	D	I	V	C	G	C	R	K	N	Q	Y	R	H	Y	V	S	E	N	L	F	Q	C	F	N	C	S	L	-	TNFR1			
106	-	-	-	E	T	Q	A	-	-	C	T	R	E	Q	N	R	I	C	T	C	R	P	G	W	Y	C	A	L	S	K	Q	E	-	G	C	R	L	C	A	P	L	-	TNFR2	
95	M	S	A	P	-	-	-	-	-	C	V	E	A	D	D	A	V	C	R	C	A	Y	G	Y	-	Q	D	E	T	T	G	-	-	R	C	E	A	C	R	V	-	NGFR		
110	F	E	E	V	A	P	-	-	-	C	T	S	D	R	K	A	E	C	R	C	Q	P	G	M	S	C	V	Y	L	D	N	E	-	-	C	V	H	C	E	E	-	LTbR		
113	L	E	V	E	I	N	-	-	-	C	T	R	T	Q	N	T	K	C	R	C	K	P	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	F	F	C	N	-	-	-	FAS	
74	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D	H	H	T	R	P	-	-	H	C	E	S	C	R	H	-	CD27		
92	L	V	E	K	T	P	-	-	-	C	A	V	N	S	S	R	V	C	E	C	R	P	G	M	F	C	S	T	S	A	V	N	-	-	S	C	A	R	C	F	H	-	CD30	
89	L	R	V	Q	Q	K	-	-	-	G	T	S	E	T	D	T	I	C	T	C	E	E	G	W	H	C	T	-	-	S	E	A	-	-	-	C	E	S	C	V	L	H	-	CD40
71	V	F	R	T	R	K	E	-	-	C	S	S	T	S	H	A	E	C	D	C	T	P	G	F	H	C	L	-	-	-	G	A	-	-	G	C	S	M	C	E	Q	D	4-1BB	
92	G	S	E	R	K	Q	L	-	-	C	T	A	T	Q	D	T	V	C	R	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	OX40
96	-	-	-	E	T	R	S	-	-	C	N	T	T	H	H	R	I	C	E	C	S	P	G	Y	Y	C	L	L	K	G	S	-	-	G	C	K	A	C	V	S	Q	-	VC22	
96	-	-	-	E	T	R	S	-	-	C	N	T	T	H	N	R	I	C	D	C	A	P	G	Y	Y	C	F	L	K	G	S	-	-	G	C	K	A	C	V	S	Q	-	CRMB	
101	-	-	-	E	A	R	A	-	-	C	H	A	T	H	N	R	A	C	R	C	R	T	G	F	F	-	-	-	A	H	A	-	-	G	-	-	F	C	L	E	H	-	TNFR-6a	
101	-	-	-	E	A	R	A	-	-	C	H	A	T	H	N	R	A	C	R	C	R	T	G	F	F	-	-	-	A	H	A	-	-	G	-	-	F	C	L	E	H	-	TNFR-6b	

FIG.3D



FIG. 3F

FIG. 3G

FIG. 3H

FIG. 31

264	T	K	P	L	A	P	N	P	S	F	S	P	T	P	G	F	T	P	T	L	G	F	S	P	V	P	S	S	T	F	T	S	S	T	Y	T	P	G	D	TNFR1			
294	-	-	-	-	-	-	-	-	L	Q	R	E	A	K	V	P	H	L	P	A	-	D	K	A	R	G	T	Q	G	P	E	Q	Q	H	L	L	I	T	A	-	TNFR2		
281	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N	K	Q	G	A	N	S	R	P	V	-	N	Q	T	P	P	P	E	G	E	K	L	H	S	D	S	G	I	S	V	D	NGFR		
262	-	-	-	-	-	-	-	-	-	P	E	G	E	S	P	P	C	P	A	-	P	R	A	D	P	H	F	F	D	L	A	E	P	L	-	-	-	-	-	L1bR			
212	-	-	-	-	-	-	-	-	S	P	T	L	N	P	E	-	-	T	V	A	I	N	L	S	D	V	D	L	S	K	Y	I	T	-	-	-	-	-	-	FAS			
169	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	L P CD27					
322	T	T	F	E	A	P	P	L	G	T	Q	P	D	C	N	P	T	P	E	-	N	G	E	A	P	A	S	T	S	P	T	Q	S	L	L	V	D	S	Q	A	CD30		
222	-	-	-	-	-	-	-	-	P	T	N	K	A	P	H	P	K	Q	E	-	P	Q	-	E	I	N	F	P	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	CD40		
193	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4-1BB			
198	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	S	Q	G	P	S	T	R	P	V	-	E	-	-	-	V	P	G	G	R	A	V	A	A	I	L	G	L	-	-	-	OX40		
255	-	-	-	-	-	-	-	-	L	N	F	E	I	K	C	N	N	-	-	-	-	-	-	-	K	G	S	-	S	F	K	Q	-	-	-	L	T	K	-	-	-	VC22	
255	-	-	-	-	-	-	-	-	L	N	F	E	I	K	C	N	N	-	-	-	-	-	-	-	K	D	S	Y	S	S	S	K	Q	-	-	-	L	T	K	-	-	-	CRMB
229	-	-	-	-	-	-	-	-	L	Q	R	L	L	Q	A	L	E	A	P	E	-	G	W	-	-	G	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	TNFR-6a	
143	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	E	-	S	W	A	R	G	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	TNFR-6b

FIG.3J

FIG. 3K

FIG. 3L

365	N	V	P	P	L	R	W	K	E	F	V	R	R	L	G	L	S	D	H	E	I	D	R	L	E	L	Q	N	G	R	C	L	R	E	A	Q	Y	S	M	L	TNFR1	
372	P	G	G	H	G	T	Q	V	N	V	T	C	I	V	N	V	C	S	S	S	D	H	-	S	S	Q	C	S	S	Q	A	S	S	T	M	G	D	T	-	-	TNFR2	
355	A	G	D	T	W	R	H	L	A	G	E	L	G	Y	Q	P	E	H	I	D	S	F	T	H	E	A	C	P	V	R	-	-	-	-	-	-	A	L	L	NGFR		
327	P	G	E	H	G	Q	V	A	H	G	A	N	G	I	H	V	T	G	S	V	T	V	T	G	N	I	Y	I	Y	N	G	P	V	L	G	G	T	-	-	LT6R		
246	-	-	-	-	-	-	-	-	K	G	F	V	R	K	N	G	V	N	E	A	K	I	D	E	I	K	N	D	N	V	Q	D	T	A	E	Q	K	V	Q	L	L	FAS
214	-	-	-	-	-	R	R	K	Y	R	S	N	K	G	E	S	P	V	E	P	A	E	P	C	R	Y	S	C	P	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	CD27	
441	R	R	S	S	T	Q	L	R	S	G	A	S	V	T	E	P	V	A	E	E	R	G	L	M	S	Q	P	L	M	E	T	C	H	S	V	G	A	A	Y	L	CD30	
256	-	-	-	-	-	-	-	-	H	G	C	Q	P	V	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	CD40			
222	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4-1BB				
245	-	-	-	-	-	-	R	L	P	P	D	-	A	H	K	P	P	G	G	G	S	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	OX40		
308	A	Q	D	Y	E	T	D	T	I	S	Y	R	V	G	N	V	L	D	D	D	S	H	M	P	G	S	C	N	I	H	K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	VC22	
311	T	Q	D	Y	E	T	D	T	I	S	Y	H	V	G	N	V	L	D	V	D	S	H	M	P	G	R	C	D	T	H	K	-	-	-	-	-	-	-	-	CRMB		
282	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	V	A	R	M	P	G	L	E	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	TNFR-6a			
155	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	R	R	C	G	R	G	Q	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	TNFR-6b			

FIG.3M

FIG. 3N

FIG. 30

FIG. 3P

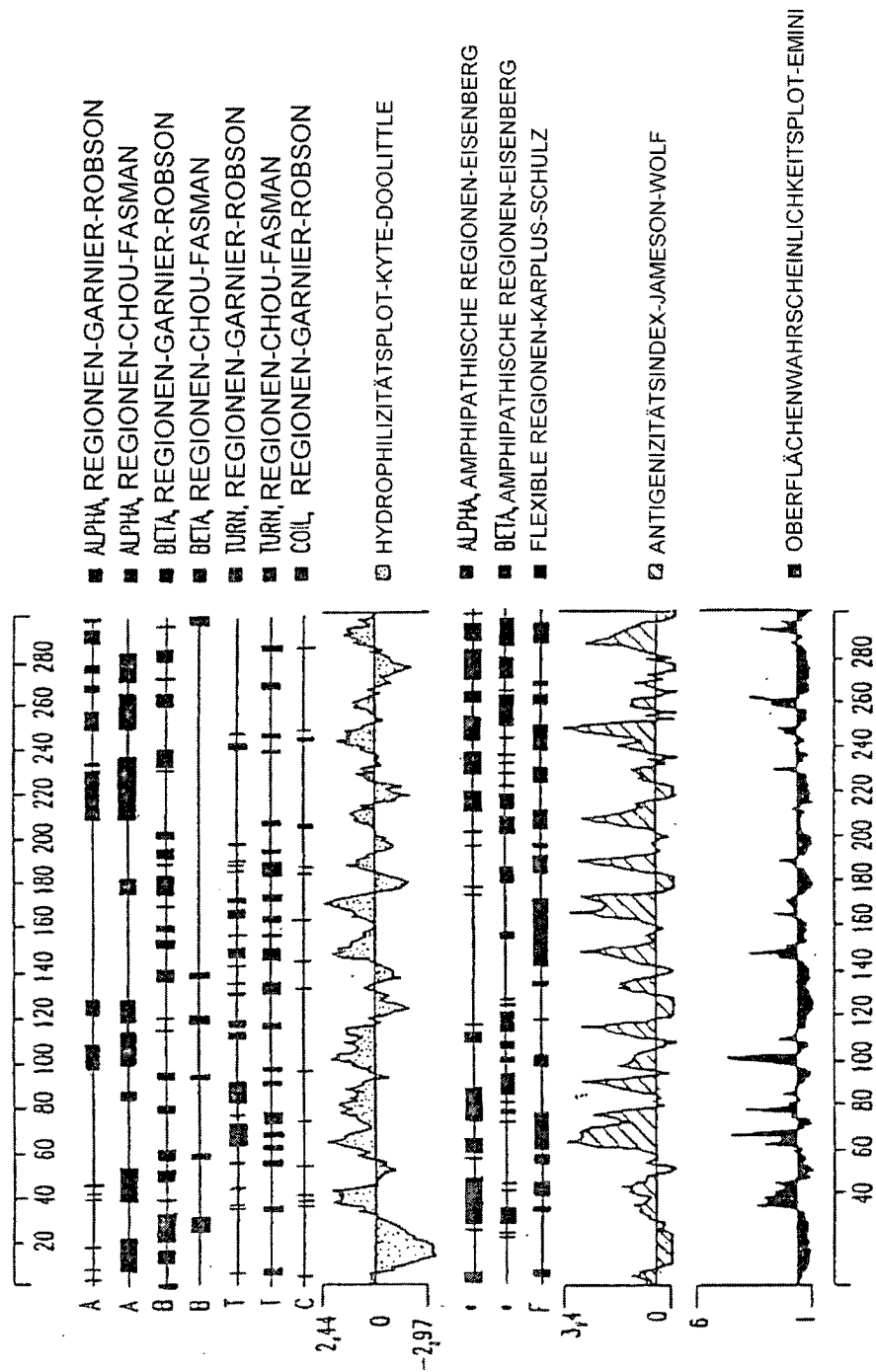


FIG.4

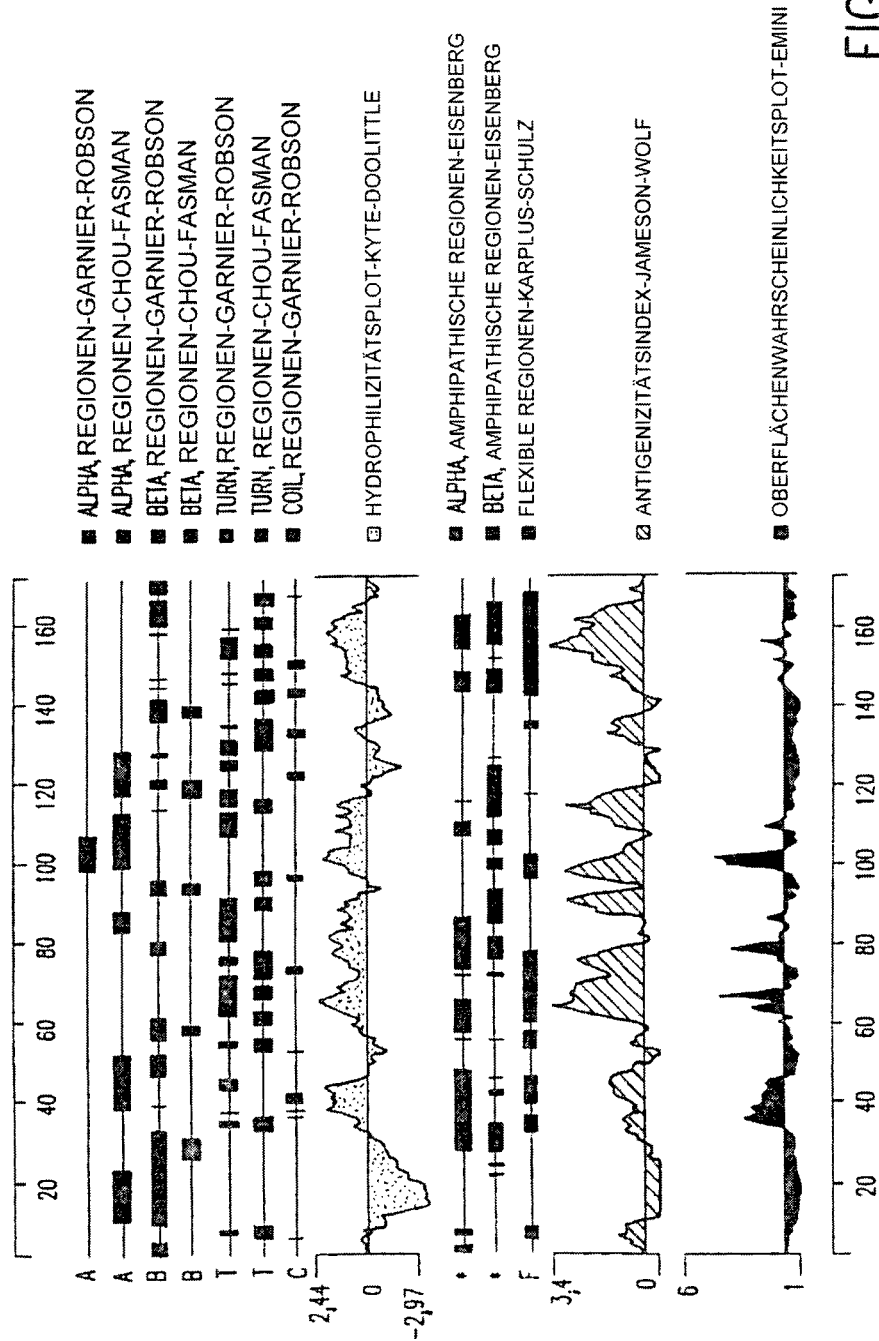


FIG.5

HELDI06R

```

GGCACGAGCA GGGTCCTGTN TCCGCCCTGA GCCGCGCTCT NCCTGCTCCA GCAAGGACCA
TGAGGGGCGCT GGAGGGGCCA GGCCTGTCGC TGCTGTGCCT GGTGTTGGCG CTGCCTGCCC
TGCTGCCGGT GCCGGCTGTA CGCGGAGTGG CAGAAACACN NACNTACCCC TGGCGGGACG
NAGAGACAGG GGAGCGGCTG GTGTNTNCCC ANTGCCCCC AGGCACCTTT NTGCAGCGGC
CGTGCCGNCG AGACAGCCCC ACGACGTGTG GCCCGTNTCC ACCGCGCCAC TACACGCATT
CTGGAACCTAC CTGGAGCGCT GNCGTTACTN CAACGTCCTC TGCGGGGAGC GTNAGGAGGA
GGCACGGGTT TNCCACGNCA ACCACAACCG NGGNTTACCG TNGCCGNACC GGTTTCTTCG
NGGCAAGTTG GTTTTTNNTT TGGAGNAAGG ATTCGTGTTN CAATTNATTG ACGNAGTGAT
TNNNCNCGGG AACTNAAA

```

HCE0W38R

```

CGCAACTGCA CGGCCCTGGG ACTGGCCCTC AATGTGCCAG GNTCTTCCTC CCATGACACC
CTGTGCACCA GCTGCACTGG CTTCCCCCTC AGCACCAGGG TACCANGAGC TGAGGAGTGT
GAGCNTGCCG TCATCGACTT TTTGGCTTTC CAGGACATCT CCATCAAGAG GCTGCAGCGG
CTGCTCANGC C

```

FIG.6