



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 695 35 495 T2** 2008.01.17

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 782 625 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **695 35 495.7**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US95/11720**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **95 934 426.8**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1996/008570**

(86) PCT-Anmeldetag: **14.09.1995**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **21.03.1996**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **09.07.1997**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **09.05.2007**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **17.01.2008**

(51) Int Cl.⁸: **C12N 15/62** (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

C07K 14/16 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

(30) Unionspriorität:
305700 **14.09.1994** **US**

(73) Patentinhaber:
Merck Patent GmbH, 64293 Darmstadt, DE

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

(72) Erfinder:
**LO, Kin-Ming, Lexington, MA 02173, US; SUDO,
Yukio, Asaka City, Saitama, 352, JP; GILLIES,
Stephen D., Hingham, MA 02043, US**

(54) Bezeichnung: **EXPRESSION UND EXPORTTECHNOLOGIE VON PROTEINEN ALS AN IMMUNOGLOBIN GEBUN-
DENE FUSIONSPROTEINE**

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

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

Beschreibung

Hintergrund

[0001] Die Erfindung betrifft Fusionsprotein-Expressionssysteme für die Verwendung in Säugetierzellen, die die Produktion eines gegebenen Zielproteins verstärken. Insbesondere betrifft die Erfindung eine Sekretionskassette, die aus einem Säugetier-Signalpeptid und einem Teil von Säugetier-Immunglobulinen besteht, die, wenn als der aminoterminalen Fusionspartner für das Zielprotein verwendet, im Allgemeinen zu einem hohen Expressions- und Sekretionsspiegel des Fusionsprodukts führt. Derartige Fusionsproteine sind, zum Beispiel, für die Herstellung und extrazelluläre Sammlung von Zielproteinen ohne die Notwendigkeit einer Lyse einer Wirtszelle von Nutzen. Die Erfindung ist vielleicht am meisten für die Expression von Zielproteinen von Nutzen, die normalerweise nicht von einer Wirtszelle sezerniert werden, von einer Wirtszelle mit niedrigen Spiegeln sezerniert werden oder für eine Wirtszelle toxisch oder auf andere Weise schädlich sind.

[0002] Gen-Fusionskonstrukte einsetzende Expressionssysteme wurden verwendet, um die Produktion von Proteinen in Bakterien zu erhöhen. Der Einsatz eines bakteriellen Proteins, dessen Expressionsspiegel normalerweise sehr hoch ist, als der aminoterminalen Fusionspartner eines Fusionsproteins hilft dabei, effiziente Transkription und Translation der Botschaft und in einigen Fällen die Sekretion und das Löslichmachen des Fusionsproteins zu gewährleisten (Smith und Johnson (1988) *Gene* 67:31; Hopp et al. (1988) *Biotechnology* 6:1204; La Vallie et al. (1993) *Biotechnology* 11:187). Das Hauptziel der Expression von rekombinanten Fusionsproteinen in Säugetierzellen war die Übertragung von neuen Eigenschaften auf die Hybridmoleküle, z. B. Lenkung eines Cytokins oder Toxins in vivo, Fc-Rezeptorbindung, Komplementfixierung, Protein A-Bindung, Erhöhung der Halbwertszeit und Durchqueren der Blut-Hirn-Schranke. Beispiele für rekombinante Fusionsproteine, die in Säugetierzellen hergestellt werden, umfassen Cytokin-Immunkonjugate (Gillies et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69:1428; Gillies et al. (1993) *Bioconjugate Chemistry* 4:230), Immunadhäsine (Cappon et al. (1989) *Nature* 337:525), Immuntoxine (Chaudhary et al. (1989) *Nature* 339:394), und ein Nervenwachstumsfaktor-Konjugat (Friden et al. (1993) *Science* 259:373).

[0003] In der PCT-Veröffentlichung WO 91/08298 werden Fusionsproteine offenbart, die in N- zur C-Richtung (5' → 3') eine Signalsequenz enthalten, die mit einem Zielprotein verbunden ist ("Ligandenbindungspartner"), das mit einer Gelenkregion verbunden ist, die schließlich mit der Fc-Region eines Immunglobulins (CH2-CH3-Domäne) verbunden ist. Diese Konstrukte zeigen eine erhöhte Plasmastabilität des Ligandenbindungspartners.

[0004] Gillies et al. (*Bioconjugate Chem.* 1993, 4, 230-235) lehren Fusionsproteine, die aus einem intakten vollständigen Antikörper bestehen, der mit seinem C-Terminus an den N-Terminus eines Cytokins wie beispielsweise IL2 und GM-CSF verbunden ist. Diese Immuncytokine zeigen eine deutlich rasche Clearance-Geschwindigkeit in vivo, bezogen auf den freien Antikörper.

[0005] Proteine, die in Säugetierzellen hergestellt werden, weisen oftmals nicht die Löslichkeits- und Sekretionsprobleme auf, die bei bakterieller Expression angetroffen werden. Die Verwendung von Genfusions-Konstrukten zur Erhöhung der Produktion oder Sekretion eines Zielproteins in einem Säugetiersystem wurde nicht vollständig erforscht.

[0006] Es ist die Aufgabe der Erfindung DNAs bereitzustellen, die die Produktion und Sekretion eines Zielproteins erleichtern. Insbesondere sind Aufgaben der vorliegenden Erfindung die Bereitstellung von neuen DNAs, die: effiziente Produktion und Sekretion von schwer zu exprimierenden Proteinen, wie beispielsweise Nucleoproteinen, regulatorischen Proteinen oder Proteinen, die auf andere Weise für eine Wirtszelle toxisch sein können, erleichtern und die an jegliches interessierende Zielpolypeptid angepasst werden können, die kodiert werden und in einem Wirtsorganismus exprimiert werden können; die Bereitstellung von DNA-Konstrukten für die schnelle und effiziente Produktion und Sekretion von Proteinen in einer Vielzahl von Wirtszellen; und die Bereitstellung eines Verfahrens zur Produktion, Sekretion und Sammlung von genetisch veränderten Proteinen, einschließlich nicht-nativen, biosynthetischen oder auf andere Weise künstlichen Proteinen, wie beispielsweise Proteinen, die durch rationales Design erschaffen wurden. Andere Aufgaben der vorliegenden Erfindung sind die Bereitstellung von DNA-Sequenzen, die, wenn mit einem für ein Zielprotein kodierenden Polynucleotid fusioniert, für ein Fusionspolypeptid kodieren, das unter Verwendung von üblichen Reagenzien und Techniken gereinigt werden kann, und gegebenenfalls die Einführung einer proteolytischen Spaltungsstelle zwischen der kodierten Sekretionskassette und dem kodierten Zielprotein, so dass die Sekretionskassette von dem Zielprotein abgespalten werden kann und das Zielprotein unabhängig gereinigt werden kann. Noch eine weitere Aufgabe ist die Bereitstellung eines Verfahrens, das sowohl effizient wie auch kostengünstig ist.

[0007] Diese und andere Aufgaben der vorliegenden Erfindung werden aus der folgenden Beschreibung, den Abbildungen und Ansprüchen offensichtlich.

Kurze Beschreibung der Erfindung

[0008] Die vorliegende Erfindung bietet eine DNA mit allgemeiner Anwendbarkeit für die Produktion und Sekretion von Fusionsproteinen. Die DNA enthält eine Sekretionskassette als den aminoterminalen Fusionspartner und ein Zielprotein, und wird hierin als ein „Immunfusin“ bezeichnet. Die Erfindung stellt, in ihren verschiedenen Aspekten, eine rekombinante DNA bereit, die für das Immunfusin kodiert, und Verfahren zur Herstellung des kodierten Immunfusinproteins. Das Immunfusin ist eine DNA, die ein Polynucleotid enthält, das für eine Sekretionskassette kodiert, die in ihrer 5' zur 3'-Richtung eine Signalsequenz und eine Immunglobulin-Fc-Region enthält und ein Polynucleotid, das für ein Zielprotein kodiert, das an das 3'-Ende der Sekretionskassette fusioniert ist. Eine erfindungsgemäße Sekretionskassette kann, einmal konstruiert, an verschiedene Zielproteine fusioniert werden. Außerdem kann man die Sequenzen optimieren, die die Expression einer Sekretionskassette regulieren, und so die Expression des Immunfusins. Die resultierende DNA kann in einer Wirtszelle in hohen Spiegeln exprimiert werden, und das Fusionsprotein wird effizient von der Wirtszelle produziert und sezerniert. Das sezernierte Immunfusin kann aus dem Kulturmedium gesammelt werden, ohne dass die Wirtszelle lysiert werden muss, und kann auf Aktivität untersucht werden oder unter Verwendung von üblichen Reagenzien gereinigt werden, je nach Wunsch.

[0009] Der Anteil der DNA, der für die Signalsequenz kodiert, kodiert vorzugsweise für ein Peptidsegment, das die Sekretion des Immunfusinproteins steuert und anschließend abgespalten wird. Wie in der Patentschrift und den Ansprüchen verwendet, meint „Immunglobulin-Fc-Region“ den carboxyterminalen Teil einer konstanten Region der schweren Immunglobulinkette. Jede konstante Region der schweren Immunglobulinkette besteht bekanntermaßen aus vier oder fünf Domänen. Die Domänen werden aufeinander folgend wie folgt bezeichnet: CH1-Gelenk-CH2-CH3(-CH4), und der Fc-Region von jeder Immunglobulin-Unterklasse fehlt die CH1-Domäne. Wie aus einer Übersicht der DNA-Sequenzen der Immunglobulin-Unterklassen ersichtlich, weisen die DNA-Sequenzen der Domänen der schweren Kette eine Kreuzhomologie unter den Immunglobulin-Klassen auf, z. B. ist die CH2-Domäne von IgG homolog zur CH2-Domäne von IgA und IgD, und zur CH3-Domäne von IgM und IgE.

[0010] Die derzeit bevorzugte Sekretionskassette ist ein Polynucleotid, das in seiner 5'- zur 3'-Richtung für die Signalsequenz eines Gens einer leichten Immunglobulinkette und die FC γ 1-Region des humanen Immunglobulin γ 1-Gens kodiert. Die Fc γ 1-Region des Immunglobulin γ 1-Gens umfasst einen Teil der Gelenk-Domäne, der CH2-Domäne und CH3-Domäne. Die für die Sekretionskassette kodierende DNA kann in ihrer genomischen Konfiguration oder in ihrer cDNA-Konfiguration vorliegen. Die unten beschriebenen Untersuchungen verwenden jedoch eine Sekretionskassette in der genomischen Konfiguration. Die Verwendung des humanen Fc γ 1 als die Fc-Regionssequenz hat mehrere Vorteile. Zum Beispiel kann, wenn das Fusionsprotein als ein Biopharmazeutikum verwendet werden soll, die Fc γ 1-Domäne die Effektorfunktionsaktivitäten auf das Fusionsprotein übertragen. Die Effektorfunktionsaktivitäten umfassen die biologischen Aktivitäten wie beispielsweise Komplementfixierung, antikörpergerichtete zelluläre Zytotoxizität, Fähigkeit für Plazentadurchtritt und eine längere Halbwertszeit im Serum. Die Fc-Domäne ermöglicht auch den Nachweis durch anti-Fc-ELISA und Reinigung durch Bindung an das Staphylococcus aureus Protein A ("Protein A"). In bestimmten Anwendungen kann es wünschenswert sein, spezifische Effektorfunktionen aus der FC-Region zu deletieren, wie beispielsweise Fc-Rezeptorbindung oder Komplementfixierung.

[0011] In einer weiteren Ausführungsform kann die Fc-Region ein murines Immunglobulin-Gen sein. Die Verwendung von murinem Fc als die Fc-Region kann Vorteile haben. Zum Beispiel wird dann, wenn das Fusionsprotein für die Herstellung von Proteinen in Mäusen verwendet werden soll, die murine Fc-Region keine Immunantwort in dem Wirtstier hervorrufen. Die Fc-Domäne kann die Effektorfunktionsaktivitäten an das Fusionsprotein übertragen und den Nachweis des Fusionsproteins durch anti-Fc-ELISA sowie die Reinigung durch Bindung an Protein A ermöglichen. In bestimmten Anwendungen kann es wünschenswert sein, spezifische Effektorfunktionen aus der Fc-Region zu deletieren.

[0012] In einer weiteren Ausführungsform kodiert die DNA-Sequenz für eine proteolytische Spaltungsstelle, die zwischen die Sekretionskassette und das Zielprotein eingeschoben ist. Eine Spaltungsstelle ermöglicht die proteolytische Spaltung des kodierten Fusionsproteins und so die Abtrennung der Fc-Domäne von dem Zielprotein. Wie hier verwendet, versteht sich „proteolytische Spaltungsstelle“ als die Aminosäuresequenzen, die durch ein proteolytisches Enzym oder andere proteolytische Spaltungsmittel gespalten werden. Wie weiter unten noch genauer beschrieben, umfassen nützliche proteolytische Spaltungsstellen Aminosäuresequenzen,

die durch proteolytische Enzyme wie Trypsin, Plasmin oder Enterokinase K erkannt werden.

[0013] In einer bevorzugten Ausführungsform kodiert die Zielproteinsequenz für das Prostata-spezifische Membranantigen, PSMA. PSMA ist ein Membranprotein vom Typ II, also wird die extrazelluläre Domäne, oder lösliche Form des Proteins, als die Zielproteinsequenz verwendet. Die kodierte lösliche Form von PSMA kann eine humane Sequenz sein, wie beispielsweise die in Israeli et al. (1993) Cancer Res., 53:227-ff. bereitgestellte Sequenz.

[0014] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform kodiert die Zielproteinsequenz für das Protein gp120. Das Hüllprotein gp120 des humanen Immundefizienz-Virus ist ein Glykoprotein, das in infizierten Zellen als ein Polyprotein, gp160 exprimiert wird, und dann durch eine zelluläre Protease in gp120 und gp41 gespalten wird. Die Nucleotidsequenz und die Aminosäuresequenz von gp120 wird in Ratner et al., 1985, Nature, 313:277-ff bereitgestellt.

[0015] In einem weiteren Aspekt wird die erfindungsgemäße DNA-Sequenz innerhalb eines replizierbaren Expressionsvektors integriert. Wie hier verwendet, versteht sich „Vektor“ als jegliche Nukleinsäure, die eine interessierende Nucleotidsequenz enthält und für einen Einbau in eine Wirtszelle und für eine Rekombination mit und Integration in das Wirtszellengenom kompetent ist, oder für eine autonome Replikation als ein Episom. Derartige Vektoren umfassen lineare Nukleinsäuren, Plasmide, Phagemide, Cosmide und dergleichen. Ein bevorzugter Expressionsvektor ist pdC, in dem die Transkription der Immunfusin-DNA unter die Kontrolle des Enhancers und des Promotors des humanen Cytomegalovirus gestellt wird. Der Vektor pdC wurde von pdEMp abgeleitet, der in Lo et al. 1991, Biochim. Biophys. Acta 1088:712 wie folgt beschrieben wurde. Das SalI-XhoI-Fragment, das die originale Enhancer- und Promotersequenz enthält, wurde durch den Enhancer und Promotor des humanen Cytomegalovirus mittels standardmäßiger molekularbiologischer Techniken ersetzt. Die Enhancer- und Promotersequenz des verwendeten humanen Cytomegalovirus wurde von den Nucleotiden -601 bis +7 der Sequenz abgeleitet, die in Boshart et al., 1985, Cell 41:521 bereitgestellt wurde. Der Vektor enthält auch das mutierte Dihydrofolat-Reductase-Gen als einen Selektionsmarker (Simonsen und Levinson (1983) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 80:2495).

[0016] Eine geeignete Wirtszelle kann mit der erfindungsgemäßen DNA-Sequenz transformiert oder transfiziert werden und für die Expression und Sekretion eines Zielproteins genutzt werden. Derzeit bevorzugte Wirtszellen für die Verwendung in der Erfindung umfassen unsterbliche Hybridom-Zellen, Myelom-Zellen, 293-Zellen, (Chinese hamster ovary-) CHO-Zellen, Hela-Zellen und COS-Zellen. Wie hier verwendet, versteht sich „Genexpression“ oder „Expression eines Zielproteins“ als Bezug auf die Transkription der DNA-Sequenz, Translation des mRNA-Transkripts und Sekretion des Fusionsproteinprodukts.

[0017] Das erfindungsgemäße Verfahren umfasst die Bereitstellung einer DNA-Sequenz, die für ein Immunfusin kodiert, Transfektion der DNA-Sequenz in eine Wirtszelle durch eine zugängliche Transfektions- oder Transformationstechnik, Kultivieren der transfizierten Wirtszelle in einem geeigneten Medium unter Bedingungen, die die Expression und Sekretion des Immunfusins fördern, und Sammeln des Fusionsproteins aus dem extrazellulären Medium. Wenn gewünscht, kann das Zielprotein von der Sekretionskassette abgespalten werden, entweder bevor oder nachdem es aus dem extrazellulären Medium gesammelt wurde.

[0018] Andere Vorteile und Merkmale der vorliegenden Erfindung werden aus der folgenden Beschreibung, den Abbildungen und aus den Ansprüchen offensichtlich.

Kurze Beschreibung der Abbildung

[0019] Die [Fig. 1A](#)-D sind eine schematische Darstellung eines Immunfusins. [Fig. 1A](#), „DNA“, stellt die DNA dar, die für ein Immunfusinprotein kodiert. [Fig. 1B](#), „Fusioniertes Protein 1“, stellt das Immunfusinprotein vor der Abspaltung der Signalsequenz dar. [Fig. 1C](#), „Fusioniertes Protein 2“, stellt das Immunfusinprotein nach der Abspaltung der Signalsequenz dar. [Fig. 1D](#), „Zielprotein“, stellt den Zielproteinteil eines Immunfusinproteins nach Spaltung des Immunfusinproteins an der Spaltungsstelle dar, die zwischen der Fc-Region und dem Zielprotein eingeschoben wurde.

Ausführliche Beschreibung

[0020] Die vorliegende Erfindung ist eine DNA, die ein Polynucleotid enthält, das in seiner 5'- zur 3'-Richtung für eine Signalsequenz, eine Fc-Region eines Immunglobulins und ein Zielprotein kodiert. Dieser Ansatz für die Expression und nachfolgende Sekretion eines Zielproteins ist bestehenden Techniken aufgrund der Wahl

und der Konfiguration der Sekretionskassette überlegen, die an das 5'-Ende des Fusionskonstrukts gesetzt wird. Außerdem können die regulatorischen Sequenzen, die die Expression der Sekretionskassette steuern, optimiert werden und die optimierte Sekretionskassette kann mit einer Vielzahl an Zielproteinen gepaart werden, was eine effiziente Produktion einer Vielzahl von Fusionsproteinen ermöglicht.

[0021] Die Herstellung der Immufusinproteine ist als effizient und mit hohen Spiegeln gekennzeichnet, da das Zielprotein mit einem Spiegel von mehreren Mikrogramm/Milliliter produziert wurde, unter Verwendung der DNAs und Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung. Bisher haben Arbeitskräfte auf dem Gebiet die Expressionsspiegel von schwer zu exprimierenden Proteinen selten quantifiziert, aufgrund der niedrigen Expressionsspiegel, die in den bekannten Säugetier-Expressionssystemen erhalten werden und den Schwierigkeiten im Anbetracht der Quantifizierung von Proteinen durch Techniken wie Western Blot und RIA. Vor den Lehren der vorliegenden Erfindung wurde die Expression von Mikrogramm pro Milliliter von schwer zu exprimierenden Proteinen oftmals unter Verwendung von bakteriellen Expressionssystemen versucht.

[0022] Die vorliegende Erfindung beruht auf dem Konzept, dass die Leichtigkeit der Produktion und Sammlung eines Zielproteins verbessert werden könnte, wenn das interessierende Polypeptid mit einer Fc-Domäne eines Immunglobulins verknüpft wäre und das Fusionsprotein in einer Wirtszelle exprimiert würde, insbesondere in einer komplementären Wirtszelle, die das Immunglobulin natürlicherweise exprimiert, so dass das Fusionsprotein ohne Weiteres von der Wirtszelle sezerniert würde. Zusätzlich zur Förderung der Sekretion des Fusionsproteins von der Wirtszelle kann die Fc-Region weiter ausgenutzt werden, um die Reinigung des fusionierten Polypeptids zu unterstützen. Der allgemeine Ansatz dieser Erfindung umfasst die Konstruktion eines rekombinanten Polypeptids, das bei Expression zu einer Expression einer Sekretionskassette führt, die mit einem Zielprotein verknüpft ist, d. h. einem interessierende Protein mit möglichem oder nachweisbarem Nutzen.

[0023] Die Gesamtstruktur der erfindungsgemäßen bevorzugten DNA, das von ihr kodierte Fusionsprotein, die Form des Proteins, das am meisten sezerniert wird und das Zielproteinprodukt nach enzymatischer Spaltung sind schematisch in den [Fig. 1A-D](#) dargestellt. Bezugszeichen in der DNA, [Fig. 1A](#), werden in das Protein übernommen, [Fig. 1B-D](#), als entsprechende, mit Strichindex versehene Zeichen. Die DNA, die für das Immufusin kodiert, ist zwischen den Start- und Stopmarkierungen auf der dargestellten DNA-Sequenz gezeigt, [Fig. 1A](#). Regulatorische Elemente stromaufwärts sind am 5'-Ende der DNA gezeigt und als „regulatorische Sequenzen“ bezeichnet. Die DNA besteht aus drei verschiedenen Polynucleotiden, die miteinander verknüpft sind. In [Fig. 1A](#), ist 3' der regulatorischen Sequenzen, die für jede Sekretionskassette optimiert werden können, eine erste DNA **8**, die für eine Sekretionskassette kodiert, die zwei der drei Polynucleotide enthält: 1) eine Signalsequenz **10**, und 2) eine Immunglobulin-Fc γ -Region **12**. Die Immunglobulin-Fc γ -Region besteht aus drei Unterregionen: 1) eine Gelenk-Region **14**, 2) eine CH2-Region **16**, und eine CH3-Region **20**. An das 3'-Ende der für die Sekretionskassette kodierenden DNA ist das dritte Polynucleotid geknüpft, eine für das Zielprotein kodierende DNA **24**. Gegebenenfalls kann eine DNA, die für eine proteolytische Spaltungsstelle **22** kodiert, zwischen die für die CH3-Region der Immunglobulin-Fc γ -Region kodierende DNA und die für das Zielprotein kodierende DNA eingeschoben werden.

[0024] Das kodierte fusionierte Protein umfasst die Sekretionskassette **8'** und das Zielprotein **24'**, wie als Fusioniertes Protein in 1 in [Fig. 1B](#) gezeigt. Meistens wird das Signalpeptid **10'** enzymatisch durch die Wirtszelle vor der Sekretion des Immufusins von dem Fusionsprotein abgespalten und so zeigt das Fusionierte Protein 2, gezeigt in [Fig. 1C](#), das sezernierte fusionierte Protein, das das Fc γ -Peptid **12'** fusioniert an das Zielpolypeptid **24'** enthält. Sowohl Fusioniertes Protein 1 wie auch Fusioniertes Protein 2 zeigen den optionalen Einschub einer proteolytischen Spaltungsstelle **22'** zwischen der CH3-Domäne **20'** der Fc γ -Region **12'** und dem Zielprotein **24'**. Spaltung von entweder dem Fusionierten Protein mit dem geeigneten proteolytischen Mittel an der Spaltungsstelle **22'** führt zu der Freisetzung des Zielproteins **24** von der Fc-Region **12'**, wie in [Fig. 1D](#) gezeigt.

[0025] Die Verfahren zur Manipulation, Amplifizierung und Rekombination von DNAs sind im Allgemeinen auf dem Fachgebiet wohlbekannt und werden daher hier nicht im Detail beschrieben. Verfahren zur Identifizierung und Isolierung von Genen, die für Proteine von Interesse kodieren, oder zur Konstruktion derartiger Gene sind wohl verstanden und entwickelt. Im Allgemeinen umfassen die Verfahren die Auswahl des genetischen Materials, das für Aminosäuren kodiert, die das interessierende Polypeptid gemäß dem genetischen Code definieren.

[0026] Demzufolge kann das DNA-Konstruktionsprinzip, das hierin offenbart wird, ausgenutzt werden unter Verwendung von bekannten DNA-Rekombinationstechniken, die die Verwendung von verschiedenen Restriktionsenzymen umfassen, die sequenzspezifische Schnitte in DNA machen, um stumpfe Enden oder kohäsive Enden herzustellen, DNA-Ligase-Techniken, die enzymatische Addition von klebrigen Enden an stumpf enden-

de DNA ermöglichen, Konstruktion von synthetischen DNAs durch Zusammenbau von kurzen Oligonucleotiden, cDNA-Synthesetechniken, Polymerasekettenreaktion und synthetische Sonden für die Isolierung von Genen mit einer bestimmten Funktion. Verschiedene Promotorsequenzen und andere regulatorische DNA-Sequenzen, die zur Erreichung von Expression verwendet werden, und verschiedene Arten von Wirtszellen sind ebenfalls bekannt und zugänglich. Herkömmliche Transfektionstechniken und ebenso herkömmliche Techniken zum Klonen und Subklonen von DNA sind bei der Ausführung der vorliegenden Erfindung von Nutzen und Fachleuten auf dem Gebiet bekannt. Es können verschiedene Arten von Vektoren verwendet werden, wie beispielsweise Plasmide und Viren, einschließlich tierischer Viren. Die Vektoren können verschiedene Markergene einsetzen, die einer erfolgreich transfizierten Zelle eine nachweisbare phänotypische Eigenschaft vermitteln, die für eine Identifizierung verwendet werden kann, welche einer Familie von Zellen erfolgreich die rekombinante DNA des Vektors eingebaut hat. Angesichts des vorhergehenden Stands der Technik bei gentechnischen Veränderungen, sind Fachleute in der Lage, die hierin beschriebene Erfindung im Anbetracht dieser Beschreibung auszuführen.

[0027] Ein Verfahren, um die DNA zu erhalten, die für verschiedene, hierin offenbarte synthetische Linker kodiert, ist der Zusammenbau von synthetischen Oligonucleotiden in einem herkömmlichen, automatisierten Polynucleotid-Synthesizer, gefolgt von Ligation mit einer Ligase. Zum Beispiel können die Linker als komplementäre DNA-Fragmente unter Verwendung von Phosphoramidit-Chemie synthetisiert werden.

[0028] Die erfindungsgemäße Signalsequenz ist ein Polynucleotid, das für eine Aminosäuresequenz kodiert, die den Transport eines Proteins durch die Membran des endoplasmatischen Retikulums initiiert. Signalsequenzen, die in der vorliegenden Erfindung von Nutzen sein werden, umfassen Signalsequenzen von leichten Ketten von Antikörpern, z. B. Antikörper 14.18 (Gillies et al., 1989, Jour. of Immunol. Meth., 125:191-202), Signalsequenzen von schweren Ketten von Antikörpern, z. B. der Signalsequenz der schweren Kette des Antikörpers MOPC141 (Sakano et al., 1980, Nature 286:5774), und beliebige andere Signalsequenzen, die auf dem Gebiet bekannt sind (siehe zum Beispiel, Watson, 1984, Nucleic Acids Research 12:5145). Signalsequenzen wurden auf dem Gebiet gut charakterisiert und es ist bekannt, dass sie typischerweise 16 bis 30 Aminosäurereste enthalten und mehr oder weniger Aminosäurereste enthalten können. Ein typisches Signalpeptid besteht aus drei Regionen, einer basischen N-terminalen Region, einer zentralen hydrophoben Region und einer polarerer C-terminalen Region. Die zentrale hydrophobe Region enthält 4 bis 12 hydrophobe Reste, die das Signalpeptid durch die Membran-Lipiddoppelschicht während des Transports des naszierenden Polypeptids verankern. Im Anschluss an die Initiierung wird das Signalpeptid gewöhnlich durch zelluläre Enzyme, die als Signalpeptidasen bekannt sind, in das Lumen des endoplasmatischen Retikulums abgespalten. Mögliche Spaltungsstellen des Signalpeptids folgen im Allgemeinen der „(-3, -1)-Regel“. So hat ein typisches Signalpeptid kleine, neutrale Aminosäurereste in den Positionen -1 und -3 und es fehlen Prolinreste in dieser Region. Die Signalpeptidase wird ein derartiges Signalpeptid zwischen den -1 und +1-Aminosäuren spalten. So kann der Anteil der DNA, der für die Signalsequenz kodiert, vom Amino-Terminus des Immunfusinproteins während der Sekretion abgespalten werden. Dies führt zu der Sekretion eines Immunfusinproteins, bestehend aus der Fc-Region und dem Zielprotein. Eine detaillierte Diskussion von Signalpeptidsequenzen wird bereitgestellt von von Heijne (1986) Nucleic Acids Res., 14:4683. Wie einem Fachmann offensichtlich wäre, kann die Eignung einer bestimmten Signalsequenz für die Verwendung in der Sekretionskassette einige Routineexperimente erfordern. Derartige Experimente werden die Bestimmung der Fähigkeit der Signalsequenz umfassen, die Sekretion eines Immunfusins zu steuern, und auch die Bestimmung einer optimalen Konfiguration, genomisch oder cDNA, der zu verwendenden Sequenz, um eine effiziente Sekretion von Immunfusinen zu erreichen. Zusätzlich ist ein Fachmann in der Lage, ein synthetisches Signalpeptid zu erschaffen, indem er den von von Heijne vorgestellten Regeln folgt, die oben zitiert wurden, und auf die Effizienz einer derartigen synthetischen Signalsequenz durch Routineexperimente testet. Eine Signalsequenz wird auch als ein „Signalpeptid“, eine „Leader-Sequenz“ oder als „Leader-Peptide“ bezeichnet und jeder dieser Begriffe mit Bedeutungen, die synonym zu Signalsequenz sind, kann hierin verwendet werden.

[0029] Die FC-Region eines Immunglobulins ist die Aminosäuresequenz für den carboxylterminalen Teil einer konstanten Region einer schweren Immunglobulinkette. Die Fc-Regionen sind insbesondere bei der Bestimmung der biologischen Funktionen des Immunglobulins von Bedeutung und diese biologischen Funktionen werden als Effektorfunktionen bezeichnet. Bekanntlich enthalten die schweren Ketten der Immunglobulin-Unterklassen vier oder fünf Domänen: IgM und IgE besitzen fünf schwere Ketten-Domänen und IgA, IgD und IgG besitzen vier schwere Kette-Domänen. Die Fc-Region von IgA, IgD und IgG ist ein Dimer der Gelenk-CH2-CH3-Domänen und in IgM und IgE ist sie ein Dimer der Gelenk-CH2-CH3-CH4-Domänen. Des Weiteren ist die CH3-Domäne von IgM und IgE strukturell äquivalent zu der CH2-Domäne von IgG, und die CH4-Domäne von IgM und IgE ist das Homolog der CH3-Domäne von IgG (siehe, W. E. Paul, Hrsg., 1993, Fundamental Immunology, Raven Press, New York, New York). Jegliche der bekannten Fc-Regionen würde

als die Fc-Region der Sekretionskassette von Nutzen sein. Es ist jedoch wichtig, dass die Bindungsstellen für bestimmte Proteine aus der FC-Region während der Konstruktion der Sekretionskassette deletiert werden. Zum Beispiel sollte, da Co-Expression mit der leichten Kette unnötig ist, die Bindungsstelle für das Bindungsprotein der schweren Kette, Bip (Hendershot et al. (1987) Immunol. Today 8:111-114) aus der CH2-Domäne der Fc-Region von IgE deletiert werden, so dass diese Stelle die effiziente Sekretion des Immufusins nicht beeinträchtigt. Ebenso sollten die Cysteinreste, die in den Fc-Regionen vorkommen und für die Bindung an die leichte Kette des Immunglobulins verantwortlich sind, deletiert oder durch eine andere Aminosäure substituiert werden, so dass diese Cysteinreste nicht die richtige Faltung der Fc-Region beeinträchtigt, wenn sie als ein Immufusin produziert wird. Auf die gleiche Weise sollten Sequenzen der Transmembran-Domäne, wie beispielsweise solchen, die in IgM vorkommen, deletiert werden, so dass diese Sequenzen nicht zu einer Fehlsteuerung des Immufusins an die Membran als ein Transmembranprotein führen.

[0030] Bei Expression und Produktion der Fc-Region als ein Teil der Sekretionskassette kann diese einige der biologischen Eigenschaften, die als „Effektorfunktionen“ bezeichnet werden und die für die bestimmte Immunglobulinklasse nativ sind, aus der die Fc-Region erhalten wurde, beibehalten. Nützliche Effektorfunktionen umfassen, zum Beispiel, Komplementfixierung, Fc-Rezeptorbindung, Bindung an Zellmembranen und Plazentadurchtritt. In einigen Fällen kann es von Vorteil sein, eine oder mehrere dieser Effektorfunktionen zu modifizieren oder zu beseitigen, wie beispielsweise Fc-Rezeptorbindung oder Komplementfixierung, indem ortsgerichtete Mutagenese oder andere wohlbekanntere molekularbiologische Techniken verwendet werden. Zum Beispiel haben Duncan et al. (Nature, 1988, 332:738) die Aminosäuren kartiert, die für einige der Immunglobulin-Gamma-Effektorfunktionsaktivitäten verantwortlich sind, siehe auch Duncan et al., 1988, 332:563; Yasmeen et al., Immunol., 1976, 116:518; Tao et al., J. Immunol., 1989, 143:2595. Die Aminosäuren oder Peptidsegmente, die für diese Funktionen verantwortlich sind, können deletiert werden, was den Teil der Fc-Region entfernt, oder durch Sequenzen substituiert werden, die diese Funktion nicht übertragen würden, unter Verwendung von wohlbekannteren molekularbiologischen Techniken.

[0031] Die derzeit bevorzugte Klasse von Immunglobulin, aus der die Fc-Region gewonnen wird, ist Immunglobulin Gamma-1, da es gut charakterisiert wurde und es von den meisten Zellarten effizient sezerniert wird. Die FC-Region der anderen Unterklassen von Immunglobulin Gamma (Gamma-2, Gamma-3 und Gamma-4) würde ebenso gut in der Sekretionskassette funktionieren. Die Fc-Region von Immunglobulin Gamma-1, die vorzugsweise in der Sekretionskassette verwendet wird, umfasst zumindest einen Teil der Gelenkregion, CH2-Region und CH3-Region. Außerdem kann die Fc-Region von Immunglobulin Gamma-1 ein CH2-deletiertes Fc sein, das einen Teil einer Gelenkregion und eine CH3-Region umfasst, wobei die CH2-Region deletiert wurde. Ein CH2-deletiertes Fc wurde beschrieben von Gillies et al., 1990, Hum. Antibod. Hybridomas, 1:47; diese Veröffentlichung wird durch Bezugnahme hier aufgenommen.

[0032] Wie aus der oben aufgeführten Diskussion von FC-Regionen ersichtlich, wären die FC-Regionen von den anderen Klassen von Immunglobulinen, IgA, IgD, IgE und IgM, ebenfalls als die Fc-Region der Sekretionskassette von Nutzen. Des Weiteren wären Deletionskonstrukte dieser Fc-Regionen, in denen eine oder mehrere der konstanten Domänen deletiert sind, ebenfalls von Nutzen. Ein durchschnittlicher Fachmann könnte derartige Deletionskonstrukte unter Verwendung von wohlbekannteren molekularbiologischen Techniken herstellen.

[0033] Die Identität des Zielproteins, das gemäß der vorliegenden Erfindung hergestellt wurde, ist im Wesentlichen nicht eingeschränkt. Tatsächlich ist ein wichtiges Merkmal der Erfindung, dass diese ein allgemeines DNA-Konstrukt sowie ein Verfahren bereitstellt, das angepasst werden kann, um die rekombinante Produktion von jeglichem gewünschten Zielprotein zu erleichtern. Zum Beispiel ermöglicht die Anwendung der Erfindung auf die Expression von regulatorischen Proteinen, wie beispielsweise Transkriptionsfaktoren, die normalerweise im Zellkern lokalisiert sind, die effiziente Sekretion von derartigen, normalerweise nicht sezernierten Proteinen. Außerdem sind regulatorische Proteine im Allgemeinen schwer zu exprimieren und die Reinigungsverfahren sind im Allgemeinen mühsam (siehe, zum Beispiel, Meisterernst et al. (1991) Cell 66:981). Daher ist es besonders wünschenswert, dass derartige Proteine in das Kulturmedium exportiert werden. Außerdem kann die Erfindung verwendet werden, um die Herstellung und Sekretion von Proteinen zu verstärken, die normalerweise mit geringen Spiegeln exprimiert werden. Wenn ein gewünschtes Zielprotein Sequenzen umfasst, die für ein Sekretionssignal oder ein Transmembransignal kodieren, können diese Sequenzen aus dem Zielprotein entfernt werden, so dass die Sekretionskassette die Sekretion des Fusionsproteins steuert.

[0034] Die optionale proteolytische Spaltungsstelle kann jegliche Aminosäuresequenz sein, die von spezifischen Spaltungsmitteln erkannt wird. Die Spezifität der Spaltungsmittel wird durch die Identität der Sequenz von Aminosäuren an oder nahe dem hydrolysierten Peptid bestimmt. Ein gegebenes Spaltungsmittel kann die

Bindung zwischen zwei spezifischen Aminosäuren erkennen oder kann eine Bindung erkennen, die auf eine Aminosäure oder eine spezifische Sequenz aus Aminosäuren folgt. Die Spezifität vieler Spaltungsmittel ist bekannt. Tabelle 1 legt unten Listen von verschiedenen, bekannten Spaltungsmitteln sowie deren primäre (und in einigen Fällen sekundäre) Wirkungsstelle dar.

TABELLE 1

Spaltungsmittel	Hauptwirkungsstelle	andere Wirkungsstellen
Trypsin	Arg, Lys	
Chymotrypsin	Trp, Phe, Tyr	Leu, Met, His
Elastase	Neutrale aliphatische Reste	
Pepsin	Phe, Leu, Trp	Ala, Gly, Glu
Papain	Arg, Lys, Gly	breite Spezifität
Subtilisin	aromatische und aliphatische Reste	verschiedene
Thermolysin	Amino-verknüpfte Bindungen von aliphatischen Resten	Ala, Phe
S. aureus-Protease	Glu	Asp
Endoproteinase	Arg	
Arg C (Submaxillaris Protease)		
Clostripain	Arg	
Thrombin	Arg	
Collagenase	X-Gly-Pro	X-Ala-Pro X-Gly-Thr
Lysobacter	Lys	
Enzymogene (Endoproteinase Lys-C)		
Mysobacter AI-1	Lys	
Protease		
Armillaria mellea	Lys	
Flavobacterium meringosepticum	Pro	
Factor Xa	Ile-Glu-Gly-Arg	
CNBr	Met	
BNPS-Skatol	Trp	
N-Bromsuccinimid	Trp	
O-Iodosobenzoessäure	Trp	
HBr/DMSO	Trp	
NTCB	Cys	
Natriummetall in flüssigem Ammoniak	Pro	
Hydroxylamin	Asn-Gly	
verdünnte Säure:	Asp-Pro	

[0035] Andere Spaltungsmittel sind bekannt. Solche für die Verwendung in der vorliegenden Erfindung bevorzugte sind Enzyme mit einer primären Wirkungsstelle, die an der C-terminalen Seite des Spaltungsstellenrests spalten.

[0036] Die Spaltungsstelle in dem fusionierten Protein kann im Allgemeinen jegliche Aminosäure oder Se-

quenz an Aminosäuren enthalten, die durch ein Spaltungsmittel gespalten werden, das für die Stelle in einer geeigneten Umgebung spezifisch ist. Die Spezifität der Spaltung kann erhöht werden und die Wahrscheinlichkeit einer unerwünschten Spaltung innerhalb des Zielproteins oder anderswo in dem fusionierten Polypeptid kann vermindert werden, indem das Spaltungsmittel mit einer Wirkungsstelle ausgewählt wird, die im Zielpolypeptid nicht vorkommt. Das fusionierte Polypeptid wird vorzugsweise unter Bedingungen gespalten, in denen es seine native Konformation angenommen hat. Dies hat den Effekt, dass die Gegenwart von potentiellen Spaltungsstellen in dem Zielpolypeptid maskiert wird.

[0037] Die Erfindung wird weiter durch die folgenden nichteinschränkenden Beispiele erläutert.

Beispiel 1. Konstruktion einer Sekretionskassette

[0038] Die Konstruktion einer beispielhaften Sekretionskassette wird unten beschrieben. Wie von einem durchschnittlichen Fachmann verstanden würde, könnten die Signalsequenz und die Fc-Region eines Immunglobulins andere Sequenzen als die beschriebenen sein.

[0039] Die Signalsequenz einer leichten Immunglobulinkette des Antikörpers 14.18 wurde für die Verwendung als die Signalsequenz der Sekretionskassette ausgewählt. Die Sequenz der leichten Kette des Antikörpers 14.18 wird in Gillies et al., 1989, Jour. Immunol. Meth., 125:191-202 bereitgestellt und ist durch Bezugnahme hierin aufgenommen. Die Signalsequenz wurde für eine leichtere Klonierung als ein XbaI-AfIII-Fragment der DNA modifiziert. Wie für einen Fachmann auf dem Gebiet offensichtlich wäre, könnte auch die DNA, die für eine humane Signalsequenz kodiert, verwendet werden. Insbesondere wurde eine XbaI-Stelle 5' des Translationsstartcodons und der Konsensus-Sequenz für eine optimale Ribosombindung eingefügt (Kozak, 1984, Nature 308:241). Eine AfIII-Stelle wurde in das 3'-Ende der Signalsequenz durch Mutagenese der für den vorletzten Aminosäurereste des Signalpeptids kodierenden DNA von einem Serin zu einem Leucin eingefügt, und so wurde die Sequenz ATC zu TTA unter Verwendung von ortsgerichteter Mutagenese mutagenisiert.

[0040] Die Fc-Region eines Immunglobulins wurde ausgewählt als die humane, genomische Fc γ 1-DNA, die die genomische Konfiguration der Gelenk-, CH2- und CH3-Domänen umfasst. Die genomische Sequenz von humanem Fc γ 1 wird in Huck et al., (1986) Nucleic Acids Res. 14:1779 bereitgestellt. Wie einem durchschnittlichen Fachmann offensichtlich wäre, kann auch ein CH2-deletiertes Fc als die Fc-Region der Sekretionskassette verwendet werden (siehe, Gillies et al., 1990, Hum. Antibod. Hybridomas, 1:47), in welchem Fall die CH2-Domäne aus der Fc-Region unter Verwendung von bestehenden molekularbiologischen Techniken während der Konstruktion der Sekretionskassette deletiert werden würde. Die genomische DNA von Fc γ 1 wurde für eine leichtere Klonierung als ein AfIII-XmaI-Fragment modifiziert. Das 5'-Ende der humanen genomischen Fc-DNA wurde zu einer AfIII-Stelle mutagenisiert, indem eine Polymerasekettenreaktion (PCR) ausgeführt wurde, bei der ein 5'-Sinn-Primer mit der folgenden Sequenz (Sequence ID No. 1) verwendet wurde:
GAGAATTCTTAAGCGAGCCCAAATCTTCTGACAAACTCAC

[0041] Dieser Primer führte eine AfIII-Stelle (unterstrichen) ein und eine Mutation von Cystein zu Serin (TGT zu TCT, fett). Das mutierte Cystein ist jenes, das normalerweise an der Disulfid-Bindung mit der leichten Kette beteiligt ist, und sich daher nicht auf die Effektorfunktionen der Fc-Region auswirkt.

[0042] Die Deletion dieses Cysteins kann dazu dienen, die Produktion der Fc γ 1-Region zu verstärken, da die effiziente Produktion dieser modifizierten Fc γ 1-Region nicht die Coexpression der leichten Immunglobulinkette erfordert. Dieses Cystein wurde ebenfalls entfernt, so dass es die richtige Faltung der Fc γ 1-Region oder des fusionierten Zielproteins nicht beeinträchtigt. Das 3'-Ende der genomischen Fc γ 1-DNA kodiert für zwei XmaI-Restriktionsstellen. Sie befinden sich bei 10 und 280 bp stromaufwärts des Translationsstopcodons in der CH3-Domäne. Die distale XmaI-Stelle wurde durch die Einführung einer stillen Mutation zerstört, unter Verwendung einer ortsgerichteten Mutagenese, (TCC zu TCA, wobei die CC die ersten beiden Basen der XmaI-Stelle waren), so dass es nur noch eine einzige XmaI-Stelle 10 bp stromaufwärts des Stopcodons gab.

[0043] Das XbaI-AfIII-Restriktionsfragment, das für das Signalpeptid der leichten Kette kodiert, wurde dann mit dem AfIII-XmaI-Restriktionsfragment ligiert, das für die Fc-Region kodiert. Das resultierende XbaI-XmaI-Restriktionsfragment kodiert daher für die Sekretionskassette und das Gen, das für das interessierende Zielprotein kodiert, kann an das 3'-Ende der Sekretionskassette über die XmaI-Stelle ligiert werden.

[0044] Im Allgemeinen kann die DNA, die für das Zielprotein kodiert, an die einzige XmaI-Stelle durch die Verwendung eines Linker-Adaptors ligiert werden, wobei ein derartiger Linker-Adaptor auch Restriktionsendonuclease-Stellen zusätzlich zu einer XmaI-Stelle umfassen kann. Die Verwendung eines Linker-Adaptors hat das

zusätzliche Merkmal, dass er für eine proteolytische Spaltungsstelle für eine nachfolgende Verwendung bei der Abspaltung des Zielproteins von der Sekretionskassette nach Produktion und Sekretion des Fusionsproteins kodiert. Zum Beispiel kann der Linker-Adaptor für einen Lysinrest an der Verbindung des Fusionsproteins kodieren, was die Option einer Spaltung des Zielproteins von der Fc-Domäne durch proteolytische Enzyme wie Trypsin oder Plasmin bietet. Ebenso kann der Linker-Adaptor eine DNA umfassen, die für die Spaltungsstelle der Enterokinase K (Asp-Asp-Asp-Asp-Lys) kodiert, um eine spezifische Spaltung des sezernierten Fusionsproteins durch Enterokinase K zu ermöglichen.

Beispiel 2. Konstruktion eines Immunfusins

[0045] Die Konstruktion eines beispielhaften Immunfusins, einschließlich einer Sekretionskassette und eines Zielproteins, wird unten beschrieben. Wie für einen durchschnittlichen Fachmann offensichtlich wäre, können andere Zielproteine an eine Sekretionskassette unter Verwendung der gleichen oder anderer Techniken des molekularen Klonens fusioniert werden.

[0046] Als das Zielprotein für das beispielhafte Immunfusin wurde CD26 ausgewählt, das ein Membranprotein vom Typ II ist, dessen aktive Stelle sich innerhalb der carboxyterminalen Region des Proteins befindet, die die extrazelluläre Domäne ist. Während der Konstruktion eines CD26-Immunfusins werden die cytoplasmatische und Transmembrandomänen von CD26 deletiert, so dass sie die Sekretion des Immunfusins durch die Sekretionskassette nicht stören. Das 5'-Ende der cDNA, die für die extrazelluläre Domäne kodiert, wurde für eine leichtere Klonierung so modifiziert, dass sie eine XmaI-Stelle umfasst, die über einen Linker-Adaptor eingeführt wurde. Das 3'-Ende der CD26-cDNA wurde ebenfalls für eine leichtere Klonierung so modifiziert, dass es eine XhoI-Stelle umfasst, die stromabwärts des Translationsstopcodons entweder mittels PCR oder mittels Ligation durch Linker-Adaptor eingeführt werden könnte.

[0047] Es können verschiedene Linker-Adaptoren verwendet werden, in Abhängigkeit von dem Wunsch nach einer Einführung einer proteolytischen Spaltungsstelle zwischen der für die Fc-Region kodierenden DNA und der CD26-cDNA. Zum Beispiel ist ein Linker-Adaptor, der für CD26 verwendet werden kann:

```
5' CCG GGT (AAA) GGC ACA GAT GAT GCT ACA G
3'      CA (TTT) TTG TGT CTA CTA CGA TGT C
```

wie in SEQ ID Nos. 2 und 3 bereitgestellt. Die ersten drei Codons in dem oberen Strang kodieren für die letzten drei Aminosäurereste der CH3-Domäne, und mit dem Codon GGC beginnt die Gensequenz der extrazellulären Domäne von CD26. Dieser Linker-Adaptor hatte das kohäsive Ende einer XmaI-Stelle an seinem 5'-Ende und das stumpfe Ende einer PvuII-Stelle an seinem 3'-Ende, wobei die stumpf endende PvuII-Stelle eine bequeme Stelle für eine Rekonstruktion mit dem Rest der CD26-cDNA ist. Der Lysin-Codon (AAA, in Klammern) in dem Linker-Adaptor ist nur eine von vielen möglichen Aminosäuresequenzen, die von Nutzen sind, um eine proteolytische Spaltungsstelle durch Spaltungsmittel bereitzustellen. Zum Beispiel kann dieser Lysinrest durch Enzyme wie beispielsweise Trypsin oder Plasmin gespalten werden.

[0048] Alternativ, für eine spezifischere proteolytische Spaltung durch Enterokinase K, kann die für die Enterokinase K-Spaltungsstellen kodierende Sequenz über den folgenden Linker-Adaptor eingeführt werden:

```
5' CCG GGT TCA GGG GAT GAC GAT GAC GAT A
3'      CA AGT CCC CTA CTG CTA CTG CTA TTC GA -
```

wie in SEQ ID Nos. 4 und 5 bereitgestellt. Die fettgedruckten Nucleotide kodieren für die Aminosäurereste (Asp)₄-Lys, die die Erkennungsstelle für Enterokinase K sind. Der Linker-Adaptor endet mit einer HindIII-Stelle, an die das CD26-Gen oder andere Zielprotein-Gensequenzen geknüpft werden können.

Beispiel 3. Wirtszellen und Transfektion

[0049] Die bevorzugten Wirtszelllinien umfassen die Myelom- (oder Hybridom-) NS/0- und Sp2/0 Ag14-Zellen der Maus. Die Myelomzellen wurden durch Protoplastenfusion transfiziert und in Dulbecco's modifiziertem Eagles Medium (Gibco), enthaltend 10 % fötales Rinderserum und 100 nM Methotrexat, selektiert, wie von Gillies et al., 1989, BioTechnology, 7:799 beschrieben; diese Veröffentlichung ist durch Bezugnahme hier aufgenommen. Transfektanten, die die Immunfusine sezernierten, wurde mittels anti-Fc-ELISA identifiziert, wie durch Gillies et al. (1989) J. Immunol. Methods 125:191 beschrieben; diese Veröffentlichung wird durch Bezugnahme hier aufgenommen. Die höchsten Produzenten wurde an Medien adaptiert, die 1 µM MTX enthielten, und durch limitierende Verdünnungen subkloniert. Für die Produktion von Immunfusinen wurden die Zellen in Hybri-

dom-Serumfreiem Medium (HSFM, Gibco) gezüchtet, das 1 % fötales Rinderserum und 1 μ M MTX enthält.

[0050] Die andere bevorzugte Empfängerzelllinie sind die humanen Nieren 293-Zellen, die sowohl für transiente wie auch für stabile Expression von Nutzen sind. Andere Zellen wie beispielsweise die HeLa- und die Chinese hamster ovary (CHO-) Zellen funktionierten ebenfalls in unserem System. Das bevorzugte Transfektionsverfahren für diese adhärenz Zellen ist durch Copräzipitation von Plasmid-DNA mit Calciumphosphat, und andere Verfahren umfassen Lipofektion und Elektroporation. Für eine Beschreibung dieser Verfahren und anderer nützlicher Transfektionsverfahren, siehe Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning – A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, NY, durch Bezugnahme hier aufgenommen.

Beispiel 4. Charakterisierung und Reinigung von Immunfusinen

[0051] Für Routinecharakterisierung durch Gelelektrophorese wurden Immunfusine in den konditionierten Medien zunächst auf Protein A Sepharose (Repligen, Cambridge, MA) gefangen und dann durch Kochen in dem Proteinprobenpuffer mit oder ohne 2-Mercaptoethanol eluiert. Nach Elektrophorese auf einem SDS-Gel wurden die Proteinbanden mittels Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. Zum Beispiel ergab das IL2-Immunfusin, siehe Beispiel 5, eine Bande mit dem Molekulargewicht von 45 kD unter reduzierenden Bedingungen und eine Bande mit dem Molekulargewicht von 90 kD unter nicht reduzierenden Bedingungen, was zeigt, dass das IL2-Immunfusin als ein Dimer hergestellt wurde, vermutlich durch Disulfidbindung in der Gelenkdomäne der FC-Region.

[0052] Zur Reinigung wurden die Zellkulturmedien gesammelt und anschließend wurden die Immunfusine an Protein A Sepharose gebunden. Die Immunfusine wurden nacheinander von dem Protein A in einen Natriumcitratpuffer (100 mM, pH 4) eluiert. Das Eluat wurde dann sofort mit 0,1 Volumen 1 M Tris-Hydrochlorid, pH 8, neutralisiert. Im Falle von CD26-Immunfusin wurde gezeigt, dass ein derartiges Elutionsverfahren zu einer mehr als 80 %igen Gewinnung des CD26-Immunfusins ohne Verlust von Enzymaktivität führte.

Beispiel 5. Expression von IL2-Immunfusin

[0053] Die cDNA des reifen IL2-Proteins wurde zur leichteren Klonierung so modifiziert, dass sie eine 5'-XmaI-Restriktionsendonuclease-Stelle und eine 3'-XhoI-Restriktionsendonuclease-Stelle aufweist, unter Verwendung von wohlbekannten Molekulartechniken wie sie beispielsweise in Beispiel 2 beschrieben wurden. Die Sequenz der reifen IL2-cDNA wird von Taniguchi et al., 1983, *Nature*, 302:305 bereitgestellt und ist durch Bezugnahme hierin aufgenommen. Die cDNA des reifen IL2-Proteins wurde unter Verwendung von rekombinanten Techniken als ein synthetisches Gen konstruiert, um die Codon-Verwendung zu optimieren und wünschenswerte Restriktionsendonuclease-Spaltungsstellen einzuführen. Das synthetische Gen wurde unter Verwendung von herkömmlichen Techniken zur DNA-Manipulierung geschaffen. Sobald die synthetische IL2-cDNA konstruiert war, wurde die 5'-XmaI-Stelle der IL2-cDNA an die 3'-XmaI-Stelle der Sekretionskassette, beschrieben in Beispiel 1, ligiert. Das IL2-Immunfusin wurden anschließend in den Expressionsvektor pDC inkloniert. Der IL2-Immunfusin-Expressionsvektor wurde mittels Protoplastenfusion in NS/0 und Sp2/0 als Wirtszellen transfiziert, wie von Gillies et al., 1989, *Biotechnology*, 7:799, beschrieben.

[0054] Zwei bis drei Wochen nach der Transfektion traten MTX-resistenten NS/0- und Sp2/0-Klone auf. Die Anfangsklone wurden mittels anti-Fc-ELISA gescreent. Das IL2-Immunfusinprotein wurde aus den Medien gesammelt. Ein geeignetes Assay für die biologische Aktivität von IL2 war das standardmäßige T-Zell-Proliferationsassay nach Gillies et al. (*Proc. Natl. Acad. Sci.* (1992) 89:1428). Die verbrauchte Kultur des besten Klons enthielt etwa 100 μ g/ml IL2-Immunfusin. Die Wirtszellklone, die das IL2-Immunfusinprotein effizient erzeugten und sezernierten, wurden in Medien subkloniert, die 100 nM MTX enthielten, und der beste Subklon erzeugte etwa 200 μ g/ml Protein in verbrauchter Kultur. Wenn MTX aus dem Medien bei Subklonieren weggelassen wurde, erzeugte der beste so isolierte Subklon etwa 180 μ g/ml in verbrauchter Kultur. Also ermöglichte die Konstruktion eines IL2-Immunfusins unerwarteterweise die Produktion von IL2 auf einem Niveau das in etwa 80 Mal dem entspricht, das durch die Expression von IL2 allein unter Verwendung des pdEmp-Vektors (unveröffentlichte Daten) erreicht wird, und viele Male dem von IL2, das in Säugetierzellen (Conradt et al., 1989, *J. Biol. Chem.*, 264:17368) und in Hefe (Ernst et al., 1989, *Biotechnology*, 7:716) exprimiert wurde. Wie in Beispiel 4 erwähnt, wurde das IL2-Immunfusin als ein Homo-Dimer mit einem Molekulargewicht von 90 kD erzeugt, vermutlich durch Disulfid-Bindung in der Gelenkregion des 45 kD Monomers.

Beispiel 6. Expression von CD26-Immunfusin

[0055] Die Konstruktion von CD26 als ein Immunfusin wurde unternommen, um nachzuweisen, dass die Er-

findung auf die Expression von membranverankerten Proteinen wie Membranproteinen vom Typ II anwendbar ist. Ein Membranprotein vom Typ II zeigt die carboxylterminale Domäne auf der extrazellulären Oberfläche und umfasst meistens seine aktive Region innerhalb dieser carboxylterminalen Domäne. Die Verknüpfung eines Fusionspolypeptids mit der carboxylterminalen Region eines derartigen Proteins kann die richtige Faltung der aktiven Stelle beeinträchtigen und so die Produktion von aktivem Protein vermindern oder verhindern.

[0056] CD26 ist ein Membranprotein vom Typ II, das 766 Aminosäurereste enthält. Die biologische Funktion von CD26 ist als ein T-Zell-Aktivierungsantigen und der putative Corezeptor für den Eintritt von HIV in CD4+-Zellen (Callebaut et al. (1993) Science 262:2045). Das CD26-Protein ist an die Lipiddoppelschicht der Plasmamembran durch eine hydrophobe Domäne zwischen den Resten 7 und 28 am N-Terminus verankert. Aminosäuren 1 bis 6 bilden einen kurzen cytoplasmatischen Schwanz. Der Rest des Proteins zwischen den Resten 29 und 766, ist extrazellulär und umfasst mehrere mögliche N-Glykosylierungsstellen und die aktive Stelle des Enzyms (Tanaka et al. (1992) J. Immunol. 149:481). Die 728 carboxylterminalen Reste im CD26 ragen aus der Membranoberfläche heraus und der C-Terminus ist frei. Ein lösliches CD26, das als ein Immunadhäsion exprimiert wird, wird eine Konformation aufweisen, die sich von der des nativen CD26 unterscheidet, da der Carboxyl-Terminus in einem Immunadhäsion-CD26-Protein nicht frei ist, sondern mit einer Antikörpersequenz verbunden ist. Andererseits, wenn wir ein Immunfusin entwerfen, in dem die Antikörpersequenz zum Zielprotein aminoterminal ist, wie beispielsweise CD26, wird die native Konformation von CD26 konserviert, d. h. der C-Terminus ist frei und die Antikörpersequenz, hier eine Fc-Region, nimmt den Platz der Membran ein, an der CD26 normalerweise verankert ist. Die enzymatischen und biologischen Aktivitäten eines derartigen löslichen CD26-Immunfusins werden nicht gefährdet. Außerdem ist CD26 eine Protease und seine Expression kann für die Wirtszelle schädlich sein. Also kann durch einen effizienten Export der CD26-Protease aus der Wirtszelle heraus in der Form eines Immunfusins ein höherer Expressionspiegel erreicht werden.

[0057] Ein 2,3 kb cDNA-Fragment, das für die extrazelluläre Domäne von CD26 kodiert, wurde verwendet, um den CD26-Immunfusin-Expressionsvektor zu konstruieren. Die DNA-Sequenz von CD26 wird in Tanaka et al., 1992, J. Immunol., 149:481 bereitgestellt. CD26 wurde 3' der Sekretionskassette fusioniert, wie oben in Beispiel 2 beschrieben, und anschließend wurde die Sekretionskassette und das CD26-Ziel-Protein in den Expressionsvektor pdC inkloniert, unter Verwendung der XbaI-Restriktionsendonuclease-Stelle 5' der Signalsequenz der leichten Kette und der XhoI-Restriktionsendonuclease-Stelle 3' des CD26-Proteins, wie in Beispiel 2 oben beschrieben. Der resultierende CD26-Immunfusin-Expressionsvektor wurde in eine Wirtszelle wie oben in Beispiel 3 beschrieben transfiziert. MTX-resistente Klone aus transfizierten NS/0- und Sp2/0-Zellen wurden mittels anti-Fc-ELISA und DPPIV-Aktivitätsassay gescreent. CD26 ist auch als DPPIV bekannt, das eine Exopeptidase ist, die nach aminoterminalen X-P spaltet (x kann ein beliebiger Aminosäurerest sein und P ist Prolin). DPPIV-Enzymaktivität des CD26-Immunfusins wurde gemäß Tanaka et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 1993, 90:4586) unter Verwendung von Glycylprolin-p-nitroanilid-tosylat (Gly-Pro-pNA) als ein Substrat untersucht. Der beste NS/0-Klon produzierte etwa 3,5 µg/ml CD26-Immunfusin. Es wurde nachgewiesen, dass die DPPIV-Einheit des Proteinprodukts vollständig aktiv war, mit K_M - und k_{cat} -Werten, die denen von nativem CD26 ähneln. Weiterhin wurde die enzymatische Aktivität von CD26-Immunfusin durch bekannte Peptidinhibitoren auf eine Dosis-abhängige Weise inhibiert. Die untersuchten Peptidinhibitoren umfassten die Tripeptide IPI und VPL und APL und jedes von ihnen inhibierte die CD26-Enzymaktivität um mehr als 30 % bei 0,15 mM, mehr als 70 % bei 1 mM und mehr als 90 % bei 4 mM. Als eine Kontrolle wurden bekannte Nicht-Inhibitorpeptide ebenfalls auf ihre Wirkung auf die CD26-Enzymaktivität untersucht und es wurde gefunden, dass die bekannten Nicht-Inhibitoren, GGG und GPHyP (wobei HyP Hydroxyprolin ist) keine Wirkung auf die CD26-Aktivität haben, wenn sie mit dem CD26-Immunfusin bei Konzentrationen im Bereich zwischen 0,01 mM und 11 mM inkubiert werden.

Beispiel 7. Expression von Tat-Immunfusin

[0058] Die Erfindung wurde auch auf die Expression von regulatorischen Proteinen angewandt, die sich normalerweise am Zellkern befinden. Da regulatorische Proteine im Allgemeinen schwer zu exprimieren und zu reinigen sind, ist es besonders wünschenswert, ein Verfahren zu entwickeln, durch das derartige Proteine effizient von einer Wirtszelle sezerniert werden können. Immunfusin-Konstrukte von Tat und Rev (beschrieben in Beispiel 8), die zwei durch den humanen Immundefizienz-Virus (HIV) kodierte Proteine sind, die die Expression von viralen Proteinen im Zellkern regulieren, wurden hergestellt, um die Effizienz zu bestimmen, mit der diese Proteine exprimiert und gesammelt werden können. Wir haben einen hohen Expressions- und Sekretionsspiegel von Tat- und Rev-Immunfusinen erreicht und die Immunfusine in einem einzigen Schritt ohne Weiteres gereinigt.

[0059] Ein für Tat kodierendes cDNA-Fragment mit 260 Basenpaaren wurde in die XmaI- und XhoI-Stellen

des pdC-Expressionsvektors durch Modifizierung der 5'- und 3'-Enden des Tat-Proteins unter Verwendung von DNA-Rekombinationstechniken wie oben beschrieben inkloniert. Die Sequenz der für das Tat-Protein kodierenden DNA wird in Ratner et al., 1985, Nature, 313:277 bereitgestellt. Insbesondere wurde die Sequenz am 5'-Ende modifiziert zu Seq. ID No. 6, C CCG GGT CGC ATG GAG..., wobei die unterstrichene Sequenz die XmaI-Stelle ist und das ATG in fett das Translationsstartcodon des Tat-Gens ist. Am 3'-Ende wurde eine XhoI-Stelle direkt stromabwärts des Translationsstopcodons mittels standardmäßiger PCR-Techniken eingeführt. Der Tat-Immunfusin-Expressionsvektor wurde dann in eine Wirtszelle transfiziert, wie oben beschrieben, und die Wirtszellen wurde auf die Produktion von Tat-Immunfusinprotein analysiert. Es wurden hohe Expressionsspiegel in transient transfizierten 293-Zellen und stabil transfizierten NS/0-Zellen erhalten. Stabile NS/0-Klone produzierten etwa 3 µg/ml eines 48 kD Proteins, analysiert auf einem SDS-Gel unter reduzierenden Bedingungen. Dass dieses Protein ein Tat-Immunfusin ist, wurde durch einen anti-Tat-Antikörper bestätigt (Cat. #7001, American BioTechnologies, Cambridge, MA).

[0060] Durch das folgenden transiente Expressionsexperiment in 293-Zellen, dessen Ergebnisse unten in Tabelle 2 dargestellt werden, wurde gezeigt, dass das Tat-Immunfusin aktiv ist. Der Expressionsvektor für Tat-Immunfusin wurde mit einem separaten Vektor co-transfiziert, der LTR-TAR-Kappa enthält, wobei LTR-TAR die lange terminale Repeat-DNA-Sequenz von HIV ist, die durch das Tat-Protein transaktiviert wird und Kappa die Gensequenz ist, die für die leichte Kappa-Kette des Immunglobulins kodiert. Um die Expressionsspiegel von Fc-Tat (Tat-Immunfusin) und Kappa zu messen, wurden die Überstände mittels anti-Fc- bzw. anti-Kappa-ELISA analysiert. In Tabelle 2, stellt pdC-Fc-Tat den pdC-Expressionsvektor für das Tat-Immunfusin dar, stellt LTR-TAR-Kappa den Expressionsvektor für die leichte Kappa-Kette dar, in der die regulatorische Region von LTR-TAR durch Tat transaktiviert werden kann, und ist pCEP-Tat ein Expressionsvektor für Tat, dessen Transkription unter der Kontrolle des humanen Cytomegalovirus-Enhancers und -Promoters steht. pCEP-Tat wurde als eine positive Kontrolle verwendet, um die Transaktivierung des LTR-TAR-Kappa durch das Tat-Protein zu überwachen. Als eine negative Kontrolle wurde nur LTR-TAR-Kappa transfiziert, um nachzuweisen, dass es in der Abwesenheit des Tat-Proteins oder Tat-Immunfusins nicht transaktiviert wird. Wie in Tabelle 2 gezeigt, wurden hohe Expressionsspiegel an Tat-Immunfusin bei Transfektion 1 beobachtet; hohe Expressionsspiegel von sowohl Tat und leichter Kappa-Kette wurden in dem Cotransfektionsexperiment, Transfektion 2 beobachtet. Transaktivierung von Kappa durch Tat wurde in der positiven Kontrolle, Transfektion 3, gesehen, wie erwartet. Geringe oder keine Expression von Kappa wurde in der negativen Kontrolle, Transfektion 4, gesehen, ebenfalls wie erwartet. Daher wird die leichte Kappa-Kette nur durch Transaktivierung der LTR-TAR-Region durch ein funktionales Tat-Protein exprimiert und das Tat-Immunfusin liefert ein funktionales Tat-Protein, das ohne weiteres von der Wirtszelle sezerniert wird. Dieses Ergebnis zeigt auch, dass die Sekretionskassette in der Lage ist, die Sekretion eines Proteins zu steuern, das normalerweise zum Zellkern der Wirtszelle transportiert wird.

Tabelle 2

		ELISA	(ng/ml)
in der Transfektion verwendete DNA		Fc	Kappa
1.)	pdC-Fc-Tat	>3000	0
2.)	pdC-Fc-Tat, LTR-TAR-Kappa	1600	160
3.)	pdC-Fc-Tat, LTR-TAR-Kappa	0	277
4.)	LTR-TAR-Kappa	0	3

Beispiel 8. Expression von Rev-Immunfusin

[0061] Ein für Rev kodierendes cDNA-Fragment mit 350 Basenpaaren wurde so modifiziert, dass es eine 5'-XmaI-Stelle und eine 3'-XhoI-Stelle umfasst, und dann an das 3'-Ende der beschriebenen Sekretionskassette in dem pdC-Expressionsvektor ligiert. Die Sequenz der für das Rev-Protein kodierenden DNA wird in Ratner et al., 1985, Nature, 313:277 bereitgestellt und wird durch Bezugnahme hier aufgenommen. Insbesondere wurde die Sequenz am 5'-Ende der cDNA modifiziert zu C CCG GGT CGC ATG GCA... (Seq. ID No. 7), wobei die unterstrichene Sequenz die XmaI-Stelle und das ATG in fett das Translationsstartcodon des Rev-Gens ist. Am 3'-Ende wurde eine XhoI-Stelle direkt stromabwärts des Translationsstopcodons mittels standardmäßiger PCR-Techniken eingeführt. Es wurden hohe Expressionsspiegel in transient transfizierten 293-Zellen und stabil transfizierten NS/0-Zellen erhalten. Stabile NS/0-Klone produzierten etwa 3 µg/10⁶ Zellen/Tag des Rev-Im-

munfusins, das ein Molekulargewicht von etwa 50 kD aufweist, bei Analyse auf einem SDS-Gel unter reduzierenden Bedingungen.

Beispiel 9. Stellenspezifische Proteolytische Spaltung eines Immunfusins

[0062] Unten wird eine beispielhafte Spaltung eines Immunfusins beschrieben. Wie einem durchschnittlichen Fachmann offensichtlich wäre, könnte jedes der oben beschriebenen Immunfusine von seiner jeweiligen Sekretionskassette unter Verwendung des gleichen Verfahrens oder eines analogen Verfahrens abgespalten werden.

[0063] Ein CD26-Immunfusin mit einem Lysinrest („Fc(Lys)-CD26-Immunfusin“), der durch den Linker-Adaptor während der Konstruktion des Immunfusins zwischen der Fc-Region und der CD26-Zielproteinsequenz eingeführt wurde, wurde unter Verwendung von Trypsin gespalten. Um das Fc(Lys)-CD26-Immunfusin zu spalten, wurde das Immunfusin an Protein A Sepharose gebunden und an der gewünschten Lysinposition durch Trypsin gespalten, um CD26 wie folgt freizusetzen: Fc(Lys)-CD26-Immunfusin, das an Protein A Sepharose gebunden war, wurde mit einer 1 %igen Trypsinlösung bei 37 °C für 2 h inkubiert. Anschließend wurde Trypsin-Inhibitor (Sigma) zugegeben, um jeglichen weiteren Verdau zu stoppen. Der Überstand wurde dann entfernt und auf einem SDS-Gel unter reduzierenden Bedingungen analysiert. Nach Coomassie-Färbung wurde eine Bande mit einem Molekulargewicht von 110 kD erhalten, was der Größe von CD26 ohne die Sekretionskassette entspricht. Als eine Kontrolle wurde CD26-Immunfusin ohne den Lysinrest an der Verbindung der Fusion zwischen der Fc-Domäne und dem CD26-Zielprotein („Fc-CD26-Immunfusin“) an Protein A Sepharose gebunden und gleichartig behandelt. Es wurde erwartungsgemäß festgestellt, dass CD26 nicht von der Sekretionskassette des Fc-CD26-Immunfusins freigesetzt wurde, und dies bestätigte auch die spezifische Spaltung des Immunfusins an der Aminosäure Lysin, die zwischen der CH3-Domäne der Fc-Region und dem CD26-Zielprotein eingeführt wurde. Als eine weitere Kontrolle wurde ein identisches Aliquot des Fc-CD26-Immunfusins, das an Protein A Sepharose gebunden wurde, in dem gleichen Proteinprobenpuffer gekocht und die SDS-Gel-Analyse des Überstandes zeigte eine Bande mit 140 kD, die dem Volllängen-CD26-Immunfusinproteinmonomer entspricht.

[0064] Die Ergebnisse aus dem Gelelektrophorese-Experiment wurden durch DPPIV-Aktivitätsassays der Produkte des Trypsinverdaus bestätigt. Quantitative Gewinnung der enzymatischen DPPIV-Aktivität wurde in den Überständen erhalten, wenn das an Protein A Sepharose gebundene Fc(Lys)-CD26-Immunfusin mit Trypsin behandelt wurde. In dem parallelen Experiment mit Fc-CD26-Immunfusin, gab es keine DPPIV-Aktivität in dem Überstand, da das CD26-Protein nicht von der Protein A Sepharose freigesetzt wurde.

Beispiel 10. Expression von OSF-2-Immunfusin

[0065] OSF-2 ist ein sekretorisches Protein mit 80 kD, das am Knochenbildungsprozess beteiligt ist. Die Sequenz der für das OSF-2 kodierenden DNA wird in Takeshita et al., 1993, Biochem. J. 294:271 bereitgestellt und wird durch Bezugnahme hier aufgenommen. Die für das OSF-2 kodierende cDNA mit ihrem Signalpeptid wurde in den Expressionsvektor pDC inkloniert. Es wurden NS/0-Zellen für eine stabile Transfektion verwendet und 293-Zellen wurden für transiente Expression verwendet; aber in keinem Fall wurde das OSF-2-Protein nachgewiesen.

[0066] Die OSF-2-cDNA wurde dann so angepasst, dass sie als ein Immunfusin exprimiert wurde. Am 3'-Ende wurde die XbaI-Stelle am Translationsstopcodon durch Linker-Ligation in eine XhoI-Stelle umgewandelt. Am 5'-Ende wurde der folgende Linker-Adaptor verwendet:

```
5' CCG GGT AAA AAC AAT CAT TAT GAC AA
3'      CA TTT TTG TTA GTA ATA CTG TTC TAG
```

wie in den SEQ ID Nos. 8 und 9 bereitgestellt. Die Nucleotide in Fett kodieren für den N-Terminus des reifen OSF-2-Proteins, das mit kohäsiven Enden von BglII endet. Diese kohäsiven Enden von BglII wurden an das BglII-XhoI-Fragment der OSF-2-cDNA ligiert. Die kohäsiven Enden von XmaI am 5'-Ende des Linker-Adaptors (unterstrichen) wurden an die einzige XmaI-Stelle in dem Immunfusin-Expressionsvektor ligiert.

[0067] Es wurden hohe Expressionsspiegel in transient transfizierten 293-Zellen und stabil transfizierten NS/0-Zellen erhalten. Stabile NS/0-Klone produzierten etwa 5 bis 7 µg/ml eines 110 kD Proteins, bei Analyse auf einem SDS-Gel unter reduzierenden Bedingungen. Es wurde mittels Western Blot mit einem anti-OSF-2-Antikörper bestätigt, dass es sich bei diesem Protein um das OSF-2-Immunfusin handelt.

[0068] Es wurde auch gefunden, dass die Expression von OSF-2 als ein Immunfusin in einem Säugetier-System der Expression von OSF-2 in dem Thioredoxingenfusionssystem in *E. coli* (LaVallie et al., 1993, *Biotechnology*, 11:187) überlegen war. Das Thioredoxin-Genfusionssystem wurde entworfen, um die Bildung von Einschlusskörpern zu umgehen, da Fusion an Thioredoxin die Löslichkeit vieler heterologer Proteine, die im Cytoplasma von *E. coli* produziert werden, erhöht. Um dieses System auf die Expression von OSF-2 zu prüfen, wurde die für das reife OSF-2 kodierende cDNA in die SmaI-Stelle des pTrxFus-Vektors (Invitrogen, San Diego, CA) inseriert, um so ein Thioredoxin-OSF-2-Fusionsprotein zu schaffen. Es wurde der Anleitung des Lieferanten für die Expression der Fusionsproteine gefolgt. Das Thioredoxin-OSF-2-Fusionsprotein wurde exprimiert und es wurde, als eine Kontrolle, Thioredoxinprotein allein ohne einen Fusionspartner exprimiert. Die Ergebnisse zeigen, dass, obwohl Thioredoxin allein als ein lösliches Protein mit einem hohen Spiegel produziert werden konnte, das Thioredoxin-OSF-2-Fusionsprotein nur in der unlöslichen Fraktion vorkam. Daher wurde zusätzlich zu einem Fehlen von posttranslationaler Modifizierung bei der bakteriellen Expression, ein relativ komplexes Säugetierprotein wie OSF-2 bei Fusion an Thioredoxin nicht als ein lösliches Protein synthetisiert.

Beispiel 11. Expression von β IG-H3-Immunfusin

[0069] β IG-H3, ein Genprodukt, das durch den Transforming Growth Faktor -induziert wird, ist ein sekretorisches Protein mit 68 kD, das eine Sequenzhomologie mit OSF-2 teilt. Die Sequenz der für das β IG-H3 kodierenden cDNA wird in Skonier et al. (1992) *DNA and Cell Biology*, 11:511 bereitgestellt und wird durch Bezugnahme hier aufgenommen. Die für das native β IG-H3 kodierende cDNA wurde in den Expressionsvektor pdC inkloniert; aber Versuche, stabile β IG-H3 produzierende Transfektanten zu erhalten, blieben erfolglos.

[0070] Die β IG-H3-cDNA wurde dann so angepasst, dass sie als ein Immunfusin exprimiert wurde. Am 3'-Ende wurde die BsmI-Stelle stromabwärts des Translationsstopcodons durch Linker-Ligation in eine XhoI-Stelle umgewandelt. Am 5'-Ende wurde der folgende Linker-Adaptor verwendet:

```
5'          CCG GGT AAA GCC CTG GGC C
3'          CA TTT CGC GAC
```

(Seq ID. Nos. 10 und 11). Die Nucleotide in Fett kodieren für den N-Terminus des reifen β IG-H3-Proteins. Der Linker-Adaptor hatte kohäsive Enden von XmaI für die Ligation des Expressionsvektors wie in den oben genannten Beispielen beschrieben, und kohäsive Enden von ApaI für die Ligation der ApaI-Stelle an das 5'-Ende der für das reife β IG-H3 kodierenden cDNA-Sequenz.

[0071] Es wurden hohe Expressionsspiegel in transient transfizierten 293-Zellen und stabil transfizierten NS/0-Zellen erhalten. Stabile NS/0-Klone produzierten etwa $3,5 \mu\text{g}/10^6$ Zellen/Tag eines 100 kD Proteins, bei Analyse auf einem SDS-Gel unter reduzierenden Bedingungen. Es wurde mittels Western Blot mit einem anti- β IG-H3-Antikörper bestätigt, dass es sich bei diesem Protein um das β IG-H3-Immunfusin handelt.

Beispiel 12. Expression der löslichen Form des IgE-Rezeptors als ein Immunfusin

[0072] Die alpha-Untereinheit des IgE-Rezeptors (IgE-R) hoher Affinität, dessen DNA-Sequenz gefunden werden kann in Kochan et al. (1988) *Nucleic Acids Res.* 16: 3584 und durch Bezugnahme hier aufgenommen wird, wurde wie folgt als ein Immunfusin konstruiert: Eine XmaI-Stelle wurde am 5'-Ende der für den reifen IgE-R kodierenden cDNA eingeführt, so dass die Sequenz an der Verbindung der Fusion C CCG GGT GTC CCT CAG --- (Seq. ID No. 12) war, wobei die XmaI-Stelle unterstrichen ist und die drei Codons in Fett die ersten drei Aminosäurereste des reifen IgE-R sind. Am 3'-Ende des IgE-R, wurde die für die Transmembrandomäne und den Rest des C-Terminus kodierende cDNA deletiert und es wurde ein Translationsstopcodon hinter den letzten Codon der extrazellulären Domäne gesetzt. Die Sequenz des IgE-R-Immunfusins am 3'-Ende war also TAC TGG CTA TAA CTC GAG (Seq. ID No. 13), wobei die drei Codons in Fett die letzten drei Aminosäurereste der extrazellulären Domäne von IgE-R waren, und auf sie folgte ein Stopcodon und eine XhoI-Stelle (unterstrichen).

[0073] Der das IgE-R-Immunfusin enthaltende pdC-Expressionsvektor wurde in 293-Zellen und NS/0-Zellen transfiziert. Es wurden hohe Expressionsspiegel (3 bis $5 \mu\text{g}/\text{ml}$) des IgE-R-Immunfusins mittels anti(Fc)-ELISA in den Zellkulturmedien nachgewiesen. SDS-Gelanalyse unter reduzierenden Bedingungen zeigte eine Bande bei der erwarteten Größe von 70 kD. Es wurde gezeigt, dass das teilweise gereinigte Protein (auf Protein A Sepharose) in einem IgE-R/IgE-ELISA an IgE bindet.

Beispiel 13. Expression von Fcy1

[0074] Fcy1 wurde für sich ohne ein C-terminales Zielprotein exprimiert. Dies wurde erreicht, indem der folgende Linker (mit kohäsiven Enden von XmaI und XhoI) ligiert wurde:

```
5'          CCG GGT AAA TAG C
3'          CA TTT ATC GAG CT
```

(Seq. ID Nos. 14 und 15), an die XmaI und XhoI-Stellen des pdC, um die kodierende Region des Fc zu rekonstruieren. Es wurden hohe Expressionsspiegel mittels anti(Fc)-ELISA in den Zellkulturmedien der transient transfizierten 293-Zellen (5 bis 7 µg/ml) und den stabil transfizierten NS/0-Klonen (5 bis 10 µg/ml) nachgewiesen. SDS-Gelanalyse unter reduzierenden Bedingungen zeigte eine Fc-Bande bei der erwarteten Größe von 31 kD.

Beispiel 14. Expression von PSMA-Immufusin

[0075] PSMA, Prostata-spezifisches Membranantigen, ist ein Membranprotein vom Typ II mit einem Molekulargewicht von mehr als 100 kD. PSMA ist ein integrales Membranprotein und ist als solches ein attraktives Ziel für bildgebende Verfahren und Immunkonjugat-Lieferung. Um die Expression von signifikanten Mengen an PSMA zu erleichtern, haben wir die extrazelluläre Domäne von PSMA (die lösliche Form) subkloniert und diese Domäne von PSMA als ein Immufusin exprimiert. Ein Teil der extrazellulären Domäne von PSMA, die die lösliche Form von PSMA ist, kann als ein Immufusin produziert werden.

[0076] Die für das Vollängen-PSMA kodierende cDNA wurde aus einer humanen Prostatakarzinom-Zelllinie LNCaP kloniert (Israeli et al. (1993) Cancer Res., 53:227). Der Teil der PSMA-cDNA, die der extrazellulären Domäne entspricht, wurde so angepasst, dass er durch Polymerasekettenreaktion unter Verwendung der folgenden Primer als ein Immufusin exprimiert werden sollte:

N-terminal: 5' AAGCTT AAA TCC TCC AAT GAA GC

C-terminal: 5' CTCGAG TTA GGC TAC TTC ACT CAA AG

(Seq ID. Nos. 16 und 17). Die beiden Primer liefern die HindIII- und die XhoI-Stellen (unterstrichen) für das Einklonieren in den Immufusin-Expressionsvektor. In dem N-terminalen Primer folgt auf die HindIII-Stelle die kodierende Sequenz der extrazellulären Domäne von PSMA (in fett) direkt hinter der Transmembranregion. In dem C-terminalen Primer folgt auf die XhoI-Stelle der Anticodon des Stopcodons und die C-terminale kodierende Sequenz von PSMA (in fett). Die Aminosäuresequenz der extrazellulären Domäne von PSMA wird in SEQ ID 18 gezeigt.

[0077] Es wurden hohe Expressionsspiegel in stabil transfizierten 290- und Sp2/0-Zellen erhalten. Das in die Zellkulturmedien sezernierte PSMA-Immufusin wurde mittels Protein A Sepharose gereinigt. Behandlung des Immufusins mit der Protease Plasmin wandelte das 130 kD Fc-PSMA quantitativ in zwei Produkte um: die extrazelluläre Domäne von PSMA mit 100 kD und das Fc mit 31 kD. Das Fc wurden anschließend aus der Lösung durch Absorption auf Protein A Sepharose entfernt. Das lösliche PSMA wurde gereinigt und für die Immunisierung von Mäusen verwendet. Es wird erwartet, dass ein nur auf PSMA spezifischer Antikörper die Diagnose und Therapie von Prostata-Krebs erleichtern sollte.

Beispiel 15. Expression von murinem Fc

[0078] Die Fc-Region von murinem γ 2a wurde für die Expression als ein Immufusin hergestellt. Da die murine Fc-Region für Mäuse nicht immunogen sein wird, kann ein derartiges Immufusin, das das murine Fc gefolgt von, zum Beispiel, einem humanen Protein-Fusionspartner enthält, verwendet werden, um Mäuse ohne vorherige Spaltung, um das Fc loszuwerden, direkt zu immunisieren. Die murine Fc wurde in unseren Immufusin-Expressionsvektor wie unten beschreiben einkloniert und wurde unter unseren Expressionsbedingungen mit einem hohen Spiegel exprimiert.

[0079] Die murine Fc- γ 2a-Domäne, der ein Signalpeptid wie oben beschrieben vorherging, wurde in einem Expressionsvektor kloniert, pdC, und ohne Fusion an ein Zielprotein exprimiert. Murine Fc- γ 2a-cDNA (Sikorav et al., 1980, Nucleic Acids Res., 8:3143-3155) wurde für die Klonierung in den Expressionsvektor durch Polymerasekettenreaktion unter Verwendung der folgenden Primer angepasst:

N-terminal: 5' CTTAAGC GAG CCC AGA GGG CCC ACA

C-terminal: 5' CTCGAGC TCA TTT ACC CGG AGT CCG

(Seq ID. Nos. 19 und 20). Der N-terminale Primer enthält eine AflII-Stelle (unterstrichen) für die Ligation an die AflII-Stelle am 3'-Ende des oben beschriebenen Signalpeptids. Die auf die AflII-Stelle folgende Sequenz (in

fett) kodiert für die Aminosäurereste in der Gelenkregion des murinen $\gamma 2a$ -Gens. Der C-terminale Primer enthält eine XhoI-Stelle für das Einklonieren in den Expressionsvektor, gefolgt durch die Anticodons des Translationsstopcodons und das Carboxyl-Ende des murinen $\gamma 2a$ (in fett).

[0080] Expression der murinen Fc $\gamma 2a$ -Region in hohen Spiegeln wurde in 293-Zellen durch SDS-Gel-Analyse gefolgt von Western Blot mit einem anti-murine IgG-Antikörper nachgewiesen.

Beispiel 16. Expression von gp120

[0081] Das Hüllprotein gp120 des humanen Immundefizienz-Virus (HIV) ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 120 kD und wird auf der Oberfläche von HIV-Partikeln und HIV-infizierten Zellen exprimiert. Das Protein gp120 wird ursprünglich in infizierten Zellen als ein Polyprotein, gp160 exprimiert, das dann durch ein zelluläres Protein in gp120 und gp41 gespalten wird. gp120 wurde als ein Immunfusin hergestellt und es wurde nachgewiesen, dass das gp120-Immunfusin in sehr hohen Spiegeln exprimiert wurde. Jeder gewünschte Teil von gp120 kann ebenfalls als Immunfusin hergestellt werden. Die Fc-Einheit des gp120-Immunfusins konnte abgespalten werden und gp120 wurde gereinigt.

[0082] Die vollständige Nucleotidsequenz von HIV wurde veröffentlicht in Ratner et al. (1985) Nature, 313:277. Um das gp120-Immunfusin herzustellen, wurde ein Translationsstopcodon gefolgt von einer XhoI-Restriktionsstelle in die gp120-gp41-Verbindung nach Aminosäure Arg-518 von gp160 unter Verwendung von standardmäßigen molekularbiologischen Techniken, z. B. der Polymerasekettenreaktion, eingeführt. Die bestehende NdeI-Restriktionsstelle, die an Nucleotid 5979 vorliegt, das innerhalb des aminoterminalen Teils von gp120 liegt, wurde in eine HindIII-Restriktionsstelle durch eine Linker-Adaptor-Ligation umgewandelt, um eine In-Frame-Fusion zu erzeugen. Das resultierende HindIII-XhoI-Fragment (1,36 Kilobasenpaare), das für gp120 kodiert, wurde anschließend in den Immunfusin-Expressionsvektor, pdC, einkloniert, wie oben beschrieben.

[0083] Der gp120-Immunfusin-Expressionsvektor wurde in stabil transfizierten 293-Zellen gemäß den oben beschriebenen Verfahren exprimiert und es wurde eine Expression des gp120-Immunfusins in hohen Spiegeln erhalten. Das gp120-Immunfusin war funktional aktiv, wie durch Bindung an CD4 in einem ELISA nachgewiesen. Es wurde auch nachgewiesen, dass das gp120-Immunfusin quantitativ durch Enterokinase gespalten wird, um die gp120 und die FC-Region freizusetzen.

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE INFORMATIONEN:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: FUJI IMMUNOPHARMACEUTICALS CORP.
- (B) STRASSE: 125 HARTWELL AVENUE
- (C) STADT: LEXINGTON
- (D) STAAT: MA
- (E) LAND: USA
- (F) POSTLEITZAHL: 02173
- (G) TELEFON: (617) 861-5300
- (H) TELEFAX: (617) 861-5301

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: EXPRESSIONS- UND EXPORTTECHNIK
VON PROTEINEN ALS IMMUNFUSINE

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 20

(iv) KORRESPONDENZADRESSE:

- (A) ADRESSAT: PATENT ADMINISTRATOR, TESTA, HURWITZ &
THIBEAULT
- (B) STRASSE: 125 HIGH STREET
- (C) STADT: BOSTON
- (D) STAAT: MA
- (E) LAND: USA
- (F) ZIP: 02110

(v) COMPUTERLESBARE FORM:

- (A) DATENTRÄGER: Diskette
- (B) COMPUTER: IBM PC kompatibel
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release Nr. 1.0, Version Nr. 1.25

(vi) AKTUELLE ANMELDUNG:

- (A) ANMELDENUMMER: US
- (B) ANMELETAG:
- (C) KLASSIFIKATION:

(viii) ANWALT/VERTETER:

- (A) NAME: PITCHER, EDMUND R.
- (B) REGISTRATIONSNUMMER: 27,829
- (C) BEZUGSNUMMER: FIP-001

(ix) TELEKOMMUNIKATIONSINFORMATIONEN:

- (A) TELEFON: 617-248-7000
- (B) TELEFAX: 617-248-7100

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZMERKMALE:

- (A) LÄNGE: 41 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: einsträngig
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

GAGAATTCTT AAGCGAGCC AAATCTTCTG ACAAACCTCA C
41

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZMERKMALE:

- (A) LÄNGE: 28 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: einsträngig
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

CCGGGTAAAG GCACAGATGA TGCTACAG
28

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZMERKMALE:

- (A) LÄNGE: 24 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: einsträngig
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

CTGTAGCATC ATCTGTGTTT TTAC
24

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZMERKMALE:

- (A) LÄNGE: 28 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: einsträngig
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

CCGGGTTCAG GGGATGACGA TGACGATA
28

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

- (i) SEQUENZMERKMALE:
 - (A) LÄNGE: 28 Basenpaare
 - (B) ART: Nukleinsäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: einsträngig
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

AGCTTATCGT CATCGTCATC CCCTGAAC
28

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

- (i) SEQUENZMERKMALE:
 - (A) LÄNGE: 16 Basenpaare
 - (B) ART: Nukleinsäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: einsträngig
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

CCCGGGTCGC ATGGAG
16

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:

- (i) SEQUENZMERKMALE:
 - (A) LÄNGE: 16 Basenpaare
 - (B) ART: Nukleinsäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: einsträngig
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

CCCGGGTCGC ATGGCA
16

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8:

- (i) SEQUENZMERKMALE:
 - (A) LÄNGE: 26 Basenpaare
 - (B) ART: Nukleinsäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: einsträngig
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

CCGGGTAAAA ACAATCATTG TGACAA
26

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 9:

- (i) SEQUENZMERKMALE:
 - (A) LÄNGE: 26 Basenpaare
 - (B) ART: Nukleinsäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: einsträngig
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

GATCTTGTCATAATGATTGT TTTTAC
26

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 10:

- (i) SEQUENZMERKMALE:
 - (A) LÄNGE: 19 Basenpaare
 - (B) ART: Nukleinsäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: einsträngig
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:

CCGGGTAAAG CCCTGGGCC
19

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 11:

- (i) SEQUENZMERKMALE:
 - (A) LÄNGE: 11 Basenpaare
 - (B) ART: Nukleinsäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: einsträngig
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11:

CAGGGCTTTA C
11

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 12:

- (i) SEQUENZMERKMALE:

- (A) LÄNGE: 16 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: einsträngig
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 12:

CCCGGGTGTGTC CCTCAG
16

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 13:

- (i) SEQUENZMERKMALE:
 - (A) LÄNGE: 26 Basenpaare
 - (B) ART: Nukleinsäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: einsträngig
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 13:

TACTGGCTAT AACTCGAG
18

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 14:

- (i) SEQUENZMERKMALE:
 - (A) LÄNGE: 13 Basenpaare
 - (B) ART: Nukleinsäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: einsträngig
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 14:

CCGGGTAAAT AGC
13

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 15:

- (i) SEQUENZMERKMALE:
 - (A) LÄNGE: 13 Basenpaare
 - (B) ART: Nukleinsäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: einsträngig
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 15:

TCGAGCTATT TAC

13

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 16:

(i) SEQUENZMERKMALE:

- (A) LÄNGE: 23 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: einsträngig
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 16:

AAGCTTAAAT CCTCCAATGA AGC

23

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 17:

(i) SEQUENZMERKMALE:

- (A) LÄNGE: 26 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: einsträngig
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 17:

CTCGAGTTAG GCTACTTCAC TCAAAG

26

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 18:

(i) SEQUENZMERKMALE:

- (A) LÄNGE: 707 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: einsträngig
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: Protein

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL : Protein
- (B) ORT: (1..707)
- (C) WEITERE INFORMATION: /Anmerkung= "Extrazelluläre Domäne von PSMA"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 18:

Lys Ser Ser Asn Glu Ala Thr Asn Ile Thr Pro Lys His Asn Met Lys
 1 5 10 15
 Ala Phe Leu Asp Glu Leu Lys Ala Glu Asn Ile Lys Lys Phe Leu Tyr
 20 25 30
 Asn Phe Thr Gln Ile Pro His Leu Ala Gly Thr Glu Gln Asn Phe Gln
 35 40 45
 Leu Ala Lys Gln Ile Gln Ser Gln Trp Lys Glu Phe Gly Leu Asp Ser
 50 55 60
 Val Glu Leu Ala His Tyr Asp Val Leu Leu Ser Tyr Pro Asn Lys Thr
 65 70 75 80
 His Pro Asn Tyr Ile Ser Ile Ile Asn Glu Asp Gly Asn Glu Ile Phe
 85 90 95
 Asn Thr Ser Leu Phe Glu Pro Pro Pro Pro Gly Tyr Glu Asn Val Ser
 100 105 110
 Asp Ile Val Pro Pro Phe Ser Ala Phe Ser Pro Gln Gly Met Pro Glu
 115 120 125
 Gly Asp Leu Val Tyr Val Asn Tyr Ala Arg Thr Glu Asp Phe Phe Lys
 130 135 140
 Leu Glu Arg Asp Met Lys Ile Asn Cys Ser Gly Lys Ile Val Ile Ala
 145 150 155 160
 Arg Tyr Gly Lys Val Phe Arg Gly Asn Lys Val Lys Asn Ala Gln Leu
 165 170 175
 Ala Gly Ala Lys Gly Val Ile Leu Tyr Ser Asp Pro Ala Asp Tyr Phe
 180 185 190
 Ala Pro Gly Val Lys Ser Tyr Pro Asp Gly Trp Asn Leu Pro Gly Gly
 195 200 205
 Gly Val Gln Arg Gly Asn Ile Leu Asn Leu Asn Gly Ala Gly Asp Pro
 210 215 220
 Leu Thr Pro Gly Tyr Pro Ala Asn Glu Tyr Ala Tyr Arg Arg Gly Ile
 225 230 235 240
 Ala Glu Ala Val Gly Leu Pro Ser Ile Pro Val His Pro Ile Gly Tyr
 245 250 255
 Tyr Asp Ala Gln Lys Leu Leu Glu Lys Met Gly Gly Ser Ala Pro Pro
 260 265 270
 Asp Ser Ser Trp Arg Gly Ser Leu Lys Val Pro Tyr Asn Val Gly Pro
 275 280 285
 Gly Phe Thr Gly Asn Phe Ser Thr Gln Lys Val Lys Met His Ile His
 290 295 300
 Ser Thr Asn Glu Val Thr Arg Ile Tyr Asn Val Ile Gly Thr Leu Arg
 305 310 315 320
 Gly Ala Val Glu Pro Asp Arg Tyr Val Ile Leu Gly Gly His Arg Asp
 325 330 335
 Ser Trp Val Phe Gly Gly Ile Asp Pro Gln Ser Gly Ala Ala Val Val
 340 345 350

His Glu Ile Val Arg Ser Phe Gly Thr Leu Lys Lys Glu Gly Trp Arg
 355 360 365
 Pro Arg Arg Thr Ile Leu Phe Ala Ser Trp Asp Ala Glu Glu Phe Gly
 370 375 380
 Leu Leu Gly Ser Thr Glu Trp Ala Glu Glu Asn Ser Arg Leu Leu Gln
 385 390 395 400
 Glu Arg Gly Val Ala Tyr Ile Asn Ala Asp Ser Ser Ile Glu Gly Asn
 405 410 415
 Tyr Thr Leu Arg Val Asp Cys Thr Pro Leu Met Tyr Ser Leu Val His
 420 425 430
 Asn Leu Thr Lys Glu Leu Lys Ser Pro Asp Glu Gly Phe Glu Gly Lys
 435 440 445
 Ser Leu Tyr Glu Ser Trp Thr Lys Lys Ser Pro Ser Pro Glu Phe Ser
 450 455 460
 Gly Met Pro Arg Ile Ser Lys Leu Gly Ser Gly Asn Asp Phe Glu Val
 465 470 475 480
 Phe Phe Gln Arg Leu Gly Ile Ala Ser Gly Arg Ala Arg Tyr Thr Lys
 485 490 495
 Asn Trp Glu Thr Asn Lys Phe Ser Gly Tyr Pro Leu Tyr His Ser Val
 500 505 510
 Tyr Glu Thr Tyr Glu Leu Val Glu Lys Phe Tyr Asp Pro Met Phe Lys
 515 520 525
 Tyr His Leu Thr Val Ala Gln Val Arg Gly Gly Met Val Phe Glu Leu
 530 535 540
 Ala Asn Ser Ile Val Leu Pro Phe Asp Cys Arg Asp Tyr Ala Val Val
 545 550 555 560
 Leu Arg Lys Tyr Ala Asp Lys Ile Tyr Ser Ile Ser Met Lys His Pro
 565 570 575
 Gln Glu Met Lys Thr Tyr Ser Val Ser Phe Asp Ser Leu Phe Ser Ala
 580 585 590
 Val Lys Asn Phe Thr Glu Ile Ala Ser Lys Phe Ser Glu Arg Leu Gln
 595 600 605
 Asp Phe Asp Lys Ser Asn Pro Ile Val Leu Arg Met Met Asn Asp Gln
 610 615 620
 Leu Met Phe Leu Glu Arg Ala Phe Ile Asp Pro Leu Gly Leu Pro Asp
 625 630 635 640
 Arg Pro Phe Tyr Arg His Val Ile Tyr Ala Pro Ser Ser His Asn Lys
 645 650 655
 Tyr Ala Gly Glu Ser Phe Pro Gly Ile Tyr Asp Ala Leu Phe Asp Ile
 660 665 670
 Glu Ser Lys Val Asp Pro Ser Lys Ala Trp Gly Glu Val Lys Arg Gln
 675 680 685
 Ile Tyr Val Ala Ala Phe Thr Val Gln Ala Ala Ala Glu Thr Leu Ser
 690 695 700
 Glu Val Ala
 705

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 19:

(i) SEQUENZMERKMALE:

- (A) LÄNGE: 25 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: einsträngig
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 19:

CTTAAGCGAG CCCAGAGGGC CCACA
25

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 20:

(i) SEQUENZMERKMALE:

- (A) LÄNGE: 25 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: einsträngig
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 20:

CTCGAGCTCA TTTACCCGGA GTCCG
25

Patentansprüche

1. DNA-Molekül, kodierend für ein Fusionsprotein einer Fc-Domäne eines Immunglobulins, das mit einem Zielprotein verknüpft ist, das die Bioaktivität des Zielproteins aufweist und von einer Säugerexpressionswirtszelle sezerniert wird, die mit dem DNA-Molekül transformiert wurde, wobei dieses DNA-Molekül eine Polynucleotidsequenz enthält, die von ihrer 5'- zur 3'-Richtung kodiert:

- (a) eine Signalpeptidsequenz, welche die Sekretion des Fusionsproteins steuert,
- (b) eine FC-Region eines Immunglobulins, enthaltend eine Gelenkregion, eine CH2-Domäne und eine CH3-Domäne eines Immunglobulins und
- (c) eine Zielproteinsequenz.

2. DNA-Molekül nach Anspruch 1, wobei das Immunglobulin IgG1 ist.

3. DNA-Molekül nach Anspruch 1 oder 2, weiterhin enthaltend eine Polynucleotidsequenz, die für eine proteolytische Spaltstelle kodiert, was die Freisetzung des Zielproteins aus der Fc-Domäne ermöglicht, wobei diese Sequenz zwischen dem 3'-Ende der für die Fc-Domäne kodierenden Polynucleotidsequenz und dem 5'-Ende der für die Zielsequenz kodierenden Polynucleotidsequenz eingeschoben ist.

4. DNA-Molekül nach einem der Ansprüche 1-3, weiterhin enthaltend regulierende Sequenzen, die an das 5'-Ende der Signalsequenz fusioniert sind.

5. DNA-Molekül nach einem der Ansprüche 1-4, wobei das Zielprotein ein Protein ist, das normalerweise nicht sezerniert wird oder dessen Sekretionsspiegel niedrig ist.

6. DNA-Molekül nach einem der Ansprüche 1-5, wobei dieses Zielprotein PSMA, gp120 oder IL-2 ist.

7. Replizierbarer Expressionsvektor, enthaltend ein DNA-Molekül nach einem der Ansprüche 1-6.

8. Expressionswirtszelle, enthaltend den Vektor nach Anspruch 7.

9. Verwendung eines DNA-Moleküls nach einem der Ansprüche 1-7 in einem In-Vitro-Expressionssystem zur Verstärkung der Produktion und Sekretion von Proteinen, die normalerweise nicht sezerniert werden oder deren Sekretionsspiegel niedrig sind.

10. Verfahren zur Herstellung in vitro eines Fusionsproteins einer Fe-Domäne eines Immunglobulins, verknüpft mit einem Zielprotein, mit der Bioaktivität des Zielproteins, wobei dieses Verfahren die Schritte umfasst:

- (i) Transformieren einer Wirtszelle mit dem Expressionsvektor nach Anspruch 7, um die Wirtszelle nach Anspruch 8 zu erhalten.
- (ii) Kultivieren der Wirtszelle in einem Medium unter Bedingungen, welche die Expression und Sekretion von diesem Fusionsprotein fördern, und
- (iii) Sammeln des Fusionsproteins aus dem Medium.

11. Verfahren zur Herstellung eines Zielproteins, wobei das Verfahren die Schritte nach Anspruch 10 umfasst, gefolgt von den Schritten:

- (iv) Abspalten der Fc-Region von dem Zielprotein, und
- (v) Sammeln des Zielproteins.

12. Verfahren zur Verstärkung der Produktion eines Zielproteins oder eines Fusionsproteins, enthaltend das Zielprotein, das normalerweise nicht sezerniert wird oder dessen Sekretionsspiegel niedrig ist, in einem rekombinanten Herstellungsverfahren, wobei das Verfahren die Schritte nach den Ansprüchen 10 oder 11 umfasst.

Es folgt ein Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

