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

(10) **DE 693 32 981 T2** 2004.05.19

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 672 141 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **693 32 981.5**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US93/10034**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **94 900 364.4**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 94/010308**
(86) PCT-Anmeldetag: **20.10.1993**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **11.05.1994**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **20.09.1995**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **14.05.2003**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **19.05.2004**

(51) Int Cl.[7]: **C12N 15/12**
C12N 15/62

(30) Unionspriorität:

969703	**23.10.1992**	**US**
107353	**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., Seattle, Wash., US

(72) Erfinder:
SPRIGGS, K., Melanie, Seattle, US; SRINIVASAN, Subhashini, Kirkland, US

(74) Vertreter:
Baumbach, F., Dr.rer.nat. Pat.-Ing., Pat.-Ass., 13125 Berlin

(54) Bezeichnung: **METHODEN ZUR HERSTELLUNG LÖSLICHER, OLIGOMERER PROTEINE**

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

TECHNISCHES GEBIET DER ERFINDUNG

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung löslicher oligomerer Proteine unter Verwendung rekombinanter DNA-Technologie.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0002] Die biologische Aktivität von Proteinen hängt von richtiger Tertiär- und Quartärstruktur oder Konformation ab. Viele Proteine existieren in ihrer nativen Form als Oligomere (Strukturen, die aus zwei oder mehr Polypeptidketten bestehen). Solche Oligomere werden oft durch nicht-kovalente Wechselwirkungen stabilisiert und hängen somit von richtiger tertiärer Struktur der einzelnen Peptide ab. Die Expression eines rekombinanten Proteins in biologisch aktiver Form, bei der die richtige Tertiär- und Quaternärstruktur dargestellt wird, durch Wirtszellen, die normalerweise keine native Form des Proteins exprimieren, stellt häufig eine große Herausforderung dar. Von besonderem Interesse ist im Rahmen der rekombinanten Protein-Technologie die Expression von Proteinen, die in der biologisch aktiven Form als lösliche Proteine membrangebunden sind. Lösliche Proteine sind als therapeutische Wirkstoffe und in anderen Anwendungen nützlich, wo große Mengen an hochgereinigten Proteinen erforderlich sind.

[0003] Lösliche Formen von Transmembranproteinen wurden durch Deletion der transmembranen und der intracytoplasmatischen Domäne und durch Hinzufügen eines geeigneten Signalpeptids hergestellt, um Sekretion der löslichen Form des Proteins zu ermöglichen (Smith et al., Science 238: 1704, 1987; Treiger et al., J. Immunol. 136: 4099, 1986). Einige lösliche Proteine wurden als Fusionsproteine exprimiert, bei denen die extrazelluläre Domäne des Membranproteins mit einer konstanten Region einer schweren Kette eines Immunoglobulins (Fanslow et al., J. Immunol. 149: 65, 1992; Noelle et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 89: 6550, 1992) oder mit der extrazellulären Domäne des murinen T-Lymphozytenantigens CD8 (Hollenbaugh et al., EMBO J. 11: 4313, 1992) verbunden ist. Solche löslichen Proteine sind aber unter Umständen auf Grund ungeeigneter Tertiärund/oder Quaternärstruktur nicht biologisch aktiv. Einige lösliche Formen von Transmembranproteinen können biologisch aktiv, aber schlecht exprimiert oder unter den Expressions- oder Reinigungsbedingungen auf Grund von Veränderungen bei der Struktur, die aus der Deletion eines Abschnitts oder von Abschnitten des Proteins resultieren, instabil sein. EP-A-0325224 offenbart Verfahren zur Herstellung von sezernierten Rezeptoranaloga wie PDGF-R-Analoga und Verfahren zur Herstellung biologisch aktiver Dimere durch Fusion eines dimerisierenden Proteins, wie der Region der schweren Kette des Immunoglobulins, an ein Peptid, das Dimerisierung zur Aktivität benötigt.

[0004] Leucin-Zipper ist eine Bezeichnung, die für die Bezugnahme auf ein sich wiederholendes Heptad-Motiv verwendet wird, das vier bis fünf Leucinreste enthält, die als eine konservierte Domäne in mehreren Proteinen vorhanden sind. Leucin-Zipper falten sich als kurze, parallele Superhelices, wobei angenommen wird, dass sie für die Oligomerisierung der Proteine verantwortlich sind, von denen sie eine Domäne bilden. Sequenzen, die von den fos und jun Leucin-Zippern abgeleitet wurden, wurden in der Bildung von bispezifischen Antikörpern durch Expression von DNA verwendet, die V_L und V_H Regionen von Antikörpern als Fusionsproteine mit Leucin-Zipper-Sequenzen codiert. (Kostelny et al., J. Immunol. 148: 1547, 1992). Leucin-Zipper-Sequenzen wurden auch verwendet, um die Dimerisierungsdomäne des λ-Repressors, ein lösliches DNA-bindendes Protein der Bakteriophage λ (Hu et al., Science 250: 1400, 1990), zu ersetzen, und bei der Herstellung einer dimeren Form von MalE, ein Maltose-bindendes Protein von E. coli, das in den periplasmatischen Raum exportiert wird (Blondel and Bedoulle, Protein Engineering 4: 457, 1991).

[0005] Auf dem Fachgebiet besteht die Notwendigkeit, Verfahren zum Exprimieren biologisch aktiver, rekombinanter, ologimerer Proteine, insbesondere löslicher Proteine, die in ihrer biologisch aktiven Konfiguration membrangebunden sind, zu entwickeln.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0006] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines löslichen Proteins gemäß des in einem der Ansprüche 1–10 dargestellten Verfahrens. In einem Ausführungsbeispiel umfasst das Protein eine extrazelluläre Region eines heterologen Säugetier-Transmembranproteins. Das resultierende Fusionsprotein bildet ein Oligomer von mindestens einem Trimer. In einem anderen Ausführungsbeispiel ist das lösliche Protein eine Cytokin-Domäne, wobei das resultierende Fusionsprotein ein Oligomer von mindestens einem Trimer bildet. Die Leucin-Zipper-Domäne kann aus dem Fusionsprotein durch Spaltung mit einem spezifischen proteolytischen Enzym entfernt werden. Ein heterooligomeres Protein kann unter Verwendung von Leucin-Zipper-Domänen hergestellt werden, die vorzugsweise Hetero-Oligomere bilden. Die vorliegende Erfindung betrifft auch ein Protein, so wie in einem der Ansprüche 11–22 dargelegt, und eine DNA gemäß Anspruch 23.

KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0007] **Fig.** 1A stellt die Fähigkeit des löslichen, oligomeren humanen CD40-L, das eine Leucin-Zipper-Domäne umfasst, dar, die Proliferation von humanen tonsillären B-Zellen stimulieren. **Fig.** 1B stellt die Fähigkeit des löslichen, oligomeren humanen CD40-L, das eine Leucin-Zipper-Domäne umfasst, dar, die Proliferation von humanen peripheren Blut-B-Zellen zu stimulieren.
[0008] **Fig.** 2 zeigt das Hemmen der Bindung von CD27.Fc an MP.1-Zellen, welche CD27-L exprimieren, durch eine lösliche Form von CD27-L, sCD27L-3, die eine Leucin-Zipper-Domäne enthält. Kurve I(---): I = 6'55; K = 7'84e + II; Ka = 2'93e + 07; MF = 8'84e – 10. Kurve 2(–): I = III'49; K = 2'21e + 08; Ka = 2'93e + 07; MF = 8'83e – 10.

DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0009] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren wie es in einem der Ansprüche 1– 10 dargelegt ist.
[0010] Zu beispielhaften Säugetier-Transmembranproteinen gehören Mitglieder der Tumornekrosefaktor-/Nervenwachstumsfaktorrezeptor (TNFR/NGFR)-Familie (Farrah and Smith, Nature 358: 26, 1992; Goodwin et al., Cell 73: 447; 1993), welche den CD40-Liganden (CD40-L), den CD27. Liganden (CD27-L), den OX40-Liganden (OX40-L) und TNF einschließt. Strukturelle Untersuchungen bestimmter Mitglieder dieser Proteinfamilie haben ergeben, dass sie Homotrimere bilden. Das erfinderische Verfahren wird auch für andere Mitglieder dieser Familie nützlich sein.
[0011] Darüber hinaus bilden viele andere Säugetier-Transmembranproteine Oligomere, entweder Hetero-Oligomere oder Homo-Oligomere, in ihrer biologisch aktiven Form. Mitglieder der Hämatopoietin-Rezeptor-Familie (Cosman et al., Trends Biochem. Sci. 15: 265; 1990) sind beispielhaft für solche Proteine. Gearing et al. (Science 255: 1434, 1992) berichtete über das Klonen eines Gens, das ein Protein (gp130) codiert, das hoch affine Bindung sowohl an den Leukämie-Inhibitionsfaktor (LIF) als auch an Oncostatin M (OSM) verlieh, wenn gemeinsam mit einem niedrig affinen LIF-Rezeptor in Zellen exprimiert. Ähnliche Wechselwirkungen eines niedrig affinen Rezeptors und eines zweiten Untereinheit-Proteins, die in einen hoch affinen Rezeptor resultieren, wurden auch für andere Mitglieder dieser Familie vorgeschlagen (Hayashida et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 0655, 1990; Kitamura et al., Cell 66: 1165, 1991; Tavernier et al., Cell 66: 1175, 1991; Devos et al., EMBO J. 10: 2133, 1991). Lösliche Formen der Mitglieder der Hämatopoietin-Rezeptor-Familie werden für ihren verwandten Liganden höhere Affinität aufweisen, wenn sie als Hetero-Oligomere oder – in einigen Fällen – als Homo-Oligomere exprimiert werden. Dasselbe wird für andere Transmembranproteine gelten, die zwei oder mehr Untereinheiten umfassen.
[0012] In einem anderen Ausführungsbeispiel umfasst das heterologe Säugetier-Protein ein lösliches Protein wie ein Cytokin; das resultierende Fusionsprotein bildet ein Oligomer. Cytokine sind lösliche Mediatoren, die von Zellen während einer Immun- oder Entzündungsreaktion freigesetzt werden, welche antigen nicht-spezifische, intrazelluläre Signale bereitstellen, die bei der Regulierung physiologischer Prozesse entscheidend sind. TNFα, TNFβ und bestimmte Neurotrophine wie der Nervenwachstumsfaktor (NGF) gehören zur TNF/NGF-Familie. Modellstudien bestimmter Mitglieder dieser Familie zeigen, dass sie dazu neigen, Oligomere zu bilden (Goh and Porter, Protein Eng. 4: 385, 1991; Peitsch and Jongeneel, Int. Immunol. 5: 233, 1993). Ferner ist auch von anderen Cytokinen, einschließlich des Makrophagen-Kolonien-stimulierenden Faktors (M-CSF; Pandit e al., Science 258: 1358, 1992), bekannt, dass sie oligomer sind. Solche Cytokine werden auch im erfinderischen Verfahren nützlich sein, wobei eine Leucin-Zipper-Domäne die geeignete Quaternärstruktur des oligomeren Cytokins stabilisiert.
[0013] In einem anderen Ausführungsbeispiel werden hetero-oligomere Formen von Cytokinen hergestellt. Ein Fusionsprotein des Granulocyten-Makrophagen-Koloniestimulierenden Faktors (GM-CSF) und Interleukin-3 (IL-3) hat sich als mehr potenter Proliferationsstimulus herausgestellt als einer der Faktoren alleine oder IL-3 und GM-CSF kombiniert (US-Patentschriften 5,073,627 und 5,108,910). Fusionsproteine, die GM-CSF und IL-3 umfassen, sowie DNA-Sequenzen, die solche Fusionsproteine codieren, werden in den US-Patentschriften 5,073,627 bzw. 5,108,910 beschrieben, die beide durch Bezugnahme hierin aufgenommen werden. Ein ähnliches, bivalentes Protein, das sich aus GM-CSF und IL3 zusammensetzt, kann durch Expression dieser Cytokine als Fusionsproteine gebildet werden, die Leucin-Zipper-Domänen umfassen, die vorzugsweise Heterodimere bilden.
[0014] In einem anderen Ausführungsbeispiel wird die Leucin-Zipper-Domäne aus dem Fusionsprotein entfernt, zum Beispiel durch Spaltung mit einem spezifischen proteolytischen Enzym. Zusätzlich zu einer Leucin-Zipper-Sequenz und einem heterologen Protein umfassen solche Fusionsproteine auch eine Aminosäuresequenz, die von einem ausgewählten proteolytischen Enzym erkannt und gespalten wird. Die Leucin-Zipper-Domäne dient dazu, das rekombinante Fusionsprotein während der Expression und der Sekretion zu stabilisieren. Nach der Reinigung des sezernierten Proteins wird der Leucin-Zipper durch Behandlung mit dem proteolytischen Enzym enzymatisch entfernt. Das heterologe Protein kann dann monomer werden. Solche mo-

nomeren Formen löslicher Proteine werden als Rezeptor-Antagonisten nützlich sein, zum Beispiel durch Binden an einen verwandten Rezeptor und Vermeiden von Signalisierung durch Vermeidung von Quervernetzung des Rezeptors.

Leucin-Zipper-Domäne

[0015] Leucin-Zipper-Domäne wurden ursprünglich in mehreren DNA-bindenden Proteinen nachgewiesen (Landschulz et al., Science 240: 1759, 1988). Leucin-Zipper-Domäne ist ein Begriff, der verwendet wird, um auf eine konservierte Peptid-Domäne Bezug zu nehmen, die in diesen (und anderen) Proteinen vorhanden ist, welche für die Dimerisierung der Proteine verantwortlich sind. Die Leucin-Zipper-Domäne (hierin auch als eine oligomerisierende oder Oligomer bildende Domäne bezeichnet) umfasst eine repetitive Heptad-Wiederholung mit vier oder fünf Leucinresten, die mit anderen Aminosäuren durchsetzt sind. Beispiele für eine Leucin-Zipper-Domäne sind jene, die im Hefe-Transkriptionsfaktor GCN4 vorkommen, und ein wärmebeständiges DNA-bindendes Protein, das in Rattenleber vorkommt (C/EBP; Landschulz et al., Science 243: 1681, 1989). Zwei nukleare transformierende Proteine, fos und jun, weisen auch Leucin-Zipper-Domänen auf, so wie das Gen-Produkt des murinen Proto-Onkogens c-myc (Landschulz et al., Science 240: 1759, 1988). Die Produkte der nuklearen Onkogene fos und jun umfassen Leucin-Zipper-Domänen, die vorzugsweise ein Heterodimer bilden (O'Shea et al., Science 245: 646, 1989; Turner and Tjian, Science 243: 1689, 1989). Die Leucin-Zipper-Domäne ist für biologische Aktivität (DNA-Bindung) in diesen Proteinen notwendig.

[0016] Die fusogenen Proteine mehrerer, unterschiedlicher Viren, einschließlich des Paramyxovirus, des Coronavirus, des Masernvirus und vieler Retroviren, besitzen ebenfalls eine Leucin-Zipper-Domäne (Buckland and Wild, Nature 338: 547, 1989; Britton, Nature 353: 394, 1991; Delwart and Mosialos, AIDS Research and Human Retroviruses 6: 703, 1990). Die Leucin-Zipper-Domänen in diesen fusogenen viralen Proteinen befinden sich in der Nähe der transmembranen Region der Proteine; es deutet darauf hin, dass die Leucin-Zipper-Domänen zur oligomeren Struktur der fusogenen Proteine beitragen könnten. Die Oligomerisierung von fusogenen viralen Proteinen ist in die Fusions-Porenbildung involviert (Spruce et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 3523, 1991). Vor kurzem wurde auch berichtet, dass Leucin-Zipper-Domänen eine Rolle bei der Oligomerisierung von Hitzeschock-Transkriptionsfaktoren spielen (Rabindran et al., Science 259: 230, 1993).

[0017] Leucin-Zipper-Domänen falten sich als kurze, parallele Supercoil. (O'Shea et al., Science 254: 539; 1991). Die allgemeine Architektur der parallelen Supercoil wurde mit einer „Knopf in Loch" [„knobs-into-holes"]-Packung gut charakterisiert, so wie von Crick im Jahr 1953 vorgeschlagen (Acta Crystallogr. 6: 689). Das von einer Leucin-Zipper-Domäne gebildete Dimer wird durch die Heptad-Wiederholung stabilisiert, die gemäß dem Vermerk von McLachlan und Stewart (J. Mol. Biol. 98: 293; 1975) als $(abcdefg)_n$ bezeichnet wird, wobei die Reste a und d im Allgemeinen hydrophobe Reste sind, wobei d ein Leucin ist, und auf derselben Fläche einer Helix angeordnet sind. Gegensätzlich geladene Reste kommen häufig an den Positionen g und e vor. Somit werden in einer parallelen Supercoil, das aus zwei spiralförmigen Leucin-Zipper-Domänen gebildet wird, die „Knöpfe" [„knobs"], die durch die hydrophoben Seitenketten der ersten Helix ausgebildet werden, in die „Löcher" [„holes"] gepackt, die zwischen den Seitenketten der zweiten Helix ausgebildet sind.

[0018] Die Leucinreste an der Position d tragen große hydrophobe Stabilisierungsenergien bei und sind für die Dimerbildung wichtig (Krystek et al., Int. J. Peptide Res. 38: 229, 1991). Lovejoy et al. haben vor kurzem über die Synthese eines dreisträngigen α-Helixbündels berichtet, in dem die Helices nach oben-oben-unten verlaufen (Science 259: 1288, 1993). Ihre Untersuchungen haben bestätigt, dass hydrophobe Stabilisierungsenergie die Hauptantriebskraft für die Bildung von Supercoils aus helikalen Monomeren bereitstellt. Diese Untersuchungen zeigen auch, dass elektrostatische Wechselwirkungen zur Stoichiometrie und Geometrie von Supercoils beitragen.

[0019] Mehrere Studien haben gezeigt, dass konservative Aminosäuren durch individuelle Leucinreste bei minimaler Abnahme der Dimerisierungsfähigkeit ausgetauscht werden können; Mehrfachänderungen führen aber üblicherweise zu einem Verlust dieser Fähigkeit (Landschulz et al., Science 243: 1681, 1989; Turner and Tjian, Science 243: 1689, 1989; Hu et al., Science 250: 1400, 1990) van Heekeren et al. berichteten, dass eine Anzahl an unterschiedlichen Aminoresten gegen die Leucinreste in der Leucin-Zipper-Domäne von GCN4 ausgetauscht werden kann, und haben ferner festgestellt, dass einige GCNS-Proteine, die zwei Leucin-Substitutionen enthielten, schwach aktiv waren (Nucl. Acids Res. 20: 3721, 1992). Die Mutation der ersten und zweiten Heptad-Leucine der Leucin-Zipper-Domäne des Masernvirus-Fusionsproteins (MVF) haben sich nicht auf die Syncytium-Bildung ausgewirkt (ein Maß viral induzierter Zellfusion): Die Mutation aller vier Leucin-Reste hat jedoch eine Fusion vollständig verhindert (Buckland et al., J. Gen. Virol. 73: 1703, 1992). Keine der Mutationen wirkte sich auf die Fähigkeit von MVF aus, ein Tetramer zu bilden.

[0020] Kürzlich wurde festgestellt, dass Aminosäuresubstitutionen in den a und d Resten eines synthetischen Peptids, das die GCN4 Leucin-Zipper-Domäne repräsentiert, die Oligomerisierungseigenschaften der Leucin-Zipper-Domäne ändern (Alber, Sixth Symposium of the Protein Society, San Diego; CA). Wenn alle Reste an der Position a auf Isoleucin geändert werden, bildet der Leucin-Zipper noch immer ein paralleles Dimer.

Wenn, zusätzlich zu dieser Änderung, alle Leucinreste bei Position d auch auf Isoleucin geändert werden, bildet das resultierende Peptid spontan eine trimere parallele Supercoil in Lösung. Ein Austausch aller Aminosäuren bei Position d durch Isoleucin und bei Position a durch Leucin, führt zu einem Peptid, das tetramerisiert. Peptide, die diese Substitutionen enthalten, werden noch immer als Leucin-Zipper-Domänen bezeichnet, da angenommen wird, dass der Mechanismus der Oligomerbildung derselbe wie für herkömmliche Leucin-Zipper-Domänen wie jene, die oben beschrieben wurden, ist. Vor der vorliegenden Erfindung war die Auswirkung dieser Substitutionen auf längere Peptide, von denen der Leucine-Zipper nur eine kleine Domäne ist, nicht bekannt, noch war bekannt, ob Peptide, die diese Sequenzen enthalten, durch Zellen exprimiert und sezerniert werden könnten.

Herstellung von Gen-Fragmenten und Oligonukleotiden

[0021] Oligonukleotidfragmente mit ungefähr 12 bis ungefähr 20 Nukleotiden können gemäß auf dem Fachgebiet bekannten Verfahren hergestellt werden, zum Beispiel durch Verwendung eines automatisierten DNA-Synthesizers. Mehrere solche Fragmente, die überlappende Abschnitte eines Peptids codieren, zum Beispiel eine Leucin-Zipper-Domäne, können synthetisiert werden. Auf Grund der Degeneration des genetischen Codes werden die meisten Aminosäuren von zwei oder mehr unterschiedlichen Nukleotid-Triplets codiert. Die Auswahl eines Triplets zum Codieren einer bestimmten Aminosäure hängt unter anderem von dem Organismus ab, in dem das endgültige Genprodukt exprimiert werden soll. Überlappende Fragmente können dann verbunden werden, um eine DNA zu bilden, die ein in Frage kommendes Peptid codiert.

[0022] Eine Polymerasekettenreaktions-Technik (PCR) (Saiki et al., Science 239: 487, 1988) kann angewendet werden, um Gen-Fragmente, die das gesamte oder einen Abschnitt eines in Frage kommenden Proteins codieren, unter Verwendung von 5' (stromaufwärts) und 3' (stromabwärts) Oligonukleotidprimern zu amplifizieren, die aus der bekannten DNA-Sequenz des Gens oder einem Gen abgeleitet werden, das ein verwandtes Protein codiert. Ein beispielhafter Satz an PCR-Bedingungen schließt Folgendes ein: einen Zyklus bei 94°C über einen Zeitraum von 2 Minuten, gefolgt von 42°C über einen Zeitraum von zwei Minuten; 30 Zyklen bei 72°C über einen Zeitraum von 1,5 Minuten, gefolgt von 94°C über einen Zeitraum von einer Minute, danach 48°C über einen Zeitraum von 1 Minute; und ein Zyklus bei 72°C über einen Zeitraum von sieben Minuten. Restriktionsenzymstellen können ebenfalls zu den in Frage kommenden DNA-Sequenzen hinzugefügt werden, um die Ligation des resultierenden PCR-Produktes mit einem Plasmid oder einem Vektor oder mit einer zusätzlichen DNA-Sequenz oder Sequenzen zu erleichtern. Amplifizierte DNA-Sequenzen können im Wesentlichen wie durch Yon und Fried beschrieben (Nucleic Acids Res. 17: 4895; 1989) verbunden werden.

[0023] Wie zum Beispiel in U.S.S.N. 08/097,827, eingereicht am 23. Juli 1993, geoffenbart, wobei diese Offenbarung durch Bezugnahme hierin aufgenommen wird, wurde Volllänge-Maus-OX40 unter Verwendung von 5' (stromaufwärts) und 3' (stromabwärts) Oligonukleotidprimern geklont, basierend auf der veröffentlichten Sequenz von Ratten-OX40. Der Stromaufwärts-Primer umfasste eine Erkennungsstelle für die Restriktionsendonuklease Spe 1 stromaufwärts einer Sequenz, welche die ersten sechs (Nterminalen) Aminosäuren von Ratten-OX40 codiert. Der Stromabwärts-Primer umfasste eine Erkennungsstelle für die Restriktionsendonuklease Spe I stromaufwärts einer Sequenz, welche die letzten fünf (C-terminalen) Aminosäuren von Volllänge-OX40 codiert. Das PCR-Produkt wurde mit Spe I verdaut und ein ungefähr 800 bp Fragment wurde durch Gel-Filtration isoliert und in einer zweiten Runde der PCR-Reaktion verwendet. Das isolierte Fragment wurde in Spe I geschnittenes Plasmid, bBLUESCRIPT SK® (Strategene Cloning Systems, La Jolla, CA), ligiert, das mit einer Kalbdarm-Alkalinphosphatase (CIAP) behandelt worden war, um Selbstligation zu verhindern.

[0024] In einem anderen Beispiel kann eine DNA, die nur die extrazelluläre Region eines Transmembranproteins codiert, durch Deletion von DNA, welche die intrazellulären und transmembranen Abschnitte des Transmembranproteins codiert, erhalten werden. Verfahren zum Bestimmen, welche Reste deletiert werden sollten, und zur Durchführung tatsächlicher Deletionen sind auf dem Fachgebiet an sich bekannt. So beschreiben zum Beispiel Smith et al. eine lösliche Form des menschlichen CD4-Antigens, das durch Deletion des transmembranen und des intrazellulären Abschnitts des CD4-Antigens hergestellt wird (Science 238: 1704, 1987). Treiger et al., stellten eine lösliche Form eines Interleukin-2-Rezeptors unter Verwendung ähnlicher Verfahren her (J. Immunol. 136: 4099, 1986).

[0025] Ein Fusionsprotein kann aus einer extrazellulären Region und einem Protein (oder einem Abschnitt davon) hergestellt werden, von dem bekannt ist, dass es sezerniert wird.

[0026] Zum Beispiel wurden lösliche Proteine, die eine extrazelluläre Domäne aus einem membrangebundenen Protein und eine konstante Region einer schweren Kette von Immunoglobulin umfassen, von Fanslow et al., J. Immunol. 149: 65, 1992 und von Noelle et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A: 89: 6550, 1992 beschrieben. Die extrazelluläre Domäne des murinen T-Lymphozyten-Antigens CD8 wurde auch verwendet, um lösliche Fusionsproteine zu bilden (Hollenbaugh et al., EMBO J. 11: 4313, 1992).

[0027] Fusionsproteine sind Polypeptide, die zwei oder mehr Regionen umfassen, die von verschiedenen – oder heterologen – Proteinen oder Peptiden abgeleitet werden. Fusionsproteine werden unter Verwendung herkömmlicher Techniken des Enzymschneidens und der Ligation von Fragmenten aus gewünschten Sequenzen hergestellt. PCR-Techniken, bei denen synthetische Oligonukleotide zur Anwendung kommen, können verwendet werden, um die gewünschten Fragmente herzustellen und/oder zu amplifizieren. Überlappende synthetische Oligonukleotide, welche die gewünschten Sequenzen darstellen, können auch verwendet werden, um DNA-Konstrukte herzustellen, die Fusionsproteine codieren. Fusionsproteine können mehrere Sequenzen umfassen, einschließlich einer Leitsequenz (oder Signalpeptidsequenz), Linkersequenz, einer Leucin-Zipper-Sequenz oder anderer Oligomer bildender Sequenzen und Sequenzen, die hoch antigene Anteile codieren, die ein Mittel für leichte Reinigung oder rasche Detektion eines Fusionsproteins bereitstellen.

[0028] Signalpeptide erleichtern die Sekretion von Proteinen aus Zellen. Ein beispielhaftes Peptid ist die amino-terminale 25 Aminosäure der Leitsequenz von murinem Interleukin-7 (IL-7; Namen et al., Nature 333: 571; 1988). Andere Signalpeptide können ebenfalls verwendet werden. Ferner können bestimmte Nukleotide in der IL-7 Leitsequenz geändert werden, ohne die Aminosäuresequenz zu ändern. Darüber hinaus können Aminosäureänderungen, die sich nicht auf die Fähigkeit der IL-7-Sequenz auswirken, als eine Leitsequenz zu wirken, durchgeführt werden.

[0029] Das Flag® Octapeptid (SEQ-ID. Nr. 1; Hopp et al., Bio/Technology 6: 1204, 1988) ändert die biologische Aktivität von Fusionsproteinen nicht, ist hoch antigen und stellt ein Epitop bereit, das durch einen spezifischen monoklonalen Antikörper reversibel gebunden ist, wodurch schnelle Detektion und leichte Reinigung des exprimierten Fusionsproteins möglich wird. Die Flag®-Sequenz wird auch speziell durch Rinder-Schleimhautenterokinase am Rest gespalten, der unmittelbar auf die Asp-Lys-Paarung folgt. Fusionsproteine, die mit diesem Peptid gekappt werden, können auch gegenüber intrazellulärem Abbau in E. coli resistent sein. Ein muriner monoklonaler Antikörper, der die Flag®-Sequenz bindet, wurde bei der ATCC unter der Zugangsnummer HB 9259 hinterlegt; Verfahren zur Verwendung des Antikörpers bei der Reinigung von Fusionsproteinen, welche die Flag®-Sequenz umfassen, werden in der US-Patentschrift 5,011,912 beschrieben, die hierin durch Bezugnahme aufgenommen wird.

[0030] Ein in Frage kommendes Protein kann direkt mit einem anderen Protein verbunden werden, um ein Fusionsprotein zu bilden. Alternativ dazu können die Proteine durch einen Abstand getrennt sein, der ausreicht, um zu gewährleisten, dass die Proteine richtige Sekundär- und Tertiärstrukturen bilden. Geeignete Linkersequenzen (1) werden eine flexible verlängerte Konformation annehmen, (2) werden keine Neigung zur Entwicklung einer geordneten sekundären Struktur aufweisen, die mit den funktionellen Domänen der Fusionsproteine interagieren könnte, und (3) werden minimale hydrophobe oder geladene Eigenschaft aufweisen, welche die Wechselwirkung mit den funktionellen Protein-Domänen fördern könnte. Typische Oberflächenaminosäuren in flexiblen Proteinregionen schließen Gly, Asn und Ser ein. Bei praktisch jeder Permutation von Aminosäuresequenzen, die Gly, Asn und Ser enthalten, würde man annehmen, dass sie die oben angeführten Kriterien für eine Linkersequenz erfüllt. Andere beinahe neutrale Aminosäuren, wie Thr und Ala, können ebenfalls in der Linkersequenz verwendet werden. Die Länge der Linkersequenz kann variieren, ohne sich merklich auf die biologische Aktivität des Fusionsproteins auszuwirken. Linkersequenzen sind nicht notwendig, wenn die Proteine, die fusioniert sind, nichtwesentliche N- oder C-terminale Aminosäureregionen aufweisen, die verwendet werden können, um die funktionellen Domänen zu trennen und sterische Interferenz zu vermeiden. Beispielhafte Linkersequenzen werden in den US-Patentschriften 5,073,627 und 5,108,910 beschrieben, deren Offenbarungen hierin durch Bezugnahme aufgenommen werden.

[0031] Wenn ein oligomeres Fusionsprotein aus dem extrazellulären Abschnitt eines Transmembranproteins gebildet wird, wird eine DNA-Sequenz, die eine Oligomer bildende Domäne codiert, wie eine Leucin-Zipper-Domäne, mit einer DNA-Sequenz verschmolzen, welche die extrazelluläre Region des Transmembranproteins codiert. Die Mitglieder des Fusionsproteins werden verbunden, so dass die Oligomer bildende Domäne des Fusionsproteins in derselben Ausrichtung relativ zum Fusionsprotein positioniert ist wie die transmembrane und die intracytoplasmatische Region des nativen Transmembranproteins. Ein oligomeres Fusionsprotein wird durch die Supercoil-Wechselwirkung der Leucin-Zipper-Domäne stabilisiert. Somit wird in einem Beispiel ein Fusionsprotein, das eine extrazelluläre Region, die von einem Liganden für CD40 (CD40-L) abgeleitet ist, ein Typ-II-Transmembranprotein, das in U.S.S.N. 07/969,703 beschrieben ist, dessen Offenbarung hierin durch Bezugnahme aufgenommen wird, die Oligomer bildende Domäne und eine Leucin-Zipper-Sequenz umfasst, mit dem amino-proximalen Ende der extrazellulären Region verschmolzen. In einem Fusionsprotein, das von einem Typ-I-Transmembranprotein abgeleitet ist, würde die Oligomer bildende Domäne mit dem carboxy-proximalen Ende der extrazellulären Region des Typ-I-Transmembranproteins verschmolzen werden. Andere Transmembranproteine durchqueren die Zellmembran öfter als einmal. Solche Transmembranproteine werden zwei oder mehr unterschiedliche extrazelluläre Regionen aufweisen. Lösliche, oligomere Fusionsproteine können auch aus zwei oder mehreren solcher unterschiedlichen extrazellulären Regionen aus demsel-

ben Transmembranprotein hergestellt werden.

[0032] Es können auch oligomere Formen von Proteinen, die natürlicherweise in löslicher Form vorkommen, hergestellt werden. In diesen Fällen wird die Oligomer bildende Domäne mit dem löslichen Protein verbunden, so dass die Bildung eines Oligomers der Konformation des biologisch aktiven, löslichen Proteins folgt. Ferner können entweder homo-oligomere Proteine oder hetero-oligomere Proteine hergestellt werden, je nachdem, ob die oligomerisierende(n) Domäne(n) des Fusionsproteins vorzugsweise Hetero-Oligomere oder Homo-Oligomere bilden.

Expressionsvektoren

[0033] Rekombinante Expressionsvektoren für die Expression eines eine Oligomer bildende Domäne und ein heterologes Säugetier-Protein aufweisenden Fusionsproteins, durch rekombinante DNA-Techniken schließen eine DNA-Sequenz ein, welche ein synthetisches oder cDNA-abgeleitetes DNA-Fragment umfasst, das eine Oligomer bildende Domäne codiert, im Rahmen verbunden mit einem DNA-Fragment, welches das heterologe Protein codiert. Diese DNA-Fragmente sind operativ mit geeigneten transkriptionalen und/oder translationalen regulatorischen Nukleotidsequenzen verbunden, wie jenen, die aus einem Säugetier-Gen, einem mikrobiellen, viralen oder Insekten-Gen abgeleitet sind. Beispiele für regulatorische Sequenzen schließen Sequenzen, die eine regulatorische Rolle bei der Gen-Expression spielen (z. B. ein Transkriptions-Promotor oder Transkriptions-Verstärker), eine Operator-Sequenz zur Kontrolle der Transkription, eine Sequenz, die eine mRNA ribosomale Bindungsstelle codiert, eine Polyadenylierungsstelle, Spleiss-Spender- und Akzeptor-Stellen und geeignete Sequenzen ein, welche die Transkription, die Translationsinitiation und die Translationstermination steuern. Außerdem können Sequenzen, die Signalpeptide codieren, in Expressionsvektoren aufgenommen werden. Zum Beispiel kann eine DNA-Sequenz für ein Signalpeptid (sekretorischer Leiter) operativ mit einer DNA verbunden sein, die ein Fusionsprotein codiert, das eine Oligomer bildende Domäne und ein heterologes Säugetier-Protein aufweist. Das Signalpeptid wird als ein Teil einer Vorläufer-Aminosäuresequenz exprimiert; das Signalpeptid ermöglicht eine verbesserte extrazelluläre Sekretion von translatiertem Fusionspolypeptid durch eine Hefe-Wirtszelle.

[0034] Nukleotidsequenzen sind operativ verbunden, wenn sich die regulatorische Sequenz funktionell auf die DNA bezieht, die das Fusionsprotein codiert. Somit ist eine Promotor-Nukleotidsequenz mit einer DNA operativ verbunden, welche ein Fusionsprotein codiert, wenn die Promotor-Nukleotidsequenz die Transkription der DNA steuert, die das Fusionsprotein codiert. Darüber hinaus kann eine Ribosomen-Bindungsstelle operativ mit einer Sequenz für ein Fusionsprotein verbunden sein, wenn die Ribosomen-Bindungsstelle innerhalb des Vektors angeordnet ist, um eine Translation zu fördern.

[0035] Transkriptionale und translationale Kontrollsequenzen für Säugetier-Wirtszellen-Expressionsvektoren können aus viralen Genomen ausgeschnitten werden. Zum Beispiel werden häufig verwendete Säugetierzell-Promotorsequenzen und Verstärkersequenzen aus dem Polyoma Virus, dem Adenovirus 2, Simian Virus 40 (SV40) und dem menschlichen Cytomegalovirus abgeleitet. DNA-Sequenzen, die vom SV40 viralen Genom, zum Beispiel dem SV40-Ursprung, von frühen und späten Promotoren, Verstärker-, Spleiss- und Polyadenylierungsstellen abgeleitet werden, können verwendet werden, um die anderen genetischen Elemente bereitzustellen, die für die Expression einer strukturellen Gensequenz in einer Säugetier-Wirtszelle erforderlich sind. Virale frühe und späte Promotoren sind besonders nützlich, weil beide leicht aus einem viralen Genom als ein Fragment erhalten werden, das auch einen viralen Replikationsursprung enthalten kann (Fiers et al., Nature 273: 113, 1978). Kleinere oder größere SV40-Fragmente können auch verwendet werden, sofern die ungefähr 250 bp Sequenz, die sich von der Hind III Stelle zur Bgl I Stelle in der SV40 viralen Replikationsursprungsstelle erstreckt, eingeschlossen ist.

[0036] Beispielhafte Säugetier-Expressionsvektoren können so konstruiert werden wie durch Okayama und Berg (Mol. Cell. Biol. 3: 280, 1983) geoffenbart. Ein nützlicher Hochexpressionsvektor, PMLSV N1/N4, der von Cosman et al., Nature 312: 768, 1984 beschrieben wird, wurde unter der Nummer ATCC 39890 hinterlegt. Zusätzliche nützliche Säugetier-Expressionsvektoren werden in EP-A-0367566 und in der US-Patentanmeldung mit der Seriennummer 07/701,415, eingereicht am 16. Mai 1991, beschrieben, die hierin durch Bezugnahme aufgenommen werden. Zur Expression einer Typ-II-Protein extrazellulären Region, wie einem OX40-L, kann eine heterologe Signalsequenz hinzugefügt werden, wie die Signalsequenz für Interleukin-7 (IL-7), die in der US-Patentschrift 4,965,195 beschrieben wird, oder die Signalsequenz für den Interleukin-2-Rezeptor, die in der US-Patentanmeldung 06/626,667, eingereicht am 2. Juli 1984, beschrieben wird. Ein weiterer beispielhafter Vektor ist pDC406, der regulatorische Sequenzen einschließt, die von SV40, dem humanen Immunschwächevirus (HIV) und dem Epstein-Barr-Virus (EBV) abgeleitet sind.

[0037] Expressionsvektoren, die in prokaryotische Wirtszellen transfekiert werden, umfassen im Allgemeinen einen oder mehrere phenotypische selektierbare Marker. Ein phenotypischer selektierbarer Marker ist zum Beispiel ein Gen, das ein Protein codiert, das Antibiotikaresistenz überträgt oder eine autotrophe Anforderung liefert, und ein Replikationsursprung, der vom Wirt erkannt wird, um die Amplifikation innerhalb des Wirts zu

gewährleisten. Andere nützliche Expressionsvektoren für prokaryotische Wirtszellen schließen einen selektierbaren Marker bakteriellen Ursprungs ein, der von im Handel erhältlichen Plasmiden abgeleitet wird. Dieser selektierbare Marker kann genetische Elemente des Klonvektors pBR322 (ATCC 37017) aufweisen. pBR322 enthält Gene für Ampicillin- und Tetracyclin-Resistenz und stellt somit einfache Mittel bereit, um transformierte Zellen nachzuweisen. Die pBR322 „Rückgrat"-Abschnitte werden mit einem geeigneten Promotor und einer OX40-L DNA-Sequenz verbunden. Zu anderen im Handel erhältlichen Vektoren zählen zum Beispiel pKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden) und pGEM 1 (Promega Biotec, Madison, WI, USA).

[0038] Promotorsequenzen werden häufig für rekombinante prokaryotische Wirtszellen-Expressionsvektoren verwendet. Zu häufigen Promotorsequenzen zählen β-Lactamase (Penicillinase), das Lactose-Promotorsystem (Chang et al., Nature 275: 615, 1978; und Goeddel et al., Nature 281: 544, 1979), das Tryptophan (trp) Promotorsystem (Goeddel et., Nucl. Acids Res. 8: 4057, 1980; und EP-A-36776) sowie der Tac-Promotor (Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Seite 412, 1982). Ein besonders nützliches prokaryotisches Wirtszellen-Expressionssystem verwendet einen Phagen λ P_L Promotor und eine cI857ts wärmelabile Repressorsequenz. Plasmidvektoren, die von der American Type Culture Collection erhältlich sind, welche Derivate des λ P_L Promotors aufnehmen, schließen Plasmid pHUB2 (resident im E. coli Strang MJB9 (ATCC 37092)) und pPLc28 (resident in E. coti RR1 (ATCC 53082)) ein.

Wirtszelten

[0039] Geeignete Wirtszellen für die Expression eines eine Oligomer bildende Domäne und ein heterologes Säugetier-Protein enthaltenden Fusionsproteins, schließen Prokaryote und Hefe oder höhere eukaryotische Zellen ein. Prokaryote schließen gramnegative oder grampositive Organismen ein, 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 Pseudomonas, Streptomyces und Staphylococcus ein. Höhere eukaryotische Zellen schließen etablierte Zelllinien mit Säugetierursprung ein. Zellfreie Translationssysteme könnten auch verwendet werden, um ein Fusionsprotein, das eine Oligomer bildende Domäne und ein heterologes Säugetierprotein enthält, unter Verwendung einer RNA zu erzeugen, die von DNA-Konstrukten abgeleitet wird, die hierin offenbart werden.

[0040] In einer prokaryotischen Wirtszelle, wie E. coli, kann ein Fusionsprotein einen Nterminalen Methioninrest einschließen, um die Expression des rekombinanten Polypeptids in der prokaryotischen Wirtszelle zu erleichtern. Das N-terminate Met kann von dem exprimierten rekombinanten Fusionsprotein gespaltet werden. Prokaryotische Wirtszellen können für die Expression von Fusionsproteinen verwendet werden, die keine extensive proteotytische oder Disulfid-Verarbeitung erfordern.

[0041] Geeignete Klonungs- und Expressionsvektoren zur Verwendung mit bakteriellen, Pilz-, Hefe- und Säugetier-Zellwirten werden zum Beispiel in Pouwels et al. Cloning Vectors: A Laboratory Manual, Elsevier, New York (1985) beschrieben. Ein Expressionsvektor, der die rekombinante Fusionsprotein DNA trägt, wird in eine im Wesentlichen homogene Kultur eines geeigneten Wirts-Mikroorganismus oder einer Säugetier-Zeltlinie gemäß den Verfahren transfektiert oder transformiert, die auf dem Fachgebiet bekannt sind, um transfektierte oder transformierte Wirtszellen zu bilden, welche das Fusionsprotein exprimieren. Das exprimierte Fusionsprotein wird sich innerhalb der Wirtszelle befinden und/oder in Kultur Überstand-Flüssigkeit sezerniert, je nach Natur der Wirtszelle und des Gen-Konstrukts, das in die Wirtszelle eingefügt ist.

[0042] Ein Fusionsprotein, das eine Oligomer bildende Domäne und ein heterologes Säugetier-Protein umfasst, kann in Hefe-Wirtszellen exprimiert werden, vorzugsweise von der Gattung Saccharomyces (z. B. S. cerevisiae). Andere Hefegattungen wie Pichia oder Kluyveromyces können ebenfalls verwendet werden. Hefe-Vektoren werden oft eine Replikationsursprungssequenz von einem 2 μ Hefe-Plasmid, eine autonom replizierende Sequenz (ARS), eine Promotor-Region, Sequenzen für die Polyadenylierung und Sequenzen für die Transkriptionstermination enthalten. Vorzugsweise schließen Hefe-Vektoren eine Replikationsursprungssequenz und selektierbare Marker ein. Geeignete Promotorensequenzen für Hefe-Vektoren schließen Promotoren für Metallothion, 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-phosphatdehydrogenase, Hexokinase, Pyruvatdecarboxylase, Phosphofructokinase, Glucose-6-phosphatisomerase, 3-Phosphoglyceratmutase, Pyruvatkinase, Triosephosphatisomerase, Phosphoglucoseisomerase und Glucokinase ein. Andere geeignete Vektoren und Promotoren zur Verwendung in der Hefeexpression werden ferner in Hitzeman, EPA-73,657 beschrieben.

[0043] Hefe-Vektoren können zum Beispiel unter Verwendung von DNA-Sequenzen aus pBR322 zur Auswahl und Replikation in E. coli (Amp^T Gen und Replikationsursprung) zusammengesetzt werden. Andere Hefe-DNA-Sequenzen, die in ein Hefe-Expressionskonstrukt eingeschlossen werden können, umfassen einen Glucosereprimierbaren ADH2-Promotor und einen α-Faktor Sekretionsleiter. Der ADH2-Promotor wurde von Russel et al. (J. Biol. Chem. 258: 2674, 1982) und Beier et al. (Nature 300: 724, 1982) beschrieben. Die Hefe

α-Faktor Leitsequenz leitet die Sekretion von heterologen Polypeptiden. Die α-Faktor Leitsequenz wird oft zwischen die Promotor-Sequenz und die strukturelle Gen-Sequenz eingefügt. Siehe z. B. Kurjan et al., Cell 30: 933, 1982 und Bitter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 5330, 1984. Andere Leitsequenzen, die für die Erleichterung der Sekretion von rekombinanten Polypeptiden aus Hefe-Wirten geeignet sind, sind dem Durchschnittsfachmann bekannt. Eine Leitsequenz kann in der Nähe ihres 3'-Endes modifiziert werden, um eine oder mehrere Restriktionsstellen zu enthalten. Das wird die Fusion der Leitsequenz mit dem Struktur-Gen erleichtern.

[0044] Hefetransformationsprotokolle sind Durchschnittsfachmännern bekannt. Ein solches Protokoll wird von Hinnen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 1929, 1978 beschrieben. So kann man sich zum Beispiel für Trp^+ Transformanten in einem selektiven Medium entscheiden, wobei das selektive Medium aus 0,67% Hefestickstoffbase, 0,5% Gasaminosäure, 2% Glucose, 10 μg/ml Adenin und 20 μg/ml Uracil besteht. Hefe-Wirtszellen, die durch Vektoren transformiert wurden, die eine ADH2-Promotorsequenz enthalten, können vermehrt werden, um Expression in einem „reichen" Medium zu induzieren. Ein Beispiel für ein reiches Medium ist eines, das aus 1% Hefeextrakt, 2% Pepton und 1% Glucose besteht, ergänzt mit 80 μg/ml Adenin und 80 μg/ml Uracil. Zur Derepression des ADH2-Promotors kommt es, wenn Glucose aus dem Medium vollständig aufgebraucht wird.

[0045] Säugetier- oder Insekten-Wirtszellenkultursysteme könnten auch verwendet werden, um ein rekombinantes Fusionsprotein zu exprimieren. Beispiele geeigneter 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 CRL 163), chinesische Hamster-Eierstockzellen (CHO-Zellen), HeLa-Zellen, BHK (ATCC CRL 10)-Zelllinien und CV-1/EBNA-Zellen (ATCC CRL 10478) ein. Die CV-1/EBNA-Zelllinie wurde durch Transfektion der CV-1-Zelllinie mit einem Gen abgeleitet, welches das Epstein-Barr-Virus Nuklear-Antigen-1 (EBNA-1) codiert, das EBNA-1, das von dem menschlichen CMV immediaten-frühen Verstärker/Promotor gelenkt wird, konstitutiv exprimiert. Ein EBNA-1 Gen ermöglicht eine episomale Replikation von Expressionsvektoren, die den EBV-Replikationsursprung enthalten.

Protein-Reinigung

[0046] Gereinigte lösliche Fusionsproteine werden durch Kultivieren geeigneter Wirts-Nektorensysteme hergestellt, um die rekombinanten löslichen Fusionsproteine zu exprimieren, die dann aus Kulturmedien- oder Zellextrakten unter Verwendung von Standardverfahren zur Protein-Reinigung gereinigt werden, die für jedes einzelne lösliche Fusionsprotein optimiert werden.

[0047] Zum Beispiel werden Überstände aus Systemen, die rekombinantes Protein in Kulturmedien sezernieren, geklärt und unter Verwendung eines im Handel erhältlichen Protein-Konzentrationsfilters, zum Beispiel einer Amicon oder Millipore-Pellicon-Ultrafiltrationseinheit, konzentriert. Nach dem Konzentrationsschritt kann das Konzentrat bei einer geeigneten Reinigungsmatrix verwendet werden. Geeignete Matrizen schließen jene ein, die bei der Affinitätschromatographie nützlich sind. Zum Beispiel kann eine geeignete Affinitätsmatrix ein verwandtes Protein umfassen, an welches das Fusionsprotein bindet, oder Lectin oder ein Antikörpermolekül, welches das Fusionsprotein bindet, das an einen geeigneten Träger gebunden ist.

[0048] Alternativ dazu kann ein Ionenaustauscherharz, zum Beispiel ein Anionenaustauscherharz, das eine Matrix oder ein Substrat umfasst, das hängende Diethylaminoethyl(DEAE)-Gruppen aufweist, oder ein anderer geeigneter Anionenaustauscher verwendet werden. Die Matrizen können Acrylamid, Agarose, Dextran, Zellulose oder andere Typen sein, die häufig bei der Protein-Reinigung eingesetzt werden. Alternativ dazu kann ein Kationenaustauschschritt durchgeführt werden. Geeignete Kationenaustauscher schließen verschiedene unlösliche Matrizen ein, die Sulfopropyl- oder Carboxymethylgruppen umfassen.

[0049] Ein oder mehrere Schritte zur Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (RP-HPLC), bei denen hydrophobe RP-HPLC Medien eingesetzt werden, z. B. Silica-Gel mit hängenden Methyl- oder anderen aliphatischen Gruppen, können verwendet werden, um ein lösliches Fusionsprotein weiter zu reinigen. Größenausschlusschromatographie ist auch bei der Reinigung von löslichen Fusionsproteinen nützlich. Zusätzlich können auch hydrophobe Träger bei Niedrigdruckbedingungen verwendet werden: ein beispielhaftes Medium ist Phenyl-Sepharose. Einige oder alle der vorhergehenden Reinigungsschritte können, in verschiedenen Kombinationen, auch durchgeführt werden, um ein homogenes rekombinantes Protein bereitzustellen.

Biologische Aktivität

[0050] Biologische Aktivität von rekombinanten, löslichen Fusionsproteinen wird durch Binden des rekombinanten, löslichen Fusionsproteins an ein verwandtes Molekül vermittelt. Ein verwandtes Molekül wird als Molekül definiert, welches das rekombinante lösliche Fusionsprotein in einer nicht-kovalenten Wechselwirkung basierend auf der richtigen Konformation des rekombinanten löslichen Fusionsproteins und des verwandten Moleküls bindet. Zum Beispiel umfasst bei einem rekombinanten löslichen Fusionsprotein, das eine extrazel-

luläre Region eines Rezeptors umfasst, das verwandte Molekül einen Liganden, der die extrazelluläre Region des Rezeptors bindet. Im Gegensatz dazu umfasst bei einem rekombinanten löslichen Fusionsprotein, das einen Liganden umfasst, das verwandte Molekül einen Rezeptor (oder ein Bindungsprotein), das den Liganden bindet.

[0051] Die Bindung eines rekombinanten Fusionsproteins an ein verwandtes Molekül ist ein Marker für die biologische Aktivität. Eine solche Bindungsaktivität kann zum Beispiel durch Konkurrenz bei der Bindung an die Bindungsdomäne des verwandten Moleküls (d. h. durch kompetitive Bindungs-Assays) bestimmt werden. Bei einer Konfiguration eines kompetitiven Bindungs-Assays für ein rekombinantes lösliches Fusionsprotein, das einen Liganden umfasst, werden ein radioaktiv markierter, löslicher Rezeptor und intakte Zellen verwendet, die eine native Form des Liganden exprimieren. Ein solcher Assay ist in Beispiel 4 des vorliegenden Dokumentes dargestellt. In ähnlicher Weise verwendet ein kompetitiver Assay für ein rekombinantes lösliches Fusionsprotein, das einen Rezeptor umfasst, einen radioaktiv markierten, löslichen Liganden und intakte Zellen, die eine native Form des Rezeptors exprimieren. Anstatt intakter Zellen, die eine native Form des verwandten Moleküls exprimieren, könnte man ein gereinigtes verwandtes Molekül tauschen, das an eine feste Phase gebunden ist. Kompetitive Bindungs-Assays können unter Anwendung von Standardverfahren durchgeführt werden. Qualitative oder halb-quantitative Ergebnisse können durch kompetitive autoradiographische Plattenbindungs-Assays erhalten werden, oder fluoreszenzaktivierte Zellsortierung oder Scatchard-Plots können verwendet werden, um quantitative Ergebnisse zu erzeugen.

[0052] Die biologische Aktivität kann auch unter Verwendung von Bioassays gemessen werden, die auf dem Fachgebiet bekannt sind, beispielsweise durch einen Zellproliferations-Assay. Beispielhafte Bioassays werden in Beispiel 2 des vorliegenden Dokumentes beschrieben. Die Art des verwendeten Zellproliferations-Assays hängt vom rekombinanten löslichen Fusionsprotein ab. Ein Bioassay für ein rekombinantes lösliches Fusionsprotein, das in seiner nativen Form auf T-Zellen wirkt, verwendet gereinigte T-Zellen, die durch Verfahren erhalten werden, die auf dem Fachgebiet bekannt sind. Solche Bioassays schließen Kostimulations-Assays ein, bei denen die gereinigten T-Zellen in Gegenwart des rekombinanten löslichen Fusionsproteins und eines suboptimalen Pegels eines Mitogens wie Con A oder PHA inkubiert werden. In ähnlicher Weise werden gereinigte B-Zellen für ein rekombinantes lösliches Fusionsprotein verwendet, das in seiner nativen Form auf B-Zellen wirkt. Es können auch andere Zelltypen ausgewählt werden, basierend auf dem Zelltyp, auf den die native Form des rekombinanten löslichen Fusionsproteins wirkt. Die Proliferation wird durch Messen der Aufnahme einer radioaktiv markierten Substanz, wie ^{3}H Thymidin, gemäß standardmäßigen Verfahren bestimmt.

[0053] Eine wiederum andere Assay-Art zur Bestimmung der biologischen Aktivität ist die Induktion von Sekretion sekundärer Moleküle. Zum Beispiel induzieren bestimmte Proteine Sekretion von Cytokinen durch T-Zellen. T-Zellen werden gereinigt und mit einem rekombinanten löslichen Fusionsprotein unter Bedingungen stimuliert, die erforderlich sind, um eine Cytokin-Sekretion (zum Beispiel in der Gegenwart eines Comitogens) zu induzieren. Die Induktion von Cytokin-Sekretion wird durch Bioassay bestimmt, wobei die Proliferation einer cytokin-abhängigen Zelllinie gemessen wird. In ähnlicher Weise wird die Induktion von Immunoglobulin-Sekretion durch Messen der Menge an Immunoglobulin bestimmt, die durch gereinigte B-Zellen sezerniert werden, die mit einem rekombinanten löslichen Fusionsprotein stimuliert werden, das in seiner nativen Form auf B-Zellen wirkt, wobei ein quantitativer (oder halb-quantitativer) Assay wie zum Beispiel ein Enzym-Immunoassay verwendet wird. Beispiel 2 stellt solche Assays vor.

[0054] Die relevanten Offenbarungen aller hier zitierten Literaturhinweise werden ausdrücklich durch Bezugnahme hierin aufgenommen. Die folgenden Beispiele dienen nur der Veranschaulichung und haben keinerlei einschränkenden Charakter.

BEISPIEL 1

[0055] Dieses Beispiel beschreibt die Konstruktion eines CD40-L DNA-Konstrukts zum Exprimieren eines löslichen CD40-L Fusionsproteins, das als trimerer CD40-L bezeichnet wird. CD40-L ist ein auf aktivierten T-Zellen vorkommendes Typ-II-Transmembranprotein, das auf einen Liganden für das B-Zell-Antigen, CD40, wirkt (Armitage et al., Nature 357: 80, 1992; Spriggs et al., J. Exp. Med. 176: 1543, 1992). Ein Gen, das CD40-L codiert, wurde geklont und so sequenziert wie in U.S.S.N. 07/969,703, eingereicht am 23. Oktober 1992, beschrieben, wobei dessen Offenbarung hierin durch Bezugnahme aufgenommen wird. CD40-L ist ein Mitglied der Tumornekrosefaktor(TNF)-Familie von Proteinen: Es wird angenommen, dass verschiedene Mitglieder dieser Familie in trimerer Form existieren.

[0056] Ein trimerer CD40-L enthält eine Leitsequenz, eine 33 Aminosäuren-Sequenz, die als „Leucin-Zipper" (SEQ-ID Nr. 2) bezeichnet wird, und eine 8 Aminosäuren hydrophile Sequenz, die von Hopp et al. beschrieben wird (Hopp et al., Bio/Technology 6: 1204, 1988; SEQ-ID Nr. 1; als Flag® bezeichnet), gefolgt von der extrazellulären Region von humanem CD40-L (Aminosäure 50 bis Aminosäure 268 der SEQ-ID Nr. 3 und 4). Die Nützlichkeit der Leitersequenz und der Flag®-Sequenz wurden bereits zuvor beschrieben. Die 33 Aminosäuren-Sequenz, die in SEQ-ID. Nr. 2 dargestellt wird, trimerisiert spontan in Lösung. Bei Fusionsproteinen, die diese 33

Aminosäuren-Sequenz umfassen, wird daher davon ausgegangen, dass sie spontan Trimere oder Multimere bilden.

[0057] Das Konstrukt wird durch Synthetisierung von Oligonukleotiden hergestellt, die eine Leitsequenz, die oben beschriebene 33 Aminosäuren-Sequenz (SEQ-ID. Nr. 2) und die Flag®-Sequenz (SEQ-ID. Nr. 1) darstellen, wobei im Anschluss daran das Endprodukt an ein DNA-Fragment ligiert wird, das die extrazelluläre Region von menschlichem CD40-L (Aminosäuren 50 bis 261 von SEQ-ID. Nr. 3 und 4) codiert.

[0058] Das resultierende Ligationsprodukt im Expressionsvektor pDC406 wurde in die Affennierenzelllinie CV-1/EBNA (ATCC CRL 10478) transfektiert. Das pDC406-Plasmid schließt regulatorische Sequenzen ein, die von SV40, dem humanen Immundefizienzvirus (HIV) und dem Epstein-Barr (EBV)-Virus abgeleitet werden. Die CV-1/EBNA-Zelllinie wurde durch Transfektion der CV-1-Zelllinie mit einem Gen abgeleitet, welches das Epstein-Barr-Virus nukleare Antigen-1 (EBNA-1) codiert, das EBNA-1, das von dem humanen CMV intermediär-frühen Verstärker/Promotor gelenkt wird, konstitutiv exprimiert. Das EBNA-1-Gen ermöglicht episomale Replikation von Expressionsvektoren, wie pDC406, welche den EBV-Replikationsursprung enthalten.

[0059] Sobald Zellen, welche das Fusionskonstrukt exprimieren, nachgewiesen wurden, werden Massenkulturen von transfizierten Zellen gezüchtet, um Überstände aus Zellen, die löslichen, oligomeren CD40-L exprimieren, zu akkumulieren. Das lösliche, oligomere CD40-L-Fusionsprotein in überstehender Flüssigkeit wird durch Affinitätsreinigung gereinigt, so wie im Wesentlichen in der US-Patentschrift 5,011,912 beschrieben. sCD40-L kann auch unter Verwendung anderer Protein-Reinigungsverfahren gereinigt werden, so wie hierin beschrieben. Silbergefärbte SDS-Gels des löslichen, oligomeren CD40-L-Fusionsproteins können hergestellt werden, um die Reinheit zu bestimmen. Ähnliche Verfahren werden verwendet, um ein Trimer bildendes Konstrukt herzustellen und zu reinigen, das die extrazelluläre Region von murinem CD40-L (Aminosäure 50 bis Aminosäure 260 von SEQ-ID. Nr. 5 und 6) umfasst. Löslicher CD40-L weist eine ähnliche biologische Aktivität wie der membrangebundene CD40-L auf, so wie in Beispiel 2 gezeigt.

Beispiel 2

[0060] Dieses Beispiel illustriert proliferierende Aktivität von B-Zellen und die Induktion von polyklonaler Immunoglobulin-Sekretion unter Verwendung von löslichem, oligomerem CD40-L, der wie in Beispiel 1 beschrieben hergestellt wurde. Humane B-Zellen wurden im Wesentlichen so wie in Armitage et al. (J. Immunol. 150: 3671; 1993) beschrieben, gereinigt. Tonsilläres Gewebe wurde kurz sanft gereizt und die resultierende Zellsuspension über Histopaque® (Sigma, ST. Louis, MO) zentrifugiert. T-Zellen-erschöpfte Präparationen von Zellen (E^-) wurden durch Entfernen von T-Zellen mit Hilfe von Rosetting mit 2-Aminoethylisothiouroniumbromid-behandelten SRBC (rote Blutzellen vom Schaf) und Behandlung mit B-Zellen-Lympho-kwik (One Lambda Inc., Los Angeles, CA) über einen Zeitraum von 1 Stunde bei 37°C erhalten, um kontaminierende nicht-B-Zellen zu lysieren. Periphere mononukleare Blutzellen (PBMC) wurden auf dieselbe Weise isoliert, wobei als zusätzlicher Schritt die teilweise gereinigten Zellen mit 5 mM Leucin-Methylester (Leu ME; Sigma, St. Louis, MO) in einem serumfreien Medium eine Stunde lang bei Raumtemperatur vor dem Lympho-kwik-Schrittbehandelt wurden, um phagocytische Zellen zu entfernen.

[0061] Die B-Zellen-Proliferation wurde mit einem ^{3}H-Thymidin-Inkorporations-Assay gemessen, im Wesentlichen wie in Armitage et al., supra. beschrieben. Zellen wurden drei Tage lang in der Gegenwart von löslichem, oligomerem CD40-L, alleine oder in Gegenwart von 5 ng/ml IL-4 (Immunex Corporation, Seattle, WA), 5 µg/m1 anti-IgM beschichteten Perlen (BioRad, Richmond, CA) oder einer Kombination von IL-4 und anti-IgM kultiviert. Die Ergebnisse eines repräsentativen Experiments zur Evaluierung der Fähigkeit von löslichem, oligomerem CD40-L, B-Zellen-Proliferation zu induzieren, werden in **Fig.** 1A und 1B gezeigt. sCD40-L induzierte Proliferation von tonsillären B-Zellen in der Gegenwart von IL-4, anti-IgM oder einer Kombination dieser zu Cofaktoren (**Fig.** 1A). sCD40-L induzierte auch Proliferation von peripheren Blut-B-Zellen in der Gegenwart von IL-4, anti-IgM oder einer Kombination dieser zu Cofaktoren, und mit B-Zellen, die von einigen Spendern erhalten wurden, einen moderaten Proliferationspegel in Abwesenheit jeglichen Cofaktors (**Fig.** 1B). Diese Ergebnisse entsprechen den Ergebnissen, die mit rekombinantem, membrangebundenem CD40-L erzielt wurden, wie in Armitage et al. supra beschrieben.

[0062] Polyklonale Immunoglobulin-Sekretion wurde durch isotypenspezifischen ELISA auf überstehender Flüssigkeit von 10-Tage-Kulturen von 1×10^5 B-Zellen pro Well bestimmt, im Wesentlichen wie in Armitage et al., supra beschrieben. Gereinigte B-Zellen wurden mit einer 1 : 20-Verdünnung der überstehenden Flüssigkeit, die löslichen, oligomeren CD40-L (sCD40-L) enthält, einer 1 : 20-Verdünnung von Kontrollüberstand (Kontroll-S/N; konditioniertes Medium aus Zellen, die mit dem Vektor alleine transfiziert sind) oder transfektierten CV-1/EBNA-Zellen transfektiert, die membrangebundenen CD40-L (CV1/CD40L; 3×10^4 Zellen/Well) exprimieren, in der Gegenwart oder Abwesenheit von 10 ng/ml von entweder IL-2, IL-4 (beide von Immunex Corporation, Seattle, WA) oder IL-10 (Genzyme Corporation, Boston, MA). Die Ergebnisse eines repräsentativen Experiments, das die Immunoglobulin-Sekretion misst, werden in Tabelle 1 dargestellt; die angeführten Werte stellen die Menge jedes Isotyps dar, der durch die induzierten B-Zellen in ng/ml sezerniert wurde, wie durch

ELISA gemessen.

Tabelle 1: durch CD40-Liganden induzierte Immunoglobulin-Sekretion

	Medium alleine	Medium + IL-2	Medium + IL-4	Medium + IL-10	Isotyp
Kontroll-S/N	114,9	424,5	69,4	132,2	
sCD40L-3	212,3	2827,5	51,5	1726,5	
CV1/CD40L	91,8	1965,0	97,4	574,1	IgM
Kontroll-S/N	16,2	161,0	40,1	22,7	
sCD40L-3	25,8	933,2	122,3	231,9	
CV1/CD40L	2,3	428,0	27,9	247,0	IgG_1
Kontroll-S/N	45,1	44,2	39,6	50,0	
sCD40L-3	56,7	248,0	48,7	353,9	
CV1/CD40L	64,7	513,8	34,7	447,2	IgA
Kontroll-S/N	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	
sCD40L-3	< 0,3	< 0,3	67,0	< 0,3	
CV1/CD40L	< 0,3	< 0,3	77,6	< 0,3	IgE

[0063] Diese Ergebnisse zeigten, dass löslicher, oligomerer CD40-L eine polyklonale Immunoglobulin-Sekretion auf dieselbe Weise induzierte wie membrangebundener CD40-L. IL-2 und IL-10 verstärkten die Sekretion von IgM, IgG_1 und IgA; Sekretion messbarer Mengen von IgE erfolgte nur in Gegenwart von IL-4, genauso wie bei membrangebundenem CD40-L beobachtet. Dasselbe Muster der Immunoglobulin-Sekretion war vorhanden, als B-Zellen von mehreren unterschiedlichen Spendern getestet wurden, obwohl die absoluten Mengen von Spender zu Spender variierten. Bei ähnlichen Experimenten in einem murinen System brachte ein lösliches, oligomeres Konstrukt eines murinen CD40-L auch Ergebnisse, die mit jenen eines membrangebundenen murinen CD40-L vergleichbar sind.

Beispiel 3

[0064] Dieses Beispiel beschreibt die Konstruktion eines CD27-L DNA-Konstruktes, um ein lösliches, oligomeres CD27-L Fusionsprotein zu exprimieren, das als sCD27L-3 bezeichnet wird. CD27-L ist ein Typ-II-Transmembranprotein, das an das Lymphozyten-Antigen CD27 bindet. CD27 kommt auf den meisten peripheren Blut-T-Zellen (Bigler et al., J. Immunol. 141: 21, 1988; van Lier et al., Eur. J. Immunol. 18: 811, 1988) und einer Subpopulation von B-Zellen vor (Maurer et al., Eur. J. Immunol. 20: 2679, 1990). CD27-L ist ein Mitglied der Tumornekrosefaktor-Familie der Cytokine. Ein Gen, das den CD27-L codiert, wurde geklont und sequenziert, so wie in Goodwin et al., Cell 73: 447 (1993), und in U.S.S.N. _____ eingereicht am _____, eine Teilfortführungsanmeldung von U.S.S.N. 07/941,648, eingereicht am B. September 1992, beschrieben, wobei deren ffenbarungen hierin durch Bezugnahme aufgenommen werden.

[0065] Das Konstrukt, das sCD27L-3 codiert, enthält eine Leitersequenz, eine 37 Aminosäuren-Sequenz, die eine Leucin-Zipper-Domäne umfasst, und die extrazelluläre Region des humanen CD27-L von Aminosäure 39 bis Aminosäure 193. Die Nukleotid- und Aminosäuren-Sequenzen werden in SEQ-ID. Nr. 7 und 7 dargestellt. Das Konstrukt wurde unter Verwendung von Verfahren hergestellt, die auf dem Fachgebiet wohl bekannt sind, um eine DNA zu erhalten, welche die extrazelluläre Region von CD27-L codiert. Kurz gesagt, wurde extrazelluläre Region von CD27-L von einer Volllängen-CD27-L cDNA unter Anwendung einer PCR-Technik amplifiziert. Die verwendeten Primer wurden von der extrazellulären Region von CD27-L (SEQ-ID. Nr. 7, Nukleotide 222–245 für den 5'-Primer und das Komplement der Nukleotide 663–689 für den 3' Primer) abgeleitet, mit Zugabe von Sequenzen, welche die gewünschten Restriktions-Enzymstellen codieren (ACTAGT, enthält eine Spe I Stelle für den 5' Primer und GCGGCCGC, enthält eine Not I Stelle für den 3' Primer). Das amplifizierte PCR-Produkt, das die extrazelluläre Domäne von CD27-L darstellt, wurde in einen Spe I/Not I-geschnittenen SMAG (pDC206)-Vektor geklont. 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, dann mit Spe I geschnitten und mit Kalbdarm-Alkalin-Phosphatase behandelt. Oligonukleotide auf der Basis der Aminosäuren-Sequenz eines Leucin-Zippers (SEQ-ID. Nr. 1) wurden durch standardmäßige Verfahrensweise synthetisiert und mit dem Spe I-geschnittenen Vektor ligiert, um einen Expressionsvektor zu bilden, der eine murine IL-7 Leitsequenz (Namen et al., Nature 333: 571; 1988), eine Leucin-Zipper-Domäne und die extrazelluläre Domäne von CD27-L umfasst. Der Expressionsvektor wurde als pDC206/sCD27L-3 bezeichnet.

[0066] pDC206/sCD27L-3 wurde in die Affennierenzelllinie CV-1/EBNA (ATCC CRL 10478) gemeinsam mit

einem pSV3Neo Plasmid co-transfektiert. pSV3Neo (Mulligan and Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78: 2072; 1981) ist ein Plasmid, welches das SV40 T-Antigen exprimiert und somit die episomale Replikation des pDC206-Plasmids ermöglicht.

[0067] Sobald Zellen, welche das Fusionskonstrukt exprimieren, nachgewiesen sind, werden in großem Maßstab Kulturen transfektierter Zellen gezüchtet, um Überstände aus Zellen zu akkumulieren, welche das lösliche, oligomere CD27-L Fusionsprotein (als sCD27L-3 bezeichnet) exprimieren. sCD27L-3 in überstehender Flüssigkeit wird durch Affinitätsreinigung gereinigt, im Wesentlichen wie in der US-Patentschrift 5,011,912 beschrieben. sCD27L-3 kann auch unter Verwendung anderer Protein-Reinigungsverfahren gereinigt werden, so wie hierin beschrieben. Silbergefärbte SDS-Gels des löslichen, oligomeren CD27-L Fusionsproteins können hergestellt werden, um die Reinheit zu bestimmen. sCD27L-3 bindet an lösliches CD27 und hemmt die Bindung von löslichem CD27 an Zellen, die CD27-L exprimieren, wie in Beispiel 1 beschrieben.

Beispiel 4

[0068] Dieses Beispiel stellt eine Bindungshemmungsaktivität von sCD27L-3 dar. Eine lösliche Form des humanen Lymphozyten-Oberflächenantigens CD27 wurde im Wesentlichen wie von Fanslow et al., J. Immunol. 149: 65 (1992) beschrieben, hergestellt, um ein dimeres, Fc Fusionskonstrukt, das als CD27.Fc (Goodwin et al., Cell 73: 447; 1993) bezeichnet wird, zu bilden. CD27.Fc umfasst die extrazelluläre Region von CD27 und eine Fc-Region aus einem humanen IgG_1. sCD27L-3 hemmt die Bindung von CD27.Fc an die MP.1-Zelle, eine humane, Epstein-Barr-Virus-transformierte B-Zelllinie, die endogenen CD27-L exprimiert.

[0069] Konditionierte überstehende Flüssigkeit aus CV-1/EBNA-Zellen, transfektiert mit pDC206/sCD27L-3, wurde in einer 96-Vertiefungen-Platte titriert. Eine konstante Menge von CD27.Fc (1 µg/Vertiefung) wurde in Bindungsmedium (RPMI-1640, enthaltend 1% Rinderserumalbumin, 0,2% Natriumazid und 20 mM HEPES, pH 7,2) zu jeder Vertiefung hinzugefügt, gefolgt von $1 – 2 \times 10^6$ MP.1-Zellen pro Vertiefung. Die Platte wurde eine Stunde lang bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden zwei Mal mit PBS gewaschen, dann durch Zentrifugation pelletiert. ^{125}I-Maus anti-human IgG Fc wurde zu jeder Vertiefung mit konstanter Konzentration hinzugefügt, und die Platte wurde eine weitere Stunde lang bei 37 °C inkubiert. Der ^{125}I-Maus anti-human IgG Fc band an CD27.Fc, das an die MP.1-Zellen band. Nach der letzten Inkubation wurden die Zellen über Pthalatöl-enthaltenden Rohren geerntet, um den gebundenen und den freien ^{125}I-Maus anti-human IgG Fc zu trennen, wobei die Menge an Radioaktivität mit Hilfe eines Gamma-Zählers gemessen wurde.

[0070] Die Ergebnisse dieses Experimentes werden in **Fig.** 2 dargestellt. sCD27L-3 wies eine dosisabhängige Hemmung der Bindung von CD27.Fc an MP.1-Zellen auf. Durch Vergleichen der Konzentration, bei der die Hemmung des Bindens von CD27.Fc bei 50 zur Titrierung der Hemmung durch sCD27L-3 liegt, wurde geschätzt, dass die Konzentration von sCD27L-3 im konditionierten Medium zwischen 18 und 40 µg/ml lag. Bei Durchführung dieses Vergleichs wurde der MW-Wert von sCD27L-3 auf 135 Kd geschätzt (geschätzter MW-Wert der extrazellulären Region von CD27-L lag bei 45 Kd, multiptiziert mit Drei für die Bildung von Trimer), und es wurde angenommen, dass die Bindung von sCD27L-3 an CD27.Fc in einem molaren Verhältnis erfolgt. Es wurde geschätzt, dass K; 10 Mal dem Wert von K_a entspricht, der $3 \times 10^{-7}\ M^{-1}$ war, und die Anfangskonzentration wurde mit 1×10^{-8} M angenommen. Die Ergebnisse zeigten, dass die anfängliche Annahme einer Konzentration von 1×10^{-8} M ungefähr 10-Mal zu gering war, wobei eine 1 : 3 Verdünnung der überstehenden Flüssigkeit tatsächlich eine geschätzte Konzentration von 1×10^{-7} M ergab.

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE INFORMATIONEN:

(i) ANMELDER: Spriggs, Melanie

Srinivasan, Subhashini

(ii) TITEL DER ERFINDUNG: Verfahren zur Herstellung löslicher,

oligomerer Proteine

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 8

(iv) KORRESPONDENZANSCHRIFT:

(A) ADRESSAT: Immunex Corporation

(B) STRASSE: 51 University Street

(C) STADT: Seattle

(D) BUNDESSTAAT: WA

(E) LAND: USA
(F) PLZ: 98101

(v) COMPUTERLESBARE FORM:

(A) ART DES DATENTRÄGERS: Diskette
(B) COMPUTER: IBM PC kompatibel
(C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25

(vi) AKTUELLE ANMELDEDATEN:

(A) ANMELDENUMMER:
(B) EINREICHUNGSDATUM:
(C) KLASSIFIZIERUNG:

(viii) ANGABEN ZUM ANWALT/VERTRETER:

(A) NAME: Perkins, Patricia A
(B) EINTRAGUNGSNUMMER: 34,693
(C) BEZUGS-/AKTENNUMMER: 1003

(ix) ANGABEN ZUR TELEKOMMUNIKATION:

(A) TELEFON: (206)587-0430
(B) TELEFAX: (206)233-0644

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ-ID NR.:1:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 8 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(C) STRANG: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKULARTYP: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTI-SENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ-ID NR.:1:

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
1 5

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ-ID NR.:2:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 33 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG:SEQ-ID NR.:2:

Arg Met Lys Gln Ile Glu Asp Lys Ile Glu Glu Ile Leu Ser Lys Ile
1 5 10 15

Tyr His Ile Glu Asn Glu Ile Ala Arg Ile Lys Lys Leu Ile Gly Glu
20 25 30

Arg

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ-ID NR.:3:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 786 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANG: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA bis mRNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTI-SENSE: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE QUELLE:

(A) ORGANISMUS: Mensch
(B) STAMM: CD40-L

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
(B) STANDORT: 1..783

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG:SEQ-ID NR.:3:

```
ATG ATC GAA ACA TAC AAC CAA ACT TCT CCC CGA TCT GCG GCC ACT GGA 48
Met Ile Glu Thr Tyr Asn Gln Thr Ser Pro Arg Ser Ala Ala Thr Gly
1               5                  10                  15
CTG CCC ATC AGC ATG AAA ATT TTT ATG TAT TTA CTT ACT GTT TTT CTT 96
Leu Pro Ile Ser Met Lys Ile Phe Met Tyr Leu Leu Thr Val Phe Leu
            20                  25                  30
ATC ACC CAG ATG ATT GGG TCA GCA CTT TTT GCT GTG TAT CTT CAT AGA 144
Ile Thr Gln Met Ile Gly Ser Ala Leu Phe Ala Val Tyr Leu His Arg
        35                  40                  45
AGG TTG GAC AAG ATA GAA GAT GAA AGG AAT CTT CAT GAA GAT TTT GTA 192
Arg Leu Asp Lys Ile Glu Asp Glu Arg Asn Leu His Glu Asp Phe Val
    50                  55                  60
TTC ATG AAA ACG ATA CAG AGA TGC AAC ACA GGA GAA AGA TCC TTA TCC 240
Phe Met Lys Thr Ile Gln Arg Cys Asn Thr Gly Glu Arg Ser Leu Ser
65                  70                  75                  80
TTA CTG AAC TGT GAG GAG ATT AAA AGC CAG TTT GAA GGC TTT GTG AAG 288
Leu Leu Asn Cys Glu Glu Ile Lys Ser Gln Phe Glu Gly Phe Val Lys
                85                  90                  95
GAT ATA ATG TTA AAC AAA GAG GAG ACG AAG AAA GAA AAC AGC TTT GAA 336
Asp Ile Met Leu Asn Lys Glu Glu Thr Lys Lys Glu Asn Ser Phe Glu
            100                 105                 110
ATG CAA AAA GGT GAT CAG AAT CCT CAA ATT GCG GCA CAT GTC ATA AGT 384
Met Gln Lys Gly Asp Gln Asn Pro Gln Ile Ala Ala His Val Ile Ser
        115                 120                 125
GAG GCC AGC AGT AAA ACA ACA TCT GTG TTA CAG TGG GCT GAA AAA GGA 432
Glu Ala Ser Ser Lys Thr Thr Ser Val Leu Gln Trp Ala Glu Lys Gly
    130                 135                 140
TAC TAC ACC ATG AGC AAC AAC TTG GTA ACC CTG GAA AAT GGG AAA CAG 480
Tyr Tyr Thr Met Ser Asn Asn Leu Val Thr Leu Glu Asn Gly Lys Gln
145                 150                 155                 160
CTG ACC GTT AAA AGA CAA GGA CTC TAT TAT ATC TAT GCC CAA GTC ACC 528
Leu Thr Val Lys Arg Gln Gly Leu Tyr Tyr Ile Tyr Ala Gln Val Thr
                165                 170                 175
TTC TGT TCC AAT CGG GAA GCT TCG AGT CAA GCT CCA TTT ATA GCC AGC 576
Phe Cys Ser Asn Arg Glu Ala Ser Ser Gln Ala Pro Phe Ile Ala Ser
            180                 185                 190
CTC TGC CTA AAG TCC CCC GGT AGA TTC GAG AGA ATC TTA CTC AGA GCT 624
Leu Cys Leu Lys Ser Pro Gly Arg Phe Glu Arg Ile Leu Leu Arg Ala
        195                 200                 205
GCA AAT ACC CAC AGT TCC GCC AAA CCT TGC GGG CAA CAA TCC ATT CAC 672
Ala Asn Thr His Ser Ser Ala Lys Pro Cys Gly Gln Gln Ser Ile His
```

```
    210                 215                 220
TTG GGA GGA GTA TTT GAA TTG CAA CCA GGT GCT TCG GTG TTT GTC AAT 720
Leu Gly Gly Val Phe Glu Leu Gln Pro Gly Ala Ser Val Phe Val Asn

225                 230                 235                 240
GTG ACT GAT CCA AGC CAA GTG AGC CAT GGC ACT GGC TTC ACG TCC TTT 768
Val Thr Asp Pro Ser Gln Val Ser His Gly Thr Gly Phe Thr Ser Phe
                245                 250                 255
GGC TTA CTC AAA CTC TGA 786
Gly Leu Leu Lys Leu

            260
```

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ-ID NR.:4:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 261 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG:SEQ-ID NR.:4:

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


Arg Leu Asp Lys Ile Glu Asp Glu Arg Asn Leu His Glu Asp Phe Val
    50                  55                  60
Phe Met Lys Thr Ile Gln Arg Cys Asn Thr Gly Glu Arg Ser Leu Ser
65                  70                  75                  80
Leu Leu Asn Cys Glu Glu Ile Lys Ser Gln Phe Glu Gly Phe Val Lys
                85                  90                  95
Asp Ile Met Leu Asn Lys Glu Glu Thr Lys Lys Glu Asn Ser Phe Glu
            100                 105                 110
Met Gln Lys Gly Asp Gln Asn Pro Gln Ile Ala Ala His Val Ile Ser
        115                 120                 125
Glu Ala Ser Ser Lys Thr Thr Ser Val Leu Gln Trp Ala Glu Lys Gly
    130                 135                 140
Tyr Tyr Thr Met Ser Asn Asn Leu Val Thr Leu Glu Asn Gly Lys Gln
```

```
145                 150                 155                 160
Leu Thr Val Lys Arg Gln Gly Leu Tyr Tyr Ile Tyr Ala Gln Val Thr
                165                 170                 175
Phe Cys Ser Asn Arg Glu Ala Ser Ser Gln Ala Pro Phe Ile Ala Ser
            180                 185                 190
Leu Cys Leu Lys Ser Pro Gly Arg Phe Glu Arg Ile Leu Leu Arg Ala
        195                 200                 205
Ala Asn Thr His Ser Ser Ala Lys Pro Cys Gly Gln Gln Ser Ile His
    210                 215                 220
Leu Gly Gly Val Phe Glu Leu Gln Pro Gly Ala Ser Val Phe Val Asn

225                 230                 235                 240
Val Thr Asp Pro Ser Gln Val Ser His Gly Thr Gly Phe Thr Ser Phe
                245                 250                 255
Gly Leu Leu Lys Leu
            260
```

(2) INFORMATION FÜR SEQ-ID NR.:5:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 783 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANG: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA bis mRNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTI-SENSE: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE QUELLE:

(A) ORGANISMUS: Maus
(B) STAMM: CD40-L

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
(B) STANDORT: 1..780

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG:SEQ-ID NR.:5:

```
ATG ATA GAA ACA TAC AGC CAA CCT TCC CCC AGA TCC GTG GCA ACT GGA 48
Met Ile Glu Thr Tyr Ser Gln Pro Ser Pro Arg Ser Val Ala Thr Gly
1               5                   10                  15
CTT CCA GCG AGC ATG AAG ATT TTT ATG TAT TTA CTT ACT GTT TTC CTT 96
Leu Pro Ala Ser Met Lys Ile Phe Met Tyr Leu Leu Thr Val Phe Leu
            20                  25                  30
ATC ACC CAA ATG ATT GGA TCT GTG CTT TTT GCT GTG TAT CTT CAT AGA 144
```

```
Ile Thr Gln Met I Gly Ser Val Leu Phe Ala Val Tyr Leu His Arg
        35                  40                  45
AGA TTG GAT AAG GTC GAA GAG GAA GTA AAC CTT CAT GAA GAT TTT GTA 192
Arg Leu Asp Lys Val Glu Glu Glu Val Asn Leu His Glu Asp Phe Val
    50                  55                  60
TTC ATA AAA AAG CTA AAG AGA TGC AAC AAA GGA GAA GGA TCT TTA TCC 240
Phe Ile Lys Lys Leu Lys Arg Cys Asn Lys Gly Glu Gly Ser Leu Ser
65                  70                  75                  80
TTG CTG AAC TGT GAG GAG ATG AGA AGG CAA TTT GAA GAC CTT GTC AAG 288
Leu Leu Asn Cys Glu Glu Met Arg Arg Gln Phe Glu Asp Leu Val Lys
                85                  90                  95
GAT ATA ACG TTA AAC AAA GAA GAG AAA AAA GAA AAC AGC TTT GAA ATG 336
Asp Ile Thr Leu Asn Lys Glu Glu Lys Lys Glu Asn Ser Phe Glu Met
            100                 105                 110
CAA AGA GGT GAT GAG GAT CCT CAA ATT GCA GCA CAC GTT GTA AGC GAA 384
Gln Arg Gly Asp Glu Asp Pro Gln Ile Ala Ala His Val Val Ser Glu
        115                 120                 125
GCC AAC AGT AAT GCA GCA TCC GTT CTA CAG TGG GCC AAG AAA GGA TAT 432
Ala Asn Ser Asn Ala Ala Ser Val Leu Gln Trp Ala Lys Lys Gly Tyr
    130                 135                 140
TAT ACC ATG AAA AGC AAC TTG GTA ATG CTT GAA AAT GGG AAA CAG CTG 480
Tyr Thr Met Lys Ser Asn Leu Val Met Leu Glu Asn Gly Lys Gln Leu
145                 150                 155                 160
ACG GTT AAA AGA GAA GGA CTC TAT TAT GTC TAC ACT CAA GTC ACC TTC 528
Thr Val Lys Arg Glu Gly Leu Tyr Tyr Val Tyr Thr Gln Val Thr Phe
                165                 170                 175
TGC TCT AAT CGG GAG CCT TCG AGT CAA CGC CCA TTC ATC GTC GGC CTC 576
Cys Ser Asn Arg Glu Pro Ser Ser Gln Arg Pro Phe Ile Val Gly Leu
            180                 185                 190
TGG CTG AAG CCC AGC AGT GGA TCT GAG AGA ATC TTA CTC AAG GCG GCA 624
Trp Leu Lys Pro Ser Ser Gly Ser Glu Arg Ile Leu Leu Lys Ala Ala
        195                 200                 205
AAT ACC CAC AGT TCC TCC CAG CTT TGC GAG CAG CAG TCT GTT CAC TTG 672
Asn Thr His Ser Ser Ser Gln Leu Cys Glu Gln Gln Ser Val His Leu
    210                 215                 220
GGC GGA GTG TTT GAA TTA CAA GCT GGT GCT TCT GTG TTT GTC AAC GTG 720
Gly Gly Val Phe Glu Leu Gln Ala Gly Ala Ser Val Phe Val Asn Val
225                 230                 235                 240
ACT GAA GCA AGC CAA GTG ATC CAC AGA GTT GGC TTC TCA TCT TTT GGC 768
Thr Glu Ala Ser Gln Val Ile His Arg Val Gly Phe Ser Ser Phe Gly
                245                 250                 255
TTA CTC AAA CTC TGA 783
Leu Leu Lys Leu
            260
```

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ-ID NR.:6:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 260 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG:SEQ-ID NR.:6:

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

```
225                 230                 235                 240
Thr Glu Ala Ser Gln Val Ile His Arg Val Gly Phe Ser Ser Phe Gly
                245                 250                 255
Leu Leu Lys Leu

            260
```

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ-ID NR.:7:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 689 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANG: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTI-SENSE: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE QUELLE:

(A) ORGANISMUS: CD27 Ligand-Trimer (CD27L-3)

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL:CDS
(B) STANDORT: 39..686

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: sig_peptide
(B) STANDORT: 39..110

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: mat_peptide
(B) STANDORT: 111..686

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ-ID NR.:7:

```
GGAAAACTCT CGAGGTACCT ATCCCGGGGA TCCCCACC ATG TTC CAT GTC TCT 53
                                          Met Phe His Val Ser
                                          -24             -20
TTT AGA TAT ATC TTT GGA ATT CCT CCA CTG ATC CTT GTT CTG CTG CCT 101
Phe Arg Tyr Ile Phe Gly Ile Pro Pro Leu Ile Leu Val Leu Leu Pro
                -15                 -10                 -5
GTC ACT AGT TCT GAC CGT ATG AAA CAG ATA GAG GAT AAG ATC GAA GAG 149
Val Thr Ser Ser Asp Arg Met Lys Gln Ile Glu Asp Lys Ile Glu Glu
            1               5                   10
ATC CTA AGT AAG ATT TAT CAT ATA GAG AAT GAA ATC GCC CGT ATC AAA 197
Ile Leu Ser Lys Ile Tyr His Ile Glu Asn Glu Ile Ala Arg Ile Lys
```

```
    15                  20                  25
AAG CTG ATT GGC GAG CGG ACT AGT CAG CGC TTC GCA CAG GCT CAG CAG 245
Lys Leu Ile Gly Glu Arg Thr Ser Gln Arg Phe Ala Gln Ala Gln Gln
30                  35                  40                  45
CAG CTG CCG CTC GAG TCA CTT GGG TGG GAC GTA GCT GAG CTG CAG CTG 293
Gln Leu Pro Leu Glu Ser Leu Gly Trp Asp Val Ala Glu Leu Gln Leu
                50                  55                  60
AAT CAC ACA GGA CCT CAG CAG GAC CCC AGG CTA TAC TGG CAG GGG GGC 341
Asn His Thr Gly Pro Gln Gln Asp Pro Arg Leu Tyr Trp Gln Gly Gly
            65                  70                  75
CCA GCA CTG GGC CGC TCC TTC CTG CAT GGA CCA GAG CTG GAC AAG GGG 389
Pro Ala Leu Gly Arg Ser Phe Leu His Gly Pro Glu Leu Asp Lys Gly
        80                  85                  90
CAG CTA CGT ATC CAT CGT GAT GGC ATC TAC ATG GTA CAC ATC CAG GTG 437
Gln Leu Arg Ile His Arg Asp Gly Ile Tyr Met Val His Ile Gln Val
    95                  100                 105
ACG CTG GCC ATC TGC TCC TCC ACG ACG GCC TCC AGG CAC CAC CCC ACC 485
Thr Leu Ala Ile Cys Ser Ser Thr Thr Ala Ser Arg His His Pro Thr

110                 115                 120                 125
ACC CTG GCC GTG GGA ATC TGC TCT CCC GCC TCC CGT AGC ATC AGC CTG 533
Thr Leu Ala Val Gly Ile Cys Ser Pro Ala Ser Arg Ser Ile Ser Leu
                130                 135                 140


CTG CGT CTC AGC TTC CAC CAA GGT TGT ACC ATT GTC TCC CAG CGC CTG 581
Leu Arg Leu Ser Phe His Gln Gly Cys Thr Ile Val Ser Gln Arg Leu
            145                 150                 155
ACG CCC CTG GCC CGA GGG GAC ACA CTC TGC ACC AAC CTC ACT GGG ACA 629
Thr Pro Leu Ala Arg Gly Asp Thr Leu Cys Thr Asn Leu Thr Gly Thr
        160                 165                 170
CTT TTG CCT TCC CGA AAC ACT GAT GAG ACC TTC TTT GGA GTG CAG TGG 677
Leu Leu Pro Ser Arg Asn Thr Asp Glu Thr Phe Phe Gly Val Gln Trp
    175                 180                 185
GTG CGC CCC TGA 689
Val Arg Pro

190
```

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ-ID NR.:8:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 216 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG:SEQ-ID NR.:8:

```
Met Phe His Val Ser Phe Arg Tyr Ile Phe Gly Ile Pro Pro Leu Ile
-24             -20                 -15                 -10
Leu Val Leu Leu Pro Val Thr Ser Ser Asp Arg Met Lys Gln Ile Glu
            -5                  1               5
Asp Lys Ile Glu Glu Ile Leu Ser Lys Ile Tyr His Ile Glu Asn Glu
    10                  15                  20
Ile Ala Arg Ile Lys Lys Leu Ile Gly Glu Arg Thr Ser Gln Arg Phe
25                  30                  35                  40


Ala Gln Ala Gln Gln Gln Leu Pro Leu Glu Ser Leu Gly Trp Asp Val
                45                  50                  55
Ala Glu Leu Gln Leu Asn His Thr Gly Pro Gln Gln Asp Pro Arg Leu
            60                  65                  70
Tyr Trp Gln Gly Gly Pro Ala Leu Gly Arg Ser Phe Leu His Gly Pro
        75                  80                  85
Glu Leu Asp Lys Gly Gln Leu Arg Ile His Arg Asp Gly Ile Tyr Met
    90                  95                  100
Val His Ile Gln Val Thr Leu Ala Ile Cys Ser Ser Thr Thr Ala Ser

105                 110                 115                 120
Arg His His Pro Thr Thr Leu Ala Val Gly Ile Cys Ser Pro Ala Ser
                125                 130                 135
Arg Ser Ile Ser Leu Leu Arg Leu Ser Phe His Gln Gly Cys Thr Ile
            140                 145                 150
Va Ser Gln Arg Leu Thr Pro Leu Ala Arg Gly Asp Thr Leu Cys Thr
       155                 60                  165
Asn Leu Thr Gly Thr Leu Leu Pro Ser Arg Asn Thr Asp Glu Thr Phe
    170                 175                 180
Phe Gly Val Gln Trp Val Arg Pro

185                 190
```

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung eines löslichen Proteins, wobei das Verfahren den Schritt des Kultivierens einer Wirtszelle aufweist, die mit einem Expressionsvektor transformiert oder transfektiert ist, der eine DNA ent-

hält, die ein Protein codiert, wobei das Protein aus der Gruppe ausgewählt wird, die besteht aus:
(a) einer Leucin-Zipper-Domäne und einer extrazellulären Region eines heterologen Säugetier-Transmembranproteins, das ein Oligomer von mindestens einem Trimer bildet;
(b) einer Leucin-Zipper-Domäne und einer löslichen Homotrimer bildenden Domäne eines Proteins der Tumornekrosefaktor-/Nervenwachstumsfaktor-Familie und deren Rezeptoren;
(c) einer Leucin-Zipper-Domäne und einer löslichen Oligomer bildenden Domäne eines Cytokins, das ein Oligomer von mindestens einem Trimer bildet, wobei der Schritt des Kultivierens der Wirtszelle unter Bedingungen ausgeführt wird, welche die Expression des Proteins fördern.

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Leucin-Zipper-Domäne Aminosäuren 1–33 der SEQ-ID Nr. 2 enthält.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei das Protein der Tumornekrosefaktor-/Nervenwachstumsfaktor-Familie und Rezeptoren aus der Gruppe ausgewählt wird, die besteht aus:
(a) TNFR,
(b) TNFα
(e) TNFβ,
(d) CD40L,
(e) CD27L,
(f) OX40L und
(g) NGFR.

4. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei das Cytokin GM-CSF ist.

5. Verfahren nach Anspruch 4, wobei das Protein ferner IL-3 umfasst.

6. Verfahren zur Herstellung eines Proteins, wobei das Verfahren den Schritt des Kultivierens einer Wirtszelle aufweist, die mit einem Expressionsvektor transformiert oder transfektiert wird, welcher eine DNA, die Aminosäuren 1–33 der SEQ-ID Nr. 2 codiert, und eine lösliche Region von CD40L enthält, wobei der Schritt des Kultivierens der Wirtszelle unter Bedingungen ausgeführt wird, welche die Expression des Proteins fördern.

7. Verfahren nach Anspruch 1, 2 oder 3, wobei für den Fall, dass das heterologe Säugetier-Transmembranprotein ein Typ-II-Transmembranprotein ist, die Leucin-Zipper-Domäne mit dem amino-proximalen Ende der extrazellulären Region verschmolzen wird.

8. Verfahren nach Anspruch 1, 2 oder 3, wobei für den Fall, dass das heterologe Säugetier-Transmembranprotein ein Typ-I-Transmembranprotein ist, die Leucin-Zipper-Domäne mit dem carboxy-proximalen Ende der extrazellulären Region verschmolzen wird.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei das Protein eine extrazelluläre Region eines ersten heterologen Säugetier-Proteins und eine extrazelluläre Region eines zweiten heterologen Säugetier-Proteins enthält und wobei sich das erste und das zweite heterologe Säugetier-Protein voneinander unterscheiden.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, wobei das Protein ferner eine Linkersequenz aufweist, die zwischen der Leucin-Zipper-Domäne und der extrazellulären Region des Transmembranproteins eingefügt wird.

11. Protein, das aus der Gruppe ausgewählt wird, die besteht aus:
(a) einer Fusion einer Leucin-Zipper-Domäne und einer extrazellulären Region eines heterologen Säugetier-Transmembranproteins, das ein Oligomer von mindestens einem Trimer bildet;
(b) einer Fusion einer Leucin-Zipper-Domäne und einer löslichen Homotrimer bildenden Domäne eines Proteins der Tumornekrosefaktor-/Nervenwachstumsfaktor-Familie und deren Rezeptoren; und
(c) einer Fusion einer Leucin-Zipper-Domäne und einer löslichen Oligomer bildenden Domäne eines Cytokins, das ein Oligomer von mindestens einem Trimer bildet, wobei die Leucin-Zipper-Domäne jedes Fusionsproteins für die Oligomerisierung des Proteins verantwortlich ist.

12. Protein nach Anspruch 11, wobei das Protein der Tumornekrosefaktor/Nervenwachstumsfaktor-Familie und Rezeptoren aus der Gruppe ausgewählt wird, die besteht aus:
(a) TNFR,

(b) TNFα
(c) TNFβ,
(d) CD40L,
(e) CD27L,
(f) OX40L und
(g) NGFR.

13. Protein nach Anspruch 11 oder 12, wobei die Leucin-Zipper-Domäne Aminosäuren 1–33 der SEQ-ID. Nr. 2 enthält.

14. Protein nach Anspruch 11 oder 12, wobei das Cytokin GM-CSF ist.

15. Protein nach Anspruch 14, wobei das Protein ferner IL-3 umfasst.

16. Protein nach Anspruch 11, 12 oder 13, wobei für den Fall, dass das heterologe Säugetier-Transmembranprotein ein Typ-II-Transmembranprotein ist, die Leucin-Zipper-Domäne mit dem amino-proximalen Ende der extrazellulären Region verschmolzen ist.

17. Protein nach Anspruch 11, 12 oder 13, wobei für den Fall, dass das heterologe Säugetier-Transmembranprotein ein Typ-I-Transmembranprotein ist, die Leucin-Zipper-Domäne mit dem carboxy-proximalen Ende der extrazellulären Region verschmolzen ist.

18. Protein nach einem der Ansprüche 11 bis 17, das ferner eine Linkersequenz aufweist.

19. Protein nach Anspruch 18, wobei die Linkersequenz ein Peptid ist.

20. Protein nach einem der Ansprüche 11 bis 19, wobei die Leucin-Zipper-Domäne Aminosäuren 1–33 der SEQ-ID. Nr. 2 enthält, mit Ausnahme von konservativen Aminosäureaustauschen.

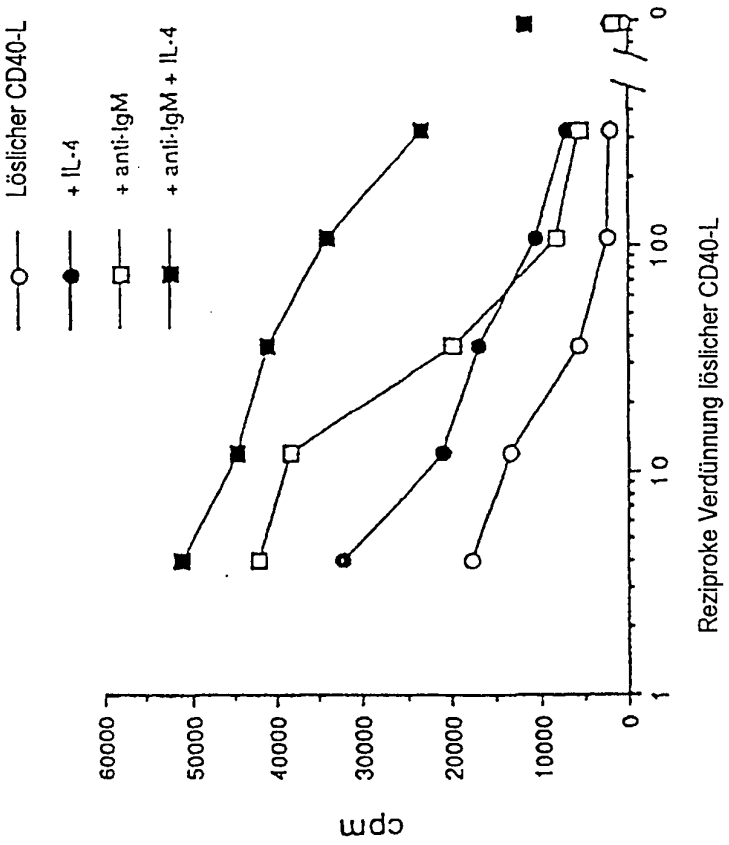
21. Protein nach einem der Ansprüche 11 bis 20:
(a) Aminosäuren 1–33 der SEQ-ID Nr. 2 und
(b) eine extrazelluläre Region eines heterologen Säugetier-Transmembranproteins.

22. Protein nach Anspruch 21, wobei die extrazelluläre Region lösliches CD40L ist.

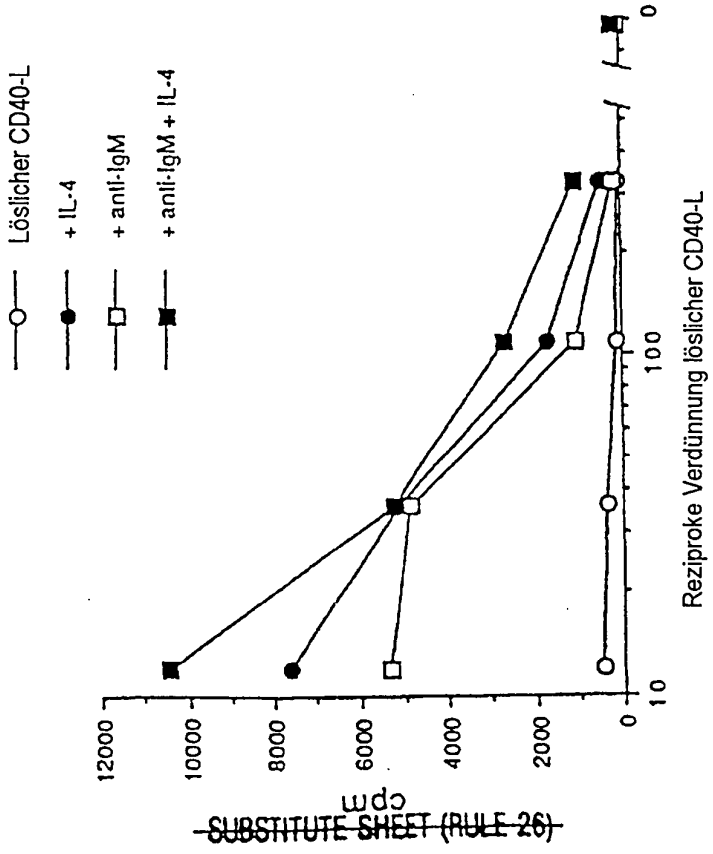
23. DNA, die ein Protein nach einem der Ansprüche 11 bis 22 codiert.

Es folgen 2 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

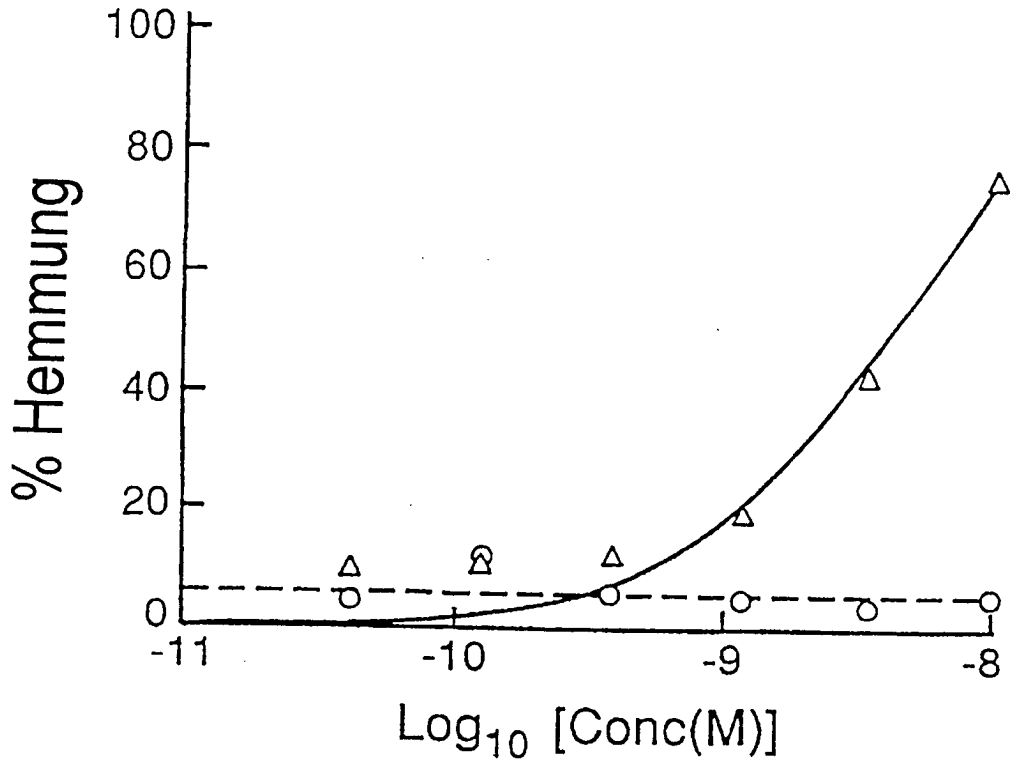


Figur 1 B



Figur 1A

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)


100
80
60
40
20
0
% Hemmung
-11
-10
-9
-8
Log10 [Conc(M)]
SMAG 4
CV1 HuCD27L III 7 Tag

Figur 2