(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 693 34 111 T2** 2007.11.22

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 662 077 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **693 34 111.4**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US93/08223**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **93 920 446.7**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1994/005691**
(86) PCT-Anmeldetag: **01.09.1993**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **17.03.1994**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **12.07.1995**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **14.02.2007**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **22.11.2007**

(51) Int Cl.[8]: ***C07H 21/04*** (2006.01)
C07K 14/52 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)
C12P 21/06 (2006.01)
C12N 15/00 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

941648	**08.09.1992**	**US**
106507	**13.08.1993**	**US**

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

(73) Patentinhaber:
Immunex Corp., Thousand Oaks, Calif., US

(74) Vertreter:
Westphal, Mussgnug & Partner, 80336 München

(72) Erfinder:
BECKMANN, M, Patricia, Poulsbo, Washington, US; GOODWIN, Raymond, G., Seattle, WA, US; GIRI, Judith, G., Seattle, WA, US; ARMITAGE, Richard J., Bainbridge Island, WA, US

(54) Bezeichnung: **CD27 LIGAND**

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 der Erfindung

[0001] Das Lymphozytenantigen CD27 ist ein Zytokinrezeptor, der auf der Oberfläche von den meisten menschlichen T Lymphozyten und einigen B Lymphozyten gefunden wird. Eine cDNA, die den CD27 Rezeptor kodiert, wurde isoliert (Camerini et al., J. Immunol. 147:3165 (1991). Basierend auf der vorausgesagten Polypeptidsequenz gehört CD27 zu einer Familie von Cysteinreichen Rezeptoren, zu dessen bekannten Liganden der Nervenwachstumsfaktor und TNF-α und -β zählen. Strukturelle Ähnlichkeiten weisen darauf hin, dass CD27 zu einer Lymphozytenspezifischen Untergruppe der Familie gehört, die aus dem B Zellen Ag CD40, dem Ratten T Zell-Teilmenge Ag OX40, und dem Maus T Zell Aktivierungs-Ag 4-1BB besteht. Es wird vermutet, dass der CD27 Rezeptor Funktionen vermittelt, welche das Überleben von aktivierten Zellen ermöglicht.

[0002] Der Wachstumsfaktor, der für die Bindung an und für die Initiierung von CD27 Aktivitäten verantwortlich ist, wurde bis jetzt nicht identifiziert. Die Existenz und Natur von solchen Wachstumsfaktoren werden beim Aufklären der Mechanismen für das Überleben von aktivierten Zellen wichtig sein. Ein Bedarf hat folglich für das Identifizieren und Charakterisieren eines Liganden bestanden, der an CD27 bindet.

[0003] Camerini et al (J. Immunology, 147, 3165-3169 (1991)) beschreiben eine Charakterisierung von CD27. Armitage et al (Nature 1992, 357, 80-82) beschreiben das Klonieren und Charakterisieren des Liganden für den CD40 Rezeptor in Mäusen. WO 94/10308 behandelt ein Fusionsprotein, welches einen Leucin-Zipper und eine extrazelluläre Domäne eines Säugetier-Transmembranproteins, wie CD40L, CD27L, OX40L oder TNF auweist. Val Lier et al (European Journal of Immunology, 1988, 18, 811-816) beschreiben Antikörper, die an CD27 binden.

[0004] Stein et al (Leucocyte IV, 1989, 446-455) beschreiben einen Cluster-Bericht in Bezug auf CDw70. Hintzen et al (International Immunology, 1994, 6, 477-480) betrifft die Entdeckung, dass CD70 den menschlichen Liganden für CD27 darstellt. Paloczi et al. (Haematologia, 1991, 24, 83-90) beschreiben das Muster von Aktivierungsantigen-Expression auf T-Lymphozyten-Subpopulation in infektiöser Mononukleose. Paloczi (Leukaemia and Lymphoma, 1990, 3, 31-36) beschreiben die Detektion von Aktivierungsantigenen auf chronischen lymphozytischen Leukämiezellen. Pileri (Histopathology, 1990, 16, 383-391) beschreibt ein lymptiohistiocytisches T-Zell Lymphom.

Zusammenfassung der Erfindung

[0005] Die vorliegende Erfindung bietet einen neuartigen CD27 Liganden (CD27L), der an den CD27 Rezeptor bindet. Die vorliegende Erfindung betrifft auch isolierte DNA, die das CD27L Protein kodiert, Expressionsvektoren, die die isolierte DNA aufweisen, und ein Verfahren zum Herstellen von CD27L durch Kultivieren von Wirtszellen, die die Expressionsvektoren enthalten, unter Bedingungen, die für die Expression des CD27L Proteins geeignet sind. Antikörper, die gegen das CD27L Protein oder ein immunogenes Fragment davon gerichtet sind, sind ebenfalls offenbart.

[0006] CD27L stimuliert die Proliferation von gereinigten menschlichen peripheren Blut-T-Zellen, wie im Detail in Beispiel 8A beschrieben ist. Gereinigte T-Zellen (1×10^5/Kammer) wurden mit einer Titration von fixierten CV-1/EBNA Zellen, die mit entweder einem leeren Vektor oder mit einem Vektor, der CD27L exprimiert, transfiziert sind, für 3 Tage in der Gegenwart einer sub-optimalen Konzentration von PHA (0,1%) kultiviert. Während den letzten 8 Stunden der Kultur wurden die Zellen mit ^{3}H-Thymidin gepulst und der Einbau wurde bestimmt. Der mittlere cpm±SD von Dreifachkulturen wurde bestimmt. Zellen, die CD27L exprimieren, proliferieren zu einem größeren Ausmaß, als Zellen, die den leeren Vektor exprimieren.

[0007] Gereinigte $CD4^+$ oder $CD8^+$ Zellen (1×10^5/Kammer) wurden mit IL-2 (10 ng/ml) oder CV-1/EBNA Zellen, die CD27L exprimieren, (1×10^4/Kammer) für 3 Tage mit sub-optimalen PHA kultiviert. Die Zellen wurden entweder mit oder ohne einem neutralisierenden IL-2 Antiserum kultiviert. Für sowohl $CD4^+$ als auch $CD8^+$ T Zellen stimulierte CD27L die Proliferation in einer IL-2 unabhängigen Art und Weise.

[0008] CD27L induziert cytolytische T Zellen (wie im Detail in Beispiel 8B beschrieben). Gereinigte T Zellen wurden im Medium allein, in Medium plus IL-2 oder mit CV-1/EBNA Zellen, die mit leerem Vektor oder mit Vektor der CD27L exprimiert, transfiziert sind, entweder in der Abwesenheit oder in der Gegenwart einer suboptimalen Konzentration von PHA (0,1) kultiviert. Nach 4 Tagen wurden die Zellen gewonnen und in Duplikaten für zytolytische Aktivität gegen ^{51}CR-markierte P815 Ziele in der Gegenwart von PHA (0,6%) beurteilt. Zellen, die

CD27L exprimieren, hatten keine stimulatorische Wirkung auf die zytolytische Aktivität in der Abwesenheit von Costimulation. Im Gegensatz dazu, verstärkten Zellen, die CD27L exprimieren, die mit PHA costimuliert sind, die Produktion von zytolytischen Zellen.

[0009] SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von CD27L wird im Detail in Beispiel 7 beschrieben. MP-1 Zellen und CV-1/EBNA Zellen, die mit einem leeren Vektor oder Vektor, der CD27L exprimiert, transfiziert sind, wurden mit ^{125}I-Natrium oberflächenmarkiert. Lysate wurden dann mit CD27/Fc präzipitiert, gefolgt von Protein G-Sepharose und auf einem SDS-Polyacrylamid (4%-20%) Gel unter reduzierenden Bedingungen analysiert. Die vorherrschende Proteinspezies auf sowohl MP-1 als auch CD27L-exprimierenden CV-1/EBNA Zellen hatte ein scheinbares M_r von etwa 50.000.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

[0010] Eine cDNA, die einen neuartigen Proteinliganden für das T-Zell-Aktivierungsantigen CD27 kodiert, wurde in Übereinstimmung mit der vorliegenden Erfindung isoliert. Ebenfalls bereitgestellt sind Expressionsvektoren, die die CD27 Ligand (CD27L) cDNA aufweisen, und Verfahren für das Herstellen von rekombinanten CD27L Polypeptide durch Kultivieren von Wirtszellen, die die Expressionsvektoren enthalten, unter Bedingungen, die für die Expression von CD27L geeignet sind, und Gewinnen des exprimierten CD27L. Gereinigtes CD27L Protein ist ebenfalls durch die vorliegende Erfindung umfasst.

[0011] Die vorliegende Erfindung bietet auch CD27L oder antigene Fragmente davon, die als Immunogene agieren können, um Antikörper zu erzeugen, die gegen die CD27L Immunogene spezifisch sind. Monoklonale Antikörper, die für CD27L oder antigene Fragmente davon spezifisch sind, können folglich hergestellt werden.

[0012] Das hierin offenbarten neuartige Zytokin ist ein Ligand für CD27, ein Rezeptor, der ein Mitglied der TNF/NGF Rezeptor-Superfamilie ist. Es wird deshalb angenommen, dass CD27L der Ligand ist, der das durch CD27 vermittelte biologische Signal auslöst, welches dafür bekannt ist, auf der Oberfläche von den meisten T Zellen und einigen B Zellen exprimiert zu werden. Eine Verwendung des CD27 Liganden der vorliegenden Erfindung ist als ein Forschungswerkzeug für das Studieren der Rolle von CD27L beim Überleben von aktivierten Zellen. Die CD27L Polypeptide der vorliegenden Erfindung können auch in in vitro Untersuchungen für das Detektieren von CD27 oder CD27L oder deren Interaktionen eingesetzt werden. Von CD27L wurde gezeigt, die Proliferation von costimulierten T Zellen zu induzieren und die Erzeugung von zytolytischen T Zellen zu verstärken, was darauf hinweist, dass CD27L eine Rolle bei der Reifung von T Zellen spielt. Biologische Studien von CD27L der vorliegenden Erfindung (wie in den Beispielen 6, 8 und 10 beschrieben) zeigen, dass CD27L die T Zell Proliferation costimuliert und auch die Erzeugung von zytolytischen T-Zell-Vorläufern verstärkt.

[0013] Der Begriff „CD27L", so wie hierin verwendet, betrifft eine Gattung von Polypeptiden, die zur Bindung von CD27 in der Lage sind. Menschlicher CD27L ist innerhalb des Umfanges der vorliegenden Erfindung, sowie CD27L Proteine, die von anderen Säugetierspezies abgeleitet sind. So wie hierin verwendet, umfasst der Begriff „CD27L" membrangebundene Proteine (die eine cytoplasmatische Domäne, eine Transmembranregion, und eine extrazelluläre Domäne aufweisen) sowie verkürzte Proteine, die die CD27-Bindungseigenschaft beibehalten. Solche verkürzte Proteine umfassen zum Beispiel löslichen CD27L, welcher nur die extrazelluläre (Rezeptorbindungs-)Domäne aufweist. Die cDNA Sequenz und vorausgesagte Aminosäuresequenz von CD27L ist in den SEQ ID NO: 1 und SEQ ID NO: 2 dargelegt.

[0014] Die Isolation einer cDNA, die menschlichen CD27L kodiert, ist in den Beispielen 1-4 später beschrieben. Ein menschliches CD27/Fc Fusionsprotein wurde, wie in Beispiel 1 beschrieben, für die Verwendung zum Screenen von Klonen in einer direkten Expressionsklonierungsprozedur hergestellt, um jene zu identifizieren, die ein Protein exprimieren, das CD27 bindet.

[0015] Irgendeine der Zelllinien, die die Bindung von CD27 an CD27L demonstrieren, kann als eine Nukleinsäure-Quelle in einem Versuch verwendet werden, eine CD27L-kodierende DNA Sequenz zu isolieren. Eine cDNA Bibliothek kann zum Beispiel aus der Zelllinie U937, der monozytischen Zelllinie THP-1, der frühen prä-B-lymphoblastischen Leukämiezelllinie EU-1, gereinigte tonsilläre T Zellen oder MP-1 Zellen hergestellt und gescreent werden, um CD27L cDNA unter Verwendung der später beschriebenen direkten Expressionsklonierungsstrategie zu identifizieren. Die Zellen können von Menschen, murinen oder anderen Säugetierquellen abgeleitet werden, einschließlich ohne darauf beschränkt zu sein, von Ratten, Rinder, Schweinen oder verschiedenen Primatenzellen.

[0016] In Kürze, Gesamt RNA wurde aus MP-1 Zellen extrahiert und für poly(A)+ RNA durch Oligo(dT) Zellu-

losechromatographie angereichert, wie im Wesentlichen von Ausubel et al., Hrsg. Current Protocols in Molecular Biology, Band 1 (1987) beschrieben ist. Erststrang cDNA wurde unter Verwendung der Gesamt RNA als Matrize hergestellt. DNA, die die extrazelluläre Domäne von menschlichem CD27 kodiert, wurde durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unter Verwendung von Primern, die auf der menschlichen cD27 Sequenz basieren, die von Camerini et al., supra veröffentlicht wurden, amplifiziert und das amplifizierte DNA Fragment wurde isoliert. Ein Expressionsvektor, der die CD27 extrazelluläre Domän DNA, die im Rahmen an den N-Terminus einer menschlichen IgG1 Fc Region DNA Sequenz fusioniert ist, aufweist, wurde hergestellt und in Säugetierzellen transfiziert. Das exprimierte Protein wurde durch eine Prozedur gereinigt, die die Verwendung einer Protein G Säule (an welche der Fc Abschnitt des Fusionsproteins bindet) einschließt.

[0017] Die humane B-Zelllinie MP-1, die CD27L exprimiert, wurde unter Verwendung einer zweistufigen Screeninguntersuchung, bei welcher das CD27/Fc Fusionsprotein an Zellen mit CD27L gebunden war, gefolgt von ^{125}I-Maus Anti-Human Fc Antikörper, der an den Fc Abschnitt des CD27/Fc Fusionsproteins gebunden war, identifiziert. Eine cDNA Bibliothek wurde aus der humanen EBV-transformierten B Zelllinie MP-1 hergestellt. cDNA aus dieser Bibliothek (in einem Säugetierexpressionsvektor, der auch in E. coli repliziert) wurde in CV-1/EBNA-1 (Säugetier) Zellen transfiziert, für die Isolation von Klonen, die ein CD27-Bindungsprotein exprimieren, durch Verwendung einer direkten Expressionsklonierungstechnik. Die Klone wurden unter Verwendung des zweistufigen Screeningverfahrens gescreent, welches das CD27/Fc Fusionsprotein, das an Zellen gebunden ist, gefolgt von ^{125}I-Maus Anti-Human Fc Antikörper, der an den Fc Anteil des CD27/Fc Fusionsproteins gebunden ist, einschließt. Der aus dem positiven Klon (muriner CD24L cDNA in Plasmid pDC303) isolierte rekombinante Vektor wurde in E. coli Zellen transformiert, die bei der American Type Culture Collection am 18. August 1992 hinterlegt wurden und die Hinterlegungsnummer ATCC 69052 zugeordnet bekam. Die Hinterlegung erfolgte unter den Bedingungen des Budapester Vertrags.

[0018] Die Sequenzanalyse des resultierenden Klons offenbarte ein Insert von 813 bp mit einem einzelnen langen offenen Leserahmen, der in der Lage ist, ein Protein von 193 Aminosäuren zu kodieren. Die Amino-terminalen 20 Aminosäuren wurde von 18 hydrophoben Aminosäuren (Aminosäuren 21-38) gefolgt, die vermutlich als ein Transmembrananker fungieren. Dieses Fehlen einer Signalsequenz, die Gegenwart einer internen hydrophoben Domäne, und die Gegenwart von zwei potentiellen N-verbundenen Glycosylierungsstellen (Aminosäuren Asn^{63} und Ans^{170}) in der C-terminalen Domäne weist darauf hin, dass CD27L ein TypII Transmembranprotein mit einer extrazellulären Carboxy-terminalen Domäne ist.

[0019] Der ursprünglich isolierte cDNA Klon enthielt nur 37 Nukleotide stromaufwärts des mutmaßlichen Initiationskodons (beginnend mit Nukleotid 114 der SEQ ID NO: 1) mit keinen im Rahmen Terminationskodons. Zusätzlich stimmt die Sequenz um diese Initiationsstelle nicht mit der Konsensus für solche Stellen überein, die von Kozak, Nucl. Acids. Res. 12:857 (1984) beschrieben ist. Somit wurde eine „verankerte PCR" Reaktion (wie von Carrier et al., Gene 116:173 (1992) beschrieben) durchgeführt, um das 5' Ende des CD27L Transkripts zu klonen, um sicherzustellen, dass es keine stromaufwärtige Initiationsstelle gibt. Dies führte zu der Identifikation von weiteren 113 Nukleotiden (Nukleotide 1-113 der SEQ ID NO: 1), die dem Ende des ursprünglich isolierten Klons vorausgehen. Keine Initiationsstellen wurden stromaufwärts von jener gefunden, welche zuvor identifiziert wurde.

[0020] Die humane CD27L cDNA kann radiomarkiert und als eine Sonde verwendet werden, um andere Säugetier CD27L cDNAS durch Kreuzspezies-Hybridisierung zu isolieren. Zum Beispiel kann eine cDNA Bibliothek, die von aktivierten murinen peripheren Blutlymphozyten hergestellt ist, mit radiomarkierter humaner cDNA gescreent werden, um einen positiven Klon zu isolieren.

[0021] Obwohl ein CD27/Fc Fusionsprotein in der Screeningprozedur eingesetzt wurde, die in Beispiel 4 unten beschrieben ist, kann markiertes CD27 verwendet werden, um Klone und Kandidatenzelllinien auf Expression von CD27L Proteinen zu screenen. Das CD27/FC Fusionsprotein bietet jedoch den Vorteil, dass es leicht gereinigt werden kann. Zusätzlich bilden sich Disulfidbindungen zwischen den Fc Regionen der zwei getrennten Fusionsproteinketten, wodurch Dimers erzeugt werden. Der dimere CD27/Fc Rezeptor wurde für den potentiellen Vorteil einer höheren Affinitätsbindung des CD27 Liganden ausgewählt, angesichts der Möglichkeit, dass der gesuchte Ligand multimer sein würde.

[0022] Außerdem können andere geeignete Fusionsproteine, die CD27 aufweisen, für CD27/Fc in den Screening-Prozeduren ausgetaucht werden. Andere Fusionsproteine können durch Fusionieren einer DNA Sequenz für die Ligandbindungsdomäne von CD27 an eine DNA Sequenz, die ein anderes Polypeptid kodiert, das zur Affinitätsreinigung in der Lage ist, zum Beispiel Avidin oder Streptavidin hergestellt werden. Das resultierende Genkonstrukt kann in Säugetierzellen eingeführt werden, um ein Fusionprotein zu exprimieren. Rezeptor/Avi-

din-Fusionproteine können durch Biotin-Affinitätschromatographie gereinigt werden. Das Fusionprotein kann später von der Säule durch Eluieren mit einer Hochsalzlösung oder einem anderen geeigneten Puffer gewonnen werden. Andere Antikörper Fc Regionen können für die humane IgG1 Fc Region ausgetauscht werden, wie in Beispiel 1 beschrieben ist. Andere geeingte Fc Regionen sind jene, die mit hoher Affinität an Protein A oder Protein G binden können, und umfassen die Fc Region von murinem IgG1 oder Fragmente der menschlichen IgG1 Fc Region, z.B. Fragmente, die zumindest die Hinge-Region enthalten, so dass Interketten-Disulfidbindungen sich bilden werden.

[0023] cDNA, die ein CD27L Polypeptid kodiert, kann aus anderen Säugetierspezies unter Verwendung der in den Beispielen offenbarten Verfahren isoliert werden. Zum Beispiel kann eine murine cDNA Bibliothek gegen die humane cDNA Bibliothek ausgetauscht werden, die auf Bindung von radioiodiniertem humanem CD27/FC Fusionsprotein in der direkten Expressionsklonierungsuntersuchung, wie in Beispiel 4 beschrieben. gescreent wurde. Klone, die andere Säugetier CD27L Proteine exprimieren, können somit identifiziert werden. Zelltypen, von welchen cDNA Bibliotheken hergestellt werden können, können durch die zweistufige Bindungsprozedur, die in Beispiel 2 beschrieben ist, oder jede andere geeignete Technik ausgewählt werden. Alternativ können mRNAs, die von verschiedenen Zelllinien isoliert wurden, durch Northern Hybridisierung gescreent werden, um eine geeignete Quelle von Säugetier CD27L mRNA für die Verwendung zum Klonieren eines CD27L Gens zu bestimmen.

[0024] Alternativ können die humanen CD27L cDNAs, die hierin beschrieben sind, benutzt werden, um cDNA, die von anderen Säugetierquellen abgeleitet sind, auf CD27L cDNA mittels bekannten Kreuzspezies-Hybridisierungstechniken zu screenen. In Kürze, eine Oligonukleotidsonde, die auf der Nukleotidsequenz der Kodierungsregion (vorzugsweise auf der extrazellulären Region) des murinen oder des menschlichen Klons basiert, wird durch Standardtechniken hergestellt. Die murine oder humane Sonde wird verwendet, um eine Säugetier cDNA Bibliothek oder genomische Bibliothek im Allgemeinen unter mäßig stringenten Bedingungen zu screenen.

[0025] Eine Ausführungsform der vorliegenden Erfindung bietet lösliche CD27L Polypeptide. Lösliche CD27L Polypeptide weisen die gesamte oder einen Teil der extrazellulären Domäne eines nativen CD27L auf, denen jedoch die Transmembran-Region fehlt, die die Retention des Polypeptids an der Zellmembran bewirken würde. Löslicher CD27L wird somit bei der Expression sezerniert. Die löslichen CD27L Polypeptide, die eingesetzt werden können, behalten die Fähigkeit, den CD27 Rezeptor zu binden. Löslicher CD27L kann ebenfalls einen Teil der Transmembran-Region oder Teil der cytoplasmatischen Domäne oder anderer Sequenzen beinhalten, vorausgesetzt, dass das lösliche CD27L Protein zum Sezernieren in der Lage ist.

[0026] Löslicher CD27L kann durch Trennen intakter Zellen, die das gewünschte Protein exprimieren, von dem Kulturmedium, z.B. durch Zentrifugieren, und Untersuchen des Mediums (Überstand) auf die Gegenwart des gewünschten Proteins identifiziert (und von seinen nichtlöslichen membrangebundenen Gegenstücken unterschieden) werden. Das Kulturmedium kann unter Verwendung von Prozeduren, die ähnlich oder identisch sind zu jenen, die in den Beispielen später beschrieben sind, untersucht werden. Die Gegenwart von CD27L im Medium weist darauf hin, dass das Protein aus den Zellen sezerniert wurde und somit eine lösliche Form des gewünschten Proteins ist. Löslicher CD27L kann eine natürlich-vorkommende Form dieses Proteins sein.

[0027] Die Verwendung von löslichen Formen von CD27L ist für bestimmte Anwendungen vorteilhaft. Reinigung der Proteine aus rekombinanten Wirtszellen wird erleichtert, da die löslichen Proteine aus den Zellen sezerniert werden. Weiters sind die löslichen Proteine im Allgemeinen für die intravenöse Verabreichung geeigneter.

[0028] Lösliche Formen von CD27L Proteinen können auch durch Deletieren der Transmembran- und intracytoplasmatischen Domänen und Hinzufügen eines geeigneten Signalpeptids hergestellt werden, um die Sekretion der löslichen Form des Proteins zu ermöglichen (Smith et al., Science 238:1704, 1987; Treiger et al., J. Immunol. 136:4099, 1986). Lösliche CD27L Polypeptide umfassen jene, die die gesamte oder einen Teil der extrazellulären Domäne eines nativen CD27L Proteins aufweisen. Verkürzter CD27L, einschließlich löslicher Polypeptide, kann durch irgendeines einer Vielzahl von herkömmlichen Techniken hergestellt werden. Im Fall von rekombinanten Proteinen kann ein DNA Fragment, das ein gewünschtes Fragment kodiert, in einen Expressionsvektor subkloniert werden. Alternativ kann eine gewünschte DNA Sequenz unter Verwendung von bekannten Techniken chemisch synthetisiert werden. DNA Fragmente können auch durch Restriktionsendonuklease-Verdau einer klonierten DNA Sequenz voller Länge und Isolation durch Elektrophorese auf Agarosegelen hergestellt werden. Linker, die Restriktionsendonukleasen-Spaltungsstellen enthalten, können eingesetzt werden, um das gewünschte DNA Fragment in einen Expressionsvektor einzuführen, oder das Fragment

kann an Spaltungsstellen, die natürlich darin vorhanden sind, verdaut werden. Die bekannte Polymerase-Kettenreaktion-Prozedur kann ebenfalls eingesetzt werden, um eine DNA Sequenz zu isolieren, die ein gewünschtes Proteinfragment kodiert.

[0029] In einem anderen Ansatz kann die enzymatische Behandlung (z.B. unter Verwendung von Bal31 Exonuklease) verwendet werden, um terminale Nukleotide von einem DNA Fragment zu deletieren, um ein Fragment mit einem bestimmten gewünschten Terminus zu erhalten. Unter den kommerziell erhältlichen Linkern sind jene, die an die stumpfen Enden, die durch Bal31 Verdau erzeugt wurden, ligiert werden können, und welche Restriktionsendonuklease-Spaltungsstellen enthalten. Alternativ können Oligonukleotide, die den N- oder C-Terminus eines DNA Fragmentes auf einen bestimmten Punkt rekonstruieren, synthetisiert werden. Das Oligonukleotid kann eine Restriktionsendonuklease-Spaltungsstelle stromäufwärts der gewünschten Kodierungssequenz enthalten und ein Initiatorkodon (ATG) an dem N-Terminus der Kodierungssequenz positionieren.

[0030] Lösliche CD27L Proteine können auch als Fusionsproteine exprimiert werden, in welchen die extrazelluläre Domäne des Membranproteins mit einer konstanten Region einer schweren Kette eines Immunoglobulins verbunden ist (Fanslow et al., J. Immunol. 149:65, 1992; Noelle et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:6550, 1992), um ein dimeres lösliches CD27L Molekül zu erzeugen, oder kann mit der extrazellulären Domäne des murinen T Lymphozytenantigen CD8 fusioniert werden (Hollenbaugh et al., EMBO J. 11:4313, 1992).

[0031] Mehrere lösliche CD27L Moleküle können auch oligomerisiert werden. Ein bevorzugtes Verfahren für das Erzeugen von multimeren Formen von CD27L ist die Verwendung eines Leucin-Zippers, welcher ein sich wiederholendes Aminosäure-Heptad-Motiv ist, die als eine konservierte Domäne in bestimmten nativen Proteinen vorhanden ist. Der Leucin-Zipper enthält vier bis fünf Leucin-Reste, die mit anderen Aminosäuren durchsetzt sind, die als kurze, parallele Coiled Coils falten, und eine Oligomerisierung der Proteine bewirken, an welche sie fusioniert sind (O'Shea et al., Science 254:539; 1991). Die allgemeine Architektur der parallelen Coiled Coil wurde gut charakterisiert, mit einer „Knopf in Loch" Packung, wie von Crick in 1953 (Acta Crystallogr. 6:689) vorgeschlagen wurde. Durch eine Leucin-Zipper-Domäne gebildete Dimere werden durch die Heptad-Wiederholung stabilisiert, die gemäß der Notation von McLachlan und Stewart (J. Mol. Biol. 98:293; 1975) mit $(abcdefg)_n$ bezeichnet, in welcher die Reste a und d im Allgemeinen hydrophoben Reste sind, d ein Leucin ist, die auf derselben Fläche der Helix ausrichten. Entgegengesetzt geladene Reste treten häufig an den Positionen g und e auf. Folglich sind in einer parallelen Coiled Coil, die aus zwei helikalen Leucin-Zipper Domänen gebildet ist, die „Knöpfe", die durch die hydrophoben Seitenketten der ersten Helix gebildet sind, in die „Löcher" gepackt, die zwischen den Seitenketten der zweiten Helix gebildet sind.

[0032] Die Leucin-Reste an der Position d tragen hohe hydrophobe Stabilisierungsenergien bei, und sind für die Dimerbildung wichtig (Krystek et al., Int. J. Peptide Res. 38:229, 1991). Lovejoy et al. berichten jüngst die Synthese eines dreisträngigen α-helikalen Bündels, in welchem die Helices von oben-oben-nach unten verlaufen (Science 259:1288, 1993). Ihre Studien bestätigten, dass die hydrophobe Stabilisierungsenergie die Hauptantriebskraft für die Bildung von Coiled Coils aus helikalen Monomeren bereitstellt und dass elektrostatische Interaktionen zu der Stöchiometrie und Geometrie von Coiled Coils beitragen.

[0033] Leucin-Zipper Sequenzen, die von den fos und jun Proteinen abgeleitet sind, können in der Bildung von bispezifischen Fusionsproteinen verwendet werden, wie durch Kostelny et al., J. Immunol. 148:1547, 1992; O'Shea et al., Science 245:646, 1989; und Turner und Tjian, Science 243:1689, 1989 beschrieben wurde. Leucin-Zipper-Domänen wurden in dem Hefe-Transkriptionsfaktor GCN4 und einem hitzestabilen DNA-Bindungsprotein gefunden, die in der Rattenleber gefunden werden (C/EBP; Landschulz et al., Science 243:1681, 1989). Die fusogenen Proteine von mehreren unterschiedlichen Viren, einschließlich Paramyxovirus, Coronavirus, Masernvirus und vielen Retroviren, besitzen auch Leucin-Zipper-Motive (Buckland und Wild, Nature, 338:547, 1989; Britton, Nature 353:394, 1991; Delwart und Mosialos, AIDS Research und Human Retroviruses 6:703, 1990). Die Leucin-Zipper-Domänen in diesen fusogenen viralen Proteinen sind in der Nähe der Transmembran-Region der Proteine, wo die Leucin-Zipper-Motive zu der oligomeren Struktur der fusogenen Proteine beitragen können.

[0034] Mehrere Studien haben darauf hingewiesen, dass konservierte Aminosäuren für individuelle Leucin-Reste ausgetauscht werden können, mit einer minimalen Abnahme der Fähigkeit, zu dimerisieren. Van Heekeren et al., berichteten, dass eine Anzahl von unterschiedlichen Aminosäuren für die Leucin-Reste in der Leucin-Zipper-Domäne von GCN4 ausgetauscht werden können, und dass einige GCN4 Proteine, die zwei Leucin-Substitutionen enthalten, schwach aktiv waren (Nucl. Acids Res. 20:3721, 1992). Aminosäure-Substitutionen in den a und d-Resten eines synthetischen Peptids, die die GCN4 Leucin-Zipper-Domäne darstellen,

können auch die Oligomerisierung der Leucin-Zipper-Domäne ändern (Alber, Sixth Symposium of the Protein Society, San Diego, CA). Wenn alle Reste an der Position a zu Isoleucin geändert werden, bildet der Leucin-Zipper nach wie vor ein paralleles Dimer. Wenn, zusätzlich zu dieser Änderung, alle Leucin-Reste an der Position d ebenfalls zu Isoleucin geändert werden, bildet das resultierende Peptid spontan ein trimeres paralleles Coiled Coil in Lösung. Substituieren aller Aminosäuren an Position d mit Isoleucin und an Position a mit Leucin führt zu einem Peptid, welches tetramerisiert.

[0035] Die vorliegende Erfindung bietet gereinigte CD27L Polypeptide, sowohl rekombinant als nicht-rekombinant. Varianten und Derivate von nativen CD27L Proteinen, die die gewünschte biologische Aktivität beibehalten, sind ebenfalls innerhalb des Umfangs der vorliegenden Erfindung. CD27L Varianten können durch Mutationen von Nukleotidsequenzen erhalten werden, die native CD27L Polypeptide kodieren. Eine CD27L Variante, wie hierin bezeichnet, ist ein Polypeptid, das im Wesentlichen zu einem nativen CD27L homolog ist, welcher jedoch eine Aminosäuresequenz aufweist, die sich von der eines nativen CD27L (human, murin, oder anderen Säugetier-Spezies) aufgrund einer oder mehreren Deletionen, Insertionen oder Substitutionen unterscheidet.

[0036] Die variante Aminosäuresequenz ist vorzugsweise zu zumindest 80% identisch zu einer nativen CD27L Aminosäuresequenz, am meisten bevorzugt zu zumindest 90% identisch. Die prozentuelle Identität kann zum Beispiel durch Vergleichen der Sequenzinformation unter Verwendung des GAP Computer Programms, Version 6,0, bestimmt werden, welches von Devereux et al. (Nucl. Acids Res. 12:387, 1984) beschrieben ist und von der University of Wisconsin Genetics Computer Group (UWGCG) erhältlich ist. Das GAP Programm benutzt das Ausrichtungsverfahren von Needleman und Wunsch (J. mol. Biol. 48:443, 1970), wie von Smith und Waterman (Adv. Appl. Math. 2:482, 1981) überarbeitet wurde. In Kürze, das GAP Programm definiert Ähnlichkeiten als die Anzahl von ausgerichteten Symbolen (d.h. Nukleotide oder Aminosäuren), die ähnlich sind, dividiert durch die Gesamtanzahl von Symbolen in der kürzeren der zwei Sequenzen. Die bevorzugten Standardparameter für das GAP-Programm schließen ein: (1) eine unäre Vergleichsmatrix (die einen Wert von 1 für Identitäten und 0 für Nicht-Identitäten enthält) für Nukleotide und die gewichtete Vergleichsmatrix von Gribskov und Burgess, Nucl. Acids Res. 14:6745, 1986, wie von Schwartz und Dayhoff, Hrsg., Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, S. 353-358, 1979, beschrieben; (2) eine Strafe von 3,0 für jede Lücke und eine zusätzliche Strafe von 0,10 für jedes Symbol in jeder Lücke; und (3) keine Strafe für Endlücken.

[0037] Änderungen der nativen Sequenz können durch eine beliebige von einer Reihe von bekannten Techniken erzielt werden. Mutationen können an bestimmten Stellen durch das Synthetisieren von Oligonukleotiden eingefügt werden, die eine mutierte Sequenz enthalten, flankiert von Restriktionsstellen, welche die Ligation an Fragmente der nativen Sequenz ermöglichen. Nach der Ligation kodiert die resultierende rekonstruierte Sequenz ein Analogon, das die gewünschte Aminosäure-Insertion, Substitution oder Deletion aufweist.

[0038] Alternativ dazu können Oligonukleotid-gerichtete, ortsspezifische Mutageneseverfahren angewendet werden, um ein geändertes Gen bereitzustellen, wobei vorbestimmte Kodons gemäß der benötigten Substitution, Deletion oder Insertion geändert werden können. Beispielhafte Verfahren zur Durchführung der oben genannten Änderungen werden von Walder et al. (Gene 42:133, 1986); Bauer et al. (Gene 37:73, 1985); Craik (BioTechniques, January 1985, 12-19); Smith et al. (Genetic Engineering: Principles and Methods, Plenum Press, 1981); und in den US-Patentschriften Nr. 4,518,584 und 4,737,462 offenbart, die hierin durch Bezugnahme aufgenommen sind.

[0039] Varianten können konservativ substituierte Sequenzen enthalten, das heißt, dass ein bestimmter Aminosäurerest durch einen Rest ersetzt wird, der ähnliche physikochemische Eigenschaften aufweist. Beispiele für konservative Substitutionen schließen die Substitution eines aliphatischen Rests durch einen anderen ein, wie beispielsweise Ile, Val, Leu oder Ala durch einen anderen, oder Substitutionen eines polaren Rests durch einen anderen, wie zum Beispiel zwischen Lys und Arg; Glu und Asp; oder Gln und Asn. Andere konservative Substitutionen dieser Art, zum Beispiel Substitutionen ganzer Regionen mit ähnlichen Hydrophobizitätseigenschaften sind weithin bekannt.

[0040] CD27L kann auch modifiziert werden, um CD27L-Derivate durch Bilden kovalenter oder aggregierender Konjugate mit anderen chemischen Anteilen wie Glycosylgruppen, Lipiden, Phosphaten, Acetylgruppen und dergleichen zu erzeugen. Kovalente Derivate von CD27L können durch Verknüpfen der chemischen Anteile zu funktionellen Gruppen auf CD27L-Aminosäure-Seitenketten oder am N-Terminus oder C-Terminus eines CD27L-Polypeptids oder der extrazellulären Domäne davon hergestellt werden. Andere Derivate von CD27L, die innerhalb des Schutzumfangs dieser Erfindung liegen, schließen kovalente oder aggregierende

Konjugate von CD27L oder seinen Fragmenten mit anderen Proteinen oder Polypeptiden ein, wie zum Beispiel durch Synthese in rekombinanter Kultur als N-terminale oder C-terminale Fusionen. Zum Beispiel kann das Konjugat eine Signal- oder Leit-Polypeptidsequenz (z.B. die α-Faktor-Leitsequenz von Saccharomyces) am N-Terminus eines CD27L-Polypeptids enthalten. Das Signal- oder Leitpeptid lenkt den Transfer des Konjugats co-translational oder post-translational von seiner Synthesestelle zu einer Stelle innerhalb oder außerhalb der Zellmenbran oder Zellwand. CD27L-Polypeptidfusionen können Peptide aufweisen, welche hinzugefügt werden, um die Reinigung und Identifikation von CD27L zu erleichtern. Zu solchen Peptiden zählen zum Beispiel poly-His oder die antigenen Identifikationspeptide, die in der US-Patentschrift Nr. 5,011,912 und in Hopp et al., Bio/Technology 6:1204, 1988 beschrieben sind. Ein solches Peptid ist das Flag®-Peptid, Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys (DYKDDDDK), das stark antigen ist und mit einem Epitop ausgestattet ist, das mittels eines spezifischen monoklonalen Antikörpers reversibel gebunden ist, wodurch eine schnelle Prüfung und eine einfache Reinigung des exprimierten rekombinanten Proteins ermöglicht wird. Diese Sequenz wird spezifische durch bovine mucosale Enterokinase an dem Rest unmittelbar im Anschluss an das Asp-Lys-Paar gespalten. Fusionsproteine, die mit diesem Peptid begrenzt sind, können auch gegenüber einem intrazellulären Abbau in E. coli resistent sein. Ein Maus-Hybridom mit der Bezeichnung 4E11 erzeugt einen monoklonalen Antikörper, der das Peptid DYKDDDDK bei Vorhandensein bestimmter zweiwertiger Metall-Kationen bindet (wie in dem US-Patent 5,011,912 beschrieben) und wurde bei der American Type Culture Collection unter der Hinterlegungsnummer HB 9259 hinterlegt.

[0041] Die vorliegende Erfindung schließt ferner CD27L Polypeptide mit oder ohne dazugehöriger Glycosylierung mit nativem Muster ein. CD27L, das in Hefe oder Säugetier-Expressionssystemen (z.B. COS-7-Zellen) exprimiert ist, kann einem nativen CD27L Polypeptid in Bezug auf das Molekulargewicht und das Glycosylierungsmuster ähnlich sein oder sich von diesem deutlich unterscheiden, je nachdem, welches Expressionssystem gewählt wurde. Die Expression von CD27L Polypeptiden in bakteriellen Expressionssystemen, wie E. coli, stellt nicht-glycosylierte Moleküle bereit.

[0042] DNA Konstrukte, die verschiedene Additionen oder Substitutionen von Aminosäureresten oder Sequenzen, oder Deletionen von terminalen oder internen Resten oder Sequenzen kodieren, die für die biologische Aktivität oder Bindung nicht benötigt werden, können hergestellt werden. Zum Beispiel, können N-Glycosylierungsstellen in der CD27L extrazellulären Domäne modifiziert werden, um Glycosylierung auszuschließen, was die Expression eines homogenen, reduzierten Kohlenhydrat-Analogons in Hefeexpressionssystemen ermöglicht. N-Glycosylierungsstellen in eukaryotischen Polypeptiden sind durch eine Aminosäure-Dreiergruppe Asn-X-Y gekennzeichnet, wobei X irgendeine Aminosäure mit Ausnahme von Pro ist, und Y für Ser oder Thr steht. Geeignete Modifikationen an der Nukleotidsequenz, welche diese Dreiergruppen codiert, führen zu Substitutionen, Additionen oder Deletionen, die das Anheften von Kohlenhydratresten an der Asn-Seitenkette verhindern. Bekannte Verfahren für das Inaktivieren von N-Glycosylierungsstellen in Proteinen schließen jene Verfahren ein, die in der US-Patentschrift 5,071,972 und in EP 276,846 beschrieben sind. In einem anderen Beispiel können Sequenzen, die Cys-Reste codieren, die für die biologische Aktivität nicht wesentlich sind, geändert werden, um zu bewirken, dass die Cys-Reste entfernt oder durch andere Aminosäuren ersetzt werden, wodurch die Bildung von inkorrekten intramolekularen Disulfidbrücken bei Renaturierung verhindert wird. Andere Varianten werden durch Modifikation von benachbarten zweibasischen Aminosäureresten hergestellt, um die Expression in Hefesystemen zu verstärken, in denen KEX2-Proteaseaktivität vorhanden ist. EP 212,914 offenbart die Verwendung von ortsspezifischer Mutagenese, um KEX2-Proteaseverarbeitungsstellen in einem Protein zu inaktivieren.

[0043] Natürlich vorkommende CD27L Varianten sind ebenfalls durch die vorliegende Erfindung umfasst. Beispiele von solchen Varianten sind Proteine, die von abwechselnden mRNA Spleißvorgängen (da CD27L durch ein Multi-Exon-Gen kodiert ist) oder von der proteolytischen Spaltung des CD27L Proteins herrühren, wobei die CD27L Bindungseigenschaft aufrechterhalten wird. Abwechselndes Spleißen von mRNA kann ein verkürztes, jedoch biologisch aktives CD27L Protein ergeben, wie zum Beispiel eine natürlich vorkommende, lösliche Form des Proteins. Zu Variationen, die der Proteolyse zugeschrieben werden können, zählen, zum Beispiel, Unterschiede in den N- oder C-Termini bei der Expression in unterschiedlichen Arten von Wirtszellen, aufgrund der proteolytischen Entfernung von einer oder mehreren terminalen Aminosäuren von dem CD27L Protein.

[0044] Nukleinsäuresequenzen innerhalb des Umfangs der vorliegenden Erfindung umfassen isolierte DNA und RNA Sequenzen, die an die hierin offenbarten CD27L Nukleotidsequenzen unter Bedingungen mäßiger Stringenz oder hoher Stringenz hybridisieren und die biologisch aktiven CD27L kodieren. Hybridisierungsbedingungen mäßiger Stringenz beziehen sich auf Bedingungen, die z.B. in Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. Ausgabe, Band 1, S. 101-104, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) beschrieben sind. Bedingungen mäßiger Stringenz, wie in Sambrook et al. definiert, umfassen die Verwendung einer

Vorwaschlösung von 5 × SSC, 0,5% SDS, 1,0 mM EDTA (pH 8,0) und Hybridisierungsbedingungen von etwa 55°C, 5 × SSC, über Nacht. Bedingungen hoher Stringenz umfassen höhere Temperaturen von Hybridisierung und Waschung. Der Fachmann wird erkennen, dass die Temperatur und Waschlösung-Salzkonzentration eingestellt werden können, wie gemäß von Faktoren, wie der Länge der Sonde, notwendig ist.

[0045] Die vorliegende Erfindung bietet somit isolierte DNA Sequenzen, die biologisch aktives CD27L kodieren, ausgewählt aus: (a) DNA, die von der kodierenden Region eines nativen Säugetier CD27L Gens abgeleitet ist (z.B., cDNA, die von der kodierenden Region der murinen oder humanen CD27L cDNA abgeleitet ist, die wie in Beispiel 4 beschrieben isoliert wurde; (b) DNA, die in der Lage ist, mit einer DNA von (a) unter mäßig stringenten Bedingungen zu hybridisieren und welche biologisch aktiven CD27L kodiert; und (c) DNA, die als Folge des genetischen Kodes zu einer DNA, die in (a) oder (b) definiert ist, degeneriert ist und welche biologisch aktiven CD27L kodiert.

[0046] Varianten, die die erforderliche Fähigkeit besitzen, an CD27 zu binden, können durch jede geeignete Untersuchung identifiziert werden. Biologische Aktivität von CD27L kann, zum Beispiel, durch Kompetition um die Bindung an die Ligandenbindungsdomäne von CD27 bestimmt werden (d.h. kompetitive Bindungsuntersuchung).

[0047] Eine Art einer Konkurrenzbindungsuntersuchung für ein CD27L Polypeptid verwendet einen radiomarkierten, löslichen humanen oder murinen CD27L und intakte Zellen, die Zelloberflächen CD27 exprimieren (z.B. Zelllinien, wie MP-1, die in Beispiel 2 beschrieben ist). Anstelle von intakten Zellen könnte lösliches CD27 (wie ein CD27/Fc-Fusionsprotein) substituiert werden, das an eine Festphase durch die Interaktion von Protein A oder Protein G mit der Fc-Region des Fusionsproteins gebunden ist. Eine andere Art von Konkurrenzbindungsuntersuchung benutzt radiomarkierte, lösliches CD27 wie ein CD27 Fc Fusionsprotein, und intakte Zellen, die CD27L exprimieren. Alternativ könnte löslicher CD27L an eine Festphase gebunden sein.

[0048] Konkurrenzbindungsuntersuchungen können unter Verwendung einer herkömmlichen Methodologie durchgeführt werden. Zum Beispiel kann radiomarkiertes CD27L verwendet werden, um mit einem mutmaßlichen CD27L Homologon zu konkurrieren, um die Bindungsaktivität gegen Oberflächen-gebundenes CD27 zu untersuchen. Qualitative Ergebnisse können durch kompetitive autoradiographische Plattenbindungsuntersuchungen erhalten werden, oder Scatchard-Diagramme können benutzt werden, um quantitative Ergebnisse zu erzeugen.

[0049] Konkurrenzbindungsuntersuchungen mit intakten Zellen, die CD27 exprimieren, können durch zwei Verfahren durchgeführt werden. In einem ersten Verfahren werden Zellen, die Zelloberflächen CD27 exprimieren, entweder in Suspension oder durch Anhaftung an Gewebekulturplatten gezüchtet. Adhärente Zellen können durch Behandlung mit einer 5 mM EDTA Behandlung für zehn Minuten bei 37°C entfernt werden. Bei einem zweiten Verfahren können transfizierte COS Zellen, die membrangebundenes CD27 exprimieren, verwendet werden. COS-Zellen oder eine andere Säugetierzelle, wie die CV-1/EBNA-Zelllinie, können mit menschlicher CD27cDNA in einem geeigneten Vektor transfiziert werden, um CD27 voller Länge mit einer extrazellulären Region zu exprimieren.

[0050] Alternativ kann lösliches CD27 an eine Festphase gebunden sein, wie eine Säulenchromatographie-Matrix oder ein ähnliches Substrat, das für die Analyse der Gegenwart eines nachweisbaren Anteils, wie ^{125}I, geeignet ist. Bindung an eine Festphase kann zum Beispiel, durch Erhalten eines CD27/Fc-Fusionsproteins und Binden dieses an eine Protein A- oder Protein G-enthaltende Matrix erreicht werden.

[0051] Die Bindungseigenschaften von CD27L (einschließlich von Varianten) können ebenfalls unter Verwendung des konjugierten, löslichen CD27 (zum Beispiel, ^{125}I-CD27/Fc) in Konkurrenzuntersuchungen, ähnlich zu den oben beschriebenen, bestimmt werden. In diesem Fall werden jedoch intakte Zellen, die CD27L exprimieren oder löslicher CD27L, der an ein festes Substrat gebunden ist, verwendet, um das Ausmaß zu messen, zu welchem eine Probe, die eine mutmaßliche CD27 Variante enthält, um die Bindung von einem konjugierten, löslichen CD27 an CD27L konkurriert.

[0052] Der CD27L der vorliegenden Erfindung kann in Bindungsuntersuchungen verwendet werden, um Zellen, die CD27 exprimieren, zu ermitteln. Zum Beispiel kann CD27L oder eine extrazelluläre Domäne oder ein Fragment davon an einen nachweisbaren Anteil, wie ^{125}I, konjugiert werden. Die Radiomarkierung mit ^{125}I kann durch jede von vielen Standardmethodologien durchgeführt werden, die ein funktionelles ^{125}I-CD27L Molekül ergeben, das mit einer hochspezifischen Aktivität markiert ist. Alternativ kann ein anderer detektierbarer Anteil, wie ein Enzym, das eine kolorimetrische oder fluorometrische Reaktion katalysieren kann, Biotin oder Avidin

verwendet werden. Zellen, die auf CD27-Expression untersucht werden, können mit markiertem CD27L in Kontakt gebracht werden. Nach der Inkubation wird ungebundener, markierter CD27L entfernt und die Bindung wird unter Verwendung des nachweisbaren Anteils gemessen.

[0053] CD27L Polypeptide können auch als Oligomere, wie Dimere oder Trimere existieren. Oligomere sind durch Disulfidbindungen, die zwischen Cysteinresten auf unterschiedlichen CD27L Polypeptiden gebildet sind, verbunden. In einer Ausführungsform der Erfindung wird ein CD27L Dimer durch Fusionieren von CD27L an die Fc-Region eines Antikörpers (z.B. IgG1) auf eine Weise erzeugt, die mit der Bindung von CD27L an die CD27 Ligandenbindungsdomäne nicht interferiert. Das Fc Polypeptid wird vorzugsweise an den N-Terminus eines löslichen CD27L (welches nur die extrazelluläre Domäne aufweist) fusioniert. Ein Verfahren für das Isolieren von DNA, die eine IgG1Fe Region kodiert, für die Verwendung bei der Herstellung von Fusionsproteinen ist in Beispiel 1 später dargestellt. Eine Genfusion, die das CD27L/Fc-Fusionsprotein kodiert, wird in einen geeigneten Expressionsvektor eingefügt. Den CD27L/Fc-Fusionsproteinen wird ermöglicht, sich ganz wie Antikörper-Moleküle zusammenzufinden, woraufhin sich zwischen den Ketten der Fc-Polypeptide Disulfid-Bindungen ausbilden, die zu einem bivalenten CD27L führen. Wenn Fusionsproteine sowohl mit schweren als auch mit leichten Ketten eines Antikörpers hergestellt werden, ist es möglich, ein CD27L Oligomer mit nicht weniger als vier CD27L-extrazellulären Regionen zu bilden. Alternativ können zwei lösliche CD27L Domänen mit einem Peptidlinker verbunden werden, wie die im U.S. Patent 5,073,627 beschriebene $Gly_4SerGly_5Ser$ Linker-Sequenz.

[0054] Die vorliegende Erfindung bietet Oligomere der CD27L extrazellulären Domänen oder Fragmente davon, die durch Disulfid-Interaktionen verbunden sind, oder als Fusionspolymere mit oder ohne Spacer-Aminosäure-Bindungsgruppen exprimiert sind. Zum Beispiel kann ein Dimer CD27L Molekül durch eine IgG Fc Region Bindungsgruppe verbunden sein.

[0055] Die vorliegende Erfindung bietet rekombinante Expressionsvektoren für die Expression von CD27L, und mit den Expressionsvektoren transformierte Wirtszellen. Jedes geeignete Expressionssystem kann verwendet werden. Die Vektoren umfassen eine CD27L DNA Sequenz (eine synthetische oder cDNA-abgeleitete DNA Sequenz, die ein CD27L Polypeptid kodiert), die mit geeigneten transkriptionalen oder translationalen regulatorischen Nukleotidsequenzen wirkungsmäßig verbunden sind, wie jenen, die von einem Säugetier-, mikrobiellen, viralen oder Insektengen abgeleitet sind. Beispiele von regulatorischen Sequenzen umfassen transkriptionale Promotoren, Operatoren, oder Verstärker, eine mRNA Ribosomenbindungsstelle, und geeignete Sequenzen, die die Transkription- und Translation-Initiierung und Termination steuern. Nukleotidsequenzen sind wirkungsmäßig verbunden, wenn die regulatorische Sequenz die CD27L DNA Sequenz funktionell betrifft. Somit ist eine Promotor-Nukleotidsequenz mit einer CD27L DNA Sequenz wirkungsmäßig verbunden, wenn die Promotor-Nukleotidsequenz die Transkription der CD27L DNA Sequenz steuert. Die Fähigkeit in der gewünschten Wirtszelle zu replizieren, die üblicherweise durch einen Replikationsursprung verliehen wird, und ein Selektionsgen, durch welches Transformanten identifiziert werden können, können zusätzlich in den Expressionsvektor eingebaut werden.

[0056] Zusätzlich können Sequenzen, die geeignete Signalpeptide kodieren, die für das CD27L Gen nicht nativ sind, in die Expressionsvektoren eingebaut werden. Zum Beispiel kann eine DNA Sequenz für ein Signalpeptid (Leitsequenz) im Rahmen mit der CD27L Sequenz fusioniert werden, so dass das CD27L anfänglich als ein Fusionsprotein translatiert ist, welches das Signalpeptid aufweist. Ein Signalpeptid, das in den beabsichtigen Wirtszellen funktionell ist, verstärkt die extrazelluläre Sekretion des CD27L Polypeptids. Das Signalpeptid wird von dem CD27L Polypeptid bei der Sekretion von CD27L aus der Zelle abgespalten.

[0057] Geeignete Wirtszellen für die Expression von CD27L-Polypeptiden schließen Prokaryoten, Hefe oder höhere eukaryotische Zellen ein. Geeignete Klonierungs- und Expressionsvektoren zur Verwendung mit zellularen bakteriellen, fungalen, Hefe- und Säugetierwirten werden zum Beispiel in Pouwels et al. Cloning Vectors: A Laboratory Manual, Elsevier, New York (1985) beschrieben. Zellfreie Translationssysteme können ebenfalls verwendet werden, um CD27L-Polypeptide unter Verwendung von RNAs zu erzeugen, die von hierin offenbarten DNA-Konstrukten abgeleitet sind.

[0058] Zu den Prokaryoten zählen Gram-negative und Grampositive Organismen, zum Beispiel E. coli oder Bacilli. Geeignete prokaryotische Wirtszellen für die Transformation schließen zum Beispiel E. coli, Bacillus subtilis, Salmonella typhimurium und verschiedene andere Spezies innerhalb der Gattungen von Pseudomonas, Streptomyces und Staphylococcus ein. In einer prokaryotischen Wirtszelle, wie E. Coli, kann ein CD27L-Polypeptid einen N-terminalen Methioninrest enthalten, um die Expression des rekombinanten Polypeptids in der prokaryotischen Wirtszelle zu erleichtern. Das N-terminale Met kann von dem exprimierten re-

kombinanten CD27L-Polypeptid abgespalten werden.

[0059] Expressionsvektoren für die Verwendung in prokaryotischen Wirtszellen weisen im Allgemeinen ein oder mehrere phänotypisch selektierbare Markergene auf. Ein phänotypisch selektierbares Markergen ist zum Beispiel ein Gen, welches ein Protein kodiert, dann eine Antibiotikaresistenz verleiht, oder das ein autotrophes Bedürfnis bereitstellt. Zu Beispielen von nützlichen Expressionsvektoren für prokaryotische Wirtszellen zählen jene, die von kommerziell erhältlichen Plasmiden abgeleitet sind, wie der Klonierungsvektor pBR322 (ATCCC 37017). pBR322 enthält Gene für Ampicillin und Tetracyclin-Resistenz und bietet somit einfache Mittel zum Identifizieren von transformierten Zellen. Ein geeigneter Promotor und eine CD27L DNA Sequenz werden in den pBR322 Vektor eingefügt. Andere kommerziell erhältliche Vektoren umfassen zum Beispiel pKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden) und pGEM 1 (Promega Biotec, Madison, WI, USA).

[0060] Für rekombinante prokaryotische Wirtszell-Expressionsvektoren häufig verwendete Promotorsequenzen umfassen β-Lactamase (Penicillinase), Lactose Promotorsystem (Chang et al., Nature 275:615, 1978; und Goeddel et al., Nature 281:544, 1979), Tryptophan (trp) Promotorsystem (Goeddel et al., Nucl. Acids Res. 8:4057, 1980; und EP-A-36776) und Tac Promoter (Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, S. 412, 1982). Ein besonders nützliches prokaryotisches Wirtszell-Expressionssystem verwendet ein Phage λ-P_L Promoter und eine cI857ts thermolabile Repressorsequenz. Von der American Type Culture Collection erhältliche Plasmidvektoren, die Derivate des λP_L Promotors aufweisen, umfassen Plasmid pHUB2 (resident in E. coli Stamm JMB9 (ATCC 37092)) und pPLc28 (resident in E. coli RR1 (ATCC 53082)).

[0061] CD27L kann alternativ dazu in Hefe-Wirtszellen exprimiert werden, vorzugsweise von der Gattung der Saccharomyces (z.B. S. cerevisiae). Andere Hefegattungen wie Pichia, oder Kluyveromyces können ebenfalls verwendet werden. Hefevektoren werden oft eine Replikationsursprungssequenz von einem 2μ-Hefeplasmid, eine autonom replizierende Sequenz (ARS), eine Promotorregion, Sequenzen für eine Polyadenylierung, Sequenzen für die Transkriptionstermination und ein selektierbares Markierungsgen enthalten. Geeignete Promotorsequenzen für Hefevektoren schließen unter anderem Promotoren für Metallothionein, 3-Phosphoglyceratkinase (Hitzeman et al., J. Biol. Chem. 255:2073, 1980) oder andere glycolytische Enzyme (Hess et al., J. Adv. Enzyme Reg. 7:149, 1968; und Holland et al., Biochem. 17:4900, 1978) wie Enolase, Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, Hexokinase, Pyruvatdecarboxylase, Phosphofructokinase, Glucose-6-phosphat-Isomerase, 3-Phosphoglycerat-Mutase, Pyruvatkinase, Triosephosphatisomerase, Phosphoglucoseisomerase und Glucokinase ein. Andere geeignete Vektoren und Promotoren zur Verwendung in der Hefeexpression werden ferner in Hitzeman, EPA-73,657 beschrieben. Eine weitere Alternative ist der Glucose-reprimierbare ADH2-Promotor, der von Russell et al. (J. Biol. Chem. 258:2674, 1982) und Beier et al. (Nature, 300:724, 1982) beschrieben wird. Shuttle-Vektoren, die sowohl in Hefe als auch in E. coli replizierbar sind, können konstruiert werden, indem DNA-Sequenzen aus pBR322 zur Selektion und Replikation in E. coli (Amp^r Gen und Replikationsursprung) in die oben beschriebenen Hefevektoren eingefügt werden.

[0062] Die Hefe-α-Faktor-Leadersequenz kann verwendet werden, um die Sekretion des CD27L-Polypeptids zu steuern. Die α-Faktor-Leadersequenz wird oft zwischen der Promotorsequenz und der Strukturgensequenz eingefügt. Siehe z.B. Kurjan et al., Cell 30:933, 1982; und Bitter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:5330, 1984. Andere Leadersequenzen, die zur Erleichterung der Sekretion von rekombinanten Polypeptiden aus Hefewirten geeignet sind, sind den Fachleuten bekannt. Eine Leadersequenz kann in der Nähe ihres 3'-Endes modifiziert werden, um eine oder mehrere Restriktionsstellen zu enthalten. Dies erleichtert die Fusion der Leadersequenz an das Strukturgen.

[0063] Hefetransformationsprotokolle sind den Fachleuten bekannt. Ein solches Protokoll wird von Hinnen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:1929, 1978 beschrieben. Das Hinnen et al. Protokoll selektiert für Trp^+ Transformanten in einem selektiven Medium, wobei das selektive Medium aus 0,67% Hefestickstoffbase, 0,5% Casaminosäuren, 2% Glucose, 10 μg/ml Adenin und 20 μg/ml Uracil besteht.

[0064] Hefewirtszellen, die durch Vektoren transformiert sind, welche eine ADH2-Promotorsequenz enthalten, können, um die Expression zu induzieren in einem „reichen" Medium gezüchtet werden. Ein Beispiel eines reichen Mediums ist ein Medium, das aus 1% Hefeextrakt, 2% Pepton und 1% Glucose, ergänzt durch 80 μg/ml Adenin und 80 μg/ml Uracil, besteht. Die De-Repression des ADH2-Promotors tritt ein, wenn Glucose in dem Medium erschöpft ist.

[0065] Es könnten auch Säugetier- oder Insekten-Wirtszellkultursysteme verwendet werden, um rekombinante CD27L Polypeptide zu exprimieren. Baculovirussysteme zur Erzeugung heterologer Proteine in Insektenzel-

len werden von Luckow und Summers, Bio/Technology 6:47 (1988) untersucht. Etablierte Zelllinien mit Säugetierursprung können auch verwendet werden. Beispiele für geeignete Säugetier-Wirtszelllinien schließen die COS-7-Linie von Affennierenzellen (ATCC CRL 1651) (Gluzman et al., Cell 23:175, 1981), L-Zellen, C127-Zellen, 3T3-Zellen (ATCC CCL 163), Chinesische Hamstereierstockzellen (CHO), HeLa-Zellen und BHK (ATCC CRL 10)-Zelllinien, sowie die CV-1/EBNA-1-Zelllinie ein, die aus der afrikanischen grünen Meerkatzen-Nierenzellinie CV1 (ATCC CCL 70) gewonnen wird, so wie von McMahan et al. (EMBO J. 10:2821, 1991) beschrieben ist.

[0066] Transkriptionale und translationale Steuersequenzen für Säugetierwirtszellen-Expressionsvektoren können aus viralen Genomen ausgeschnitten werden. Häufig verwendete Promotorsequenzen und Verstärkersequenzen werden aus dem Polyomavirus, Adenovirus 2, Simian Virus 40 (SV40) und dem humanen Cytomegalievirus gewonnen. DNA-Sequenzen, die aus dem SV40-Viralgenom gewonnen werden, zum Beispiel der SV40-Ursprung, der frühe und späte Promotor, Verstärker, Spleiß- und Polyadenylierungsstellen können verwendet werden, um andere genetische Elemente für die Expression einer Sequenz eines Strukturgens in einer Säugetierwirtszelle bereitzustellen. Virale frühe und späte Promotoren sind besonders nützlich, weil beide leicht aus einem viralen Genom als Fragment erhalten werden, das auch einen viralen Replikationsursprung enthalten kann (Fiers et al., Nature 273:113, 1978). Kleinere oder größere SV40-Fragmente können ebenfalls verwendet werden, vorausgesetzt, die ungefähr 250 bp Sequenz, die sich von der Hind III-Stelle zur BgII-Stelle erstreckt, die sich in der SV40 viralen Replikationsursprungsstelle befindet, ist eingeschlossen.

[0067] Beispielhafte Expressionsvektoren zur Verwendung in Säugetierwirtszellen können so konstruiert werden wie von Okayama und Berg (Mol. Cell. Biol. 3:280, 1983) offenbart. Ein nützliches System für stabile Hochexpression von Säugetier-cDNAs in C127 Mäuse-Mamma-Epithelzellen kann im Wesentlichen so wie von Cosman et al. (Mol. Immunol. 23:935, 1986) beschrieben konstruiert werden. Ein nützlicher Hochexpressionsvektor, PMLSV N1/N4, beschrieben von Cosman et al., Nature 312:768, 1984, wurde als ATCC 39890 hinterlegt. Zusätzliche nützliche Säugetierexpressionsvektoren werden in EP-A-0367566 und in der US Patentanmeldung Nr. 07/701.415, eingereicht am 16. Mai 1991, beschrieben, die hiermit durch Bezugnahme aufgenommen sind. Die Vektoren können aus Retroviren gewonnen werden. Für die Expression eines TypII Proteins, dem ein native Signalsequenz fehlt, kann eine heterologe Signalsequenz hinzugefügt werden, wie die Signalsequenz für Interleukin-7 (IL-7), beschrieben in der US-Patentschrift 4,965,195, oder die Signalsequenz für den Interleukin-2-Rezeptor, beschrieben in der US Patentanmeldung 06/626.667, eingereicht am 2. Juli 1984.

[0068] Die vorliegende Erfindung bietet im Wesentlichen homogenes CD27L Protein, welches durch rekombinante Expressionssysteme, wie oben beschrieben, hergestellt oder aus natürlich-vorkommenden Quellen gereinigt werden kann. Das CD27L kann im Wesentlichen zu Homogenität gereinigt werden, wie durch eine einzelne Proteinbande bei der Analyse durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) angezeigt wird.

[0069] In einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird CD27L aus einer zellulären Quelle unter Verwendung irgendeiner geeigneten Proteinreinigungstechnik gereinigt. Die Zellen können zum Beispiel aktivierte T-Lymphozyten aus einer Säugetier-Spezies von Interesse, wie die murine Zelllinie 7B9, die in den Beispielen 2 und 3 beschrieben ist, oder humane periphere Blut-T-Zellen sein.

[0070] Ein alternatives Verfahren zur Herstellung des CD27L-Proteins weist das Züchten einer Wirtszelle auf, die mit einem Expressionsvektor transformiert ist, der eine DNA-Sequenz enthält, welche CD27L codiert, unter Bedingungen, so dass CD27L exprimiert wird. Das CD27L-Protein wird dann in Abhängigkeit vom verwendeten Expressionssystem aus dem Kulturmedium oder den Zellextrakten gewonnen. Dem Fachmann wird klar sein, dass Verfahren zur Reinigung des rekombinanten CD27L in Abhängigkeit von Faktoren wie dem Typ der verwendeten Wirtszellen und in Abhängigkeit davon, ob das CD27L in das Kulturmedium ausgeschieden wird oder nicht, variieren werden.

[0071] Wenn zum Beispiel Expressionssysteme verwendet werden, welche das rekombinante Protein ausscheiden, kann das Kulturmedium zuerst mit Hilfe eines im Handel erhältlichen Proteinkonzentrationsfilters, zum Beispiel einer Amicon oder Millipore Pellicon Ultrafiltrationseinheit, konzentriert werden. Nach dem Konzentrationsschritt kann das Konzentrat auf eine Reinigungsmatrix wie ein Gelfiltrationsmedium aufgetragen werden. Alternativ dazu kann ein Anionenaustauschharz verwendet werden, zum Beispiel eine Matrix oder ein Substrat mit anhängenden Diethylaminoethyl (DEAE)-Gruppen. Die Matrizen können Acrylamid, Agarose, Dextran, Zellulose oder andere, bei der Proteinreinigung häufig verwendete Arten sein. Alternativ dazu kann ein Kationenaustauschschritt eingesetzt werden. Geeignete Kationenaustauscher schließen verschiedene unlösliche Matrizen ein, welche Sulfopropyl- oder Carboxymethylgruppen aufweisen. Sulfopropylgruppen werden

bevorzugt. Schließlich können ein oder mehrere Umkehrphasen-Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (RP-HPLC)-Schritte unter Verwendung von hydrophoben RP-HPLC-Medien (z. B. Silicagel mit anhängenden Methyl- oder anderen aliphatischen Gruppen) durchgeführt werden, um CD27L weiter zu reinigen. Einige oder alle der vorhergehenden Reinigungsschritte können in unterschiedlichen Kombinationen eingesetzt werden, um ein im Wesentlichen homogenes rekombinantes Protein bereitzustellen.

[0072] Es ist auch möglich, eine Affinitätssäule zu verwenden, welche die ligandenbindende Domäne von CD27 enthält, um exprimierte CD27L Polypeptide einer Affinitätsreinigung zu unterziehen. CD27L-Polypeptide können aus einer Affinitätssäule unter Verwendung eines hohen Salz-Eluierungspuffer entfernt werden und danach zur Verwendung in einen niedrigeren Salzpuffer dialysiert werden. Alternativ dazu kann eine Affinitätssäule einen Antikörper aufweisen, der CD27L bindet. Beispiel 5 beschreibt ein Verfahren zum Benutzten des CD27L-Proteins der vorliegenden Erfindung, um monoklonale Antikörper zu erzeugen, die gegen CD27L gerichtet sind.

[0073] Rekombinantes Protein, das in bakterieller Kultur erzeugt wird, wird für gewöhnlich durch anfängliches Zerreißen der Wirtszellen, Zentrifugation, Extraktion aus Zellpellets, im Fall eines unlöslichen Polypeptids, oder aus der überstehenden Flüssigkeit, im Fall eines löslichen Polypeptids, isoliert, gefolgt von einem oder mehreren Schritten der Konzentration, des Aussalzens, Ionenaustauschs, der Affinitätsreinigung oder Größenausschlusschromatographie. Schließlich kann die RP-HPLC für endgültige Reinigungsschritte verwendet werden. Mikrobielle Zellen können durch ein beliebiges, geeignetes Verfahren zerrissen werden, einschließlich eines Gefrier-Auftau-Zyklus, einer Beschallung, mechanischen Zerreißens oder der Verwendung von Zelllyse-Mitteln.

[0074] Transformierte Hefewirtszellen werden vorzugsweise benutzt, um CD27L als ein sezerniertes Polypeptid zu exprimieren. Dies vereinfacht die Reinigung. Das sezernierte rekombinante Polypeptid aus einer Hefewirtszell-Fermentation kann durch Verfahren gereinigt werden, die den Verfahren, die von Urdal et al. (J. Chromatog. 296:171, 1984) offenbart sind, analog sind. Urdal et al. beschreiben ein Verfahren, das zwei sequentielle, Umkehrphasen-HPLC-Schritte zur Reinigung von rekombinantem humanem IL-2 auf einer präparativen HPLC-Säule einschließt.

[0075] Die vorliegende Erfindung bietet weiters Gegensinn- oder Sinn-Oligonukleotide ein, welche eine Einzelstrang-Nukleinsäuresequenz (entweder RNA oder DNA) aufweisen, die imstande ist, an Ziel-CD27L-mRNA (Sinn) oder CD27L-DNA (Gegensinn)-Sequenzen zu binden. Gegensinn- oder Sinn-Oligonukleotide gemäß der vorliegenden Erfindung weisen ein Fragment der kodierenden Region von CD27L-cDNA auf. Ein solches Fragment enthält im Allgemeinen mindestens ungefähr 14 Nukleotide, vorzugsweise von ungefähr 14 bis ungefähr 30 Nukleotide. Die Fähigkeit ein Gegensinn- oder ein Sinn-Oligonukleotid basierend auf einer cDNA-Sequenz für ein bestimmtes Protein zu gewinnen, ist zum Bespiel in Stein und Cohen Cancer Res. 48:2659, 1988 und in van der Krol et al. BioTechniques 6:958, 1988 beschrieben.

[0076] Das Binden von Gegensinn- oder Sinn-Oligonukleotiden an Ziel-Nukleinsäuresequenzen führt zur Bildung von Doppelsträngen, welche die Translation (RNA) oder Transkription (DNA) durch eines von mehreren Mitteln blockieren, einschließlich verstärkter Degradierung der Doppelstränge, verfrühter Termination der Transkription oder Translation oder durch andere Mittel. Die Gegensinn-Oligonukleotide können daher verwendet werden, um die Expression von CD27L-Proteinen zu blockieren. Gegensinn- oder Sinn-Oligonukleotide weisen ferner Oligonukleotide auf, welche modifizierte Zuckerphosphodiester-Hauptketten (oder andere Zuckerverbindungen wie die in WO 91/06629 beschriebenen) aufweisen, und wobei die Zuckerverbindungen endogenen Nukleasen gegenüber resistent sind. Solche Oligonukleotide mit resistenten Zuckerverbindungen sind in vivo stabil (d. h. imstande, enzymatischer Degradierung zu widerstehen), behalten aber die Sequenzspezifizität, um an Ziel-Nukleotidsequenzen binden zu können. Andere Beispiele von Sinn- oder Gegensinn-Oligonukleotiden schließen jene Oligonukleotide ein, die kovalent mit organischen Anteilen wie jenen, die in WO 90/10448 beschrieben sind, und anderen Anteilen verbunden sind, welche die Affinität des Oligonukleotids für eine Ziel-Nukleinsäuresequenz, wie Poly-(L-Lysin) erhöhen. Außerdem können interkalierende Wirkstoffe, wie Ellipticin, und alkylierende Wirkstoffe oder Metallkomplexe an Sinn- oder Gegensinn-Oligonukleotide angeheftet werden, um die Bindungsspezifizitäten des Gegensinn- oder Sinn-Oligonukleotids für die Ziel-Nukleotidsequenz zu ändern. Gegensinn- oder Sinn-Oligonukleotide können in eine Zelle, welche die Ziel-Nukleinsäuresequenz enthält, durch ein beliebiges Gentransferverfahren eingeführt werden, einschließlich zum Beispiel $CaPO_4$-vermittelte DNA-Transfektion, Elektroporation oder durch Verwendung von Gentransfervektoren wie dem Epstein-Barr-Virus. Gegensinn- oder Sinn-Oligonukleotide werden in eine Zelle, welche die Ziel-Nukleinsäuresequenz enthält, vorzugsweise durch Einfügen des Gegensinn- oder Sinn-Oligonukleotids in einen geeigneten retroviralen Vektor eingefügt, wobei danach die Zelle mit dem Retrovirusvektor, der die eingefügte Se-

quenz enthält, entweder in vivo oder ex vivo in Kontakt gebracht wird. Geeignete retrovirale Vektoren umfassen – ohne darauf beschränkt zu sein – den Maus-Retrovirus M-MuLV, N2 (einem aus M-MuLV gewonnenem Retrovirus) oder die Doppelkopievektoren mit den Bezeichnungen DCT5A, DCT5B und DCT5C (siehe PCT-Anmeldung US 90/02656). Alternativ können andere Promotorsequenzen verwendet werden, um das Oligonukleotid zu exprimieren.

[0077] Sinn- oder Gegensinn-Oligonukleotide können in eine Zelle, welche die Ziel-Nukleotidsequenz enthält, auch durch Bilden eines Konjugats mit einem ligandbindenden Molekül eingeführt werden, wie in WO 91/04753 beschrieben. Geeignete ligandbindende Moleküle schließen – ohne darauf beschränkt zu sein – Zelloberflächenrezeptoren, Wachstumsfaktoren, andere Cytokine oder andere Liganden ein, welche an Zelloberflächenrezeptoren binden. Vorzugsweise führt die Konjugation des ligandbindenden Moleküls zu keiner wesentlichen Beeinträchtigung der Fähigkeit des ligandbindenden Moleküls, an sein entsprechendes Molekül oder seinen entsprechenden Rezeptor zu binden oder den Eintritt des Sinn- oder Gegensinn-Oligonukleotids oder seiner konjugierten Version in die Zelle zu blockieren.

[0078] Alternativ dazu kann ein Sinn- oder Gegensinn-Oligonukleotid in eine Zelle, welche die Ziel-Nukleinsäuresequenz enthält, durch Bildung eines Oligonukleotid-Lipidkomplexes eingeführt werden, wie in WO 90/10448 beschrieben. Der Sinn- oder Gegensinn-Oligonukleotid-Lipidkomplex wird vorzugsweise innerhalb der Zelle durch eine endogene Lipase dissoziiert.

[0079] Die folgenden Beispiele sind bereitgestellt, um bestimmte Ausführungsformen zu illustrieren und nicht um den Umfang der Erfindung einzuschränken.

Beispiel 1

Herstellung von löslichem CD27/Fc Fusionsprotein

[0080] Dieses Beispiel beschreibt die Konstruktion eines Vektors, der CD27/Fc kodiert, welcher ein lösliches CD27/Fc Fusionsprotein für die Verwendung beim Detektieren von cDNA Klonen, die ein CD27 Ligand (CD27L) kodieren, exprimiert. Ein cDNA Fragment, das die extrazelluläre Region (Ligandenbindungsdomäne) des menschlichen Rezeptors CD27 kodiert, wurde unter Verwendung der Polymerasekettenreaktion (PCR)-Techniken erhalten und basiert auf der von Camerini et al., J. Immunol. 147:3165, 1991, veröffentlichten Sequenz.

[0081] Die als eine Matrize in der PCR Reaktion verwendete CD27 cDNA wurde von D. Camerini erhalten und als eine Matrize in der PCR Reaktion verwendet. Der 5' Primer, der in der PCR Reaktion verwendet wurde, war ein einzelsträngiges Oligonukleotid (27-mer) mit der folgenden Sequenz:
SEQ ID NO: 3:
5'-ATAGCGGCCGCCTGGGCAGGGACCATG-3'

[0082] Dieser Primer weist eine Erkennungsstelle für die Restriktionsendonuklease NotI (unterstrichen) stromaufwärts einer Sequenz auf, die die Nukleotide 83-103 der CD27 Sequenz, die von Camerini et al. veröffentlicht wurde, bis zu dem N-terminalen Methionin (kodiert durch das Translationsinitiatorkodon ATG) enthält.

[0083] Der 3' Primer, der in der PCR Reaktion eingesetzt wurde, war ein einzelsträngiges Oligonukleotid (39mer) der Sequenz:

SEQ ID NO: 4

3'-GTGACCGGTGGGGTTTCTAGGGACCTCGGGTCTAGAGCG-5'

[0084] Dieser Primer weist eine Sequenz (Fettdruck) auf, die zu den Nukleotiden 629-652 (welche die Aminosäuren 157-164 kodieren) der CD27 Sequenz, die von Camerini er al., veröffentlicht ist, komplementär ist. Dieser Primer wurde so konstruiert, dass er die letzten 7 Aminosäuren der extrazelluären Domäne von CD27 eliminiert. Die Sequenz CTCGGG, die der CD27 Sequenz folgt, ist zu Kondons für Glu und Pro komplementär. Glu und Pro sind die ersten zwei Aminosäuren eines Antikörper Fc Fragments, das an den C-Terminus des CD27 Fragments fusioniert ist, wie später beschrieben ist. Der Primer positioniert auch eine Erkennungsstelle für die Restriktionsendonuklease BglII (unterstrichen) stromabwärts, für die Verwendung zum Anhängen einer DNA Sequenz, die den Rest des Fc-kodierenden Gens kodiert.

[0085] Die PCR Reaktion kann unter Verwendung irgendeiner geeigneten Prozedur ausgeführt werden, wie jene, die in Sarki et al., Science 239:487 (1988); in Recombinant DNA Methodology, Wu et al., Hrsg. Academic Press Inc., San Diego (1989), S. 189-196; und in PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Innis et al., Hrsg., Academic Press, Inc. (1990) beschrieben sind. Ein Beispiel einer geeignenten PCR Prozedur ist wie folgt. Alle Temperaturen sind in Grad Celsius. Die folgenden PCR Reagenzien werden zu einem 0,5 ml Eppendorf Mikrofugenröhrchen hinzugefügt: 10 µl 10 × PCR Puffer (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl, pH 8,3 bei 25°C, 25 mM $MgCl_2$ und 1 mg/ml Gelatine) (Perkins-Elmer Cetus, Norwalk, CN), 8 µl einer 2,5 mM Lösung, die jedes dNTP (2 mM dATP, 2 mM dCTP, 2 mM dGTP und 2 mM dTTP), enthält, 2,5 Einheiten (0,5 µl Standard 5000 Einheiten/ml Lösung) Taq DNA Polymerase (Perkins-Elmer Cetus), 1 ng Matrizen DNA, 100 Picomol von jedem Oligonukleotidprimer, und Wasser bis zu einem Endvolumen von 100 µl. Die Endmischung wird dann mit 100 µl Paraffinöl überlagert. PCR wird unter Verwendung eines DNA thermal Cycler (Ericomp, San Diego, CA) ausgeführt.

[0086] In einem bevorzugten Verfahren, wurde die Matrize bei 94°C für 5 Minuten denaturiert, gefolgt von 5 Zyklen von 94°C für 1 Minute (Denaturierung), 50°C für 1 Minute (Annealing) und 72°C für 1 Minute (Extension); gefolgt von 30 Zyklen 94°C für 1 Minute, 60°C für 1 Minute, und 72°C für 1 Minute, wobei der letzte Zyklus durch eine letztmalige Erweiterung bei 72°C für 7 Minuten gefolgt wird. Ein Aliquot der Produkte dieser PCR Reaktion wurde in einer zweiten PCR Reaktion unter Verwendung der gleichen Bedingungen reamplifiziert.

[0087] Das gewünschte DNA Fragment, das durch diese PCR Reaktion amplifiziert wurde, wies eine NotI Stelle stromaufwärts einer Sequenz auf, die die extrazelluläre Domäne von CD27 (jedoch die letzten sieben Aminosäuren deletiert, um die Cys Aminosäure zu entfernen), gefolgt von einer BglII Stelle kodiert. Die PCR Reaktionsprodukte wurden mit NotI und BglII verdaut und das gewünschte Fragment wurde durch Gelelektrophorese gereinigt. Die Entfernung der Cys-Aminosäure war notwendig, um die Expression des CD27/FC Fusionsproteins, das unten beschrieben ist, zu erleichtern.

[0088] Eine DNA Sequenz, die ein Antikörper Fc Fragment kodiert, die an das CD27-kodierende DNA Fragment fusioniert werden soll, wurde wie folgt hergestellt. DNA, die ein Einzelketten-Polypeptid kodiert, das von der Fc Region eines menschlichen IgG1 Antikörpers abgeleitet ist, wurde in die SpeI Stelle des pBLUESCRIPT SK® Vektors kloniert, welcher von Stratagene Cloning Systems, La Jolla, Kalifornien kommerziell erhältlich ist. Dieser Plasmidvektor ist in E. coli replizierbar und enthält ein Polylinker-Segment, das 21 einzigartige Restriktionsstellen umfasst. Eine einzigartige BglII Stelle wurde in der Nähe des 5' Ende der eingeführten Fc kodierenden Sequenz eingeführt.

[0089] Das durch die DNA kodierte Fc Polypeptid erstreckt sich von der N-terminalen Hinge-Region zu dem nativen C-Terminus, d.h. ist eine im Wesentlichen Antikörper Fc Region voller Länge. Fragmente der Fc Regionen, z.B. jene, die an dem C-terminalen Ende verkürzt sind, können ebenfalls eingesetzt werden. Die Fragmente enthalten vorzugsweise mehrere Cysteinreste (zumindest die Cysteinreste in der Hinge-Reaktion), um zu ermöglichen, dass sich Interketten-Disulfibindungen zwischen den Fc Polypeptid-Abschnitten von zwei getrennten CD27/Fc Fusionsproteinen bilden, was ein Dimer wie oben diskutiert bildet.

[0090] Der rekombinante Vektor, der die Fc Sequenz enthält, wird mit BglII (welches nur am 5' Ende spaltet) und NotI (welches den Vektor in der multiplen Klonierungsstelle stromabwärts des Fc cDNA Inserts spaltet) verdaut. Das Fc-kodierende Fragment (etwa 720 bp lang) wurde durch herkömmliche Verfahren unter Verwendung von LMT Agarosegel-Elektrophorese isoliert.

[0091] Das NotI/BglII CD27-kodierende DNA Fragment und das BglII/NotI Fc-kodierende DNA Fragment, die oben hergestellt wurden, wurde in einen Expressionsvektor mit der Bezeichnung pDC406 wie folgt ligiert. Plasmid pDC406, welches von McMahan et al. (EMBO J. 10:2821, 1991) beschrieben wurde, ist ein Expressionsvektor für die Verwendung in Säugetierzellen, ist aber auch in E. coli Zellen replizierbar.

[0092] pDC406 enthält Replikationsursprünge, die vom SV40, Epstein-Barr-Virus und pBR322 abgeleitet sind, und ist ein Derivat von HAV-EO, der von Dower et al., J. Immunol. 142:4314 (1989) beschrieben ist. pDC406 unterscheidet sich von HAV-EO durch die Deletion des Introns, welches in der Adenovirus 2 dreiteiligen Leitseqeunz in HAV-EO vorhanden ist. pDC406 wurde mit NotI verdaut, welches das Plasmid in der multiplen Klonierungsstelle, 3' neben der SalI Stelle, spaltet, dann mit Kalbsdarm alkalischer Phosphatase (CIAP) behandelt, um die Selbstligation zu verhindern.

[0093] Eine Dreiweg-Ligation, um den Vektor, Fc, und CD27 DNA Fragmente zu verbinden, wurde unter herkömmlichen Bedingungen ausgeführt, und E. coli Zellen wurden mit der Ligationsmischung transformiert. Von

einem Plasmid der gewünschten Größe, das aus E. colli Zellen gewonnen wurde, wurde gefunden, dass es das CD27/Fc Genfusionsinsert aufweist, jedoch in der falschen Orientierung für die Expression. Die CD27/Fc Genfusion wurde aus diesem rekombinanten Plasmid durch NotI Verdau herausgeschnitten und in den NotI-verdauten und CIAP behandelten pDC406 ligiert. E. coli Zellen wurden mit der Ligationsmischung transformiert. Ein rekombinantes Plasmid, das das Insert in der gewünschten Orientierung enthält, wurde isoliert. Die CD27 Sequenz wurde (im gleichen Leserahmen) an die stromabwärtige Fc Sequenz fusioniert.

[0094] Die CD27/Fc Fusionsmoleküle werden vorzugsweise in rekombinanten Säugetierzellkulturen synthetisiert, das sie im Allgemeinen zu groß und komplex sind, um durch prokaryotische Expressionsverfahren zu synthetisieren. Beispiele von geeigneten Säugetierzellen zum Exprimieren eines Rezeptor/Fc Fusionsproteins umfassen CV-1 Zellen (ATCC CCL 70) und COS-7 Zellen (ATCC CRL 1651), beide sind von Affennieren abgeleitet.

[0095] Das DNA Konstrukt pDC406/CD27/Fc wurde in die Affennieren Zelllinie CV-1/EBNA-1 (ATCC CRL 10478) transfiziert. In Säugetier-Wirtszellen, wie CV-1/EBNA-1, wird das CD27/Fc Fusionsprotein von dem HIV Transaktivierungsregion (TAR) Promotor exprimiert. Die CV-1/EBNA-1 Zelllinie wurde durch Transfektion der CV-1 Zelllinie (ATCC CCL 70) mit einem Gen, das das Epstein-Barr-Virus Kernantigen-1 (EBNA-1) kodiert, abgeleitet, welches EBNA-1, angetrieben von dem humanen CMV unmittelbaren-frühen Verstärker/Promotor, konstitutiv exprimiert, wie von McMahan et al., supra beschrieben. Das EBNA-1 Gen ermöglicht die episomale Replikation von Expressionsvektoren, wie pDC406, die den EBV Replikationsursprung enthalten.

[0096] CV-1/EBNA-1 Zellen, die mit dem pDC406/CD27/Fc Vektor transfiziert sind, wurden in Rollerflaschen kultiviert, um die transiente Expression des Fusionsproteins zu ermöglichen, welches in das Kulturmedium über das CD27 Signalpeptid sezerniert wird. Das CD27/Fc Fusionsprotein wurde durch Affinitätschromatographie gereinigt. In Kürze, ein Liter Kulturüberstand, der das CD27/Fc Fusionsprotein enthält, wurde durch Filtrieren des Überstandes (z.B. in einem 0,45 µ Filter) und Auftragen des Filtrats auf eine Protein G Affinitätssäule (Schleicher und Schuell, Keene, NH) gemäß den Herstellerangaben gereinigt.

[0097] Der Fc Abschnitt des Fusionsproteins wird durch das Protein G auf der Säule gebunden. Gebundenes Fusionsprotein wurde aus der Säule eluiert und die Reinheit auf einem Silber-gefärbten SDS Gel bestätigt.

Beispiel 2: Screening der Zelllinien auf Bindung von CD27

[0098] Dieses Beispiel beschreibt das Screenen von bestimmten Zelllinien auf die Fähigkeit, ein CD27/Fc Fusionsprotein zu binden. Die verwendete Screeninguntersuchung war ein zweistufiges Verfahren, das an Zellen gebundenes CD27/Fc Fusionsprotein, gefolgt von ^{125}I-Maus-Anti-Human Fc Antikörper, der an den Fc Abschnitt des CD27/Fc Fusionsprotein gebunden ist, einschließt. Jene Zelllinien, von denen gefunden wurde, dass sie in der Lage sind, CD27/Fc zu binden, wurden als Kandidaten für die Verwendung als Nukleinsäurequellen in dem Versuch betrachtet, CD27L zu klonieren.

[0099] Der Maus-Anti-Human Fc Antikörper wurde von Jackson Laboratories erhalten. Dieser Antikörper zeigte minimale Bindung an Fc Proteine, die an den Fcγ-Rezeptor gebunden sind. Der Antikörper wurde unter Verwendung des Chloramin T Verfahrens markiert. In Kürze, eine P6 Säule wurde gemäß den Herstellerangaben hergestellt. In einem Mikrofugenröhrchen wurden 10 µg Antikörper in 10 µl PBS aufgelöst, 2000 µCi von trägerfreiem Na^{125}I wurde hinzugefügt und die Lösung wurde gut gemischt. 15 µl einer frisch zubereiteten Lösung von Chloramin-T (32 µg/ml in 0,05 M Natriumphosphatpuffer (pH 7,2)) wurde dann hinzugefügt und die Mischung wurde für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Mischung wurde umgehend auf die P6 Säule aufgetragen. Der radiomarkierte Antikörper wurde dann aus der Säule durch Sammeln von 100-150 µl Eluatfraktionen eluiert. Bindungsmedium wurde zu den Peakfraktionen hinzugefügt, um das Gesamtvolumen jeder Fraktion auf 2 ml zu bringen. Die Radioiodinierung ergab spezifische Aktivitäten im Bereich von 5-10 × 10^{15} cpm/mmol Protein.

[0100] Die MP-1 Zelllinie wurde für die Verwendung beim Screenen auf Bindung von CD27/Fc erzeugt. MP-1 ist eine spontane Epstein Barr Virus (EBV)-transformierte B lymphoblastoide Zelllinie, die aus peripherem Blut mononuklearen Zellen, die von einem normalen Spender stammten, ausgewachsen wurden.

[0101] Nach zwei Wochen wurden proliferierende B Zellen zwei Klonierungsrunden mit 0,3 Zellen pro Kammer in RPMI Medium, das mit 10% Hitze-inaktiviertem fötalem Rinderserum, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin ergänzt ist, unterzogen. MP-1 Zellen werden von einem solchen Klon abgeleitet.

[0102] Die MP-1 Zelllinie wurde auf Bindung von CD27/Fc durch die folgende Prozedur gescreent. Etwa 2 × 10^6 Zellen wurden in 96-Kammerplatten kultiviert. 5 ml Bindungsmedium (RPMI 1640, das 25 mg/ml Rinderserumalbumin (BSA), 2 mg/ml Natriumazid, 20 mM Hepes pH 7,2 enthält) wurden zu den Zellen hinzugefügt und die Zellen wurden dann in der Gegenwart oder Abwesenheit von CD27/Fc für 1 Stunde bei 37°C unter leichtem Agitieren inkubiert. Die Zellen wurden aus der Mischung durch Zentrifugation der 96 Kammerplatten sedimentiert, mit PBS gewaschen, erneut zentrifugiert, und in Bindungsmedium resuspendiert. Die Zellen wurden dann mit dem ^{125}I-Maus-Anti-Human Fc Antikörper, der wie oben beschrieben hergestellt wurde, für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Zellen wurden auch mit ^{125}I-Maus-Anti Human Fc Antikörper in der Gegenwart eines Überschusses von unmarkiertem Anti-Human Fc Antikörper als eine Negativkontrolle inkubiert. Im Anschluss an eine einstündige Inkubation mit dem ^{125}I-Antikörper wurden die Zellen und ungebundener ^{125}I Antikörper durch das Phthalatöl-Trennungsverfahren getrennt, im Wesentlichen wie von Dower et al., J. Immunol. 132:751, 1984 beschrieben. Zell-gebundener und freier ^{125}I-Antikörper wurden auf einem Packard Autogamma-Zähler quantifiziert. MP-1 Zellen besaßen eine signifikante Anzahl von CD27L, die an der Zelloberfläche gebunden sind, was darauf hinweist, dass die MP-1 Zellen eine geeignete Quelle von mRNA für das Klonieren von CD27L cDNA sein können.

Beispiel 3: Konstruktion von cDNA Bibliothek

[0103] Dieses Beispiel beschreibt die Herstellung einer cDNA Bibliothek aus menschlichen MP-1 B Zellen für das Expressionsklonieren von menschlichem CD27L. Die Bibliothek-Konstruktionstechnik war im Wesentlichen ähnlich zu jener, die von Ausubel et al., Hrsg. Current Protocols In Molecular Biology, Band 1 (1987) beschrieben ist. Im Allgemeinen wurde Gesamt RNA aus 8M Guanidin HCl-lysierten MP-1 Zellkulturen unter Verwendung einer differentiellen Ethanolpräzipitation extrahiert und poly(A)$^+$ mRNA wurde isoliert und durch Oligo dT Zellulose-Chromatographie angereichert.

[0104] Doppelsträngige dDNA wurde aus einer RNA-Matrize hergestellt, und zwar im Wesentlichen wie von Gubler et al., Gene 25:263, 1983 beschrieben. Poly (A)$^+$ mRNA Fragmente wurden in RNA-cDNA Hybride unter Verwendung der Umkehrtranskriptase, die mit zufälligen Hexanukleotiden geprimed ist, umgewandelt. Die RNA-cDNA Hybride wurden dann in doppelsträngige cDNA Fragmente unter Verwendung der RNAase H in Kombination mit DNA Polymerase I umgewandelt. Die resultierende doppelsträngige cDNA wurde mittels T4 DNA Polymerase stumpfendig gemacht.

[0105] Die folgenden, nicht mit Kinase behandelten (d.h. nicht phosphororyliert) BglII Adapter

SEQ ID NO: 5

5'-GATCTTGGAACGAGACGACCTGCT-3' (24-mer)

SEQ ID NO: 6

3'-AACCTTGCTCTGCTGGACGA-5' (20-mer)

wurden an die 5' Enden der obigen stumpfendigen cDNA Duplexe unter Verwendung des Adaptorklonierungsverfahrens, das in Haymerle et al., Nucleic Acids Res. 14:8615, 1986 beschrieben ist, ligiert. Unter den beschriebenen Bedingungen wird nur das 24-mer Oligonukleotid (obere Strang) kovalent an die cDNA während der Ligationsreaktion binden. Die nicht-kovalent gebundenen Adapter (einschließlich des komplementären 20-mer Oligonukleotids, das oben beschreiben ist, und jeder unligierte Adapter) wurden durch Gelfiltrationschromatographie bei 65°C entfernt, was nicht-selbst komplementäre Überhänge von 24 Nukleotiden auf den cDNA Termini hinterlässt.

[0106] Die adaptierte cDNA wurde in pDC303, einem Säugetierexpressionsvektor eingeführt, der auch in E. coli repliziert. pDC303 wurde aus pDC201 (einem Derivat von pMLSV, zuvor von Cosman et al., Nature 312:768, 1984 beschrieben), SV40 und Zytomegalievirus DNA assembliert und weist, in Sequenz mit der Richtung der Transkription vom Replikationsursprung, die folgenden Komponenten auf: (1) SV40 Sequenzen von Koordinaten 5171-270, die den Replikationsursprung, Enhancer-Sequenzen und frühe und später Promotoren enthält; (2) Cytomegalievirus promotor und Enhancer-Regionen (Nukleotide 671-63 von der Sequenz, die von Boechart et al. (Cell 41:521, 1985) veröffentlicht wurde; (3) Adenovirus-2 aus Koordinaten 5779-6079, die das erste Exon der dreiteiligen Leiter (TPL), Segment 7101-7172 und 9634-9693 enthält, die das zweite Exon und einen Teil des dritten Exons der TPL und eine multiple Klonierungsstelle (MCS) enthält, die Stellen für XhoI, KpnI, SmaI und BglI enthält; (4) SV40 Segmente aus Koordinaten 4127-4100 und 2770-2533, die Polyadenylierungs- und Terminationssignale für frühe Transkription enhalten; (5) Adenovirus-2 Sequenzen aus Koordinaten 10532-11156 der Virusassoziierten RNA Gene VAI und VAII von pDC201; und (6) pBR322 Sequenzen

aus Koordinaten 4363-2486 und 1094-375, die das Ampicillin-Resistenzgen und Replikationsursprung enthalten.

[0107] Die MP-1 cDNA Bibliothek in pDC303 wurde in E. coli Stamm DH10B durch Elektroporation eingeführt. Rekombinanten wurden ausplattiert, um etwa 5000 Kolonien pro Platte bereitzustellen. Diese Rekombinanten wurden gepoolt, um eine Stammlösungsmenge von etwa 500.000 Rekombinanten für das Screening zu ergeben.

[0108] Aliquote dieser Stammlösungsmenge wurden ausplattiert, um Pools von 1000 Kolonien zu ergeben. Plasmid DNA wurde aus diesen Pools isoliert und in eine subkonfluente Schicht von CV-1/EBNA-1 Zellen unter Verwendung von DEAE-Dextran, gefolgt von Chloroquin-Behandlung, transfiziert, ähnlich zu jenem Verfahren, das von Luthman et al., Nucl. Acids Res. 11:1295 (1983) und McCutchan et al., J. Natl. Cancer Inst. 41:351 (1986) beschrieben wurde. Die CV-1/EBNA-1 Zellen wurden wie folgt abgeleitet. Die CV-1/EBNA-1 Zelllinie exprimiert konstitutiv EBV Kernantigen-1, das von dem CMV-unmittelbarfrühen Enhancer/Promotor angetrieben wird. Die afrikanische grüne Meerkatzen-Zelllinie, CV-1 (ATCC CCL 70, wurde mit 5 µg pSV2 gpt (Mulligan & Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2072, 1981) und 25 µg von pDC303/EBNA-1 unter Verwendung einer Kalziumphosphat-Copräzipitationstechnik kotransfiziert (Ausubel et al., Hrsg., Current Protocols in Molecular Biology, Wiley, New York, 1987). pDC303/EBNA-1 wurde aus pDC302 (Mosley et al., Cell 59:335, 1989) in zwei Schritten konstruiert. Erstens wurde das Intron, das in der Adenovirus dreiteiligen Leitsequenz vorhanden ist, durch Austauschen eines PvuII bis ScaI Fragmentes, welches das Intron umspannt, gegen das folgende synthetische Oligonukleotidpaar deletiert, um Plasmid pDC303 zu erzeugen:
SEQ ID NO: 7
5'CTGTTGGGCTCGCGGTTGAGGACAAACTCTTCGCGGTCTTTCCAGT-3'
SEQ ID NO: 8
3'GACAACCCGAGCGCCAACTCCTGTTTGAGAAGCGCCAGAAAGGTCA-5'

[0109] Zweitens, ein HindIII-AhaII Restriktionsfragment, das das Epstein-Barr-Virus Kernantigen I (EBNA-1) kodiert, und im Wesentlichen aus den EBV Koordinaten 107.932 bis 109.894 (Baer et al., Nature 310:207, 1984) besteht, wurde dann in die multiple Klonierungsstelle von pDC303 eingefügt, um das Plasmid pDC303/EBNA-1 zu erzeugen. Die transfizierten Zellen wurden in der Gegenwart von Hypoxanthin, Aminopterin, Thymidin, Xanthin, und Mycophenolsäure gemäß Standardverfahren (Ausubel et al., supra; Mulligan & Berg, supra) gezüchtet, um Zellen zu selektieren, die das transfizierte Plasmid stabil inkorporiert hatten. Die resultierenden Arzneimittelresistenten Kolonien wurden isoliert und individuell in Zelllinien für die Analyse expandiert. Die Zelllinien wurden auf die Expression von funktionellem EBNA-1 gescreent. Eine Zelllinie, Klon 68, wurde gefunden, EBNA-1 unter Verwendung dieser Untersuchung zu exprimieren, und wurden CV-1/EBNA-1 bezeichnet.

[0110] Um die CV-1/EBNA-1 Zellen mit der cDNA Bibliothek zu transfizieren, wurden die Zellen in vollständigem Medium (Dulbecco's modified Eagle's media (DMEM), das 10% (v/v) fötales Kälberserum (FCS), 50 U/ml Penicillin, 50 U/ml Streptomycin, 2 mM L-Glutamin enthält), gehalten und bei einer Dichte von 2×10^5 Zellen/Kammer auf Einzelkammer-Objektträgern (Lab-Tek) ausplattiert. Die Objektträger wurden mit 1 ml humanem Fibronectin (10 ug/ml in PBS) für 30 Minuten vorbehandelt, gefolgt von 1 Waschung mit PBS. Das Medium wurde von der adhärenten Zellschicht entfernt und mit 1,5 ml vollständigem Medium, das 66,6 µM Chloroquinsulfat enthält, ersetzt. 0,2 ml DNA Lösung (2 µg DNA, 0,5 mg/ml DEAE-Dextran in vollständigem Medium, das Chloroquin enthält) wurde dann zu den Zellen hinzugefügt und für 5 Stunden inkubiert. Im Anschluss an die Inkubation, wurde das Medium entfernt und die Zellen durch Zusatz von vollständigem Medium, das 10% DMSO enthält, für 2,5 bis 20 Minuten schockiert, gefolgt von dem Austausch der Lösung mit frischem vollständigem Medium. Die Zellen wurden in Kultur gezüchtet, um die transiente Expression der eingeführten Sequenzen zu ermöglichen. Diese Bedingungen führten zu einer 80% Transfektionshäufigkeit in überlebenden CV-1/EBNA-1 Zellen.

Beispiel 4: Isolation von menschlicher CD27L cDNA

[0111] Die transfizierten Zellen wurden für zwei bis drei Tage auf mit Kammern versehenen Glasobjektträgern (Lab-Tek) kultiviert, um die transiente Expression der eingefügten DNA Sequenzen zu ermöglichen. Transfizierte Monoschichten von CV-1/EBNA-1 Zellen wurden auf die Expression von CD27L durch Bindung von ^{125}I-Maus Anti-Human Fc Antikörper durch Objektträger-Autoradiographie, wie unten beschrieben, untersucht.

[0112] Transfizierte CV-1/EBNA-1 Zellen (an Kammerobjektträger angeheftet) wurden einmal mit Bindungsmedium mit fettfreier Trockenmilch (BM-NFDM) (RPMI Medium 1640, das 25 mg/ml Rinderserumalbumin

(BSA), 2 mg/ml Natriumazid, 20 mM HEPES, pH 7,2 und 50 mg/ml fettreie Trockenmilch enthält) gewaschen. Die Zellen wurden dann mit CD27/Fc in BM-NFDM (1 µg/ml), das enthält, für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellmonoschichten in den mit Kammern versehenen Objektträgern dreimal mit BM-NFDM gewaschen, um ungebundenes CD27/Fc Fusionsprotein zu entfernen und dann mit 40 ng/ml ^{125}I-Maus Anti-Human-Fc Antikörper (eine 1:50 Verdünnung) für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden dreimal mit BM-NFDM gewaschen, gefolgt von 2 Waschungen mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS), um ungebundenen ^{125}I-Maus-Anti-Human Fc-Antikörper zu entfernen. Die Zellen wurden durch Inkubieren für 30 Minuten bei Raumtemperatur in 2,5% Glutaraldehyd in PBS, pH 7,3, fixiert, in PBS zweimal gewaschen und luftgetrocknet. Die Kammerobjektträger, die die Zellen enthalten, wurden einem Phophorimager über Nacht ausgesetzt, dann in Kodak GTNB-2 photographische Emulsion (6 × Verdünnung in Wasser) getaucht und im Dunkeln für 3-5 Tage bei 4°C in einem lichtundurchlässigen Container exponiert. Die Objektträger wurden dann für etwa 4 Minuten in Kodak D19 Entwickler (40 g/500 ml Wasser) entwickelt, in Wasser gespült und in Agfa G433C Fixierer fixiert. Die Objektträger wurden individuelle mit einem Mikroskop bei einer 25-40 × Vergrößerung untersucht und positive Zellen, die CD27L exprimieren, wurden durch das Vorhandensein von autoradiograhischen Silberkörnchen gegen einen hellen Hintergrund identifiziert.

[0113] Unter Verwendung des Objektträger-Autoradiographieansatzes wurden etwa 50000 cDNAs in Pools von etwa 1000 cDNAs gescreent, bis die Untersuchung von einem Transfektantpool mehrere Zellen als eindeutig positiv für die CD27/Fc Bindung zeigte. Dieser Pool wurde dann in Pools von 300 partitioniert und erneut durch Objektträger-Autoradiographie gescreent und ein positiver Pool wurde identifiziert. Individuelle Kolonien aus diesem Pool von 300 wurden gescreent, bis ein einzelner Klon (Klon #60) identifiziert wurde, welcher die Synthese eines Oberflächenproteins mit detektierbarer CD27/Fc Bindungsaktivität steuerte. Dieser Klon wurde isoliert und seine Einfügung wurde sequenziert, um die Sequenz des menschlichen CD27L cDNA Klons 60 zu bestimmen.

[0114] Der Säugetierexpressionsvektor pDC304, der den menschlichen CD27L enthält (mit der Bezeichnung pDC304/HuCD27L) wurde bei der American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA (ATCC), am 18. August 1992 hinterlegt und erhielt die Hinterlegungsnummer ATCC 69052. Die Hinterlegung erfolgte unter den Bedinungen des Budapester Vertrags. Das angehängte Sequenzprotokoll legt die Nukleotid-(SEQ ID NO: 1) und vorausgesagte Aminosäuresequenzen von Klon 60 (SEQ ID NO: 1 und SEQ ID NO: 2) dar und assoziierte Informationen erscheinen am Ende der Spezifikation unmittelbar vor den Ansprüchen.

[0115] Die Sequenzanalyse des resultierenden Klons offenbarte eine Einfügung von 813 bp mit einem einzelnen langen offenen Leserahmen, der in der Lage ist, ein Protein von 193 Aminosäuren (SEQ ID NO: 1) zu kodieren. Die Amino-terminalen 20 Aminosäuren wurden von 18 hydrophoben Aminosäuren gefolgt, die vermutlich als ein Transmembrananker fungieren. Dieses Fehlen einer Signalsequenz, die Gegenwart einer internen hydrophoben Domäne, und die Gegenwart von zwei möglichen N-verbundenen Glycosylierungsstellen in der C-terminalen Domäne (bei den Aminosäuren Asn^{63} und Asn^{170}) wies darauf hin, dass CD27L ein TypII Transmembranprotein ist, welches eine extrazelluläre Carboxy-terminale Domäne aufweist.

[0116] Der isolierte cDNA Klon enthielt nur 37 Nukleotide stromaufwärts des mutmaßlichen Initiationskodons (SEQ ID NO: 1) mit keinen Terminationskodons im Rahmen. Zusätzlich stimmt die Sequenz um diese Initiatorstelle nicht mit der Konsensus für solche Stellen überein, wie von Kozak, Nucl. Acids. Res. 12:857 (1984) vorausgesagt wurde. Folglich wurde eine „verankerte PCR"-Reaktion gemäß Carrier et al., Gene 116:173 (1992) durchgeführt, um das 5' Ende des CD27L Transkripts zu klonieren, um sicherzustellen, dass es keine stromaufwärtige Initiatorstelle gibt. Dies führte zu der Identifikation von zusätzlichen 113 Nukleotiden, die dem Ende des isolierten Klons vorangehen (SEQ ID NO: 1). Es wurden keine Initiatorstellen stromaufwärts von jener gefunden, die zuvor identifiziert wurde.

Beispiel 5: Monoklonale Antikörper gegen CD27L

[0117] Dieses Beispiel illustriert die Herstellung von monoklonalen Antikörpern gegen CD27L. CD27L wird in Säugetier-Wirtszellen, wie COS-7 oder CV-1/EBNA-1 Zellen exprimiert und unter Verwendung von CD27/Fc Affinitätschromatographie gereinigt. Gereinigtes CD27L kann verwendet werden, um monoklonale Antikörper gegen CD27L unter Verwendung herkömmlicher Techniken zu erzeugen, zum Beispiel jenen Techniken, die im U.S. Patent 4.411.993 beschrieben sind. Kurz gesagt, es werden Mäuse mit CD27L als ein Immungen, das in komplettem Freudschen Adjuvans emulgiert ist, immunisiert, wobei Mengen im Bereich von 10 bis 100 µg subkutan oder intraperitoneal injiziert werden. Zehn bis zwölf Tage später werden die immunisierten Tiere mit zusätzlichem CD27L, der in inkomplettem Freud'schen Adjuvans emulgiert ist, re-immunisiert. Danach werden die Mäuse nach einem Wochen- bis Zweiwochen-Immunisierungsplan regelmäßig re-immunisiert. Durch retro-

orbitales Bluten oder Entfernen der Schwanzspitze werden regelmäßig Serumproben genommen, um mittels Dot-Blot-Assay oder ELISA (Enyzm-gebundene Immunosorbent-Untersuchung) auf CD27L Antikörper zu testen.

[0118] Nach Feststellung eines entsprechenden Antikörper-Titers wird positiven Tieren eine letzte intravenöse Injektion von CD27L in physiologischer Kochsalzlösung gegeben. Drei oder vier Tage später werden die Tiere getötet, die Milzzellen geerntet, und die Milzzellen werden mit einer Maus-Myelom-Zelllinie (z.B. NS1 oder Ag8.653 fusioniert. Die Fusionen erzeugen Hybridom-Zellen, die auf mehrere Mikrotiterplatten in einem selektiven HAT-Medium (Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin) aufgebracht werden, um eine Vermehrung von nicht fusionierten Zellen, Myelomhybriden und Milzzellhybriden zu hemmen.

[0119] Die Hybridomzellen werden mittels ELISA durch Anpassungen der von Engvall et. al., Immunochem. 8:871, 1971 und in dem US-Patent 4,703,004 beschriebenen Verfahren auf eine Reaktivität gegen gereinigten CD27L gescreent. Positive Hybridomzellen können intraperitoneal in syngene BALB/c-Mäuse injiziert werden, um Asciten zu erzeugen, die hohe Konzentrationen an monoklonalen Anti-CD27L-Antikörpern enthalten. Alternativ können Hybridomzellen mittels verschiedener Verfahren in vitro in Kolben oder Rollerflaschen herangezogen werden. In Maus-Asciten erzeugte monoklonale Antikörper können durch Ammoniumsulfatfällung, gefolgt von einer Gelausschlusschromatographie gereinigt werden. Alternativ kann auch eine Affinitätschromatographie, die auf der Antikörperbindung an Protein A oder Protein G beruht, oder auch eine Affinitätschromatographie, die auf der Bindung an CD27L beruht, angewendet werden.

Beispiel 6: Bindung von CD27L an CD27

[0120] Um die Bindung von CD27 an den nativen CD27L, der auf MP-1 Zellen exprimiert wird, mit jener des klonierten CD27L, der auf transfizierten CV-1/EBNA Zellen exprimiert werden, zu vergleichen, wurde eine modifizierte indirekte Bindungsuntersuchung unter Verwendung des CD27/Fc und der in Beispiel 2 beschriebenen ^{125}I-markierten Maus Anti-Human IgG Antikörper entwickelt. Dies war notwendig, da die direkte Radiomarkierung von CD27/Fc zu seiner Inaktivierung führte. MP-1 Zellen wurden variierenden Konzentrationen von CD27/Fc, gefolgt von einer konstanten sättigenden Konzentration von ^{125}I-Antikörper gegen den Fc-Abschnitt der Moleküle wie folgt ausgesetzt.

[0121] Bindungsuntersuchungen für MP-1 Zellen wurden durch Züchten von Zellen in Suspensionskultur in 96-Kammer Kulturplatten ausgeführt. In Kürze, es wurden MP-1 Zellen (2×10^6 Zellen/Kammer) in der Gegenwart oder Abwesenheit von verschiedenen Konzentrationen von CD27/Fc in Bindungsmedium (RPMI 1640 Medium, 1% Rinderserumalbumin, 0.2% Natriumazid und 20 mM Hepes, pH 7,2) für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Zellen wurden dann einmal mit PBS gewaschen und mit ^{125}I-Maus-Anti-Human IgG (40 ng/ml) in Bindungsmedium unter leichtem Rühren für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Zellen und ungebundener ^{125}I-Antikörper wurden durch das Pthalatöl-Trennverfahren getrennt, wie im Wesentlichen von Dower et al., J. Immunol 132:751 (1984) beschrieben ist.

[0122] Monoschichten von CV-1/EBNA Zellen ($2{,}5 \times 10^5$ Zellen pro Kammer), die mit den MP-1 cDNA Pools transfiziert sind, wurden auf CD27 Expression nach zwei Tagen unter Verwendung von maus Anti-Human IgG Bindungs- und Objektträger-Autoradiographie untersucht. Transfizierte Zell-Monoschichten wurden mit Bindungsmedium, das fettfreie Trockenmilch (50 mg/ml; BM-NFDM) enthält, gewaschen, dann mit CD27/Fc in BM-NFDM (1 µg/ml) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Zellen wurden dann dreimal mit BM-NFDM gewaschen und mit 40 ng/ml ^{125}I-Maus Anti-Human IgG in BM-NFDM für eine Stunde inkubiert. Zellen wurden zweimal mit BM-NFDM, dreimal mit PBS gewaschen, und in PBS, die 2,5% Glutaraldehyd enthält, für 30 Minuten fixiert, weitere zweimal mit PBS gewaschen und luftgetrocknet. Die Kammer-Objektträger wurden dann in Kodak GTNB-2 photographische Emulsion getaucht und für 3 Tage bei Raumtemperatur vor dem Entwickeln exponiert.

[0123] Für Bindungsuntersuchungen auf dem klonierten CD27L, wurden adhärente CV-1/EBNA Zellen mit dem CD27L Expressionsplasmid in 12-Kammerplatten ($2{,}5 \times 10^5$ Zellen/Kammer) wie oben transfiziert. Zwei Tage später wurden die Zellen mit BM-NFDM gewaschen und mit verschiedenen CD27/Fc-Konzentrationen inkubiert. Nachfolgend wurden die Zellen gewaschen, mit ^{125}I-markiertem Maus-Anti-Human IgG Antikörper, wie zuvor beschrieben, inkubiert und durch Trypsinierung geerntet. In allen Untersuchungen wurde die nicht-spezifische Bindung von ^{125}I-Antikörper in der Abwesenheit von CD27/Fc sowie in der Gegenwart von CD27/Fc und eines 200-fachen molaren Überschusses an unmarkiertem Antikörper untersucht. Freier und Zell-gebundener ^{125}I-Antikörper wurden auf einem Packard Autogamma Zähler quantifiziert. Affinitätsberechnungen wurden auf einem RS/1 (BBN Software, Boston, MA), die auf einem Microvax Computer läuft, durch-

geführt.

[0124] Wenn die MP-1 Bindungsdaten in dem Scatchard Koordinatensystem erneut graphisch dargestellt wurden, wurde eine biphasische Kurve erzeugt, was sowohl auf Hoch- als auch auf Niederaffinitätsbindungskomponenten hinweist. Der auf MP-1 Zellen exprimierte CD27L hatte Ka-Werte von $1{,}58 \times 10^9\ M^{-1}$ und $1{,}83 \times 10^8\ M^{-1}$, mit 250 bzw. 560 Stellen pro Zelle. Ähnlicherweise zeigte der klonierte CD27L, der in CV-1/EBNA Zellen exprimiert wird, sowohl Hoch- als auch Niederaffinitätsbindungkomponenten. Die Affinitätskonstanten, die aus der Scatchard-Analyse errechnet wurden, $2{,}7 \times 10^9\ M^{-1}$ und $1, 2 \times 10^8\ M^{-1}$, stimmten gut mit jenen überein, die für die Bindung von CD27/Fc an den nativen Liganden, der auf MP-1 Zellen exprimiert wird, beobachtet wurden. Insgesamt war die Expression des Liganden auf CV-1/EBNA Zellen mit 12.017 Hochaffinitäts- und 68.560 Niederaffinitätsbindungsstellen, die pro Zelle ermittelt wurden, verstärkt.

Beispiel 7: SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von CD27L

[0125] Natives und rekombinantes CD27L Protein wurde durch SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen wie folgt analysiert. Die Zellen wurden mit ^{125}I, wie zuvor von Urdal et al., (J. Biol. Chem. 263:2870 (1988) beschrieben, oberflächenmarkiert. Membranproteine wurden mit Detergens in der Gegenwart von Protease-Inhibitoren, einschließlich 100 mM Iodacetamid, aufgelöst. CD27L wurde durch Bindung an CD27/FC und Protein G Sepharose isoliert (Armitage et al., Nature 357:80, (1992)). Um Bindung von CD27/Fc an Fc-Rezeptoren zu eliminieren, wurden die Detergenslysate mit 50 µg/ml menschlichem IgG und 5% Kaninchen und Ziegensera vorgeklärt. Die Proben wurden in Puffer, der 4 M Harnstoff und 5% 2-Mercaptoethanol enthält, resuspendiert und durch 4-20% Gradienten SDS-Polyacrylamidgel (NOVEX) elektrophoretisiert.

[0126] Die vorherrschende Proteinart, die sowohl auf MP-1 als auch auf CD27L-exprimierenden CV-1/EBNA Zellen beobachtete wurde, hatte ein scheinbares M_r von ~50.000. Vergleich mit dem berechneten M_r (21.146) des unmodifizierten CD27L weist darauf hin, dass die N-verbundenen Glycosylierungsstellen in der extrazellulären Domäne verwendet werden. Präzipitate von beiden Zellen zeigten auch eine unbedeutende Proteinart von etwa 20.000, die in CV-1/EBNA Kontrollzellen nicht gefunden wurde. Diese könnte entweder unmodifizierter CD27L oder das Produkt von Proteinabbau sein. Eine Proteinart von ~200 kDa wurde ebenfalls beobachtet, die spezifisch mittels CD27/Fc präzipitiert wird.

Beispiel 8: Biologische Aktivität von CD27L

A. CD27L stimuliert die T Zell-Proliferation

[0127] Die Fähigkeit von CD27L, die Proliferation von humanen peripheren Blut T Zellen zu stimulieren, wurde unter Verwendung der folgenden Proliferationsuntersuchung gezeigt. Humane periphere Blut T-Zellen wurde aus PBMC durch Rosettenbildung mit 2-Aminoethyliosthiouroniumbromid-Hydrobromid-behandelten SRBC gereinigt. Nach der hypotonen Lyse von SRBC, wurden Monozyten durch Plastikanheftung für 1 Stunde bei 37°C abgereichert. $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen wurden durch negative Abreicherung von $CD8^+$ bzw. $CD4^+$ Zellen durch magnetische Zellsortierung gemäß dem Herstellerprotokol (Miltenyi Biotec, Sunnyvale, CA) gereinigt. Sortierte Zellen waren routinemäßig zu > 95% rein, wie durch Flusszytometrie beurteilt wurde. T-Zellen wurden in 96-Kammerplatten bei 10^5 Zellen pro Kammer in dreifacher Ausführung für 3 Tage in der Gegenwart von einer suboptimalen Konzentration von Phytohämagglutinin (0,1% v/v) kultiviert. Ebenfalls in der Kultur vorhanden waren CV-1/EBNA Zellen, die 2 Tage nach der Transfektion mit 1% Paraformaldehyd für 5 Minuten bei 25°C fixiert wurden. Die Kammern wurden mit 1 µCi von tritiertem Thymidin für die letzten 8 Stunden der Kultur gepulst und der c.p.m. Einbau wurde bestimmt. Ein neutralisierendes IL-2 Antiserum, hergestellt in einem Kaninchen, wurde verwendet, um IL-2 Bioaktivität bei einer Verdünnung von 1:500 zu blockieren, wie zuvor von Alderson et al., J. Exp. Med. 172:577 (1990) beschrieben wurde.

[0128] Die Zugabe von CD27L exprimierenden CV-1/EBNA Zellen zu T-Zellen in der Gegenwart einer suboptimalen Konzentration von Phytohämagglutinin (PHA) führte zu einem verstärkten Thymidineinbau, wohingegen die Zugabe von Kontroll CV-1/EBNA Zellen, die mit leerem Vektor transfiziert sind, keine Wirkung hatte. So wenig wie 100 CV-1/EBNA Zellen, die CD27L exprimieren, waren ausreichend, um die Proliferation in Kulturen, die mit 1×10^5/T Zellen etabliert wurden, signifikant zu erhöhen. Im Gegensatz dazu hatte CD27L in der Abwesenheit von Costimulation keine Wirkung auf die T-Zell-Proliferation.

[0129] Unter Verwendung von magnetischen Kügelchen, um Subpopulationen von T-Zellen zu isolieren, wurde bestimmt, dass CD27L die Proliferation von sowohl $CD4^+$ als auch $CD8^+$ T-Zellen costimuliert. Zusätzlich wurde die Induktion der CD4+ und CD8+ T-Zell-Proliferation durch CD27L durch die Gegenwart eines IL-2 neu-

tralisierenden Antiserums nicht beeinflusst, was impliziert, dass unter diesen Kulturbedingungen die CD27L-vermittelte T-Zell-Proliferation unabhängig von IL-2 ist. Folglich gibt CD27L entweder ein direktes proliferatives Signal zu zumindest einigen T-Zellen ab, oder alternativ, dass Zytokine, mit Ausnahme von IL-2 zu der Reaktion beitragen können.

B. CD27 induziert die lytische Aktivität von T Zellen

[0130] Um die Wirkung von CD27L auf T Zellen weiters zu charakterisieren, wurde seine Fähigkeit, die in vitro Erzeugung von zytolytischen Zellen in der Gegenwart oder Abwesenheit von Lectin zu beeinflussen, untersucht. Kulturbedinungen für das Messen der cytolytischen Aktivität waren wie oben für die Proliferationsuntersuchungen beschrieben, im Ausnahme, dass T-Zellen für 4 Tage in 24-Kammerplatten bei 10^6 Zellen pro Kammer unter Verwendung einer fixierten Konzentration (10^5) CV-1/EBNA-Zellen kultiviert wurden. Eine 4 Stunden ^{51}Cr-Freisetzungsuntersuchung wurde verwendet, um die cytolytische Aktivität von kultivierten Zellen zu beurteilen, wie zuvor berichtet wurde (Alderson et al., J. Exp. MEd. 172:577 (1990). In Kürze, die kultivierten Zellen wurden in Kulturmedium gewaschen und Duplikat-Kulturfraktionen wurden in 96-Kammer V-Bodenplatten seriell verdünnt. Als eine Zielzelle wurde die murine Tumorzelllinie P815 in der Gegewart von PHA (0,6% v/v) verwendet, um lytische Zellen zu offenbaren, ungeachtet ihrer Spezifität. Eine lytische Einheit (LU) wurde als die Fraktion der anfänglichen Kultur definiert, die eine 50% Lyse der Zielzellen hervorruft.

[0131] CD27L hatte keine stimulatorische Wirkung auf zytolytische Aktivität in der Abwesenheit von Costimulation, wie in einer Lectin-vermittelten Zytotoxizitätsuntersuchung detektiert wurde. Jedoch führte die Inkubation von gereinigten T-Zellen mit CD27L in der Gegenwart von suboptimalem PHA zu einer verstärkten Erzeugung von zytolytischen Zellen im Vergleich zu Zellen, die mit PHA allein oder PHA plus CV-1/ENBA Kontrollzellen kultiviert wurden. Die durch CD27L induzierte lytische Aktivität auf PHA costimulierte T-Zellen in dieser Untersuchung war zu jener vergleichbar, die durch IL-2 (1.100 bzw. 800 lytische Einheiten (LU) pro Kultur) induziert wurde und war mehr als zehnfach höher als jene, die mit Zellen gesehen wurde, die in der Gegenwart von PHA allein (61 LU) oder PHA puls CV-1/EBNA Kontrollzellen (50 LU) inkubiert wurden. Die Wirkung von CD27L auf zytolytische Zellerzeugung war auch auf einer pro Effektor Zellbasis (780 LU pro 10^6 Zellen für CD27L+PHA im Vergleich zu 71LU pro 10^6 Zellen für CV-1/EBNA Kontrollzellen + PHA) offensichtlich, was impliziert, dass CD27L, zusätzlich zur Überstützung der T-Zell Proliferation, die Differenzierung von zytolytischen Z-Zellvorläufern verstärkt.

Beispiel 9: Konstruktion und Expression von löslichem CD27L

[0132] Eine CD27-L DNA wurde erzeugt, um ein lösliches, oligomeres CD27-L Fusionsprotein mit der Bezeichnung sCD27L-3 zu exprimieren. Das Konstrukt, das sCD27L-3 kodiert (in SEQ ID NO: 9 und SEQ ID NO: 10 gezeigt), enthält eine Leitsequenz (die die Aminosäuren –24 bis –1 aufweist), eine 37 Aminosäuresequenz, die eine Leucin-Zipper-Domäne (die die Aminosäuren 3-35 aufweist) enthält, und die extrazelluläre Region von humanem CD27-L (die die Aminosäuren 39-193 aufweist). Die Nukleotide, die die Aminosäuren 1-2 und 36-38 kodieren, sind nicht-funktionelle Reste von Restriktionsstellen. Das Konstrukt wurde mittel Verfahren hergestellt, die im Stand der Technik bekannt sind, um eine DNA zu erhalten, die die extrazelluläre Region von CD27-L kodiert. In Kürze, es wurde die extrazelluläre Region von CD27-L aus einer Volllängen CD27-L cDNA mittels PCR amplifiziert. Die verwendeten Primer wurden von der extrazellulären Region von CD27-L (SEQ ID NO: 1, Nukleotide 222-245, für den 5' Primer, und das Komplement der Nukleotide 663-689 für den 3' Primer) abgeleitet, zuzüglich von Sequenzen, die die gewünschten Restriktionsenzymstellen (ACTAGT, welche eine SpeI Stelle enthält, für den 5' Primer, und GCGGCCGC, welche eine NotI Stelle enthält, für den 3' Primer) kodieren. Das amplifizierte PCR Produkt, die die extrazelluläre Domäne von CD27-L darstellt, wurde in einen SpeI/NotI geschnittenen SMAG (pDC206) Vektor kloniert. Der SMAG Vektor ist ein Derivat von pDC201 (Sims et al., Science 241:585, 1988), der die murine IL-7 Leitsequenz enthält. Der Vektor wurde amplifiziert, mit SpeI geschnitten und mit Kalbsdarm alkalische Phosphatase behandelt. Die Nukleotidsequenz, die die Leucin-Zipper-Region aufweist, wurde durch Ligieren von mehreren Oligonukleotiden, die von der bekannten Aminosäuresequenz des Leucin-Zippers abgeleitet sind, mittels Standardmethodologie synthetisiert, und dann mit dem SpeI-geschnittenen SMAG Vektor ligiert, um einen Expressionsvektor, der eine murine IL-7 Leitsequenz (Namen et al., Nature 333:571; 1988), eine Leucin-Zipper Domäne, und die extrazelluläre Domäne von CD27-L enthält, zu bilden. Der Expressionsvektor wurde als pDC206/sCD27L-3 bezeichnet.

[0133] pDC206/sCD27L-3 wurde in die Affennieren-Zelllinie CV-1/EBNA (ATCC CRL 10478) zusammen mit einem pSV3Neo Plasmid co-transfiziert. pSV3Neo (Mulligan und Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78:2072, 1981) ist ein Plasmid, welches das SV40 T-Antigen exprimiert und folglich die episomale Replikation des pDC206 Plasmids ermöglicht.

[0134] Sobald Zellen, die das Fusionskonstrukt exprimieren, identifiziert sind, werden Kulturen im großen Maßstab von transfizierten Zellen gezüchtet, um Überstand von Zellen zu akkumulieren, die das lösliche, oligomere CD27-L Fusionsprotein (als sCD27L-3 bezeichnet) exprimieren. sCD27L-3 in der Überstandsflüssigkeit wird durch Affinitätsreinigung gereinigt, und zwar im Wesentlichen wie im U.S. Patent 5.011.912 beschrieben ist. sCD27L-3 kann auch mittels anderen Proteinreinigungsverfahren gereinigt werden, wie hierin beschrieben. Silber-gefärbte SDS Gele des löslichen, oligomeren CD27-L Fusionsprotein können hergestellt werden, um die Reinheit zu bestimmen. sCD27L-3 bindet lösliches CD27, und inhibiert die Bindung von löslichem CD27 an Zellen, die CD27-L exprimieren, wie in Beispiel 10 beschrieben ist.

Beispiel 10: Biologische Aktivität von löslichem CD27L

[0135] Dieses Beispiel illustriert eine biologische Aktivität von sCD27L-3. Eine lösliche Form des menschlichen Lymphozyt-Oberfächenantigens CD27 wurde im Wesentlichen wie von Fanslow et al., J. Immunol. 149:65 (1992) beschreiben hergestellt, um ein dimeres Fc Fusionskonstrukt mit der Bezeichnung CD27/Fc zu bilden. CD27/Fc weist die extrazelluäre Region von CD27 und eine Fc Region von einem menschlichen IgG_1 auf. sCD27L-3 inhibiert die Bindung von CD27/Fc an MP-1 Zelle, einer humanen, Epstein-Barr-Virus-transformierten B-Zelllinie, die endogenes CD27-L exprimiert.

[0136] Konditionierte Überstandsflüssigkeit von CV-1/EBNA Zellen, die mit pDC206/sCD27L-3 transfiziert sind, wurde in eine 96 Kammerplatte titriert. Eine konstante Menge von CD27/Fc (1 µg/Kammer) wurde zu jeder Kammer hinzugefügt, gefolgt von 1-2 × 10^6 MP-1 Zellen pro Kammer, in Bindungsmedium (RPMI-1640, das 1% Rinderserumalbumin, 0,2% Natriumazid und 20 mM HEPES, pH 7,2 enthält) Die Platte wurde bei 37°C für eine Stunde inkubiert. Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen, dann durch Zentrifugation pelletiert. ^{125}I-Maus Anti-Human IgG Fc wurde zu jeder Kammer bei einer konstanten Konzentration hinzugefügt, und die Platte für eine weitere Stunde bei 37°C inkubiert. Das ^{125}I-Maus Anti-Human IgG Fc band an das CD27/Fc, das an die MP-1 Zellen band. Nach der letzten Inkubation wurden die Zellen über Phthalatöl-enthaltende Röhrchen geerntet, um die gebundenen und freien ^{125}I-Maus Anti-Human IgG Fc zu trennen und die Menge an Radioaktivität mittels eines Gamma-Zähler quantifiziert.

[0137] sCD27L-3 zeigte eine Dosis-abhängige Inhibierung der Bindung von CD27/Fc an MP-1 Zellen. Durch Vergleich der Konzentration, bei welcher die Inhibierung der Bindung von CD27/Fc bei 50% der Titration der Inhibierung durch sCD27L-3 ist, wurde geschätzt, dass die Konzentration von sCD27L-3 in dem konditionierten Medium zwischen 18 und 40 µg/ml war. Bei Ausführen dieses Vergleichs wurde das MW von sCD27L-3 mit 135 Kd geschätzt (geschätztes MW der extrazellulären Region von CD27-L war 45 Kd, multipliziert mal 3 für Bildung eines Trimers) und es wurde vermutet, dass die Bindung von sCD27L-3 an CD27/FC, bei einem molaren Verhältnis stattfindet. Der Ki wurde mit 10-mal dem Ka geschätzt, welcher 3 × 10^{-7} M^{-1} war, und die anfängliche Konzentration wurde mit 1 × 10^{-8} M angenommen. Die Ergebnisse demonstrierten, dass die anfängliche Annahme von einer Konzentration von 1 × 10^{-8} M etwa 10fach zu gering war, und eine 1:3 Verdünnung der Überstandflüssigkeit ergab sogar eine geschätzte Konzentration von 1 × 10^{-7} M.

Sequenzprotokoll

<110> Immunex Corporation

<120> CD27 LIGAND

<130> P18581EP

<140> EP93920446.7
<141> 1993-09-01

<150> US07/941,648
<151> 1992-09-08

<150> US08/106,507
<151> 1993-08-13

<160> 10

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 926
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> mat__peptide
<222> (151)..(729)

<220>
<221> CDS

<222> (151)..(732)

<400> 1

```
ccagagaggg gcaggcttgt cccctgacag gttgaagcaa gtagacgccc aggagccccg 60

ggaggggget gcagtttcct tccttccttc tcggcagcgc tccgcgcccc catcgccgct 120

cctgcgctag cggaggtgat cgccgcggcg atg ccg gag gag ggt tcg ggc tgc 174
                                Met Pro Glu Glu Gly Ser Gly Cys
                                  1               5

tcg gtg cgg cgc agg ccc tat ggg tgc gtc ctg cgg gct gct ttg gtc 222
Ser Val Arg Arg Arg Pro Tyr Gly Cys Val Leu Arg Ala Ala Leu Val
     10                  15                  20

cca ttg gtc gcg ggc ttg gtg atc tgc ctc gtg gtg tgc atc cag cgc 270
```

```
Pro Leu Val Ala Gly Leu Val Ile Cys Leu Val Val Cys Ile Gln Arg
 25                  30                  35                  40

ttc gca cag gct cag cag cag ctg ccg ctc gag tca ctt ggg tgg gac   318
Phe Ala Gln Ala Gln Gln Gln Leu Pro Leu Glu Ser Leu Gly Trp Asp
                 45                  50                  55

gta gct gag ctg cag ctg aat cac aca gga cct cag cag gac ccc agg   366
Val Ala Glu Leu Gln Leu Asn His Thr Gly Pro Gln Gln Asp Pro Arg
             60                  65                  70

cta tac tgg cag ggg ggc cca gca ctg ggc cgc tcc ttc ctg cat gga   414
Leu Tyr Trp Gln Gly Gly Pro Ala Leu Gly Arg Ser Phe Leu His Gly
         75                  80                  85

cca gag ctg gac aag ggg cag cta cgt atc cat cgt gat ggc atc tac   462
Pro Glu Leu Asp Lys Gly Gln Leu Arg Ile His Arg Asp Gly Ile Tyr
     90                  95                  100

atg gta cac atc cag gtg acg ctg gcc atc tgc tcc tcc acg acg gcc   510
Met Val His Ile Gln Val Thr Leu Ala Ile Cys Ser Ser Thr Thr Ala
105                 110                 115                 120

tcc agg cac cac ccc acc acc ctg gcc gtg gga atc tgc tct ccc gcc   558
Ser Arg His His Pro Thr Thr Leu Ala Val Gly Ile Cys Ser Pro Ala
                125                 130                 135

tcc cgt agc atc agc ctg ctg cgt ctc agc ttc cac caa ggt tgt acc   606
Ser Arg Ser Ile Ser Leu Leu Arg Leu Ser Phe His Gln Gly Cys Thr
            140                 145                 150

att gtc tcc cag cgc ctg acg ccc ctg gcc cga ggg gac aca ctc tgc   654
Ile Val Ser Gln Arg Leu Thr Pro Leu Ala Arg Gly Asp Thr Leu Cys
        155                 160                 165

acc aac ctc act ggg aca ctt ttg cct tcc cga aac act gat gag acc   702
Thr Asn Leu Thr Gly Thr Leu Leu Pro Ser Arg Asn Thr Asp Glu Thr
    170                 175                 180

ttc ttt gga gtg cag tgg gtg cgc ccc tga ccactgctgc tgattagggt     752
Phe Phe Gly Val Gln Trp Val Arg Pro
185                 190

tttttaaatt ttatttttatt ttatttaagt tcaagagaaa aagtgtacac acaggggcca 812

cccggggttg gggtgggagt gtggtggggg gtagtttgtg gcaggacaag agaaggcatt 872

gagctttttc tttcattttc ctattaaaaa atacaaaaat caaaacaaaa aaaa       926
```

<210> 2
<211> 193
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

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

<210> 3
<211> 27
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Oligonukleotid

<400> 3

atagcggccg cctgggcagg gaccatg 27

<210> 4

<211> 39

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz.
Oligonukleotid

<400> 4

gtgaccggtg gggtttctag ggacctcggg tctagagcg 39

<210> 5

<211> 24

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Oligonukleotid

<400> 5

gatcttggaa cgagacgacc tgct 24

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Oligonukleotid

<400> 6
aaccttgctc tgctggacga 20

<210> 7
<211> 46
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Oligonukleotid

<400> 7
ctgttgggct cgcggttgag gacaaactct tcgcggtctt tccagt 46

<210> 8
<211> 46
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz
<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Oligonukleotid

<400> 8
gacaacccga gcgccaactc ctgtttgaga agcgccagaa aggtca 46

<210> 9
<211> 689
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: CD27 Ligand Trimer (CD27L-3)

<220>

<221> CDS

<222> (39).._(689)

<220>

<221> sig__peptide

<222> (39).._(110)

<220>

<221> mat__peptide

<222> (111).._(686)

<400> 9

```
ggaaaactct cgaggtacct atcccgggga tccccacc atg ttc cat gtc tct ttt 56
                                          Met Phe His Val Ser Phe
                                                          -20

aga tat atc ttt gga att cct cca ctg atc ctt gtt ctg ctg cct gtc   104
Arg Tyr Ile Phe Gly Ile Pro Pro Leu Ile Leu Val Leu Leu Pro Val
            -15                 -10                 -5
```

```
act agt tct gac cgt atg aaa cag ata gag gat aag atc gaa gag atc   152
Thr Ser Ser Asp Arg Met Lys Gln Ile Glu Asp Lys Ile Glu Glu Ile
     -1   1               5                  10

cta agt aag att tat cat ata gag aat gaa atc gcc cgt atc aaa aag   200
Leu Ser Lys Ile Tyr His Ile Glu Asn Glu Ile Ala Arg Ile Lys Lys
 15                  20                  25                  30

ctg att ggc gag cgg act agt cag cgc ttc gca cag gct cag cag cag   248
Leu Ile Gly Glu Arg Thr Ser Gln Arg Phe Ala Gln Ala Gln Gln Gln
                 35                  40                  45

ctg ccg ctc gag tca ctt ggg tgg gac gta gct gag ctg cag ctg aat   296
Leu Pro Leu Glu Ser Leu Gly Trp Asp Val Ala Glu Leu Gln Leu Asn
             50                  55                  60

cac aca gga cct cag cag gac ccc agg cta tac tgg cag ggg ggc cca   344
His Thr Gly Pro Gln Gln Asp Pro Arg Leu Tyr Trp Gln Gly Gly Pro
         65                  70                  75

gca ctg ggc cgc tcc ttc ctg cat gga cca gag ctg gac aag ggg cag   392
Ala Leu Gly Arg Ser Phe Leu His Gly Pro Glu Leu Asp Lys Gly Gln
     80                  85                  90

cta cgt atc cat cgt gat ggc atc tac atg gta cac atc cag gtg acg   440
Leu Arg Ile His Arg Asp Gly Ile Tyr Met Val His Ile Gln Val Thr
 95                  100                 105                 110

ctg gcc atc tgc tcc tcc acg acg gcc tcc agg cac cac ccc acc acc   488
Leu Ala Ile Cys Ser Ser Thr Thr Ala Ser Arg His His Pro Thr Thr
                 115                 120                 125

ctg gcc gtg gga atc tgc tct ccc gcc tcc cgt agc atc agc ctg ctg   536
Leu Ala Val Gly Ile Cys Ser Pro Ala Ser Arg Ser Ile Ser Leu Leu
             130                 135                 140

cgt ctc agc ttc cac caa ggt tgt acc att gtc tcc cag cgc ctg acg   584
Arg Leu Ser Phe His Gln Gly Cys Thr Ile Val Ser Gln Arg Leu Thr
         145                 150                 155

ccc ctg gcc cga ggg gac aca ctc tgc acc aac ctc act ggg aca ctt   632
Pro Leu Ala Arg Gly Asp Thr Leu Cys Thr Asn Leu Thr Gly Thr Leu
     160                 165                 170

ttg cct tcc cga aac act gat gag acc ttc ttt gga gtg cag tgg gtg   680
Leu Pro Ser Arg Asn Thr Asp Glu Thr Phe Phe Gly Val Gln Trp Val
175                 180                 185                 190
```

cgc ccc tga 689
Arg Pro

<210> 10

<211> 216

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: CD27 Ligand Trimer (CD27L-3)

<400> 10

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

Patentansprüche

1. Isolierte DNA Sequenz, die ein biologisch aktives CD27L Polypeptid kodiert, welches die Aminosäuresequenz 1-193 der SEQ ID NO: 1 oder eine verkürzte Form davon aufweist, die die CD27-Bindungseigen-

schaften beibehält.

2. Isolierte DNA Sequenz, die ein biologisch aktives, lösliches CD27L Polypeptid kodiert, welches die Aminosäuresequenz 39-193 der SEQ ID NO: 1 oder eine verkürzte Form davon aufweist, die die CD27-Bindungseigenschaften beibehält.

3. Isolierte DNA Sequenz, wobei die DNA Sequenz ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus:
(a) cDNA, welche die Nukleotidsequenz 268-729 der SEQ ID NO: 1 aufweist;
(b) DNA Sequenz, die ein Komplement einer DNA ist, die mit der cDNA von (a) unter hoch stringenten Bedingungen hybridisiert, wobei die Komplement-DNA ein biologisch aktives CD27L kodiert, das in der Lage ist, CD27 zu binden, oder entweder die Proliferation von T Zellen zu stimulieren oder die Differenzierung von cytolytischen T-Zellvorläufern zu verstärken; und
(c) DNA Sequenz, die als Folge des genetischen Codes zu einer DNA Sequenz von (a) oder (b) degeneriert ist, und welche ein biologisch aktives CD27L kodiert, das in der Lage ist, CD27 zu binden, oder entweder die Proliferation von T Zellen zu stimulieren oder die Differenzierung von cytolytischen T-Zellvorläufern zu verstärken.

4. Expressionsvektor, der eine DNA Sequenz nach einem der Ansprüche 1 bis 3 kodiert.

5. Wirtszelle, die mit einem Expressionsvektor nach Anspruch 4 tranformiert oder transfiziert ist.

6. Verfahren zum Herstellen eines CD27L-Polypeptids, welches das Kultivieren einer Wirtzelle nach Anspruch 5 unter Bedingungen, die die Expression von CD27L fördern, und Gewinnen des CD27L Polypeptids aus der Kultur aufweist.

7. CD27L Polypeptid, das durch eine Sequenz nach einem der Ansprüche 1 bis 3 kodiert ist.

8. CD27L Polypeptid, das zumindest zu 80% identisch ist zu einem Polypeptid nach Anspruch 7.

9. CD27L Polypeptid, das zumindest zu 90% identisch ist zu einem Polypeptid nach Anspruch 7.

10. CD27L Polypeptid nach einem der Ansprüche 7 bis 9, wobei besagtes Polypeptid ein lösliches Polypeptid ist.

11. CD27L Polypeptid nach einem der Ansprüche 7 bis 10, welches homogen ist.

12. CD27L Polypeptid nach einem der Ansprüche 7 bis 11, wobei besagtes CD27L menschliches CD27L ist.

13. CD27L Polypeptid nach einem der Ansprüche 7 bis 12, welches gereinigt ist.

14. CD27L Polypeptid nach einem der Ansprüche 7 bis 13, wobei das CD27L Polypeptid ein oligomeres CD27L Polypeptid ist, das zwei oder mehrere, miteinander fusionierte CD27L Polypeptide aufweist.

15. Antiköper, der mit CD27L nach einem der Ansprüche 7 bis 13 immunreaktiv ist.

16. Antikörper nach Anspruch 15, welcher ein monoklonaler Antikörper ist.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen