



(10) **DE 690 17 753 T3** 2013.06.20

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

(97) **EP 0 398 327 B2**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **690 17 753.4**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **90 10 9337.7**

(96) Europäischer Anmeldetag: **17.05.1990**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **22.11.1990**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **15.03.1995**

(97) Veröffentlichungstag

des geänderten Patents beim EPA: **20.02.2013**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **20.06.2013**

(51) Int Cl.: **C12P 21/02** (2011.01)

C12N 15/12 (2011.01)

C12P 21/08 (2011.01)

A61K 38/16 (2011.01)

G01N 33/68 (2011.01)

G01N 33/577 (2011.01)

Patentschrift wurde im Einspruchsverfahren geändert

(30) Unionspriorität:

90339 **18.05.1989** **IL**

91229 **06.08.1989** **IL**

94039 **06.04.1990** **IL**

(73) Patentinhaber:

**Yeda Research and Development Co., Ltd., 76100,
Rehovot, IL**

(74) Vertreter:

Vossius & Partner, 81675, München, DE

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

**Wallach, David, Rehovot, IL; Engelmann, Hartmut,
W-8000, München 70, DE; Aderka, Dan, Holon,
IL; Novick, Daniela, Rehovot, IL; Rubinstein,
Menachem, Givat Shmuel, IL**

(54) Bezeichnung: **Tumor-Nekrosefaktor-Bindungsprotein II, seine Reinigung und spezifische Antikörper**

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 die in den Ansprüchen definierten Ausführungsformen. Daher betrifft die Erfindung Tumor-Nekrosefaktor (TNF)-Bindungsprotein II (TBP-II) in im Wesentlichen gereinigter Form, das die folgenden Merkmale aufweist:

- (a) es hemmt den cytotoxischen Effekt von TNF; und
- (b) es enthält die folgende Aminosäuresequenz:
Thr-Pro-Tyr-Ala-Pro-Glu-Pro-Gly-Ser-Thr;

oder Salze, funktionelle Derivate, Vorläufer oder aktive Fraktionen davon oder Gemische von diesen, wobei die Salze, funktionellen Derivate, Vorläufer, aktiven Fraktionen oder Gemische die Fähigkeit haben, den cytotoxischen Effekt von TNF auf Zellen zu hemmen. Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Aufreinigung von TBP-II sowie das im Wesentlichen gereinigte Protein wie in den Ansprüchen definiert, seine Clonierung und Produktion mittels DNA-Rekombinationstechniken. Die Erfindung betrifft auch gegen TBP-II gerichtete Antikörper und F(ab)Fragmente davon wie in den Ansprüchen definiert. Sie betrifft weiter die Verwendung von TBP-II, Salzen, funktionellen Derivaten, Vorläufern aktiven Fraktionen davon und/oder Gemischen von diesen und die wie in den Ansprüchen definierte Verwendung der Antikörper.

[0002] Der Tumor-Nekrosefaktor (TNF- α) und Lymphotoxin (TNF- β) (nachstehend bedeutet TNF sowohl TNF- α als auch TNF- β) sind Cytokine, die auf die Zellen zahlreiche Wirkungen ausüben (Wallach, D., in: Interferon 7 (Herausgeber Ion Gresser), (1986), S. 83–122, Academic Press, London; Beutler, B. and Cerami, A., New England J. Med., 316 (1987), 379–385). Sowohl die Wirkung von TNF- α als auch von TNF- β wird durch ihre Bindung an bestimmte Zelloberflächen-Rezeptoren eingeleitet. Einige Wirkungen sind für den Organismus wahrscheinlich günstig: sie können beispielsweise Tumorzellen oder virusinfizierte Zellen zerstören und die antibakterielle Aktivität der Granulocyten erhöhen. Auf diese Weise trägt TNF zur Abwehr des Organismus gegen infektiöse Krankheitserreger und zur Genesung bei Verletzungen bei. Ziemlich deutlich besitzt jedoch sowohl TNF- α als auch TNF- β in beträchtlichem Maße schädliche Wirkungen. Es gibt Beweise, dass eine Überproduktion von TNF- α bei mehreren Krankheiten eine bedeutende pathogene Rolle spielen kann. Es ist heute bekannt, dass die Wirkungen, die TNF- α hauptsächlich auf das Blutgefäßsystem ausübt, eine Hauptursache für die Symptome des septischen Schocks sind (Tracey, K. J. et al., Science, 234 (1986), 470–474). Bei einigen Krankheiten kann TNF einen übermäßigen Gewichtsverlust (Kachexie) verursachen, indem es die Aktivität von Fettzellen unterdrückt und Appetitlosigkeit hervorruft. TNF- α wurde daher als Cachectin bezeichnet. Es wurde auch als Vermittler des bei rheumatischen Krankheiten auftretenden Gewebeschadens (Beutler, vorstehend) und als Hauptvermittler der bei Transplantat-Wirt-Abstoßungs-Reaktionen beobachteten Schäden beschrieben.

[0003] Es besteht daher die Notwendigkeit, Wege zur Ausschaltung oder zur Bekämpfung von endogen gebildetem oder exogen verabreichtem TNF zu finden. Ein Versuch in diese Richtung war die Isolierung eines ersten als TBP-I bezeichneten TNF-Bindungsproteins aus menschlichem Urin, bei dem gezeigt wurde, dass es die TNF-Wirkungen bekämpfen kann. Diese gegen TNF gerichtete Wirkung wurde bestimmt, indem sowohl die Verringerung der cytotoxischen TNF-Aktivität als auch die Hemmung der TNF-Bindung an seine Rezeptoren gemessen wurden.

[0004] Das Protein TBP-I wurde zum ersten Mal in der am 22. März 1989 veröffentlichten Europäischen Patentanmeldung EP 308,378 beschrieben, die von den Erfindern der vorliegenden Erfindung stammt und ein Verfahren für seine Aufreinigung zur Homogenität aus menschlichem Urin mit Hilfe von CM-Sepharose-Chromatographie, gefolgt von einer Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) auf Mono-Q- und Mono-S-Säulen und Umkehrphasen-HPLC, offenbart. Das so gewonnene homogene TBP-I-Protein besaß ein relatives Molekulargewicht von etwa 27000 D, das durch Natriumdodecylsulfat (SDS)-Polyacrylamid-Gelelektrophorese sowohl unter reduzierenden als auch nichtreduzierenden Bedingungen bestimmt wurde. Die Homogenität des gereinigten Proteins wurde durch eine Mikrosequenzanalyse bestätigt, die eine einzige N-terminale Sequenz zeigte: Asp-Ser-Val-Cys-Pro. Eine teilweise Aufreinigung von TNF- α -Bindungsproteinen, die offensichtlich TBP-I ähnlich sind, wurde auch von Brockhaus et al., 2nd Int. Conf. on TNF and Related Cytokines, (15.–20. Januar 1989), Abstract WA 140, beschrieben. Homann et al., (1989), *ibid.*, Abstract WA 143, berichten über Vernetzungsexperimente mit Rezeptorproteinen von TNF- α , beschreiben jedoch nicht die Isolierung und Reinigung solcher Proteine.

[0005] Es zeigte sich, dass TBP-I in Konzentrationen von wenigen Nanogramm pro ml Zellen vor den toxischen TNF-Wirkungen schützt und sowohl die Bindung von TNF- α als auch die von TNF- β bei gleichzeitiger Anwendung mit diesen Cytokinen hemmt.

[0006] Eine weitere Untersuchung des Funktionsmechanismus von TSP-I zeigte, dass TBP-I keine Wechselwirkung mit der Zielzelle eingeht, sondern die Funktion von TNF vielmehr durch spezifische TNF-Bindung blockiert und daher mit dem TNF-Rezeptor um TNF konkurriert.

[0007] Aufgrund dieses Ergebnisses haben die Erfinder der vorliegenden Erfindung einen anderen Weg zur TBP-I-Aufreinigung gewählt. Dabei wurden Proteine aus Urin oder Fraktionen davon auf eine Säule, die immobilisiertes TNF enthielt, aufgetragen und nach der Entfernung von nichtgebundenen Proteinen wurden die an die Säule gebundenen Proteine durch Herabsetzung des pH-Werts in biologisch aktiver Form eluiert. Bei einer SDS-PAGE-Analyse wanderten die meisten Proteine aus dem Eluat als einzelne breite Bande mit einem relativen Molekulargewicht von 30000 ± 2000 D.

[0008] Bei weiterer Fraktionierung mittels Umkehrphasen-HPLC zeigten die aus der TNF-Säule eluierenden Proteine, dass zwei aktive Bestandteile vorhanden waren: ein Bestandteil, TBP-I, eluierte wie erwartet bei 27% Acetonitril, und ein zweites TNF-Bindungsprotein eluierte außerdem bei einer etwas höheren Acetonitril-Konzentration (31%). Dieses TNF-Bindungsprotein ist neu und wird in der vorliegenden Erfindung als TBP-II bezeichnet. Beide Proteine bieten Schutz gegen die cytotoxische in vitro-Wirkung von TNF und binden TNF- β weniger wirksam als TNF- α . Obwohl die beiden Proteine TBP-I und TBP-II bei SDS-PAGE-Analyse eine sehr ähnliche Molekülgröße zu besitzen schienen, ließen sie sich durch das Fehlen immunologischer Kreuzreaktivität, unterschiedliche N-terminale Aminosäuresequenzen und unterschiedliche Aminosäure-Zusammensetzung leicht unterscheiden.

[0009] Die vorliegende Erfindung stellt ein Tumor-Nekrosefaktor (TNF)-Bindungsprotein II (TBP-II) in im Wesentlichen gereinigter Form, das die folgenden Merkmale aufweist:

- (a) es hemmt den cytotoxischen Effekt von TNF; und
- (b) es enthält die folgende Aminosäuresequenz:
Thr-Pro-Tyr-Ala-Pro-Glu-Pro-Gly-Ser-Thr;

oder Salze, funktionelle Derivate, Vorläufer oder aktive Fraktionen davon oder Gemische von diesen, wobei die Salze, funktionellen Derivate, Vorläufer, aktiven Fraktionen oder Gemische die Fähigkeit haben, den cytotoxischen Effekt von TNF auf Zellen zu hemmen, bereit. Die gegen TNF gerichtete Wirkung wird bestimmt, indem man die Verringerung der cytotoxischen Aktivität von TNF, nicht jedoch die Aktivitätsverringern anderer Verbindungen, die ähnliche Aktivitäten wie TNF besitzen, wie z. B. menschliches Interleukin-1 (IL-1), selektiv misst.

[0010] Die Erfindung betrifft TBP-II in einer im Wesentlichen gereinigten Form, die keine Proteinverunreinigungen enthält und die in der Umkehrphasen-HPLC als einzelner Peak wandert.

[0011] Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Aufreinigung von TBP-II aus menschlichen Körperflüssigkeiten, wie z. B. Urin.

[0012] Ein anderes Ziel der Erfindung ist die Herstellung von TBP-II mit Hilfe von DNA-Rekombinationstechniken, umfassend die Herstellung von DNA-Sequenzen, die TBP-II und ein dazu im Wesentlichen homologes Protein codieren, die Konstruktion von Expressionsvektoren, die die DNA-Sequenzen umfassen, und von Wirtszellen, die damit transformiert sind, sowie die Züchtung der transformierten Zellen in einem geeigneten Kulturmedium zur Herstellung des rekombinanten TBP-II-Proteins oder eines dazu im Wesentlichen homologen Proteins.

[0013] Ein weiteres Ziel der Erfindung ist die Bereitstellung von TBP-II-spezifischen Antikörpern und F(ab)-Fragmenten davon, die zur Diagnose und in Arzneimitteln sowohl zur Hemmung der toxischen TNF-Wirkungen als auch zur Nachahmung der günstigen TNF-Wirkungen auf die Zelle verwendet werden können.

[0014] Das erfindungsgemäße TBP-II-Protein und seine Salze, funktionellen Derivate, Vorläufer und aktiven Fraktionen davon sowie Gemische von diesen können bei gemeinsamer Verwendung mit TNF als Arzneimittel-Wirkstoffe zum Schutz von Säugern vor den schädlichen Wirkungen von TNF und/oder zur Aufrechterhaltung seiner verlängerten günstigen Wirkungen verwendet werden.

[0015] Die Figuren zeigen:

[0016] [Fig. 1](#) zeigt das Elutionsmuster von TNF-Bindungsproteinen aus Urin auf einer Umkehrphasen-HPLC-Säule.

[0017] [Fig. 2](#) zeigt eine SDS-PAGE-Analyse von Roh- und gereinigten TBP-I – und TBP-II-Präparaten.

[0018] [Fig. 3](#) stellt die Sequenzen mehrerer tryptischer TBP-II-Peptide dar.

[0019] [Fig. 4](#) zeigt die mit den beiden TBP-Arten im ELISA-Test erzielten Ergebnisse bezüglich der Bindung von Antisera, die gegen TBP-1 und TBP-II gerichtet sind.

[0020] [Fig. 5](#) zeigt die Hemmung der TNF-Bindung an verschiedene Zelllinien durch Antisera, die gegen TBP-I und TBP-II gerichtet sind.

[0021] [Fig. 6](#) zeigt die TBP-II-Mengen in den Seren von gesunden Personen und Patienten mit systemischem Lupus erythematosus (SLE).

[0022] [Fig. 7](#) zeigt die Wirkungen verschiedener Konzentrationen von TBP-II bei der Aufrechterhaltung der verlängerten günstigen Wirkung von TNF als Stimulator des Fibroblasten-Wachstums (FS11-Zellen).

[0023] [Fig. 8](#) zeigt die zeitabhängigen TBP-II-Wirkungen auf die biologische TNF-Aktivität.

[0024] Die vorliegende Erfindung stellt das TNF-Bindungsprotein TBP-II, Salze, funktionelle Derivate, Vorläufer und aktive Fraktionen davon sowie Gemische aus diesen bereit, wie in den Ansprüchen definiert, die die cytotoxische Wirkung von TNF selektiv hemmen und/oder seine verlängerten günstigen Wirkungen aufrechterhalten.

[0025] Erfindungsgemäß wurde festgestellt, dass TBP-II die cytotoxische TNF-Aktivität hemmen kann und daher umfasst die vorliegende Erfindung die Hemmung der cytotoxischen TNF-Wirkungen durch TBP-II. Ferner wurde festgestellt, dass TBP-II zusätzlich eine Rolle als spezifischer Trägerstoff spielt, der TNF bindet und seine verlängerten günstigen Wirkungen aufrechterhält. Der Komplex TBP-II-gebundenes TNF wirkt daher möglicherweise als Speicher, der für eine verzögerte Abgabe von aktivem TNF an die Zielzellen sorgt. Die vorliegende Erfindung umfasst auch diesen Aspekt durch gemeinsame Verwendung von TBP-II, wie in den Ansprüchen definiert, in geringen Mengen und von TNF zur Förderung der verlängerten günstigen TNF-Wirkungen, wie z. B. der gegen Tumoren gerichteten, antiviralen, antibakteriellen, antiparasitischen oder das Wachstum von Fibroblasten stimulierenden Wirkung. In diesem Fall kann das Gemisch mehrere klinische Anwendungen haben, wie z. B. Förderung der Wundheilung.

[0026] Das erfindungsgemäße TBP-II wurde aus menschlichem Urin isoliert. Das weitgehend gereinigte Protein, das im Wesentlichen keine Proteinverunreinigungen enthält, besitzt bei SDS-PAGE-Analyse unter reduzierenden Bedingungen ein Molekulargewicht von etwa 30 kDa und läuft in der Umkehrphasen-HPLC als einzelner Peak. Seine Aktivität wurde mittels seiner Fähigkeit zur Hemmung der cytotoxischen Wirkung von TNF- α auf Maus-A9-Zellen ermittelt.

[0027] TBP-II ist weiter durch die folgende Sequenz charakterisiert, die durch Analyse der N-terminalen Proteinsequenz erhalten wurde:

Ala-Gln-Val-Ala-Phe-Thr-Pro-Tyr-Ala-Pro-Glu-Pro-Gly-Ser-Thr-Cys-Arg-Leu-Arg-Glu-Tyr-Tyr-Asp-Gln-Thr-Ala-Gln-Met-Cys-Cys-

[0028] Tatsächlich wurde in der TBP-II-Probe festgestellt, dass die N-terminalen Sequenzen heterogen sind. In allen Experimenten wurden verkürzte Formen dieser Sequenz gefunden. Die Mengen der verschiedenen verkürzten Sequenzen und das Verhältnis zueinander variierte von Versuchsansatz zu Versuchsansatz. Zusammen mit der vorstehend angegebenen Sequenz wurden eine um fünf Aminosäuren verkürzte Sequenz: Thr-Pro-Tyr-Ala-Pro-Glu-Pro-Gly-Ser-Thr ...

und eine Sequenz, der nur vier terminale Aminosäuren fehlten, gefunden:

Phe-Thr-Pro-Tyr-Ala-Pro-Gly-Pro-Gly-Ser-Thr ...

[0029] Die vorliegende Erfindung umfasst sowohl ein nachstehend als TBP-II bezeichnetes Protein mit der vorstehenden Sequenz als auch beliebige andere Polypeptide, bei denen eine oder mehrere Aminosäure(n) in der Struktur von natürlichem TBP-II deletiert oder durch andere Aminosäuren ersetzt ist/sind bzw. eine oder mehrere zusätzliche Aminosäure(n) vorhanden ist/sind, sofern sie die Aktivität von menschlichem TBP-II besitzen.

[0030] Die vorliegende Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Isolierung von TBP-II aus einer menschlichen Körperflüssigkeit, z. B. Urin, und seine Aufreinigung. In einer bevorzugten Ausführungsform wird das im Wesentlichen gereinigte erfindungsgemäße Protein durch ein Verfahren hergestellt, umfassend:

- a) Gewinnen der Rohproteinfraktion aus einem dialysierten Konzentrat von menschlichem Urin gesunder Versuchspersonen;
- b) Durchführung einer Affinitätschromatographie mit der Rohproteinfraktion von Schritt (a) auf einer Säule mit immobilisiertem TNF;
- c) Durchführung einer Umkehrphasen-HPLC mit den affinitätsgereinigten aktiven TNF-Bindungsproteinen von Schritt (b) zum Erhalt von im Wesentlichen gereinigten aktiven Fraktionen der TNF-Bindungsproteine, die durch ihre Fähigkeit zur Hemmung der cytotoxischen TNF-Wirkung definiert sind;
- d) Abtrennen der im Wesentlichen gereinigten Proteine von Schritt (c), die bei SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen ein Molekulargewicht von etwa 30 kDa haben, in der Umkehrphasen-HPLC als ein einzelner Peak laufen und die Fähigkeit zur Hemmung der cytotoxischen TNF-Wirkung besitzen; und
- e) Gewinnen der Fraktionen, die bei 31% Acetonitril eluieren und im Wesentlichen gereinigtes TBP-II enthalten.

[0031] Die Erfindung betrifft weiter die Herstellung von TBP-II mit Hilfe von gentechnischen Verfahren und umfasst alle bei diesen Verfahren verwendeten Hilfsmittel. Die Erfindung betrifft daher DNA-Moleküle, die die Nucleotidsequenz umfassen, die TBP-II oder ein dazu im Wesentlichen homologes Protein codiert. Diese DNA-Moleküle können genomische DNA, cDNA, synthetische DNA oder Kombinationen davon sein. Die Clonierung von TBP-II kann mit Hilfe verschiedener Verfahren durchgeführt werden. Gemäß einer Verfahrensweise werden gegen TBP-II gerichtete spezifische polyclonale oder monoclonale Antikörper hergestellt und mittels Immunfluoreszenzverfahren oder Western-Blot-Analyse zur Suche nach TBP-II produzierenden Zellen verwendet. Danach wird aus den TBP-II produzierenden Zellen mRNA extrahiert und in cDNA umgewandelt, indem sie mit reverser Transkriptase für einen zur cDNA-Bildung geeigneten Zeitraum unter dafür geeigneten Bedingungen in Kontakt gebracht wird. Die cDNA wird in einen Expressionsvektor, wie z. B. lambda gt 11, cloniert und unter Verwendung der Antikörper untersucht. Der Expressionsvektor lambda gt 11 kann verwendet werden, um DNA bis zu einer Länge von 7 kb an einer nur einmal vorhandenen EcoRI-Restriktionsstelle zu inserieren, die sich 53 Basen stromaufwärts vom Stoppcodon des β -Galactosidase-Gens befindet. Daher können Fremd-DNA-Sequenzen in diese Restriktionsstelle inseriert und unter geeigneten Bedingungen als Fusionsprotein exprimiert werden. Der Expressionsvektor lambda gt 11 lässt sich besonders zur Konstruktion einer cDNA-Genbank verwenden, die mit Antikörper-Sonden untersucht werden soll (Huynh, T. V. et al., in: DNA Cloning Techniques: A Practical Approach, (Herausgeber David Glover), (1984), S. 49–78, IRL Press, Oxford).

[0032] Bei einer anderen Verfahrensweise wird ein synthetisches Oligodesoxyribonucleotid oder ein Gemisch aus synthetischen Oligodesoxyribonucleotiden hergestellt, dessen/deren Sequenz(en) aus der Aminosäuresequenz eines Proteinfragments abgeleitet ist/sind, z. B. der N-terminalen Aminosäuresequenz, und als Sonde (n) zur Clonierung der TBP-II codierenden cDNA oder genomischen DNA verwendet. Geeignete DNA-Präparate, wie z. B. menschliche genomische DNA, werden mit Hilfe von Restriktionsenzymen enzymatisch gespalten oder in Zufallsfragmente gesichert und die Fragmente werden zur Erzeugung einer Genbank in geeignete rekombinante Vektoren inseriert. Diese Vektoren können dann mit synthetischen Oligodesoxyribonucleotid-Sonden zum Nachweis TBP-II-codierender Sequenzen gescreent werden.

[0033] In einer anderen Ausführungsform wird mRNA aus TBP-II exprimierenden Zellen isoliert und wird, wie vorstehend beschrieben, nach Aufreinigung in cDNA umgewandelt. Die cDNA wird mit Hilfe bekannter Verfahren in doppelsträngige cDNA umgewandelt und cloniert. Die sich daraus ergebenden Clone werden mit einer geeigneten Sonde auf die cDNA hin gescreent, die die gewünschten Sequenzen codiert. Wenn der gewünschte Clon einmal isoliert ist, kann die cDNA im Wesentlichen auf die gleiche Weise manipuliert werden wie genomische DNA. Die cDNA enthält jedoch keine Introns oder zwischen den Exons liegende Sequenzen.

[0034] Die vorliegende Erfindung betrifft auch synthetische Oligodesoxyribonucleotide, die als Sonden für TBP-II codierende DNA verwendet werden. Sie werden mit Hilfe bekannter Verfahren auf der Basis der Aminosäuresequenzen von TBP-II-Fragmenten synthetisiert. Dazu kann man entweder eine Sequenzanalyse des vollständigen TBP-II-Proteins durchführen oder Peptidfragmente davon gewinnen und ihre Aminosäuresequenz charakterisieren. Zur Gewinnung der Peptidfragmente werden gereinigte Proteinpräparate in Fragmente zerlegt, z. B. durch Spaltung mit Proteasen, wie Trypsin, Chymotrypsin oder Papain, wobei man Verfahren, die auf dem Fachgebiet bekannt sind (Oike, Y. et al., J. Biol. Chem., 257 (1982), 9751–9758), verwendet. Die Fragmente werden durch Umkehrphasen-HPLC getrennt und mit Hilfe von automatisierten Aminosäuresequenzierungs-Verfahren sequenziert.

[0035] Sobald ein oder mehrere geeignete(s) Peptidfragment(e) sequenziert worden ist/sind oder eine Protein-Teilsequenz bestimmt worden ist, werden die DNA-Sequenzen untersucht, die die Fragmente codieren können. Aufgrund der Degeneration des genetischen Codes kann mehr als ein Codon zur Codierung einer bestimmten Aminosäure verwendet werden und ein oder mehrere unterschiedliche Oligodesoxyribonucleotid (e) kann/können hergestellt werden, wobei jedes davon die TBP-II-Peptidfragmente codieren könnte (Watson, J. D., in : *Molecular Biologie of the Gene*, 3. Ausgabe, (1977), S. 356–357, W. A. Benjamin, Inc. Menlo Park, Kalifornien). Jedoch nur ein Oligodesoxyribonucleotid des Satzes enthält die Nucleotidsequenz, die mit der Nucleotidsequenz des Gens identisch ist. Seine Gegenwart im Satz und seine Fähigkeit zur DNA-Hybridisierung selbst in Gegenwart der anderen Oligodesoxyribonucleotide des Satzes ermöglichen es, einen nichtfraktionierten Oligodesoxyribonucleotiden-Satz in der gleichen Weise anzuwenden, in der man ein einzelnes Oligodesoxyribonucleotid zur Clonierung des Gens verwenden würde, das das Peptid codiert. Durch die Verwendung eines solchen Oligodesoxyribonucleotides oder eines Oligodesoxyribonucleotid-Satzes, das/der die theoretisch "wahrscheinlichste" Sequenz enthält, die die TBP-II-Genfragmente codiert (wobei man sich nach den "Codonverwendungs-Regeln" richtet, die von Lathe, R. et al., *J. Mol. Biol.*, 183 (1985), 1–12, offenbart sind), ist es möglich, die Sequenz eines komplementären Oligodesoxyribonucleotides oder eines Oligodesoxyribonucleotid-Satzes, das/der mit der "wahrscheinlichsten" Sequenz hybridisieren kann, die TBP-II oder zumindest einen Teil davon codiert, zu identifizieren oder einen Satz dieser Sequenzen. Danach wird das eine komplementäre Sequenz enthaltende Oligodesoxyribonucleotid synthetisiert und als Sonde zur Identifizierung sowie Isolierung eines DNA-Moleküls, das das erfindungsgemäße TBP-II-Protein codiert, aus einer DNA-Genbank verwendet (Maniatis, T. et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, (1982), Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY).

[0036] In einer Ausführungsform erfolgt die Isolierung des TBP-II-Gens mit Hilfe von Koloniehybridisierungs-Verfahren unter stringenten Bedingungen. Verfahren zur Hybridisierung von Nucleinsäuren gehören zum allgemeinen Fachwissen und sind beispielsweise in Maniatis, T., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, vorstehend, und in Haymes, B. T. et al., *Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach*, (1985), IRL Press, Oxford, England, offenbart. Durch Hybridisierung mit dem vorstehend genannten Oligodesoxyribonucleotid oder Satz von Oligodesoxyribonucleotid-Sonden ist es möglich, in einer cDNA- oder genomischen Genbank DNA-Sequenzen zu identifizieren, die zur Hybridisierung fähig sind. Danach werden diese Sequenzen untersucht, um zu bestimmen, inwieweit sie das erfindungsgemäße TBP-II-Protein codierende Sequenzen enthalten.

[0037] Mit Hilfe von Verfahren, die auf dem Fachgebiet bekannt sind (vgl. Maniatis et al., vorstehend), wird danach die DNA aus positiven Clonen in entsprechend konstruierte Expressionsvektoren inseriert. Doppelsträngige cDNA wird mit Plasmidvektoren durch Anfügen homopolymerer Enden, durch Verbinden von Restriktionsfragmenten, umfassend die Verwendung synthetischer DNA-Linker, oder durch Ligierungsverfahren für glatte Enden verbunden. Zur Ligierung von DNA-Molekülen werden DNA-Ligasen verwendet. Unerwünschte Verbindungen können durch Behandlung mit alkalischer Phosphatase vermieden werden.

[0038] Zur Expression des gewünschten Proteins sollte der Expressionsvektor auch spezifische Nucleotidsequenzen umfassen, die Informationen zur Regulation von Transkription sowie Translation enthalten, welche mit der DNA, die das gewünschte Protein codiert, dergestalt verbunden sind, dass Genexpression und Proteinproduktion ermöglicht werden. Vor dem Gen, das transkribiert werden soll, muss sich zu allererst ein Promotor befinden, der von einer RNAPolymerase erkannt werden kann und an den sie bindet, wodurch der Transkriptionsprozess einleitet wird. Es können verschiedene Promotoren verwendet werden, die mit unterschiedlicher Effizienz funktionieren (starke und schwache Promotoren) und die für prokaryotische und eukaryotische Zellen unterschiedlich sind. Eine hohe Genexpression wird in prokaryotischen Zellen auch unter Verwendung von Ribosomen-Bindungsstellen erreicht, wie z. B. der Shine-Dalgarno-Sequenz (SD-Sequenz). Für eukaryotische Wirte können je nach Art des Wirtes verschiedene Sequenzen zur Regulation von Transkription und Translation eingesetzt werden. Sie können aus viralen Quellen stammen, wie z. B. Adenovirus, Rinder-Papillomavirus, Affenvirus oder dergleichen, in denen die Regulationssignale mit einem bestimmten Gen verbunden sind, das einen hohen Expressionsgrad aufweist. Beispiele sind der TK-Promotor des Herpes-Virus, der frühe Promotor von SV40, der Promotor des Hefe-gal4-Gens, usw. Es können Regulationssignale für den Transkriptionsstart ausgewählt werden, die Repression und Aktivierung gestatten, so dass sich die Expression der Gene beeinflussen lässt.

[0039] Das DNA-Molekül, umfassend die Nucleotidsequenz, die ein die Aminosäuresequenz des erfindungsgemäßen TBP-II-Proteins umfassendes Protein codiert, eine davor befindliche Nucleotidsequenz für ein Signalpeptid und damit funktionell verbundene Regulationssignale für Transkription und Translation, wird in einen Vektor inseriert, der die gewünschten Gensequenzen in das Chromosom der Wirtszelle integrieren kann. Die Zellen, in denen die eingeführte DNA stabil in die Chromosomen integriert worden ist, können dadurch

selektiert werden, dass man auch ein oder mehrere Marker einführt, die eine Selektion der den Expressionsvektor enthaltenden Wirtszellen gestatten.

[0040] In einer bevorzugten Ausführungsform wird das eingeführte DNA-Molekül in einen Plasmid- oder Virusvektor integriert, der zur autonomen Replikation im Empfänger-Wirt fähig ist. Aus der Literatur sind prokaryotische und eukaryotische Plasmide wohl bekannt. Wichtige Faktoren bei der Selektion eines bestimmten Plasmid- oder Virusvektors sind die Leichtigkeit, mit der sich den Vektor enthaltende Empfänger-Zellen identifizieren und Empfänger-Zellen, die den Vektor nicht enthalten, trennen lassen; die in einem bestimmten Wirt gewünschte Kopienzahl des Vektors; und die Frage, ob die Einführung des Vektors in Wirtszellen verschiedener Arten wünschenswert ist.

[0041] Wenn der das/die Konstrukt(e) enthaltende Vektor oder die DNA-Sequenz einmal hergestellt ist, kann/können das/die DNA-Konstrukt(e) mit Hilfe verschiedener geeigneter Verfahren zur Expression in eine geeignete Wirtszelle eingeführt werden: Transformation, Transfektion, Konjugation, Protoplastenfusion, Elektroporation, Calciumphosphat-Präzipitation, direkte Mikroinjektion, usw. Für die vorliegende Erfindung können entweder prokaryotische oder eukaryotische Wirtszellen verwendet werden. Bevorzugte prokaryotische Wirte umfassen Bakterien, wie z. B. E. coli, Bacillus, Streptomyces, Pseudomonas, Salmonella, Serratia, usw. Der am meisten bevorzugte prokaryotische Wirt ist E. coli. Unter diesen Bedingungen wird das Protein jedoch nicht glycosyliert. Der prokaryotische Wirt muss mit dem Replikon und den Kontrollsequenzen im Expressionsplasmid verträglich sein. Bevorzugte eukaryotische Wirte sind Säugerzellen, z. B. menschliche, Affen-, Maus- und Ovarialzellen vom Chinesischen Hamster (CHO), da sie posttranslationale Modifikationen der Proteinmoleküle ausführen, umfassend die korrekte Faltung oder Glycosylierung an den richtigen Stellen. In Hefezellen werden auch posttranslationale Peptid-Modifikationen einschließlich der Glycosylierung ausgeführt.

[0042] Nach Einführung des Vektors werden die Wirtszellen in einem selektiven Medium gezüchtet, wodurch auf Wachstum der Zellen selektiert wird, die den Vektor enthalten. Eine Expression der clonierten Gensequenz (en) führt zur Produktion des gewünschten TBP-II-Proteins oder eines Fragments davon. Das exprimierte Protein wird danach isoliert und entsprechend dem in der vorliegenden Patentanmeldung beschriebenen Reinigungsverfahren oder mit Hilfe eines anderen üblichen Verfahrens, umfassend Extraktion, Präzipitation, Chromatographie, Elektrophorese oder dergleichen, gereinigt.

[0043] Ein weiteres Reinigungsverfahren, das vorzugsweise zur Reinigung des erfindungsgemäßen Proteins verwendet werden kann, ist eine Affinitätschromatographie unter Verwendung von gegen TBP-II gerichteten monoclonalen Antikörpern, die auf einer Gelmatrix hergestellt und immobilisiert werden, die in einer Säule enthalten ist. Durch die Säule lässt man unreine Präparate hindurchlaufen, die das rekombinante Protein enthalten. Das Protein wird durch die spezifischen Antikörper an die Säule gebunden, während Verunreinigungen durchlaufen. Nach Waschen wird das Protein durch eine Veränderung des pH-Werts oder der Ionenstärke aus dem Gel eluiert.

[0044] Der in der vorliegenden Erfindung verwendete Begriff "Salze" betrifft sowohl Salze der Carboxylgruppen als auch Säure-Additionssalze der Aminogruppen des Proteinmoleküls, die durch auf dem Fachgebiet bekannte Mittel gebildet werden. Salze von Carboxylgruppen umfassen anorganische Salze, z. B. Natrium- und Calciumsalze, sowie Salze mit organischen Basen, wie sie beispielsweise mit Aminen, z. B. Triethanolamin, Arginin oder Lysin, gebildet werden. Säure-Additionssalze umfassen z. B. Salze mit Mineralsäuren und Salze mit organischen Säuren.

[0045] Der in der vorliegenden Erfindung verwendete Begriff "funktionelle Derivate", umfasst Derivate, die mit Hilfe von auf dem Fachgebiet bekannten Verfahren aus den funktionellen Gruppen, die als Seitenketten vorkommen, oder aus den N- bzw. C-terminalen Gruppen hergestellt werden können. Die Erfindung umfasst diese Derivate, sofern sie pharmazeutisch verträglich bleiben, d. h. dass sie die Proteinaktivität nicht zerstören und den Mitteln, in denen sie enthalten sind, keine toxischen Eigenschaften verleihen. Diese Derivate umfassen aliphatische Ester oder Amide der Carboxylgruppen und N-Acyl-Derivate freier Aminogruppen oder O-Acyl-Derivate freier Hydroxylgruppen, die mit Acylresten gebildet werden (z. B. Alkanoyl- oder carbocyclische Aroylreste).

[0046] "Vorläufer" sind Verbindungen, die im Körper eines Tieres oder des Menschen vor TBP-II gebildet und dann in dieses Protein umgewandelt werden. Die vorliegende Erfindung umfasst als "aktive Fraktionen" beliebige Fragmente oder Vorläufer der Polypeptidkette des Proteinmoleküls, entweder allein oder zusammen mit damit verbundenen Molekülen oder Resten, z. B. Zucker- oder Phosphatresten, oder nur aus dem Proteinmolekül oder den Zuckerresten bestehende Aggregate, vorausgesetzt, dass die Fraktion die Fähigkeit zur

Hemmung der cytotoxischen Wirkung von TNF auf Zellen und/oder zur Aufrechterhaltung seiner verlängerten günstigen Wirkungen besitzt.

[0047] Die Erfindung betrifft weiter gegen TBP-II gerichtete Antikörper und F(ab)-Fragmente davon, sowie Salze, funktionelle Derivate und/oder aktive Fraktionen davon (mit vorstehend angegebener Bedeutung), wie in den Ansprüchen definiert. Diese Antikörper bieten eine neue Möglichkeit, die TNF-Aktivität zu beeinflussen, und können sowohl zur Hemmung als auch zur Nachahmung der Wirkungen verwendet werden, die TNF auf spezifische Zelluntergruppen hat. Die Verwendung hängt von der Molekularform der Antikörper, insbesondere von ihrer Valenz ab: monovalente Antikörperformen (z. B. F(ab)-Fragmente) wirken hemmend und multivalente Formen können zumindest teilweise die Wirkungen von TNF nachahmen. Sie sind daher als Arzneimittel sowohl zur Nachahmung als auch zur Hemmung der TNF-Wirkungen auf Zellen geeignet.

[0048] Durch die funktionelle Wechselwirkung der erfindungsgemäßen Antikörper mit TBP-II wird auch ein neues diagnostisches Mittel auf der Basis von Immuntests, wie z. B. Radioimmuntest, ELISA, usw., bereitgestellt, mit dem sich Über- oder Unterproduktion von TBP-II in Körperzellen bei bestimmten Krankheiten nachweisen lassen. In Seren von Patienten, die unterschiedliche Krebsarten haben oder an Autoimmunkrankheiten leiden, wie z. B. an systemischem Lupus erythematosus (SLE), kann daher auf diese Weise die TBPII-Menge bestimmt werden. Umgekehrt werden unter Verwendung von gereinigtem TBP-II-Protein im Körper endogen produzierte, gegen TBP-II gerichtete Antikörper bestimmt. Der Nachweis dieser bei bestimmten Autoimmunkrankheiten gebildeten Auto-Antikörper ist äußerst wichtig, da ihre Fähigkeit zur Nachahmung oder Hemmung der TNF-Wirkungen sicher von großer Bedeutung für die pathologischen Syndrome dieser Krankheiten ist.

[0049] Die Antikörper können sowohl polyclonal als auch monoclonal sein. Sie können in Kaninchen, Mäusen, anderen Tieren oder davon abstammenden gezüchteten Gewebezellen produziert werden oder können Produkte von Zellen des Menschen sein. Sie können auch mit Hilfe von DNA-Rekombinationstechniken produziert werden, entweder in einer mit dem nativen Antikörper identischen Form, als chimäres Molekül, das aus Antikörpermolekülen menschlicher und tierischer Herkunft durch Rekombination konstruiert wird, oder in anderen Formen, die zur therapeutischen Verwendung am meisten geeignet sind.

[0050] Zur Herstellung der Antikörper kann das gereinigte TBP-II-Protein für die Immunisierung von Tieren ebenso verwendet werden wie ein oder mehrere synthetische Peptide, die mit der bekannten Sequenz eines TBP-II-Fragments identisch sind, z. B. mit der N-terminalen Proteinsequenz. Eine weitere Möglichkeit ist die Fusion einer möglichen Nucleotidsequenz, die ein TBP-II-Fragment codiert, mit dem Gen, das Protein A codiert. Dadurch kann das fusionierte Protein A-TBP-II-Gen in *E. coli* exprimiert werden und das fusionierte Protein lässt sich durch Affinitätschromatographie auf einer IgG-Sepharose-Säule reinigen und dann zur Immunisierung von Tieren verwenden.

[0051] Die erfindungsgemäßen monoclonalen Antikörper werden unter Verwendung des üblichen Hybridomverfahrens hergestellt (Kohler et al., *Nature*, 256 (1975), 495; Kohler et al., *Eur. J. Immunol.*, 6 (1976), 511). Nach Immunisierung werden Milzzellen allein oder zusammen mit Lymphknotenzellen der immunisierten Tiere isoliert und mit einer geeigneten Myelom-Zelllinie fusioniert. Nach Fusion werden die resultierenden Hybridomzellen selektiv in HAT-Medium gehalten und dann cloniert. Die durch eine solche Selektion erhaltenen Hybridomzellen werden dann zur Identifizierung von Clonen, die Antikörper mit der Fähigkeit zur TBP-II-Bindung sezernieren, analysiert. Die gewünschten Clone werden nach Identifizierung entweder in Suspensionskultur oder nach Injektion der Zellen in das Bauchfell geeigneter Wirtsmäuse in Ascitesflüssigkeit in großem Maßstab gezüchtet. Die von den Hybridomen produzierten monoclonalen Antikörper werden danach isoliert und gereinigt.

[0052] Wie vorstehend erwähnt, können die monoclonalen Antikörper auch immobilisiert und unter Verwendung einer Säule mit einem Immunadsorptionsmittel in einem Affinitätsreinigungsverfahren zur TBP-II-Aufreinigung verwendet werden.

[0053] TBP-II und Salze, funktionelle Derivate, Vorläufer und aktive Fraktionen davon sowie Gemische von diesen sind zur Bekämpfung schädlicher TNF-Wirkungen in Säugern geeignet, d. h. zur Behandlung von Zuständen, bei denen ein Überschuss an TNF endogen gebildet oder exogen verabreicht wird. In geringen Mengen und im Gemisch mit TNF sind sie auch als Trägerstoffe zur Verlängerung günstiger TNF-Wirkungen angezeigt.

[0054] Die vorliegende Erfindung betrifft weiter Arzneimittel, umfassend einen pharmazeutisch verträglichen Trägerstoff und als Wirkstoff das erfindungsgemäße TBP-II-Protein oder seine Salze, funktionellen Derivate, Vorläufer oder aktive Fraktionen davon oder Gemische von diesen, wobei die Fraktionen die cytotoxische Wir-

kung von TNF auf Zellen hemmen und/oder seine verlängerten günstigen Wirkungen aufrechterhalten können. Diese Mittel können für jeden beliebigen Zustand verwendet werden, bei dem eine Überproduktion von endogenem TNF auftritt, wie z. B. bei septischem Schock, Kachexie, Transplantat-Wirt-Abstoßungsreaktionen, Autoimmunkrankheiten wie rheumatoide Arthritis, usw. Eine Verabreichung kann über beliebige, für ähnliche Mittel anerkannte Darreichungsformen erfolgen und hängt von dem zu behandelnden Zustand ab, z. B. durch intravenöse Verabreichung bei septischem Schock, im Fall von rheumatoider Arthritis durch lokale Injektion (z. B. in das Knie) oder kontinuierliche Verabreichung durch Infusion, usw. Die Mittel können auch bei einer durch exogene Verabreichung übermäßiger TNF-Mengen (Überdosen) verursachten TNF-Intoxikation verwendet werden. Die Mittel können auch TNF umfassen, wobei in diesem Fall TNF über einen längeren Zeitraum kontrolliert freigesetzt wird.

[0055] Zur Verabreichung werden die erfindungsgemäßen Arzneimittel durch Mischen des Proteins oder seiner Derivate mit physiologisch verträglichen Trägerstoffen, Stabilisierungsmitteln und Excipienten hergestellt und in die Darreichungsform gebracht, z. B. durch Lyophilisierung in Dosis-Ampullen. Die Menge des zu verabreichenden Wirkstoffs hängt von der Darreichungsform, der zu behandelnden Krankheit und dem Zustand des Patienten ab. Bezogen auf das Körpergewicht erfordert eine lokale Injektion im Fall von Entzündungskrankheiten bei rheumatoider Arthritis weniger TBP-II als eine intravenöse Infusion im Falle eines septischen Schocks.

[0056] Die Erfindung wird nun durch die folgenden Beispiele veranschaulicht, die den Schutzzumfang der Erfindung nicht beschränken.

BEISPIEL 1: REINIGUNG VON TBP-II

1.1. Herstellung des Urinkonzentrats

[0057] Insgesamt 200 l Urin, die von gesunden männlichen Spendern und gesunden Frauen nach der Menopause erhalten worden waren, wurden einer Mikrofiltration auf einer Pellicon-Membran mit einer Porengröße von 0,45 µm unterworfen. Unter Verwendung einer Pellicon-Membran mit einem Molekulargewichts-Rückhaltevermögen von 10 kDa wurde das Filtrat durch Ultrafiltration auf ein Endvolumen von 500 ml konzentriert. Das Konzentrat wurde gegen Phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung, enthaltend 1 mM Benzamidin und 0,1% Natriumazid, dialysiert.

1.2. Affinitätsreinigung von TBP-I und TBP-II auf einer Säule mit immobilisiertem TNF

[0058] Rekombinantes TNF-α wurde auf eine Konzentration von 7,2 mg/ml eingestellt, dann mit 0,02% Natriumazid enthaltendem PBS äquilibriert und mit Affigel 10 verknüpft (3,6 mg auf 0,5 ml Gelkörner). Eine 250 ml-Probe der konzentrierten Urin-Proteine von Schritt 1.1 wurde auf eine Säule, die aus den Harzkörnern mit dem immobilisierten TNF aufgebaut war, bei 4°C mit einer Durchflussgeschwindigkeit von 0,2–0,3 ml/min aufgetragen. Nichtgebundene Proteine wurden durch Waschen mit PBS entfernt. Die gebundenen Proteine wurden dann durch Auftragen einer Lösung aus 25 mM Citronensäure, 100 mM NaCl und 0,02% Natriumazid bei einem pH-Wert von 2,5 eluiert. Die spezifische biologische Aktivität (Hemmung der toxischen TNF-Wirkung) der eluierten Proteine war etwa 20.000-fach höher als die der Urin-Rohproteine (Tabelle I). Bei einer SDS-PAGE-Analyse wanderte der größte Teil der eluierten Proteine als einzelne breite Bande mit einem relativen Molekulargewicht von etwa 30000 ± 2000 D.

1.3. Umkehrphasen-Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC)

[0059] Eine weitere Fraktionierung der affinitätsgereinigten Proteine von Schritt 1.2 erfolgte mit Hilfe von Umkehrphasen-HPLC auf einer Aquapore RP300-Säule (4,6 × 30 mm, Brownlee Labs), die mit 0,3%-iger wässriger Trifluoressigsäure (TFA) (Puffer F) zuerst voräquilibriert und dann solange gewaschen worden war, bis durch das Fluorescamin-Nachweissystem eine stabile Grundlinie erhalten wurde. Die vereinigten aktiven Fraktionen, die aus der Affinitäts-TNF-Säule von Schritt 1.2 eluiert worden waren, wurden auf die Säule aufgetragen. Die Elution wurde bei einer Durchflussgeschwindigkeit von 0,5 ml/Minute mit einem linearen Acetonitril-Gradienten in Puffer F (5 Minuten 0–20%, danach 60 Minuten 20–50% und schließlich 5 Minuten 50–80%) durchgeführt. Danach wurde die Säule 15 Minuten mit 80%-igem Acetonitril gewaschen. Es wurden 0,5 ml-Fraktionen gesammelt und auf ihren Proteingehalt (–) und biologische Aktivität (■) hin untersucht, wie in [Fig. 1](#) gezeigt (--- bedeutet Elution mit einem Acetonitril-Gradienten in Puffer F).

[0060] Die biologische Aktivität wurde mit dem gleichen biologischen Test bestimmt, der für TBP-I entwickelt worden war. Er beruht auf der cytotoxischen TNF-Wirkung auf Zellen, die mit Cycloheximid (CHI) sensibilisiert worden waren. Die quantitative Auswertung erfolgt durch das Neutralrot-Aufnahmeverfahren, wie in Wallach, D., J. Immunol., 132 (1984), 2464–2469, beschrieben. In der vorliegenden Erfindung wird er zur Kontrolle der TBP-II-Aktivität während der Aufreinigung verwendet.

– Proben, die auf die Gegenwart des Proteins hin untersucht werden sollten, wurden bei 4°C in einer Verdünnungsreihe zweifach in nach Dulbecco modifiziertem Eagle-Minimalgrundmedium (DMEM) verdünnt. Dazu wurde dasselbe Medium, enthaltend 40 E/ml TNF- α und 400 μ g/ml Cycloheximid (CHI), in gleicher Menge gegeben. Die Endkonzentration von TNF- α in der Zellsuspension betrug 5 E/ml und die Endkonzentration von CHI 50 μ g/ml.

– Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen und flachem Boden, wobei jede Vertiefung 100 μ l DMEM-CS (DMEM, enthaltend 5% foetales Kälberserum und 5% Kälberserum) enthielt, wurden mit Maus-A9-Zellen beimpft (1, 5×10^4 Zellen/Vertiefung).

– In jede Vertiefung wurden 100 μ l-Aliquots der mittels Verdünnungsreihe verdünnten TNF- α -Protein-CHI-Gemische gegeben. Danach wurden die Zellen 14 Stunden weiter inkubiert.

– Die Lebensfähigkeit der Zellen wurde bestimmt, indem sie 2 Stunden mit Neutralrot inkubiert wurden. Nach Abwaschen von überschüssigem Farbstoff wurde das von den Zellen aufgenommene Neutralrot mit einem Gemisch aus Sorenson-Citratpuffer und Ethanol extrahiert und mit einem automatischen Microelisa-Ablesegerät bei 570 nm kolorimetrisch bestimmt.

– 1 E/ml TNF-Hemmaktivität wurde als der Verdünnungsfaktor definiert, der einen statistisch signifikanten Schutz gegen ein Abtöten durch TNF bietet ($p < 0,05$).

TABELLE I: Reinigung von TBP-I und TBP-II

Reinigungs-schritt	Protein	Schutzwirkung		Spezifische Ak-tivität	Aufreinigung
	mg	Einheiten	%	Einh./mg	x-fach
Urin-Rohprote-ine	9400	117200	100	12,4	
Affinitätsreini-gung					
Durchfluß elu-ierte	9300	nicht nachweisbar			
Proteine	0,36	98600	84,2	273800	22000
Umkehrpha-sen-HPLC					
Gesamt	0,217	31200	26,6	143400	11600
TBP-I	0,070	22300	19,0	318600	
TBP-II	0,147	8 900	7,6	60700	

* Eine Einheit der Schutzwirkung wurde als die Menge TNF-Bindungsproteine definiert, in deren Gegenwart sich die Zahl der Zellen verdoppelte, die unter den Bedingungen lebensfähig blieben, unter denen die Proteine auf ihre Schutzwirkung gegen die cytotoxische TNF-Wirkung getestet wurden.

[0061] Wie in [Fig. 1](#) gezeigt, wurde festgestellt, dass die aktiven Proteine aus der HPLC-Säule als zwei deutliche Proteinpeaks eluierten, wobei die Fraktionen etwa 27% Acetonitril (TBP-I) und etwa 31% Acetonitril (TBP-II) entsprachen. Beide Proteine besaßen eine Schutzwirkung gegen die cytotoxische TNF-Wirkung, obwohl die spezifische Aktivität von TBP-II geringer war als die von TBP-I (Tabelle I).

[0062] Die Hemmwirkung von TBP-II auf die Bindung von radioaktiv markiertem TNF an Zellen wurde untersucht, wie von Olsson, I. et al., Eur. J. Hematol., 42 (1989), S. 270–275, beschrieben. Wie bei TBP-I wurde festgestellt, dass TBP-II die Bindung von 125 I-TNF- α an die Zellen nur dann verringert, wenn 125 I-TNF- α und TBP-II zusammen zu den Zellen gegeben werden, jedoch nicht, wenn zuerst TBP-II den Zellen zugegeben und dann vor TNF- α -Zugabe entfernt wird. Das zeigt, dass die Hemmung der TNF- α -Bindung an Zellen nicht auf eine Wirkung von TBP-II auf die Zellen zurückzuführen ist, sondern vielmehr eine Art Wechselwirkung zwischen TBP-II und TNF- α widerspiegelt.

[0063] Die Bindungsaktivitäten von TBP-I und TBP-II wurden in einem Festphasen-Test unter Verwendung radioaktiv markierter Proteinpräparate untersucht. Es wurde festgestellt, dass beide Proteine TNF- α binden und dass diese Bindung durch überschüssiges TNF- α und mit geringerer Effizienz auch durch TNF- β kompetitiv gehemmt werden konnte. Die Bindung konnte jedoch nicht durch mehrere andere untersuchte Cytokine gehemmt werden (IL-1, IL-6, IFN-gamma, Tabelle II).

TABELLE II: Bindung von TBP-I und TBP-II mit TNF- α und die Wirkung konkurrierender Cytokine

Zur kompetitiven Hemmung der TBP-Bindung eingesetzte Proteine*	¹²⁵ J-TBP I (gebundene)	¹²⁵ J-TBP-II CPM)
-	27700 (\pm 2000)	17634 (\pm 1230)
menschliches TNF- α	1050 (\pm 140)	2400 (\pm 174)
menschliches TNF- β	21000 (\pm 850)	6240 (\pm 230)
IL-1 α	28100 (\pm 460)	17840 (\pm 890)
IL-6	27050 (\pm 570)	18570 (\pm 1120)
IFN-gamma	28050 (\pm 1050)	18470 (\pm 1430)
TBP-I	1900 (\pm 170)	2240 (\pm 160)
TBP-II	nicht bestimmt	2005 (\pm 150)

* Alle Proteine wurden in einer Konzentration von 10 μ g/ml zugegeben.

1.4. SDS-PAGE

[0064] Zur Kontrolle der bei den Reinigungsschritten erhaltenen Proteine wurde entsprechend dem Verfahren von Laemmli, U. K. et al., Nature, 227 (1970), 680, eine Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt.

[0065] Fig. 2A zeigt eine Analyse des Affinitätsreinigungsschrittes unter reduzierenden Bedingungen: Spur 1 – nichtfraktionierte Proteine aus Urin; Spur 2 – Proteine, die aus der TNF-Säule durch den Puffer mit niedrigem pH-Wert eluiert wurden. Fig. 2B zeigt eine Analyse der aus der Umkehrphasen-HPLC eluierten aktiven Fraktionen unter reduzierenden Bedingungen. Proben wurden mit 3 \times konzentriertem Probenpuffer, enthaltend 6% SDS (Gew./Vol.) und 15% β -Mercaptoethanol (Vol./Vol.), gemischt und auf ein 12%-iges Acrylamidgel geladen (Spuren 1–4: TBP-I; Spuren 5–9: TBP-II). Zum Molekulargewichtvergleich wurde ein Gemisch aus Molekulargewichtsmarkern verwendet (α -Lactalbumin: 14,4 kDa; Sojabohnen-Trypsininhibitor: 20,1 kDa; Carboanhydrase: 30 kDa; Ovalbumin: 43 kDa; Rinderserumalbumin: 67 kDa; Phosphorylase b: 94 kDa). Eine Kontrolle mit Probenpuffer ließ man in Spur 10 laufen. Das Gel ließ man bei 160 Volt laufen und die Proteinbanden wurden durch Anfärben mit Silber sichtbar gemacht (Oakley, B. R. et al., Anal. Biochem., 105, 361).

1.5. Sequenz-Analyse des N-Terminus

[0066] Proben des im Wesentlichen gereinigten erfindungsgemäßen TBP-II-Proteins (1–5 μ g jeweils 50–200 pmol) wurden auf vorbehandelte, mit Biobren beschichtete Glasfaserscheibchen aufgetragen. Die getrockneten Scheibchen wurden sich wiederholenden Edman-Abbauzyklen in einer automatisierten Impuls-Flüssigphasen-Proteinmikrosequenziervorrichtung (Modell 475) mit einem rechnerunterstützten HPLC-PTH-Aminosäure-Analysator (Modell 120) und einer Einheit zur Datenerfassung und -verarbeitung (Modell 900) unterworfen (alle Geräte von Applied Biosystems Inc. Foster City, CA, USA). Die vom Computer erhaltene Sequenz wurde mit den Rohdaten verglichen und gegebenenfalls korrigiert. Zur Bestätigung der Sequenzdaten wurden insgesamt drei getrennte Untersuchungen durchgeführt. Die Anfangsausbeute betrug mehr als 40%, was zeigte, dass der größte Teil des Proteins im Präparat (die 30 kDa-Bande) zur resultierenden Sequenz in Beziehung steht.

[0067] Durch die N-terminale Sequenzanalyse des Proteins der Fraktion 27 (Fig. 1) wurde die folgende Sequenz erhalten:

Val-Ala-Phe-Thr-Pro-Tyr-Ala-Pro-Glu-Pro-Gly-Ser-Thr-Cys-Arg-Leu-Arg-Glu-Tyr-Tyr-Asp-,
die gemeinsam mit größeren Mengen einer um 3 Aminosäuren kürzeren Sequenz:

Thr-Pro-Tyr-Ala-Pro-Glu-Pro-Gly-Ser-Thr

auftrat und mit noch größeren Mengen einer Sequenz anfiel, der zwei terminale Aminosäuren fehlten:
Phe-Thr-Pro-Tyr-Ala-Pro-Glu-Pro-Gly-Ser-Thr.

[0068] Der größte Teil der Fraktion 28 bestand andererseits aus der Sequenz Val-Ala-Phe-Thr-Pro-... Außerdem wurde die kürzere Sequenz Phe-Thr-Pro-... in geringeren Mengen und die Sequenz Thr-Pro-... in noch geringeren Mengen gefunden.

[0069] Die am wenigsten verkürzte Sequenz des Proteins, die aus verschiedenen gereinigten TBP-II-Proben erhalten wurde, war wie folgt:
Ala-Gln-Val-Ala-Phe-Thr-Pro-Tyr-Ala-Pro-Glu-Pro-Gly-Ser-Thr-Cys-Arg-Leu-Arg-Glu-Tyr-Tyr-Asp-Gln-Thr-Ala-Gln-Met-Cys-Cys-.

BEISPIEL 2: Herstellung tryptischer Peptide von TBP-II

[0070] Gereinigtes TBP-II-Protein (180 µg) wurde reduziert und alkyliert, wie in Andrews, P. C. und Dixon, J. E., Anal. Biochem., 161 (1987), S. 524–528, beschrieben. Zur Entfernung der Rückstände der zur Reduktion und Alkylierung verwendeten Reagenzien wurde das Protein erneut auf eine Aquapore RP300-Säule (vgl. Beispiel 1.3) aufgetragen. Das gereinigte TBP-II-Protein wurde dann durch Trypsinspaltung (Verhältnis Substrat/Enzym 20:1) über Nacht bei einem pH-Wert von 8,0 fragmentiert. Die erhaltenen Peptide wurden mit Hilfe von Umkehrphasen-HPLC auf einer C-18-SynChropak[®] RP-P-Säule gereinigt. Die Sequenzen der in den Fraktionen 44, 50, 53, 53', 60 und 84 enthaltenen sechs Peptide wurden wie in Beispiel 1.5 bestimmt und sind in [Fig. 3](#) dargestellt.

BEISPIEL 3: Herstellung polyclonaler Antikörper gegen TBP-II

[0071] Zur Immunisierung von Kaninchen wurde den Tieren zuerst eine Emulsion aus 20 µg TBP-II in vollständigem Freund-Adjuvans subcutan injiziert. Drei Wochen später wurde ihnen erneut als Emulsion in unvollständigem Freund-Adjuvans intramuskulär und danach zweimal in Abständen von einer Woche als Lösung in PBS subcutan injiziert. 10 Tage nach der letzten Immunisierung wurde den Kaninchen Blut entnommen.

[0072] Zur Aufreinigung von Immunglobulinen aus dem Kaninchenserum wurde 10 ml Serum eine gesättigte Ammoniumsulfatlösung bis zu einer Endkonzentration von 50% zugegeben. Nach Inkubation über Nacht bei 4°C wurden die Immunglobuline durch Zentrifugation präzipitiert. Das Pellet wurde zweimal mit 50%-igem Ammoniumsulfat gewaschen und dann in 10 mM Natriumborat sowie 0,02% Natriumazid bei einem pH-Wert von 9 gelöst. Die Lösung wurde danach gründlich gegen die Borat-Azid-Lösung dialysiert. Zur Chromatographie wurde die Lösung auf eine HPLC-Mono-Q-Säule aufgetragen, aus der die Proteine mit einem Gradienten aus 0–500 mM NaCl in der vorstehenden Borat-Azid-Lösung eluiert wurden. Die Immunglobuline eluierten bei einer Salzkonzentration von etwa 70 mM NaCl.

[0073] Das gegen TBP-II gerichtete Antiserum unterdrückte in einer Verdünnung von 1:6400 die Bindung von ¹²⁵I-TNF an U-937-Zellen um etwa 50%. Unter den gleichen Bedingungen wurde in Kaninchen ein gegen TBP-I gerichtetes Antiserum produziert. Das Ausmaß der immunologischen Kreuzreaktivität beider Antiseren wurde durch Western-Blot-Analyse untersucht. Diese zeigte, dass sich TBP-I und TBP-II immunologisch unterscheiden: Jedes Antiserum erkannte signifikant nur die TBP-Art, gegen das es erzeugt worden war.

[0074] Bei der Untersuchung der Wechselwirkung von Antiseren und Proteinen im ELISA-Test wurde ebenso festgestellt, dass das gegen TBP-I gerichtete Antiserum mit TBP-I in einer Verdünnung von bis zu 1:25000 reagierte, jedoch nicht mit TBP-II, nicht einmal in einer Verdünnung von 1:100. [Fig. 4](#) zeigt die Ergebnisse eines ELISA-Tests für die Bindung der gegen TBP-I und TBP-II gerichteten Antiseren mit zwei TBP-Arten. Die Bindungen des gegen TBP-I gerichteten Antiserums an TBP-I (□), des gegen TBP-I gerichteten Antiserums an TBP-II (■), des gegen TBP-II gerichteten Antiserums an TBP-I (•) und des gegen TBP-II gerichteten Antiserums an TBP-II (o) werden durch die Extinktion des Farbprodukts im Meerrettich-Peroxidase-Test angegeben. Die Messwerte eines Kontrolltests, bei dem die Antikörper in mit BSA beschichtete Vertiefungen aufgetragen wurden, wurden davon subtrahiert. (Es zeigte sich, dass die geringfügige Bindung des gegen TBP-II gerichteten Antiserums an TBP-I, die in [Fig. 2](#) zu sehen ist, auf eine Verunreinigung des Antiserums durch gegen TBP-I gerichtete Antikörper in geringfügigen Mengen zurückzuführen ist, die durch die Gegenwart von etwas TBP-I-Protein in dem zur Immunisierung verwendeten TBP-II-Präparat verursacht wurde).

BEISPIEL 4: Wirkung polyclonaler Antikörper auf die Bindung von TNF an Zellen

[0075] Die gegen TBP-I und TBP-II gerichteten Antiseren wurden in einer ausgewogenen Dulbecco-Salzlösung (PBS+), enthaltend 0,5% BSA und 0,1% Natriumazid (PBS/BSA), verdünnt. Damit wurden Testzellen der Zelllinien HeLa, MCF7, K562 und U937 2 Stunden entweder direkt oder in kompetitiven Hemmungs-Experimenten nach Inkubation mit einer TBP-Probe behandelt. Die Zellen wurden gewaschen und auf TNF-Bindung hin untersucht.

[0076] Fig. 5 zeigt die Hemmung der Bindung von radioaktiv markiertem TNF an U937-, K562-, HeLa- und MCF7-Zellen durch Antiseren, die gegen TBP-I (○) und gegen TBP-II (□) gerichtet sind. Die bei Abwesenheit von Antiseren festgestellte spezifische Bindung (100%) betrug bei U937-Zellen 2500 cpm, bei K562-Zellen 1500 cpm, bei HeLa-Zellen 2400 cpm und bei MCF7-Zellen 1100 cpm. Die Ergebnisse zeigen, dass die gegen TBP-I und TBP-II gerichteten Antiseren die TNF-Bindung an Zellen stören, wobei sich jedes Antiserum auf die verschiedenen Zelllinien in unterschiedlichem Maße auswirkt. Das gegen TBP-I gerichtete Antiserum hemmt die TNF-Bindung an HeLa- und MCF7-Zellen wirksam, hat jedoch keine Wirkung auf die TNF-Bindung an U937-Zellen und nur sehr geringe Wirkung auf die TNF-Bindung an K562-Zellen. Umgekehrt hemmt das gegen TBP-II gerichtete Antiserum wirksam die TNF-Bindung an K562- und U937-Zellen, die TNF-Bindung an HeLa- und MCF7-Zellen jedoch nur in hohen Konzentrationen. Kompetitive Hemmungs-Experimente, bei denen dem Serum reines TBP-I-Protein und TBP-II-Protein zugegeben wurde, zeigten, dass die Wirkung des gegen TBP-II gerichteten Antiserums auf letztere Zellen darauf zurückzuführen ist, dass in dem gegen TBP-II gerichteten Antiserumpräparat Verunreinigungen durch gegen TBP-I gerichtete Antikörper vorhanden waren.

BEISPIEL 5: Gegen TBP-II gerichtete monoclonale Antikörper

Herstellung der monoclonalen Antikörper

[0077] Weiblichen Balb/C-Mäusen (8 Wochen alt) wurde 1 µg gereinigtes TBP-II-Protein in einer Emulsion aus vollständigem Freund-Adjuvans in die Ballen der Hinterpfoten und drei Wochen später in unvollständigem Freund-Adjuvans subcutan in den Rücken injiziert. Die anderen Injektionen wurden in wöchentlichen Abständen subcutan in PBS verabreicht. Die letzten Auffrischungsinjektionen mit 9,0 µg TBP-I in PBS wurden 4 Tage (intraperitoneal) und 3 Tage (intravenös) vor der Fusion verabreicht. Die Fusion wurde unter Verwendung von NSO/Mr-Zellen und Lymphocyten, die sowohl aus der Milz als auch aus den lokalen Lymphocyten der Hinterbeine isoliert worden waren, als Fusionspartner durchgeführt. Die Hybridome wurden in DMEM selektiert, das mit HAT, 15% Pferdeserum und 2 µg/ml Gentamycin angereichert worden war. Hybridome, bei denen eine Produktion von gegen TBP-I gerichteten Antikörpern festgestellt wurde, wurden durch das Grenzverdünnungsverfahren subcloniert und in Balb/C-Mäuse injiziert, die zur Ascites-Entwicklung mit Pristan vorbehandelt worden waren. Durch Ammoniumsulfat-Ausfällung (50% Sättigung) wurden aus der Ascitesflüssigkeit Immunglobuline isoliert und danach gegen 0,02% Azid enthaltende PBS dialysiert. Die Reinheit betrug etwa 60%, wie durch SDS-PAGE-Analyse und Anfärben mit Coomassie-Blau bestimmt wurde. Die Isotypen der Antikörper wurden unter Verwendung eines im Handel erhältlichen ELISA-Kits (Amersham, GB) bestimmt.

[0078] Es wurden mehrere positive Clone gewonnen, die für weitere Untersuchungen subcloniert und charakterisiert wurden. Einige isolierte Subclone, ihr Isotyp und die Bindung von TBP-II in einem umgekehrten RIA-Test sind in Tabelle III aufgeführt.

Tabelle III

Subclone, die gegen TBP-II gerichtete monoclonale Antikörper produzieren

Clon-Nummer	Screening mit iRIA [CPM]	Subclon-Screening durch iRIA [CPM]	Isotyp
13.11	31800	31000	IgG ₁
.12		31500	IgG ₁
.13		31100	IgG ₁
14.1	15300	15400	IgG _{2a}
.6		16200	IgG _{2a}
.7		15300	IgG _{2a}

20.2	12800	14200	IgG _{2b}
.5		14300	IgG _{2b}
.6		14800	IgG _{2b}
22.7	20400	20000	IgG ₁
.8		19300	IgG ₁
27.1	18000	27000	IgG _{2a}
.3		25000	IgG _{2a}
.9		28000	IgG _{2a}
32.4	11315	10900	IgG _{2b}
.5		10700	IgG _{2b}
.6		11200	IgG _{2b}
33.1	18400	11400	IgG ₁
.3		10500	IgG ₁
.4		14800	IgG ₁
36.1	27500	26600	IgG _{2a}
.5		24900	IgG _{2a}
.6		24900	IgG _{2a}
41.3	13800	18100	IgG ₁
.7		18100	IgG ₁
.10		18800	IgG ₁
67.1	16800	10900	IgG _{2a}
.16		10800	IgG _{2a}
.17		10900	IgG _{2a}
70.2	15100	5100	IgG _{2a}
.3		5200	IgG _{2a}
.4		5300	IgG _{2a}
77.2	15300	11800	IgG _{2b}
78.9	25300	21400	IgG _{2a}
82.1	17600	25900	IgG ₁
.4		25700	IgG ₁
.10		26400	IgG ₁
86.2	8800	12200	IgG _{2b}
.5		12600	IgG _{2b}
.11		12800	IgG _{2b}
19.6		29700	IgG _{2a}
.9		28900	IgG _{2a}

[0079] Die Hybridome TBP-II 13-12 und TBP-II 70-2 wurden am 12. März 1990 an Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), Institut Pasteur, 25, rue du Docteur Roux, 75724 Paris CEDEX 15, Frankreich, hinterlegt. Sie erhielten die Nr. 1-929 bzw. die Nr. 1-928.

BEISPIEL 6: Umgekehrter Radioimmunttest (IRIA) zum Nachweis
der gegen TBP-II gerichteten monoclonalen Antikörper

[0080] Dieser Test wurde verwendet, um die Titer der gegen TBP gerichteten Antikörper in den Seren immunisierter Mäuse zu bestimmen und Hybridome auf Antikörperproduktion hin zu untersuchen. PVC-Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen (Dynatech 1-220-25) wurden 12 Stunden bei 4°C mit affinitätsgereinigten, gegen Maus-F(ab) gerichteten Ziegen-Immunglobulinen (Biomakor, Israel; 10 µg/ml in 0,02% NaN₃ enthaltender PBS) beschichtet, danach 2 Stunden bei 37°C mit 0,5% BSA in PBS, angereichert mit 0,05% Tween 20 (Sigma) und 0,02% NaN₃ (Blockierungspuffer), blockiert und dreimal mit PBS, enthaltend 0,05% Tween 20 und 0,02% NaN₃ (Waschpuffer), gewaschen. In Verdünnungsreihen verdünnte Serumproben oder Proben der Hybridom-Zuchtmedien (50 µl) wurden für 2 Stunden bei 37°C in die Vertiefungen gegeben. Die Platten wurden mit Waschpuffer gewaschen und danach wurde ¹²⁵I-markiertes TBP-I-Protein (10.000 cpm, in Blockierungspuffer) in die Vertiefungen gegeben. Nach einer weiteren 2-stündigen Inkubation bei 37°C wurden die Platten gewaschen und die Menge der an die einzelnen Vertiefungen gebundenen Radioaktivität wurde mit einem gamma-Zähler bestimmt.

BEISPIEL 7: Die Verwendung von gegen TBP-II gerichteten Antikörpern zur Affinitätschromatographie

[0081] Gegen TBP-II gerichtete Antikörper können entsprechend dem folgenden Verfahren mit Hilfe einer Affinitätschromatographie zur Aufreinigung von TBP-II verwendet werden. Die zur Verwendung in der Affinitätschromatographie bestimmten monoclonalen Antikörper wurden selektiert, indem in einem Festphasen-Radioimmunttest ihre Fähigkeit zur Bindung des radioaktiv markierten Antigens untersucht wurde. Für alle Hybridome wurde Ascitesflüssigkeit durch Ammoniumsulfat-Präzipitation bei 50%-iger Sättigung und anschließende gründliche Dialyse gegen PBS aufgereinigt. PVC-Platten mit 96 Vertiefungen wurden mit gereinigtem McAbs beschichtet. Nach Blockierung der Platten mit PBS, enthaltend 0,5% BSA, 0,05% Tween 20 (Sigma) und 0,02% NaN₃, wurden 50.000 cpm ¹²⁵I-TNF pro Vertiefung zugegeben. Die Platten wurden 2 h bei 37°C inkubiert, danach gewaschen und die in jeder Vertiefung gebundene Radioaktivität wurde mit einem gamma-Zähler quantitativ bestimmt. Die Antikörper mit der größten Bindungsfähigkeit wurden hinsichtlich ihrer Leistung in einer Immunaaffinitätschromatographie untersucht.

[0082] Als Harz zur Immobilisierung der Antikörper wurde Polyacrylhydrazid-Agarose verwendet. Die halbge reinigten Immunglobuline wurden konzentriert und wie von Wilchek und Miron, *Methods in Enzymology*, 34 (1979), 72–76, beschrieben, an das Harz gebunden. In diesen Experimenten wurden drei gegen TBP-I gerichtete monoclonale Antikörper, die Clone 16, 20 und 34, getestet. Es wurden Säulen mit Antikörpern und 1 ml Volumen konstruiert. Vor Verwendung wurden alle Säulen 10-mal mit Elutionspuffer gewaschen, wobei nach jedem Waschen mit PBS neutralisiert wurde. Danach wurden 120 ml konzentrierte Urin-Proteine in PBS mit 0,02% NaN₃ auf die Säulen gegeben. Die Durchflussgeschwindigkeit der Säulen wurde auf 0,2 bis 0,3 ml pro Minute eingestellt. Nach dem Auftragen der Proteine wurden die Säulen mit 50 ml PBS gewaschen und danach mit einer Lösung, enthaltend 50 mM Citronensäure, pH-Wert 2,5, 100 mM NaCl und 0,02% NaN₃, eluiert. Es wurden 1 ml-Fractionen gesammelt. Proben der aufgetragenen Urin-Proteine, der letzten Waschlösung (1 ml) und von jeder Fraktion (pro Säule 8 1 ml-Fractionen) wurden auf ihre Proteinkonzentration und ihre TBP-II-Aktivität im biologischen Test hin untersucht. Bei den Proteinbestimmungen vor und nach der Antikörperbindung an die Hydrazid-Agarose lagen die Mengen des an die Säulen gebundenen Immunglobulins zwischen 7 und 10 mg/ml Agarose. Alle Proteinbestimmungen wurden nach dem Mikro-Fluorescamin-Verfahren durchgeführt und mit einer 100 µg BSA/ml enthaltenden Standardlösung verglichen (Stein, S. und Moschera, J., *Methods Enzymol.*, 79 (1981), 7–16).

BEISPIEL 8: TBP-II-Bestimmung unter Verwendung von gegen TBP-II gerichteten Antikörpern

[0083] In den Seren gesunder Personen, Patienten mit Krebs oder systemischem Lupus erythematosus (SLE) und schwangeren Frauen kurz vor der Entbindung wurden die TBP-II-Mengen mit einem ELISA-Verfahren bestimmt, wobei ein gegen TBP-II gerichteter monoclonaler Antikörper zur Beschichtung der Mikrotiterplatten verwendet wurde. 50 µl jeder Probe wurden zugegeben und nach einer 2,5-stündigen Inkubation bei 37°C wurden die Vertiefungen mit einer Lösung aus PBS, 0,05% Tween und 0,02% Natriumazid gewaschen. Danach wurde ein gegen TBP-II gerichteter polyclonaler Kaninchen-Antikörper für 2,5 h bei 37°C zugegeben. Sodann wurden die Vertiefungen erneut gewaschen (ohne Azid) und ein gegen Kaninchen-Antikörper gerichteter, Meerrettich-Peroxidase-konjugierter Ziegen-Antikörper für 2 h zugegeben. Nach Inkubation und Waschen wurde ABTS-Puffer zugegeben und 30 Minuten später die optische Dichte (O. D.) bei 600 nm ermittelt.

[0084] Normale TBP-II-Mengen im menschlichen Serum gesunder Personen liegen bei $1,48 \pm 0,46$ ng/ml, wie mit dem ELISA-Verfahren bestimmt.

[0085] In den Seren von 46 Patienten mit systemischem Lupus erythematodes (SLE) lagen die TBP-II-Mengen bei $4,04 \pm 3,75$ ng/ml, einem im Vergleich zu normalen Mengen signifikant höheren Wert ($p < 0,001$). Wie in [Fig. 6](#) gezeigt, wiesen 29 der 46 Patienten mit SLE eine TBP-II-Menge auf, die höher war als der Durchschnitt $2SD$ normaler Werte. Die Erfinder der vorliegenden Erfindung haben eine hochsignifikante Korrelation zwischen den TBP-II-Mengen und dem von Symmonds, D. P. M. et al., Quarterly J. of Med., Bd. 69 (1988), S. 927–937, entwickelten Krankheitswirkungs-Index festgestellt: $r = 0,62$, $p < 0,001$. Eine ähnliche Korrelation wurde zwischen TBP-II und den klassischen Markern der SLE-Wirkung, den gegen DNA gerichteten Antikörpern ($r = 0,64$, $p < 0,001$) sowie zwischen den klinischen Hauptanzeichen der SLE-Wirkung, d. h. Gelenkschmerzen, und TBP-II ($r = 0,54$, $p < 0,001$) festgestellt.

[0086] Diese Ergebnisse zeigen, dass sich TBP-II als empfindlicher Marker für die Wirkung der Krankheit und zur Prognose einer Verschlimmerung bei SLE-Patienten verwenden lässt. TBP-II kann daher bei diesen Patienten zur Kontrolle einer mit der Krankheitswirkung zusammenhängenden Aktivierung des Immunsystems ebenso verwendet werden wie bei Patienten mit anderen Autoimmunkrankheiten.

[0087] Mit Hilfe des vorstehend erwähnten ELISA-Verfahrens wurden die TBP-II-Mengen in Seren von Patienten mit verschiedenen Krebsarten untersucht. Bei 20 von 34 Patienten mit verschiedenen Krebsarten (58, 8%) lagen die TBP-II-Mengen über dem normalen Durchschnitt $\pm 2SD$. Der Unterschied in den TBP-II-Mengen bei Krebspatienten ($4,16 \pm 4,08$ ng/ml) und bei gesunden Kontrollpatienten ($1,48 \pm 0,46$ ng/ml) war statistisch hochsignifikant ($p < 0,001$).

[0088] Diese Ergebnisse zeigen, dass TBP-II ein nützlicher und allgemeiner Marker für verschiedene Krebsarten ist und sich zur frühzeitigen Entdeckung dieses Leidens verwenden lässt. Nach einer Krebsresektion kann eine Normalisierung der TBP-II-Mengen ein Marker für die Heilung der Krankheit sein. Eine TBP-II-Zunahme nach einer anfänglichen Normalisierung kann ein früher und empfindlicher allgemeinverwendbarer Marker für das Wiederausbrechen der Krankheit sein.

[0089] 14 schwangere Frauen zum Geburtstermin mit Eklampsie bzw. Präeklampsie wiesen statistisch signifikant höhere TBP-II-Mengen ($2,91 \pm 0,96$ ng/ml) auf als 16 normotone Schwangere ($1,58 \pm 0,52$), wie mit dem ELISA-Verfahren bestimmt ($p < 0,001$).

BEISPIEL 9: Kombinationen von TBP-II und TNF

[0090] Um die TBP-II-Aktivität zur Protraktion der günstigen TNF-Wirkungen zu untersuchen, wurden die folgenden Experimente durchgeführt:

FS11-Fibroblasten (Passage 9) wurden in Mikrovertiefungen (Platten mit 96 Vertiefungen) in einer Anfangskonzentration von 10000 Zellen/Vertiefung gezüchtet. Nach 24 h wurden Gemische, umfassend konstante rTNF-Konzentrationen (5 ng/ml) und unterschiedliche TBP-II-Konzentrationen (3 ng bis 100 ng/ml), in die entsprechenden Vertiefungen gegeben. In die Kontrollvertiefungen wurde Medium, rTNF allein oder TBP-II in den entsprechenden Konzentrationen ohne TNF gegeben. Nach 7 Tagen Züchtung wurden die Zellüberstände gesammelt und zur weiteren Bestimmung der cytotoxischen TNF-Restwirkung sowie der TBP-II-Restmengen sofort bei -20°C eingefroren. Nach Entfernung der Überstände wurde einer FS11-Platte ^3H -Thymidin 8 h zugegeben, während einer "Tween"-Platte der Farbstoff Neutralrot zugesetzt wurde.

[0091] Die Ergebnisse sind in [Fig. 7](#) gezeigt. [Fig. 7\(D\)](#) zeigt, dass in Gegenwart von 5 ng/ml TNF und zunehmenden TBP-II-Konzentrationen das Fibroblasten-Wachstum signifikant zugenommen hatte (bestimmt durch die Aufnahme des Farbstoffs Neutralrot oder den ^3H -Thymidin-Einbau (F)). Eine Untersuchung der gefrorenen FS11-Überstände in einem biologischen Test (die Maus-Zelllinie A9) auf cytotoxische TNF-Restwirkung zeigte eine mit der Zunahme der TBP-II-Konzentrationen (E) parallel verlaufende cytotoxische Restwirkung, was auf eine durch TBP-II verursachte Verhinderung des TNF-Abbaus im System hindeutete.

[0092] Zur weiteren Untersuchung dieses Phänomens wurden den gezüchteten FS11-Fibroblasten auf verschiedenen Platten rTNF, TBP-II und die entsprechenden Kontrollen über 2 h oder 2, 5, 7 und 9 Tage zugegeben. Danach wurden die Überstände entfernt und sofort auf cytotoxische TNF-Wirkung hin untersucht.

[0093] Wie in [Fig. 8](#) gezeigt, behielten bei 2 h von den zugegebenen 5 ng rTNF nur 0,6 ng in Gegenwart von TBP-II die biologische Aktivität, während der Rest von TBP-II gebunden und neutralisiert wurde. Während

rTNF, wenn es ohne TBP-II zugegeben worden war, zwischen den Tagen 2 und 9 schnell seine biologische Aktivität verlor, war die nachweisbare cytotoxische rTNF-Wirkung in Gegenwart von TBP-II 10-fach höher. Folglich neutralisierte TBP-II anfangs die hohe TNF-Konzentration, schützte jedoch das übrige biologisch aktive TNF vor zunehmendem Verlust seiner biologischen Aktivität. Diese Ergebnisse zeigen, dass TBP-II TNF bindet und die Abnahme oder den Verlust seiner Aktivität verhindert. Daher lässt sich TBP-II als Trägerstoff zur Verlängerung der günstigen TNF-Wirkungen verwenden.

BEISPIEL 10: Kartierung der TBP-II-Epitope durch kompetitive Kreuzhemmungs-
Untersuchung mit gegen TBP-II gerichteten monoclonalen Antikörpern (mAbs)

[0094] PVC-Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen wurden wie vorstehend beschrieben mit gereinigten, gegen TBP-II gerichteten mAbs beschichtet (25 µg/ml). Nach Waschen und Blockierung wurden ¹²⁵I-markierte TBP-II-Proben (100.000 cpm pro Vertiefung), die 2 h bei 37°C vorinkubiert worden waren, zusammen mit dem gleichen oder einem anderen monoclonalen Antikörper gegen TBP-II (in einer Konzentration von 1 µg/ml) in die Vertiefungen gegeben. Die Platten wurden über Nacht bei 4°C inkubiert, gewaschen und die in jeder Vertiefung gebundene Radioaktivität mit einem gamma-Zähler bestimmt. Die Ergebnisse sind prozentual zu den Kontrollwerten ausgedrückt (TBP-II-Bindung bei Abwesenheit konkurrierender mAbs).

[0095] Die Ergebnisse sind in Tabelle IV dargestellt. Die monoclonalen Antikörper sind durch die Clon-Nummer in der ersten Reihe und in der linken Spalte gezeigt. Niedrige prozentuale Bindungswerte zeigen, dass die zwei Antikörper miteinander um das gleiche Epitop auf dem TBP-II-Protein konkurrieren, während höhere Werte zeigen, dass sie an unterschiedliche Epitope binden. Nichtkonkurrierende Antikörper sind zur Verwendung im doppelten Sandwich-ELISA-Verfahren geeignet, z. B. die Clone 13 und 70.

Kompetitive Kreuzhemmungsanalyse mit gegen TBP-II gerichteten monoclonalen Antikörpern

An Festphase gebundene Antikörper																
	13	14	19	20	22	27	32	33	36	41	67	70	77	78	82	86
13	4	64	53	73	31	51	161	35	177	72	131	128	77	102	50	101
14	119	20	90	13	13	84	156	11	132	173	134	113	14	70	89	179
19	103	28	7	19	11	5	144	11	144	133	179	123	18	5	85	126
20	119	17	93	14	10	88	149	9	135	170	137	135	16	70	101	181
22	109	26	94	22	13	82	128	12	115	164	136	114	17	68	98	167
27	106	23	11	27	14	8	145	17	152	133	196	136	24	8	82	125
32	150	267	150	291	156	186	14	163	139	200	205	18	294	143	103	226
33	115	19	98	23	16	86	133	12	118	156	120	114	24	78	90	155
36	155	262	168	271	144	185	167	158	12	169	223	135	265	158	93	150
41	117	119	119	118	101	109	118	76	93	9	179	107	106	111	8	9
67	112	138	125	141	125	157	136	107	138	213	30	117	120	127	106	236
70	150	246	150	255	145	166	4	162	166	217	204	6	232	132	107	234
77	121	18	98	15	13	78	148	11	145	184	142	132	18	66	103	184
78	118	20	9	26	10	6	153	13	157	137	183	131	19	6	94	172
82	107	110	130	116	112	121	128	89	90	8	162	102	121	113	8	7
86	122	181	125	166	126	129	131	120	86	18	253	109	152	125	20	17
100%-Wert	31582	3958	2057	5437	4947	17395	25923	3525	6368	8042	4368	24113	5887	22222	11608	9703

Konkurrierender Antikörper

Patentansprüche

1. Tumor-Nekrosefaktor (TNF)-Bindungsprotein II (TBP-II) in im Wesentlichen gereinigter Form, das die folgenden Merkmale aufweist:
 - (a) es hemmt den cytotoxischen Effekt von TNF; und
 - (b) es enthält die folgende Aminosäuresequenz:
Thr-Pro-Tyr-Ala-Pro-Glu-Pro-Gly-Ser-Thr;
oder Salze, funktionelle Derivate, Vorläufer oder aktive Fraktionen davon oder Gemische von diesen, wobei die Salze, funktionellen Derivate, Vorläufer, aktiven Fraktionen oder Gemische die Fähigkeit haben, den cytotoxischen Effekt von TNF auf Zellen zu hemmen.
2. TBP-II nach Anspruch 1 mit einem Molekulargewicht von etwa 30 kD bei einer Analyse des im Wesentlichen gereinigten Proteins durch SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen.
3. TBP-II nach Anspruch 1 oder 2, das in der Umkehrphasen-Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) als ein einziger Peak läuft.
4. TBP-II nach einem der Ansprüche 1 bis 3 mit der Fähigkeit zur Hemmung des cytotoxischen Effekts von TNF- α auf murine A9-Zellen.
5. TBP-II nach einem der Ansprüche 1 bis 4, das die folgende Aminosäuresequenz enthält:
Phe-Thr-Pro-Tyr-Ala-Pro-Glu-Pro-Gly-Ser-Thr.
6. Verfahren zur Isolierung von im Wesentlichen gereinigtem TBP-II-Protein, umfassend:
 - (a) Gewinnen der Rohproteinfraktion aus einem dialysierten Konzentrat von menschlichem Urin;
 - (b) Durchführen einer Affinitätschromatographie mit der Rohproteinfraktion von Schritt (a) auf einer Säule mit immobilisiertem TNF zum Erhalt von gereinigten aktiven Fraktionen von TNF-Bindungsproteinen, die durch ihre Fähigkeit zur Hemmung des cytotoxischen Effekts von TNF definiert sind;
 - (c) Durchführen einer Umkehrphasen-HPLC mit den gereinigten aktiven Fraktionen der TNF-Bindungsproteine aus Schritt (b) zum Erhalt von im Wesentlichen gereinigten aktiven Fraktionen von TNF-Bindungsproteinen, die durch ihre Fähigkeit zur Hemmung des cytotoxischen Effekts von TNF definiert sind; und
 - (d) Gewinnen des im Wesentlichen gereinigten TBP-II-Proteins von Schritt (c), wobei das Protein ein Molekulargewicht von etwa 30 kD bei einer SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen besitzt, als ein einzelner Peak in der Fraktion wandert, die etwa 31% Acetonitril bei der Umkehrphasen-HPLC entspricht, und die Fähigkeit zur Hemmung des cytotoxischen Effekts von TNF besitzt.
7. TBP-II nach einem der Ansprüche 1 bis 5, hergestellt nach dem Verfahren von Anspruch 6.
8. TBP-II nach einem der Ansprüche 1 bis 5 oder 7, wobei das TBP-II menschlichen Ursprungs ist.
9. TBP-II nach einem der Ansprüche 1 bis 5 oder 8, das ein rekombinantes Protein ist.
10. TBP-II nach Anspruch 9, hergestellt in einem prokaryontischen Wirt, vorzugsweise in *E. coli*, oder in einem eukaryontischen Wirt, vorzugsweise in einer Säugerzelle.
11. DNA-Molekül, umfassend eine TBP-II nach einem der Ansprüche 1 bis 5 oder 7 bis 10 codierende Nucleotidsequenz.
12. Replizierbares Expressionsvehikel, das das DNA-Molekül nach Anspruch 11 umfasst und in einer transformierten Wirtszelle das TBP-II wie in einem der Ansprüche 1 bis 5 oder 7 bis 10 definiert exprimieren kann.
13. Wirtszelle, ausgewählt aus einer prokaryontischen und einer eukaryontischen Zelle, die mit dem replizierbaren Expressionsvehikel von Anspruch 12 transformiert ist.
14. Verfahren zur Herstellung von rekombinatem TBP-II, umfassend die folgenden Schritte:
 - (a) Züchten einer transformierten Wirtszelle nach Anspruch 13 in einem geeigneten Kulturmedium; und
 - (b) Isolieren des TNF-Bindungsproteins TBP-II.
15. Arzneimittel, umfassend TBP-II und/oder Salze, funktionelle Derivate, Vorläufer oder aktive Fraktionen davon oder Gemische von diesen nach einem der Ansprüche 1 bis 5 oder 7 bis 10 als aktiven Bestandteil

zusammen mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger, wobei die Fraktionen die cytotoxische Wirkung von TNF auf Zellen hemmen können.

16. Arzneimittel nach Anspruch 15 zur Verwendung in der Bekämpfung der nachteiligen Wirkung von TNF in Säugern, insbesondere in der Behandlung von Zuständen, bei denen ein Überschuss von TNF endogen gebildet oder exogen verabreicht wird.

17. Verwendung des TBP-II nach einem der Ansprüche 1 bis 5 oder 7 bis 10 zur Herstellung eines Arzneimittels für die Verwendung bei der Aufrechterhaltung anhaltender günstiger Wirkungen von TNF in Säugern.

18. Antikörper gegen TBP-II nach einem der Ansprüche 1 bis 5 oder 7 bis 10, der das Protein spezifisch erkennt.

19. Antikörper nach Anspruch 18, der weiterhin dadurch gekennzeichnet ist, dass er die Bindung von TNF an U937- und K562-Zellen blockiert.

20. Antikörper nach Anspruch 18 oder 19, der weiterhin dadurch gekennzeichnet ist, dass er die Bindung von TNF an HeLA- und MCF7-Zellen nicht blockiert.

21. Antikörper nach einem der Ansprüche 18 bis 20, der ein polyclonaler Antikörper ist.

22. Antikörper nach einem der Ansprüche 18 bis 20, der ein monoclonaler Antikörper ist.

23. Monoclonaler Antikörper nach Anspruch 22, hergestellt von einem Hybridom, das durch Fusion von Myelomzellen mit Milzzellen und/oder Lymphocyten von zuvor mit TBP-II immunisierten Mäusen gebildet wurde.

24. Monoclonaler Antikörper nach Anspruch 23, hergestellt von Hybridom TBP-II 13-12 (CNCM 1-929).

25. Monoclonaler Antikörper nach Anspruch 23, hergestellt von Hybridom TBP-II 70-2 (CNCM 1-928).

26. Arzneimittel, enthaltend einen Antikörper nach einem der Ansprüche 18 bis 25 oder F(ab)-Fragmente davon oder Salze, funktionelle Derivate oder aktive Fraktionen des Antikörpers oder des Fragments davon zusammen mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger.

27. Arzneimittel nach Anspruch 26 zur Verwendung bei der Blockierung der Bindung von TNF an Zellen und der Hemmung seiner Wirkung auf Zellen.

28. Arzneimittel nach Anspruch 27 zur Verwendung bei der Behandlung von Zuständen, bei denen die Wirkungen von entweder endogen gebildetem oder exogen verabreichtem TNF bekämpft werden sollen.

29. Arzneimittel nach Anspruch 26 zur Verwendung in der Nachahmung günstiger Wirkungen von TNF auf Zellen.

30. Arzneimittel nach Anspruch 26 zur Verwendung in der Nachahmung der cytotoxischen Wirkung von TNF auf Zellen.

31. In vitro-Immuntest für TBP-II in Körperflüssigkeiten, gekennzeichnet durch die Messung seiner Wechselwirkung mit einem Antikörper nach einem der Ansprüche 18 bis 25.

32. TBP-II nach einem der Ansprüche 1 bis 5 oder 7 bis 10 zur Verwendung in diagnostischen Tests zur Messung der Spiegel an Antikörpern gegen das in Seren von Patienten bei verschiedenen Störungen, vorzugsweise bei Autoimmunstörungen, endogen hergestellte TBP-II.

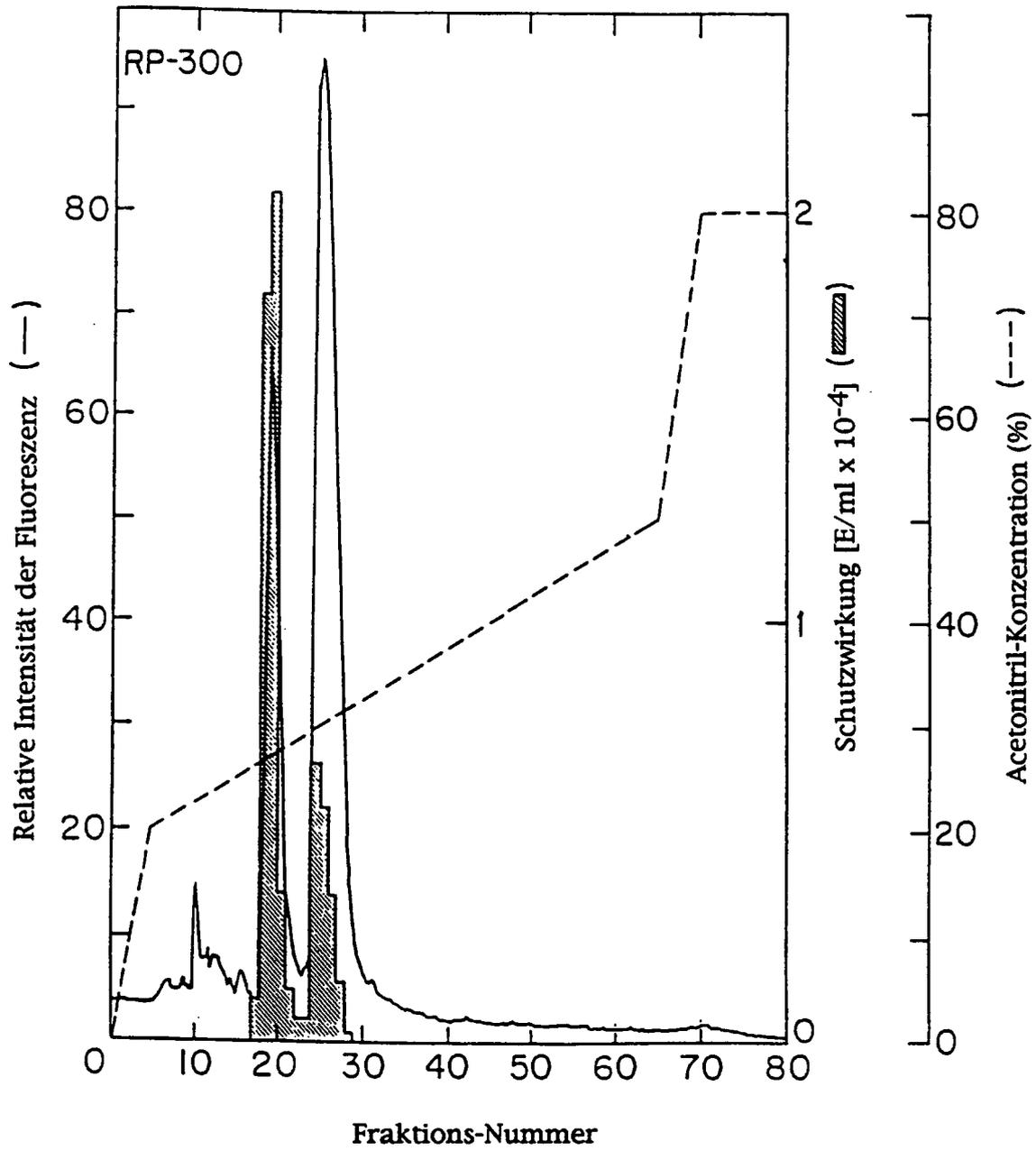
33. Verfahren zur Reinigung von menschlichem TBP-II unter Verwendung eines geeigneten Antikörpers nach einem der Ansprüche 18 bis 25, wobei das Verfahren die folgenden Schritte umfasst:

- (a) Koppeln des Antikörpers an ein geeignetes Harz zur Herstellung einer Immunaффinitätssäule;
- (b) Beladen der Immunaффinitätssäule mit einer das Protein enthaltenden Lösung;
- (c) Wegwaschen der nicht-gebundenen Proteine mit einem geeigneten Waschpuffer;
- (d) Eluieren des gebundenen TBP-II mit einem geeigneten Elutionsmittel; und

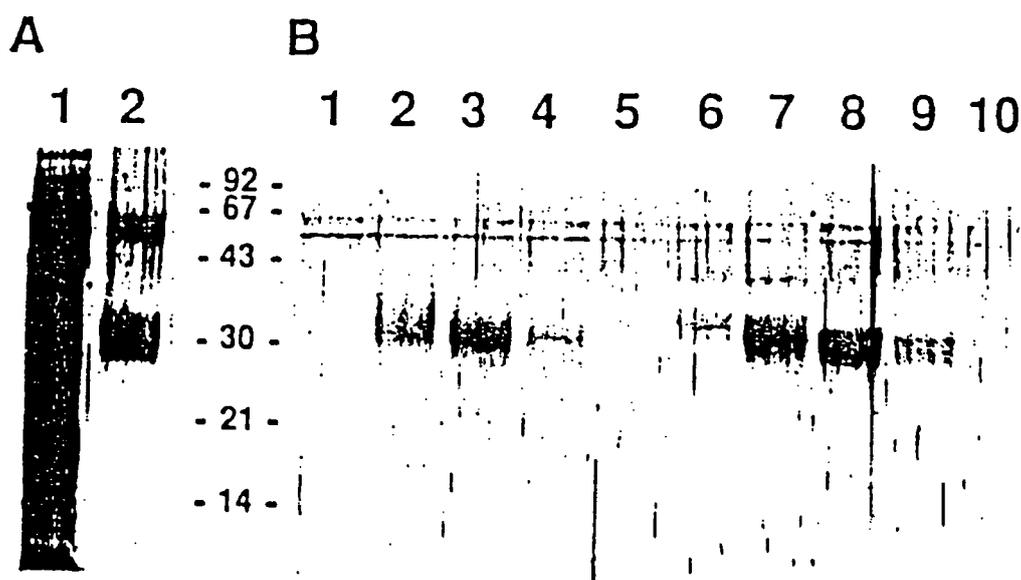
(e) Sammeln der angereicherten Fraktion von TBP-II.

Es folgen 8 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen



Figur 1



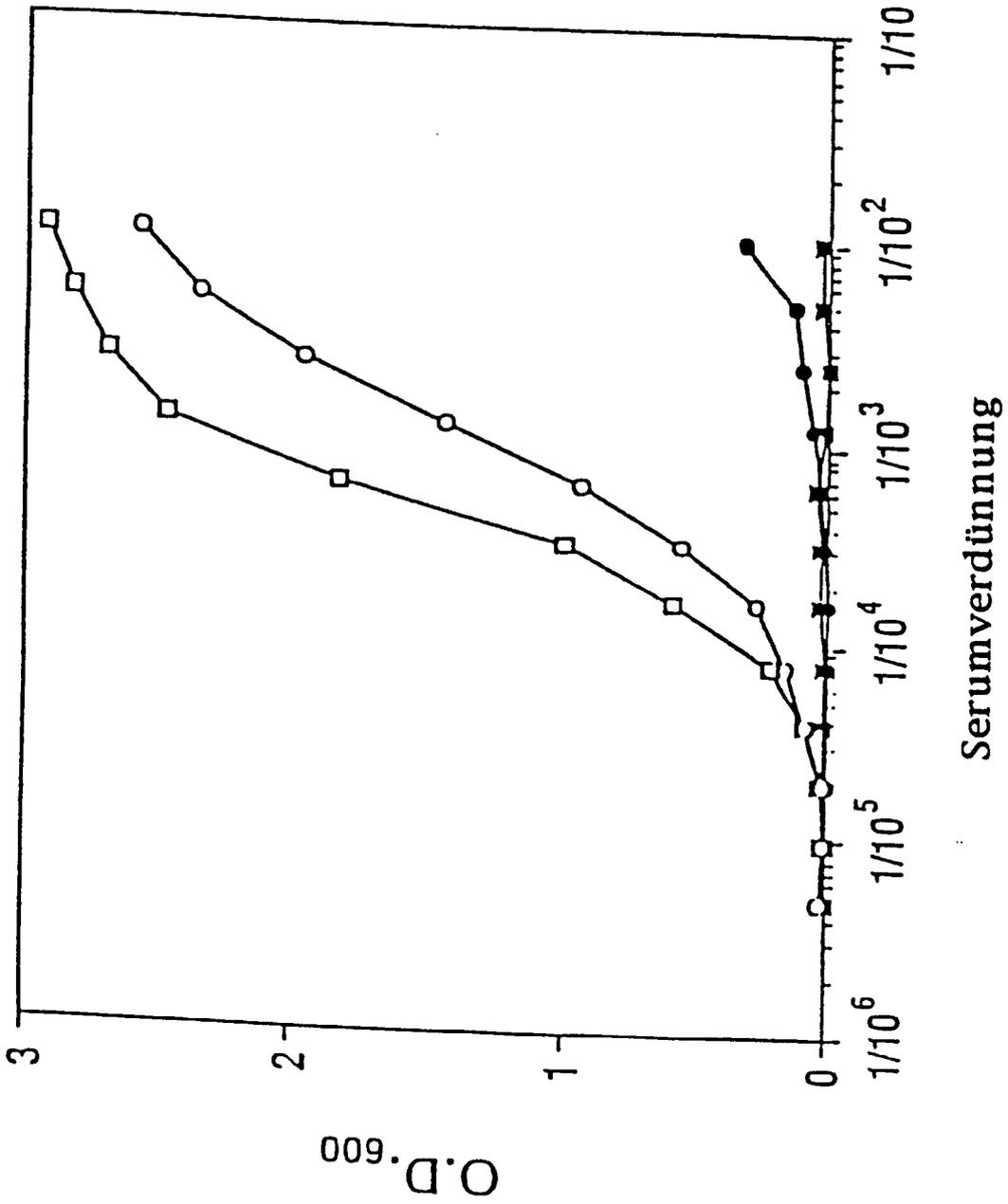
Figur 2

Sequenz von TBP-II-Peptiden (auf einer C18-Säule gereinigte tryptische Spaltung)

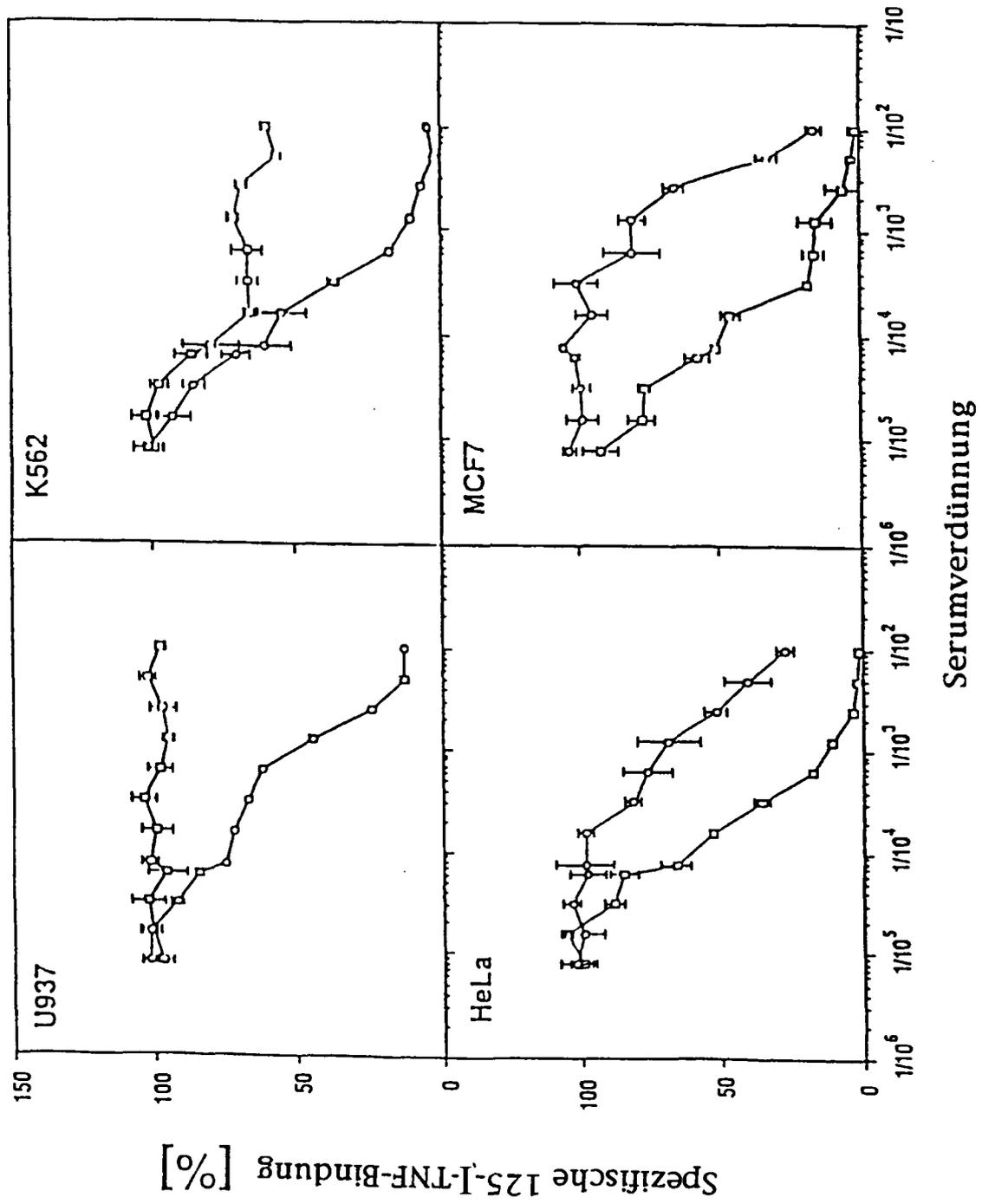
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Fraktion 441	Tyr	Tyr	Asp	Gln	Thr	Ala	Gln	Met	Cys	Cys									
Fraktion 501	Leu	Arg	Val	Tyr	Tyr	Asp	Ala	Thr	Ala	Gln	Met	Cys	Cys						
Fraktion 532	Val	Ala	Phe	Thr	Pro	Tyr	Ala	Pro	Glu	Pro	Gly	Ser	Thr	Cys	Arg				
Fraktion 53	Cys	Arg	Pro	Gly	Phe	Gly	Val	Ala	Arg										
Fraktion 60	Ile	Cys	Thr	Cys	Arg	Pro	Gly	Trp	Tyr	Cys	Ala	Pro	Leu						
Fraktion 84	Thr	Ser	Asp	Thr	Val	Cys	Asp	Ser	Cys	Glu	Asp	Ser	Thr	Tyr	Thr	Gln	Leu	Trp	Asn

Figur 3

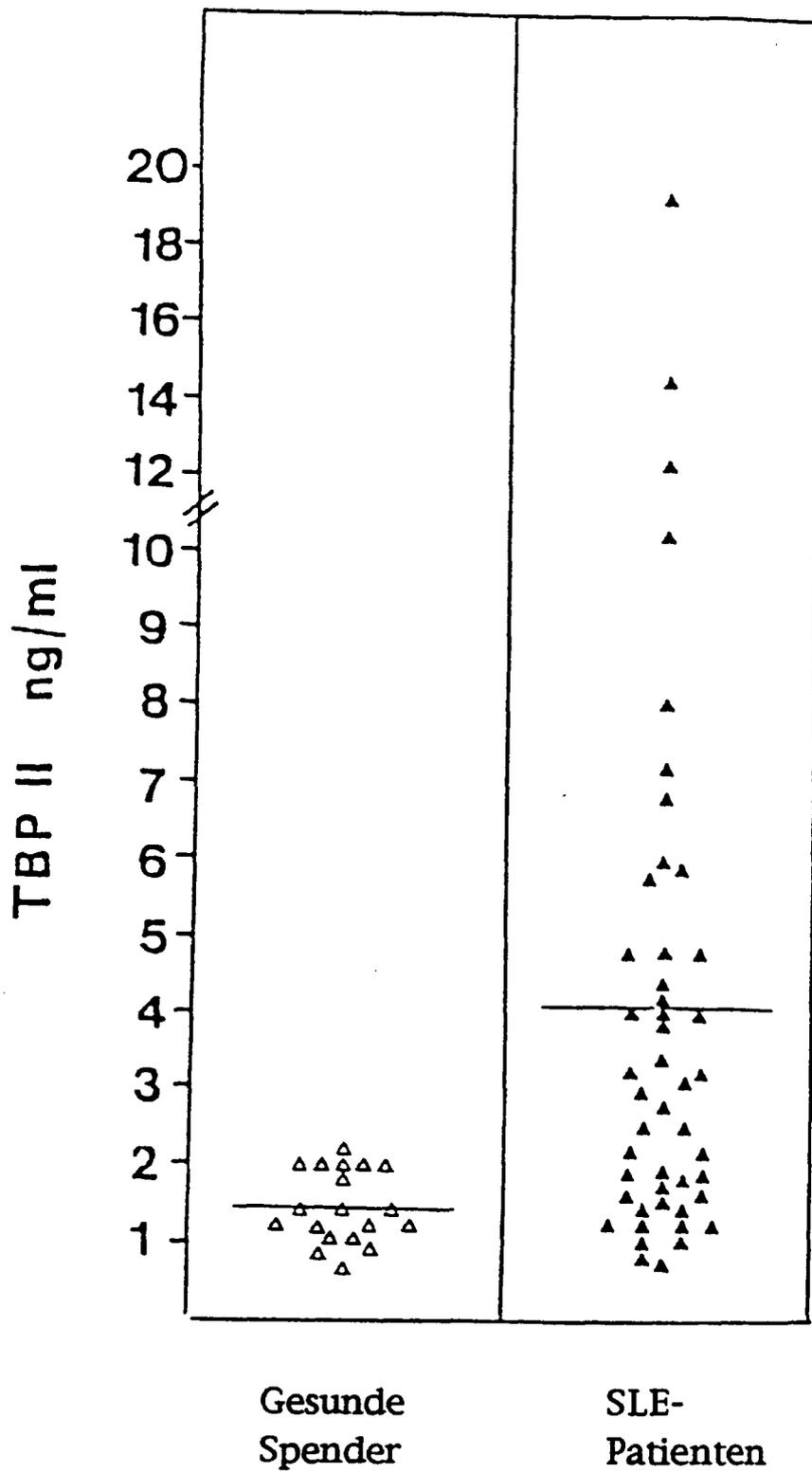
- 1 Die Sequenzen des Peptids in Fraktion 44 überlappen vollständig mit der Sequenz des Peptids in Fraktion 50. Beide Sequenzen stellen die für das vollständige TBP-II-Protein beschriebene Verlängerung der N-terminalen Sequenz dar.
- 2 Die Sequenz des in Fraktion 53 gefundenen Peptids überlappt vollständig mit der für das vollständige TBP-II-Protein beschriebenen N-terminalen Sequenz.



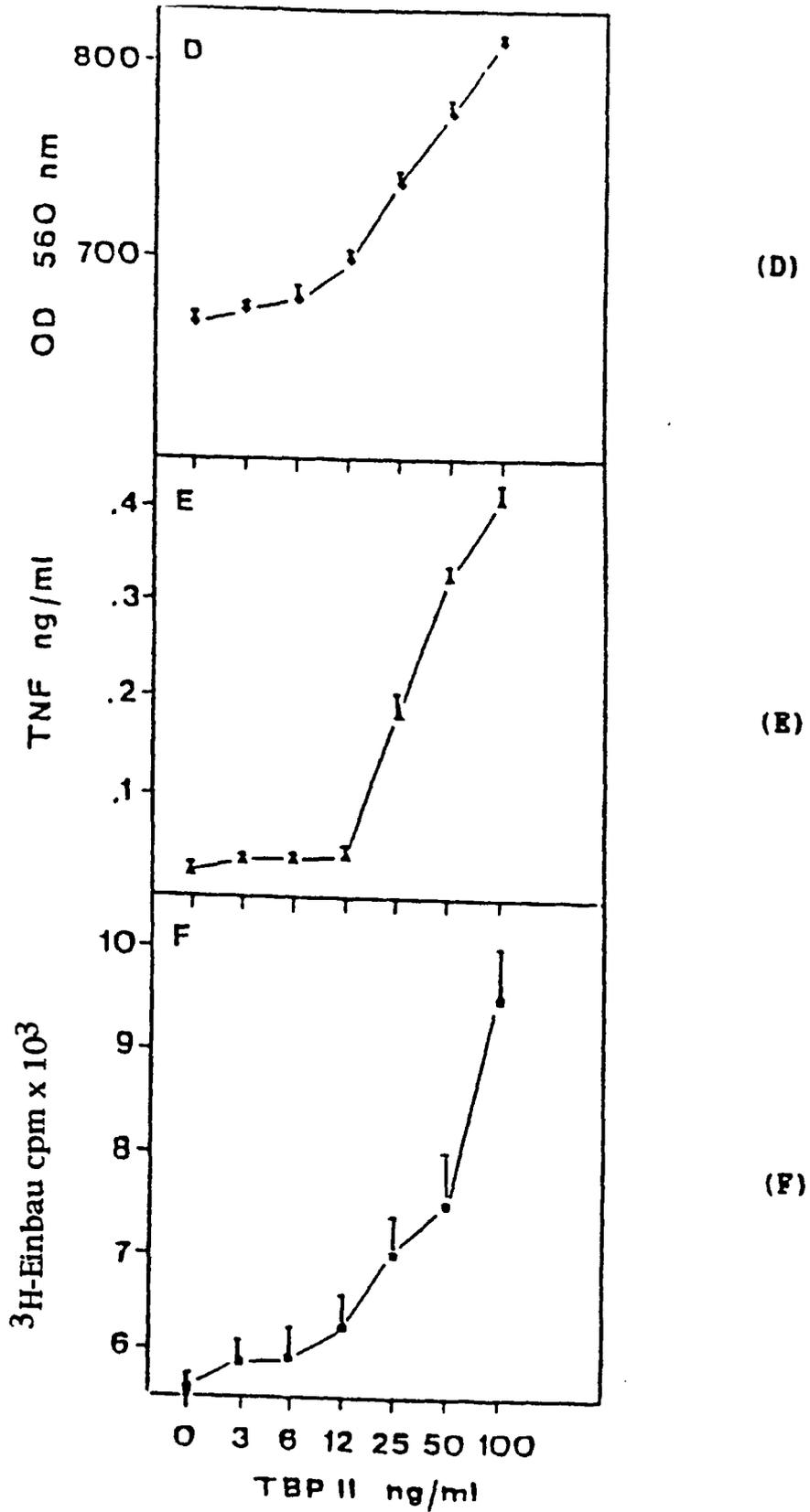
Figur 4



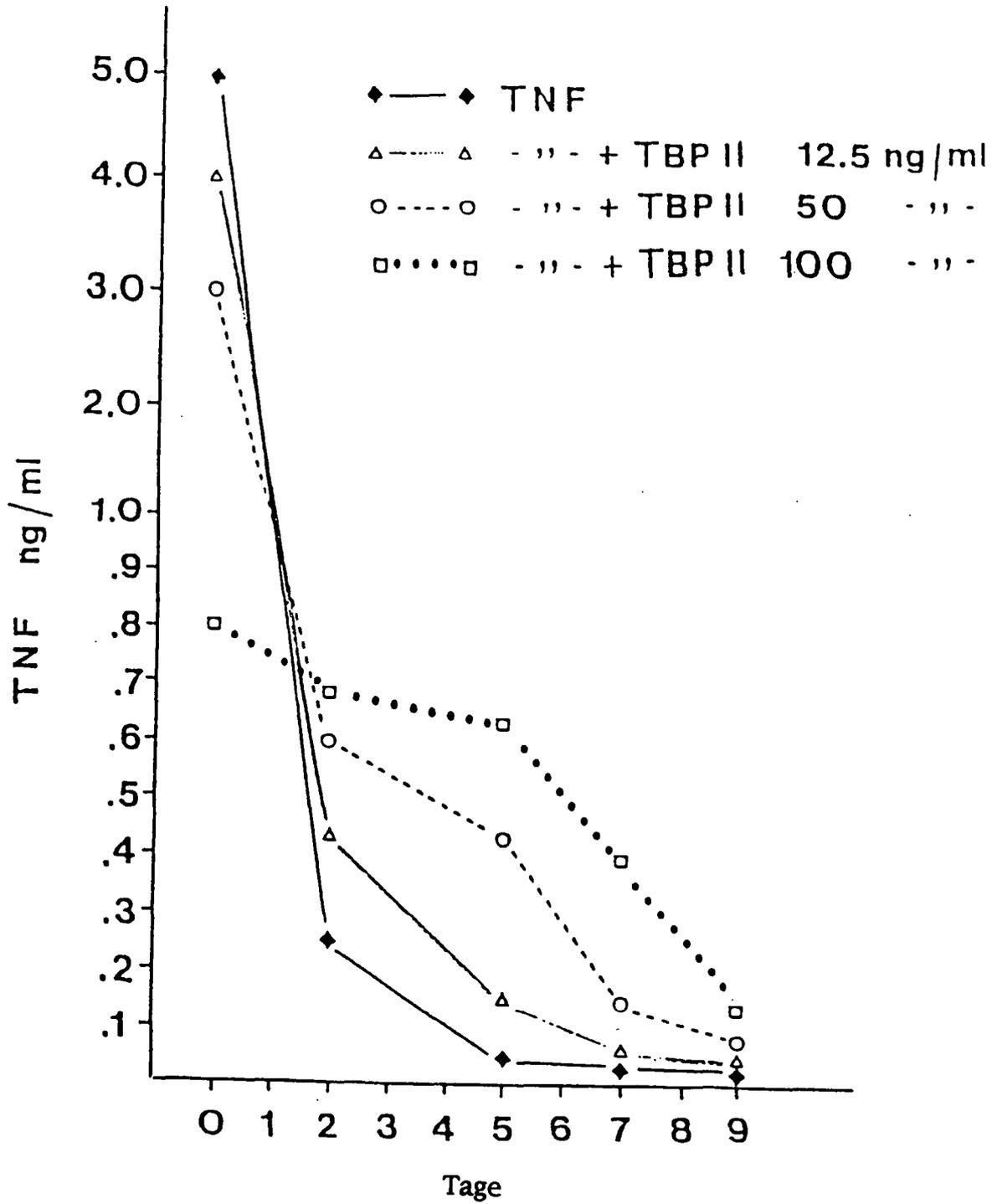
Figur 5



Figur 6



Figur 7



Figur 8