

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
29. April 2004 (29.04.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/035794 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 15/62,
C07K 14/525, 14/705, A61K 47/48, C12N 1/19, 5/10

(71) Anmelder und

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2003/011357

(72) Erfinder: PFIZENMAIER, Klaus [DE/DE]; Seehausstr.
7, 75233 Tiefenbronn (DE). WAJANT, Harald [DE/DE];
Guttenberger Str. 10, 97270 Kist (DE).

(22) Internationales Anmeldedatum:
14. Oktober 2003 (14.10.2003)

(74) Anwälte: GRAF VON STOSCH, Andreas usw.;
Flüggengstr. 13, 80639 München (DE).

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD,
GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN,
MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU,

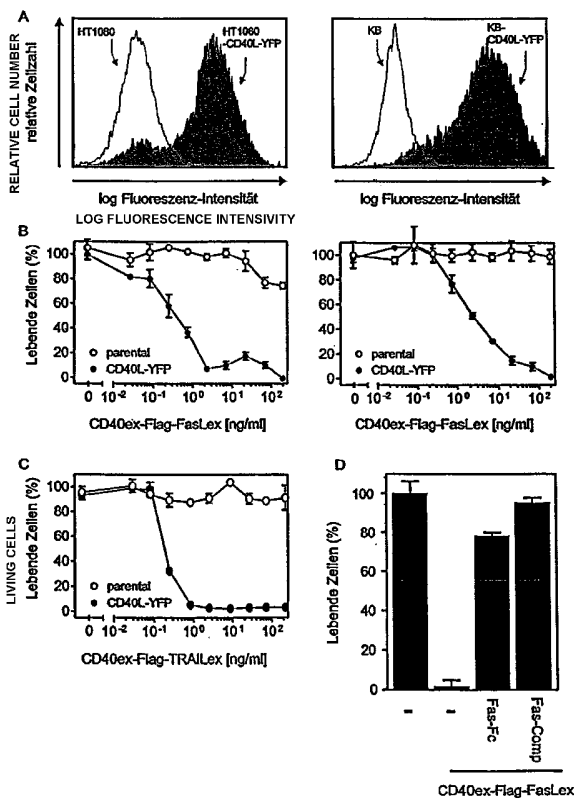
(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
102 47 755.8 14. Oktober 2002 (14.10.2002) DE

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: SELECTIVE, LOCAL ACTIVATION OF MEMBERS OF THE TNF LIGAND FAMILY OF SYSTEMICALLY INACTIVE NON-ANTIBODY TNF LIGAND FUSION PROTEINS

(54) Bezeichnung: SELEKTIVE, LOKALE AKTIVIERUNG VON MITGLIEDERN DER TNF-LIGANDEN FAMILIE VON SYSTEMISCH INAKTIVEN NICHT-ANTIKÖRPER-TNF-LIGANDEN-FUSIONSPROTEINEN



(57) Abstract: The invention relates to polypeptides, comprising an effector and a cell surface molecule binding domain which are joined by a peptide linker. The effector domain, especially the extracellular domain, is a fragment of a member of the TNF ligand family (module 1) which is biologically inactive per se or is to a limited extent active. The cell surface molecule binding domain (module 2) is an amino acid section which selectively binds to a surface structure of the plasma membrane, preferably to a membrane protein, but which is not derived from immunoglobulin. The invention also relates to nucleic acid constructs coding for the polypeptides, vectors which contain them, host cells transfected therewith, pharmaceutical compositions containing the above mentioned inventive objects, methods for the production of the inventive polypeptides and uses of the inventive objects for therapeutical purposes.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft Polypeptide, bestehend aus einer Effektor- sowie einer Zelloberflächenmolekül-Bindungsdomäne, die durch einen Peptidlinker verknüpft sind. Die Effektordomäne ist ein Fragment, insbesondere die extrazelluläre Domäne, eines Mitglieds der TNF-Ligandenfamilie (Modul 1), welches als solches biologisch inaktiv oder eingeschränkt aktiv ist. Die Zelloberflächenmolekül-Bindungsdomäne (Modul 2) ist ein Aminosäureabschnitt, der selektiv an eine Oberflächenstruktur der Plasmamembran, vorzugsweise an ein Membranprotein, bindet, jedoch nicht von einem Immunglobulin abgeleitet ist. Des Weiteren stellt die Erfindung für die Polypeptide codierende Nukleinsäurekonstrukte, diese enthaltende

Vektoren,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 2004/035794 A1



SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

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

SELEKTIVE, LOKALE AKTIVIERUNG VON MITGLIEDERN DER TNF-LIGANDEN FAMILIE VON SYSTEMISCH INAKTIVEN NICHT-ANTIKÖRPER-TNF-LIGANDEN-FUSIONSPROTEINEN

20 Die vorliegende Erfindung betrifft Polypeptide, bestehend aus einer Effektor- sowie einer Zelloberflächenmolekül-Bindungsdomäne, die durch einen Peptidlinker verknüpft sind. Die Effektordomäne ist ein Fragment, insbesondere die extrazelluläre Domäne, eines Mitglieds der TNF-Ligandenfamilie (Modul 1), welches als solches biologisch inaktiv oder eingeschränkt aktiv ist. Die Zelloberflächenmolekül-Bindungsdomäne (Modul 2) ist ein Aminosäureabschnitt, der selektiv an eine
25 Oberflächenstruktur der Plasmamembran, vorzugsweise an ein Membranprotein, bindet, jedoch nicht von einem Immunglobulin abgeleitet ist. Des Weiteren stellt die Erfindung für die Polypeptide codierende Nukleinsäurekonstrukte, diese enthaltende Vektoren, damit transfizierte Wirtszellen, die genannten Erfindungsgegenstände enthaltende pharmazeutische Zusammensetzungen, Verfahren zur
30 Herstellung der erfindungsgemäßen Polypeptide sowie Verwendungen erfindungsgemäßer Gegenstände zu therapeutischen Zwecken bereit.

Zytokine, bspw. Mitglieder der TNF-Ligandenfamilie, bspw. TRAIL (TNF Related
35 Apoptosis Inducing Ligand), auch Apo2L genannt (Wiley et al. (1995), Immunity 6: 673-682, Pitti et al. (1996) J Biol Chem 271: 12687-12689), und bspw. FasL

zeigen in *in vitro* Untersuchungen eine starke apoptotische Wirkung auf viele Tumorzellen tierischen und menschlichen Ursprungs. Im Falle von TRAIL scheint es so zu sein, dass nicht maligne Zellen nicht beeinträchtigt werden. In den untersuchten präklinischen Tiermodellen (Maus, Affe) wurden darüber hinaus keinerlei Anhaltspunkte für eine akute Toxizität oder andere systemische Nebenwirkungen von TRAIL, die als therapiebegrenzend anzusehen wären, festgestellt (Walczak et al. (1999) Nat Med 5:157-163, Ashkenazi et al. (1999) J Clin Invest 104: 155-162). Neuere *in vitro* Untersuchungen an primären humanen Hepatozyten zeigten allerdings eine starke zytotoxische Wirkung am Beispiel eines rekombinant hergestellten TRAIL-Produktes bzw. von membranständigem TRAIL der natürlich vorkommenden Form dieses Zytokins (Jo et al. (2000) Nat Med 6: 564-567, Ichikawa et al. (2001) Nat Med 7: 954-960). Damit wird zur Zeit eine klinische systemische Anwendung von speziellen löslichen Varianten von Mitgliedern der TNF-Ligandenfamilie (insbesondere TNF, FasL, TRAIL, CD40L), welche bioaktiv sind und daher im Wesentlichen die Wirkung des membranständigen Liganden haben, aufgrund der auftretenden Nebenwirkungen ausgeschlossen. Gleiches gilt für agonistische Antikörper, die die zu diesen Liganden korrespondierenden Rezeptoren aktivieren. So wurde z.B. für den FasL (Ligand des Fas-Rezeptors (Fas, CD95)), dem Prototyp apoptotischer Zytokine, eine klinische Anwendung *a priori* aus Sicherheitsgründen unterlassen, da agonistische Antikörper gegen seinen Rezeptor, Fas, *in vivo* extrem hepatotoxisch sind (Ogasawara et al.(1993) Nature 364: 806-809). Schließlich wurde auch gezeigt, dass FasL in löslicher Form praktisch im Unterschied zu seiner membranständigen Form keine Bioaktivität besitzt (Schneider et al. (1998) J. Exp. Med. 187: 1205-1213).

25

Damit sind die nach dem Stand der Technik verfügbaren Varianten der Mitglieder der TNF-Ligandenfamilie entweder auf Grund mangelnder Bioaktivität oder extremer Nebenwirkungen zur therapeutischen Anwendung, bspw. zur Behandlung von Tumoren, nicht oder nur sehr begrenzt (z.B. im Falle von TNF unter sog. „isolated limb perfusion“ Bedingungen) einsetzbar.

30

Die WO 02/22680 offenbart Fusionsproteine, bei denen an sich biologisch nicht aktive bzw. eingeschränkt aktive Fragmente von bspw. TNF-Zytokinen über einen Peptidlinker mit einem Antigen-bindenden Antikörper bzw. einem antigenbindenden Fragment davon verbunden sind. Es besteht jedoch ein Bedarf an alternativen Systemen, da nicht selten für bestimmte Zelloberflächenmoleküle keine entsprechenden Antikörper (oder Antikörperfragmente) verfügbar sind oder die Antigenbindung nicht wie erwartet, bspw. nicht mit der entsprechenden Spezifität, erfolgt.

10 Der vorliegenden Erfindung liegt nunmehr die Aufgabe zugrunde, ein alternatives, insbesondere von Antikörpern unabhängiges System bereitzustellen, mit dem es gelingt, die Wirkung von Liganden der TNF-Familie (bzw. Fragmenten davon) gerichtet und gewebs- bzw. zellspezifisch zu entfalten und damit unerwünschte, u.U. systemische Nebenwirkungen auf nicht zum Zielgewebe gehörigen Gewe-

15 ben/Zellen bei einer klinischen Anwendung zu vermeiden oder zumindest stark einzuschränken.

Diese Aufgabe wird durch die in den Ansprüchen gekennzeichneten Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung gelöst.

20

Insbesondere wird erfindungsgemäß ein Polypeptid bereitgestellt, umfassend einen Abschnitt (1), der eine Zelloberflächenmolekül-Bindungsdomäne (auch sog. Modul 2) enthält, einen Abschnitt (2), der ein Peptidlinker ist, und einen Abschnitt (3), der ein als solches biologisch inaktives/eingeschränkt aktives Fragment eines Mitglieds der TNF-Ligandenfamilie (im folgenden auch „TNF-Zytokine“ oder „TNF-Rezeptor-Ligandenfamilie“ genannt) oder einer funktionellen Variante davon (auch sog. Modul 1) enthält, wobei die Zelloberflächenmolekül-Bindungsdomäne nicht von einem Immunglobulin abgeleitet ist und das Fragment des Mitglieds der TNF-Ligandenfamilie oder einer funktionellen Variante davon nur durch Bindung

25

30 des Abschnitts (1) an das Zelloberflächenmolekül biologisch vollständig aktiv wird.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform sind die Abschnitte (1) bis (3) im Polypeptid (= erfindungsgemäßes Fusionsprotein = erfindungsgemäßes Proteinkonstrukt) von N- nach C-terminal angeordnet.

- 5 Der vorliegenden Erfindung die Feststellung zugrunde, dass natürlicherweise membranständig vorkommende Liganden der TNF-Familie, wenn sie vom Organismus in eine lösliche, der extrazellulären Domäne entsprechende Form proteolytisch prozessiert werden, entweder biologisch gänzlich inaktiv oder nur noch eingeschränkt, z.B. auf bestimmten Membranrezeptor-Subtypen, wirksam sind.
- 10 Dies gilt auch für rekombinant hergestellte Derivate, die der extrazellulären Domäne des jeweiligen Liganden entsprechen. Interessanterweise sind solche biologisch unwirksamen, lösliche Liganden durchaus noch in der Lage, an ihren komplementären Membranrezeptor zu binden, ohne jedoch eine Aktivierung des Rezeptors, d.h. Signaltransduktion und Auslösung einer zellulären Reaktion, zu
- 15 bewirken. Erfindungsgemäßes Erkenntnis ist es, dass ein derart inaktiver/eingeschränkt aktiver Ligand (Modul 1) durch Fusion mit einer weiteren Peptidkomponente (Modul 2), die nicht aus einem Antikörper bzw. Antikörperfragment besteht und die eine vom TNF-Liganden-Anteil unabhängige spezifische Bindung an eine zellmembranständige Struktur erlaubt, wieder (volle) biologische Wirk-
- 20 samkeit erlangt, wenn diese Peptidkomponente zur Bindung an eine Zelloberfläche führt. Die so erlangte Rekonstitution der biologischen Wirkung des Moduls 1 wird sowohl gegenüber den durch Modul 2 erkannten Zielzellen selbst wirksam wie auch gegenüber benachbart liegenden Zellen, sofern diese jeweils die entsprechenden Rezeptoren für das im Fusionsprotein enthaltene TNF-Liganden-
- 25 Fragment (Modul 1) exprimieren.

Die Zelloberflächenmolekül-Bindungsdomäne (Abschnitt (1) bzw. Modul (2)) der erfindungsgemäßen Fusionsproteine vermittelt die Bindung des Fusionsproteins an Zellen, welche die entsprechende Oberflächenstruktur aufweisen. Die Erfindung zeichnet sich aufgrund der spezifischen Module durch zwei Eigenschaften

30 aus, die dazu führen, dass das Gesamtprotein Eigenschaften erhält, die keine der verwendeten Module allein besitzt und die nicht vorhersehbar sind.

Die erste diesbezügliche Eigenschaft ist, dass die Zelloberflächenmolekül-Bindungsdomäne im Fusionsprotein nicht durch das dem Stand der Technik entsprechende Prinzip der Verwendung von Antikörpern oder daraus abgeleiteten Fragmenten (z.B. scFv) erreicht wird, sondern dass angesichts der üblicherweise verwendeten antigenbindenden Domänen von Antikörpern unerwarteterweise andere Zelloberflächenmolekül-Bindungsdomänen dazu in der Lage sind, an sich biologisch inaktiven/eingeschränkt aktiven Fragmenten von TNF-Zytokinen durch Bindung an bestimmte Zelloberflächenstrukturen, insbesondere an Membranproteine, eine spezifisch gegen die Zielzellen gerichtete, vollständige und damit hoch wirksame Effektorwirkung zu verleihen. Bevorzugte Nicht-Immunglobulin-Domänen zur Bindung an Zelloberflächenstrukturen sind bspw. Peptidhormone oder Zytokine, kurze Peptide, aber genauso Rezeptoren für membranständige Liganden (bzw. vorzugsweise jeweils diejenigen Fragmente davon, die eine spezifische Bindung eingehen).

Die zweite Eigenschaft besteht darin, dass die Effektordomäne als solche und auch im Fusionsprotein auf Zellen, welche die Oberflächenstruktur, die durch die Zelloberflächenmolekül-Bindungsdomäne erkannt wird, nicht besitzen, biologisch inaktiv oder wenig aktiv ist, d.h. der zur Effektordomäne korrespondierende Rezeptor wird nicht aktiviert. Die überraschende, nur dem Gesamt-Fusionsprotein zukommende Eigenschaft ist, dass die Effektordomäne (an sich biologisch inaktives/eingeschränktes Frgament eines TNF-Zytokins) des Fusionsprotein nur nach Bindung an Zellen, welche die Oberflächenstruktur exprimieren, die durch die Zelloberflächenmolekül-Bindungsdomäne erkannt wird, biologisch aktiv wird. Somit aktiviert die Effektordomände des erfindungsgemäßen Polypeptids nur den zu ihr korrespondierenden Rezeptor auf einer Zelle, welche die dem Zelloberflächenmolekül-Bindungsmodul entsprechende Oberflächenstruktur aufweist, oder auf einer Zelle, welche einer mit der Oberflächenstruktur ausgestatteten Zelle benachbart ist. Das Fusionsprotein, nicht jedoch dessen einzelne Komponenten (Modul 1 bzw. Modul 2) und auch nicht eine aktive Form der Effektordomäne, aktiviert somit den zur Effektordomäne korrespondierenden Rezeptor selektiv auf

Zellen (bzw. zu diesen benachbarten Zellen), welche die Oberflächenstruktur exprimieren, die durch die Zelloberflächenmolekül-Bindungsdomäne erkannt wird. Diese neue Eigenschaft (selektive lokale Rezeptoraktivierung) des erfindungsgemäßen Polypeptids macht es daher möglich, die systemischen Nebenwirkungen zu vermeiden, die das aktive TNF-Zytokin, von dem die erfindungsgemäße Effektor-domäne abgeleitet wurde, oder im Stand der Technik bekannte agonistische Antikörper, die den korrespondierenden Rezeptor aktivieren, aufweisen. Das erfindungsgemäße Polypeptid erlaubt damit eine gezielte lokale Wirkungsentfaltung im Gesamtorganismus.

10

Die Zelloberflächenmolekül-Bindungsdomäne wird vorteilhafter Weise derart gewählt, dass die Oberflächenstruktur, die durch diese erkannt wird, auf den Zellen, Orten oder Organen, auf denen die Effektor-domäne wirksam werden soll, selektiv oder zumindest angereichert vorhanden ist. Die Zelloberflächenmolekül-Bindungsdomäne wird des Weiteren derart ausgewählt, dass sie keine Autoaktivierung des Fusionsprotein, z.B. durch Aggregation, erlaubt.

15

Mitglieder der TNF-Ligandenfamilie, bspw. TNF (Tumor Nekrose Faktor; GenBank Zugriffsnr. NM_000594), bspw. TRAIL (TNF Related Apoptosis Inducing Ligand; GenBank Zugriffsnr. U37518), auch Apo2L genannt, bspw. CD40L (GenBank Zugriffsnr. NM_011616) und bspw. FasL (GenBank Zugriffsnr. U11821) haben apoptotische und/oder das Immunsystem-regulierende Wirkung. Von wenigen Ausnahmen abgesehen handelt es sich bei den Mitgliedern der TNF-Ligandenfamilie um Membranproteine des Typs II. Von diesen membranständigen Formen können sich durch spezifische Proteolyse oder alternatives Spleißen jedoch in vielen Fällen auch lösliche Formen ableiten. Insbesondere können lösliche Formen auch durch gentechnische Methoden hergestellt werden. Lösliche wie auch membranständige Mitglieder der TNF-Ligandenfamilie entfalten dabei ihre biologische Wirkung durch Interaktion mit den Mitgliedern einer korrespondierenden Familie von Rezeptoren - den Mitgliedern der TNF-Rezeptorfamilie. In manchen Fällen können sich die löslichen und membranständigen Formen von

25

30

Mitgliedern der TNF-Ligandenfamilie beträchtlich in ihrer Bioaktivität unterscheiden. So ist z.B lösliches TNF ein sehr starker Aktivator des TNF-R1, hat am TNF-R2 jedoch keine oder nur eine sehr eingeschränkte Wirkung. Die membranständige Form desselben Liganden kann hingegen beide TNF-Rezeptoren gleichermaßen gut aktivieren. Weitere Beispiele, in denen sich lösliche und membranständige Formen von Mitgliedern der TNF-Rezeptor-Ligandenfamilie unterscheiden, sind u.a. der FasL, der CD40L und TRAIL.

In einer bevorzugten Ausführungsform weisen erfindungsgemäße Polypeptide daher in ihrem Abschnitt (3) eine Aminosäuresequenz einer löslichen Form eines Mitglieds der TNF-Rezeptor-Ligandenfamilie, eine Variante einer solchen Sequenz oder ein Fragment hiervon auf.

Unter einer Variante werden erfindungsgemäß allgemein Sequenzen verstanden, die zumindest Teile, vorzugsweise mindestens 50%, stärker bevorzugt mindestens 80 % der nativen Sequenz aufweisen und sich durch bspw. Deletion(en), Insertion(en) und/oder mindestens eine Mutation von der nativen Sequenz unterscheiden. Hierbei ist eine Sequenzhomologie von mindestens 90%, vorzugsweise mindestens 95% und am stärksten bevorzugt mindestens 97 % mit der entsprechenden nativen Sequenz bevorzugt. Bei einem funktionellen Fragment kann es sich um N-Terminal, C-terminal oder intrasequentiell verkürzte Sequenzen der löslichen Formen der Mitglieder der TNF-Rezeptor-Ligandenfamilie handeln. Auch biologisch aktive Varianten dieser Fragmente werden erfindungsgemäß mitoffenbart. Bei den abgeleiteten Varianten i.S. der Erfindung werden vorzugsweise selektive Rezeptorbindungseigenschaften gegeben sein, wobei die Variante z.B. hinsichtlich ihrer spezifischen Bioaktivität oder anderer Eigenschaften (Stabilität) optimiert sein kann.

Das Wirkprinzip erfindungsgemäßer Konstrukte ist insbesondere für all diejenigen Mitglieder der TNF-Rezeptor-Ligandenfamilie zutreffend, die für bestimmte Rezeptoren ausschließlich oder in besonders gutem Maße als Membranmolekül wirksam sind. Hierzu gehören neben FasL, CD40L auch TNF, TRAIL, 41BB,

CD30L und Ox40L. Besonders bevorzugt im Modul 1 (Abschnitt (3)) der erfindungsgemäßen Polypeptide sind daher solche Mitglieder der TNF-Rezeptor-Ligandenfamilie, die natürlicherweise nur als Membranprotein ihren komplementären Rezeptor aktivieren.

5

Ganz besonders bevorzugt ist als Abschnitt (3) eine lösliche extrazelluläre Domäne, eine funktionelle Variante einer löslichen extrazellulären Domäne oder ein funktionelles Fragment einer löslichen extrazellulären Domäne von TRAIL, FasL, CD40, 41BBL, CD30L, Ox40L oder TNF.

10

Der Linkerabschnitt (2) zwischen den Abschnitten (1) (Zelloberflächenmolekül-Bindungsdomäne; Modul 2) und (3) (TNF-Rezeptor-Ligandenfragment; Modul 1) stellt sich bei erfindungsgemäßen Polypeptidkonstrukten bspw. als eine flexible Verbindung dar, vorzugsweise jedoch ohne die intrinsischen Trimerisierungseigenschaften des betreffenden TNF-Rezeptor-Ligandenfragments (Modul 1) negativ zu beeinflussen, wie nachstehend in den Beispielskonstrukten (A) und (B) gezeigt.

15

In Abschnitt (2) ist jede natürlich vorkommende oder synthetisch hergestellte Peptid-Sequenz denkbar. Grundsätzlich kann ein Linker einer nativen oder variierten (Teil)sequenz aller Organismen, vorzugsweise aus Vertebraten, insbesondere aus Säugetieren, vor allem aus dem Menschen, entsprechen. Ferner sind als Linker bspw. alle Sequenzabschnitte von Proteinen geeignet, die durch Ausbildung von Supersekundärstrukturen Trimere generieren. In jedem Fall können die Sequenzen von nativen Polypeptiden oder Fragmenten dieser nativen Polypeptide, die als Linker in Abschnitt (2) eines erfindungsgemäßen Polypeptids zum Einsatz kommen, auch in Form biologisch aktiver Varianten derselben im Sinne dieser Erfindung und nach obiger Definition auftreten.

25

Die Zelloberflächenmolekül-Bindungsdomäne (Abschnitt (1)) des Polypeptids der vorliegenden Erfindung kann z.B. den für die spezifische Interaktion mit dem Zelloberflächenmolekül erforderlichen Abschnitt eines Rezeptors für einen membran-

30

ständigen Liganden umfassen. Bevorzugt im Rahmen der vorliegenden Erfindung sind dabei solche Polypeptide, die eine lösliche Liganden-bindende Domäne eines Rezeptors, insbesondere eines Mitglieds der TNF-Rezeptorfamilie, aufweisen. Hierbei darf der Rezeptor-Anteil nicht komplementär zu dem in Abschnitt (3) befindlichen TNF-Rezeptor-Ligandenfragment sein.

Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des Polypeptids umfasst der Abschnitt (1) mindestens den für die spezifische Interaktion mit dem Zelloberflächenmolekül erforderlichen Abschnitt eines Liganden eines membranständigen Rezeptors. Daher sind erfindungsgemäß lösliche Liganden oder Peptide, die zellständige Rezeptoren erkennen, geeignet. Es sind auch von Abschnitt (3) (Modul 1) verschiedene TNF-Rezeptor-Ligandenfragmente geeignet. Hierbei wird ein erfindungsgemäßes Polypeptid dann ganz besonders bevorzugt sein, wenn der Abschnitt (1) ein lösliches Ligand/Rezeptor-Fragment eines Säugetiers, insbesondere humanen Ursprungs, ist und mit definierten komplementären Zielstrukturen auf Säuger-, insbesondere menschlichen, Zellen und Geweben spezifisch interagiert.

Der Abschnitt (1) eines erfindungsgemäßen Polypeptids wird vorzugsweise Spezifität für ein im Tumorgewebe oder auf aktivierten Zellen des Immunsystems (z.B. T-Zellen, B-Zellen, Makrophagen, dendritische Zellen) selektiv bzw. dominant exprimiertes Zelloberflächen-Protein aufweisen. Beispiele für derartige selektiv bzw. predominant exprimierte Zelloberflächen-Proteine, die durch den Abschnitt (1) eines erfindungsgemäßen Polypeptids gebunden werden können, sind bei Tumorgeweben, wie der VEGFR bzw. der VEGFR/VEGF-Komplex, alle mutierten und Wildtyp-Formen der EGF-Rezeptorfamilie oder CD30, bei aktivierten T-Zellen bspw. CD40L oder der IL2-Rezeptor, in B-Zellen bspw. der Baff-R oder CD40, bei Makrophagen bspw. Membran-TNF oder der B7-Ligand und bei dendritischen Zellen z.B. gleichfalls der B7-Ligand .

Als bevorzugt für den Abschnitt (1) eines erfindungsgemäßen Polypeptids erweisen sich daher Protein- bzw. Peptid-Hormone, bspw. Wachstumsfaktoren, wie EGF, und Angiogenesefaktoren, wie VEGF, wie auch die löslichen extrazellulären

Domänen von Rezeptoren wie z.B. alle Mitglieder der TNF-Rezeptor-Superfamilie, insbesondere TNF-R2, CD30 und CD40, sowie von anderen Rezeptoren, z.B. CD28.

- 5 Damit stellt sich ein bevorzugtes erfindungsgemäßes Polypeptid als ein rekombinantes Fusionsprotein dar, das prinzipiell folgende Strukturelemente (Monomer) in einer definierten Abfolge enthält: Abschnitt (1), bspw. N-terminal, ein Ligand-, Rezeptorfragment oder Peptid; Abschnitt (2) eine Linkersequenz; Abschnitt (3), bspw. C-terminal, der humanen extrazellulären Domäne des FasL oder des TNF
10 oder des CD40L. Analog können bspw. CD30L, Ox40L oder andere Mitglieder der TNF-Familie als Abschnitt (3) in entsprechenden erfindungsgemäßen Polypeptiden dienen.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Nucleinsäuren mit
15 Nucleotidsequenzen (insbesondere DNA-Sequenzen), die für Fusionsproteine der vorgenannten erfindungsgemäßen Art codieren (Nucleinsäurekonstrukte) oder einen solchen für ein erfindungsgemäßes Polypeptid codierenden Bereich enthalten. Derartige Nucleinsäurekonstrukte werden bevorzugt in Expressionsvektoren exprimiert. Die entsprechenden Vektoren, die eine DNA-Sequenz für die erfindungsgemäßen Fusionsproteine enthalten, sind somit ebenfalls Gegenstand der
20 vorliegenden Erfindung. Vorzugsweise weisen erfindungsgemäße Vektoren die Fähigkeit zur Expression und/oder Amplifikation in einer prokaryontischen und/oder eukaryontischen Zelle auf. Insbesondere betrifft die vorliegende Erfindung auch retrovirale Vektoren sowie auch all jene Vektorsysteme, die gentherapeutisch zur Anwendung kommen können, z.B. auch adenovirale Vektorsysteme.
25 Im Rahmen der vorliegenden Erfindung werden damit auch gentherapeutische Verfahren mit erfindungsgemäßen Vektoren oder Nucleinsäurekonstrukten als Behandlungsmethode für die erfindungsgemäß offenbarten medizinischen Indikationen offenbart.

30

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Wirtszellen, die mit Nucleinsäuren transfiziert sind, die für die erfindungsgemäßen Fusionsproteine

codieren. Ganz besonders bevorzugt sind in diesem Zusammenhang Wirtszellen, die mit erfindungsgemäßen Expressionsvektoren oder erfindungsgemäßen Nukleinsäurekonstrukten transfiziert sind, wobei die Expressionsvektoren wiederum DNA-Sequenzen enthalten, die für die erfindungsgemäßen Fusionsproteine codieren.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Verfahren zur Herstellung (Expression und Isolierung) von erfindungsgemäßen Polypeptiden, wobei ein erfindungsgemäßes Isolierungsverfahren typischerweise gekennzeichnet ist durch

10 (a) Bereitstellen eines erfindungsgemäßen Vektors oder eines Nukleinsäurekonstrukts, (b) Transfektion von Zellen mit einem gemäß Verfahrensschritt (a) erhaltenen Vektor oder Nukleinsäurekonstrukt, (c) Kultivierung der gemäß (b) transfizierten Zellen, und (d) Isolierung von unter entsprechenden Bedingungen exprimierten erfindungsgemäßen Polypeptiden aus den Wirtszellen und/oder dem Kulturüberstand. Die Expression des Fusionsproteins erfolgt hierbei typischerweise

15 nach dem Stand der Technik in geeigneten Expressionssystemen, vorzugsweise als sezerniertes Produkt stabiler Transfektanden, z.B. CHO-Zellen oder in anderen tierischen Zellen wie Cos7 oder SF9 (Insektenzellen) bzw. anderen eukaryontischen Zellsystemen, insbesondere in Hefen, z.B. *Pichia pastoris*. Vorzugsweise

20 werden die exprimierten erfindungsgemäßen Polypeptide jeweilige zur Sekretion in dem Zellsystem geeignete Leadersequenzen aufweisen. Daher werden die zur Expression eingesetzten erfindungsgemäßen Vektoren auch codierende Abschnitte enthalten, die für eine funktionelle Leadersequenz codieren.

25 Erfindungsgemäße Polypeptide, ggf. aber auch Nukleinsäurekonstrukte, Vektoren oder Wirtszellen, (hier unter der Kategorie „erfindungsgemäße Substanzen“ bzw. „erfindungsgemäße Gegenstände“ zusammengefaßt), kommen auch als Arzneimittel oder zur Herstellung eines Arzneimittels in Betracht. Ihre Verwendung ist insbesondere dann gegeben, wenn erfindungsgemäße Substanzen nach Bindung

30 des Fusionsproteins über dessen Modul 2 (Abschnitt (1)) an ein spezifisches, (Zell-) membranständiges Zielmolekül biologische Wirkung über den korrespondierenden Rezeptor des TNF-Rezeptor-Ligandenfragments gemäß Modul 1 (Ab-

schnitt (3)) entfalten soll. Durch geeignete Auswahl des Moduls 2 wird die TNF-Rezeptor-Ligandenaktivität der erfindungsgemäßen Substanz auf das zu behandelnde Gewebe, bzw. den zu behandelnden Zelltyp, gerichtet, und es kann ein auf die jeweilige Indikation spezifisch abgestimmtes/optimiertes Therapeutikum hergestellt werden.

Ein erfindungsgemäßes Polypeptid wird z.B. bei Anwendung als Tumorthera-
peutikum, insbesondere zur Behandlung solider Tumore, aber auch lymphatischer
Tumore (benigne oder maligne), nach *in vivo* Verabreichung durch die Zellober-
flächenmolekül-Bindungsdomäne (Modul 2) zunächst spezifisch im Tumorareal
selbst oder am reaktiven Tumorstroma/Tumorgefäßsystem gebunden und da-
durch aktiviert. Die zu dem TNF-Rezeptor-Ligandenfragment (Modul 1) korres-
pondierenden Rezeptoren können dann aktiviert werden und z.B. Apoptose indu-
zieren (Modul 1 z.B. lösliches Fragment des FasL oder TRAIL) oder infiltrierende
T-Zellen aktivieren (Modul 1 z.B. lösliches Fragment des CD40L). Ein erfindungs-
gemäßes Polypeptid wird z.B. bei Anwendung als Therapeutikum in Autoimmun-
erkrankungen nach *in vivo* Verabreichung durch die Zelloberflächenmolekül-
Bindungsdomäne (Modul 2) zunächst an einen Oberflächenmarker von aktivierten
T-Zellen (z.B. CD40L) oder aktivierten Makrophagen (z.B. Membran-TNF) gebun-
den und dadurch biologisch vollständig aktiv. Die zu dem TNF-Rezeptor-
Ligandenfragment (Modul 1) korrespondierenden Rezeptoren können dann akti-
viert werden und z.B. Apoptose induzieren (Modul 1 z.B. lösliches Fragment des
FasL oder TRAIL).

Die Verwendung erfindungsgemäßer Substanzen ist aber grundsätzlich auch im-
mer dann zur Anwendung im therapeutischen Bereich erwünscht, wenn die Akti-
vierung einer Signaltransduktionskette, bspw. die durch die TNF-Rezeptorfamilie
ausgelösten Signalkaskaden, z.B. eine apoptotische Signalkaskade, ausgelöst
werden soll. Somit kommt die Verwendung erfindungsgemäßer Substanzen bei
der Behandlung bzw. zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung aller
hyperproliferativer Erkrankungen in Betracht, bspw. auch zur zielgerichteten Aus-
schaltung von Zellen des Immunsystems bei überschießenden Immunreaktionen,

bspw. bei Autoimmunerkrankungen, wie z.B. multiple Sklerose, rheumatoide Arthritis, Diabetes mellitus und TEN, oder bei fehlgeleiteten Immunreaktionen gegen Fremdartigene, wie sie z.B. bei Infektionserkrankungen (bakteriell (bspw. durch Mykobakterien), viral oder protozoologisch) auftreten können. In Betracht kommt
5 ferner die Behandlung von Stoffwechselerkrankungen oder allgemeinen hyperinflammatorischen Zuständen, insbesondere chronischen Entzündungen, bspw. auch bei Allergien, aber auch die Behandlung von Abstoßungsreaktionen durch das Immunsystem des Patienten gegen Fremdgewebe. In den vorgenannten Fällen muß jeweils die Zelloberflächenmolekül-Bindungsdomäne (Modul 2), also der
10 Abschnitt (1) eines erfindungsgemäßen Polypeptids, charakteristische Marker auf der Oberfläche der Zielzellen, bei denen vorzugsweise eine apoptotische Signalkaskade mit dem Ziel des Zelltods ausgelöst werden soll, erkennen. Im Falle der Behandlung nach Transplantation von Fremdgewebe werden also bspw. die körpereigenen für die Abstoßungsreaktion verantwortlichen Zellen des Immunsystems des Transplantationspatienten als Zielzellen dienen. Im Falle der Behandlung
15 von rheumatoider Arthritis werden somit bspw. die körpereigenen aktivierten Makrophagen, die wesentlich zur Erkrankung beitragen, als Zielzellen dienen.

Erfindungsgemäße Gegenstände, wie Nukleinsäurekonstrukte, Expressionsvektoren oder Wirtszellen kommen – wie vorstehend dargelegt – gleichfalls als Arzneimittel bspw. zur Behandlung der vorgenannten Erkrankungen in Betracht. In diesem Fall werden vorzugsweise dem zu behandelnden Patienten zu transfizierende Zellen entnommen, diese *in vitro* mit erfindungsgemäßen Expressionsvektoren transfiziert, kultiviert und dann als Retransplantat in den Patienten überführt. Die
25 Transfektion wird vorzugsweise durch erfindungsgemäße Nukleinsäurekonstrukte oder Expressionsvektoren vorgenommen, welche die Expression an einen regulierbaren Promotor koppeln. Das transfizierte Eigentransplantat kann lokal appliziert, bspw. injiziert werden – abhängig von der spezifischen Erkrankung und den spezifischen Zielzellen. Eine lokale Verabreichung ist bspw. im Fall einer Tumortherapie bevorzugt. Hierbei werden Tumorzellen dem Patienten entnommen, *in vitro*
30 transfiziert und dann vorzugsweise direkt in den Tumor injiziert. Diese Vor-

gehensweise eignet sich bspw. zur Behandlung von Hauttumoren (z.B. Melanomen), Tumoren des Nervensystems (z.B. Glioblastomen), usw.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine pharmazeutische
5 Zusammensetzung, enthaltend erfindungsgemäße Polypeptide, erfindungsgemä-
ße Nukleinsäurekonstrukte, erfindungsgemäße Vektoren und/oder erfindungsgemä-
ße Wirtszellen sowie pharmazeutisch unbedenkliche Hilfs-, Zusatz- und/oder
Trägersubstanzen (z.B. auch Lösungsvermittler). Damit wird erfindungsgemäß
10 eine Kombination erfindungsgemäßer Substanzen mit pharmazeutisch akzeptab-
len Träger-, Hilfs- und/oder Zusatzstoffen offenbart. Entsprechende Herstellungs-
wege sind bei "Remington's Pharmaceutical Sciences" (Mack Pub. Co., Easton,
PA, 1980) offenbart, das Bestandteil der Offenbarung der vorliegenden Erfindung
ist. Für die parenterale Verabreichung kommen als Trägerstoffe bspw. steriles
15 Wasser, sterile Kochsalzlösungen, Polyalkylenglykole, hydriertes Naphthalen und
insbesondere biokompatible Lactidpolymere, Lactid/Glycolidcopolymer oder Poly-
oxyethylen-/Polyoxypropylencopolymere in Betracht. Derartige erfindungsgemäße
Zusammensetzungen kommen für alle oben offenbarten medizinischen Indikatio-
nen in Betracht.

20 Grundsätzlich werden im Rahmen der vorliegenden Erfindung für erfindungsgemä-
ße Substanzen oder erfindungsgemäße Zusammensetzungen alle im Stand
der Technik bekannten Verabreichungswege offenbart. Vorzugsweise erfolgt die
Verabreichung eines Arzneimittels zur Behandlung der vorgenannten Erkrankungen
oder Störungen auf dem parenteralen, d.h. bspw. subkutanen, intramuskulä-
25 ren oder intravenösen, oder oralen oder intranasalen Verabreichungsweg. Typi-
scherweise werden erfindungsgemäße pharmazeutische Zusammensetzungen
fest, flüssig oder aerosolartig (z. B. als Spray formuliert) sein. Dabei wird die Form
der Zusammensetzung je nach Art der Konfektionierung veränderlich sein.

30 Zusammenfassend ist festzustellen, dass erfindungsgemäß dualspezifische Fusi-
onsproteine mit proapoptotischen und immunmodulierenden Eigenschaften zur
Verfügung gestellt werden, die lösliche inaktive bzw. eingeschränkt aktive Frag-

mente *a priori* membranständiger TNF-Rezeptor-Liganden enthalten, die jedoch lokal durch Bindung an Zelloberflächenstrukturen, die nicht mit dem TNF-Rezeptor-Ligandenfragment interagieren, aktiviert werden können. Die Zelloberflächenmolekül-Bindungsdomäne kann selbst ein zweites Zytokin, ein Rezeptor für membranständige Liganden oder ein anderes Nicht-Antikörper-Peptid sein (bzw. ein Fragment davon), welches eine spezifische Bindung an Zellmembranstrukturen eingeht. Durch diese Zelloberflächenmolekül-Bindungsdomäne wird die TNF-Rezeptor-Ligandenaktivität auf das zu behandelnde Gewebe bzw. die zu behandelnden Zelltypen gerichtet, und es kann ein auf die jeweilige Indikation spezifisch abgestimmtes/optimiertes Therapeutikum hergestellt werden. Insgesamt wird somit die Selektivität der TNF-Rezeptor-Ligandenwirkung mit den vorliegenden erfindungsgemäßen Polypeptiden durch zwei Mechanismen erreicht: Einerseits über die durch die Zelloberflächenmolekül-Bindungsdomäne vermittelte Anreicherung des im nicht gebundenen Zustand inaktiven, respektive eingeschränkt aktiven Fusionsproteins und wichtiger durch dessen von der Zelloberflächenmolekülbindung, d.h. Immobilisation, abhängigen Aktivierung.

Die vorliegende Erfindung wird durch die nachfolgenden Figuren näher erläutert.

In Fig. 1 sind die Ergebnisse von Untersuchungen im Hinblick auf die präferentielle Apoptoseinduktion durch erfindungsgemäße Fusionsproteine am Beispiel CD40L-positiver Zellen dargestellt. Um die CD40L-Expression in einfacher Weise nachweisen zu können, wurde das gelb fluoreszierende Protein YFP an die intrazelluläre Domäne des CD40L fusioniert.

Fig. 1A zeigt die Expression des CD40L-YFP Fusionsproteins in parental KB- und HT1080-Zellen und den davon abgeleiteten Transfektanten, die stabil CD40L-YFP exprimieren, mittels FACS-Analyse. Ein entsprechendes Bild wird auch durch FACS-Analysen mit Antikörpern erhalten, welche die extrazelluläre Domäne des CD40L erkennen (Daten nicht gezeigt).

Fig. 1B bis 1D zeigen jeweils eine Auftragung der Zell-Vitalität (in %) gegen die Konzentration des jeweils angegebenen Fusionsprotein. Die eingezeichneten Kurvenverläufe geben die Ergebnisse der Behandlung von CD40L-positiven (HT1080-CD40L, KB-CD40L) oder CD40L-negativen HT1080- und KB-Zellen mit den Konstrukten CD40ex-Flag-FasLex und CD40ex-Flag-TRAILex wieder.

Bei den Experimenten gemäß Fig. 1B wurden in einer Zellkultur-Platte mit 96 Vertiefungen HT1080- und HT1080-CD40L-YFP-Zellen (linkes Diagramm) bzw. KB- und KB-CD40L-YFP-Zellen (rechtes Diagramm) über Nacht kultiviert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit den angegebenen Konzentrationen an CD40ex-Flag-FasLex stimuliert. Die Zellen wurden parallel zur Sensitivierung der Apoptoseinduktion mit CHX (2,5 µg/ml) behandelt. Am darauffolgenden Tag wurde die Zell-Vitalität mittels Kristall-Violett-Färbung bestimmt.

Bei den Experimenten gemäß Fig. 1C wurden in einer Zellkultur-Platte mit 96 Vertiefungen HT1080- und HT1080-CD40L-YFP-Zellen über Nacht kultiviert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit den angegebenen Konzentrationen an CD40ex-Flag-TRAILex stimuliert. Ansonsten wurde wie bei Fig. 1B beschrieben verfahren.

In Fig. 1D wird beispielhaft gezeigt, dass der in CD40L-exprimierenden HT1080-Zellen durch CD40ex-Flag-FasLex induzierte Zelltod durch Fas vermittelt wird. Wiederum wurden in einer Zellkultur-Platte mit 96 Vertiefungen HT1080-CD40L-YFP-Zellen über Nacht kultiviert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit 100 ng/ml CD40ex-Flag-FasLex stimuliert. Wo angegeben, wurden das CD40ex-Flag-FasLex-Reagenz zuvor mit 2 µg/ml Fas-Fc bzw. Fas-Comp vorinkubiert. Ansonsten wurde wie bei Fig. 1B bzw. 1C beschrieben verfahren. Durch Maskieren des FasL-Anteils in CD40ex-Flag-FasLex mit dem FasL-bindenden löslichen Reagenzien Fas-Fc und Fas-Comp konnte die Apoptose-Induktion auf CD40L-positiven Zellen teilweise bzw. vollständig blockiert werden.

Die vorliegende Erfindung wird durch die nachfolgenden Ausführungsbeispiele näher erläutert.

Beispiel 1

5

Konstruktion der erfindungsgemäßen Polypeptide CD40ex-Flag-FasLex und CD40ex-Flag-TRAILex.

Konstrukt (A): CD40ex-Flag-FasLex

10

NH₂-[CD40(1-192)]-[Linker mit Flag-tag]-[FasL(139-281)]-COOH

CD40(1-192): extrazelluläre Domäne des humanen CD40-Rezeptors einschließlich Leadersequenz (AA 1-192)

Linker1: Linker mit Flag-Epitope (Fettdruck)

15

GSDYKDDDDKEFGRGDSPGRGDSP

FasL(139-281): extrazelluläre Domäne des humanen FasL (AA 139-281)

Konstrukt (B): CD40ex-Flag-TRAILex

NH₂-[CD40(1-192)]-[Linker=flag-tag]-[TRAIL(95-281)]-COOH

20

CD40(1-192): extrazelluläre Domäne des humanen CD40 Rezeptors inkl. Leadersequenz (AA 1-192)

Linker1: Linker mit Flag-Epitope (Fettdruck)

GSDYKDDDDKEF

25

TRAIL(95-281): extrazelluläre Domäne des humanen TRAIL (AA 95-281)

Die Fusionsproteine wurden wie folgt hergestellt:

CD40ex-Flag-FasLex:

30

1. Die der extrazellulären Domäne des CD40-Rezeptors (Aminosäuren 1-192 inkl. Leadersequenz) entsprechende cDNA wurde mittels "proof-reading"-

PCR aus einem cDNA-Pool aktivierter B-Zellen amplifiziert. Dabei wurde mit Hilfe der verwendeten Primer (Nr.1160 und Nr.1161) am 5'-Ende des Amplikons eine Hind3-Schnittstelle eingefügt und am 3'-Ende eine BamH1-Schnittstelle. Das mit Hind3 und BamH1 verdaute Amplikon wurde dann in den gleichfalls mit Hind3 und BamH1 verdauten eukaryontischen Expressionsvektors pCR3 (Invitrogen) eingeführt.

5

2. Die der extrazellulären Domäne des FasL (Aminosäuren 139-281) entsprechende cDNA wurde mittels "proof-reading"-PCR aus einem cDNA-Pool aktivierter T-Zellen amplifiziert. Dabei wurde mit Hilfe der verwendeten Primer (Nr.1106 und Nr.1107) am 5'-Ende des Amplikons eine EcoR1-Schnittstelle eingefügt und am 3'-Ende eine Xho1-Schnittstelle. Mittels des Forward-Primers wurden des Weiteren sechs Aminosäuren als Linker eingeführt. Das mit EcoR1 und Xho1 verdaute Amplikon wurde dann in den gleichfalls mit EcoR1 und Xho1 verdaute Zwischenprodukt, das in 1. erhalten wurde, eingesetzt.

10

15

3. Abschließend wurde für analytische Zwecke zwischen die BamH1 und EcoR1-Schnittstelle des unter 2. erhaltenen Zwischenprodukts ein Flag-tag mittels Oligonukleotid-Linkern eingefügt. Das so erhaltene Konstrukt (pCR3-CD40ex-Flag-FasLex) codiert für eine Fusionsprotein mit der extrazellulären Domäne des CD40-Moleküls und der extrazellulären Domäne des Fas-Liganden, die durch einen Flag-tag sowie einigen weiteren AS verbunden sind.

20

25

CD40ex-Flag-TRAILex:

1. Die der extrazellulären Domäne von TRAIL (Aminosäuren 95-281) entsprechende cDNA wurde mittels "proof-reading"-PCR aus einem cDNA-Pool aktivierter T-Zellen amplifiziert. Dabei wurde mit Hilfe der verwendeten Primer (Nr.1302 und Nr.1334) am 5'-Ende des Amplikons eine EcoR1-Schnittstelle eingefügt und am 3'-Ende eine Xba1-Schnittstelle. Das mit

30

EcoR1 und Xba1 verdaute Amplikon wurde dann in den gleichfalls mit EcoR1 und Xba1 verdauten pCR3-CD40ex-Flag-FasL-ex Expressionsvektors eingeführt. Vor der Ligation wurde das durch den Verdau aus pCR3-CD40ex-Flag-FasL-ex freiwerdende FasL-Fragment entfernt. Das so erhaltene Konstrukt (pCR3-CD40ex-Flag-TRAILex) codiert für eine Fusionsprotein mit der extrazellulären Domäne des CD40 Moleküls und der extrazellulären Domäne des TRAIL-Moleküls, die durch einen Flag-tag sowie einigen weiteren AS verbunden sind.

10 Zur Gewinnung von CD40ex-Flag-FasLex und CD40ex-Flag-TRAILex wurden HEK293- oder Cos7-Zellen mit den oben beschriebenen Konstrukten nach Angaben des Herstellers mit Lipofektamin (Gibco-BRL) transfiziert. 48-96 Stunden nach Transfektion wurden die Fusionsprotein-Überstände sterilfiltriert und bei 4°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

15

Alle Klonierungs- und PCR-Amplifikationsschritte erfolgten nach üblichen Standardprozeduren mit den nachfolgenden Primern. Alle Konstrukte wurden zur Verifikation der cDNA-Sequenz sequenziert.

20 Primer 1106

5' CCG GAA TTC GGC CGG GGC GAC TCA CCC GGC CGG GGC GAC TCA
CCC GAA AAA AAG GAG CTG AGG AAA GTG GCC 3'

Primer 1107

5' CCG CTC GAG GTG CTT CTC TTA GAG CTT ATA TAA GCC G 3'

25 Primer 1160

5' CCC AAG CTT CTC GCC ATG GTT CGT CTG CCT CTG CAG 3'

Primer 1161

5' CGC GGA TCC CAG CCG ATC CTG GGG ACC ACA GAC 3'

Primer 1302

30 5' CCG GAA TTC TAC GCA TAT TAC ACC TCT GAG GAA ACC ATT TCT ACA
G 3'

Primer 1334

5' TGC TCT AGA CCA GGT CAG TTA GCC AAC TAA AAA GGC 3'

Beispiel 2

5

Nachweis der CD40L-abhängigen Aktivierung von CD40ex-Flag-FasLex und CD40ex-Flag-TRAILex am Beispiel von CD40L-exprimierenden Zellen (siehe auch Abb. 1A).

- 10 CD40ex-Flag-FasLex und CD40ex-Flag-TRAILex wurde wie in Beispiel 1 beschrieben bereitgestellt. CD40L-exprimierende (HT1080-CD40L; KB-CD40L-YFP) und CD40L-negative (HT1080; KB) Zellen wurden in Zellkultur-Platten mit 96 Vertiefungen über Nacht kultiviert. Am nächsten Tag wurden die Zellen in Gegenwart von CHX (2.5 µg/ml) mit den angegebenen Konzentrationen an CD40ex-Flag-
- 15 FasLex und CD40ex-Flag-TRAILex für 8 h inkubiert. Die Quantifizierung der überlebenden Zellen erfolgte mittels Kristallviolett-Färbung.

Patentansprüche

- 5 1. Polypeptid, umfassend einen Abschnitt (1), der eine Zelloberflächenmolekül-Bindungsdomäne enthält, einen Abschnitt (2), der ein Peptidlinker ist, und einen Abschnitt (3), der ein als solches biologisch inaktives/eingeschränkt aktives Fragment eines Mitglieds der TNF-Ligandenfamilie enthält, wobei die Zelloberflächenmolekül-
10 Bindungsdomäne nicht von einem Immunglobulin abgeleitet ist und das Fragment des Mitglieds der TNF-Ligandenfamilie nur durch Bindung des Abschnitts (1) an das Zelloberflächenmolekül biologisch vollständig aktiv wird.
- 15 2. Polypeptid nach Anspruch 1, wobei die Abschnitte (1) bis (3) von N- nach C-terminal angeordnet sind.
- 20 3. Polypeptid nach Anspruch 1 oder 2, wobei der Abschnitt (3) die extrazelluläre Domäne oder eine funktionelle Variante der extrazellulären Domäne oder ein funktionelles Fragment der extrazellulären Domäne des Mitglieds der TNF-Ligandenfamilie enthält.
- 25 4. Polypeptid nach Anspruch 3, wobei der Abschnitt (3) die extrazelluläre Domäne von TRAIL, FasL, TNF, 41BBL, CD40L, CD30L oder Ox40L oder eine funktionelle Variante oder ein funktionelles Fragment dieser extrazellulären Domänen enthält.
- 30 5. Polypeptid nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Zelloberflächenmolekül-Bindungsdomäne an ein Membranprotein bindet.
6. Polypeptid nach Anspruch 5, wobei die Zelloberflächenmolekül-Bindungsdomäne mindestens den für die spezifische Interaktion mit

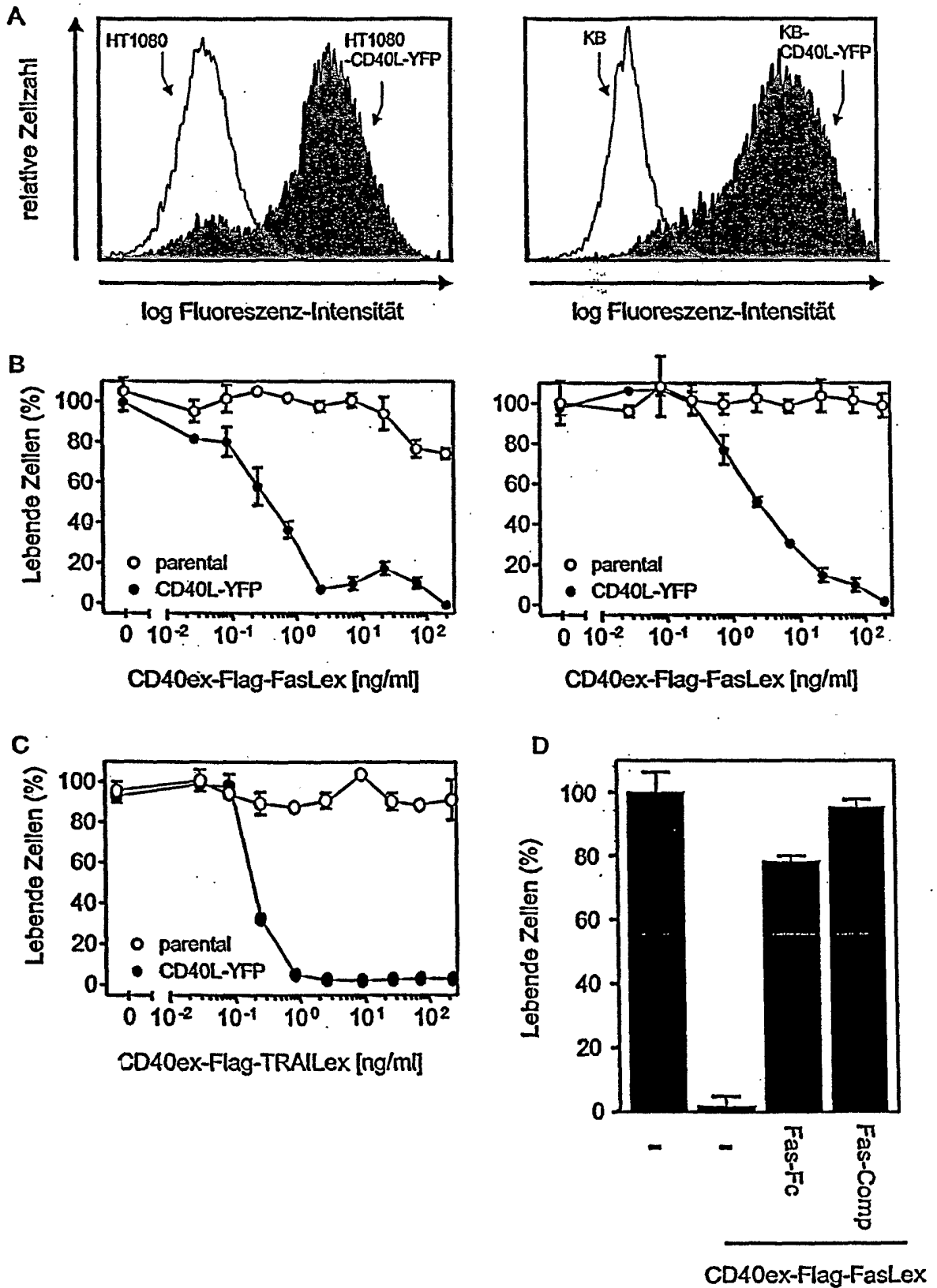
dem Zelloberflächenmolekül erforderlichen Abschnitt eines Liganden von einem membranständigen Rezeptor umfasst.

- 5 7. Polypeptid nach Anspruch 6, wobei der Ligand ein Rezeptor-bindendes Peptid- oder Proteinormon oder ein Rezeptor-bindendes Fragment eines Zytokins ist.
- 10 8. Polypeptid nach Anspruch 7, wobei das Zytokin-Fragment ein Fragment eines Mitglieds der TNF-Ligandenfamilie ist, mit der Maßgabe, dass das Mitglied der TNF-Ligandenfamilie, von dem die Abschnitte (1) und (3) stammen, unterschiedlich ist.
- 15 9. Polypeptid nach Anspruch 7, wobei das Hormon aus der Gruppe, bestehend aus Wachstumsfaktoren, insbesondere EGF, und Angiogenesefaktoren, insbesondere VEGF, ausgewählt ist.
- 20 10. Polypeptid nach Anspruch 5, wobei die Zelloberflächenmolekül-Bindungsdomäne mindestens den für die spezifische Interaktion mit dem Zelloberflächenmolekül erforderlichen Abschnitt eines Rezeptors für einen membranständigen Liganden umfasst, mit der Maßgabe, dass der Rezeptor-Abschnitt nicht an die extrazelluläre Domäne des Mitglieds der TNF-Ligandenfamilie gemäß Abschnitt (3) bindet.
- 25 11. Polypeptid nach Anspruch 10, wobei der Rezeptor aus der TNF-Rezeptor-Superfamilie ausgewählt ist.
- 30 12. Polypeptid nach Anspruch 10 oder 11, wobei der Rezeptor aus der Gruppe, bestehend aus TNF-R2, CD30, CD40 und CD28, ausgewählt ist.

13. Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend eine Nukleotidsequenz, die für ein Polypeptid nach einem der vorhergehenden Ansprüche codiert.
14. Vektor, enthaltend das Nukleinsäurekonstrukt nach Anspruch 13.
- 5
15. Wirtszelle, enthaltend das Nukleinsäurekonstrukt nach Anspruch 13 und/oder den Vektor nach Anspruch 14.
16. Verfahren zur Isolierung eines Polypeptids nach einem der Ansprüche 1 bis 12, wobei
- 10
- (a) ein Vektor gemäß Anspruch 14 oder ein Nukleinsäurekonstrukt gemäß Anspruch 13 hergestellt wird,
- (b) Zellen mit einem gemäß Verfahrensschritt (a) erhaltenen Vektor oder Nukleinsäurekonstrukt transfiziert werden,
- 15
- (c) die gemäß (b) transfizierten Zellen kultiviert werden, und
- (d) unter entsprechenden Bedingungen exprimierte Polypeptide aus den Wirtszellen und/oder dem Kulturüberstand isoliert werden.
17. Verwendung eines Polypeptids nach einem der Ansprüche 1 bis 12, eines Nukleinsäurekonstrukts nach Anspruch 13, eines Vektors nach Anspruch 14 oder einer Wirtszelle nach Anspruch 15 zur Herstellung eines Arzneimittels.
- 20
18. Verwendung eines Polypeptids nach einem der Ansprüche 1 bis 12, eines Nukleinsäurekonstrukts nach Anspruch 13, eines Vektors nach Anspruch 14 oder einer Wirtszelle nach Anspruch 15 zur Behandlung von Krebserkrankungen, insbesondere soliden oder lymphatischen Tumoren, Infektionskrankheiten, Stoffwechselerkrankungen, Entzündungszuständen, Autoimmunerkrankungen, insbesondere rheumato/arthritische
- 25
- Erkrankungen.
- 30

- 5 19. Pharmazeutische Zusammensetzung, mindestens enthaltend ein Polypeptid nach einem der Ansprüche 1 bis 12 und/oder ein Nukleinsäurekonstrukt nach Anspruch 13 und/oder einen Vektor nach Anspruch 14 und/oder Wirtszellen nach Anspruch 15 sowie pharmazeutisch unbedenkliche Hilfs-, Zusatz- und/oder Trägersubstanzen.
- 10 20. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 19 zur Behandlung von Krebserkrankungen, insbesondere soliden oder lymphatischen Tumoren, Infektionskrankheiten, Stoffwechselerkrankungen, Entzündungszuständen, Autoimmunerkrankungen, insbesondere rheumato/arthritische Erkrankungen.

Figur 1



SEQUENZPROTOKOLL**ANMELDER**

5 1. NAME: Prof. Dr. Klaus Pfizenmaier
STRASSE: Seehausstraße 7
ORT: Tiefenbronn
POSTLEITZAHL: 75233
TELEFON: 07 11/6 85 69 86
10 TELEFAX: 07 11/6 85 74 84

2. NAME: PD. Dr. Harald Wajant
STRASSE: Sonnenbühl 2
ORT: Leinfelden-Echterdingen
15 POSTLEITZAHL: 70771
TELEFON: 07 11/6 85 69 86
TELEFAX: 07 11/6 85 74 46

20 **BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG:** Selektive, lokale Aktivierung von
Mitgliedern der TNF-
Rezeptorfamilie durch systemisch
inaktive nicht-Antikörper-TNF-
Liganden-Fusionsproteine

25 **ANZAHL DER SEQUENZEN:** 2 DNA Sequenzen
2 Proteinsequenzen

COMPUTERLESBARE FASSUNG:

DATENTRÄGER: Diskette
COMPUTER: PC
30 BETRIEBSSYSTEM: MS DOS
SOFTWARE: Windows NT

Sequenzbeschreibung 1: Codierende DNA Sequenz (unten, nur codierender DNA Strang, Nukleotid (NT) 1-1080) und translatierte Aminosäuresequenz (oben, Einzelbuchstaben Kodierung der Aminosäuren (AA) 1-359) eines erfindungsgemäßen Fusionsproteins am Beispiel von CD40ex-Flag-FasL (Konstrukt A).

5

	1	M	V	R	L	P	L	Q	C	V	L	W	G	C	L	L	T	16
	1	ATG	GTT	CGT	CTG	CCT	CTG	CAG	TGC	GTC	CTC	TGG	GGC	TGC	TTG	CTG	ACC	48
10	17	A	V	H	P	E	P	P	T	A	C	R	E	K	Q	Y	L	32
	49	GCT	GTC	CAT	CCA	GAA	CCA	CCC	ACT	GCA	TGC	AGA	GAA	AAA	CAG	TAC	CTA	96
	33	I	N	S	Q	C	C	S	L	C	Q	P	G	Q	K	L	V	48
	97	ATA	AAC	AGT	CAG	TGC	TGT	TCT	TTG	TGC	CAG	CCA	GGA	CAG	AAA	CTG	GTG	144
15	49	S	D	C	T	E	F	T	E	T	E	C	L	P	C	G	E	64
	145	AGT	GAC	TGC	ACA	GAG	TTC	ACT	GAA	ACG	GAA	TGC	CTT	CCT	TGC	GGT	GAA	192
20	65	S	E	F	L	D	T	W	N	R	E	T	H	C	H	Q	H	80
	193	AGC	GAA	TTC	CTA	GAC	ACC	TGG	AAC	AGA	GAG	ACA	CAC	TGC	CAC	CAG	CAC	240
	81	K	Y	C	D	P	N	L	G	L	R	V	Q	Q	K	G	T	96
	241	AAA	TAC	TGC	GAC	CCC	AAC	CTA	GGG	CTT	CGG	GTC	CAG	CAG	AAG	GGC	ACC	288
25	97	S	E	T	D	T	I	C	T	C	E	E	G	W	H	C	T	112
	289	TCA	GAA	ACA	GAC	ACC	ATC	TGC	ACC	TGT	GAA	GAA	GGC	TGG	CAC	TGT	ACG	336
	113	S	E	A	C	E	S	C	V	L	H	R	S	C	S	P	G	128
30	337	AGT	GAG	GCC	TGT	GAG	AGC	TGT	GTC	CTG	CAC	CGC	TCA	TGC	TCG	CCC	GGC	384
	129	F	G	V	K	Q	I	A	T	G	V	S	D	T	I	C	E	144
	385	TTT	GGG	GTC	AAG	CAG	ATT	GCT	ACA	GGG	GTT	TCT	GAT	ACC	ATC	TGC	GAG	432
35	145	P	C	P	V	G	F	F	S	N	V	S	S	A	F	E	K	160
	433	CCC	TGC	CCA	GTC	GGC	TTC	TTC	TCC	AAT	GTG	TCA	TCT	GCT	TTC	GAA	AAA	480
	161	C	H	P	W	T	S	C	E	T	K	D	L	V	V	Q	Q	176
	481	TGT	CAC	CCT	TGG	ACA	AGC	TGT	GAG	ACC	AAA	GAC	CTG	GTT	GTG	CAA	CAG	528
40	177	A	G	T	N	K	T	D	V	V	C	G	P	Q	D	R	L	192
	529	GCA	GGC	ACA	AAC	AAG	ACT	GAT	GTT	GTC	TGT	GGT	CCC	CAG	GAT	CGG	CTG	576
	193	G	S	D	Y	K	D	D	D	D	K	E	F	G	R	G	D	208
45	577	GGA	TCC	GAT	TAC	AAA	GAC	GAT	GAC	GAT	AAA	GAA	TTC	GGC	CGG	GGC	GAC	624
	209	S	P	G	R	G	D	S	P	E	K	K	E	L	R	K	V	224
	625	TCA	CCC	GGC	CGG	GGC	GAC	TCA	CCC	GAA	AAA	AAG	GAG	CTG	AGG	AAA	GTG	672
	225	A	H	L	T	G	K	S	N	S	R	S	M	P	L	E	W	240
50	673	GCC	CAT	TTA	ACA	GGC	AAG	TCC	AAC	TCA	AGG	TCC	ATG	CCT	CTG	GAA	TGG	720
	241	E	D	T	Y	G	I	V	L	L	S	G	V	K	Y	K	K	256
	721	GAA	GAC	ACC	TAT	GGA	ATT	GTC	CTG	CTT	TCT	GGA	GTG	AAG	TAT	AAG	AAG	768
55	257	G	G	L	V	I	N	E	T	G	L	Y	F	V	Y	S	K	272
	769	GGT	GGC	CTT	GTG	ATC	AAT	GAA	ACT	GGG	CTG	TAC	TTT	GTA	TAT	TCC	AAA	816
	273	V	Y	F	R	G	Q	S	C	N	N	L	P	L	S	H	K	288
60	817	GTA	TAC	TTC	CGG	GGT	CAA	TCT	TGC	AAC	AAC	CTG	CCC	CTG	AGC	CAC	AAG	864

	289	V	Y	M	R	N	S	K	Y	P	Q	D	L	V	M	M	E	304
	865	GTC	TAC	ATG	AGG	AAC	TCT	AAG	TAT	CCC	CAG	GAT	CTG	GTG	ATG	ATG	GAG	912
5	305	G	K	M	M	S	Y	C	T	T	G	Q	M	W	A	R	S	320
	913	GGG	AAG	ATG	ATG	AGC	TAC	TGC	ACT	ACT	GGG	CAG	ATG	TGG	GCC	CGC	AGC	960
	321	S	Y	L	G	A	V	F	N	L	T	S	A	D	H	L	Y	336
	961	AGC	TAC	CTG	GGG	GCA	GTG	TTC	AAT	CTT	ACC	AGT	GCT	GAT	CAT	TTA	TAT	1008
10	337	V	N	V	S	E	L	S	L	V	N	F	E	E	S	Q	T	352
	1009	GTC	AAC	GTA	TCT	GAG	CTC	TCT	CTG	GTC	AAT	TTT	GAG	GAA	TCT	CAG	ACG	1056
	353	F	F	G	L	Y	K	L	*									359
15	1057	TTT	TTC	GGC	TTA	TAT	AAG	CTC	TAA									1080

□

Merkmale Konstrukt A:

20 Sequenz der extrazellulären Domäne von CD40 (AS 1-192)inkl. Leitsequenz:
NT 1-576, AA 1-192

Sequenz des „Flag“-Epitop enthaltenden Linkers zwischen den extrazellulären Domänen von CD40 und FasL: NT 577-648, AA 193-216

25 Sequenz des humanen FasL Fragments (extrazelluläre Domäne, ab AA 139-281 des natürlichen, humanen FasL Moleküls): NT 649-1077, AA 217-359

Stop Kodon: NT 1078-1080.

30

Sequenzbeschreibung 2: Codierende DNA Sequenz (unten, nur codierender DNA Strang, Nukleotid (NT) 1-1176) und translatierte Aminosäuresequenz (oben, Einzelbuchstaben Kodierung der Aminosäuren (AA) 1-391) eines erfindungsgemäßen Fusionsproteins am Beispiel von CD40ex-Flag-TRAIL (Konstrukt B).

	1	M	V	R	L	P	L	Q	C	V	L	W	G	C	L	L	T	16
40	1	ATG	GTT	CGT	CTG	CCT	CTG	CAG	TGC	GTC	CTC	TGG	GGC	TGC	TTG	CTG	ACC	48
	17	A	V	H	P	E	P	P	T	A	C	R	E	K	Q	Y	L	32
	49	GCT	GTC	CAT	CCA	GAA	CCA	CCC	ACT	GCA	TGC	AGA	GAA	AAA	CAG	TAC	CTA	96
45	33	I	N	S	Q	C	C	S	L	C	Q	P	G	Q	K	L	V	48
	97	ATA	AAC	AGT	CAG	TGC	TGT	TCT	TTG	TGC	CAG	CCA	GGA	CAG	AAA	CTG	GTG	144
	49	S	D	C	T	E	F	T	E	T	E	C	L	P	C	G	E	64
	145	AGT	GAC	TGC	ACA	GAG	TTC	ACT	GAA	ACG	GAA	TGC	CTT	CCT	TGC	GGT	GAA	192
50	65	S	E	F	L	D	T	W	N	R	E	T	H	C	H	Q	H	80

	193	AGC GAA TTC CTA GAC ACC TGG AAC AGA GAG ACA CAC TGC CAC CAG CAC	240
	81	K Y C D P N L G L R V Q Q K G T	96
5	241	AAA TAC TGC GAC CCC AAC CTA GGG CTT CGG GTC CAG CAG AAG GGC ACC	288
	97	S E T D T I C T C E E G W H C T	112
	289	TCA GAA ACA GAC ACC ATC TGC ACC TGT GAA GAA GGC TGG CAC TGT ACG	336
10	113	S E A C E S C V L H R S C S P G	128
	337	AGT GAG GCC TGT GAG AGC TGT GTC CTG CAC CGC TCA TGC TCG CCC GGC	384
	129	F G V K Q I A T G V S D T I C E	144
	385	TTT GGG GTC AAG CAG ATT GCT ACA GGG GTT TCT GAT ACC ATC TGC GAG	432
15	145	P C P V G F F S N V S S A F E K	160
	433	CCC TGC CCA GTC GGC TTC TTC TCC AAT GTG TCA TCT GCT TTC GAA AAA	480
	161	C H P W T S C E T K D L V V Q Q	176
20	481	TGT CAC CCT TGG ACA AGC TGT GAG ACC AAA GAC CTG GTT GTG CAA CAG	528
	177	A G T N K T D V V C G P Q D R L	192
	529	GCA GGC ACA AAC AAG ACT GAT GTT GTC TGT GGT CCC CAG GAT CGG CTG	576
	193	G S D Y K D D D D K E F T S E E	208
25	577	GGA TCC GAT TAC AAA GAC GAT GAC GAT AAA GAA TTC ACC TCT GAG GAA	624
	209	T I S T V Q E K Q Q N I S P L V	224
	625	ACC ATT TCT ACA GTT CAA GAA AAG CAA CAA AAT ATT TCT CCC CTA GTG	672
30	225	R E R G P Q R V A A H I T G T R	240
	673	AGA GAA AGA GGT CCT CAG AGA GTA GCA GCT CAC ATA ACT GGG ACC AGA	720
	241	G R S N T L S S P N S K N E K A	256
35	721	GGA AGA AGC AAC ACA TTG TCT TCT CCA AAC TCC AAG AAT GAA AAG GCT	768
	257	L G R K I N S W E S S R S G H S	272
	769	CTG GGC CGC AAA ATA AAC TCC TGG GAA TCA TCA AGG AGT GGG CAT TCA	816
40	273	F L S N L H L R N G E L V I H E	288
	817	TTC CTG AGC AAC TTG CAC TTG AGG AAT GGT GAA CTG GTC ATC CAT GAA	864
	289	K G F Y Y I Y S Q T Y F R F Q E	304
	865	AAA GGG TTT TAC TAC ATC TAT TCC CAA ACA TAC TTT CGA TTT CAG GAG	912
45	305	E I K E N T K N D K Q M V Q Y I	320
	913	GAA ATA AAA GAA AAC ACA AAG AAC GAC AAA CAA ATG GTC CAA TAT ATT	960
	321	Y K Y T S Y P D P I L L M K S A	336
50	961	TAC AAA TAC ACA AGT TAT CCT GAC CCT ATA TTG TTG ATG AAA AGT GCT	1008
	337	R N S C W S K D A E Y G L Y S I	352
	1009	AGA AAT AGT TGT TGG TCT AAA GAT GCA GAA TAT GGA CTC TAT TCC ATC	1056
	353	Y Q G G I F E L K E N D R I F V	368
55	1057	TAT CAA GGG GGA ATA TTT GAG CTT AAG GAA AAT GAC AGA ATT TTT GTT	1104
	369	S V T N E H L I D M D H E A S F	384
	1105	TCT GTA ACA AAT GAG CAC TTG ATA GAC ATG GAC CAT GAA GCC AGT TTT	1152
60	385	F G A F L V G *	391
	1153	TTC GGG GCC TTT TTA GTT GGC TAA	1176

□

Merkmale Konstrukt B:

Sequenz der extrazellulären Domäne von CD40 (AS 1-192) inkl. Leitsequenz:
NT 1-576, AA 1-192

5

Sequenz des „Flag“-Epitop enthaltenden Linkers zwischen den extrazellulären Domänen von CD40 und TRAIL: NT 577-612, AA 193-204

10 Sequenz des humanen FasL Fragments (extrazelluläre Domäne, ab AA 139-281 des natürlichen, humanen FasL Moleküls): NT 613-1173, AA 205-391

Stop Kodon: NT 1174-1176.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 03/11357

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/62 C07K14/525 C07K14/705 A61K47/48 C12N1/19
C12N5/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 02 22680 A (WUEEST THOMAS ;PFIZENMAIER KLAUS (DE); WAJANT HARALD (DE); MOOSMAY) 21 March 2002 (2002-03-21) page 3, line 4-31; claims 1-18 ---	1-20
A	WO 02 22833 A (PFIZENMAIER KLAUS ;GRELL MATTHIAS (DE); SCHEURICH PETER (DE); UNIV) 21 March 2002 (2002-03-21) page 1, last paragraph -page 3, last paragraph; claims 1-29 ---	1-20
A	XIANG J: "TARGETING CYTOKINES TO TUMORS TO INDUCE ACTIVE ANTITUMOR IMMUNE RESPONSES BY RECOMBINANT FUSION PROTEINS" HUMAN ANTIBODIES, AMSTERDAM, NL, vol. 9, 1996, pages 23-36, XP000940526 ISSN: 1093-2607 the whole document ---	1

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 February 2004

Date of mailing of the international search report

01/03/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Huber, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 03/11357

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>WAJANT H ET AL: "DIFFERENTIAL ACTIVATION OF TRAIL-R1 AND -2 BY SOLUBLE AND MEMBRANE TRAIL ALLOWS SELECTIVE SURFACE ANTIGEN-DIRECTED ACTIVATION OF TRAIL-R2 BY A SOLUBLE TRAIL DERIVATIVE" ONCOGENE, BASINGSTOKE, HANTS, GB, vol. 20, no. 30, 2001, pages 4101-4106, XPO01062620 ISSN: 0950-9232 Zusammenfassung; S. 4106, linke Spalte, letzter Absatz bis S. 4106, rechte Spalte, erster Absatz</p>	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

EP0311357

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although claim 18 relates to a method for treatment of the human or animal body, the search was carried out and was based on the stated effects of the compound or composition.

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

- Remark on Protest**
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP 03/11357

Patent document cited in search report	A	Publication date		Patent family member(s)	Publication date
WO 0222680	A	21-03-2002	DE	10045591 A1	04-04-2002
			AU	1816302 A	26-03-2002
			WO	0222680 A2	21-03-2002
			EP	1317488 A2	11-06-2003
WO 0222833	A	21-03-2002	DE	10045592 A1	28-03-2002
			AU	9381901 A	26-03-2002
			BG	107613 A	31-12-2003
			BR	0113928 A	22-07-2003
			CA	2422759 A1	17-03-2003
			CN	1458977 T	26-11-2003
			WO	0222833 A1	21-03-2002
			EP	1317556 A1	11-06-2003
			HU	0301693 A2	28-08-2003
			NO	20031185 A	05-05-2003
			SK	2812003 A3	04-11-2003

INTERNATIONALER RESEARCHENBERICHT

Internationaler Aktenzeichen
PCT/EP 03/11357

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
 IPK 7 C12N15/62 C07K14/525 C07K14/705 A61K47/48 C12N1/19
 C12N5/10

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RESEARCHIERTE GEBIETE

Recherchiertes Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
 IPK 7 C07K A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)
 EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE, PAJ

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 02 22680 A (WUEEST THOMAS ;PFIZENMAIER KLAUS (DE); WAJANT HARALD (DE); MOOSMAY) 21. März 2002 (2002-03-21) Seite 3, Zeile 4-31; Ansprüche 1-18 ---	1-20
A	WO 02 22833 A (PFIZENMAIER KLAUS ;GRELL MATTHIAS (DE); SCHEURICH PETER (DE); UNIV) 21. März 2002 (2002-03-21) Seite 1, letzter Absatz -Seite 3, letzter Absatz; Ansprüche 1-29 ---	1-20
A	XIANG J: "TARGETING CYTOKINES TO TUMORS TO INDUCE ACTIVE ANTITUMOR IMMUNE RESPONSES BY RECOMBINANT FUSION PROTEINS" HUMAN ANTIBODIES, AMSTERDAM, NL, Bd. 9, 1996, Seiten 23-36, XP000940526 ISSN: 1093-2607 das ganze Dokument ---	1

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

- *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
- *T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- *X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- *Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- *Z* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absenddatum des internationalen Recherchenberichts
10. Februar 2004	01/03/2004
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter Huber, A

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Ver6ffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>WAJANT H ET AL: "DIFFERENTIAL ACTIVATION OF TRAIL-R1 AND -2 BY SOLUBLE AND MEMBRANE TRAIL ALLOWS SELECTIVE SURFACE ANTIGEN-DIRECTED ACTIVATION OF TRAIL-R2 BY A SOLUBLE TRAIL DERIVATIVE" ONCOGENE, BASINGSTOKE, HANTS, GB, Bd. 20, Nr. 30, 2001, Seiten 4101-4106, XP001062620 ISSN: 0950-9232 Zusammenfassung; S. 4106, linke Spalte, letzter Absatz bis S. 4106, rechte Spalte, erster Absatz</p>	1

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 03/11357

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
Obwohl sich Anspruch 18 auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.
2. Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

INTERNATIONALER RESEARCHBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationalen Kennzeichen

PCT/EP 03/11357

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 0222680 A	21-03-2002	DE 10045591 A1	04-04-2002
		AU 1816302 A	26-03-2002
		WO 0222680 A2	21-03-2002
		EP 1317488 A2	11-06-2003
WO 0222833 A	21-03-2002	DE 10045592 A1	28-03-2002
		AU 9381901 A	26-03-2002
		BG 107613 A	31-12-2003
		BR 0113928 A	22-07-2003
		CA 2422759 A1	17-03-2003
		CN 1458977 T	26-11-2003
		WO 0222833 A1	21-03-2002
		EP 1317556 A1	11-06-2003
		HU 0301693 A2	28-08-2003
		NO 20031185 A	05-05-2003
		SK 2812003 A3	04-11-2003