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

(10) **DE 693 34 062 T2** 2007.03.15

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 1 249 490 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **693 34 062.2**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **02 014 141.2**
(96) Europäischer Anmeldetag: **18.02.1993**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **16.10.2002**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **06.09.2006**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **15.03.2007**

(51) Int Cl.[8]: ***C12N 5/08*** (2006.01)
C12N 5/06 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)

(30) Unionspriorität:
841662 **19.02.1992** **US**

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

(73) Patentinhaber:
The Scripps Research Institute, La Jolla, Calif., US

(74) Vertreter:
LEINWEBER & ZIMMERMANN, 80331 München

(72) Erfinder:
Peterson, Per A., Rancho Santa Fe, California 92067, US; Jackson, Michael, Del Mar, CA 92014, US; Langlade-Demoyen, Pierre, 75015 Paris, FR

(54) Bezeichnung: **In vitro Aktivierung von cytotoxischen T Zellen**

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

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren der Aktivierung von CD8-Zellen in vitro mit Spezifität für bestimmte antigene Peptide, die Verwendung von aktivierten CD8-Zellen in vivo für die Behandlung einer Vielzahl von Krankheitszuständen sowie für diese Verwendungen geeignete Zusammensetzungen.

Hintergrund

[0002] Die Wirksamkeit, mit der das Immunsystem Individuen vor Infektionskrankheit schützt oder diese heilt, war für Wissenschaftler immer schon faszinierend, da angenommen worden ist, dass es möglich sein könnte, das Immunsystem zu aktivieren, um andere Krankheitstypen zu bekämpfen. Solche Krankheiten umfassen Krebs, AIDS, Hepatitis und Infektionskrankheiten in immunosupprimierten Patienten. Solange verschiedene, die Verwendung von Antikörpern umfassende Verfahren bei diesen Krankheitstypen angewendet worden sind, sind, wenn überhaupt, nur wenige erfolgreiche Versuche unter Verwendung von zytotoxischen T-Zellen zu verzeichnen gewesen. Theoretisch wären zytotoxische T-Zellen die bevorzugten Mittel zur Behandlung der oben erwähnten Krankheitstypen. Jedoch sind keine In-vitro-Verfahren verfügbar gewesen, um zytotoxische T-Zellen spezifisch zu aktivieren.

[0003] Zytotoxische T-Zellen oder CD8-Zellen stellen, soweit sie heute bekannt sind, die Hauptlinie der Abwehr gegen Virusinfektionen dar. CD8-Lymphozyten erkennen und zerstören spezifisch Zellen, die von einem Virus infiziert sind. Folglich ist der Preis für die Eliminierung einer Virusinfektion der begleitende Verlust der infizierten Zellen. Die T-Zellenrezeptoren an der Oberfläche von CD8-Zellen können fremde Antigene nicht direkt erkennen. Im Gegensatz zu Antikörpern muss das Antigen zuerst den Rezeptoren präsentiert werden.

[0004] Die Präsentation von Antigen an T-Zellen wird durch Haupthistokompatibilitätskomplex-(MHC-)Moleküle vom Typ Klasse I erzielt. Der Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) bezieht sich auf einen großen genetischen Locus, der für eine umfangreiche Familie von Glykoproteinen kodiert, die eine wichtige Rolle in der Immunantwort spielen. Die MHC-Gene, die auch als HLA-(Human-Leucozyten-Antigen-)Komplex bezeichnet werden, befinden sich auf dem Chromosom 6 in Menschen. Die durch die MHC-Gene kodierten Moleküle sind an Zelloberflächen vorhanden und für die Erkennung von Gewebetransplantaten als „nicht eigen" hauptverantwortlich. Folglich sind membrangebundene MHC-Moleküle eng an der Erkennung von Antigenen durch T-Zellen beteiligt.

[0005] MHC-Produkte sind in drei Hauptklassen gruppiert, die als I, II und II bezeichnet werden. T-Zellen, die hauptsächlich als Helferzellen dienen, exprimieren CD4 und werden in erster Linie durch Klasse-II-Moleküle eingeschränkt, während CD8-exprimierende Zellen, die hauptsächlich zytotoxische Effektorzellen darstellen, mit Klasse-I-Molekülen interagieren.

[0006] Klasse-I-Moleküle sind Membranglykoproteine mit der Fähigkeit, Peptide zu binden, die sich in erster Linie vom intrazellulären Abbau endogener Proteine herleiten. Komplexe von MHC-Molekülen mit Peptiden, die sich von viralen, bakteriellen und anderen fremden Proteinen herleiten, enthalten den Liganden, der die Antigen-Responsivität von T-Zellen triggert. Im Gegensatz dazu spielen Komplexe von MHC-Molekülen mit Peptiden, die sich von normalen zellulären Produkten herleiten, eine Rolle in der „Instruktion" von T-Zellen im Thymus, Eigen-Peptide zu tolerieren. Klasse-I-Moleküle präsentieren keine gesamten, intakten Antigene; sie präsentieren eher Peptidfragmente davon, die auf ihrer „Peptidbindungsfurche" „aufgeladen" sind.

[0007] WO 91/16924 beschreibt Verfahren zur Verstärkung der Präsentation von exogen zugegebenem Peptidantigen durch Antigen-präsentierende Säugetierzellen. Das Verfahren umfasst das Versorgen der Zellen mit exogenem Peptidantigen in Gegenwart hoher Konzentrationen an freiem Beta-2-Microglobulinprotein.

[0008] Levy und Kvist (International Immunology 2(10), 995–1002 (1990)) beschreiben die Verwendung gesonderter Baculovirus-Vektoren, um MHC I, Beta-2-Micorglobulin und Adenovirus-2-Protein getrennt oder zusammen in Insektenzellen zu exprimieren, um die Wirkungen des Adenovirus-Proteins auf die Assemblierung von Klasse-I-MHC-Komplexe zu untersuchen.

[0009] Für viele Jahre haben Immunologen gehofft, spezifische zytotoxische Zellen für das Targeting von Viren, Retroviren und Krebszellen erzeugen zu können. Während das Targeting gegen Viruserkrankungen im Allgemeinen in vivo durch Impfung mit lebenden oder geschwächten Vakzinen erreicht werden kann, konnte mit

Retroviren oder mit Krebszellen kein vergleichbarer Erfolg erzielt werden.

[0010] EP 360.205 A beschreibt Verfahren zur Stimulierung der Immunantwort eines Krebspatienten gegen den Krebs. Peripherblutlymphozyten aus dem Patienten werden in vitro Krebszellen aus demselben Patienten ausgesetzt, die mit Mitomycin C behandelt worden sind, um die Proliferation zu verhindern. Die stimulierten Lymphozyten werden dann wieder dem Patienten verabreicht.

[0011] WO 93/10816 beschreibt Peptid-Vakzinen, die verwendet werden können, um zytotoxische T-Zellen gegen HIV zu induzieren. Dieses Dokument schlägt vor, dass zytotoxische T-Zellen aus immunisierten Individuen isoliert, kultiviert und in vitro vermehrt und wieder dem Patienten verabreicht werden könnten, um die Immunreaktion gegen das Virus zu verstärken.

[0012] Außerdem hatte der Vakzinen-Ansatz nicht die gewünschte Effizienz in immunosupprimierten Patienten. Ein Weg zur Umgehung dieser Schwierigkeit wäre die Immunisierung eines gesunden Individuums, Isolierung der CD8-Zellen aus diesem Individuum und Injektion dieser CD8-Zellen in die von der Krankheit befallene Person. Dieses experimentelle Protokoll scheint in Inzucht-Mausstämmen zu funktionieren, bei Menschen ist es jedoch nicht erfolgreich erprobt worden. Dafür gibt es mehrere mögliche Erklärungen. Zuallererst sind Peptide für einen gegebenen MHC einzigartig; in anderen Worten binden gewisse antigene Peptide bevorzugt an bestimmte MHC-Spezies und binden nicht gut an andere, sogar in Abwesenheit des „bevorzugten" MHC-Moleküls. Darüber hinaus sind MHC-Moleküle höchst polymorph, wobei diese Tatsache zumindest zwei Probleme hervorruft. Erstens können die CD8-Zellen eines Individuums nur mit Peptiden wechselwirken, die an genau jene drei bis sechs in diesem Individuum vorhandenen Klasse-I-Moleküle gebunden sind. Zweitens reagieren CD8-Zellen heftig mit allen Klasse-I-Molekülen, die von jenen verschieden sind, die in dem Individuum exprimiert werden, aus dem die CD8-Zellen erhalten werden, und zwar unabhängig davon, welche Peptide die Klasse-I-Moleküle enthalten. Diese Reaktivität ist eine Zeit lang beobachtet worden und ist als Alloreaktivität bezeichnet worden. Es ist die zugrunde liegende Ursache der Immunabstoßung transplantierter Organe.

[0013] Abgesehen von der eher radikalen experimentellen Protokoll, bei dem ein Individuum als Donor aktivierter CD8-Zellen für ein anderes Individuum verwendet wird, ist es schwierig, zwei nicht verwandte Personen mit derselben Ausrüstung von Klasse-I-Molekülen zu finden. Aus diesem Grund hat zumindest ein Wissenschaftler den eher unspezifischen Ansatz des „Boosten" vorhandener CD8-Zellen durch ihre In-vitro-Inkubation mit IL-2, einem Wachstumsfaktor für T-Zellen gewählt. Dieses Protokoll (als LAK-Zellentherapie bekannt) erlaubt für gewöhnlich nur die Vermehrung jener CD8-Zellen, die bereits inaktiviert sind. Da das Immunsystem aus dem einen oder anderen Grund immer aktiv ist, werden die meisten der IL2-aktivierten Zellen zum Zwecke der Bekämpfung der Krankheit ohne Bedeutung sein. In der Tat ist nicht dokumentiert worden, dass diese Therapieart irgendwelche Zellen der gewünschten Spezifität aktiviert. Folglich ist der Nutzen der LAK-Zellentherapie bestenfalls umstritten und die Nebenwirkungen sind typischerweise derart schwerwiegend, dass viele Studien abgebrochen worden sind.

[0014] Vor kurzer Zeit sind mehrere neue Moleküle identifiziert worden, die anscheinend am Peptid-Beladungsprozess beteiligt sind. Es ist ferner beobachtet worden, dass Klasse-I-Moleküle ohne gebundenes Peptid (d.h. „leere" Moleküle) unter gewissen einschränkenden Umständen produziert werden können. Diese „leeren" Moleküle sind jedoch häufig unfähig, die Zelloberfläche zu erreichen, da Klasse-I-Moleküle ohne gebundenes Peptid sehr thermolabil sind. Folglich zerfallen die „leeren" Klasse-I-Moleküle während ihres Transports vom Inneren der Zelle zur Zelloberfläche. Dies ist ein eleganter Weg, durch den das Immunsystem sicherstellen kann, dass nur diejenigen Zellen zerstört werden, welche aktiv Virusproteine synthetisieren. Wenn beispielsweise eine virusinfizierte Zelle abgetötet wird, wird sie Viruspeptide freisetzen. Wenn benachbarte Zellen „leere" Klasse-I-Moleküle – d.h. jene ohne gebundenes Peptid – exprimieren würden, dann würden diese Zellen mit den freigesetzten Viruspeptiden beschichtet werden. Da zytotoxische T-Zellen (oder CD8-Zellen) keine Möglichkeit besitzen festzustellen, wie oder weshalb ein Peptid an ein Klasse-I-Molekül gebunden ist, würden Zellen, die passiv eine Viruspeptidbeschichtung erhielten, genauso wie jene abgetötet werden, welche die Virusproteine aktiv synthetisierten.

[0015] Viruspeptide werden in vivo durch ein großes, als Proteasom bekanntes Partikel zerlegt. Dieser Enzymkomplex baut auch normale Zellproteine ab, was darauf hinweist, dass von unseren eigenen Zellproteinen abstammende Peptide mit Virus-hergeleiteten Peptiden um Bindungsstellen an Klasse-I-Molekülen konkurrieren. Folglich würden nur einige der Klasse-I-Moleküle an der Oberfläche einer virusinfizierten Zelle tatsächlich Viruspeptide enthalten, da die Mehrzahl der Klasse-I-Moleküle Peptide enthalten würde, die sich von unseren eigenen Zellproteinen herleiten. Da sich an der Oberfläche einer Zelle zehntausende Klasse-I-Moleküle befinden und da CD8-Zellen bereits 200, mit einem gegebenen Viruspeptid aufgeladene Klasse-I-Moleküle erken-

nen können, beeinträchtigt diese Konkurrenz zwischen den von Viren hergeleiteten Peptiden und den Zellproteinen nicht völlig die Effizienz, mit der CD8-Zellen eine virusinfizierte Zelle zerstören können. Dennoch ließe sich die Effizienz der CD8-Aktivierung wohl steigern, wenn man in der Lage wäre, Zellen gentechnisch dahingehend zu „manipulieren", dass sie Klasse-I-Moleküle exprimieren, die nur eine Antigenpeptid-Spezies zeigen, d.h. wenn alle Klasse Moleküle dasselbe daran gebundenen Peptid aufwiesen.

[0016] Klasse-I-Moleküle binden Peptide auf eine spezifische Weise. Alle Peptide müssen eine Länge von ungefähr 8–9 Aminosäuren aufweisen und ihre Sequenz muss in die peptidbindende Tasche der Klasse-I-Moleküle passen. In dieser Hinsicht weisen Klasse-I Moleküle eine gewisse Ähnlichkeit mit Antikörpern auf. Während jedoch ein gegebener Antikörper dazu neigt, nur ein Antigen zu binden, kann ein gegebenes Klasse-I-Molekül viele hundert verschiedene Peptide binden. Da die Anzahl von Viren und anderen Pathogenen ziemlich groß ist, ist es offensichtlich, dass unsere Immunabwehr schwach wären, wenn wir nur ein einziges Klasse-I-Molekül hätten, auch wenn es zur Bindung und Veränderung vieler verschiedener Peptide fähig wäre. Aus diesem Grund besitzen alle Menschen zwischen drei und sechs verschiedene Klasse-I-Moleküle, wobei jedes davon viele verschiedene Arten von Peptiden binden kann. Demgemäß können CD8-Zellen viele Tausend, an das eine oder andere Klasse-I-Molekül gebundene Peptide erkennen.

[0017] Da Selektion die beherrschende Kraft der Evolution zu sein scheint, bilden sich Pathogene heraus, die durch das Immunsystem nicht effizient erkannt werden können. Folglich kann eine Virussequenz, die Peptide hervorruft, die effizient an eine Reihe von Klasse-I-Molekülen binden, in der Weise mutieren, dass sie von keinem der sechs in einem Individuum vorhandenen Klasse-I-Molekülen erkannt wird. Dieser Virus kann daher vom Immunsystem möglicherweise nicht erkannt werden und folglich den Tod des befallenen Individuums verursachen. Wenn alle Individuen einen identischen Satz von Klasse-I-Molekülen besitzen würden, könnte ein solcher Virus denkbarerweise eine ganze Spezies eliminieren. Individuelle Variation ist eine Schutzmaßnahme gegen diese Möglichkeit, da in jeder Population mehrere 100 verschiedene Formen von Klasse-I Molekülen vorhanden sind. Folglich könnte ein Virus einigen Individuen Schaden zufügen, jedoch kaum die Ausrottung einer ganzen Population zur Folge haben, da verschiedene Individuen verschiedene Sätze von Klasse-I Molekülen besitzen.

[0018] Wenn Klasse-I-Moleküle eine Vielfalt von Peptiden, einschließlich von eigenen Zellproteinen der Erfinder hergeleitete Peptide binden können, könnte man sich fragen, weshalb die CD8-Zellen des Immunsystems unsere eigenen Gewebe nicht erkennen und zerstören. Wenn auch die Antwort auf diese Frage nicht gänzlich geklärt ist, wird zur Zeit angenommen, dass zwei unterschiedliche Mechanismen wirken. Erstens werden CD8-Zellen, die mit Eigen-Peptiden reagieren können, im Thymus eliminiert. Zweitens werden CD8-Zellen gegen Eigen-Peptide in den peripheren Organen des Immunsystems reaktionslos (anergisch). Da nicht jeder/s mögliche Typ oder Epitop von Zellproteinen von den Zellen des Thymus synthetisiert wird, scheint der zweite Mechanismus die wahrscheinlichere Erklärung zu sein. Dieser Mechanismus scheint für den Level der normalerweise angetroffenen Eigen-Peptide funktionsfähig zu sein. Wenn dieser Level auf irgendeine Weise erhöht wird, kann gezeigt werden, dass Individuen in der Tat CD8-Zellen besitzen, die Eigen-Peptide exprimierende Zellen erkennen und zerstören können. Die letztere Beobachtung ist von Bedeutung bezüglich des Konzepts des Einsatzes des Immunsystems zur Eliminierung von Tumorzellen.

Kurze Zusammenfassung der Erfindung

[0019] Ein direkterer Ansatz zur Lösung der oben diskutierten Probleme wäre es, nur jene CD8-Zellen direkt und spezifisch zu stimulieren, die für die Bekämpfung der Krankheit relevant sind. Neueste Erkenntnisse über die Mechanismen, welche die Beladung von Klasse-I-Molekülen mit Peptiden steuern, haben nun dies ermöglicht. Folglich sind Klasse-I-Moleküle in Zellen von Drosophila melanogaster (Fruchtfliege) exprimiert worden. Da Drosophila kein Immunsystem besitzt, sollten die verschiedenen, an der Peptidbeladungsmaschinerie beteiligten Proteine in solchen Zellen fehlen. Es ist nun erwiesen, dass es das Fehlen der Proteinbeladungsmaschinerie erlaubt, die Klasse-I Moleküle als „leere" Moleküle an der Zelloberfläche zu exprimieren.

[0020] in weiterer Vorteil der Verwendung des Drosophila-Systems ist es, dass Drosophila-Zellen eine Temperatur von 28 °C und nicht 37 °C bevorzugen. Diese Tatsache ist von großer Bedeutung, da „leere" Klasse-I-Moleküle thermolabil sind und bei 37 °C zum Zerfall neigen. Durch Inkubation der Klasse-I-exprimierenden Drosophila-Zellen mit Peptiden, die an das Klasse-I-Molekül binden können, ist es möglich zu erreichen, dass jedes Klasse-I-Molekül ein und dasselbe Peptid enthält. Die Zellen sind demgemäß von Säugetierzellen sehr verschieden, worin die Klasse-I-Moleküle viele verschiedene Peptid-Typen enthalten, wovon die meisten von unseren eigenen, harmlosen Zellproteinen hergeleitet sind.

[0021] Trotz der zahlreichen erfolglosen Anstrengungen in hunderten Laboratorien im Laufe der Jahre, CD8-Zellen in vitro spezifisch zu aktivieren, scheint die Annahme berechtigt zu sein, dass hohe Expressionslevel eines Klasse-I-Moleküls, das ein einziges Peptid enthält, den Bedarf der In-vivo-Stimulation des Immunsystems überwinden könnte. Durch Inkubation der in geeigneter Weise behandelten Drosophila-Zellen mit Milz- oder Lymphknoten-Zellen aus ungeprimten Mäusen (d.h., dass die Mäuse vorher nie den verwendeten Peptiden ausgesetzt waren) ist es nun möglich, zytotoxische Zellen zu erzeugen, die für das antigene Peptid vollkommen spezifisch sind. Die zytotoxische Reaktion ist für gewöhnlich drei bis fünf Mal stärker als diejenige, die über vorher bekannte Verfahren erhalten wurde.

[0022] Wenn auch einige Beispiele hierin unter Verwendung von murinen Klasse-I-Molekülen ein „Modell" darstellen, werden hierin andere Beispiele unter Verwendung humaner Klasse-I-Moleküle oder Human-Moleküle exprimierender, transgener Mäusen offenbart. In einem der Beispiele wird ein vom gag-Protein aus HIV (dem AIDS-Virus) hergeleitetes Peptid verwendet. Diese Kombination von Molekülen funktioniert gut; in der Tat funktioniert es genauso gut wie Experimente unter Verwendung eines rein murinen Modells. Außerdem ist das vorliegend offenbarte System, das Human-Moleküle in einem Drosophila-System wie hierin offenbart verwendet, wesentlich vielseitiger als das in einer kürzlich erschienen Arbeit von DeBruijn et al. (Eur. J. Immunol. 21, 2963–70 (1991)) beschriebene Maus-System. Im Speziellen erfordert das letztere System gewaltige Mengen von Effektorzellen, um Abtötung zu bewirken und ist weniger vielseitig als das vorliegend offenbarte System. Bedeutungsvoller ist, dass das vorliegend offenbarte System im Gegensatz zum Maus-System Reaktionen gegen Human-Moleküle effizient verwendet und aktiviert.

[0023] In den meisten der gegenwärtig offenbarten, bis zum heutigen Zeitpunkt durchgeführten Experimente sind intakte Drosophila-Zellen verwendet worden. Es wird jedoch nun gezeigt, dass leere, trunkierte Moleküle in guten Ausbeuten (ungefähr 1 mg/l) aus Drosophila-Zellen erhalten werden können. Solche Moleküle könnten zur Erzielung der Immunsuppression in Transplantat-Patienten und zur Behandlung von Patienten mit Autoimmunerkrankungen, wie z.B. rheumatischer Polyarthritis, nützlich sein.

[0024] Zusammenfassend hat das Langzeitengagement der Erfinder, das auf das Verständnis der Einzelheiten darüber abzielte, wie Peptide erzeugt und in vivo auf Klasse-I-Moleküle geladen werden, die Entwicklung eines vernünftigen und höchst effizienten Weges stimuliert, durch den CD8-Zellen gegen Peptide nach Wahl der Erfinder aktiviert werden können. Die Erfinder sind davon überzeugt, dass die Anwendung solch aktivierter Zellen eine Rolle bei der Behandlung einer breiten Vielfalt von Krankheitszuständen einnehmen kann.

[0025] Ein vernünftiger, eleganter Weg der Produktion, Beladung und Verwendung von Klasse-I-Molekülen zur spezifischen Aktivierung von CD8-Zellen in vitro wird nun hierin offenbart. Zusätzlich werden therapeutische Anwendungen dieser neuen Technologie bei der Behandlung von Krebs, Tumoren oder Neoplasie, sowie Virus-, Retrovirus-, Autoimmun- und Autoimmun-Typus-Erkrankungen offenbart.

[0026] Die vorliegende Erfindung stellt ein Verfahren zur Herstellung aktivierter CD8-Zellen in vitro bereit, worin ein Verfahren das Kontaktieren von CD8-Zellen in vitro mit Antigen-beladenen Human-Klasse-I-MHC-Molekülen umfasst, die an der Oberflächen von Insektenzellen für einen Zeitraum exprimiert werden, der ausreicht, um die CD8-Zellen auf eine Antigen-spezifische Weise zu aktivieren. Bei einer der Variationen sind die Oberflächen-exprimierten Moleküle monotypisch; bei einer anderen sind die Oberflächen-exprimierten Moleküle mono-antigen. Die hierin vorgesehenen Verfahren können außerdem Fogendes umfassen: (a) Trennen der aktivierten CD8-Zellen von den Antigen-beladenen Klasse-I-Molekülen, (b) Suspendieren der aktivierten CD8-Zellen in einem annehmbaren Träger oder Exzipienten. Gemäß den offenbarten Verfahren können die Antigene native oder nicht abgebaute Proteine oder Polypeptide umfassen, oder sie können antigene Polypeptide umfassen, die zu Peptidfragmenten gespalten worden sind, die zumindest 8 Aminosäurereste vor der Inkubation mit den Human-Klasse-I-Molekülen umfassen.

[0027] Eine durch die Verfahren der Erfindung aktivierte CD8-T-Zelle kann bei der Herstellung eines Medikaments zur Behandlung eines Krebses, Tumors, einer Neoplasie, Virus-(z.B. Retrovirus-)Infektion oder eines Autoimmunleidens verwendet werden. Das Medikament kann zur Verabreichung durch intravenöse Injektion geeignet sein.

Kurzbeschreibung der Abbildungen

[0028] **Fig.** 1 stellt die Konstruktion der Expressionsplasmide pRmHa-2 und pRmHa-3 dar. In Fig. 1A ist die Konstruktion von pRmHa-2 gezeigt; in Fig. 1B ist die Konstruktion von pRmHa-3 gezeigt; und in **Fig.** 3C ist der pRmHa-3-Vektor dargestellt und zeigt die Restriktions-, Polylinker-, Promotor- und Polyadenylierungsstellen

sowie eine Stelle, an der eine Nucleotidsequenz für die Expression eingesetzt werden kann.

[0029] Fig. 2A zeigt, dass muriner MHC Klasse I K^b/Maus-β2 (mβ2) und D^b/mβ2, exprimiert in Drosophila-Zellen, die Charakteristika von peptidfreien oder „leeren" Klasse-I-Molekülen aufweisen. K^b/β2, L^d/β2 und D^b/β2 exprimierende Drosophila-Zellen wurden für 45 Minuten mit 35S-Methionin markiert und Lysate hergestellt. Jedes Lysat wurde in vier Aliquoten geteilt, denen entweder OVA, NP oder überhaupt kein Peptid zugesetzt wurde. Nach Inkubation für eine Stunde bei 4 °C wurde das andere für eine Stunde bei 30 °C inkubiert. Klasse-I-Moleküle wurden dann aus den Lysaten immunpräzipitiert und durch SDS-PAGE analysiert. Fig. 2B stellt Ergebnisse eines Tests von radioaktiven Zell-Lysaten dar, die aus Drosophila-Zellen hergestellt wurden, die K^b/β2, L^d/β2 und D^b/β2 entweder mit murinem oder humanem Microglobulin exprimierten. Die Inkubationstemperatur (in °C) ist gegen immunpräzipitierbare Schwerkette (in %) aufgetragen. K^b/mβ2 (offene Quadrate), K^b/mβ2 + OVA-8 (volle Quadrate), L^d/mβ2 (offene Dreiecke), L^d/mβ2 + NP (volle Dreiecke), D^b/mβ2 (offene Kreise) und D^b/mβ2 + INF (volle Kreise) sind gezeigt.

[0030] **Fig.** 3 (A und B) zeigt die mittlere Fluoreszenz von transfizierten, in serumfreien Medien kultivierten Drosophila-Zellen, wie sie durch Cytofluorometrie nach Färbung auf K^b/mβ2 Y3-Antikörper und D^b/mβ2 mit B22.249-Antikörper bestimmt wurde. Vor der Färbung wurden die Zellen wie in der Figur bezeichnet in Peptid (25 µg/ml) für eine Stunde bei 27 °C inkubiert, gefolgt von einer 2-stündigen Inkubation bei 37 °C. Die mittlere Fluoreszenz jeder behandelten Zellpopulation ist gegen die Inkubationsbedingungen aufgetragen gezeigt. Fig. 3A zeigt, dass an der Oberfläche von Drosophila-Zellen exprimierte Maus-Klasse-I-Moleküle bei 37 °C rasch dermaßen denaturiert werden, dass sie durch Klasse-I-Antikörper nicht länger erkannt werden können. Fig. 3B zeigt, dass in Drosophila-Zellen exprimierte Klasse-I-MHC-Moleküle in Triton X100-Lysaten thermolabil sind, wenn sie nicht in Gegenwart von Peptid vorinkubiert werden, die bekanntermaßen spezifisch an die Klasse I binden.

[0031] Fig. 4 stellt Daten eines Experiments dar, das dazu entworfen war, zu bestimmen, ob Insektenzellen Antigen prozessieren und dieses auf Klasse-I-Moleküle aufladen kann, und ob letztere entweder endogen oder exogen hergeleitetes Antigen T-Zellen präsentieren können. Mit K^b/β2 transfizierte Schneider-2-(SC2-) oder 3T3-Zellen wurden mit Ovalbumin-Protein (OvPro) oder Ovalbumin-Peptid, OVA 24 (OvPep) in isotonischen (Iso) oder hypertonischen (Hyp) Medien inkubiert. (Die murine Zelllinie BALB/3T3 ist von der ATCC unter der Zugangsnummer CCL 163 erhältlich). Nach der Behandlung wurden die Zellen mit dem T-Zellenhybridom b3/CD8 co-kultiviert. B3/CD8 ist ein T-Zellenhybridom zwischen B3 (Carbone et al., J. Exp. Med. 169, 603–12 (1989)), für Ovalbumin-Peptid 253–276 spezifischer, zytotoxischer T-Zelle, präsentiert durch H-2K^b-Klasse-I-Moleküle und CD8-tragender, IL-2-sekretierender Zelllinie. Bei Antigenstimulation produziert b3/CD8 IL-2, gemessen durch ^{3}H-Thymidininkorporation in die IL-2-abhängige Zelllinie CTLL (Gillis et al., J. Immunol. 120, 2027 (1978)). Folglich lässt sich durch Messung der produzierten IL-2-Menge auf T-Zellen-Erkennung testen.

[0032] Der Überstand aus den Co-Kulturen wurde durch ^{3}H-Thymidin-Inkorporation durch die IL-2-abhängige Zelllinie CTLL (ATCC-Nr. TIB 214) auf IL-2 analysiert. Die inkorporierte ^{3}H-Thymidinmenge ist gegen die anfänglichen Zellbehandlungen aufgetragen.

[0033] **Fig.** 5A zeigt die Peptid-induzierte Thermostabilisierung von an der Oberfläche von Drosophila-Zellen exprimiertem HLA B27 und HLA A2.1 durch HIV-Peptide. Die mittlere Fluoreszenz jeder Zellpopulation ist gegen die Inkubationsbedingungen aufgetragen gezeigt.

[0034] Fig. 5B zeigt, dass in Drosophila-Zellen exprimiertes HLA B7 die Eigenschaften von leeren Klasse-I-Molekülen in Triton-X100-Lysaten aufweist.

[0035] Fig. 5C illustriert, dass in Drosophila-Zellen exprimiertes HLA A2.2Y die Eigenschaften von leeren Klasse-I-Molekülen in Triton-X100-Lysaten aufweist.

[0036] **Fig.** 6 illustriert die primäre CD8-Antwortinduktion nach CD8-Stimulation in vitro in An- und Abwesenheit von Peptid. Die Antwortgeber sind Maus-B6-Milzzellen, und die Stimulatoren sind RMA-S (offene Dreiecke); RMA-S plus OVA (volle Dreiecke); Drosophila plus OVA (offene Quadrate); und Drosophila K^b plus OVA (volle Quadrate). In Fig. 6A sind RMA-S-Zellen und Ovalbumin-Peptid das Target; in Fig. 6B sind RMA-S-Zellen das Target. In beiden Grafiken ist die prozentuelle Lyse gegen Effektor/Target-Verhältnis aufgetragen.

[0037] Fig. 7 stellt die Antwortinduktion nach CD8-Stimulierung in vitro mit Drosophila-Zellen in An- oder Abwesenheit von Peptid dar. In 7 werden Antwortgeber-C57-B1/6-Splenozyten mit Drosophila-Zelle K^b-OVA stimuliert. Die Target-Zellen umfassen: EL4 (offene Quadrate mit Mittelpunkt); EL4 OVA (voller Rhombus); EL4

+ OVA-Peptid (schwarze Quadrate mit weißem Mittelpunkt); und RMA-S (volle Quadrate). Prozentuelle Lyse ist gegen Effektor/Target-Verhältnis aufgetragen.

[0038] **Fig.** 8 (A und B) zeigt das In-vivo-Primen mit transfizierten Drosophila-Zellen, worin die Antwortgeber C57-B1/6-Maussplenozyten sind. In **Fig. 8A** sind einige der Zellen fixiert; in **Fig. 8B** sind alle Drosophila-Zellen nicht fixiert. In **Fig. 8A** sind die Stimulator-Fliegenzellen wie folgt: K^b (offene Quadrate mit Mittelpunkt); K^b OVA fixiert (volle Rhomben), K^b OVA fixiert + S/N (volle Quadrate mit weißem Mittelpunkt); K^b OVA (nicht fixiert) (volle Rhomben mit weißem Mittelpunkt). In **Fig. 8B** sind die Stimulator-Fliegenzellen wie folgt dargestellt: K^b (offene Quadrate mit Mittelpunkt); K^b/OVA (volle Rhomben); K^b/OVA in vivo/K^b/OVA in vitro (volle Quadrate mit weißem Mittelpunkt); K^b/OVA in vivo/D^b/OVA in vitro (volle Rhomben mit weißem Mittelpunkt); und D^b/OVA (volle Quadrate). Sowohl in A als auch in B ist die prozentuelle Lyse gegen das Effektor/Target-Verhältnis aufgetragen.

[0039] **Fig. 9** stellt die Ergebnisse eines Experiments dar, bei dem C57BL/6-Mäuse mit 3MM EL4 OVA und daraufhin mit Drosophila-Zellen oder nicht mit Zellen injiziert wurden. Das prozentuelle Überleben jeder dieser drei Mauspopulationen ist gegen die Anzahl der Überlebenstage aufgetragen. Gruppe I (volle Kreise) erhielten eine subkutane Injektion von 50MM lebender, K^b/OVA exprimierender Drosophila-Zellen 5 Tage nach der EL4-Injektion; Gruppe II (offene Quadrate) erhielt 50MM fixierte, K^b/OVA exprimierende Drosophila-Zellen 5 Tage nach der EL4-Injektion; und Gruppe III (volle Rhomben), die Kontrollgruppe, erhielt keine zusätzlichen Injektionen. Gruppe-II-Mäuse wurden am Tag 20 getötet; Gruppe-III-Mäuse am Tag 23.

[0040] Die **Fig. 10A**, B und C stellen die In-vitro-Aktivierung mit transfizierten Drosophila-Zellen dar. In A sowie B sind die Antwortgeber-Zellen transgene B7/Human-β2-Microglobulin-Mausmilzzellen. Bei den Target-Zellen handelt es sich um Jurkat (offene Quadrate mit Mittelpunkt) und mit HIV-GAG-Peptid A beschichtete Jurkat (volle Rhomben), wie in A sowie B dargestellt ist. In **Fig. 10A** sind die Stimulatorzellen Drosophila-Zellen mit B7-HIV-GAG (A); in **Fig. 10B** sind sie Drosophila-Zellen mit B7. In **Fig. 10C** sind die Antwortgeber-Zellen durch Drosophila B7-VPR stimulierte, transgene B7-Mausmilzzellen. Die Target-Zellen sind Jurkat (offene Quadrate mit Mittelpunkt); Jurkat/VPR (volle Rhomben); RMA-S (volle Quadrate); und RMA-S/VPR (offene Rhomben mit Mittelpunkt). Die prozentuelle Lyse ist in A, B und C gegen das Effektor/Target-Verhältnis aufgetragen.

[0041] Die **Fig. 11A**, B und C stellen die In-vitro-Aktivierung mit transfizierten Drosophila-Zellen dar. In **Fig. 11A** sind die Antwortgeber-Zellen Human-PBL-HLA-B7, stimuliert mit Drosophila-Zelle B7-VPR. Die prozentuelle Lyse ist gegen das Effektor/Target-Verhältnis aufgetragen. Die Target-Zellen sind Jurkat VPR (offene Quadrate mit Mittelpunkt); EL4 B7 (volle Rhomben); Jurkat (volle Quadrate); und EL4 B7 VPR (offene Rhomben mit Mittelpunkt). In **Fig. 11B** sind die Antwortgeber-Zellen Human-HLA2-PRL, stimuliert mit Drosophila-Zelle A2-GAG (A) (HIV). Die prozentuelle Lyse ist gegen das Effektor/Target-Verhältnis aufgetragen. Die Target-Zellen sind Jurkat A2 (volle Rhomben) und Jurkat A2-GAG (A) (offene Quadrate mit Mittelpunkt). In **Fig. 11C** sind die Antwortgeber-Zellen Human-B27-PBL, stimuliert mit Drosophila-Zelle B27-VPR (HIV). Die Target-Zellen sind 310-B27 (offene Quadrate mit Mittelpunkt) oder 310 (B27)-VPR (volle Rhomben). Die prozentuelle Lyse ist gegen das Effektor/Target-Verhältnis aufgetragen.

[0042] **Fig. 12** stellt die In-vitro-Aktivierung mit transfizierten Drosophila-Zellen dar. Die Antwortgeber-Zellen sind Human-PBL-HLA-A2.2, stimuliert mit HIV-POL-Peptid beschichteter Drosophila-Zelle A2.1. Die prozentuelle Lyse ist gegen das Effektor/Target-Verhältnis aufgetragen. Die Target-Zellen sind Jurkat A2.1-HIV (offene Quadrate mit Mittelpunkt) und Jurkat A2.1 (voller Rhombus).

Ausführliche Beschreibung der Erfindung

A. Definitionen

[0043] Aminosäure: Alle hierin definierten Aminosäurereste befinden sich in der natürlichen L-Konfiguration. In Übereinstimmung mit der standardmäßigen Nomenklatur, J. Biol. Chem. 243, 3557–59 (1969), erfolgen die Abkürzungen für Aminosäurereste wie in der folgenden Übereinstimmungstabelle gezeigt:

ÜBEREINSTIMMUNGSTABELLE

SYMBOL		AMINOSÄURE
1-Buchstabe	3-Buchstaben	
Y	Tyr	L-Tyrosin
G	Gly	Glycin
F	Phe	L-Phenylalanin
M	Met	L-Methionin
A	Ala	L-Alanin
S	Ser	L-Serin
I	Ile	L-Isoleucin
L	Leu	L-Leucin
T	Thr	L-Threonin
V	Val	L-Valin
P	Pro	L-Prolin
K	Lys	L-Lysin
H	His	L-Histidin
Q	Gln	L-Glutamin
E	Glu	L-Glutaminsäure
W	Trp	L-Tryptophan
R	Arg	L-Arginin
D	Asp	L-Asparaginsäure
N	Asn	L-Asparagin
C	Cys	L-Cystein

[0044] Es sollte angemerkt werden, dass alle Aminosäurerestesequenzen hierin als Formeln dargestellt sind, deren Orientierung von links nach rechts der herkömmlichen Richtung vom Amino-Terminus zum Carboxy-Terminus entspricht.

[0045] Basenpaar (bp): ist eine Partnerschaft von Adenin (A) mit Thymidin (T) oder Cytosin (C) mit Guanin (G) in einer DNA-Doppelhelix.

[0046] Klon: beschreibt eine große Anzahl von identischen Zellen oder Molekülen mit einer/m einzigen angestammten Zelle oder Molekül.

[0047] Komplementäre Basen: Nucleotide, die sich normalerweise paaren, wenn DNA oder RNA eine doppelsträngige Konfiguration einnimmt.

[0048] Komplementäre Nucleotidsequenz: eine Sequenz von Nucleotiden in einem einzelsträngigen Molekül von DNA oder RNA, die zu der eines anderen Einzelstrangs hinreichend komplementär ist, um an diese mit folglicher Wasserstoffbrückenbindung spezifisch zu hybridisieren.

[0049] Konserviert: eine Nucleotidsequenz ist bezüglich einer vorgewählten (Bezugs-) Sequenz konserviert, wenn sie an ein exaktes Komplement der vorgewählten Sequenz nicht-zufällig hybridisiert.

[0050] Stromab: bezeichnet Sequenzen, die sich in Expressionsrichtung weiter fortsetzen; beispielsweise befindet sich die Polypeptid-kodierende Region für ein Gen stromab des Initiationscodons.

[0051] Expression: die durch ein Strukturgen unterzogene Prozess, um ein Polypeptid zu produzieren. Sie ist eine Kombination von Transkription und Translation.

[0052] Gen (Cistron): eine Nucleinsäure, dessen Nucleotidsequenz für eine RNA oder ein Polypeptid kodiert. Ein Gen kann entweder RNA oder DNA sein. Es kann auch sowohl Regionen, die der kodierenden Region vorangehen oder folgen (Leader und Trailer), als auch Intervening-Sequenzen (Introns) zwischen einzelnen kodierenden Segmenten (Exons) umfassen.

[0053] Hybridisierung: die Paarung von im Wesentlichen komplementären Nucleotidsequenzen (Stränge von Nucleinsäuren), um einen Duplex oder Heteroduplex durch Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den komplementären Basenpaaren zu bilden. Sie ist eine spezifische, d.h. nicht zufällige Wechselwirkung zwischen zwei komplementären Polynucleotiden, die kompetitiv inhibiert werden kann.

[0054] Ligand: Ligand bezieht sich auf ein Molekül, das einen strukturellen Teil aufweist, der durch spezifische Wechselwirkung mit einem speziellen Rezeptorprotein gebunden wird.

[0055] Nucleotid: eine monomere Einheit von DNA oder RNA, bestehend aus einem Zuckerteil (Pentose), einer Phosphatgruppe und einer stickstoffhältigen, heterozyklischen Base. Die Base ist über den glykosidischen Kohlenstoff (1'-Kohlenstoff der Pentose) an den Zuckerteil gebunden und diese Kombination von Base und Zucker ist ein Nucleosid. Wenn das Nucleosid eine Phosphatgruppe enthält, die an die 3'- oder 5'-Position der Pentose gebunden ist, wird es als Nucleotid bezeichnet. Eine Sequenz von operativ verbundenen Nucleotiden wird hierin typischerweise als eine „Basensequenz" oder „Nucleotidsequenz" und deren grammatikalischen Äquivalente bezeichnet und ist hierin durch eine Formel dargestellt, deren Orientierung von links nach rechts der herkömmlichen Richtung von 5'-Terminus nach 3'-Terminus entspricht.

[0056] Oligonucleotid oder Polynucleotid: ein Polymer von einzel- oder doppelsträngigen Nucleotiden. Wie hierin verwendet, umfasst „Oligonucleotid" und dessen grammatikalischen Äquivalente die gesamte Spanne von Nucleinsäuren. Ein Oligonucleotid bezieht sich typischerweise auf ein Nucleinsäuremolekül bestehend aus einem linearen Strang von Ribonucleotiden. Die genaue Größe hängt von vielen Faktoren ab, die ihrerseits von den letztlichen Bedingungen der Verwendung abhängt und ist im Fach bekannt.

[0057] Offenes Leseraster: eine Nucleotidsequenz, für gewöhnlich eine DNA-Sequenz, die (potentiell) in Protein translatierbar ist.

[0058] Polypeptid und Peptid: sind hierin wechselseitig verwendete Begriffe, um eine lineare Reihe von Aminosäureresten zu bezeichnen, die durch Peptidbindungen zwischen den Alpha-Amino- und Carboxygruppen benachbarter Reste miteinander verbunden sind.

[0059] Rezeptor: Rezeptor und Rezeptorprotein sind hierin verwendete Begriffe, um ein biologisch aktives, proteinisches Molekül zu bezeichnen, das spezifisch an (oder mit) andere(n) Moleküle(n) bindet.

[0060] Rekombinantes DNA-(rDNA-)Molekül: ein DNA-Molekül, das durch operatives Verknüpfen einer Nucleinsäure, wie z.B. eines Gens, mit einer DNA-Molekülsequenz der vorliegenden Erfindung hergestellt wird. Folglich ist ein rekombinantes DNA-Molekül ein Hybrid-DNA-Molekül, das zumindest zwei Nucleotidsequenzen umfasst, die normalerweise in der Natur nicht gemeinsam auftreten. rDNAs, die keinen gemeinsamen biologischen Ursprung haben, d.h. evolutionär verschieden sind, werden als „heterolog" bezeichnet.

[0061] Im Wesentlichen homogen heißt, dass eine bestimmte, gegenständliche Sequenz oder ein bestimmtes, gegenständliche s Molekül, beispielsweise eine mutierte Sequenz, von einer Bezugssequenz durch eine oder mehrere Substitutionen, Deletionen oder Additionen abweicht, wobei die Nettoauswirkung davon nicht zu einer nachteiligen funktionellen Verschiedenheit zwischen Bezugs- und Gegenstands-Sequenz führt. Im Sinne der vorliegenden Erfindung werden Aminosäuresequenzen mit mehr als 90 % Ähnlichkeit, äquivalenter biologischen Aktivität und äquivalenter Expressionseigenschaften als im Wesentlichen homolog betrachtet. Aminosäuresequenzen mit mehr als 40 % Ähnlichkeit werden als im Wesentlichen ähnlich betrachtet. Zum Zwecke der Bestimmung von Homologie und Ähnlichkeit sollten Trunkation oder interne Deletionen der Bezugssequenz nicht in Betracht gezogen werden, sowie auch nachfolgende Modifizierungen des Moleküls, z.B. Glykosylierung. Sequenzen mit geringeren Homologiegraden und vergleichbarer Bioaktivität werden als Äquivalente betrachtet.

[0062] Transfektion: ist der Erwerb neuer genetischer Marker durch Inkorporation zugesetzter DNA in eukaryotischen Zellen.

[0063] Vektor: eine Nucleinsäure, vorzugsweise ein DNA-Molekül, das zur eigenständigen Replikation in einer Zelle fähig ist und an die ein Nucleinsäuresegment, z.B. ein Gen oder Polynucleotid (vorzugsweise DNA) derart operativ gebunden werden kann, das die Replikation des angebundenen Segments herbeigeführt wird. Vektoren, die zur Lenkung der Expression von Nucleinsäure-(vorzugsweise DNA-)Segmenten fähig sind, die für ein oder mehrere Proteine kodieren, werden hierin als „Expressionsvektonen" bezeichnet. Eine weitere Art wichtiger Vektoren erlauben die Klonierung von cDNA (komplementäre DNA) aus mRNAs, produziert unter

Verwendung von reverser Transkriptase.

[0064] Klonierungsvektor: ist irgendein Plasmid oder Virus, in das eine fremde, zu klonierende Nucleotidsequenz (vorzugsweise DNA) insertiert werden kann.

[0065] Expressionsvektor: ist irgendein Plasmid oder Virus, in das eine fremde Nucleotidsequenz (vorzugsweise DNA) insertiert oder exprimiert werden kann.

B. Ausführliche Beschreibung

1. Human-Klasse-I-MHC-Moleküle

[0066] Ein Human-Klasse-I-MHC-Molekül zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung kann aus der HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-E, HLA-F und HLA-G umfassenden Gruppe und bevorzugter aus der HLA-A, HLA-B und HLA-C umfassenden Gruppe gewählt werden.

[0067] Obwohl es möglich ist, für Human-Klasse-I-MHC-Moleküle kodierende Nucleotidsequenzen aus bekannten, etablierten Zelllinien zu isolieren, welche die geeigneten Varianten tragen, z.B. den transformierten Zelllinien JY, BM92, WIN, MOC und MG, ist es praktikabler, die Nucleotidsequenz aus einem Teil des Gens über Polymerasekettenreaktion (PCR) unter Verwendung der geeigneten Primer zu synthetisieren. Dieses Verfahren ist erfolgreich verwendet worden, um HLA-cDNA der vollen Länge zu klonieren; beispielsweise sind die Sequenzen für HLA-A25, HLA-A2, HLA-B7, HLA-B57, HLA-B51 und HLA-B37 in der GenBank-Datenbank unter den Zugangsnummern M32321, M32322, M32317, M32318, M32319 bzw. M32320 deponiert. Bekannte, Teil- oder mutmaßliche HLA-Aminosäure- und -Nucleotidsequenzen, einschließlich der Konsensussequenz, sind publiziert worden (siehe z.B. Zemmour und Parham, Immunogenetics 33, 310–320 (1991)), und HLA-Varianten exprimierende Zelllinien sind ebenfalls bekannt und allgemein erhältlich, viele davon von der American Type Culture Collection („ATCC"). Daher ist es unter Verwendung von PCR möglich, Human-Klasse-I-MHC-kodierende Nucleotidsequenzen zu synthetisieren, die dann operativ an einen Vektor gebunden und verwendet werden können, um eine geeignete Zelle zu transformieren und sie darin zu exprimieren.

[0068] Insbesondere bevorzugte Verfahren zur Herstellung von Human-Klasse-I-MHC-Molekülen und Human-β2-Microglobulinmolekülen stützen sich auf die Verwendung von vorgewählten Oligonucleotiden als Primer in einer Polymerasekettenreaktion (PCR), um wie hierin beschrieben PCR-Reaktionsprodukte zu bilden. Die Herstellung von MHC- und β2-Microglobulin-Gen wird typischerweise durch Primerextension erzielt, vorzugsweise durch Primerextension in einem Polymerasekettenreaktions(PCR-)Format.

[0069] Wenn die Gene durch (PCR-)Amplifikation herzustellen sind, müssen zwei Primer, d.h. ein Primerpaar für jeden kodierenden Strang zu amplifizierender Nucleinsäure verwendete werden. (Aus Gründen der Einfachheit wird die Synthese einer beispielhaften HLA-Varianten-Sequenz diskutiert, es versteht sich jedoch ausdrücklich, dass das beschriebene PCR-Amplifikationsverfahren gleichermaßen auf die Synthese von β2-Microglobulin und aller HLA-Varianten anwendbar ist, einschließlich jener, deren vollständige Sequenzen gegenwärtig unbekannt sind). Der erste Primer wird Teil des Nonsense-(Minus- oder Komplementär-)Strangs und hybridisiert an eine unter HLA-(Plus- oder kodierenden) Strängen konservierte Nucleotidsequenz. Um kodierende DNA-Homologe herzustellen, werden Erst-Primer daher so gewählt, dass sie an konservierte Regionen innerhalb der MHC-Gene, vorzugsweise an die Konsenssequenz oder an ähnlich konservierte Regionen innerhalb jeder HLA-Gruppe, d.h. Konsenssequenzen innerhalb HLA-A, HLA-B, HLA-C und die weniger polymorphen Gruppen HLA-E, -F und -G hybridisieren (d.h. komplementär dazu sind). Zweit-Primer werden Teil des kodierenden (Plus-)Strangs und hybridisieren an eine Nucleotidsequenz, die unter Minus-Strängen konserviert ist. Um HLA-kodierende DNA-Homologe herzustellen, werden daher Zweit-Primen so gewählt, dass diese mit einer konservierten Nucleotidsequenz am 5'-Ende des HLA-kodierenden Gens hybridisiert, wie z.B. demjenigen Bereich, der für den Leader oder die erste Gerüstregion kodiert. Es sollte angemerkt werden, dass bei der Amplifikation der kodierenden DNA-Homologe die konservierte 5'-Sequenz des zweiten Primers komplementär zu einer Sequenz sein kann, die unter Verwendung terminaler Desoxynucleotidyltransferase wie durch Loh et al. Science 243, 217–220 (1989) beschrieben exogen zugesetzt wird. Einer oder beide der ersten und zweiten Primer können eine Nucleotidsequenz enthalten, die eine Endonuclease-Erkennungsstelle definiert. Die Stelle kann heterolog dem zu amplifizierenden Immunglobulin-Gen sein und tritt typischerweise nahe dem oder am 5'-Ende des Primers auf.

[0070] Der erste Primer eines PCR-Primerpaars wird hierin manchmal als „Sense-Primer" bezeichnet, da er an den kodierenden oder Sense-Strang einer Nucleinsäure hybridisiert. Zusätzlich wird der zweite Primer ei-

nes Primerpaars hierin manchmal als „Anti-Sense-Primer" bezeichnet, da er an einen nicht kodierenden oder Anti-Sense-Strang von Nucleinsäure hybridisiert, d.h. an einen zu einem kodierenden Strang komplementären Strang. Eine Vielzahl an Erst-Primern und/oder Zweit-Primern kann in jeder Amplifikation verwendet werden, z.B. kann eine Spezies von Erst-Primer mit einer Reihe von verschiedenen Zweit-Primern gepaart werden, um mehrere verschiedene Primerpaare zu bilden. Alternativ dazu kann ein einzelnes Paar von Erst- und Zweit-Primern verwendet werden. Auf jeden Fall können die Amplifikationsprodukte unter Verwendung derselben oder verschiedener Kombinationen von Erst- und Zweit-Primern kombiniert werden, um die Vielfalt der Gen-Bibliothek zu erhöhen.

[0071] Sofern vorhanden, ist der die Restriktionsstelle definierende Teil typischerweise in einem 5'-terminalen, nicht-primenden Teil des Primers lokalisiert. Als die durch den ersten Primer definierte Restriktionsstelle wird typischerweise eine gewählt, die durch ein Restriktionsenzym erkannt wird, das die durch den zweiten Primer definierte Restriktionsstelle nicht erkennt, wobei es das Ziel ist, in der Lage zu sein, ein DNA-Molekül mit kohäsiven Termini herzustellen, die nicht komplementär zueinander sind und folglich eine gerichtete Insertion in einen Vektor erlauben.

[0072] In einer der Ausführungsformen nützt die vorliegende Erfindung einen Satz von Polynucleotiden, die Primer mit einer Priming-Region bilden, die am 3'-Terminus des Primers lokalisiert ist. Die Priming-Region ist typischerweise die 3'-äußersten (3'-terminalen) 15 bis 30 Nucleotidbasen. Der 3'-terminale, primende Teil jedes Primers ist in der Lage, als ein Primer zu agieren, um die Nucleinsäuresynthese zu katalysieren, d.h. eine Primer-Extensionsreaktion vom 3'-Terminus weg zu initiieren. Einer der oder beide Primer können zusätzlich einen 5'-terminalen (5'-äußersten), nicht primenden Teil enthalten, d.h., eine Region, die nicht an der Hybridisierung an HLA-Templat teilnimmt.

[0073] In der PCR funktioniert jeder Primer in Kombination mit einem zweiten Primer, um eine Target-Nucleinsäure zu amplifizieren. Die Wahl von PCR-Primerpaaren zur Verwendung in der PCR wird durch Erwägungen bestimmt, wie sie hierin zur Herstellung von Human-Klasse-I-MHC-Moleküle und β2-Microgiobulin diskutiert werden. Das heißt, dass die Primer eine Nucleotidsequenz aufweisen, die zu einer im Gen der Wahl konservierten Sequenz komplementär ist. Zweckdienliche Priming-Sequenzen sind nachstehend offenbart.

[0074] Die zur Klonierung der HLA-Gene angewendete Strategie hängt, wie im Fach gut bekannt ist, von der Art, Komplexität und Reinheit der Nucleinsäuren ab, welche die verschiedenen HLA-Gene ausmachen. Andere Faktoren umfassen, ob die Gene zu amplifizieren und/oder zu mutieren sind oder nicht.

[0075] Im Allgemeinen bestehen die HLA-Gene aus Polynucleotid-kodierenden Strängen, wie z.B. mRNA und/oder dem Sense-Strang genomischer DNA. Wenn HLA in Form doppelsträngiger, genomischer DNA vorliegt, wird es für gewöhnlich zuerst denaturiert, typischerweise durch Aufschmelzen in Einzelstränge. Eine HLA-Sequenz wird durch Behandeln (Kontaktieren) der Sequenz mit einem PCR-Primerpaar einer PCR-Reaktion unterworfen, wobei jedes Mitglied des Paars eine vorgewählte Nucleotidsequenz aufweist. Das PCR-Primerpaar ist zur Initiation von Primerextensionsreaktionen fähig, und zwar durch Hybridisierung an Nucleotidsequenzen, die vorzugsweise zumindest ungefähr 10 Nucleotide lang und bevorzugter zumindest ungefähr 20 Nucleotide lang und innerhalb der HLA-Sequenz konserviert sind.

[0076] Die PCR-Reaktion wird durchgeführt, indem das PCR-Primerpaar, vorzugsweise eine vorbestimmte Menge davon mit Nucleinsäuren des HLA-Gens, vorzugsweise einer vorbestimmten Menge davon in einem PCR-Puffer gemischt wird, um eine PCR-Reaktionsmischung zu bilden. Die Mischung wird unter Polynucleotid-synthetisierenden Bedingungen für eine Zeitdauer gehalten, die typischerweise vorbestimmt und zur Bildung eines PCR-Reaktionsprodukts ausreichend ist, wodurch eine Vielzahl verschiedener, HLA-kodierender DNA-Homologe produziert wird.

[0077] In einer weiteren Strategie ist es das Ziel, die für die HLA-Variante kodierenden Gene aus einer HLA-Variante zu klonieren, und zwar durch Bereitstellung eines Polynucleotid-Komplements des HLA, wie z.B. des Anti-Sense-Strangs genomischer dsDNA oder des Polynucleotids, das durch Behandlung von mRNA in einer Reaktion mit reverser Transkriptase produziert wird. Verfahren zur Herstellung solcher Komplemente sind im Fach gut bekannt.

[0078] Die PCR-Reaktion wird durch Anwendung irgendeines geeigneten Verfahrens durchgeführt. Im Allgemeinen tritt sie in einer gepufferten, wässrigen Lösung, d.h. einem PCR-Puffer auf, vorzugsweise bei einem pH von 7–9, insbesondere bevorzugt ungefähr 8. Vorzugsweise wird ein molarer Überschuss (für genomische Nucleinsäure, für gewöhnlich ungefähr 10^6:1 Primer:Templat) des Primers dem Puffer zugemischt, der den

Templat-Strang enthält. Ein großer molarer Überschuss wird bevorzugt, um die Effizienz des Prozesses zu verbessern.

[0079] Der PCR-Puffer enthält bevorzugt auch die Desoxyribonucleotidtriphosphate dATP, dCTP, dGTP und dTTP und eine Polymerase, typischerweise thermostabil, alle in geeigneten Mengen für die Primerextensions-(Polynucleotidsynthese-)Reaktion. Die erhaltene Lösung (PCR-Mischung) wird auf ungefähr 90 °C–100 °C für ungefähr 1 bis 10 Minuten, vorzugsweise 1 bis 4 Minuten erwärmt. Nach dieser Erwärmungsdauer wird die Lösung auf eine Temperatur von 54 °C abgekühlt, die für die Primerextension bevorzugt ist. Die Synthesereaktion kann bei Raumtemperatur bis zu einer Temperatur erfolgen, über der die Polymerase (induzierendes Agens) nicht mehr effizient funktioniert. Wenn folglich beispielsweise DNA-Polymerase als induzierendes Agens eingesetzt wird, ist die Temperatur im Allgemeinen nicht höher als ungefähr 40 °C. Ein beispielhafter PCR-Puffer umfasst folgendes: 50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl; pH 8,3; 1,5 mM $MgCl_2$; 0,001 % (w/v) Gelatine, 200 µM dATP; 200 µM dTTP; 200 µM dCTP; 200 µM dGTP; und 2,5 Units DNA-Polymerase I aus Thermus aquaticus (US-Patent Nr. 4.889.818) je 100 Mikroliter Puffer.

[0080] Das induzierende Agens kann jede Verbindung oder jedes System sein, die/das für die Erzielung der Synthese von Primerextensionsprodukten, einschließlich Enzymen funktionsfähig ist. Geeignete Enzyme für diesen Zweck umfassen beispielsweise DNA-Polymerase I aus E. coli, Klenow-Fragment von DNA-Polymerase I aus E. coli, DNA-Polymerase T4, andere erhältliche DNA-Polymerasen, reverse Transkriptase und andere Enzyme, einschließlich hitzestabile Enzyme, welche die Kombination der Nucleotide in geeigneter Weise erleichtern, um diejenigen Primerextensionsprodukte zu bilden, die komplementär zu jedem Nucleinsäurestrang sind. Im Allgemeinen wird die Synthese am 3'-Ende jedes Primers initiiert und setzt sich in 5'-Richtung entlang des Templat-Strangs fort bis die Synthese terminiert, wobei Moleküle unterschiedlicher Längen produziert werden. Es kann jedoch induzierende Agenzien geben, welche die Synthese am 5'-Ende initiieren und in obiger Richtung fortsetzen, und zwar unter Anwendung desselben Prozessen, wie er oben beschrieben wurde.

[0081] Das induzierende Agens kann auch eine Verbindung oder ein System sein, die/das für die Erzielung der Synthese von RNA-Primerextensionsprodukten, einschließlich Enzymen funktionsfähig ist. In bevorzugten Ausführungsformen kann das induzierende Agens DNA-abhängige RNA-Polymerase, wie z.B. RNA-Polymerase T7, RNA-Polymerase T3 oder RNA-Polymerase SP6 sein. Diese Polymerasen produzieren ein komplementäres RNA-Polynucleotid. Die hohe Umsatzgeschwindigkeit der RNA-Polymerase amplifiziert das Anfangs-Polynucleotid, wie von Chamberlin et al., The Enzymes, P. Boyer (Hrsg.), Academic Press, New York, S. 87–108 (1982) beschrieben worden ist. Ein weiterer Vorteil von RNA-Polymerase T7 ist es, dass durch Ersetzen eines Teils von cDNA durch ein oder mehrere mutagene Oligodesoxynucleotide (Polynucleotide) und direktes Transkribieren des teilweise fehlgepaarten Templats Mutationen in die Polynucleotidsynthese eingeführt werden können, wie vorher von Joyce et al., Nuc. Acid Res. 17, 711–722 (1989) beschrieben worden ist. Amplifikationssysteme, die auf Transkription basieren, sind von Gingeras et al., in: PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications, Academic Press Inc., San Diego, CA, S. 245–252 (1990) beschrieben worden.

[0082] Wenn das induzierende Agens eine DNA-abhängige RNA-Polymerase ist und daher Ribonucleotidtriphosphate inkorporiert, werden ausreichende Mengen ATP, CTP, GTP und UTP dem Primerextensionsreaktionsgemisch beigemischt und die erhaltene Lösung wie oben beschrieben behandelt.

[0083] Der neu synthetisierte Strang und ihr komplementärer Nucleinsäurestrang bilden ein doppelsträngiges Molekül, das in den nachfolgenden Schritten des Prozesses verwendet werden kann.

[0084] Nach Herstellung HLA-Varianten-kodierender DNA-Homologe für ein oder eine Vielfalt verschiedener Gene innerhalb des HLA-Systems werden die DNA-Moleküle typischerweise weiter amplifiziert. Obwohl die DNA-Moleküle durch klassische Techniken, wie z.B. Inkorporation in einen autonom replizierenden Vektor amplifiziert werden können, wird bevorzugt, die Moleküle vor dem Insertieren in einen Vektor zunächst zu amplifizieren, indem sie einer Polymerasekettenreaktion (PCR) unterworfen werden. PCR wird typischerweise durch Thermocycling durchgeführt, d.h. wiederholtes Erhöhen und Absenken der Temperatur des PCR-Reaktionsgemisches innerhalb eines Temperaturbereichs, dessen Untergrenze ungefähr 10 °C bis ungefähr 40 °C beträgt und dessen Obergrenze ungefähr 90 °C bis ungefähr 100 °C beträgt. Das Erhöhen und Absenken kann kontinuierlich erfolgen, erfolgt jedoch bevorzugt phasisch mit Zeitdauern relativer Temperaturstabilität bei jeder der Temperaturen, die Polynucleotidsynthese, Denaturierung und Hybridisierung begünstigen.

[0085] PCR-Amplifikationsverfahren werden in den US-Patenten Nr. 4.683.192, 4.683.202, 4.800.159 und 4.965.188 und zumindest in mehrerer Lehrbüchern, einschließlich „PCR-Technology: Principles and Applications for DNA Amplification", H. Ehrlich (Hrsg.), Stockton Press, New York (1989); und „PCR Protocols: A Guide

to Methods and Applications", Innis et al. (Hrsg.), Academic Press, San Diego, California (1990) ausführlich beschrieben. Verschiedene bevorzugte und hierin verwendete Verfahren und Primer werden nachstehend beschrieben und werden beispielsweise ebenso beschrieben in Nilsson et al., Cell 58, 707 (1989), Ennis et al., PNAS USA 87, 2833–7 (1990) und Zemmour et al., Immunogenetics 33, 310–20 (1991). Im speziellen wird bevorzugt, Primer aus dem Vergleich von 5'- und 3'-untranslatierten Regionen von HLA-Allelen (z.B. -A, -B, -C, -E, -F oder -G-Allelen) mit Selektion konservierter Sequenzen zu entwerten. Restriktionsstellen können ebenfalls in die 5'- und 3'-Primer inkorporiert werden, um die Subklonierung der Amplifikationsprodukte in Sequenzierungs- oder Expressionsvektoren zu ermöglichen. Es kann auch hilfreich sein, die 4-Basen-Spacersequenz proximal zur Restriktionsstelle zu setzen, um die Effizienz des Schneidens von Amplifikationsprodukten mit Enzymen zu verbessern.

[0086] Die folgenden Primer werden zur Amplifikation von HLA-A-, -B-, -C-, -E-, -F- und G- cDNA, vorzugsweise in gesonderten Reaktionen bevorzugt. Erhaltene cDNAs können dann wie hierin beschrieben kloniert und sequenziert werden. Diese Primer sind zur Verwendung für das Amplifizieren aller bekannten und gegenwärtig unbekannten HLA-Typen geeignet.

HLA A

5'- Primer: 5' CC ACC ATG GCC GTC ATG GCG CCC 3'

(Seq.-ID Nr. 1)

3'- Primer: 5' GG TCA CAC TTT ACA AGC TCT GAG 3'

(Seq.-ID Nr. 2)

HLA B

5'-Primer: 5' CC ACC ATG CTG GTC ATG GCG CCC 3'

(Seq.-ID Nr. 3)

3'- Primer: 5' GG ACT CGA TGT GAG AGA CAC ATC 3'

(Seq.-ID Nr. 4)

HLA C

5'-Primer: 5' CC ACC ATG CGG GTC ATG GCG CCC 3'

(Seq.-ID Nr. 5)

3'-Primer: 5' GG TCA GGC TTT ACA AGC GAT GAG 3'

(Seq.-ID Nr. 6)

HLA E

5'- Primer: 5' CC ACC ATG CGG GTA GAT GCC CTC C 3'

(Seq.-ID Nr. 7)

3'- Primer: 5' GG TTA CAA GCT GTC AGA CTC ACA 3'

(Seq.-ID Nr. 8)

HLA F

5'- Primer: 5' CC ACC ATG GCG CCC CGA AGC CTC 3'

(Seq.-ID Nr. 9)

3'- Primer: 5' GG TCA CAC TTT ATT AGC TGT GAG A 3'

(Seq.-ID Nr. 10)

HLA G

5'- Primer: 5' CC ACC ATG GCG CCC CGA ACC CTC 3'

(Seq.-ID Nr. 11)

3'- Primer: 5' GG TCA CAA TTT ACA AGC CGA GAG 3'

(Seq.-ID Nr. 12)

[0087] In bevorzugten Ausführungsformen wird je Amplifikationsreaktion nur ein Paar von Erst- und Zweit-Primern verwendet. Die aus einer Vielzahl von verschiedenen Amplifikationen erhaltenen Amplifikationsreaktionsprodukte, jede unter Verwendung einer Vielzahl von verschiedenen Primerpaaren, werden dann kombiniert. Jedoch sieht die vorliegende Erfindung auch DNA-Homolog-Herstellung über Co-Amplifikation (unter Verwendung von zwei Primerpaaren) und Multiplex-Amplifikation (unter Verwendung von bis zu 8, 9 oder 10 Primerpaaren) vor.

[0088] Der PCR-Prozess kann nicht nur dazu verwendet werden, um eine Reihe von Human-Klasse-I-kodierenden DNA-Molekülen herzustellen, sondern auch zur Induktion von Mutationen, die jene emulieren können, die in den höchst polymorphen HLA-Loci beobachtet werden, oder um Diversität aus einem einzelnen Elternklon zu kreieren und dadurch eine Klasse-I-MHC-Molekül-kodierende DNA-„Bibliothek" mit höherer Heterogenität bereitzustellen. Erstens sollte angemerkt werden, dass der PCR-Prozess selbst aufgrund einer Reihe von gut fachbekannten Faktoren von Natur aus mutagen ist. Zweitens können zusätzlich zu den im oben zitierten US-Patent Nr. 4.683.195 beschriebenen mutationsinduzierenden Variationen andere mutationsinduzierende PCR-Variationen angewendet werden. Beispielsweise kann das PCR-Reaktionsgemisch mit verschiedenen Mengen eines oder mehrerer der in das Extensionsprodukt zu inkorporierenden Nucleotide gebildet werden. Unter solchen Bedingungen schreitet die PCR-Reaktion fort, um Nucleotidsubstitutionen innerhalb des Extensionsprodukt als Ergebnis des Mangels an einer bestimmten Base zu produzieren. Auf ähnliche Weise können ungefähr äquimolare Mengen der Nucleotide dem anfänglichen PCR-Reaktionsgemisch in einer Menge beigefügt werden, um eine Anzahl von X Zyklen effizient durchzuführen und dann das Gemisch über eine Anzahl von Zyklen über X hinaus, wie z.B. 2X, im Kreis zu führen. Alternativ dazu können Mutationen während der PCR-Reaktion induziert werden, indem dem Reaktionsgemisch Nucleotid-Derivate, wie z.B. Inosin, die normalerweise in den Nucleinsäuren der zu amplifizierenden HLA-Variante nicht auftreten, beigefügt werden. Während der nachfolgenden In-vivo-Amplifikation wird das Nucleotid-Derivat durch ein Nucleotid-Substitut ersetzt und induziert dadurch eine Punktmutation.

[0089] Ein bevorzugtes Verfahren, das zur Klonierung einer für Human-Klasse-I-MHC kodierenden Nucleotidsequenz angewendet werden kann, läuft folgendermaßen ab. Zellen, die das/die Gene) der Wahl enthalten, können in einem geeigneten Medium (z.B. RPMI 1640) gezüchtet werden, das nach Bedarf ergänzt wird (z.B. mit fötalem Kälberserum und/oder Antibiotika). Zelluläre Gesamt-RNA wird aus der Kultur der Wahl aufbereitet und dann die Erststrang-DNA synthetisiert. cDNA kann synthetisiert werden, beispielsweise unter Verwendung von Oligo(dT) und reverser Transkriptase aus Vogel-Myeloblastose-Virus. Radiomarkierung kann ebenfalls angewendet werden, um die Isolierung und Gewinnung des klonierten Produkts zu unterstützen. Das Produkt wird dann vorzugsweise extrahiert, präzipitiert und als Target für die PCR-Amplifikation unter Verwendung des geeigneten PCR-Primerpaars wie hierin beschrieben verwendet. Die Amplifikation kann unter Anwendung verfügbarer Verfahren und Sets, z.B. GeneAmp-Sets und einem DNA-Thermocycler (Perkin-Elmer/Cetus) durchgeführt werden. Verschiedene Protokolle sind ebenfalls zweckdienlich; eines der Amplifikationsprotokolle läuft für 30 Zyklen, bei denen jeder Zyklus aus 60 Sekunden bei 94 °C, 60 Sekunden bei 60 °C und 90 Sekunden bei 72 °C, gefolgt von 10 Minuten bei 72 °C besteht. Ein weiteres Protokoll läuft für 20 Zyklen mit 60 Sekunden bei 94 °C, eine Sekunde bei 65 °C und eine variable Zeit bei 72 °C, die bei etwa 50 Sekunden beginnt und sich in jedem Zyklus stufenweise um eine Sekunde erhöht. Die Amplifikation endet daraufhin mit 10 Minuten bei 72°.

[0090] Typischerweise wird das PCR-Produkt dann subkloniert und nach bekannten Verfahren sequenziert. Beispielsweise kann das Produkt extrahiert und rückextrahiert (z.B. mit Phenol/Chloroform), präzipitiert und mit einem geeigneten Enzym, z.B. Hind III, für eine geeignete Zeitdauer verdaut werden. Doppelt geschnittenes Produkt wird isoliert und gereinigt (beispielsweise mit Glaskügelchen) und an ähnlich geschnittene Vektoren ligiert. Ein geeigneter Vektor wird dann auf Basis der Eigenschaften der zur Expression des MHC-Moleküls ausgewählten Zelllinie ausgewählt. Beispielsweise kann man das MHC zum Zwecke der Gewinnung des MHC für die Sequenzanalyse in E. coli exprimieren. Alternativ dazu kann man das MHC in einer transformierten Zelllinie zum Zwecke der Aktivierung von CD8-Zellen exprimieren. Die Auswahl von geeigneten Vektoren wird daher an anderer Stelle in diesem Abschnitt ausführlicher beschrieben.

2. DNA-Expressionsvektoren

[0091] Ein Vektor der vorliegenden Erfindung ist ein Nucleinsäure-(vorzugsweise DNA-)Molekül, das zur autonomen Replikation in einer Zelle fähig ist und an das ein DNA-Segment, z.B. ein Gen oder Polynucleotid, operativ dermaßen gebunden werden kann, dass die Replikation des angehefteten Segments herbeigeführt wird. In der vorliegenden Erfindung kodiert eines der operativ an Vektorsequenzen zu knüpfenden Nucleotidsegmente zumindest für einen Teil eines Säugetier-Klasse-I-MHC-Moleküls. Vorzugsweise wird die gesamte

für Peptid kodierende Sequenz des MHC-Gens in den Vektor insertiert und exprimiert; es ist jedoch ebenso möglich, einen Vektor zu konstruieren, der auch einige nicht-kodierende MHC-Sequenzen umfasst. Vorzugsweise werden nicht-kodierende Sequenzen des MHC ausgeschlossen. Ein weiterer bevorzugter Vektor umfasst eine Nucleotidsequenz, die zumindest für einen Teil eines Säugetier-β2-Microglobulinmoleküls kodiert, das operativ an den Vektor für die Expression gebunden ist. Es ist ebenso möglich, einen Vektor zu konstruieren, der Nucleotidsequenzen umfasst, die sowohl für ein Klasse-I-MHC-Molekül und ein β2-Microglobulin kodieren.

[0092] Ein bevorzugter Vektor besteht aus einer Kassette, die eine oder mehrere translatierbare DNA-Sequenzen umfasst, die zur Expression operativ über eine für gerichtete Ligation adaptierte Sequenz von Nucleotiden gebunden sind. Die Kassette umfasst vorzugsweise DNA-Expressionskontrollsequenzen zur Expression des Polypeptids oder Proteins, das produziert wird, wenn eine translatierbare DNA-Sequenz über die zur gerichteten Ligation adaptierte Sequenz von Nucleotiden gerichtet in die Kassette insertiert ist. Die Kassette umfasst ferner vorzugsweise eine Promotorsequenz stromauf der translatierbaren DNA-Sequenz und eine Polyadenylierungssequenz stromab der Säugetier-MHC-Sequenz. Die Kassette kann auch einen Selektionsmarker umfassen, wenn auch bevorzugt wird, dass ein solcher Marker in einer Nucleotidsequenz kodiert ist, die operativ an eine andere Expressionsvektorsequenz gebunden ist.

[0093] Ein Expressionsvektor ist charakterisiert durch seine Fähigkeit, in einem kompatiblen Wirt ein strukturelles Genprodukt wie z.B. ein Human-Klasse-I-MHC-Polypeptid, ein β2-Microglobulin oder beide zu exprimieren.

[0094] Wie hierin verwendet, bezieht sich der Begriff „Vektor" auf ein Nucleinsäuremolekül, das zum Transport einer anderen Nucleinsäure, an die es operativ gebunden ist, zwischen verschiedenen genetischen Umgebungen fähig ist. Bevorzugte Vektoren sind jene, die dazu fähig sind, strukturelle Genprodukte, die in den Nucleotid-(DNA-)Segmenten, an die sie operativ gebunden sind, autonom zu replizieren und zu exprimieren.

[0095] Wie hierin in Bezug auf DNA-Sequenzen oder Segmenten verwendet, bedeutet der Ausdruck „operativ verbunden", dass die Sequenzen oder Segmente kovalent in einem DNA-Stück verbunden worden sind, ob in einzel- oder doppelsträngiger Form.

[0096] Die Wahl des Vektors, an die eine Kassette operativ gebunden ist, hängt direkt, wie im Fach gut bekannt ist, von den gewünschten funktionellen Eigenschaften, z.B. Vektor-Replikation und Proteinexpression, und der zu transformierenden Wirtszelle ab, wobei dies Einschränkungen sind, die der Wissenschaft der Konstruktion rekombinanter DNA-Moleküle innewohnen.

[0097] In verschiedenen Ausführungsformen wird ein Vektor zur Produktion von Polypeptiden angewendet, die in den Verfahren der vorliegenden Erfindung von Nutzen sind, umfassend MHC-Varianten und antigene Peptide. Solche Vektoren werden vorzugsweise in Verbindung mit bakteriellen „Wirts"-Zellen angewendet, die für die Produktion brauchbarer Mengen von Proteinen oder Polypeptiden adaptiert sind. Solche Vektoren können ein prokaryotisches Replikon umfassen, d.h. eine Nucleotidsequenz mit der Fähigkeit, die autonome Replikation und extrachromosomale Erhaltung des rekombinanten DNA-Moleküls in einer damit transformierten prokaryotischen Wirtszelle, wie z.B. einer bakteriellen Wirtszelle, zu steuern. Solche Replikons sind im Fach bekannt. Zusätzlich können jene Ausführungsformen, die ein prokaryotisches Replikon umfassen, auch ein Gen umfassen, dessen Expression einem damit transformierten Wirten einen selektiven Vorteil, wie z.B. Medikamentenresistenz, verleiht. Typische bakterielle Medikamentenresistenz-Gene sind jene, die Resistenz gegen Ampicillin oder Tetracyclin verleihen. Vektoren enthalten typischerweise ferner dienliche Restriktionsstellen für die Insertion von translatierbaren Nucleotidsequenzen. Beispielhafte Vektoren umfassen die Plasmide pUC8, pUC9, pUC18, pBR322 und pBR329, die von BioRad Laboratories (Richmond, CA) erhältlich sind, pPL und pKK223, die von Pharmacia (Piscataway, NJ) erhältlich sind, und pBS und M13mp19 (Stratagene, La Jolla, CA). Andere beispielhafte Vektoren umfassen pCMU (Nilsson et al. Cell 58, 707 (1989)). Andere geeignete Vektoren können ferner gemäß bekannten Verfahren synthetisiert werden; beispielsweise sind die Vektoren pCMU/K^b und pCMUII, die in verschiedenen Anwendungen hierin verwendet werden, Modifizierungen von pCMUIV (Nilsson et al., s.o.).

[0098] Eine zur gerichteten Ligation adaptierte Sequenz von Nucleotiden, d.h. ein Polylinker, ist eine Region des Expressionsvektors, die (1) für Replikation und Transport die Stromauf- und Stromab-Nucleotidsequenzen operativ verbunden und (2) eine Stelle oder Mittel für die gerichtete Ligation einer Nucleotidsequenz in den Vektor bereitstellt. Typischerweise ist ein Polylinker eine Sequenz von Nucleotiden, die zwei oder mehrere Erkennungssequenzen oder Restriktionsstellen für Restriktionsendonucleasen definiert. Bei Restriktionsspal-

tung liefern die beiden Stellen kohäsive Termini, an die eine translatierbare Nucleotidsequenz an den Expressionsvektor ligiert werden kann. Vorzugsweise stellen die beiden Restriktionsstellen bei Restriktionsspaltung kohäsive Termini bereit, die nicht komplementär sind und dadurch die gerichtete Insertion einer translatierbaren Nucleotidsequenz in die Kassette erlauben. In einer der Ausführungsformen wird das Mittel der gerichteten Ligation durch Nucleotide bereitgestellt, die in der Stromauf-Nucleotidsequenz, Stromab-Nucleotidsequenz oder in beiden vorhanden ist. In einer weiteren Ausführungsform umfasst die für gerichtete Ligation adaptierte Sequenz von Nucleotiden eine Sequenz von Nucleotiden, die ein mehrfaches, gerichtetes Klonierungsmittel definiert. Wo die für gerichtete Ligation adaptierte Sequenz von Nucleotiden zahlreiche Restriktionsstellen definiert, wird sie als eine multiple Klonierungsstelle bezeichnet.

[0099] Eine translatierbare Nucleotidsequenz ist eine lineare Reihe von Nucleotiden, die eine ununterbrochene Reihe von zumindest 8 Codons bereitstellt, die für ein Polypeptid in einem Leseraster kodiert. Vorzugsweise ist die Nucleotidsequenz eine DNA-Sequenz. Zusätzlich befindet sich vorzugsweise eine Sequenz stromauf der translatierbaren Nucleotidsequenz, die für eine Promotorsequenz kodiert. Vorzugsweise ist der Promotor bedingt (z.B. induzierbar). Ein bevorzugter, hierin verwendeter bedingter Promotor ist ein Metallothionein-Promotor oder ein Hitzeschock-Promotor.

[0100] Vektoren können unter Anwendung irgendeines der gut bekannten Vektor-Konstruktionstechniken konstruiert werden. Diese Techniken werden jedoch in einem Ausmaß modifiziert, dass die in das Genom der Wirtszelle zu insertierende Nucleotidsequenz „stramauf" der Sequenz von einem geeigneten Promotor flankiert ist und in einigen Variationen der vorliegenden Erfindung die translatierbare Nucleotidsequenz „stromab" von einer Polyadenylierungsstelle flankiert ist. Die ist insbesondere bevorzugt, wenn die „Wirts"-Zelle eine Insektenzelle ist und die Nucleotidsequenz durch Transfektion übertragen wird. Die Transfektion kann über zahlreiche Verfahren erzielt werden, einschließlich Calciumphosphat-Verfahren, DEAE-Dextran-Verfahren, stabiler-Transfer-Verfahren, Elektroporation oder über das Liposom-Vermittlungsverfahren. Zahlreiche Lehrbücher sind verfügbar, die bekannte Transfektionsverfahren und andere Prozeduren zur Einführung von Nucleotiden in Zellen darlegen; siehe z.B. Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1991).

[0101] Der Vektor selbst kann von jeglicher geeigneten Art sein, wie z.B. ein viraler Vektor (RNA oder DNA), nackte geradkettige oder zirkuläre DNA oder ein Vesikel oder eine Hülle, welche das Nucleinsäurematerial und jegliche Polypeptide enthalten, die in die Zelle zu insertieren sind. Bezüglich Vesikeln sind Techniken zur Konstruktion von Lipidvesikeln, wie z.B. Liposomen, bekannt. Solche Liposomen können gegen bestimmte Zellen gerichtet sein, und zwar unter Verwendung herkömmlicher Techniken, wie z.B. die Bereitstellung eines Antikörpers oder eines anderen spezifischen Moleküls an Außenseite des Liposoms. Siehe z.B. A. Huang et al., J. Biol. Chem. 255, 8015–8018 (1980).

[0102] Zweckdienlichste Vektoren enthalten mehrfache Elemente, einschließlich eines oder mehrere der folgenden in Abhängigkeit von der Natur der „Wirts"-Zelle, d.h. der transformierten Zelle: (1) einen SV40-Replikationsstartpunkt zur Amplifikation auf hohe Kopienzahl; (2) ein effizientes Promotorelement zur Transkriptionsinitiation auf hohem Level; (3) mRNA-Prozessierungssignale, wie z.B. mRNA-Spaltungs- und Polyadenylierungssequenzen (und häufig auch Intervening-Sequenzen); (4) Polylinker, die multiple Restriktionsendonucleasestellen zur Insertion „fremder" DNA enthalten; (5) selektierbare Marken, die für die Selektion derjenigen Zellen verwendet werden können, welche die Plasmid-DNA stabil integriert haben; und (6) Plasmid-Replikationskontrollsequenzen, um die Vermehrung in bakteriellen Zellen zu erlauben. Zusätzlich zum obigen enthalten viele Vektoren auch ein induzierbares Expressionssystem, das durch einen äußeren Stimulus gesteuert wird. Sequenzen aus einer Reihe von Promotoren, die für induzierte Transkription erforderlich sind, sind identifiziert und gentechnisch in Expressionsvektoren insertiert worden, um induzierte Expression zu erhalten. Mehrere zweckdienliche Vektoren basierten auf der Induktion durch β-Interferon, Hitzeschock, Schwermetallionen und Steroide (z.B. Glucocorticoide). (Siehe z.B. Kaufman, Meth. Enzymol. 185, 487–511 (1990)).

[0103] In einer bevorzugten Ausführungsform enthält der Vektor auch einen selektierbaren Marken. Nach der Expression kann dann das Produkt der translatierbaren Nucleotidsequenz unter Verwendung von Antikörpern gegen diese Sequenz gereinigt werden. Eines der Beispiele für einen selektierbaren Marken ist die Neomycin-Resistenz. Ein für Neomycin-Resistenz kodierendes Plasmid, wie z.B. phshsneo, phsneo oder pcopneo, kann in jede Transfektion aufgenommen werden, so dass eine Population, die das/die Gene) der Wahl exprimiert, durch Kultivieren der Transfektanten in Selektionsmedium geprüft werden kann.

[0104] In einer bevorzugten Ausführungsform kann die translatierbare Nucleotidsequenz mit einem/einer geeigneten kontrollierbaren Transkriptionspromotor, Translationskontrollsequenz und einem Polylinker in ein Plasmid inkorporiert werden, um die Insertion der translatierbaren Nucleotidsequenz in der richtigen Orientie-

rung zu vereinfachen, und kann in einer Insektenzelle, wie z.B. Drosophila, oder in einer prokaryotischen Zelle, wie z.B. E. coli, unter Anwendung herkömmlicher Techniken exprimiert werden. Vorzugsweise sind 5'-Kontrollsequenzen vorhanden, die einen Promotor für die Initiation der Transkription und eine Ribosom-Bindungsstelle definieren, die operativ an den 5'-Terminus der stromauf translatierbaren DNA-Sequenz gebunden sind. Um hohe Genexpressionslevel in transformierten oder transfizierten Zellen, z.B. in E. coli, zu erzielen, ist es notwendig, nicht nur starke Promotoren zu verwenden, um große Mengen von mRNA zu erzeugen, sondern auch Ribosom-Bindungsstellen, um die effiziente Translation der mRNA sicherzustellen. In E. coli beispielsweise umfasst die Ribosom-Bindungsstelle ein Initiationscodon (AUG) und eine 3–9 Nucleotide lange Sequenz, die 3–11 Nucleotide stromauf des Initiationscodons lokalisiert ist (Shine et al. Nature 254, 34 (1975)). Die Sequenz, AGGAGGU, welche die Shine-Dalgarno-(SD-)Sequenz genannt wird, ist komplementär zum 3'-Ende der 16S-mRNA in E. coli. Die Bindung des Ribosoms an mRNA und die Sequenz am 3'-Ende der mRNA kann durch mehrere Faktoren beeinflusst sein, einschließlich (1) des Grads der Komplementarität zwischen der SD-Sequenz und dem 3'-Ende der 16S-tRNA; und (2) des Zwischenraums und möglicherweise der zwischen SD-Sequenz und AUG liegenden DNA-Sequenz. (Siehe z.B. Roberts et al., PNAS USA 76, 760 (1979a); Roberts et al., PNAS USA 76, 5596 (1979b); Guarente et al., Science 209, 1428 (1980); und Guarente et al., Cell 20, 543 (1980).) Die Optimierung wird im Allgemeinen durch Messen des Expressionslevels von Genen in Plasmiden erzielt, in denen dieser Zwischenraum systematisch verändert wird. Der Vergleich verschiedener mRNAs zeigt, dass statistisch bevorzugte Sequenzen von Positionen –20 bis +13 vorliegen (wobei das A des AUG die Position 0 ist; siehe z.B. Gold et al., Ann. Rev. Microbiol. 35, 356 (1981)). Von Leadersequenzen ist ebenfalls gezeigt worden, dass sie die Translation drastisch beeinflussen (Roberts et al., 1979a, s.o.). Die Bindung des Ribosoms kann ferner durch die dem AUG folgende Nucleotidsequenz beeinflusst sein, welche die Ribosom-Bindung beeinflusst. (Siehe z.B. Taniguchi et al., J. Mol. Biol. 118, 533 (1978).)

[0105] Einer der Vektoren, der gemäß der vorliegenden Erfindung verwendet werden kann, umfasst einen Hitzeschock-Promotor. Solche Promotoren sind im Fach bekannt; siehe beispielsweise Stellar et al., EMBO J. 4, 167–171 (1985). Wenn dieser Promotor verwendet wird, wird auch die Addition einer Polyadenylierungsstelle bevorzugt.

[0106] Ein bevorzugter Vektor zur Verwendung in den Verfahren der vorliegenden Erfindung ist ein Plasmid; bevorzugter ist er ein Plasmid mit hoher Kopienzahl. Es ist ferner wünschenswert, dass der Vektor eine induzierbare Promotorsequenz enthält, da induzierbare Promotoren dazu neigen, den Selektionsdruck gegen Zellen einzuschränken, in die solche Vektoren (die häufig so konstruiert werden, dass sie nicht-native oder chimäre Nucleotidsequenzen tragen) eingeführt worden sind. Es wird ferner bevorzugt, dass der Vektor der Wahl für die Expression im gewählten Wirten bestens geeignet ist. Wenn die Wirtszellenpopulation eine Drosophila-Zellkultur ist, dann umfasst ein kompatibler Vektor Vektor-Funktionalitäten, die jenen wie p25-lacZ (siehe Bello und Couble, Nature 346, 480 (1990)) oder pRmHa-1, -2 oder -3 (siehe Bunch et al., Nucl. Acids Res. 16, 1043–1061 (1988)) gleichwertig sind. In der bevorzugten Ausführungsform ist der Vektor pRmHa-3, der in **Fig.** 1 gezeigt ist. Dieser Vektor umfasst einen Metallothionein-Promotor, der sich vorzugsweise stromauf derjenigen Stelle befindet, an der die MHC-Sequenz insertiert ist, und die Polyadenylierungsstelle befindet sich vorzugsweise stromab der besagten MHC-Sequenz. Drosophila-Zellen sind bevorzugte Wirte gemäß der vorliegenden Erfindung; in Speziellen besitzen die Drosophila-Zellen wie z.B. Schneider-2-Zellen die zur Aktivierung des Promotors erforderlichen trans-agierenden Faktoren und sind daher noch bevorzugter.

[0107] Der Expressionsvektor pRmHa-3 basiert auf dem bakteriellen Plasmid pRmHa-1, wobei letzterer auf Plasmid pUC18 basiert. Das Plasmid pUC18 ist bei der American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD) hinterlegt und besitzt die Zugangsnummer 37253. Der pRmHa-3-Vektor enthält den Promotor, die 5'-untranslatierte Leadersequenz des Metallothionein-Gens (Sequenzen 1-421, Seq.-ID Nr. 13) mit entfernten R1- und Stu-Stellen (siehe **Fig. 1C**). Er enthält ferner den 3'-Teil des Drosophila-ADH-Gens (Sequenz Nr. 6435-7270, Seq.-ID Nr. 14), einschließlich der Polyadenylierungsstelle. Daher wird die klonierte DNA durch den Metallothionein-Promotor transkriptionell reguliert und polyadenyliert sein. Die Konstruktion des pRmHa-1-Plasmids wird in Bunch et al., Nucl. Acids Res. 16, 1043–1061 (1988) beschrieben. Die Konstruktion der pRmHa-3- und pRmHa-2-Plasmide (der letztere besitzt eine Metallothionein-Promotorsequenz, die als ein Eco RI-Fragment entfernt werden kann) ist in **Fig. 1A**, B und C dargestellt. Bezüglich pRmHa-3, einem bevorzugten Plasmid zur Verwendung gemäß der vorliegenden Erfindung, befinden sich Pst I, Sph I und Hind III im Porotorfragment und sind daher nicht einzigartig. Xba befindet sich im ADH-Fragment (3 Basen von dessen 3'-Ende) und ist daher ebenfalls nicht einzigartig. Die folgenden Restriktionsstellen sind jedoch in pRmHa-3 einzigartig: Eco RI, Sac I, Kpn I, Sma I, Bam HI, Sal I, Hinc 2 und Acc I.

[0108] Eine Kassette in einem DNA-Expressionsvektor ist diejenige Region des Vektors, die bei Insertion einer translatierbaren NA-Sequenz eine Sequenz von Nucleotiden bildet, die in einem geeigneten Wirt zur Ex-

pression eines Fusionsproteins dieser Erfindung fähig ist. Die expressionskompetente Sequenz von Nucleotiden wird als Cistron bezeichnet. Folglich enthält die Kassette vorzugsweise DNA-Expressionskontrollelemente, die operativ an eine oder mehrere translatierbare DNA-Sequenzen gebunden ist. Ein Cistron wird gebildet, wenn eine translatierbare DNA-Sequenz über die für diesen Zweck adaptierte Sequenz von Nucleotiden zwischen die Kontrollelemente gerichtet insertiert (gerichtet ligiert) wird. Die erhaltene, translatierbare DNA-Sequenz, nämlich die insertierte Sequenz, ist vorzugsweise operativ im geeigneten Leseraster gebunden.

[0109] DNA-Expressionskontrollsequenzen umfassen einen Satz von DNA-Expressionssignalen zur Expression eines strukturellen Genprodukts um umfassen 5' sowie 3'-Elemente, wie bekannt ist, die operativ dermaßen mit dem Cistron verbunden sind, dass das Cistron zur Expression eines strukturellen Genprodukts fähig ist. Die 5'-Kontrollsequenz definiert einen Promotor für die Transkriptionsinitiation und eine Ribosom-Bindungsstelle, die operativ mit dem 5'-Terminus der stromauf translatierbaren DNA-Sequenz verbunden ist.

[0110] Folglich stellt ein DNA-Expressionsvektor ein System zur Klonierung von translatierbaren DNA-Sequenzen in den Kassettenteil des Vektors bereit, um ein Cistron herzustellen, dass zur Expression eines Fusionsproteins dieser Erfindung fähig ist.

3. Zelllinien

[0111] Eine bevorzugte Zelllinie zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung ist zum kontinuierlichen Wachstum in Kultur fähig und zur Expression von Human-Klasse-I-MHC-Molekülen an der Oberfläche ihrer Zellen fähig.

[0112] Die Zelllinie ist eine Insektenzelllinie. Verschiedene Insektenzelllinien sind zur Verwendung gemäß der vorliegenden Erfindung verfügbar, einschließlich Motte (ATCC CCL 80), Armyworm (ATCC CRL 1711), Moskitolarven (ATCC-Linien CCL 125, CCL 126, CRL 1660, CRL 1591, CRL 6585, CRL 6586) und Seidenraupe (ATCC CRL 8851). In einer bevorzugten Ausführungsform ist die Zelllinie eine Drosophila-Zelllinie, wie z.B. die Schneider-Zelllinie (siehe Schneider, J. Embryol. Exp. Morph. 27, 353–356 (1972)); vorzugsweise ist die Zelllinie eine Schneider-2-Zelllinie (S2/M3), die für das Wachstum in M3-Medium adaptiert ist (siehe Lindquist et al., Drosophila Information Service 58, 163 (1982)).

[0113] Schneider-Zellen können im Wesentlichen wie folgt hergestellt werden. Eier von Drosophila melanogaster (Oregon-R) werden über ein ungefähr 4-Sunden-Intervall gesammelt und werden in einer 2,5%igen, wässrigen Hypochloritlösung entchorioniert und durch Eintauchen in 70 % Ethanol für 20 Minuten, gefolgt von weiteren 20 Minuten in 0,05 % $HgCl_2$ in 70 % Ethanol oberflächlich sterilisiert. Nach gründlichem Abspülen in destilliertem Wasser werden die Eier auf Petrischalen übertragen, die sterile, schwarze, mit Millipore-Vorfiltern gestützte Metricel-Filter enthalten, die beide vorher mit Kulturmedium befeuchtet wurden. Die Eier werden über Nacht in einen Inkubator mit 22 °C gegeben und nach 20–24 Stunden zur Kultivierung entfernt. Jedes der Embryos wird in Hälften oder Drittel geschnitten und dann für 20–45 Minuten bei Raumtemperatur in 0,2 % Trypsin (1:250, Difco), in Rinaldini's Salzlösung (Rinaldini, Nature (London) 173, 1134–1135 (1954)) gegeben. 200–300 Embryos werden zum Starten jeder Kultur verwendet.

[0114] Nach dem Zusatz von fötalem Kälberserum (FBS) werden die Fragmente bei 100 × g für 2–3 Minuten zentrifugiert, in 1,25 ml Kulturmedium resuspendiert und in T-9-Glasflaschen ausgesät. Die Kulturen werden bei ungefähr 22–27 °C +/– 0,5 °C mit einer Raumluft-Gasphase gehalten. Schneiders Kulturmedium (Schneider, J. Exp. Zool. 156, 91–104 (964); Schneider, J. Embryol. Exp. Morph. 15, 271–279 (1966)), das zusätzliche 500 mg bakteriologisches Pepton je 100 ml Medium enthält und mit 15 % inaktiviertem FBS ergänzt ist, wird bevorzugt verwendet. Der pH (vorzugsweise 6,7–6,8) wird mit 0,01 % Phenolrot beobachtet. Die Zelllinien werden vorzugsweise durch Subkultivierung alle 3–7 Tage erhalten. Die Zellen heften sich leicht an das Glas, jedoch nicht so fest, dass sie Trypsinbehandlung benötigten; typischerweise ist einfaches Pipettieren hinreichend, um die meisten der Zellen aus dem Flaschenboden heraus zu spülen. Die morphologische Erscheinungsform der Zellen wird in Schneider, J. Embryol. Exp. Morph. 27, 353–365 (1972) beschrieben. Sie sind im Wesentlichen in ihrer Erscheinungsform Epithel-ähnlich und liegen im Bereich von ungefähr 5–11 µm Durchmesser und 11–35 µm Länge. Abgerundete Zellen enthaltende kleine Taschen können zufällig über die gesamten anderen Zellen verstreut sein.

[0115] Vorzugsweise werden die Schneider-2-Zellen in Schneiders Drosophila-Medium plus 10 % FBS einschließlich Penicillin (100 Units/ml) und Streptomycin (100 mg/ml) gehalten. Es ist zu bevorzugen, die Zellen bei einer Dichte von mehr als ungefähr $0,5 \times 10^5$/ml zu halten und sie in einem Temperaturbereich von 24–30 °C zu züchten. Die Zellen neigen zur Verdoppelung in weniger als 24 Stunden und wachsen bis zu hoher Zell-

dichte, d.h. ungefähr 2 × 10^7/ml oder höher. Die Zellen können auch in 90 % FBS und 10 % DMSO zur späteren Verwendung oder Analyse eingefroren werden. Man kann die Zellen auf –70 °C legen und dann in flüssigem Stickstoff einfrieren.

[0116] Eine bevorzugte, als Schneider-2-Zellen identifizierte Zelllinie gemäß der vorliegenden Erfindung ist entsprechend den Budapest-Treaty-Erfordernissen bei der American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, MD, am 18. Februar 1992 hinterlegt worden und hat die Zugangsnummer CRL-10874 erhalten.

[0117] Die Zelllinie ist eine transformierte Zelllinie, die zur Expression von Human-Klasse-I-MHC-Genen fähig ist. Es wird ferner bevorzugt, dass die Zelllinie zur Expression von Human-β2-Microglobulin fähig ist. Eine noch bevorzugtere Zelllinie ist zur stabilen oder vorübergehenden Expression fähig.

[0118] Ein Vektor kann zur Transformation/Transfektion einer derartigen Zelllinie angewendet werden. Es sind viele Vektoren verfügbar, die für die Transformation/Transfektion von Zelllinien zweckdienlich sind; diese Vektoren sind oben ausführlicher diskutiert. Kurz gesagt jedoch werden in bevorzugten Ausführungsformen Zellen der vorliegenden Erfindung mit cDNAs transformiert, die für (humane) MHC-Schwerketten und β2-Microglobulin kodieren, die beide in einen Expressionsvektor insertiert (d.h. operativ daran gebunden) worden sind. In einer bevorzugteren Ausführungsform umfasst der Vektor das Drosophila-Expressionsplasmid pRmHa-3, in das exprimierbare Nucleotidsequenzen, die für Human-Klasse-I-MHC-Moleküle oder Human-β2-Microglobulin kodieren, unter Anwendung hierin offenbarter Techniken insertiert worden sind. Vorzugsweise sind die für MHC kodierende cDNAs und jene, die für β2-Microglobulin kodieren, operativ an gesonderte Expressionsplasmide gebunden und werden in die kultivierten Zellen co-transfiziert. Alternativ dazu können die für MHC und β2-Microglobulin kodierenden cDNAs operativ an dasselbe Plasmid gebunden und über dieses eine Plasmid co-transfiziert werden. In einer weiteren Variante werden für MHC, β2-Microglobulin und ein Cytokin wie z.B. IL2 kodierende cDNAs operativ an Expressionsplasmide gebunden und werden in eine Zelllinie der vorliegenden Erfindung co-transfiziert. Die Selektion von HLA-Genen, Konstruktion von geeigneten Vektoren und Primerselektion sind oben in den Abschnitten B.1. und B.2. ausführlicher beschrieben.

[0119] Erfolgreich transformierte Zellen, d.h. Zellen, die eine exprimierbare Human-Nucleotidsequenz gemäß der vorliegenden Erfindung enthalten, können über bekannte Techniken identifiziert werden. Beispielsweise können Zellen, die aus der Einführung einer cDNA oder rDNA der vorliegenden Erfindung erhalten wurden, kloniert werden, um monoklonale Kolonien herzustellen. Zellen von diesen Kolonien können geerntet, lysiert und ihr DNA-Gehalt auf die Anwesenheit der rDNA hin untersucht werden, und zwar unter Anwendung eines Verfahrens wie jenes, das von Southern, J. Mol. Biol. 98, 503 (1975), beschrieben wurde. Zusätzlich zum direkten Testen auf Anwesenheit von rDNA kann erfolgreiche Transfektion durch wohlbekannte immunologische Verfahren bestätigt werden, wenn die rDNA dazu fähig ist, die Expression eines gegenständlichen chimären Polypeptids zu steuern. Beispielsweise könnten mit einem Expressionsvektor erfolgreich transformierte Zellen Proteine produzieren, die bestimmte antigene Eigenschaften zeigen, die unter Verwendung geeigneter Antikörper leicht bestimmt werden können. Zusätzlich kann eine erfolgreiche Transformation/Transfektion über die Verwendung eines zusätzlichen Vektors ermittelt werden, der eine Markersequenz, wie z.B. eine Neomycin-Resistenz wie hierin oben beschrieben enthält.

[0120] Es wird ferner bevorzugt, dass die Kultur zu anhaltendem Wachstum bei herabgesetzten Temperaturen fähig ist. Beispielsweise wird bevorzugt, dass die Kultur bei etwa. Raumtemperatur, z.B. ungefähr 24–27 °C gehalten werden kann. In anderen Ausführungsformen wird die Kultur bei höheren Temperaturen gehalten, insbesondere während des Prozesses der Aktivierung von CD8-Zellen. Es ist folglich bevorzugt, dass eine Kultur gemäß der vorliegenden Erfindung in der Lage ist, einer Temperatur-Exposition von ungefähr 30 °C bis ungefähr 37 °C zu widerstehen. Zugabe von β2-Microglobulin zu einer Kultur stabilisiert sie auf eine Exposition von zumindest 30 °C; der Zusatz von β2-Microglobulin und Peptiden liefert eine höhere Thermostabilität bei höheren Temperaturen, d.h. bei 37 °C.

[0121] Daher wird noch stärker bevorzugt, dass eine Zelllinie zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung zu Folgendem fähig ist: (1) anhaltendes Wachstum bei herabgesetzten Temperaturen für eine vorbestimmte Zeitspanne; (2) Transformation durch einen Expressionsvektor; (3) Expression von β2-Microglobulin; (4) Expression eines oder mehrerer Typen von Klasse-I-MHC-Molekülen; (5) Aufladen von Peptiden auf Klasse-I-MHC-Moleküle; und (6) Exprimieren leerer oder Peptid-beladener Klasse-I-MHC-Moleküle an der Zelloberfläche.

[0122] In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird eine Kultur von Drosophila-Zellen etabliert und mit Vektoren transfiziert, die operativ mit (1) einem oder mehreren, für Human-Klas-

se-I-MHC-Moleküle kodierenden Nucleotidsequenzen (2) zumindest einer für Human-β2-Microglobulin kodierenden Nucleotidsequenz verbunden sind. Diese Sequenzen können operativ mit demselben Vektor verbunden sein, jedoch befinden sich die Sequenzen für β2-Microglobulin und für Human-MHC vorzugsweise in getrennten Vektoren. Für Selektionszwecke ist es ferner vorteilhaft, die Zelllinie mit einem Vektor zu transfizieren, der operativ mit einem Selektionsmarker, z.B. Neomycin-Resistenz verbunden ist. Danach wird eine Human-Klasse-I-MHC-Moleküle exprimierende Zellpopulation herausselektiert und in Kultur gehalten.

[0123] Um die Kultur zur Expression von leeren oder, bevorzugter, peptidbeladenen MHC-Molekülen herzustellen, kann die Kultur zunächst eine Stimulation erfordern, z.B. über $CuSO_4$-Induktion, und zwar für eine vorbestimmte Zeitdauer. Nach einer geeigneten Induktionsdauer, z.B. ungefähr 12–24 Stunden, können Peptide in einer vorbestimmten Konzentration (z.B. ungefähr 100 µg/ml) zugesetzt werden. Peptide können wie nachstehend in Abschnitt B.5. besprochen hergestellt werden. Nach einer weiteren Inkubationszeit, z.B. für ungefähr 12 Stunden bei 37 °C, ist die Kultur zur Verwendung in der Aktivierung von CD8-Zellen bereit. Obgleich diese zusätzliche Inkubationsdauer verkürzt und vielleicht weggelassen werden kann, entspricht es der Beobachtung der Erfinder, dass die Kultur dazu neigt, zunehmend stabiler gegen Temperatur-Expositionen zu werden, wenn sie vor der Zugabe von Ruhe- oder Vorläufer-CD8-Zellen für eine Zeit inkubiert wird. Beispielsweise sind Kulturen gemäß der vorliegenden Erfindung, denen Peptid zugesetzt wurde, zur Expression signifikanter Mengen von peptidbeladenen Klasse-I-MHC-Molekülen fähig, auch wenn sie für erweiterte Zeitspannen bei 37 °C inkubiert wurden.

[0124] Zur Kultivierung von transformierten Wirtszellen zweckdienliche Nährmedien sind im Fach bekannt und können von zahlreichen kommerziellen Quellen erhalten werden. In Ausführungsformen, worin die Wirtszelle eine Säugetierzelle ist, wird bevorzugt ein „serumfreies" Medium verwendet.

4. Human-β2-Microglobulin

[0125] Um eine Zelllinie zu etablieren, die in der Lage ist, therapeutisch brauchbare Mengen Oberflächen-exprimierter Human-Klasse-I-MHC-Moleküle zu produzieren, wird bevorzugt, eine Zelllinie mit einem Vektor zu co-transfizieren, der operativ an eine für β2-Microglobulin kodierende Nucleotidsequenz gebunden ist, um geeignete Expressionslevel von Human-MHC-Molekülen in der Zelllinie zu bewirken. Obgleich die für Säugetier-β2-Microglobulin, wie z.B. Maus-β2-Microglobulin, kodierende Nucleotidsequenz die Stabilität der in den Zelllinien exprimierten Human-Klasse-I-MHC-Moleküle erhöht, wird bevorzugt, die Zelllinie mit einem Vektor zu co-transformieren, der operativ an eine für Human-β2-Microglobulin kodierende, exprimierbare Nucleotidsequenz gebunden ist. Wie oben in Abschnitt B.2. diskutiert, umfasst ein bevorzugter Vektor eine Nucleotidsequenz, die zumindest für einen Teil eines Säugetier-β2-Microglobulinmoleküls kodiert und die operativ an den Expressionsvektor gebunden ist. Es ist ferner möglich, einen Vektor zu konstruieren, der Nucleotidsequenzen umfasst, die sowohl für ein Klasse-I-MHC-Molekül als auch für ein β2-Microglobulin kodiert.

[0126] Eine Human-β2-Microglobulin-cDNA-Sequenz ist publiziert worden (siehe Suggs et al., PNAS 78, 6613-17 (1981)), und die Sequenz wurde als Templat für eine Polymerasekettenreaktion (PCR) unter Verwendung der folgenden Primer verwendet:

5'-Primer:

5' GCTTGGATCCAGATCTACCATGTCTCGCTCCGTGGCCTTAGCTGTGCT

CGCGCTACTCTC 3'

(Seq.-ID Nr. 15)

3'-Primer:

5' GGATCCGGATGGTTACATGTCGCGATCCCACTTAAC 3'

(Seq.-ID Nr. 16)

[0127] Die Primer werden in einer standardmäßigen PCR-Reaktion verwendet (siehe Abschnitt B.1. oben und darin zitierte Literatur). Die Reaktionsprodukte werden mit Phenol extrahiert, unter Verwendung eines Geneclean-Sets (Bio 101, San Diego, CA) gereinigt, mit Bam HI verdaut und in die Bam-HI-Stelle von pBS (Stratagene, La Jolla, CA) kloniert. Nach Verifizierung der Sequenz wird dieses Bam-HI-Fragment in die Bam-HI-Stelle eines geeigneten Expressionsvektors kloniert. In der bevorzugten Ausführungsform wird Human-β2-Microglobulin-cDNA synthetisiert und operativ mit dem Expressionsvektor pRmHa-3 verbunden.

5. Peptide

[0128] Praktisch alle Zellproteine zusätzlich zu Virus-Antigenen können dazu verwendet werden, relevante Peptidfragmente zu erzeugen, die als potentieller Klasse-I-MHC-Ligand dienen. In den meisten Säugetierzellen würde also jeder bestimmte MHC-Peptidkomplex nur einen kleinen Teil der insgesamt MHC-kodierten Moleküle darstellen, die an der Zelloberfläche vorhanden sind. Um Oberflächen-exprimierte Human-Klasse-I-MHC-Moleküle herzustellen, die eine erhöhte Kapazität zur spezifischen Aktivierung von CD8-Zellen aufweisen, wird daher bevorzugt, Peptidfragmente geeigneter Größe und antigener Eigenschaften zu isolieren und auf Klasse-I-Moleküle aufzuladen.

[0129] Die Peptide der vorliegenden Erfindung binden an Klasse-I-MHC-Moleküle. Die Bindung tritt unter biologischen Bedingungen auf, die sowohl in vivo, als auch in vitro hervorgebracht werden können. Die exakte Charakter der Bindung der Peptide muss zur Ausführung der Erfindung nicht bekannt sein.

[0130] In einer bevorzugten Ausführungsform sind die auf die Klasse-I-MHC-Maleküle aufzuladenden Peptide antigen. Es wird ferner bevorzugt, dass die Peptide eine gleichförmige Größe aufweisen, vorzugsweise 8-mere oder 9-mere und insbesondere 8-mere sind. Es wird ebenso bevorzugt, dass die zur Aufladung auf MHC-Moleküle hergestellten Peptide von einer einzigen Spezies sind, d.h., dass alle auf MHC aufgeladenen Peptide bezüglich Größe und Sequenz identisch sind. Auf diese Weise ist es möglich, monoantigene peptidbeladene MHC-Moleküle herzustellen.

[0131] Peptide können den Zellen auf verschiedene Weisen präsentiert werden. Vorzugsweise werden Peptide auf eine Weise präsentiert, die es ihnen erlaubt, in einen intrazellulären Pool von Peptiden einzutreten. Beispielsweise können Peptide über osmotische Beladung präsentiert werden. Typischerweise werden Peptide dem Kulturmedium zugesetzt. Die Peptide können der Kultur in Form eines intakten Polypeptids oder Proteins zugesetzt werden, das anschließend über zelluläre Prozesse abgebaut wird, z.B. über enzymatischen Abbau. Alternativ dazu kann das intakte Polypeptid oder Protein vor dessen Zugabe zur Zellkultur über einige andere Wege abgebaut werden, wir z.B. chemischen Verdau (z.B. Bromcyan) oder Proteasen (z.B. Chymotrypsin). In anderen Ausführungsformen werden die Peptide in kleineren Segmenten präsentiert, die epitopische Aminosäuresequenzen umfassen können oder auch nicht.

[0132] In einer bevorzugten Ausführungsform wird eine ausreichende Menge von Protein(en) oder Peptid(en) der Zellkultur zugegeben, damit die Klasse-I-MHC-Moleküle binden können und anschließend eine hohe Dichte des Peptids an der Oberfläche von Human-Klasse-I-MHC-exprimierenden Zellen präsentiert wird, wobei vorzugsweise dieselbe Art Peptid an jedes MHC gebunden ist. Es wird ferner bevorzugt, die Bindung von Human-Klasse-I-MHC und Human-β2-Microglobulin zu erlauben, d.h. Heterodimere zu bilden, bevor Peptid den MHC-Molekülen intrazellulär präsentiert wird.

[0133] In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung werden Peptide transfizierten Zellen der vorliegenden Erfindung zugesetzt, um die Thermostabilität der durch die Zellen exprimierten MHC-Moleküle zu steigern. Wie oben angemerkt, werden Peptide vorzugsweise dem Kulturmedium zugesetzt. Antigene Peptide, die an die Klasse-I-Moleküle binden, dienen der Thermostabilisierung der MHC-Moleküle und erhöhen auch die Zelloberflächenexpression. Kulturen mit zugesetzten Peptiden, die an die MHC-Moleküle binden, sind folglich signifikant weniger empfindlich gegen Temperatur-Expositionen als Kulturen ohne zugesetztes Peptid.

[0134] In einer der Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung werden antigene Peptide der transformierten/transfizierten in verschiedenen Formen präsentiert. Beispielsweise kann ein gesamtes Protein oder anderes antigenes Polypeptid beispielsweise chemisch oder enzymatisch abgebaut werden und in dieser Form der Zelllinie zugesetzt werden. Beispielsweise wird ein Protein von Interesse mit Chymotrypsin abgebaut und das gebildete Gemisch von Peptid-„Fragmenten" einer transformierten oder transfizierten Zellkultur zugesetzt; diesen Zellen wird dann erlaubt, die „geeigneten" Peptide auszuwählen (die häufig kleinere Peptide, vorzugsweise 8-mere oder 9-mere sind), die auf die Klasse-I-MHC-Moleküle aufgeladen werden. Alternativ dazu kann eine gesamte Protein- oder Polypeptidsequenz in einen geeigneten Vektor kloniert und in eine prokaryotische Zelle insertiert werden, wodurch die Zelle signifikante Mengen des antigenen Polypeptids erzeugt, das dann geerntet, gereinigt und zu Peptiden verdaut wird, die dann der transformierten/transfizierten eukaryotischen Zellkultur zugesetzt werden; den Zellen würde wiederum erlaubt werden, die Peptide „auszuwählen" und auf das exprimierte MHC aufzuladen.

6. Isolierung von Ruhe- oder Vorläufer-CD8-Zellen

[0135] Ruhe-(oder Vorläufer-)CD8-Zellen, d.h. T-Zellen, die nicht für das Targeting eines spezifischen Antigens aktiviert worden sind, werden vorzugsweise vor Inkubation der CD8-Zellen mit den transformierten, die Human-MHC-Moleküle exprimierenden Kulturen aus dem Patienten extrahiert. Es wird ferner bevorzugt, dass Vorläufer-CD8-Zellen vor dem Beginn einer anderen Behandlung oder Therapie, welche die der Fähigkeit von CD8-Zellen zur spezifischen Aktivierung stören könnte, aus einem Patienten geerntet werden. Wenn man beispielsweise beabsichtigt, ein Individuum mit einer Neoplasie oder einem Tumor zu behandeln, ist zu bevorzugen, vor dem Beginn der Chemotherapie- oder Strahlenbehandlung eine Probe von Zellen zu erhalten und dieselbe zu kultivieren.

[0136] Verfahren der Extraktion und Kultivierung von Lymphozyten sind bekannt. Beispielsweise beschreibt das US-Patent Nr. 4.690.915 an Rosenberg ein Verfahren zur Gewinnung großer Zahlen von Lymphozyten über Lymphozytopherese. Geeignete Kultivierungsbedingungen sind jene für Säugetierzellen, die typischerweise bei 37 °C durchgeführt werden.

[0137] Verschiedene Verfahren sind auch zur Abtrennung und/oder Anreicherung von Kulturen von Vorläufer-CD8-Zellen verfügbar. Einige Beispiele von allgemeinen Verfahren zur Zelltrennung umfassen die indirekte Bindung von Zellen an speziell beschichteten Oberflächen. In einem anderen Beispiel werden humane Peripherblut-Lymphozyten (PBL), die CD8-Zellen umfassen, durch Ficoll-Hypaque-Gradientenzentrifugation (Pharmacia, Piscataway, NJ) isoliert. PBL-Lymphoblasten können unmittelbar danach verwendet oder in flüssigem Stickstoff nach Einfrieren in FBS-enthaltendem 10%igen DMSO (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), das die Lebensfähigkeit der Zellen und Lymphozytenfunktion erhält, gelagert werden.

[0138] Alternative Verfahren der Abtrennung und/oder Anreicherung von Kulturen von Vorläufer-Zellen schließen das folgende Beispiel ein. Nachdem die mit Lymphozyten angereicherten PBL-Populationen aus Gesamtblut hergestellt worden sind, werden daraus Subpopulationen von CD8-Lymphozyten durch Trenntechniken isoliert, die auf Affinität basieren, die auf die Anwesenheit des CD8-Rezeptorantigens gerichtet ist. Diese auf Affinität basierenden Techniken umfassen Durchfluss-Mikrofluormetrie, einschließlich fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (FACS), Zelladhäsion und ähnliche Verfahren. (Siehe z.B. Scher und Mage, in: Fundamental Immunology, W.E. Paul (Hrsg.), River Press, NY, S. 767–780 (1984)). Affinitätsverfahren können Anti-CD8-Rezeptor-Antikörper als die Quelle des Affinitätsreagens anwenden. Alternativ dazu können der natürliche Ligand oder Ligandenanaloga des CD8-Rezeptors als Affinitätsreagens verwendet werden. Verschiedene monoklonale Anti-T-Zellen- und Anti-CD8-Antikörper zur Verwendung in diesen Verfahren sind von einer Reihe von kommerziellen Quellen, einschließlich der American Type Culture Collection (Rockville, MD) und Pharmingen (San Diego, CA) allgemein erhältlich. In Abhängigkeit von der Antigen-Bestimmung können verschiedene Antikörper geeignet sein. (Für Diskussion und Überblick über die Nomenklatur, Antigen-Bestimmung und humanen Leukozyten zugeordneten Antikörper, einschließlich T-Zellen siehe Knapp et al., Immunology Today 10, 253–258 (1989)). Beispielsweise sind die monoklonalen Antikörper OKT 4 (Anti-CD4, ATCC Nr. CRL 8002), OKT 5 (ATCC Nr. CRL 8013 und 8016), OKT 8 (Anti-CD8, ATCC Nr. CRL 8014) und OKT 9 (ATCC Nr. CRL 8021) im ATCC-Katalog der Zelllinien und Hybridom (ATCC, Rockville, MD) als reaktiv mit Human-T-Lymphozyten, Human-T-Zellen-Untermengen bzw. aktivierten T-Zellen gekennzeichnet. Verschiedene andere Antikörper sind zur Identifizierung und Isolierung von T-Zellen-Spezies verfügbar.

[0139] Vorzugsweise werden die PBLs dann gereinigt. Beispielsweise können Ficoll-Gradienten zu diesem Zweck angewendet werden. Die gereinigten PBLs würden dann mit syngenetischen, mit den geeigneten antigenen Peptiden vorinkubierten Drosophila-Zellen gemischt werden.

7. In-vitro-Aktivierung von CD8-Zellen

[0140] Um die in-vitro-Bedingungen zur Erzeugung spezifisch zytotoxischer T-Zellen zu optimieren, wird die Kultur von Stimulatorzellen in einem geeigneten Medium gehalten. In der bevorzugten Ausführungsform sind die Stimulatorzellen Drosophila-Zellen, die vorzugsweise in serumfreiem Medium (z.B. Excell 400) gehalten werden.

[0141] Vor der Inkubation der Stimulatorzellen mit den zu aktivierenden Zellen, z.B. Vorläufer-CD8-Zellen, wird der Stimulatorzellkultur eine Menge antigenen Peptids in ausreichender Menge zugesetzt, um auf die Human-Klasse-I-MHC-Moleküle aufgeladen zu werden, die an der Oberfläche der Stimulatorzellen zu exprimieren sind. Gemäß der vorliegenden Erfindung ist eine ausreichende Peptidmenge eine Menge, welche die Expression von ungefähr 200 und vorzugsweise 200 und mehr mit Peptid beladenen Human-Klasse-I-MHC-Mo-

lekülen an der Oberfläche jeder Stimulatorzelle erlaubt. Vorzugsweise werden die Stimulatorzellen mit > 20 µg/ml Peptid inkubiert.

[0142] Ruhe- oder Vorläufer-CD8-Zellen werden dann in Kultur mit den geeigneten Stimulatorzellen für eine Zeitdauer inkubiert, die zur Aktivierung der CD8-Zellen ausreichen ist. Vorzugsweise sollen die CD8-Zellen folglich auf eine Antigen-spezifische Weise aktiviert werden. Das Verhältnis von Ruhe- oder Vorläufer-CD8-(Effektor-)Zellen zu Stimulatorzellen kann von Individuum zu Individuum schwanken und kann weiters von Variablen abhängen, wie z.B. von der Zugänglichkeit der Lymphozyten eines Individuums für Kultivierungsbedingungen und der Natur und Schwere des Krankheitszustands oder einer anderen Kondition, für welche die hierin beschriebene Behandlungsmodalität angewendet wird. Vorzugsweise liegt jedoch das Verhältnis Lymphozyten:Stimulator-Zelle (z.B. Drosophila-Zelle) vorzugsweise im Bereich von ungefähr 30:1 bis 300:1. Beispielsweise wurden in einer Ausführungsform 3×10^7 Human-PBL- und 1×10^6 lebende Drosophila-Zellen gemischt und in 20 ml RPMI-1640-Kulturmedium gehalten.

[0143] Die Effektor/Stimulator-Kultur kann für so lange Zeit gehalten werden, wie sie notwendig ist, um eine therapeutisch verwendbare oder wirksame Anzahl von CD8-Zellen zu stimulieren. Allgemein gesprochen liegt die optimale Zeit zwischen ungefähr einem und fünf Tagen, mit einem „Plateau", d.h. einem „maximalen" spezifischen CD8-Aktivierungslevel, das im Allgemeinen nach fünf Tagen Kultur beobachtet wird. In einer der Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung wird die In-vitro-Aktivierung von CD8-Zellen innerhalb einer kurzen Zeitspanne nach Transfektion einer Zelllinie detektiert. In einer der Ausführungsformen ist die vorübergehende Expression in einer transfizierten Zelllinie, die zur Aktivierung von CD8-Zellen fähig ist, innerhalb von 48 Stunden nach Transfektion detektierbar. Dies zeigt eindeutig an, dass entweder stabile oder vorübergehende Kulturen transformierter, Human-Klasse-I-MHC-Moleküle exprimierender Zellen zur Aktivierung von CD8-Zellen wirksam sind.

8. Trennung von CD8-Zellen von Drosophila-Zellen

[0144] Aktivierte CD8-Zellen können von den Stimulator-(z.B. Drosophila-)Zellen unter Anwendung einer Vielzahl von bekannten Verfahren effektiv getrennt werden. Beispielsweise können monoklonale Antikörper, die für die Stimulatorzellen, für die auf die Stimulatorzellen aufgeladenen Pepetide oder für die CD8-Zellen (oder einem davon) spezifisch sind, dazu verwendet werden, um ihren geeigneten komplementären Liganden zu binden. Antikörper-getaggte Moleküle können dann aus dem Stimulator-Effektor-Zellgemisch über geeignete Mittel, z.B. über bekannte Immunpräzipitations- oder Immuntest-Verfahren extrahiert werden.

9. Verabreichung von aktivierten CD8-Zellen

[0145] Wirksame, zytotoxische Mengen aktivierter CD8-Zellen können zwischen In-vitro- und In-vivo-Anwendungen schwanken, sowie mit der Menge und Art der Zellen, die das endgültige Target dieser Killerzellen sind. Die Menge wird auch von der. Kondition des Patienten abhängen und sollte über die Abwägung aller zutreffenden Faktoren durch den praktischen Arzt bestimmt werden. Vorzugsweise werden jedoch für erwachsene Menschen ungefähr 1×10^6 bis ungefähr 1×10^{12}, bevorzugter ungefähr 1×10^8 bis ungefähr 1×10^{11} und noch bevorzugter ungefähr 1×10^9 bis ungefähr 1×10^{10} aktivierte CD8-Zellen angewendet, im Vergleich zu ungefähr 5×10^6 bis 5×10^7 in Mäusen angewendeten Zellen.

[0146] Vorzugsweise werden die aktivierten CD8-Zellen wie oben diskutiert vor Verabreichung der CD8-Zellen an das zu behandelnde Individuum aus der Drosophila-Zellkultur geerntet. Es ist jedoch wichtig anzumerken, dass im Gegensatz zu anderen gegenwärtigen und vorgeschlagenen Behandlungsmodalitäten das vorliegende Verfahren ein Zellkultursystem (d.h. Drosophila-Zellen) anwendet, das nicht tumorigen ist. Wenn daher die vollständige Trennung von Drosophila-Zellen und aktivierten CD8-Zellen nicht erzielt werden kann, besteht keine bekannte, inhärente Gefahr, die mit der Verabreichung einer kleinen Anzahl von Drosophila-Zellen assoziiert ist, wogegen die Verabreichung von Tumor-begünstigenden Säugetierzellen äußerst gefährlich sein kann.

[0147] Verfahren der Wiedereinführung zellulärer Komponenten sind fachbekannt und umfassen Verfahren wie jene, die im US-Patent Nr. 4.884.893 an Honsik et al. und im US-Patent Nr. 4.690.915 an Rosenberg beispielhaft dargestellt sind. Beispielsweise ist die Verabreichung aktivierten CD8-Zellen über intravenöse Infusion geeignet.

10. HLA-Typisierung

[0148] Wie vorhin erwähnt variieren HLA-Haplotypen/Allotypen von Individuum zu Individuum und dies ist, obwohl für die Ausführung der vorliegenden Erfindung nicht essentiell, häufig hilfreich für die Bestimmung des HLA-Typs des Individuums. Der HLA-Typ kann über standardmäßige Typisierungsverfahren bestimmt und die PBLs durch Ficoll-Gradienten gereinigt werden. Die gereinigten PBLs würden dann mit syngenetischen Drosophila-Zellen gemischt werden, die mit den geeigneten antigenen Peptiden vorinkubiert wurden, z.B. von Virus- oder Krebs-spezifischen Proteinen hergeleitete Peptide in Virusinfektionen, Krebsformen oder Malignitäten betreffenden therapeutischen Anwendungen.

[0149] In Fortsetzung der Verwendung viraler oder maligner Konditionen als ein Beispiel werden in jenen Fällen, bei denen spezifische Peptide eines bestimmten Virus- oder Krebs-spezifischen Proteins charakterisiert worden sind, die für diese Epitope kodierenden Peptide vorzugsweise verwendet. In Fällen, wo die bevorzugten antigenen Peptide nicht genau bestimmt worden sind, können Proteaseverdaue von Virus- oder Krebs-spezifischen Proteinen verwendet werden. Als Quelle für ein solches Antigen wird für Virus- oder Krebs-spezifische Proteine kodierende cDNA in ein bakterielles Expressionsplasmid kloniert und verwendet, um Bakterien, z.B. über hierin offenbarte Verfahren zu transformieren.

[0150] Nach der HLA-Typisierung, wenn die das bevorzugte HLA exprimierende Drosophila-Zellen nicht verfügbar sind, können die für das bevorzugte HLA kodierenden cDNAs über die Anwendung der Polymerasekettenreaktion kloniert werden. Die oben in Abschnitt B.1. offenbarten Primer (Seq.-ID Nr. 1 bis Seq.-ID Nr. 12) können dazu verwendet werden, um die geeigneten HLA-A, -B-, -C-, -E-, -F- oder -G-cDNAs in getrennten Reaktionen zu amplifizieren, die dann wie in den unten für HLA A2.1 offenbarten Verfahren beschrieben kloniert und sequenziert werden können. Stabile Zelllinien, welche das klonierte HLA exprimieren, können dann in Drosophila-Zellen etabliert werden. Alternativ dazu kann eine Population von Insektenzellen, die eine umfangreiche Population von klonierten, rekombinanten Molekülen aus der PCR-Reaktion vorübergehend exprimiert, für die In-vitro-CD8-Aktivierung verwendet werden.

11. Drosophila-Mitogen

[0151] Es hat sich nun herausgestellt, dass Überstände von Zellen, die gemäß der vorliegenden Erfindung kultiviert worden sind, die Fähigkeit von Zelllinien verstärkt oder wiederherstellt, spezifische, aktivierte CD8-Zellen zu erzeugen. Zugabe von ungefähr 10 % Drosophila-Kulturüberstand zu einer Lymphozytenkultur oder zu fixierten Zellen aktiviert CD8 auf effiziente Weise. Syngenetische Klasse-I-Antigene exprimierende, kultivierte Zellen, die CD8 in Primärkultur nicht aktivierten, waren nach Zugabe von Drosophila-Kulturüberstand fähig, spezifisches CD8 zu erzeugen.

[0152] Ein aus der Kultur isolierter Faktor, der einen signifikanten Einfluss auf die CD8-Aktivierung in Drosophila-Zellkulturen zu haben scheint, ist Drosophila-Zellmitogen. Das Mitogen ist als eine lösliche, sekretierte Substanz mit guter Stabilität charakterisiert, die ihre Aktivität sogar nach Lagerung für vier Monate bei 4 °C beibehielt. Das Mitogen besitzt ein relativ hohes Molekulargewicht, d.h. 500 kDa mittels Superose 6-(Pharmacia, Piscataway, NJ) Gelfiltration. Es bindet ferner stark an Mono Q-Sepharose (Pharmacia, Piscataway, NJ). Drosophila-Mitogen induziert scheinbar die Proliferation von B-Zellen und aktiviert Makrophagen.

[0153] Das in Drosophila gefundene Mitogen könnte beispielgebend für andere Insektenmitogen sein und könnte ein wirksames therapeutisches Adjuvans bereitstellen. Beispielsweise können Zellen aus einem infizierten Tier entfernt und zur Stimulation von Drosophila-Zeilen verwendet werden, die anschließend mit Primärblut-Lymphozyten und Drosophila-Mitogen gemischt werden. Das Gemisch kann dann zur Behandlung des Organismus verwendet werden.

Beispiele

[0154] Die folgenden Beispiele sind zur Veranschaulichung, nicht jedoch zur Einschränkung der vorliegenden Erfindung gedacht.

Beispiel 1

Expression von Human-Klasse-I-MHC-Molekülen

A. Herstellung des pRmHa-3-Expressionsvektors

[0155] Der pRmHa-3-Expressionsvektor zur Verwendung in der in dieser Erfindung beschriebenen Expression von MHC-Proteinen in Drosophila-Schneider-2-Zellen wurde durch Ligieren eines Sph-I-linearisierten pRmHa-1-DNA-Expressionsvektors mit einem DNA-Fragment konstruiert, das wie unten beschrieben aus einem Sph-I-Restriktionsverdau eines pRmHa-2-Expressionsvektors erhalten wurde. Das Ligieren von pRmHa-1 mit dem pRmHa-Fragment wurde auf diese wiese durchgeführt, um eine der beiden in pRmHa-1 vorhandenen Restriktionsendonuclease-Klonierungsstellen zu entfernen. Folglich enthielt der gebildete pRmHa-3-Expressionsvektor nur eine Eco-RI-Restriktionsstelle in der multiplen Klonierungsstelle (Polylinker), in die wie in den Beispielen beschrieben verschiedene, für MHC-kodierende DNA-Fragmente insertiert wurden.

1. Herstellung des pRmHa-1-Expressionsvektors

[0156] Der pRmHa-1-Expressionsvektor, der einen Metallothionein-Promotor, Metallreaktions-Konsenssequenzen (als MT bezeichnet) und ein Alkoholdehydrogenase-(ADH-)Gen enthielt, das ein aus Drosophila melanogaster isoliertes Polyadenylierungssignal enthielt, wurde wir von Bunch et al., Nucl. Acids Res. 16, 1043–61 (1988) beschrieben konstruiert. Eine schematische Darstellung des endgültigen pRmHa-1-Konstrukts ist in **Fig. 1B** gezeigt. Der Plasmidexpressionsvektor pUC18 mit der ATCC-Zugangsnummer 37253 wurde als Herkunftsvektor verwendet, aus dem spätere, hierin beschriebene Vektoren abgeleitet wurden. Das pUC18-Piasmid enthält die folgenden Restriktionsstellen von 5' nach 3' in der multiplen Klonierungsstelle, wovon nicht alle in den schematischen Darstellungen der pUC18-hergeleiteten Vektoren in **Fig.** 1 erläutert sind: Eco RI; Sac I; Kpn I; Sma I und Sma I an derselben Position lokalisiert; Bam HI; Xba I; Sal I, Acc I und Hinc II an derselben Position lokalisiert; Pst I; Sph I und Hind III. Der pUC18-Vektor wurde zunächst mit Hind II verdaut, um ein linearisiertes pUC18 zu bilden. Stumpfe Enden wurden dann durch Auffüllen der Hind-III-Enden mit dem großen DNA-Polymerase-I-Fragment wie von Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1982) beschrieben erzeugt.

[0157] Der gebildete, linearisierte, stumpfendige pUC18-Vektor wurde mit einem 740 Basenpaare (bp) langen Hinf-I-Fragment aus dem ein Polyadenylierungssignal enthaltendem ADH-Gen von Drosophila melanogaster ligiert. Das ligierte ADH-Allel wurde zunächst aus dem Plasmid pSACI, beschrieben von Goldberg et al., PNAS USA 77, –5798 (1980) durch Verdau mit Hinf-I-Fragment, gefolgt von Abstumpfen der Enden mit Klenow isoliert und lieferte die in Seq.-ID Nr. 14 verzeichnete Nucleotidsequenz. Der das ADH-Allel enthaltende pSACI-Vektor wurde durch Subklonieren in pBR322 (ATCC-Zugangsnummer 31344) konstruiert, einem 4,7 Kilobasen (kb) langen Eco-RI-Fragment der Drosophila-DNA, die aus einer Lamda-Bakteriophagen-Bibliothek gewählt wurde, die hochmolekulare DNA (größer als 15 kb) enthielt. Die 5'-Hinf-I-Restriktionsstelle trat im ADH-Gen an Position 1770 natürlich auf, wie von Kreitman, Nature 304, 412–417 (1983) beschrieben wurde. Die 3'-Hinf-I-Stelle wurde vom pUC18-Vektor hergeleitet, in den das ADH-Gen kloniert worden ist. Diese Position befand sich vier Basen 3' von der Xba-I-Stelle an Position 2500 des ADH-Gens. Das ADH-Segment erstreckte sich von 35 bp stromauf der Polyadenylierungs/Spalt-Sequenz im 3'-untransiatierten Teil der ADH-mRNA bis 700 bp stromab des Polyadenylierungssignals. Der gebildete, pUC18-hergeleitete, das ADH-Genfragment enthaltende Vektor wurde wie in **Fig. 1A** gezeigt als pHA-1 bezeichnet.

[0158] Das Eco-RI/Stu-I-MT-Genfragment von 421 bp wurde aus einem Klon erhalten, der DNA von ungefähr 15,3 kb in einer Genom-DNA-Bibliothek von Drosophila melanogaster enthielt. Die Bibliothek, hergestellt mit einem Mbo-I-Teilverdau von Imaginal-DNA, wurde in das Lambda-Derivat EMBL4 kloniert. Das Fragment enthielt den MT-Promotor und Metallreaktions-Konsenselemente des MT-Gens von Drosophila melanogaster (Maroni et al., Genetics 112, 493–504 (1986)). Diese Region, die Promotor und Transkriptionsstartstelle am Nucleotid 1+ enthielt, entsprach Position –370 bis Nucleotidposition +54 des MT-Gens (Seq.-ID Nr. 13). Des gebildete Fragment wurde dann in den oben hergestellten Expressionsvektor pHA-1 ligiert, der vorher mit Eco RI und Sma I linearisiert wurde. Das durch den Stu-I-Verdau erzeugte stumpfe 3'-Ende in MT war mit dem durch den Sma-I-Verdau erzeugten stumpfen Ende in pHA-1 kompatibel. Der gebildete, pUC18-hergeleitete Vektor, der ein 5'-Drosophila-MT-Genfragment und ein 3'-ADH-Genfragment enthielt, wurde als pRmHa-1 bezeichnet. Der in **Fig. 1B** gezeigte pRmHa-1-Expressionsvektor enthielt den Replikationsstartpunkt (ori) und das Ampicillin-Resistenz übertragende Beta-Lactamase-Gen (Amp') aus pUC18 wie in **Fig. 1A** gezeigt am pHa-1-Vektor. Das Diagramm von pRmHa-1 zeigt ferner die 5' nach 3'-benachbarten Positionen des MT-Gen-

fragments, die multiple Klonierungsstelle und das ADH-Genfragment. Der pRmHa-1-Vektor wurde wie in c. untenstehend beschrieben in der Konstruktion des pRmHa-3-Expressionsvektors verwendet.

2. Herstellung des pRmHa-2-Expressionsvektors

[0159] Die Konstruktion von pRmHa-2 ist in Fig. 1A gezeigt. Zur Konstruktion des pRmHa-2-Expressionsvektors wurde das oben hergestellte MT-Fragment in den pUC18-hergeleiteten Vektor pHA-1 insertiert, und zwar abgesehen von einigen Modifizierungen wie oben für die Konstruktion von pRmHa-1 beschrieben. Ein Eco-RI-Linker wurde der Stu-I-Stelle des oben hergestellten, Eco-RI/-Stu-I-isolierten MT-Genfragments angefügt, um ein Metallothionein-Fragment mit Eco-RI-Restriktionsstellen an beiden Enden zu bilden. Das erhaltene Fragment wurde dann in den das ADH-Fragment enthaltenden pUC18-Expressionsvektor ligiert, der vorher mit Eco RI linearisiert worden war. Der erhaltene, pUC18-hergeleitete Vektor, der ein 5'-Drosophila-MT-Genfragment und ein 3'-ADH-Fragment mit zwei Eco-RI-Restriktionsstellen 5' der multiplen Klonierungsstelle enthielt, wurde als pRmHa-2 bezeichnet. Der in Fig. 1A gezeigte pRmHa-2-Expressionsvektor enthielt den Replikationsstartpunkt (ori) und das Ampicillin-Resistenz übertragende Beta-Lactamase-Gen (Amp') aus pUC18. Das Diagramm von pRmHa-2 zeigt ferner die 5' nach 3'-benachbarten Positionen des MT-Genfragments, die multiple Klonierungsstelle und das ADH-Genfragment. Der pRmHa-2-Vektor wurde gemeinsam mit pRmHa-1 wie in c. untenstehend beschrieben in der Konstruktion des pRmHa-3-Expressionsvektors verwendet.

3. Herstellung des pRmHa-3-Expressionsvektors

[0160] Um den pRmHa-3-Expressionsvektor herzustellen, der nur eine Eco-RI-Restriktionsstelle aufwies, wurde ein Fragment aus pRmHa-2 in pRmHa-1 ligiert. Für diese Konstruktion wurde das in b. oben hergestellte pRmHa-2 zunächst mit Sph I verdaut. Des gebildete, in der Mitte des MT-Gens beginnende und sich zur Sph-I-Stelle in der multiplen Klonierungsstelle erstreckende Sph-I-Fragment wurde zunächst aus dem pRmHa-2-Vektor isoliert und dann in das oben in A.1. hergestellte pRmHa-1 ligiert. Der pRmHa-1-Vektor wurde vorher modifiziert, um die Eco-RI-Restriktionsstelle 5' des MT-Genfragments zu entfernen und dann mit Sph I linearisiert. Dieser Prozess ist in Fig. 1B schematisch veranschaulicht. Um die Eco-RI-Stelle in pRmHa-1 zu entfernen, wurde der Vektor zunächst mit Eco RI verdaut, um einen linearisierten Vektor zu bilden, dann zur Abstumpfung der Enden mit Mung-Bean-Nuclease behandelt und religiert.

[0161] Der pRmHa-1-Vektor mit fehlender Eco-RI-Stelle wurde dann mit Sph I verdaut, um die dem Sph-I-Fragment-Insert aus pRmHa-2 entsprechende Region zu entfernen und einen linearisierten pRmHa-1-Vektor zu bilden. Das Sph-I-Fragment aus pRmHa-2 wurde dann in das Sph-I-linearisierte pRmHa-1 ligiert, um den pRmHa-3-Expressionsvektor zu bilden. Ein Schema des pRmHa-2-Vektors ist in Fig. 1C gezeigt. Die relativen Positionen der verschiedenen Restriktionsstellen aus dem pUC18-Vektor, aus dem pRmHa-3 hergeleitet wurde, sind in der Figur bezeichnet. Zusätzlich sind in der Figur die relativen Positionen und Längen der MT- und ADH-Genfragmente bezeichnet, die durch die multiple Klonierungsstelle (Polylinker) getrennt sind, in die das MHC-Gen von Interesse kloniert ist. Der von pUC18 hergeleitete pRmHa-3-Vektor enthält den pUC18-Replikationsstartpunkt und das Ampicillin-Resistenz übertragende Beta-Lactamase-Gen. Folglich wurden die für MHC kodierende DNA-Fragmente, wie sie in dieser Erfindung hergestellt und in die multiple Klonierungsstelle von pRmHA-3 kloniert wurden, durch den MT-Promotor transkriptionell reguliert und über das ADH-Gen polyadenyliert.

B. cDNA-Synthese

[0162] Um HLA-A2.2 zu synthetisieren, wird für vollständiges A2.2 kodierende cDNA (zur publizierten Sequenz siehe Holmes et al., J. Immunol. 139, 936–41 (1987)) in ein M13mp19-Plasmid, einem im Handel erhältlichen Bakteriophagen-Vektor (Stratagene, La Jolla, CA) kloniert. cDNA wird durch PCR unter Verwendung von aus der publizierten Sequenz von A2 hergeleiteten Primern synthetisiert. Die cDNA wird aus einem M13mp19-Klon als ein Not-I (Überhang mit Klenow aufgefüllt)/EcoRI-Fragment freigesetzt. (Klenow-Fragmente sind Teil des DNA-Polymerase-I-Moleküls von E. coli, hergestellt durch Behandlung von DNA-pol-I von E. coli mit Subtilisin. Sie werden verwendet, um 5'- oder 3'-Überhänge an den durch Restriktionsnucleasen produzierten DNA-Molekülen „auszufüllen"). Das Not-I/Eco-RI-Fragment wird in mit Bg III (Enden mit Klenow aufgefüllt) und Eco RI verdautem pSP64T insertiert. pSP64T ist ein SP6-Klonierungsvektor, der dazu entworfen ist, um 5'- und 3'-flankierende Regionen einer mRNA bereitzustellen, die effizient in jede cDNA translatiert (β-Globin) wird, die ihr eigenes Initiationscodon enthält. Dieser Translations-SP6-Vektor wurde durch Verdauen von pSP64-Xβm mit Bal I und Bst EII, Auffüllen der versetzten Enden mit DNA-Polymerase T4 und Anfügen eines Bgl-II-Linkers konstruiert. Bal I schneidet die β-Globin-cDNA zwei Basen stromauf des ATG (Startcodon) und Bst EII schneidet acht Basen stromauf des TAA (Stopcodon). Es befindet sich nur eine Bgl-II-Stelle in

pSP64T, so dass Restriktionsenzyme, die im Polylinker-Fragment von Pat I zu EcoRI schneiden, nach wie vor verwendet werden können, um das Plasmid für die Transkription zu linearisieren. (Siehe Kreig und Melton, Nucleic Acid Res. 12, 7057–7070 (1984), welche auch die Konstruktion des Plasmids pSP64-Xβm beschreibt). Das erhaltene Plasmid wird mit EcoRI (aufgefüllt mit Klenow) und Hind III gespalten und in den pCMUII-Polylinker zwischen Hind III (5') und Stu I (3') kloniert. (Siehe Paabo et al., EMBO J. 5, 1921–1927 (1986)). Die gesamte cDNA wird als Hind-III-(Enden mit Klenow aufgefüllt) Bam-HI-Fragment entfernt, das pRmHa-3, gespalten mit Sma I und Bam HI kloniert wird.

[0163] HLA-A2.2-sol wurde durch gentechnischen Einbau eines Stopcodons in die oben beschriebene A2.2-cDNA unmittelbar vor der Transmembrandomäne hergestellt. Die Mutagenese wird durch Spalten der in den eukaryotischen Expressionsvektor pCMU-II zwischen Hind III 5' und Stu I 3' (siehe oben) klonierten cDNA mit Mbo II und Bam HI erzielt, wobei die folgenden Oligonucleotide insertiert wurden:

5'-Primer: 5' GGAGCCGTGACTGACTGAG 3'

(Seq.-ID Nr. 17)

3'-Primer: 5' CCCTCGGCACTGACTGACTCCTAG 3'

(Seq.-ID Nr. 18)

[0164] Das erhaltene rekombinante Plasmid wird mit Hind III gespalten und das überhängende Ende mit Klenow aufgefüllt, dann mit Bam HI geschnitten, wobei ein Restriktionsfragment freigesetzt wird, dass in pRmHa-3 in derselben Weise wie Volllängen-A2.2 kloniert wird.

[0165] HLA-A2.1-cDNA wird wie folgt hergestellt. Eine trunkierte HLA-A2.1-cDNA-Sequenz wird durch PCR unter Anwendung der folgenden, aus der publizierten Sequenz von A2.1 hergeleiteter Primer (Koller und Orr, J. Immunol. 124, 2727–2733 (1985)) und der von Nilsson et al., Cell 58, 707–718 (1989) beschriebenen Reaktionsbedingungen synthetisiert.

5'-Primer: 5' GCGGATCCATGGCCGTCATGGCGCCC 3'

(Seq.-ID Nr. 19)

3'-Primer: 5' CGGAATTCTCATCAGGGCTTCGGCAGCCC 3'

(Seq.-ID Nr. 20)

[0166] Das erhaltene PCR-Fragment wird in pBS (Stratagene, La Jolla, CA) kloniert und die Sequenz durch Didesoxy-Sequenzierung verifiziert. Ein Fragment von 800 bp, das für die Mehrheit der kodierenden Sequenz von HLA-A2.1 kodiert, wird aus diesem Plasmid mit Ava I und Stu I herausgeschnitten und dazu verwendet, um dasselbe Fragment in der HLA-A2.2-Transmembrandomäne zu ersetzen, das vorher in pRmHa-3 kloniert worden ist (siehe oben).

[0167] HLA-B7 wird durch PCR synthetisiert, und zwar unter Verwendung von aus der publizierten Sequenz von B7 (siehe z.B. Zemmour und Parham, Immunogenetics 33, 310–320 (1991)) hergeleiteten Primern, flankiert von Bam-HI-Stellen, direkt in die Bam-HII-Stelle von pRmHa-3 kloniert. (Siehe Sood et al., Immunogenetics 22, 101–121 (1988)).

[0168] HLA-B27-cDNA wird durch PCR synthetisiert, und zwar unter Verwendung von aus der publizierten Sequenz von B27 (siehe z.B. Zemmour und Parham, Immunogenetics 33, 310–320 (1991)) hergeleiteten Primern. Weitere Einzelheiten sind unmittelbar nachstehend angegeben.

[0169] HLA-B27-sol-cDNA wird wie obige b27-cDNA hergestellt, wobei jedoch das Stopcodon am Ende der Alpha-3-Domäne von Klon pB1 eingebaut wird (siehe Szotz et al., PNAS 83, 1428 (1986)). Sowohl trunkierte, als auch Volllängen-B27-cDNAs werden im Vektor pDS5 mit einem modifizierten 5'-Ende erhalten (siehe Stueber et al., EMBO J. 3, 3143–3148 (1986)). Ortsgerichtete Mutagenese wird durchgeführt, um die 5'-Enden der cDNA zu verlängern. Die folgenden Sequenz (in Großbuchstaben) wird dem publizierten B27-cDNA-Klon angefügt; die Sequenz nach der Schrägstrichmarkierung (/) ist der Beginn der publizierten Sequenz:

GGATCCTCTCAGACGCCGAGATGCGGGTC/acggcgccc...

(Seq.-ID Nr. 21)

[0170] Die vollständigen B27- und B27-sol-cDNAs werden aus dem pDS5-Plasmid herausgeschnitten, indem zunächst mit Apa LI (Enden mit Klenow aufgefüllt) und Bam HI geschnitten wird. Die erhaltenen Fragmente werden gerichtet in mit Sal I (Enden mit Klenow aufgefüllt) und Bam HI geschnittenem pRmHa-3 kloniert.

[0171] Für irgendwelche bevorzugten HLA kodierende cDNAs können über die Anwendung der Polymerasekettenreaktion kloniert werden. Die in Abschnitt B.1. oben offenbarten Primer (Seq.-ID Nr. 1 bis Seq.-ID Nr. 12) können verwendet werden, um die geeigneten HLA-A-, -B-, -C-, -E-, -F- oder -G-cDNAs in gesonderten Reaktionen zu amplifizieren die dann wie in den oben für HLA-A2.1 offenbarten Verfahren beschrieben kloniert und sequenziert werden können. Die Herstellung von cDNA aus Humanzellen wird wie in Ennis et al., PNAS USA 87, 2833–2837 (1990) beschrieben durchgeführt. Kurz gesagt wird aus einem Individuum eine Blutprobe erhalten und die Zellen werden nach Zentrifugation gesammelt und verwendet, um Gesamt-RNA herzustellen. Erststrang-DNA wird durch Verwendung von Oligo(dT) und reverser Transkriptase aus Vogel-Myeloblastose-Virus synthetisiert. Die erhaltene cDNA wird in einer PCR-Amplifikation unter Anwendung der/des geeigneten Primer(s) wie oben in Abschnitt B.1. erwähnt und eines GeneAmp-Sets und Thermocyclers (Perkin-Elmer/Cetus) verwendet. Die Reaktionsbedingungen sind vorzugsweise wie folgt. 100 ng cDNA-Templat und 50 Picomol jedes Oligonucleotidprimers werden eingesetzt. Dreißig Zyklen werden wie folgt durchgeführt: (a) eine Minute bei 94 °C; (b) eine Minute bei 60 °C; und (c) eine Minute, 30 Sekunden bei 72 °C. Die PCR-Reaktion wird dann für 10 Minuten auf 100 °C erhitzt, um die Tag-Polymerase zu zerstören und die Enden der DNA werden mit Polymerase T4 (Stratagene, San Diego, CA) abgestumpft.

[0172] Human-β2-Microglobulin-cDNA wird unter Verwendung einer publizierten cDNA-Teilsequenz (siehe Suggs et al., PNAS 78, 6613–17 (1981)) hergestellt, die als Templat für eine Polymerasekettenreaktion (PCR) mit den folgenden Primern verwendet wird:

5'-Primer

5' GCTTGGATCCAGATCTACCATGTCTCGCTCCGTGGCCTTAGCTGTGCTCGC GCTACTCTC 3'

(Seq.-ID Nr. 15)

3'-Primer

5' GGATCCGGATGGTTACATGTCGCGATCCCACTTAAC 3'

(Seq.-ID Nr. 16)

[0173] Die Primer werden in einer standardmäßigen PCR-Reaktion verwendet (siehe Nilsson et al., Cell 58, 707 (1989)). Die Reaktionsprodukte werden mit Phenol extrahiert, unter Verwendung eines Geneclean-Sets (Bio 101, San Diego, CA) gereinigt, mit Bam HI verdaut und in die Bam-HI-Stelle von pBS (Stratagene, La Jolla, CA) kloniert. Nach Verifizierung der Sequenz wird dieses Fragment in die Bam-HI-Stelle von pRmHa-3 kloniert.

[0174] Wie in den Beispielen bemerkt, wurde murine Klasse-I-cDNA in verschiedenen Fäl- len angewendet. Murine Klasse-I-cDNA wurde wie folgt hergestellt.

[0175] H-2K^b: für ein vollständiges K^b-Molekül kodierende cDNA wird aus einem wie folgt konstruierten Expressionsplasmid pCMU/K^b erhalten. Eine Teil-H-2K^b-cDNA, der die Leadersequenz und der Großteil der Alpha-I-Domäne fehlt, wird gemäß dem Verfahren von Reyes et al., PNAS 79, 3270–74 (1982) hergestellt, wobei pH202 erhalten wurde. Diese cDNA wird verwendet, um ein Volllängen-Molekül zu erhalten. Die fehlende Sequenz wird unter Verwendung eines für H-2K^b kodierenden genomischen Klons (Caligan et al., Nature 291, 35–39 (1981)) als Templat in einer PCR-Reaktion bereitgestellt, und zwar unter Verwendung eines 5'-Primers, flankiert von einer Not-I-Stelle, gefolgt von 21 Nucleotiden, die für die letzten sieben Aminosäuren der Leadersequenz kodieren und 18 Nucleotiden, die komplementär zum Beginn der Alpha-I-Domäne sind, und eines 3'-Primers, der komplementär zur die Sty-I-Stelle umfassenden Region ist. Das erhaltene Fragment wird mit pH202 an der Sty-I-Stelle ligiert. Die für den Rest der Signalsequenz kodierende 5'-Sequenz wird aus der D^b-cDNA (siehe unten) als ein Bam-HI/Not-I-Fragment erhalten. Die gesamte kodierende Sequenz wird vom Expressionsplasmid als ein Bam-HI-Fragment abgespalten und in mit Bam HI gespaltenes pRmHa-3 kloniert.

[0176] N-ZL^d: für ein vollständiges Ld-Molekül kodierende cDNA wird aus einem Expressionsplasmid pCMUIV/L^d erhalten (siehe Joly und Oldstone, Science 253, 1283–85 (1991)). Die vollständige cDNA wird aus einem eukaryotischen Expressionsvektor pCMUIV/D^b als Bam-HI-Fragment abgespalten und in pRmHa-3 als K^b kloniert.

[0177] H-2D^b: für ein vollständiges D^b-Molekül kodierende cDNA wird vom Expressionsplasmid pCMUIV/D^b erhalten (siehe Joly und Oldstone, Science 253, 1283–85 (1991)). Die vollständige cDNA wird von einem eukaryotischen Expressionsvektor PCMUIV/D^b als ein BamHI-Fragment gespalten und als K^b in pRmHa-3 kloniert.

[0178] Murines β2-Microglobulin: murine Volllängen-β2-Microglobulin-cDNA wird als ein Hind-III-(5') (aufgefüllt mit Klenow)/Bgl-II- (3') Fragment aus pSV2neo- (ATCC Nr. 37149) Maus-β2-Microglobulin-cDNA erhalten und in mit Sma I und Bam HIII geschnittenes pRmHa-3 kloniert.

[0179] Wie vorher erwähnt, leitet sich der pCMU-Vektor (pCMUIV) vom eukaryotischen Expressionsvektor pC81G her, wie von Nilsson et al., s.o. beschrieben wurde. Vektor pC81G ist seinerseits von pA81G hergeleitet (Paabo et al., Cell 33, 445–453 (1983)), und zwar gemäß dem in Paabo et al., EMBO J. 5, 1921-7 (1986) offenbarten Verfahren. Kurz gesagt werden diese Vektoren wie folgt konstruiert.

[0180] Die 220 bp lange Leadersequenzen des Vektors pA81G werden durch Deletieren eines Hind-III-nach-Dde-I-Fragments von 80 bp (nt 1286–1366 der von Herisse et al., NAR 8, 2173–2192 (1980) publizierten Sequenz) gekürzt; dieses Konstrukt wird pB81G genannt. Ein Hinf-I-Fragment des Alpha-Globin-Gens, das die Region von nt-112 bis +19 bezüglich der Stelle der Transkriptionsinitiation umspannt, wurde in die Pst-I-Ste11e von pUC9 subkioniert und der Repeat-Enhancer wurde stromauf des Promotors insertiert. Dieses Promotor-Enhancer-Element wurde zunächst getestet, indem es vor die für SV40-T-Antigen kodierende Region kloniert wurde und des erhaltene Konstrukt wurde in HeLa-Zellen (ATCC CCL 185) transfiziert. Die Zellen wurden nach zwei Tagen fixiert und durch indirekte Immunfluoreszenz auf T-Antigen gefärbt. Eine große Zahl von gefärbten Kernen wurde gefunden, was auf eine starke Promotoraktivität des Alpha-Globin-Fragments hinweist. Der SV40-Promotor im Vektor pB81G wurde dann durch dieses effiziente Promotorelement ersetzt, wodurch das Konstrukt pC81G erhalten wurde.

[0181] pCMUIV wurde durch Verdauen von pC81G mit Hind III und Bam HI und Insertieren der für die 5'-untranslatierte Sequenz von β-Globin-cDNA aus Xenopus laevis kodierenden Oligonucleotide, die zur Erzeugung von pSP64T verwendet wurden (Krieg et al., NAR 12, 7057–7070 (1984)), konstruiert. Es wurde jedoch eine Bam-HI-Stelle gewählt und nicht die in pSP64T verwendete Bgl-II-Stelle. Die zwischen Hind III und Bam HI von pC81G insertierte Sequenz war:

```
5'  AGCTTGAGCACTTGTTCTTTTTGCAGAAGCTCAGAATAAACG
    CTCAACTTTG  3'
```

(Seq.-ID Nr. 22).

[0182] Der Vektor phshsneo überträgt Neomycin-(G418-)Resistenz und ist ein Abkömmling von phsneo (pUChsneo) mit einer zusätzlichen Hitzeschock-Promotor-(hs-)Sequenz, die aus im Handel erhältlichem pUC8 wie in Steller et al., EMBO J. 4, 167 (1985) synthetisiert werden kann. Der in diesen Vektoren enthaltene Hitzeschock-Promotor ist der hsp70-Promotor. Andere zweckdienliche, Neomycin-Resistenz (G418-Resistenz) übertragende Vektoren umfassen Cosmid-Vektor smart2 (ATCC 37588), der unter Kontrolle des Drosophila-hsp70-Promotors exprimiert wird, und Plasmidvektor pcopneo (ATCC 37409).

C. Insertion von Genen in Expressionsvektoren

[0183] Die Restriktionsprodukte werden der Elektrophorese an einem 1 %igen Agarosegel unterworfen (Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1982)). Die für die cDNAs kodierenden Restriktionsfragmente werden aus dem Gel herausgeschnitten und unter Verwendung von „Geneclean" gemäß den Anleitungen des Herstellers (Bio 101, San Diego, CA) von der Agarose befreit. Das Drosophila-Expressionsplasmid pRmHa-3 (siehe Bunch et al., Nucl. Acids Res. 16, 1043–61 (1988)) wird mit den geeigneten Restriktionsenzymen in One-Phor-All-Puffer gemäß den Anleitungen des Herstellers (Pharmacia, Piscataway, NJ) gespalten und wie in der Literatur des Herstellers (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) mit alkalischer Phosphatase behandelt. Einhundert ng gespaltener und phosphatasebehandelter pRmHa-3-Vektor wird mit 300 ng Agarosegel-gereinigter Klasse-I-MHC-Schwerketten-cDNA oder β2-Micro-

globulin-cDNA gemischt und unter Verwendung von DNA-Ligase T4 und One-Phor-All-Puffer wie in der Literatur des Herstellers beschrieben ligiert. Nach Inkubation bei 16 °C für fünf Stunden wird das Ligationsgemisch verwendet, um kompetenten E. coli JM83 zu transformieren (Maniatis et al., s.o. (1982)).

[0184] In Maniatis et al., s.o., offenbarte Verfahren werden verwendet, um die benötigte cDNA herzustellen; kurz dargelegt sind die Verfahren die folgenden. Transformanten werden durch Ausplattieren von E. coli auf Ampicillin enthaltende Agarplatten selektiert. Ampicillin-resistente Kolonien werden einzeln in Flüssigkultur gezüchtet und DNA unter Anwendung des Miniprep-Verfahrens der alkalischen Lyse hergestellt. Die Anwesenheit der MHC-Schwerketten-cDNA und ihre Orientierung im Vektor wird durch Restriktionskartierung bestimmt. Bakterien, die den Vektor mit der cDNA in der korrekten Orientierung bezüglich des Metallothionein-Promotors enthalten, werden für die Herstellung von DNA im Großmaßstab unter Anwendung des Verfahrens der alkalischen Lyse und Cäsiumchlorid-Gradientenreinigung verwendet. Die erhaltene DNA-Menge wird spektralphotometrisch bestimmt.

D. Transfektion und Markierung von Schneider-Zellen

[0185] Schneider-II-Zellen werden in Schneider-Medium (Gibco/BRL, Grand Island, NY), ergänzt mit 10 % fötalem Kälberserum (wärmebehandelt für eine Stunde bei 55 °C), 100 Units/ml Penicillin, 100 mg/ml Streptomycin und 1 mM Glutamin gezüchtet. (Der Einfachheit halber wird dieses ergänzte Medium hiernach Schneidermedium genannt). Die Zellen werden bei 27 °C gezüchtet und typischerweise alle sieben Tage durch Verdünnen 1:17 mit frischem Medium passiert. Die Zellen werden auf Wachstum in serumfreiem Medium (Excell 400 oder 401. ergänzt mit 100 Units/ml Penicillin, 100 mg/ml Streptomycin, 1 mM Glutamin und 500 µg/ml G418 (JRH Biosciences, Lenexa, KS)) durch anfängliche Verdünnung in 50 % Schneider/50 % Excell 401 umgestellt. Eine Woche später können die Zellen in 10 % Schneidermedium/90 % Excell 401 und eine Woche später in 100 % Excell 401 passiert werden. Die Zellen werden in diesem Medium gehalten und alle sieben Tage durch Verdünnen 2:17 in frischem Medium passiert.

[0186] 15×10^6 Schneiderzellen in einer Konzentration von 10^6 Zellen pro ml werden in 85 mm-Petrischalen. ausplattiert. Zwölf Stunden später werden wie unten hergestellte Calciumphosphat/DNA-Präzipitate (1 ml) den Zellen tropfenweise zugesetzt. Nach 48 Stunden wird der Überstand vorsichtig entfernt und die Zellen in eine 175 cm^2-Flasche in ein Gesamtvolumen von 50 ml Schneidermedium transferiert, das 500 µg/ml Geneticin (G418) (Gibco/BRL, Grand Island, NY) enthält. Nach 21 Tagen werden 20 ml dieser Kultur entfernt und in eine frische Flasche mit 30 ml Medium mit 500 µg/ml G418 gegeben. Zehn Tage später wird eine stabile Population von Zellen erhalten, die schwach an der Flasche hafteten und mit einer Verdoppelungszeit von ungefähr 24 Stunden wuchsen und diese Zellen wurden anschließend kultiviert und wie oben beschrieben in Selektionsmedium passiert. Gefrorene Aliquoten dieser Zellen werden durch Sammeln von $5–20 \times 10^6$ Zellen durch Zentrifugation und Resuspendieren der Zellen in 1 ml Zelleinfriermedien (93 % Kälberserum/7 % Dimethylsulfoxid) hergestellt. Aliquoten werden dann für eine Woche bei –70 °C gelagert und anschließend in die Flüssigstickstofflagerung transferiert.

[0187] Calciumphosphatpräzipitate werden wie von Paabo et al. (EMBO J. 5, 1921–27 (1986)) beschrieben hergestellt mit der Ausnahme, dass 25 µg DNA je Transfektion verwendet werden. Die folgenden Kombinationen von DNA werden verwendet, um die bezeichneten Transfektanten herzustellen:

(a) MHC-Klasse-I-Schwerkette alleine: 23 µg Schwerketten-Expressionsvektor-DNA + 2 µg phshsneo-DNA.

(b) MHC-Klasse-I-Schwerkette + β2-Microglobulin: 11,5 µg Schwerketten-Expressionsvektor-DNA + 11,5 µg β2-Microglobulin- (Human oder Maus) Expressionsvektor-DNA + 2 µg phshsneo-DNA.

[0188] Vierundzwanzig Stunden vor dem metabolischen Markieren werden die Zellen bei einer Zelldichte von $3–5 \times 10^6$ Zellen/ml (10 ml/85 mm-Petrischale) in 1 mM $CuSO_4$ enthaltendem Schneidermedium ausplattiert. Dreißig Minuten vor dem Markieren wird das Medium aus den Platten abgesaugt und die Zellen mit 2 × 10 ml PBS gewaschen und dann in Graces-Insektenmedium minus Methionin und Cystein (Sonderbestellung von Gibco/BRL, Grand Island, NY) für 20 Minuten inkubiert und dann in 1 ml dieses Mediums, enthaltend 0,1 mCi 35S-Trans-Label (New England Nuclear; duPont, Boston, MA). Nach der Markierungsperiode wird die Markierungslösung abgesaugt und die Zellen entweder sofort auf Eis mit eiskaltem PBS/1 % Triton X100 (1 ml) lysiert oder nach einer Verdrängungsperiode in Gegenwart von Methionin enthaltendem Schneider- oder Excell-400-Medium (5 ml) (JRH Biosciences). Das Verdrängungsmedium wird gesammelt, wenn lösliche Klasse-I-MHC-Moleküle analysiert werden.

[0189] Die folgenden Arbeitsgänge werden alle mit kalt gehaltenen (unter 8 °C) Lysaten durchgeführt. Die Ly-

sate wurden in Eppendorf-Röhrchen gesammelt, in einem Mikrozentrifugenröhren für 15 Minuten bei 13.000 × g zentrifugiert, in ein frisches, 100 µl einer 10%igen Aufschlämmung von Protein A-Sepharose enthaltendes Röhrchen überführt und für zwei Stunden auf einen Tumbler-Rotator gegeben. Nach einer weiteren Zentrifugation in der Mikrozentrifuge für 15 Minuten sind die Zelllysate zur Analyse bereit.

[0190] In Experimenten unter Anwendung von murinem MHC wurden Schneider-II-Zellen mit den oben beschriebenen murinen MHC-Rekombinanten unter Anwendung des $CaPO_4$-Präzipitationsverfahrens transfiziert; jede Schwerkette wird entweder alleine oder als ein 50:50-Gemisch mit dem für β2-Mikroglobulin kodierenden Vektor transfiziert. Ein für Neomycin-Resistenz kodierendes Plasmid, phshsneo-DNA, wird bei jeder Transfektion dermaßen eingeschlossen, dass eine Population von Zellen, die MHC-Klasse-I stabil exprimierten, durch Züchtung der Transformanten in Selektionsmedium (Geneticin G418-sulfat, Gibco/BRL, Grand Island, NY) erhalten werden konnte.

E. Peptid-Erzeugung

[0191] Antigene Peptide gemäß der vorliegenden Erfindung können aus natürlich auftretenden Quellen erhalten oder unter Anwendung bekannter Verfahren synthetisiert werden. In verschiedenen hierin offenbarten Beispielen werden Peptide an einem Applied Biosystems Synthesizer, ABI 431A (Foster City, CA) synthetisiert und anschließend durch HPLC gereinigt. In vielen hierin offenbarten Experimenten verwendete antigene Peptid umfassen die untenstehend aufgelisteten.

Ovalbumin (8)[1] 1-Buchstaben-Code: **SIINFEKL;**
3-Buchstaben-Code: **SerIleIleAsnPheGluLysLeu**

(Seq.-ID Nr. **23)** (Reste **5-12)**

Ovalbumin (24)[1] 1-Buchstaben-Code: **EQLESIINFEKL-TEWTSSNVMEER;**
3-Buchstaben-Code: **GluGlnLeuGluSerIleIleAsnPheGluLysLeu-ThrGluTrpThrSerSerAsnValMetGluGluArg**

(Seq.-ID Nr. **23)**

VSV NP[2] 1-Buchstaben-Code: **RGYVYQGL**
3-Buchstaben-Code: **ArgGlyTyrValTyrGlnGlyLeu**

(Seq.-ID Nr. **24)**

Influenza NP[2] 1-Buchstaben-Code: **ASNENMETM**
3-Buchstaben-Code: **AlaSerAsnGluAsnMetGluThrMet**

(Seq.-ID Nr. **25)**

LCMV NP[3] 1-Buchstaben-Code: **SERPQASGVYMGNL**

3-Buchstaben-Code:

SerGluArgProGlnAlaSerGlyValTyrMetGlyAsnLeu

(Seq.-ID Nr. **26**)

LCMV GP2[4] 1-Buchstaben-Code: **DSSGVENPGGYCTK**

3-Buchstaben-Code:

AspSerSerGlyValGluAsnProGlyGlyTyrCysThrLys

(Seq.-ID Nr. **27**)

HIV GAG A (9)[5] 1-Buchstaben-Code: **QMKDCTERQ**

3-Buchstaben-Code: **GlnMetLysAspCysThrGluArgGln**

(Seq.-ID Nr. **28**)

HIV GAG B (9)[5] 1-Buchstaben-Code: **KRWIILGLN**

3-Buchstaben-Code: **LysArgTrpIleIleLeuGlyLeuAsn**

(Seq.-ID Nr. **29**)

HIV Vpr (9)[5] 1-Buchstaben-Code: **FRIGCRHSR**

3-Buchstaben-Code: **PheArgIleGlyCysArgHisSerArg**

(Seq.-ID Nr. **30**)

HIV POL (9)[5] 1-Buchstaben-Code: **ILKEPVHGV**

3-Buchstaben-Code: **IleLeuLysGluProValHisGlyVal**

(Seq.-ID Nr. **31**)

INF Matrix (10)[6] 1-Buchstaben-Code: **ILGFVFTLTV**

3-Buchstaben-Code: **IleLeuGlyPheValPheThrLeuThrVal**

(Seq.-ID Nr. **32**)

---

[1] Carbone et al., J. Exp. Med. 169, 603–12 (1989)
[2] Van Bleek et al., Nature 348, 213–216 (1990)
[3] Whitton et al., J. Virol. 63, 4303–10 (1989)
[4] Oldstone et al., J. Exp. Med. 168, 559–570 (1988)
[5] Nixon und McMichael, AIDS 5, 1049 (1991); siehe auch Nixon et al. AIDS 4, 841–5 (1990)
[6] Gotch et al., J. Exp. Med. 168, 2045–57 (1988).

[0192] Isolierung oder Synthese von „Zufalls"-Peptiden kann auch geeignet sein, insbesondere wenn man versucht, ein bestimmtes Epitop festzusetzen, um ein leeres MHC-Molekül mit einem Peptid zu beladen, das höchstwahrscheinlich Vorläufer-CD8-Zellen stimuliert. Man kann ein Gemisch von „Zufalls"-Peptiden über die Verwendung von Proteasomen (siehe z.B. Beispiel 2.B.6) herstellen oder indem man ein Protein oder Polypeptid einem Abbauprozess, z.B. Verdau mit Chymotrypsin, unterwirft oder es können Peptide synthetisiert werden. Obwohl die Erfinder beobachtet haben, dass die Zelllinien der vorliegenden Erfindung dazu fähig sind, Proteine und Polypeptide zu kleineren Peptiden abzubauen, die man auf Human-Klasse-I-MHC-Moleküle aufladen kann, wird bevorzugt, kleinere Peptide, z.B. 8-mere oder 9-mere direkt in die Zellkultur einzuführen, um eine schnelleren Beladungs- und Expressionsprozess zu ermöglichen.

[0193] Wenn man Peptide, z.B. zufällige 8-, 9- und 18-Aminosäurepeptide, synthetisiert, werden alle Aminosäurearten vorzugsweise in jeden Synthesezyklus aufgenommen. Es sollte jedoch angemerkt werden, dass verschieden Parameter, z.B. Lösungsmittel-Inkompatibilität bestimmter Aminosäuren, ein Gemisch liefern kann, dass Peptide enthält, denen bestimmte Aminosäuren fehlen. Der Prozess sollte daher wie erforderlich abgestimmt werden, d.h. durch Änderung des Lösungsmittels und der Reaktionsbedingungen, um die höchstmögliche Vielfalt von Peptiden herzustellen.

[0194] Um die „Bevorzugungen" der Peptidauswahl durch MHC-Moleküle zu bestimmen, ist daher eine Reihe von Peptiden unterschiedlicher Längen synthetisiert worden, wie in Tabelle 3 gezeigt ist. Diese umfassen Peptide einer Länge von 8 und 9 Aminosäuren sowie längere Peptide. Um das Ausmaß der Thermostabilität quantifizieren zu können, die durch Peptide verschiedener Länge und durch verschiedene β2-Microglobuline übertragen wurde, ist die Stabilität dieser verschiedenen Moleküle in Zelllysaten untersucht worden. Radioaktive Zelllysate wurden aus K^b/β2, L^d/β2 und D^b/β2 exprimierenden Drosophila-Zellen entweder mit humanem oder murinem β2-Microglobulin wie früher beschrieben hergestellt. Die Lysate wurden dann aliquotiert und Hinzufügungen wie beschrieben durchgeführt. Für jede Behandlung wurden fünf Röhrchen vorbereitet; diese wurden dann bei verschiedenen Temperaturen zwischen 4 °C und 47 °C für eine Stunde inkubiert, worauf die Klasse-I immunpräzipitiert und durch SDS-PAGE analysiert wurde. Die Autoradiogramme wurden dann mit einem Laser-Densitometer gescannt und die Signalstärke gegen die Temperatur der Inkubation aufgetragen, der diese Probe unterworfen worden ist. Diejenige Temperatur, bei der 50 % der Moleküle stabil sind, wurde aus der Kurve berechnet und als ein Maß der relativen Thermostabilitäten der verschiedenen Spezies verwendet. Wie im Vorstehenden erwähnt, waren murine, mit Human-β2-Microglobulin komplexierte Schwerketten bei Temperaturen stabil, die um ungefähr 6–8 Grad höher lagen als bei Komplexierung mit murinem β2. Es ist ferner beobachtet worden, dass die durch Peptid und xenogenes β2-Microglobulin übertragene Stabilitäten additiv sind. Ein starker Anstieg der Thermostabilität von Klasse-I-Molekülen tritt auf, wenn 8–9-mere im Vergleich zu 12–25-meren verwendet werden; in der Tat könnte der Unterschied zwischen der durch die 8-9-mere im Vergleich zu größeren Peptiden übertragenen Stabilisierung sogar größer sein als der früher beobachtete, weil es trotz der erfolgten Reinigung der Peptide durch HPLC wahrscheinlich ist, dass eine gewisse Kontamination der größeren Peptide mit den 8–9-meren vorliegt.

[0195] Es wird nunmehr gezeigt, dass die Thermostabilität eines Klasse-I-Moleküls offenbar von (1) dem Ursprung des β2-Microglobulins; (2) der Anwesenheit von Peptid; und (3) der Länge und Sequenz dieses Peptids abhängt.

F. Erzeugung von thermostabilem, oberflächenexprimiertem MHC

1. Verfeinerung der Parameter unter Verwendung von murinem MHC

[0196] Vor dem Experimentieren mit Human-Klasse-I-MHC-Moleküle exprimierenden Zellen wurde die Optimierung von verschiedenen Parametern unter Verwendung von murinem MHC durchgeführt. Zunächst wurde verifiziert, dass murine, in Drosophila-Zellen exprimierte Klasse-I-MHC-Moleküle die Eigenschaften von peptidfreien oder „leeren" Klasse-I-Molekülen aufweisen.

[0197] Beispielsweise stellen die **Fig. 2A** und B Ergebnisse von Tests, erstellt aus K^b/β2, L^d/β2 und D^b/β2 exprimierenden Drosophila-Zellen mit entweder murinem oder humanem β2-Microglobulin dar. K^b/β2, L^d/β2 und D^b/β2 exprimierende Drosophila-Zellen wurden für 45 Minuten mit 35S-Methionin markiert und Lysate davon wie oben beschrieben hergestellt. Jedes Lysat wurde in vier Aliquoten unterteilt, denen entweder OVA-, NP- oder GP2-Peptid oder überhaupt kein Peptid zugesetzt wurde. Nach Inkubation für eine Stunde bei 4 °C wurde das andere für eine Stunde bei 30 °C inkubiert. Die Klasse-1-Moleküle wurden dann aus den Lysaten immunpräzipitiert und durch SDS-PAGE analysiert. Eine drastische Stabilisierung von K^b/β2 gegen die Temperatur-Exposition trat auf, wenn den Lysaten entweder OVA- oder NP-Peptid zugesetzt wurde; auf ähnliche Weise wurde L^d/β2 durch Zusatz von NP-Peptid stabilisiert. D^b/β2 scheint nicht so temperaturlabil wie die anderen beiden Moleküle zu sein; trotzdem wird ein Anstieg der Stabilität des Moleküls bei Zusatz des GP2-Peptids zum Lysat beobachtet, wogegen der Zusatz von OVA- oder NP-Peptid dies nicht erzielte. Zwei immunpräzipitierte Banden können für jedes Klasse-I beobachtet werden, welche die Golgi-prozessierten (niedrigere) und nicht prozessierten Formen darstellen, wobei beide Moleküle durch den Zusatz von Peptid zum Lysat gleichermaßen stabilisiert zu werden scheinen. Bei der geringen Menge von „30-°C-resistentem" Protein, das in den K^b/β2-unbehandelten oder GP2-Lysaten beobachtet wurde, handelt es sich um Hintergrund, da der Zusatz von Y3 zu einem Lysat von markierten L^d/β2-Zellen zur Isolierung dieser Bande führte (nicht gezeigt).

[0198] Als Nächstes wurde die Möglichkeit untersucht, dass humanes β2-Microglobulin murine Schwerketten besser thermostabilisiert als murines β2-Microglobulin. Es wurde gefunden, dass der Zusatz von Human-β2 zu in Excell-400-Medium kultivierten Drosophila-Zellen den Steady-state-Level aller drei murinen Klasse-I-Moleküle nicht nur erhöhte, sondern die Stabilisierung der Moleküle bei 37 °C für zumindest drei Stunden bewirkte. Die erhöhte Stabilität von murinem Klasse-I bei Zusatz von Human-β2 könnte das Ergebnis der Erhöhung der β2-Konzentration im Medium gewesen sein; diese Möglichkeit wurde ausgeschlossen. Für Human-β2-Microglobulin kodierende cDNA wurden in den Drosophila-Expressionsvektor pRmHa-3 kloniert und mit Expressionsplasmiden co-transfiziert, welche die verschiedenen murinen Klasse-I-Schwerketten-cDNAs und das frü-

her beschriebene Resistenzmarken-Plasmid enthielten. Nach dieser G418-Selektion wurden die Zellen mit den geeigneten Anti-Klasse-I-Antikörpern für die Oberflächenexpression markiert, wobei stark exprimierende Zellen unter Anwendung von FACS selektiert wurden. Stabile Populationen von Zellen wurden erhalten (Daten nicht gezeigt). Die Zellen wurden dann für das Wachstum in Excell 400 konditioniert und für unterschiedliche Zeiten bei 37 °C inkubiert. Die mit Human-β2-Microglobulin synthetisierten Maus-Klasse-I-Moleküle waren gegen eine 3-Stunden-Inkubation bei 37 °C ohne Zusatz von exogenem β2 zum Excell-Medium stabil (Daten nicht gezeigt). Die Ergebnisse der Erfinder zeigen, dass die Thermostabilität von murinen Klasse-I-Molekülen von der Anwesenheit von Peptid und von der Herkunft des β2-Microglobulins abhängt. (Siehe **Fig. 3A** und **Fig. 3B**.)

[0199] Zusätzlich ist nun ermittelt worden, dass die an der Zelloberfläche exprimierten Klasse-I-Moleküle durch Zusatz von Peptiden der geeigneten Größe weiter stabilisiert werden. (Siehe **Fig.** 5A–C.) Eine Reihe von Peptiden unterschiedlicher Länge wurde synthetisiert, wie in Tabelle 3 gezeigt ist (siehe Beispiel 5.2.). Diese umfassen ein Peptid mit einer Länge von 8 Aminosäuren; RGYVYQGL (Seq.-ID Nr. 24) ist als das Epitop im G-Protein des vesikulären Stomatitis-Virus (VSV) charakterisiert worden. Auf ähnliche Weise ist das OVA-8mer-Peptid SIINFEKL (Seq.-ID Nr. 23, Reste 5-12) als dasjenige Peptid in Ovalbumin identifiziert worden, das durch K^b/β2 präsentiert wird, und das 9 Aminosäuren lange Peptid ASNENMETM (Seq.-ID Nr. 25) ist als das durch D^b/β2 präsentierte Epitop des Kernproteins des Influenza-Virus charakterisiert worden. Zusatz dieser „Eltern"-Peptide zu in Excell kultivierten und murine Klasse-I exprimierenden Drosophila-Zellen ergab eine 37-°C-Thermostabilität von K^b/β2 durch das OVA-Peptid und von D^b/β2 durch das NP-Peptid.

[0200] Um das Ausmaß der Thermostabilität quantifizieren zu können, die durch Peptide verschiedener Länge und durch verschiedene β2-Microglobuline übertragen wurde, ist die Stabilität dieser verschiedenen Moleküle in Zelllysaten untersucht worden. Radioaktive Zelllysate wurden aus K^b/β2, L^d/β2 und D^b/β2 exprimierenden Drosophila-Zellen entweder mit humanem oder murinem β2-Microglobulin wie früher beschrieben hergestellt. Die Lysate wurden dann aliquotiert und Hinzufügungen wie in Beispiel 1.D. beschrieben durchgeführt. Für jede Behandlung wurden fünf Röhrchen vorbereitet; diese wurden dann bei verschiedenen Temperaturen zwischen 4 °C und 47 °C für eine Stunde inkubiert, worauf die Klasse-I immunpräzipitiert und durch SDS-PAGE analysiert wurde. Die Autoradiogramme wurden dann mit einem Laser-Densitometer gescannt und die Signalgröße gegen die Temperatur der Inkubation aufgetragen, der diese Probe unterworfen worden ist. Diejenige Temperatur, bei der 50 % der Moleküle stabil sind, wurde aus der Kurve berechnet und als ein Maß der relativen Thermostabilitäten der verschiedenen Spezies verwendet. Wie früher beobachtet, waren murine, mit Human-β2-Microglobulin komplexierte Schwerketten bei Temperaturen stabil, die um ungefähr 6–8 Grad höher lagen als bei Komplexierung mit murinem β2. Interessanterweise sind die durch Peptid und xenogenes β2-Microglobulin übertragenen Stabilitäten additiv. Ein starker Anstieg der Thermostabilität von Klasse-I-Molekülen tritt auf, wenn 8-9-mere im Vergleich zu 12–25-meren verwendet werden; in der Tat könnte der Unterschied zwischen der durch die 8-9-mere im Vergleich zu größeren Peptiden übertragenen Stabilisierung sogar größer als der früher beobachtete sein, weil es trotz der erfolgten Reinigung der Peptide durch HPLC wahrscheinlich ist, dass eine gewisse Kontamination der größeren Peptide mit den 8–9-meren vorliegt.

[0201] Die folgende Tabelle zeigt die Temperaturen (in °C), bei denen 50 % der Klasse-I-MHC-Schwerketten (bezeichnet) in den TX100-Lysaten stabil sind, wenn sie mit murinem oder humanem β2 in An- oder Abwesenheit von Peptiden co-exprimiert werden.

Tabelle 1

MHC-Klasse I	Peptid	Maus-β2	Human-β2
H2-K^b	--	24	32
	OVA 8	45	47
	OVA 9	46	48
	VSV 8	26	34
H2-D^b	--	27	34
	INF NP9	42	44
H2-L^d	--	23	29

[0202] Um die Frage zu beantworten, ob Peptid an leere Klasse-I-Moleküle in Abwesenheit von β2-Microglobufin binden könnte, wurden Tensid-Lysate aus K^b- oder D^b-Klasse-I-Schwerketten exprimierenden, mit ^{35}S-Methionin für eine Stunde markierten und behandelten Drosophila-Zellen hergestellt. Das K^b-Molekül wurde mit dem Y3-Antikörper und D^b mit dem B22.249-Antikörper immunpräzipitierf. In den unbehandelten Lysaten konnten nur niedrige Level von immunreaktiver K^b-Schwerkette detektiert werden. Der Zusatz eines der beiden Peptide, das an Klasse-I oder Human-β2-Microgiobulin bindet, ergab einen Anstieg der Menge immunreaktiven Materials; der Zusatz beider Peptide lieferte eine viel größere Menge immunreaktiver Schwerkette. Ähnliche Ergebnisse wurden für D^b erhalten. Folglich schein es so zu sein, dass die Schwerkette Peptid in Abwesenheit von β2-Microglobulin binden kann; jedoch liefert diese Bindung entweder keine sehr stabile Konformation, oder es binden die verwendeten Antikörper diese Konformation nicht gut. Zusatz von β2-Microglobulin ergibt, möglicherweise aus demselben Grund, ebenfalls einen Anstieg der Anzahl immunreaktiver Moleküle. Die Wirkungen dieser beiden Reagenzien sind additiv, was darauf hinweist, dass der Dreifach-Komplex die stabilste Form des Moleküls ist und/oder, dass dieses Molekül durch den Antikörper am besten erkannt wird.

[0203] Diese Ergebnisse erheben die Frage, ob man Schwerketten/β2-Komplexe nach der 30-°C-Behandlung aus Lysaten „wiederherstellen" kann. Lysate aus K^b/β2 exprimierenden Drosophila-Zellen wurden für eine Stunde bei 30 °C behandelt, worauf NP-Peptid und Human-β2-Microglobulin zugesetzt wurden. Nach Inkubation bei 4 °C für 4 Stunden wurden Klasse-I-Schwerketten entweder mit Y3- oder dem Anti-Cytoplasma-Schwanz-Antikörper K193 immunpräzipitiert. Die Herstellung der Antisera ist in Beispiel 2.1 beschrieben.

[0204] Wie vorher berichtet worden ist, wurde gefunden, dass die Temperaturbehandlung von leeren Klasse-I-Molekülen in Triton TX-100-Lysaten nicht zu deren Abbau führte (das K^b-Molekül kann nach der 30-°C-Behandlung mit einem Anti-Cytoplasma-Schwanz-Antikörper K193 genauso gut immunpräzipitiert werden), sondern deren Denaturierung bewirkte. Darüber hinaus ist die angenommene Konformation diese hitzebehandelten Moleküle derart, dass sie nicht mehr länger β2-Microglobulin binden oder bei Zusatz von Peptid und Human-β2-Microglobulien zu Molekülen wiederhergestellt werden können, die von Y3 erkannt werden. Folglich ist die Schlussfolgerung angemessen, dass Klasse-I-Schwerketten Peptide entweder alleine oder wenn sie mit β2-Microglobulin komplexiert sind binden können.

[0205] Die Oberflächenexpression von peptidbeladenem Human-Klasse-I-MHC wird jedoch offenbar am besten unterstützt, indem die Moleküle mit Peptid beladen werden, nachdem die Schwerketten mit β2-Microglobulin komplexiert worden sind.

2. Expression von Human-MHC

[0206] Sobald die Erfinder ermittelt hatten, dass die Thermostabilität eines Klasse-I-Moleküls vom Ursprung des β2-Microglobulins, der Anwesenheit von Peptid und der Länge der Sequenz dieses Peptids abhängt, nützten die Erfinder diese Informationen bei der Erzeugung von Zelllinien, die zur spezifischen Aktivierung von CD8-Zellen über die Expression von peptidbeladenen Human-Klasse-I-MHC-Molekülen fähig sind.

[0207] Thermolabilität scheint eine inhärente Eigenschaft von Klasse-I-Molekülen zu sein; sie hat sich vermutlich entwickelt, um sicherzustellen, dass Klasse-I-Moleküle, die entweder kein Peptid oder ein Peptid mit schlechten Bindungseigenschaften (das wenig Thermostabilität überträgt) enthalten, sich selbst zerstören. Auf diese Weise minimiert die Zelle die Anzahl von leeren Klasse-I-Molekülen an ihrer Oberfläche, da ein solcher Zustand vermutlich gefährlich wäre, da exogen hergeleitete Peptide gebunden und präsentiert werden könnten. Human-Klasse-I-Moleküle (B27 und A2.1), die in Insektenzellen mit Human-β2 exprimiert werden, sind gegen eine verlängerte Inkubation bei 37 °C nicht stabil; auch nicht in der Mutantenzelllinie T2 exprimierte Human-Klasse-I-Moleküle, von denen gezeigt worden ist, dass sie hinsichtlich ihrer Peptidbeladung von Klasse-I-Molekülen defizient sind (Hosken und Bevan, Science 248, 367–70 (1990); Cerundolo et al., Nature 345, 449–452 (1990)). Folglich ist offenbar die Affinität zwischen der Schwerkette und β2-Microglobulin während der gemeinsamen Evolution der Moleküle sorgfältig konserviert worden, so dass leere Klasse-I-Moleküle oder jene, die schlecht bindende Peptide tragen, sich bei der Körpertemperatur des „Wirts"-Organismus selbst zerstören.

[0208] Human-Klasse-I-MHC-Moleküle wurden in Schneiderzellen exprimiert. Human-β2-Microglobulin und HLA A2.2Y, HLA A2.1, HLA B7 oder HLA B27 co-exprimierende Zelllinien wurden unter Anwendung vorher beschriebener Verfahren etabliert. Kurz umschrieben wurden für die obigen Proteine kodierende cDNAs in den Drosophila-Expressionsvektor pRmHa-3 kloniert und mit einem Human-β2-Microglobulin enthaltendem Plasmid und phshsneo-Plasmid über hierin offenbarte Verfahren in Schneiderzellen co-transfiziert. Drei bis vier Wochen später wurde die Population von G418-resistenten Zellen 1:5 mit frischen Selektionsmedien verdünnt.

Sobald die gesunde, wachsende Population von Zellen erhalten wurde, wurde einer Aliquote von Zellen $CuSO_4$ zugesetzt und 24 Stunden später wurden die Zellen über Durchflusszytometrie unter Verwendung eines monoklonalen Antikörpers W6/32 (ATCC HB95, Bethesda, MD) analysiert, der eine monomorphe Determinante von Human-Klasse-I-Schwerketten erkennt, wenn sie mit β2-Microglobulin assoziiert sind. (Siehe Barnstable et al., Cell 14, 9 (1978)). Hohe Oberflächenexpressionslevel von jedem dieser Human-Klasse-I-Moleküle wurden durch den Zusatz von $CuSO_4$ induziert (Daten nicht gezeigt). Diese stabilen Populationen wurden unter Anwendung von Zytofluorometrie wie unten beschrieben auf stark exprimierende Zellen sortiert. Es sind diese sortierten Populationen von Zellen, die für alle nachfolgenden Experimente verwendet wurden.

[0209] Vierundzwanzig Stunden vor der FACS-Analyse wird $CuSO_4$ auf eine Endkonzentration von 1 mM den stabil transfizierten Schneiderzellen zugesetzt (3–4 × 10^6 Zellen/ml), wodurch die Expression aus transfizierten Zellen „eingeschaltet" wird. Die Zellen werden in 24-Napf-Clusterplatten ausplattiert (2 ml je Napf). Acht Stunden vor der FACS-Analyse wird das $CuSO_4$-Medium durch frisches Medium (1 ml) mit oder ohne Peptid in einer Konzentration von 50 µg/ml ersetzt. 37-°C-Temperatur-Expositionen werden durch Übertragen der Platten auf eine flache Oberfläche in einem 37-°C-Raum zu verschiedenen Zeitintervallen vor der Ernte der Zellen für die Analyse durchgeführt.

[0210] Um die Oberflächenexpression von Klasse-I-MHC an Schneiderzellen zu analysieren, werden Aliquoten von Zellen (5 × 10^5) in Röhrchen auf Eis transferiert, durch Zentrifugation (1.000 × g für 4 Minuten) gesammelt, in 3 ml PBS/1 % BSA, 0,02 Natriumazid resuspendiert, durch Zentrifugation gesammelt und in PBS/BSA (0,5 ml) resuspendiert, das den geeigneten Primärantikörper (Aszites-Flüssigkeiten Y3, 28:14:8S, 30.5.7, W6/32, 1:200 verdünnt). Kaninchen-Antisera werden 1:500 verdünnt und B22.293-Hybridom-Überstand wird direkt verwendet. Nach einer Stunde Inkubation auf Eis werden die Zeilen zweimal in 3 ml PBS/BSA gewaschen und in 0,5 ml PBS/BSA resuspendiert, dass FITC-markierten Sekundärantikörper (Cappell, Durham, NC) und 1 mg/ml Propidium-Iodid enthält. Nach einer 30-minütigen Inkubation auf Eis werden die Zellen einmal mit PBS/BSA gewaschen und in diesem Puffer in einer Konzentration von 1 × 10^6/ml resuspendiert. Proben werden dann durch FACS 440 (Becton Dickinson) analysiert. Mit Propidium-Iodid gefärbte, tote Zellen werden durch Einbinden einer Lebendschleuse abgesondert.

[0211] Für die Zellsortierung wird dasselbe, oben umrissene Verfahren verwendet mit der Ausnahme, dass alle Färbevorgänge in einer Sterilwerkbank durchgeführt werden. Lösungen einschließlich Antikörper werden sterilfiltriert und Schneidermedien oder Excell 400 anstelle von PBS/BSA verwendet. Zellen, die den Primärantikörper spezifisch banden, werden mit einem Becton-Dickinson-Zellsortierer sortiert. Sortierte Zellen (2–8 × 10^5) werden einmal in Medium gewaschen, bevor sie in einer Konzentration von 2 × 10^5 Zellen/ml ausplattiert werden.

[0212] Um nachzuweisen, dass die an der Oberfläche der Drosophila-Zellen exprimierten Human-Klasse-I-Moleküle leer waren, wurden die Zellen bei 37 °C für zwei Stunden inkubiert und die Zelloberflächenexpression durch Zytofluorometrie analysiert. Die Oberflächenexpression von HLA B27 sowie A2.1 wird stark herabgesetzt, wenn die Zellen bei 37 °C für 2 Stunden inkubiert werden; die Vorinkubation der Zellen in HIV-Peptiden jedoch, die bekanntermaßen an die Klasse-I-Moleküle binden, bewirkt eine signifikante Thermostabilität der Klasse-I-Moleküle, während nicht bindende Peptide nur. eine geringe Wirkung haben (siehe **Fig.** 5A). Ein 9-Aminosäurenpeptid ILKEPVHGV (Seq.-ID Nr. 31) aus dem POL-Protein von HIV bindet und stabilisiert NLA A2.1. Ein Neun-Aminosäuren-Peptid aus dem Vpr-Protein von HIV bindet und stabilisiert B27 (FRIGCRHSR; Seq.-ID Nr. 30). Diese Daten zeigen, dass die an der Oberfläche von Drosophila-Zellen exprimierten Human-Klasse-I-Moleküle leer sind und durch Bindung spezifischer HIV-Peptide stabilisiert werden können.

[0213] **Fig.** 5A zeigt die peptidinduzierte Thermostabilisierung von HLA B27 und HLA A2.1, exprimiert an der Oberfläche von Drosophila-Zellen, durch HIV-Peptide. Drosophila-Zellen, die entweder HLA B27 oder A2.1 exprimierten, wurden, wo bezeichnet, mit Peptiden inkubiert und dann entweder bei 28 °C gehalten oder bei 37 °C für zwei Stunden inkubiert, und zwar von der Analyse der Oberflächenexpression der Klasse-I-Moleküle durch Anwendung des Antikörpers W6/32 (aus ATCC HB95) und Zytofluorometrie. Die mittlere Fluoreszenz jeder Zellpopulation ist gezeigt und gegen die Inkubationsbedingungen aufgetragen. Das HIV-POL-Peptid (ILKEPVHGV, Seq.-ID Nr. 31) stabilisiert A2.1, nicht jedoch B27, während das HIV-Vpr-Peptid (FRIGCRHSR, Seq.-ID Nr. 30) B27, nicht jedoch A2.1 stabilisiert.

[0214] Fig. 5B erläutert, dass in Drosophila-Zellen exprimiertes HLA A2.2Y die Eigenschaften von leeren Klasse-I-Molekülen in Triton X100-Lysaten aufweist. Radioaktive Triton X100-Lysate, die aus A2.2Y exprimierenden Drosophila-Zellen hergestellt wurden, wurden aliquotiert und mit folgende Peptidzusätzen versetzt: A und B: keine Zusätze; C: ein HIV-GAG-(B)-Peptid KRWIILGLN (Seq.-ID Nr. 29); D: Influenza-Peptid ILGFV-

FTLTV (Seq.-ID Nr. 32); E: Zufalls-8mer-Peptid; F: Zufalls-9mer-Peptid. Aliquote B-F wurden vor Immunpräzipitation mit W6/32 und SDS-PAGE-Analyse bei 37 °C für eine Stunde inkubiert.

[0215] Fig. 5C zeigt, dass in Drosophila-Zellen exprimiertes HLA B7 die Eigenschaften von leeren Klasse-I-Molekülen in Triton X100-Lysaten aufweist. Die Lysate wurden in NLA B7 exprimierenden Drosophila-Zellen wie in Fig. 5B hergestellt. Aliquoten erhielten wie bezeichnet kein Peptid (-P) oder Zufalls-18mer- oder -9mer-Peptid. Die Hälfte der Aliquoten wurde vor der Immunpräzipitation mit W6/32 und SDS-PAGE bei 39 °C für eine Stunde inkubiert.

[0216] In Drosophila-Zellen exprimiertes HLA B7 und A2.2Y erwiesen sich ebenfalls als leer, da sie in Triton TX100-Zelllysaten thermolabil waren (siehe Fig. 5B und Fig. 5C); jedoch konnten sie durch Zugabe von Peptiden zu den Lysaten vor der Temperatur-Exposition stabilisiert werden. Im Speziellen kann ein 10mer, das aus Influenza-Matrix, ILGFVFTLTV (Seq.-ID Nr. 32) (Gotch et al., J. Exp. Med. 168, 2045–57 (1988)), hergeleitet ist, HLA A2.2 stabilisieren, wie es auch ein Zufalls-9mer-Peptid tut, das auch HLA B7 stabilisiert.

[0217] Der Temperatur-Expositionstest von Triton TX100-Lysaten wurde wie vorher für murine Klasse-I beschrieben durchgeführt. Die Schlussfolgerung aus diesen Untersuchungen ist, dass in Drosophila-Zellen exprimierte Human-Klasse-I-Moleküle alle Eigenschaften der in der mutierten Humanzelllinie T2 exprimierten, leeren Moleküle aufweisen (Satter et al., s.o. (1985); Hosken und Bevan, s.o. (1990)).

Beispiel 2

Erzeugung von Peptiden mit optimalen Bindungseigenschaften für Klasse-I-Moleküle

A. Diskussion und Überblick

[0218] Jüngste Daten haben erwiesen, dass Klasse-I-Moleküle Peptide binden, die Konsenssequenzmotive enthalten (siehe Falk et al., Nature 348, 213–6 (1991); Van Bleek und Nathenson, Nature 348, 213–6 (1990)). Folglich scheinen die amino- und carboxyterminalen Reste von Peptiden, die an eine gegebene Form von Klasse-I-Molekülen gebunden sind, auf einige wenige Arten von Aminosäuren beschränkt zu sein, und ein oder mehrere innere Reste müssen möglicherweise spezifische Positionen belegen. Zusätzlich scheint die Gesamtlänge von Klasse-I-gebundenen Peptiden auf 8 oder 9 Aminosäurereste beschränkt zu sein. Falk et al., s.o. (1991); Van Bleek und Nathenson, s.o. (1990). Die Untersuchung der Bindung von Peptiden an das murine K^b-Molekül bestätigt, dass ein Ovalbumin-Peptid, OVA-8 mit der Sequenz SIINFEKL (Seq.-ID Nr. 23, Reste 5–12), das an K^b-Moleküle in vivo bindet, ein optimales Bindungsmotiv enthält und in vitro stark an K^b-Moleküle bindet. Da diese Peptidsequenz im Ovalbuminmolekül von den Sequenzen ... QLE und TEW... flankiert wird, ist es offensichtlich, dass entweder mehrere Proteasen, eine Protease mit sehr breiter Substratspezifität oder ein Enzymkomplex mit mehrfachen proteolytischen Aktivitäten für die Erzeugung des OVA-8-Peptids aus intaktem Ovalbumin verantwortlich sein muss.

[0219] Um zu untersuchen, ob isolierte Proteasomen das optimale Peptid zur Bindung an K^b-Moleküle erzeugen können, war es hilfreich, von der Erkenntnis Gebrauch zu machen, dass „leere" Klasse-I-K^b-Moleküle, d.h. jene ohne gebundenem Peptid, sehr thermolabil sind (Ljunggren et al., s.o. (1990)). Inkubation von „leeren" K^b-Molekülen in Tensid bei 30 °C für eine Stunde macht den β-2M-abhängigen, K^b-spezifischen Antikörper Y3 unfähig, mit dem K^b-Molekül zu reagieren, das β 2M von der Schwerkette rasch dissoziiert. Die Bindung eines geeigneten Peptids, wie z.B. OVA-8 verhindert die Untereinheitendissoziation, was die Bindung von Y3 an den Klasse-I-Komplex erlaubt. Peptide derselben Länge wie OVA-8, die von K^b-Molekülen in vivo nicht präsentiert werden können (z.B. das Peptid SNENMETM (SerAsnGluAsn-MetGluTheMet) (Seq.-ID Nr. 25, Reste 2–9), das an D^b bindet, Townsend et al., Cell 44, 959–968 (1986)) waren unfähig, die hitzeinduzierte Dissoziation der K^b-Klasse-I-Moleküle (siehe **Fig.** 3) zu verhindern. Das Peptid OVA-24 mit der Sequenz EQLESIINFEKL-TEWTSSNVMEER (Seq.-ID Nr. 23) (das die unterstrichen gezeigte Sequenz von OVA-8 umfasst) bindet schwach an K^b-Moleküle. Jedoch war die schwache Bindung von OVA-24 nicht ausreichend, um die Dissoziation des K^b-β-2M-Komplexes bei 30 °C zu verhindern.

[0220] Die verschiedenen verwendeten Antisera wurden wie folgt hergestellt. Antiserum K193 wird erzeugt durch Immunisieren von Kaninchen mit Keyhole-Limpet-Lymphocyanin (Calbiochem, La Jolla, CA), konjugiert an das der COOH-terminalen Sequenz von H-$2K^b$ (LPDCKVMVHDPSLA oder LeuProAspCysLysValMetValHisAspProSerLeuAla) (Seq.-ID Nr. 33) entsprechende synthetische Peptid. Y3-Aszites wird unter Verwendung von Hybridom HB176 (ATCC, Rockville, MD) hergestellt. (Siehe auch Hammering et al., PNAS USA 79, 4737–4741 (1982)). Aszites 28-14-8S wird aus Hybridom HB 27 (ATCC, Rockville, MD) hergestellt. (Siehe

auch Ozato und Sachs, J. Immunol. 126, 317–321 (1980); Myers et al., J. Immunol. 142, 2751–58 (1989)). Aszites 30-5-7 wird aus dem Kulturüberstand aus Hybridom B22.249 hergestellt (siehe Hammerling et al., Immunogenetics 8, 433–445 (1979); Allen et al., Nature 309, 279–81 (1984)). Polyklonale Antisera gegen gereinigtes, murines MHC werden gemäß Kvist et al., Scand. J. Immunol. 7, 265–76 (1978) hergestellt. FITC-markierte Sekundärantikörper (affinitätsgereinigtes Ziege-Anti-Maus- und Ziege-Anti-Kaninchen-IgG) werden von Cappell (Durham, NC) bezogen.

[0221] Unter Verwendung dieses Testsystems wurden biosynthetisch markierte, „leere" K^b-Moleküle aus RMA-S-Zellen, welche keine Peptide auf Klasse-I-Moleküle aufladen können, mit dem β-2M-abhängigen, K^b-spezifischen, monoklonalen Antikörper Y3 inkubiert. An Antikörper gebundene Moleküle wurden durch SDS-PAGE getrennt und durch Autoradiographie sichtbar gemacht. Die SDS-PAGE-Analyse wird wie folgt durchgeführt. Durch Protein A-Sepharose-Beads gesammelte Immunpräzipitate werden fünf Mal mit 1 ml 0,1 % TX100/PBS gewaschen und sofort in SDS-PAGE-Probenpuffer aufgekocht oder, wo angezeigt, nach Verdau der Hälfte der Probe mit Endoglycosidase H (siehe Jackson et al., EMBO J. 9, 3153–31&2 (1990)). Die Proben wurden dann an 10- bis 15%igen Gradienten-SDS-PAGE-Gelen analysiert, die vor der Autoradiographie bei –70 °C mit Kodak XOmat AR-Film (Rochester, NY) mit Amplify (Amersham, Arlington Heights, IL) behandelt werden.

[0222] Die der K^b-Kette entsprechenden Banden wurden durch Densitometrie quantifiziert. Um die Daten zu erzeugen (nicht gezeigt), wurde Lysat, das „leere" Klasse-I-K^b-Moleküle enthielt, mit Peptid und/oder gereinigten Proteasomen inkubiert, bevor es entweder bei 4 °C oder 30 °C für eine Stunde inkubiert wurde. K^b-Moleküle wurden mit dem monoklonalen Antikörper Y3 immunpräzipitiert und durch SDS-PAGE analysiert. „Leere" K^b-Moleküle wurden inkubiert mit OVA-24; Proteasomen alleine; OVA-24 und Proteasomen; OVA-24, Proteasomen und p-Hydroxymercuribenzoat; und OVA-8. „Leeres" K^b enthaltendes Lysat alleine wurde analysiert (Daten nicht gezeigt). Vor der Immunpräzipitation wurden die Proben einer Hitze-Exposition bei 30 °C für eine Stunde unterzogen oder für dieselbe Zeitdauer bei 4 °C gehalten (Daten nicht gezeigt). Das OVA-8-Peptid wurde in einer Endkonzentration von 75 μM und das OVA-24-Peptid in einer Konzentration von 75 μM verwendet.

[0223] Über Nacht bei 4 °C inkubierte K^b-Moleküle dissoziierten fast vollständig, wie durch ihre fehlende Reaktion mit Antiköper beurteilt wurde, konnten jedoch aus demjenigen Inkubationsgemisch, welches das OVA-8-Peptid enthielt, quantitativ wiedergefunden werden.

[0224] Densitometrische Scans der geradzahligen Lanes (nicht gezeigt) erlaubten eine Bestimmung der nach der Hitze-Exposition wiedergefundenen K^b-Menge. Die Daten wurden als Prozentanteile der nach Hitze-Exposition wiedergefundenen Menge von K^b/OVA-8-Komplexen ausgedrückt. Die Mehrzahl der K^b-Moleküle, die mit OVA-8 inkubiert worden sind, blieb nach der 30-°C-Behandlung intakt. Das längere Peptid, OVA-24, war für die Stabilisierung der K^b-Moleküle nicht so effizient wie OVA-8, und im Einklang mit den früheren Daten der Erfinder über die schwache Bindung von OVA-24 blieben nur ungefähr 30 % der K^b-Moleküle nach der Hitzebehandlung erhalten. Wenn Reaktionsgemisch das OVA-24-Peptid und gereinigte Proteasomen enthielt, konnte eine erhöhte Menge von K^b-Molekülen immunpräzipitiert werden und es überlebten ungefähr 80 % der K^b-Moleküle die 30-°C-Exposition. Das die erhöhte Stabilität der K^b-Moleküle auf die/das von OVA-24 hergeleitete(n) Peptid(e) zurückzuführen war, war aus der Tatsache ersichtlich, dass Proteasomen alleine keine Peptide im Lysat erzeugen konnten, welche die Dissoziation des K^b-β-2M-Komplexes verhinderten. Diese Schlussfolgerung wird auch durch die Tatsache unterstützt, dass mit dem Inhibitor p-Hydroxymercuribenzoat behandelte Proteasomen (Rivett, Arch. Bioch. Biophys, 268, 1–8 (1989)) keine Peptide aus OVA-24 erzeugen konnten, welche die K^b-Moleküle bei 30 °C stabilisieren könnten.

[0225] Diese Daten zeigten, dass isolierte Proteasomen Peptid(e) aus schwach K^b-bindendem Vorläufer-Peptid erzeugen konnten, so dass das Klasse-I-Molekül im selben Ausmaß stabilisiert wurde wie durch endogene Peptide. Somit muss/müssen das/die von OVA-24 hergeleiteten Peptid(e) ungefähr 8 Aminosäuren lang gewesen sein und müssen die Sequenz des OVA-8-Peptids umfasst haben. Zusätzlich führten ähnliche Experimente, in denen denaturiertes, reduziertes und alkyliertes Ovalbumin mit Proteasomen inkubiert wurde, ebenfalls zur Wiederfindung von thermostabilen K^b-Molekülen (Daten nicht gezeigt).

B. Verfahren

1. Zellkulturen

[0226] HeLa-Zellen (ATCC Nr. CCL 185) wurden in Dulbecco's modifiziertem Eagle's-Medium (DMEM, Gibco, Grand Island, NY) gezüchtet, das mit 8 % fötalem Kälberserum, 2 mM Glutamin, Penicillin (100 μg/ml) und

Streptomycin (100 µg/ml) ergänzt war. Splenozyten von vier verschiedenen H-2-Haplotypen (H-2^k, ^{s}, ^{d} und ^{q}), RMA-S, T1, T2 und murinen Astrozyten wurden in RMPI 1640-Medium (Gibco, Grand Island, NY) gezüchtet. RMA-S, eine murine, mutierte N-2^b-Lymphomzelllinie (Ljunggren und Karre, J. Exp. Med. 162, 1745–59 (1985); Karre et al., Nature 319, 675–8 (1986)) ist unfähig, endogene Antigene zu präsentieren (Townsend et al., Nature 340, 443–8 (1989); Townsend und Bodmer, Ann. Rev. Immunol. 7, 601–24 (1989)). T1 und T2 sind Abkömmlinge der humanen, mutierten B-Lymphoblasten-Zelllinie LBL 721.174 (0.174), fusioniert an die T-Zellen-Lymphom-CEM (Satter et al., Immunogenetics 21, 235-7 (1985)). T1, das 0.174-CEM-Hybrid, exprimierte hohe Level von 0.174-hergeleitetem Klasse-I-MHC. T2, das wegen dem Verlust beider Kopien des Humanchromosoms 6 gewählt wurde, weist den niedrigen Klasse-I-Expressions-Phänotyp von 0.174 auf (Hosken und Bevan, Science 248, 367–70 (1990)).

2. Metabolische Radiomarkierung, Immunpräzipitation und Densitometrie

[0227] Die metabolische Markierung von Zellen wurde wie in Jackson et al. (EMBO J. 9, 3153–3162 (1990)) beschrieben mit den folgenden Modifizierungen durchgeführt. Wenn nicht anders angegeben, wurden die Zellen mit Interferon Gamma (IFN-Gamma; Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) (2500 U/ml) für 96 Stunden vor dem metabolischen Markieren behandelt. Pulse-Medien enthielten 0,15 mCi/ml L[35S]Methionin-defizientes und Cystein-defizientes DMEM. Die Zellen wurden routinemäßig für 4 Stunden markiert, gefolgt von Chase-Perioden verschiedenen Zeitdauern (bis zu 36 Stunden) in Gegenwart von normalem Kulturmedium. Immunpräzipitation, SDS-PAGE (Blobel und Dobberstein, J. Cell Biol. 67, 835–51 (1975)) und Fluorographie (Bonner und Laskey, Eur. J. Biochem. 46, 83–88 (1974)) wurden wie beschrieben durchgeführt (Jackson et al., EMBO J. 9, 3153–3162 (1990)). Nicht-Äquilibrium-pH-Gradienten-Gelelektrophorese in der ersten Dimension (unter Verwendung von Ampholinen pH 3,5–10) wurde wie in Jones, in: Selected Methods in Cellular Immunology, Mishell und Shigii (Hrsg.), Freeman, San Francisco, S. 398–400 (1980) beschrieben durchgeführt. Um die in Protein eingebaute Radioaktivität zu bestimmen, wurden Bandenintensitäten an den Fluorogrammen durch Scanning-Densitometrie unter Anwendung eines LKB Ultroscan XL (Brouma, Schweden) bestimmt. Die radioaktiven Markenproteine Rinderserumalbumin (67 kD), Ovalbumin (46 kD), Carbonic Anhydrase (30 kD) und Lactoglobulin A (18,4 kD) wurden von New England Nuclear (duPont, Boston, MA) erworben.

[0228] Für die Pulse-Chase-Analyse werden Lysate aus den verschiedenen Zeitpunkten in drei Röhrchen aliquotiert, und zwar in Abhängigkeit von der Anzahl der Antikörper, die zur Analyse des Transports verwendet wurden. Antikörper wird dem Lysat zugesetzt (1 µl Aszitesflüssigkeit Y3, 30.5.7, 28:14:8S; W6/32) oder Antiserum (K193, K270), 100 µl Hybridom-Kulturüberstand (Antikörper B22.293); das Gemisch wird dann vor dem Sammeln des Antikörpers durch Inkubation mit Protein A-Sepharose für 1 Stunde und Zentrifugation für 5 Sekunden in der Mikrozentrifunge für 2–12 Stunden stehengelassen.

3. Antiseren, monoklonaler Antikörper und Peptide

[0229] Kaninchen-Anti-Human- und Anti-Ratten-Proteasom-Seren wurden freundlicherweise von Dr. A. Ichihara bereitgestellt (Tanaka et al. J. Cell Physiol. 139, 34–41 (1986)). Y3-Aszites, ein monoklonaler Antikörper gegen Maus-H2-K^b, wurde durch Verwendung von Hybridom Nr. HB 176 von ATCC hergestellt (Hammerling et al., PNAS USA 79, 4737–4741 (1982)). IFN-Gamma aus humanen T-Lymphozyten wurde von Boehringer Mannheim (Indianapolis, IN) erhalten. Maus-IFN-Gamma wurde von Genentech (South San Francisco, CA) und Amgen Biologicals (Thousand Oaks, CA) erhalten. Peptide wurden durch Festphasen-Techniken an einem Applied Biosystems 430A Peptidsynthesizer synthetisiert und an einer C_{18}-Umkehrphasen-Chromatographiesäule (VyDac) weiter aufgereinigt.

4. Ammoniumsulfat-Fraktionierung von HeLa-Zellhomogenisaten

[0230] Unbehandelte und IFN-Gamma-behandelte, homogenisierte HeLa-Zellen wurden zentrifugiert, um Kerne und Zelltrümmer zu entfernen und die erhaltenen Überstände wurden einer Ammoniumsulfat-Fraktionierung wie beschrieben (Rivett, J. Biol. Chem. 260, 12600–12612 (1985)) unterworfen. Im Überstand enthaltene 26S-Proteasomkomplexe wurden mit Ammoniumsulfat bei 38 % Sättigung selektiv präzipitiert, während die im Überstand vorhandenen 19S-Proteasomkomplexe nach der 38 %-Fraktionierung bei 60 % Ammoniumsulfat präzipitiert wurden (Waxman et al., J. Biol. Chem. 262, 2451–57 (1987)).

5. Fraktionierung von Microsomen und Zytosol

[0231] Unbehandelte und IFN-Gamma-behandelte HeLa-Zellen wurden für 4 Stunden markiert, homogenisiert und einer differenziellen Zentrifugation unterworfen. Die Homogenisate wurden zunächst bei 15.000

U/min für 30 Minuten zentrifugiert, um Kerne und Zelltrümmer zu entfernen. Die erhaltenen Überstände wurden dann bei 100.000 × g für 30 Minuten zentrifugiert, um Microsomen zu pelletieren. Die in den Überstandfraktionen (zytosolische Fraktionen) und Pellets (microsomale Rohfraktion) enthaltenen Proteasomen wurden gesondert immunpräzipitiert und durch zweidimensionale Gelelektrophorese analysiert.

6. Reinigung von Proteasomen

[0232] Proteasomen wurden aus frischer Rinderleber unter Anwendung einer Modifizierung des von Skilton et al., (1991) beschriebenen Verfahrens gereinigt. Kurz umschrieben wurde frische Rinderleber in 10 mM Tris-HCl (pH 7,2), 50 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM DTT und 20 % Glycerin (v/v) („Puffer A") gereinigt. Das Homogenisat wurde bei 105.000 × g für eine Stunde zentrifugiert. Der Überstand wurde zunächst mit Ammoniumsulfat auf 38 % Sättigung behandelt, um die großen Proteinaggregate sowie die 26S-Form des Proteasoms zu entfernen (Waxman et al., J. Biol. Chem. 262, 2451–57 (1987)). Der verbleibende Überstand wurde dann mit Ammoniumsulfat auf 60 % Sättigung behandelt, um die 19S-Form des Proteasoms selektiv zu präzipitieren. Das Pellet wurde in einem kleinen Volumen Puffer A resuspendiert. Die resuspendierte 60 %-Ammoniumsulfat-Fraktion wurde drei aufeinander folgenden Chromatographieschritten unterworfen: DEAE-Sepharose, Anionenaustauschchromatographie an Mono Q 10/10 und schließlich Gelfiltration an einer Superose 6-Säule. Nach jedem Chromatographieschritt wurden Proteasom enthaltende Fraktionen durch SDS-PAGE und durch Analyse von Peptidaseaktivität wie in Hough et al., J. Biol. Chem. 262, 8303–8313 (1987) beschrieben identifiziert. Die verwendeten Peptidsubstrate waren: N-Succinyl-ala-ala-phe-MCA, N-Succinyl-leu-leu-val-tyr-MCA und t-Butoxycarbonyl-phe-ser-arg-MCA.

7. Peptidbindungstest

[0233] „Leere" Klasse-I-K^b-Moleküle enthaltendes Lysat von RMA-S-Zellen wurden unter Anwendung eines modifizierten Verfahrens (Ljunggren et al., Nature 346, 476–80 (1990)) hergestellt. Kurz umschrieben wurden RMA-S-Zellen in RMPI 1640 bei 26 °C für 8 Stunden kultiviert. Die Zellen wurden dann einmal in PBS gespült und wiederum bei 26 °C für 16 Stunden in Medium inkubiert, das 0,25 mCi/ml L-[^{35}S]Methionin und 0,25 mCi/ml L-[^{35}S]Cystein in Methinonin-defizientem und Cytein-defizientem RMPI **1640** und normalem RMPI 1640-Medium im Verhältnis von 10:1 enthielt. Die Zellen wurden in PBS gespült und wie oben beschrieben lysiert. „Leere" Klasse-I-K^b-Moleküle enthaltendes Lysat wurde dann mit Peptiden und/oder gereinigten Proteasomen bei 26 °C für 1 Stunde inkubiert, bevor es der Inkubation bei 30 °C für eine weitere Stunde unterworfen wurde. Dieses Gemisch wurde dann der Immunpräzipitation mit monoklonalem Antikörper Y3 unterworfen und durch SDS-PAGE analysiert.

Beispiel 3

Induktion zytotoxischer Effektoren in vitro

A. Osmotische Beladung

[0234] Die osmotische Beladung von SC2- und 3T3-Zellen mit Ovalbumin-Protein wurde wie von Moore et al. Cell 54, 777–785 (1988) beschrieben durchgeführt. Das Testverfahren ist wie folgt: In einer 96-Napf-Platte werden 1 × 10^5 Drosophila-Zellen (mit oder ohne Peptid/Protein-Beladung) oder 3T3 Zellen gemeinsam mit 1 × 10^5 B3/CD8-T-Zellen-Hybridomzellen in 200 µl RMPI-Medien kultiviert, die mit 10 % fötalem Kälberserum ergänzt waren. Nach 24 Stunden Inkubation wurden 100 µl des Überstands aus diesen Kulturen zu 100 µl PMPI zugegeben, das 5.000 CTLL-Zellen enthielt. Die Zellen wurden gemeinsam für 24 Stunden bei 37 °C kultiviert, worauf 1 µCi ^{3}H-Thymidin (Amersham) zugesetzt wurden. Nach weiteren 15 Stunden Inkubation bei 37 °C wurde der Einbau von Radiomarkierung in die CTLL-Zellen durch Szintillationszählung bestimmt.

[0235] Mit murinem MHC durchgeführte Tests verifizierten ebenfalls, dass die Insektenzellen zur Beladung von Klasse-I-Molekülen mit Peptid fähig sind. Zellen, die nicht mehr als 200–500, ein bestimmtes Antigen enthaltende MHC-Moleküle exprimieren, können durch eine T-Zelle detektiert werden. Da die Drosophila-Zellen kein Chrom akkumulieren, wurde ein Test angewendet, der auf B3/CD8, einem T-Zellen-Hybridom, basierte. B3/CD8 ist ein Hybridom zwischen B3, einer zytotoxischen T-Zelle, die für das durch H-2K^b-Klasse-I-Moleküle präsentierte Ovalbumin-Peptid 253–276 spezifische ist, und der CD8-tragenden und IL-2-sekretierenden Zelllinie (siehe Carbone et al., s.o. (1989)). Bei antigener Stimulation produziert B3/CD8 IL-2, gemessen durch ^{3}H-Thymidin-Inkorporation in die IL-2-abhängige Zelllinie CTLL (Gillis et al., J. Immunol. 120, 2027 (1978)). Folglich kann man durch Messen der produzierten IL-2-Menge auf T-Zellen-Erkennung testen.

[0236] Um einen intrazellulären Pool von Ovalbumin bereitzustellen, aus dem OVA-Peptide hergeleitet werden können, wurden Zellen wie von Moore et al., s.o. (1988) beschrieben osmotisch mit Ovalbumin (Sigma Chem. Co., MO) beladen. Unmittelbar nach der Beladung wurden die Zellen mit dem T-Zellen-Hybridom gemischt. Nach Inkubation für zwei Tage wurde das Medium entfernt und auf IL-2 getestet. Die IL-2-Menge wurde durch die Fähigkeit des Mediums bestimmt, das Wachstum der IL-2-abhängigen Zelllinie CTLL zu fördern (Gillis et al., s.o. (1978) und das Wachstum wurde durch die in die Zellen eingebaute Radioaktivitätsmenge quantifiziert. Es ist aus **Fig. 4** ersichtlich, dass die T-Zellen gut auf die Drosophila-Zellen reagierten, wenn das Ovalbumin-Peptid dem Kulturmedium zugesetzt wurde, jedoch trat keine Erkennung auf, wenn die Zellen mit dem Ovalbumin-Protein beladen wurden. Die an der Oberfläche der Insektenzelle exprimierten MHC-Klasse-I-Moleküle sind in der Weise vollkommen funktionstüchtig, dass sie Peptid binden können, wenn es dem Kulturmedium zugesetzt wird und es in der richtigen Umgebung präsentieren, um durch eine T-Zelle erkannt zu werden.

B. Optimierung der In-vitro-Bedingungen

[0237] Für die Optimierung der In-vitro-Bedingungen zur Erzeugung spezifischer zytotoxischer T-Zellen wird die Kultur der Drosophila-Zellstimulatorzellen vorzugsweise in serumfreiem Medium gehalten (z.B. Excell 400). Drosophila-Zellstimulatorzellen werden vorzugsweise mit > 20 µg/ml Peptid inkubiert. Das Effektor:Stimulator-Verhältnis (Lymphozyten:Drosophila-Zellen-Verhältnis) liegt vorzugsweise im Bereich von ungefähr 30:1 bis 300:1. Das Maximum von spezifischem CD8 wird im Allgemeinen nach fünf Tagen Kultur beobachtet. Die Kultur der Target-Zellen für den Abtötungstest wird vorzugsweise in einem serumfreien Medium gehalten.

C. ^{51}Cr-Freisetzungs-zytotoxischer-Test

[0238] Zellvermittelte zytotoxische Aktivität wurde mit einem Cr^{51}- oder Freisetzungstest detektiert. Der Prozentanteil spezifischer Lyse von 10^4 ^{51}Cr-markierten Target-Zellen in 200 µl wurde für verschiedene Verhältnisse von Lymphozyten zu Target-Zellen und Dosisantwortkurven für jede Lymphozyten-Population durch Auftragen der spezifischen Zytotoxizität gegen log 10 der lebensfähigen Effektor-Anzahl bestimmt. Spontane ^{51}Cr-Freisetzungswerte variierten zwischen 5 % und 15 % des insgesamt inkorporierten Markers. Der Prozentanteil spezifischer ^{51}Cr-Freisetzung wurde gemäß der folgenden Formel berechnet: (ER-MR) (MR-SR) × 100, wobei ER die experimentell beobachtete ^{51}Cr-Freisetzung, SR die durch Inkubation der Target-Zellen in Kulturmedium alleine detektierte, spontane Freisetzung und MR das Maximum der aus den Target-Zellen nach Inkubation in 200 µl in HCl für die Testdauer freigesetzten Radioaktivität ist.

D. Induktion von zytotoxischen Effektoren durch primäre In-vitro-Stimulation mit Drosophila-Zellen, die murine Klasse-I-Peptide exprimieren

[0239] Peptid-OVA, NP (Influenza) und NP (LcMV) wurden als Peptidquelle verwendet, um ihre Fähigkeit zu ermitteln, eine primäre In-vitro-CD8-Reaktion zu erzeugen. (Siehe **Fig. 6A** und B.) Eine fünftägige Inkubation von Milzzellen aus immunisierten C57BL/6- und Balb/c-Mäusen mit den jeweiligen Drosophila-Zellen, die H2-K^b + Antigen und H2-L^d + Antigen exprimierten, erzeugte Effektoren, die den Tumor EL4 und P815 in Gegenwart von Peptiden wirksam lysierten.

[0240] P815 (ATCC T1B 64) (H-2^d) ist ein Mastocytom aus DBA/2-Mäusen. EL4 (ATCC T1 B 39) ist ein Thymom aus C57BL/6 (H-2^b). EL4 wird mit OVA-cDNA in einem Plasmidkonstrukt mit dem humanen β-Actin-Promotor transfiziert, um die OVA-Produktionszelllinie EL4-OVA herzuleiten. Diese Tumoren werden als stationäre Suspensionskulturen in PMPI 1640 gehalten, das mit 10 % fötalem Rinderserum FBS ergänzt ist (siehe Moore et al., Cell 54, 777–785 (1988)). Jurkat (ATCC CRL 8163) ist eine HLA B7 exprimierende Humanzelllinie. Jurkat A2 ist eine transfizierte Zelllinie, hergestellt durch Transfektion von Jurkat-Zellen mit HLA A2-1, z.B. über hierin offenbarte Verfahren. (Siehe auch Irwin et al., J. Exp. Med. 170, 1091–1101 (1989)).

[0241] Synthetische Peptide können durch endogen synthetisierte Virusproteine während der CD8-Erkennung ersetzt werden. Das erzeugte, spezifische CD8 konnte endogen synthetisierte, durch Klasse-I an der Oberfläche von EL4 (transfiziert mit einer Ovalbumin-cDNA) präsentierte Peptide erkennen. (Siehe Moore et al., Cell 54, 777–785 (1988)). Auf ähnliche Weise erkannte das in vitro gegen das mit Influenza-NP-Peptid beladene D^b erzeugte CD8 mit Influenzavirusstamm A/PR/8 infizierte EL4-Target-Zellen (siehe **Fig. 7**) (Siehe Carbone et al., J. Exp. Med. 167, 1767–1799 (1988); Stamm A/PR/8 ist auch von der American Type Culture Collection erhältlich und hat die Zugangsnummer ATCC VR-95).

E. Charakterisierung von Antipeptid-zytotoxischen-Zellen

[0242] Um zu ermitteln, ob die peptidspezifische Erkennung tatsächlich auf T-Zellenaktivität zurückzuführen war, wurden diese Linien mit Anti-CD8 (OKT8, ATCC-Nr. CRL 8014) oder Anti-CD4 (OKT4, ATCC-Nr. CRL 8002) und/oder Komplement vor ihrer Zugabe zur Testkultur behandelt. Nur Anti-CD8-Behandlung hob die Zytotoxizität auf.

[0243] Diese spezifischen CD8 wurden an 3T3/D^b- und 3T3/K^b-Zellen getestet, die durch Transfektion von BALB-3T3- (ATCC, CLL 163) Zellen entweder mit D^b bzw. K^b hergestellt wurden. (Andere, leicht erhältliche 3T3-Kulturen sind ebenfalls zur Anwendung erhältlich, einschließlich ATCC CCL 163.2.). Vorzugsweise werden stabile Transfektanten über Co-Transfektion von 3T3 durch pCMU/K^b oder pCMU/D^b und pSV2neo hergestellt und mit G418 selektiert. (Siehe auch Joly und Oldstone, s.o. (1991)). Die Anti-OVA-CD8-Reaktion war D^b- oder K^b-beschränkt, was bestätigt, dass diese Aktivitäten eine klassische Klasse-I-Beschränkung zeigen.

[0244] Die Möglichkeit, CD8 durch Peptidstimulation auszulösen, bietet eine relativ einfache Technik, mit der Klasse-I-beschränkte Erkennung untersucht werden kann. Da T-Zellen eher für denaturierte als für natürliche Formen oder fremde Antigene spezifisch sind, stellen Peptide zweifellos ein potentielles Mittel der wirksamen Vakzination dar.

F. Erzeugung spezifischer CD8-Zellen

[0245] Drosophila-Zellpeptid-Klasse-I-Komplexe wurden mit 0,001 % Glutaraldehyd fixiert und dann gewaschen und als Stimulatoren in Lymphozyten-Co-Kultur verwendet. Eine sehr schwache Zytotoxizität wurde nach 5 Tagen Co-Kultur detektiert, was bestätigt, dass lebende (d.h. unfixierte) Drosophila-Zellen zur Erzeugung spezifischer CD8 überlegen sind. Zugabe von 10 % Drosophila-Kulturüberstand zu den fixierten Zellen stellt die Erzeugung spezifischer CD8 wieder her. (Siehe **Fig. 8A** und B.)

[0246] Die syngenetischen Klasse-I-Antigene exprimierenden, kultivierten Zellen, die CD8 in Primärkultur für gewöhnlich nicht aktivierten konnten, waren nach Zugabe von Drosophila-Kulturüberstand fähig, spezifische CD8 zu erzeugen.

[0247] Entfernung von CD4+ und Klasse-II+-Zellen aus dieser Antwortpopulation erniedrigt die mit auf Drosophila-Zellen aufgeladenem Peptid erzeugte CD8-Aktivität. Folglich scheint die durch peptidbeladene Drosophila-Zellen induzierte Primärreaktion CD4+-Zellen- und Klasse-II-abhängig zu sein.

Beispiel 4

In-vivo-Wirksamkeit der Behandlung

A. Abstoßung von Tumoren

[0248] Unter Anwendung hierin offenbarter Verfahren ist es nunmehr möglich, Target-Zellen im Menschen spezifisch abzutöten, indem spezifische CD8-Zellen verwendet werden, die durch die Verfahren der vorliegenden Erfindung aktiviert wurden. Im Wesentlichen umfasst das Behandlungsverfahren die folgenden Schritte: (1) Erlangung einer flüssigen Probe, die T-Zellen eines zu behandelnden Individuums enthält; (2) Beladen leerer Klasse-I-MHC-Moleküle mit zumindest einer Spezies antigenen Peptids, worin das Peptid im Wesentlichen homolog zu zumindest einem Teil eines von der Target-Zelle hergeleiteten Peptids ist, (3) Mischen der T-Zellen in vitro mit einer Menge von peptidbeladenen Klasse-I-MHC-Molekülen, die ausreichend ist, um aktivierte CD8-Zellen zu produzieren; (4) Ernten der aktivierten CD8-vierte CD8-Zellen zu produzieren; (4) Ernten der aktivierten CD8-Zellen aus der Kultur; und (5) Verabreichen der aktivierten CD8-Zellen an das zu behandelnde Individuum.

[0249] Dieses Verfahren zeigt bereits vielversprechende Ergebnisse in einem Mausmodell. Beispielsweise wurden in einer Studie weibliche C57BL/6-Mäuse (ungefähr 6–8 Wochen alt) subkutan mit drei Millionen (3MM) EL4/OVA-Tumorzellen knapp hinter den Ohren injiziert. Die Tumorzellen wurden durch eine einzige Passage in C57BL/6-Mäusen tumorigen gemacht. Am Tag der subkutanen Inokulation mit EL4/OVA-Tumorzellen wurden die Mäuse mit Drosophila/K^b/OVA-stimulierten CD8-Zellen entweder neben der (proximal zur) Tumorinjektionsstelle oder intravenös injiziert.

[0250] Am Tag 8 wurden die Tumorabmessungen gemessen. Die fünf Kontrollmäuse, die nur die 3MM Tu-

morzellen erhielten, wiesen Tumore der Größe 12 mm 12 mm auf. Drei Mäuse, die Tumorzellen und 24MM CD8-Zellen IV injiziert erhielten, wurden untersucht; die Tumorabmessungen in diesen Mäusen waren (a) 2 mm × 2 mm, (b) 5 mm × 5 mm und (c) 12 mm × 12 mm. Fünf Mäuse, die Tumorzellen und 24MM CD8-Zellen neben der Tumorinjektionsstelle erhielten, wurden untersucht. Die Ergebnisse waren wir folgt: (i) drei Mäuse hatten keine detektierbaren Tumore am Tag 8; (ii) drei Mäuse hatten einen Tumor der Größe 1 mm × 1 mm; und (iii) eine Maus hatten einen Tumor der Größe 5 mm × 5 mm.

[0251] Am Tag 11 wurden folgende Tumorgrößen ermittelt:

Gruppe	Anzahl der Mäuse	Tumorgröße
Kontrolle	3	15 mm x 12 mm
"	2	20 mm x 12 mm
3MM Tumor+24MM CD8 IV	1	5 mm x 5 mm
"	1	10 mm x 5 mm
"	1	13 mm x 8 mm
3MM Tumor+24MM CD8 IP	2	KEIN TUMOR
"	1	0,5 mm x 1,0 mm
"	1	1 mm x 1 mm
"	1	1,5 mm x 1,5 mm

[0252] In einem anschließenden Experiment wurde das Volumen der Tumoren in Mäusen gemessen, nachdem verschiedene Regime angewendet worden sind. Den Mäusen wurden drei Millionen (3MM) EL4/OVA-Tumorzellen wie oben beschrieben injiziert. Am Tag der subkutanen Inokulation mit EL4/OVA-Tumorzellen wurde den Mäusen Drosophila/K^b/OVA-stimulierte CD8-Zellen entweder intraperitoneal, subkutan oder intravenös wie in untenstehender Tabelle 2 beschrieben vorinjiziert. Das Tumorvolumen wurde an den Tagen 6, 8, 10, 12 und 20 nach der Injektion gemessen. Fünf Mäuse wurden in jede Experimental- und Kontrollgruppe aufgenommen. Die Ergebnisse sind in untenstehender Tabelle 2 dargelegt.

Tabelle 2

Maus	Anzahl CD8/ Verfahren	gemessenes Tumorvolumen, Tag 6	8	10	12	20
1	30MM,IP	0	0	0	0	0
2	"	0	0	0	0	0
3	"	0	0	0	0	0
4	"	0	0	0	0	0
5	"	0	1	2	1	0
1	30MM,IV	0	0	0	0	0
2	"	0	0	0	0	0
3	"	0	0	0	0	0
4	"	0	2	3	2	0
5	"	2	3.5	5	3	0
1	15MM,IV	0	0	0	0	0
2	"	0	0	0	0	0
3	"	5	8	13	20	+*
4	"	5	10	20	25	+
5	"	6	14	25	35	+
1	30MM,SC	0	0	0	0	0
2	"	0	0	0	0	0
3	"	0	0	0	0	0
4	"	2	4	5	2	0
5	"	2	7	10	3	0
1	K^b/OVA ,alleine	0	0	0	0	0
2	"	0	0	0	0	0
3	"	0	6	12	5	10
4	"	3	8	18	10	20
5	"	2	10	20	20	30
1	Kontrolle	3	10	20	>50	+
2	"	4	18	30	>50	+
3	"	6	18	30	>50	+
4	"	7	24	35	>50	+
5	"	7	24	40	>50	+

IP = intraperitoneal; IV = intravenös; SC = subkutan; * = Messung schwierig aufgrund der Größe oder aber des Todes des Tieres

B. Behandlung von Influenza

[0253] Influenza-spezifische CD8-Populationen können beispielsweise gemäß den hierin offenbarten Verfahren erzeugt werden und erweisen sich als wirksam beim Schutz von Individuen gegen letale Influenzainfektion. Das vom In-vitro-Peptidpriming hergeleitete, virusreaktive CD8 ist in der Lage, in vivo Schutz zu liefern, und legt nahe, dass sich die primäre In-vitro-CD8-Stimuation bei der Konstruktion einer breiten Vielfalt von antiviralen und antiretroviralen Vakzinen als zweckdienlich erweisen könnte.

C. In-vivo-Priming von Mäusen mit Klasse-I-transfizierten Drosophila-Zellen

[0254] Die intraperitoneale (IP) Injektion von 50 × 10^6 Drosophila-Zellen führte zur Induktion spezifischer CD8. Die Detektion dieses Primings wurde durch Anwendung der Grenzverdünnungsanalyse durchgeführt. Die Häufigkeit der für OVA spezifischen CD8 betrug ungefähr 10^6 in ? naive Mäusen. Nach Injektion der mit Peptid beschichteten Drosophila-Zellen beträgt die Häufigkeit ungefähr 10^3 (Daten nicht gezeigt).

[0255] **Fig.** 8 (A und B) stellt In-vivo-Priming mit transfizierten Drosophila-Zellen dar, worin die Antwortzellen C57-B1/6-Maus-Splenozyten sind. In **Fig. 8A** sind einige der Zellen fixiert; in **Fig. 8B** sind die Drosophila-Zellen alle unfixiert.

[0256] Für eine sekundäre CD8-Reaktion wurden C57BL/6-Mäuse durch eine Injektion von Drosophila-Zellen IP (5 × 10^7) geprimt und 5–15 Tage nach der Immunisierung getestet. (Siehe **Fig. 8B**.) Die Induktion von aktiviertem CD8 in vivo stimuliert offenbar die Abstoßung von Tumoren.

[0257] In einem weiteren Experiment wurde C57BL/6-Mäuse subkutan 3MM ELA4-OVA injiziert. Fünf Tage später erhielten Gruppe-I-Mäuse eine subkutane Injektion von 50MM lebenden, K^b/OVA exprimierenden Drosophila-Zellen; Gruppe II-Mäuse erhielten eine subkutane Injektion von 50MM fixierten Drosophila-Zellen mit K^b/OVA; Gruppe-III-Mäuse waren die Kontrollgruppe und erhielten keine zusätzliche Injektion am Tag 5.

[0258] Die Ergebnisse des Experiments sind in **Fig. 9** dargestellt, die zeigt, dass die Gruppe-I-Mäuse am längsten überlebten und in größerer Zahl überlebten.

[0259] Primär-CD8 wurde durch peptidbeladene Klasse-I in Drosophila-Zellen in ungeprimten B6-Mäusen induziert. CD8-Zellen wurden einmal in vitro mit Drosophila-Zellen stimuliert, die für 36 Stunden bei 22 °C mit verschiedenen Konzentrationen von Oval-Peptiden inkubiert worden waren. Die letzliche Minimalmenge des Peptids beträgt ungefähr 20 µg/ml. Die Effektoren wurden gesammelt und an RMA-S-Zellen mit 50 µg Peptiden getestet. CD8-Zellpopulationen waren fähig, RMA-S-OVA-8 zu erkennen. (Siehe **Fig. 6A** und B.)

[0260] In einem weiteren Experiment wurde Ovalbumin-Protein mit Endoproteinase Glu-C (aus Staph. aureus; Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) abgebaut. Das Gemisch wurde einer Drosophila-Zellkultur mit murinem MHC zugesetzt. Nach ungefähr 5 Tagen wurden CD8-Zellen den Effektoren exponiert; eine Anzahl von CD8-Zellen war dazu fähig, RMA-S-OVA-8 zu erkennen.

D. Peptid-Titration am Target-Zell-Level

[0261] Neuliche Studien haben erwiesen, dass Peptide einer Länge von 9 Aminosäuren als untergeordnete Spezies in Präparaten synthetischer Peptide vorhanden sind. Diese Peptide einer Länge von mehr als 9 Aminosäuren binden mit niedriger Affinität an das H-2K^b-Klasse-I-MHC-Molekül. Peptid-Titrationsexperimente zeigten, dass eine 50fach niedrigere Konzentration eines 9mer-Peptids als die eines 16mer-Peptids für die Induktion der T-Zellenreaktion ausreicht. Dieselbe Peptid-Titration wurde zur Sensibilisierung von Target-Zellen durchgeführt. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Sensibilisierung von Target-Zellen mit einer ungefähr 1000fach niedrigeren Konzentration erzielt werden kann, als sie für In-vitro-Reaktionsinduktion erforderlich ist.

E. Erzeugung von CD8 in transgenen Mäusen

[0262] In dieser Studie wurden HLA A2.1, HLA B7 und HLA B27 exprimierende, transgene Mäuse verwendet. Die Splenozyten der Mäuse wurden mit Drosophila-Zellen kultiviert, die das syngenetische HLA (A2.1, B7 bzw. B27) exprimierten. Spezifische CD8-Reaktionen wurden gegen drei HIV-Peptide erzeugt. (Siehe **Fig. 10A**, B und C.) Inzucht-Mäuse G57BL/6y ($H2^b$) und Balb/c-($H2^d$-)Mäuse sowie verschiedene transgene Mäuse werden in diesen Studien verwendet. Transgene Mäuse umfassten das Folgende. Transgene B7-Mäuse werden im Labor wie folgt produziert. Kurz umschrieben wird ein genomischer HLA-B7-Klon (einschließlich mehrerer hundert Basenpaare von 5'- und 3'-flankierenden Regionen) in B6-X-SJL-Mausembryos (Scripps Research Institute Transgenic Facility, La Jolla, CA) injiziert. Die transgene B7-Linie ist zu C57BL/6 ($H2^b$) rückgekreuzt worden (Scripps Research Institute Transgenic Facility, La Jolla, CA). Transgene B27-Mäuse können gemäß bekannten Verfahren hergestellt werden; die der Erfinder wurden durch Injektion von genomischen Klonen in B6-X-SJL-Embryos und Rückkreuzung derselben zu C57BL/6 hergestellt (Scripps Research Institute Transgenic Facility, La Jolla, CA). (Siehe auch Krimpenfort et al., EMBO J. 6(8), 1673 (1987) zu einem weiteren Verfahren der Erzeugung transgener B27-Mäuse). β2-Microglobulin-transgene Mäuse und transgene A2-1-Mäuse werden auf ähnliche Weise unter Anwendung bekannter Verfahren hergestellt (siehe z.B. Irwin et al., J. Exp.

Med. 170, 1091–1101 (1989)).

F. Erzeugung von spezifischen HIV-CD8 in Menschen

[0263] PBL aus seronegativen Spendern wurden auf ihre Fähigkeit hin getestet, gegen zwei NIV-Peptide spezifische CD8 zu erzeugen. Diese Spender sind HLA A2, HLA B7 oder HLA B27. Nach 5 Tagen Kultivierung konnte in der Kultur eine sehr starke CD8-Aktivität gegen beide HIV-Peptide detektiert werden. (Siehe **Fig. 11A**, B und C.) Human-PBL werden durch Ficoll-Hypaque-Gradientenzentrifugation isoliert (Pharmacia, Piscataway, NJ). PBL-Lymphoblasten werden nach Einfrieren in 10 % DMSO enthaltendem FBS in Flüssigstickstoff gelagert. Die Lebensfähigkeit der Zellen und Lymphozytenfunktionen werden erhalten.

[0264] Peptidspezifische CD8-Zellen werden in syngenetischer Primärkultur mit Drosophila-Zellen erzeugt, die den syngenetischen Peptid-Klasse-I-Komplex exprimieren. Diese Kulturen werden mit 3×10^7 reagierenden Milzzellen aus Maus- oder Human-PBL und lebenden Drosophila-Zellen in 20 ml RMPI 1640-Kulturmedium, das mit $5 \cdot 10^{-5}$ M β-Mercaptoethanol und 5 % FBS enthielt, in einer 25 cm^2-Flasche bei 37 °C in 7 % CO_2 etabliert. CD8-Zellen werden nach 5 Tagen in Kultur geerntet.

[0265] In einem weiteren Experiment wurden Human-PBL geerntet und über einen Zeitraum von 5 Tagen mit Drosophila-Zellen stimuliert, die Human-HLA A2.1 exprimierten und mit HIV-POL-Peptid beladen waren. Die stimulierten PBL wurden dann an mit HIV infizierten Jurkat A2.1-Zellen getestet. Die Ergebnisse des Experiments sind in **Fig. 12** dargestellt. Human-PBL stimulierten in vitro und waren eindeutig in der Lage, A2.1-POL an infizierten Zellen zu erkennen und diese Zellen abzutöten.

Beispiel 5

Therapeutische Anwendungen

A. Klasse-I-Molekül-Bank

[0266] Ein Reservoir oder eine „Bank" von Drosophila-Zelllinien kann etabliert und gehalten werden; wobei jede Zelllinie eines der 50 bis 100 häufigsten Klasse-I-Moleküle exprimiert. Für diese Proteine kodierende cDNAs können auf Basis von HLA-Varianten, die aus Zelllinien erhalten wurden, welche dieselben enthalten, z.B. über die Polymerasekettenreaktion (siehe Ennis et al., PNAS USA 87, 2833–7 (1990)) kloniert und in einen geeigneten Vektor, wie z.B. einen Insektenexpressionsvektor insertiert werden, um Zelllinien zu erzeugen, die jede HLA-Variante exprimieren. Testen gemäß dem folgenden Protokoll kann beispielsweise kann angewendet werden, um zu ermitteln, welche von Virus der Wahl hergeleiteten Peptide am besten an die verschiedenen Klasse-I-Moleküle binden. Die verschiedenen Kulturen können in geeigneter Weise markiert oder katalogisiert werden, um zu bezeichnen, welche Klasse-I-Moleküle sich zur Verwendung mit bestimmten Peptiden am besten eignen. Alternativ dazu können vorübergehende Kulturen wie benötigt etabliert werden. Wie hierin diskutiert, ist nach ungefähr 48-stündiger Inkubation einer Kultur von Insektenzellen mit einem Vektor diese Kultur offenbar in der Lage, leere MHC-Moleküle zu exprimieren, die mit dem/den Peptid(en) der Wahl zum Zwecke der Aktivierung von CD8-Zellen beladen werden können.

B. Herstellung von speziellen" Zelllinien

[0267] Nach der HLA-Typisierung können, wenn die bevorzugten HLA exprimierende Drosophila-Zellen nicht verfügbar sind, die für bevorzugte HLA kodierenden cDNAs über die Anwendung der Polymerasekettenreaktion kloniert werden. Die in obigem Abschnitt B.1. offenbarten Primer (Seq.-ID Nr. 1 bis Seq.-ID Nr. 12) können verwendet werden, um die geeigneten HLA-A-, -B-, -C-, -E-, -F- oder -G-cDNAs in gesonderten Reaktionen zu amplifizieren, die dann wie in den in obigem Beispiel 1, Abschnitt 1 oben offenbarten Verfahren beschrieben kloniert und sequenziert werden können. Die DNA wird dann unter Verwendung eines Gene Clean-Sets (Bio 101, San Francisco, CA) aus der PCR-Reaktion gereinigt und direkt in die Sma-I-Stell von pRmHa-3 kloniert. Die einzelnen Klone werden isoliert, die Sequenzen verifiziert und stabile, HLA exprimierende Drosophila-Zelllinien etabliert. Alternativ dazu kann eine Massenpopulation von rekombinanten Plasmiden in großem Maßstab gezüchtet und DNA durch Cäsiumchlorid-Gradienten gereinigt werden. Die gereinigte DNA wird dann verwendet, um Schneiderzellen unter Anwendung von Calciumphosphatpräzipitationstechniken zu transfizieren. Nach 24 Stunden wird das Präzipitat von den Zellen abgewaschen und mit frischen Schneidermedien, die 1 mM $CuSO_4$ enthalten, ersetzt. Achtundvierzig Stunden später wird die Massenpopulation von vorübergehend transfizierten Zellen für die In-vitro-Aktivierung von CD8 nach Inkubation mit syngenetischen Peptiden oder Peptidverdauen spezifischer Proteine verwendet.

[0268] Die klonierten HLA exprimierende, stabile Zelllinien können dann in Drosophila-Zellen etabliert werden. Alternativ dazu kann eine Population von Insektenzellen, die eine Massenpopulation von klonierten, rekombinanten Molekülen aus der PCR-Reaktion vorübergehend exprimieren, für die CD8-Aktivierung in vitro verwendet werden.

[0269] Es ist ferner möglich, Haplotyp-spezifische CD8 in vitro unter Verwendung von Klasse-I-MHC exprimierenden Insektenzellen, inkubiert mit Peptiden zu aktivieren, wo das Zelllinien-exprimierte MHC nicht das in vivo exprimierte Element ist. Dies stellt eine einzigartige Gelegenheit bereit, CD8-Zellen zu proliferieren, die ein mit einem bestimmten MHC assoziiertes, spezifisches Antigen erkennen, was in vivo wegen allelischer Einschränkung nicht möglich wäre. Beispielsweise ist ein Peptid (NP) aus dem Kernprotein des Influenza-Virus für gewöhnlich auf das D^d-Molekül beschränkt; jedoch haben die Erfinder gefunden, dass ein solches Peptid an K^b binden (obgleich schwächer als an D^d) und K^b eingewisses Ausmaß an Stabilität verleihen kann (siehe **Fig.** 3). Darüber hinaus bewirkten mit dem NP-Peptid vorinkubierte und mit Splenozyten aus einer B6-Maus gemeinsam kultivierte, K^b-exprimierende Drosophila-Zellen die In-vitro-Aktivierung von CD8, die das mit dem NP-Peptid assoziierte K^b-Molekül spezifisch erkennen können. Zusätzlich bewirkt das umgekehrte Experiment unter Verwendung eines von Ovalbumin hergeleiteten, K^b-beschränkten Peptids (OVA) und D^b-exprimierender Drosophila-Zellen die Proliferation von CD8, die das OVA-Peptid enthaltende D^b spezifisch erkennen können. Solche CD8 sind der Abtötung von Zellen (EL4-OVA) fähig, die mit für Ovalbumin kodierender cDNA transfiziert sind, was darauf hinweist, dass in vivo einige D^d-Moleküle mit dem OVA-Peptid beladen sind.

[0270] Dieses System liefert daher eine einzigartige Gelegenheit, CD8 gegen spezifische Antigene zu proliferieren, die durch ein Klasse-I-Molekül, das in vivo nicht das beschränkende Element für dieses Peptid ist, präsentiert werden. Obwohl ausreichend Antigen durch die besagte Klasse-I in vivo präsentiert wird, damit die Zelle von CD8 erkannt und abgetötet werden kann, ist sie nicht ausreichend, um solche CD8 in vivo zu proliferieren. Durch Beladung von leeren, von Drosophila-Zellen exprimierten Klasse-I-Molekülen mit Peptid sind die Erfinder wahrscheinlich in der Lage, die In-vitro-Beschränkung aufzuheben, indem ein Überschuss von antigenem Peptid gegenüber dem Klasse-I-Molekül in einer nicht-kompetitiven Umgebung bereitgestellt wird, so dass durch die Klasse-I genügend Antigen präsentiert wird, um die diesen Komplex erkennende, spezifische CD8 zu aktivieren.

C. AIDS-Behandlung

[0271] In vitro aktivierte Zellen können für die In-vitro-Therapie an Patienten verabreicht werden. Vorzugsweise wird zuerst der Klasse-I-Genotyp (Haplotyp) des Individuums bestimmt. Herkömmliche Gewebe-Typisierung ist zu diesem Zweck geeignet und kann im Behandlungszentrum oder durch irgendein geeignetes, gewerbliches Unternehmen durchgeführt werden. Sobald der/die HLA-Typ(en) des Individuums bestimmt ist/sind, wird die beste Kombination von Peptiden und Klasse-I-Molekülen, die für den individuellen Patienten geeignet ist, festgestellt und wie oben angeführt hergestellt und die geeigneten Drosophila-Zellen und Peptide für die Behandlung des Patienten bereitgestellt. Ruhe- oder Vorläufer-CD8-(T-)Zellen aus dem Blut des Patienten werden dann mit dem geeigneten, peptidbeladenen, durch die Drosophila-Zellkultur produzierten MHC stimuliert. Nach Aktivierung werden die CD8-Zellen wieder in den Blutkreislauf des Patienten eingeführt und der Krankheitsprozess im Patienten weiter beobachtet. Verfahren der Entfernung und Wiedereinführung von Zellkomponenten sind fachbekannt um umfassen Verfahren wie jene, die im US-Patent Nr. 4.844.893 an Honsik et al. und im US-Patent Nr. 4.690.915 an Rosenberg erläutert sind.

[0272] Zusätzliche Behandlungen können wie benötigt verabreicht werden bis die Erkrankung ausreichend geheilt ist. Ähnliche Behandlungsprotokolle sind zur Anwendung bei anderen immunsupprimierten Individuen geeignet, einschließlich Transplantat-Patienten, ältere Patienten und dergleichen.

D. Krebsbehandlung

[0273] Bei Krebspatienten wird Behandlungsverfahren angewendet, das dem oben beschriebenen ähnlich ist. Jedoch sollte bei solchen Patienten erwartet werden, dass herkömmliche Therapie zur Herabsetzung der Tumormasse der hierin beschriebenen Immuntherapie vorausgehen kann. Daher wird bevorzugt, das Blutproben aus dem vermeintlichen Patienten verschafft und gelagert werden (z.B. über Einfrieren), und zwar vor dem Beginn herkömmlicher Therapie, wie z.B. Bestrahlung oder Chemotherapie, die zur Zerstörung der Immunzellen neigen. Da sich, wenn überhaupt, nur wenige Krebsformen als direkte Reaktion auf Virusinfektion bilden, werden Target-Peptide für die Immunbehandlung weniger leicht erkannt. Jedoch weisen neuere Studien darauf hin, dass Mutationen in den Onkogenen ras, neu und p53 in bis zu 50 % aller Krebsfälle zur Krebsbildung beitragen. Folglich sind von diesen mutierten Regionen der Moleküle hergeleitete Peptide Erstkandidaten als Tar-

gets für die vorliegende Therapie. Gemäß den hierin offenbarten Protokollen kann die beste Kombination von Peptiden und Klasse-I-Molekülen für den einzelnen Patienten bestimmt und verabreicht werden.

[0274] Beispielsweise exprimieren viele Tumore Antigene, die in vitro durch CD8-Zellen erkannt werden, die sich vom betroffenen Patienten herleiten. Solche Antigene, die in normalen Zellen nicht exprimiert werden, sowie auch der HLA-Typ der diese den CD8-Zellen präsentiert, können folglich für ein präzises Targeting unter Anwendung der Verfahren der vorliegenden Erfindung identifiziert werden. Beispielsweise haben van der Bruggen et al. ein Antigen beschrieben, dessen Expression durch ein spezifisches Gen gesteuert und offenbar durch HLA A1 präsentiert wird (Science 254, 1653–1647 (1991)). So wie verschiedenste humane Tumorantigene isoliert und beschrieben werden, werden sie zu geeigneten Kandidaten für immuntherapeutische Anwendungen, wie sie hierin beschrieben werden.

E. Kombinierte Therapien/Konjugate

[0275] Es könnte durchführbar sein, die mittels der Verfahren der vorliegenden Erfindung in vitro aktivierten CD8-Zellen der vorliegenden Erfindung in Verbindung mit anderen Immunogenen zu verabreichen. Beispielsweise könnte das in US-Patent Nr. 5.045.320 offenbarte Large-Multivalent-Immunogen in Verbindung mit aktivierten CD8-Zellen verabreicht werden.

[0276] Es ist ferner vorgesehen, dass Cytokine, wie z.B. IL2 und IL4, welche die Differenzierung und Aktivierung von T-Zellen vermitteln, ebenfalls verabreicht werden können, da Cytokine in der Lage sind, die T-Zellen-Antwort gegen Tumorzellen in vivo stimulieren. Es wird angenommen, dass IL2 eine Hauptrolle beim Wachstum und der Differenzierung von CTL-(CD8-)Vorläufern und bei der CD8-Proliferation spielt. Die Verabreichung von IL2 an Krebspatienten ist häufig mit einer verbesserten Tumorantwort verbunden, die wahrscheinlich mit der Induktion von tumorspezifischen T-Zellen in Beziehung steht. Jedoch könnten die besten therapeutischen Wirkungen von IL2 eher durch kontinuierliche, lokale, als durch systemische IL2-Verabreichung erhalten werden, wodurch die IL2-Toxizität minimiert und dessen biologische Aktivität prolongiert wird. Folglich wird hierin nahe gelegt, dass man die lokale Zufuhr über die Transfektion von Tumorzellen mit einem IL2-Genkonstrukt erzielen könnte.

[0277] IL2-cDNA wird wie von Karasuyama und Melchers in Eur. J. Immunol. 18, 97–104 (1988) beschrieben konstruiert. Die vollständige cDNA-Sequenz von IL2 wird als ein Xho-I-Fragment aus dem Plasmid pBMG-neo-IL2 (siehe Karasuyama und Melchers, s.o.) und erhalten und direkt in die Sal-I-Stelle in pRmHa-3 ligiert. Rekombinantes pRmHa-3-Plasmid mit dem Insert richtiger Orientierung (bestimmt über Restriktionskartierung mit Hind III) wird durch Cäsiumgradienten gereinigt und zur Transfektion von Schneider-2-Zellen mit dem Calciumphosphatverfahren verwendet. (Ein Gemisch von Plasmid-DNA wurde zu diesem Zweck hergestellt: 10 µg pRmHa-3, enthaltend IL2-DNA, je 6 µg pRmHa-3-Plasmid, enthaltend MHC-Klasse-I-Schwerkette oder β2-Microglobulin und 2 µg phshsneo-DNA). Stabile Zelllinien, die über $CuSO_4$ induzierbar sind, um Schwerkette, β2-Microglobulin und IL2 zu exprimieren, wurden durch Züchten der Transfektanten in G418-Medium erhalten. Diese stabilen Zelllinien wurden mit Peptid beschichtet und im oben beschriebenen In-vitro-Test verwendet. Es wurde beobachtet, dass mit IL2 transfizierte Tumorzellen die CTL-(CD8-)Aktivität gegen die parentalen Tumorzellen verstärken und CD4 und T-Helferfunktion bei der Induktion einer Antitumor- oder zytotoxischen Reaktion in vivo umgehen. Daher wird hierin die Erhöhung des Potentials des Drosophila-Systems über die Co-Transfektion mit dem IL2-Gen vorgeschlagen.

[0278] Obige Ausführungen dienen der Veranschaulichung der vorliegenden Erfindung, nicht jedoch zu deren Einschränkung bestimmt. Es können zahlreiche Variationen und Modifizierungen vorgenommen werden, die im Schutzumfang der Ansprüche liegen.

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE INFORMATIONEN:

(i) ANMELDER: Per A. Peterson
Michael Jackson
Pierre Lenglade-Demoyen

(ii) TITEL DER ERFFINDUNG: In-vitro-Aktivierung zytotoxischer T-Zellen

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 36

(iv) KORRESPONDENZADRESSE:
(A) NAME: The Scripps Research Institute
(B) STRASSE: 10666 North Torrey Pines Road, TPC 8
(C) STADT: La Jolla
(E) BUNDESSTAAT: Kalifornien
(E) LAND: USA
(F) PLZ: 92037

(v) COMPUTERLESBARE FORM:
(A) ART DES MEDIUMS: Diskette
(B) COMPUTER: IBM PC-kompatibel
(C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
(D) SOFTWARE: PatentIn Release Nr. 1.0, Version Nr. 1.25

(vi) AKTUELLE ANMELDUNGSDATEN:
(A) ANMELDENUMMER: PCT/US93/
(B) ANMELDEDATUM: 18. Februar 1993
(C) KLASSIFIKATION:

(vii) PRIORITÄTSANMELDUNGSDATEN:

(A) ANMELDENUMMER: 07/841.662

(B) ANMELDEDATUM: 19. Feb. 1992

(viii) ANGABEN ÜBER ANWALT/VERTRETER

(A) NAME: April Logan

(B) REGISTRIERUNGSNUMMER: 33.950

(C) REFERENZ: SEQ0002P

(ix) TELEKOMMUNIKATIONSANGABEN

(A) TELEFON: (619) 554-2937

(B) TELEFAX: (619) 554-6312

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ.-ID Nr. 1:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 23 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) ANZAHL DER STRÄNGE: einzeln

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTI-SENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: Seq.-ID Nr. 1:

CCACCATGGC CGTCATGGCG CCC 23

2) INFORMATIONEN FÜR SEQ.-ID Nr. 2:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 23 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) ANZAHL DER STRÄNGE: einzeln

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTI-SENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: Seq.-ID Nr. 2:

GGTCACACTT TACAAGCTCT GAG 23

2) INFORMATIONEN FÜR SEQ.-ID Nr. 3:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 23 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) ANZAHL DER STRÄNGE: einzeln

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTI-SENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: Seq.-ID Nr. 3:

CCACCATGCT GGTCATGGCG CCC 23

2) INFORMATIONEN FÜR SEQ.-ID Nr. 4:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 23 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) ANZAHL DER STRÄNGE: einzeln

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTI-SENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: Seq.-ID Nr. 4:

GGACTCGATG TGAGAGACAC ATC 23

2) INFORMATIONEN FÜR SEQ.-ID Nr. 5:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 23 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) ANZAHL DER STRÄNGE: einzeln

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTI-SENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: Seq.-ID Nr. 5:

CCACCATGCG GGTCATGGCG CCC 23

2) INFORMATIONEN FÜR SEQ.-ID Nr. 6:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 23 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) ANZAHL DER STRÄNGE: einzeln

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTI-SENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: Seq.-ID Nr. 6:

GGTCAGGCTT TACAAGCGAT GAG 23

2) INFORMATIONEN FÜR SEQ.-ID Nr. 7:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 23 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) ANZAHL DER STRÄNGE: einzeln

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTI-SENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: Seq.-ID Nr. 7:

CCACCATGCG GGTAGATGCC CTC 23

2) INFORMATIONEN FÜR SEQ.-ID Nr. 8:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 23 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) ANZAHL DER STRÄNGE: einzeln

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTI-SENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: Seq.-ID Nr. 8:

GGTTACAAGC TGTGAGACTC AGA 23

2) INFORMATIONEN FÜR SEQ.-ID Nr. 9:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 23 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) ANZAHL DER STRÄNGE: einzeln

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTI-SENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: Seq.-ID Nr. 9:

CCACCATGGC GCCCCGAAGC CTC 23

2) INFORMATIONEN FÜR SEQ.-ID Nr. 10:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 23 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) ANZAHL DER STRÄNGE: einzeln

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTI-SENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: Seq.-ID Nr. 10:

GGTCACACTT TATTAGCTGT GAG 23

2) INFORMATIONEN FÜR SEQ.-ID Nr. 11:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 23 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) ANZAHL DER STRÄNGE: einzeln

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTI-SENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: Seq.-ID Nr. 11:

CCACCATGGC GCCCCGAACC CTC 23

2) INFORMATIONEN FÜR SEQ.-ID Nr. 12:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 23 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) ANZAHL DER STRÄNGE: einzeln

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTI-SENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: Seq.-ID Nr. 12:

GGTCACAATT TACAAGCCGA GAG 23

2) INFORMATIONEN FÜR SEQ.-ID Nr. 13:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 427 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) ANZAHL DER STRÄNGE: doppelt

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTI-SENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: Seq.-ID Nr. 13:

```
AATTCGTTGC AGGACAGGAT GTGGTGCCCG ATGTGACTAG CTCTTTGCTG CAGGCCGTCC     60

TATCCTCTGG TTCCGATAAG AGACCCAGAA CTCCGGCCCC CCACCGCCCA CCGCCACCCC    120

CATACATATG TGGTACGCAA GTAAGAGTGC CTGCGCATGC CCCATGTGCC CCACCAAGAG    180

TTTTGCATCC CATACAAGTC CCCAAAGTGG AGAACCGAAC CAATTCTTCG CGGGCAGAAC    240

AAAAGCTTCT GCACACGTCT CCACTCGAAT TTGGAGCCGG CCGGCGTGTG CAAAAGAGGT    300

GAATCGAACG AAAGACCCGT GTGTAAAGCC GCGTTTCCAA AATGTATAAA ACCGAGAGCA    360

TCTGGCCAAT GTGCATCAGT TGTGGTCAGC AGCAAAATCA AGTGAATCAT CTCAGTGCAA    420

CTAAAGG                                                              427
```

2) INFORMATIONEN FÜR SEQ.-ID Nr. 14:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 740 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) ANZAHL DER STRÄNGE: doppelt

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTI-SENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: Seq.-ID Nr. 14:

```
ATTCGATGCA CACTCACATT CTTCTCCTAA TACGATAATA AAACTTTCCA TGAAAAATAT    60
GGAAAAATAT ATGAAAATTG AGAAATCCAA AAAACTGATA AACGCTCTAC TTAATTAAAA   120
TAGATAAATG GGAGCGGCTG GAATGGCGGA GCATGACCAA GTTCCTCCGC CAATCAGTCG   180
TAAAACAGAA GTCGTGGAAA GCGGATAGAA AGAATGTTCG ATTTGACGGG CAAGCATGTC   240
TGCTATGTGG CGGATTGCGG AGGAATTGCA CTGGAGACCA GCAAGGTTCT CATGACCAAG   300
AATATAGCGG TGTGAGTGAG CGGGAAGCTC GGTTTCTGTC CAGATCGAAC TCAAAACTAG   360
TCCAGCCAGT CGCTGTCGAA ACTAATTAAG TTAATGAGTT TTTCATGTTA GTTTCGCGCT   420
GAGCAACAAT TAAGTTTATG TTTCAGTTCG GCTTAGATTT CGCTGAAGGA CTTGCCACTT   480
TCAATCAATA CTTTAGAACA AAATCAAAAC TCATTCTAAT AGCTTGGTGT TCATCTTTTT   540
TTTTAATGAT AAGCATTTTG TCGTTTATAC TTTTTATATT TCGATATTAA ACCACCTATG   600
AAGTTCATTT TAATCGCCAG ATAAGCAATA TATTGTGTAA ATATTTGTAT TCTTTATCAG   660
GAAATTCAGG GAGACGGGGA AGTTACTATC TACTAAAAGC CAAACAATTT CTTACAGTTT   720
TACTCTCTCT ACTCTAGAGT                                               740
```

2) INFORMATIONEN FÜR SEQ.-ID Nr. 15:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 60 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) ANZAHL DER STRÄNGE: einzeln

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTI-SENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: Seq.-ID Nr. 15:

GCTTGGATCC AGATCTACCA TGTCTCGCTC CGTGGCCTTA GCTGTGCTCG CGCTACTCTC 60

2) INFORMATIONEN FÜR SEQ.-ID Nr. 16:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 36 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) ANZAHL DER STRÄNGE: einzeln

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTI-SENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: Seq.-ID Nr. 16:

GGATCCGGAT GGTTACATGT CGCGATCCCA CTTAAC 36

2) INFORMATIONEN FÜR SEQ.-ID Nr. 17:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 19 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) ANZAHL DER STRÄNGE: einzeln

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTI-SENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: Seq.-ID Nr. 17:

GGAGCCGTGA CTGACTGAG 19

2) INFORMATIONEN FÜR SEQ.-ID Nr. 18:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 24 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) ANZAHL DER STRÄNGE: einzeln

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTI-SENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: Seq.-ID Nr. 18:

CCCTCGGCAC TGACTGACTC CTAG 24

2) INFORMATIONEN FÜR SEQ.-ID Nr. 19:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 26 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) ANZAHL DER STRÄNGE: einzeln

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTI-SENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: Seq.-ID Nr. 19:

GCGGATCCAT GGCCGTCATG GCGCCC 26

2) INFORMATIONEN FÜR SEQ.-ID Nr. 20:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 29 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) ANZAHL DER STRÄNGE: einzeln

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTI-SENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: Seq.-ID Nr. 20:

CGGAATTCTC ATCAGGGCTT CGGCAGCCC 29

2) INFORMATIONEN FÜR SEQ.-ID Nr. 21:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 38 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) ANZAHL DER STRÄNGE: doppelt

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTI-SENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: Seq.-ID Nr. 21:

GGATCCTCTC AGACGCCGAG ATGCGGGTCA CGGCGCCC 38

2) INFORMATIONEN FÜR SEQ.-ID Nr. 22:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 52 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) ANZAHL DER STRÄNGE: einzeln

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTI-SENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: Seq.-ID Nr. 22:

AGCTTGAGCA CTTGTTCTTT TTGCAGAAGC TCAGAATAAA CGCTCAACTT TG 52

2) INFORMATIONEN FÜR SEQ.-ID Nr. 23:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 24 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(C) ANZAHL DER STRÄNGE: einzeln

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTI-SENSE: NEIN

(v) FRAGMENTTYP: intern

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: Seq.-ID Nr. 23:

```
Glu Gln Leu Glu Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu Thr Glu Trp Thr
1               5                  10                  15

Ser Ser Asn Val Met Glu Glu Arg
            20
```

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ.-ID Nr. 24:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 10 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(C) ANZAHL DER STRÄNGE: einzeln

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTI-SENSE: NEIN

(v) FRAGMENTTYP: intern

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: Seq.-ID Nr. 24:

```
Asp Leu Arg Gly Tyr Val Tyr Gln Gly Leu
1               5                  10
```

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ.-ID Nr. 25:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 9 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(C) ANZAHL DER STRÄNGE: einzeln

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTI-SENSE: NEIN

(v) FRAGMENTTYP: intern

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: Seq.-ID Nr. 25:

Ala Ser Asn Glu Asn Met Glu Thr Met
1 5

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ.-ID Nr. 26:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 14 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(C) ANZAHL DER STRÄNGE: einzeln

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTI-SENSE: NEIN

(v) FRAGMENTTYP: intern

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: Seq.-ID Nr. 26:

```
Ser Glu Arg Pro Gln Ala Ser Gly Val Tyr Met Gly Asn Leu
1               5                   10
```

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ.-ID Nr. 27:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 14 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(C) ANZAHL DER STRÄNGE: einzeln

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTI-SENSE: NEIN

(v) FRAGMENTTYP: intern

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: Seq.-ID Nr. 27:

```
Asp Ser Ser Gly Val Glu Asn Pro Gly Gly Tyr Cys Thr Lys
1               5                   10
```

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ.-ID Nr. 28:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 9 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(C) ANZAHL DER STRÄNGE: einzeln

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTI-SENSE: NEIN

(v) FRAGMENTTYP: intern

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: Seq.-ID Nr. 28:

```
Gln Met Lys Asp Cys Thr Glu Arg Gln
1               5
```

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ.-ID Nr. 29:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 9 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(C) ANZAHL DER STRÄNGE: einzeln

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTI-SENSE: NEIN

(v) FRAGMENTTYP: intern

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: Seq.-ID Nr. 29:

```
Lys Arg Trp Ile Ile Leu Gly Leu Asn
1               5
```

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ.-ID Nr. 30:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 9 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(C) ANZAHL DER STRÄNGE: einzeln

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTI-SENSE: NEIN

(v) FRAGMENTTYP: intern

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: Seq.-ID Nr. 30:

```
Phe Arg Ile Gly Cys Arg His Ser Arg
1               5
```

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ.-ID Nr. 31:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 9 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(C) ANZAHL DER STRÄNGE: einzeln

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTI-SENSE: NEIN

(v) FRAGMENTTYP: intern

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: Seq.-ID Nr. 31:

```
Ile Leu Lys Glu Pro Val His Gly Val
1               5
```

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ.-ID Nr. 32:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 10 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(C) ANZAHL DER STRÄNGE: einzeln

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTI-SENSE: NEIN

(v) FRAGMENTTYP: intern

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: Seq.-ID Nr. 32:

```
Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu Thr Val
1               5                   10
```

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ.-ID Nr. 33:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 14 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(C) ANZAHL DER STRÄNGE: einzeln

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTI-SENSE: NEIN

(v) FRAGMENTTYP: intern

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: Seq.-ID Nr. 33:

```
Leu Pro Asp Cys Lys Val Met Val His Asp Pro Ser Leu Ala
1               5                  10
```

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ.-ID Nr. 34:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 32 Basenpaare

(B) TYP: Nucleinsäure

(C) ANZAHL DER STRÄNGE: einzeln

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTI-SENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: Seq.-ID Nr. 34:

ATATGGATCC TGACGATCTC AGGGTGAGGG GC 32

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ.-ID Nr. 35:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 10 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(C) ANZAHL DER STRÄNGE: einzeln

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTI-SENSE: NEIN

(v) FRAGMENTTYP: intern

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: Seq.-ID Nr. 35:

Arg Gly Tyr Val Tyr Gln Gly Leu Lys Ser
1 5 10

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ.-ID Nr. 36:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 9 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(C) ANZAHL DER STRÄNGE: einzeln

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTI-SENSE: NEIN

(v) FRAGMENTTYP: intern

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: Seq.-ID Nr. 36:

Phe Ala Pro Gly Asn Tyr Pro Ala Leu
1 5

SEQUENZPROTOKOLL

<110> The Scripps Research Institute

<120> In-vitro-Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen

<130> SJK/FP6048722

<140> EP 02014141.2
<141> 25. Juni 2002

<150> EP 93906141.2
<151> 18. Februar 1993

<150> US 7/841.662
<151>19. Februar 1992

<160> 45

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 23
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: DNA-Primer

<400> 1

ccaccatggc cgtcatggcg ccc 23

<210> 2
<211> 23
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: DNA-Primer

<400> 2

ggtcacactt tacaagctct gag 23

<210> 3
<211> 23
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: DNA-Primer

<400> 3

ccaccatgct ggtcatggcg ccc 23

<210> 4
<211> 23
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: DNA-Primer

<400> 4

ggactcgatg tgagagacac atc 23

<210> 5
<211> 23
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: DNA-Primer

<400> 5

ccaccatgcg ggtcatggcg ccc 23

<210> 6
<211> 23
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: DNA-Primer

<400> 6

ggtcaggctt tacaagcgat gag 23

<210> 7
<211> 24
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: DNA-Primer

<400> 7

ccaccatgcg ggtagatgcc ctcc 24

<210> 8
<211> 23
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: DNA-Primer

<400> 8

ggttacaagc tgtgagactc aga 23

<210> 9
<211> 23
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: DNA-Primer

<400> 9

ccaccatggc gccccgaagc ctc 23

<210> 10
<211> 24
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: DNA-Primer

<400> 10

ggtcacactt tattagctgt gaga 24

<210> 11
<211> 23
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: DNA-Primer

<400> 11

ccaccatggc gccccgaacc ctc 23

<210> 12
<211> 23
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: DNA-Primer

<400> 12

ggtcacaatt tacaagccga gag 23

<210> 13
<211> 427
<212> DNA
<213> Drosophila melanogaster

<400> 13

aattcgttgc aggacaggat gtggtgcccg atgtgactag ctctttgctg caggccgtcc 60
tatcctctgg ttccgataag agacccagaa ctccggcccc ccaccgccca ccgccacccc 120
catacatatg tggtacgcaa gtaagagtgc ctgcgcatgc cccatgtgcc ccaccaagag 180
ttttgcatcc catacaagtc cccaaagtgg agaaccgaac caattcttcg cgggcagaac 240
aaaagcttct gcacacgtct ccactcgaat ttggagccgg ccggcgtgtg caaaagaggt 300
gaatcgaacg aaagacccgt gtgtaaagcc gcgtttccaa aatgtataaa accgagagca 360
tctggccaat gtgcatcagt tgtggtcagc agcaaaatca agtgaatcat ctcagtgcaa 420
ctaaagg 427

<210> 14
<211> 740
<212> DNA
<213> Drosophila melanogaster

<400> 14

attcgatgca cactcacatt cttctcctaa tacgataata aaactttcca tgaaaaatat 60
ggaaaaatat atgaaaattg agaaatccaa aaaactgata aacgctctac ttaattaaaa 120
tagataaatg ggagcggctg gaatggcgga gcatgaccaa gttcctccgc caatcagtcg 180
taaaacagaa gtcgtggaaa gcggatagaa agaatgttcg atttgacggg caagcatgtc 240
tgctatgtgg cggattgcgg aggaattgca ctggagacca gcaaggttct catgaccaag 300
aatatagcgg tgtgagtgag cgggaagctc ggtttctgtc cagatcgaac tcaaaactag 360
tccagccagt cgctgtcgaa actaattaag ttaatgagtt tttcatgtta gtttcgcgct 420
gagcaacaat taagtttatg tttcagttcg gcttagattt cgctgaagga cttgccactt 480
tcaatcaata ctttagaaca aaatcaaaac tcattctaat agcttggtgt tcatcttttt 540
ttttaatgat aagcattttg tcgtttatac tttttatatt tcgatattaa accacctatg 600
aagttcattt taatcgccag ataagcaata tattgtgtaa atatttgtat tctttatcag 660
gaaattcagg gagacgggga agttactatc tactaaaagc caaacaattt cttacagttt 720
tactctctct actctagagt 740

<210> 15
<211> 60
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: DNA-Primer

<400> 15

gcttggatcc agatctacca tgtctcgctc cgtggcctta gctgtgctcg cgctactctc 60

<210> 16
<211> 36
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: DNA-Primer

<400> 16

ggatccggat ggttacatgt cgcgatccca cttaac 36

<210> 17
<211> 19
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: DNA-Primer

<400> 17

ggagccgtga ctgactgag 19

<210> 18
<211> 24
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: DNA-Primer

<400> 18

ccctcggcac tgactgactc ctag 24

<210> 19

<211> 26
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: DNA-Primer

<400> 19
gcggatccat ggccgtcatg gcgccc 26

<210> 20
<211> 29
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: DNA-Primer

<400> 20
cggaattctc atcagggctt cggcagccc 29

<210> 21
<211> 38
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: HLA-B27-sol-cDNA

<400> 21
ggatcctctc agacgccgag atgcgggtca cggcgccc 38

<210> 22
<211> 52
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: DNA-Primer

<400> 22
agcttgagca cttgttcttt ttgcagaagc tcagaataaa cgctcaactt tg 52

<210> 23
<211> 24
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisches Peptid

<400> 23

```
Glu Gln Leu Glu Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu Thr Glu Trp Thr
 1               5                  10                  15

Ser Ser Asn Val Met Glu Glu Arg
            20
```

<210> 24
<211> 10
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisches Peptid

<400> 24

```
Asp Leu Arg Gly Tyr Val Tyr Gln Gly Leu
 1               5                  10
```

<210> 25
<211> 9
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisches Peptid

<400> 25

```
Ala Ser Asn Glu Asn Met Glu Thr Met
 1               5
```

<210> 26
<211> 14
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisches Peptid

<400> 26

```
Ser Glu Arg Pro Gln Ala Ser Gly Val Tyr Met Gly Asn Leu
 1               5                  10
```

<210> 27
<211> 14
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisches Peptid

<400> 27

Asp Ser Ser Gly Val Glu Asn Pro Gly Gly Tyr Cys Thr Lys
1 5 10

<210> 28
<211> 9
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisches Peptid

<400> 28

Gln Met Lys Asp Cys Thr Glu Arg Gln
1 5

<210> 29
<211> 9
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisches Peptid

<400> 29

Lys Arg Trp Ile Ile Leu Gly Leu Asn
1 5

<210> 30
<211> 9
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisches Peptid

<400> 30

Phe Arg Ile Gly Cys Arg His Ser Arg
1 5

<210> 31
<211> 9
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisches Peptid

<400> 31

Ile Leu Lys Glu Pro Val His Gly Val
1 5

<210> 32
<211> 10
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisches Peptid

<400> 32

Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu Thr Val
1 5 10

<210> 33
<211> 14
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisches Peptid

<400> 33

Leu Pro Asp Cys Lys Val Met Val His Asp Pro Ser Leu Ala
1 5 10

<210> 34
<211> 32
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: DNA-Primer

<400> 34

atatggatcc tcaccatctc agggtgaggg gc 32

<210> 35
<211> 10
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisches Peptid

<400> 35

Arg Gly Tyr Val Tyr Gln Gly Leu Lys Ser
1 5 10

<210> 36
<211> 9
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisches Peptid

<400> 36

Phe Ala Pro Gly Asn Tyr Pro Ala Leu
1 5

<210> 37
<211> 8
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisches Peptid

<400> 37

Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu
1 5

<210> 38
<211> 9
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisches Peptid

<400> 38

Glu Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu
1 5

<210> 39
<211> 10
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisches Peptid

<400> 39

Leu Glu Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu
1 5 10

<210> 40
<211> 9
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisches Peptid

<400> 40

Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu Thr
1 5

<210> 41
<211> 10
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisches Peptid

<400> 41

Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu Thr Glu
1 5 10

<210> 42
<211> 7
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisches Peptid

<400> 42

Gly Tyr Val Tyr Gln Gly Leu
1 5

<210> 43
<211> 8
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisches Peptid

<400> 43

Arg Gly Tyr Val Tyr Gln Gly Leu
1 5

<210> 44
<211> 9
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisches Peptid

<400> 44

Leu Arg Gly Tyr Val Tyr Gln Gly Leu
1 5

<210> 45
<211> 8

<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisches Peptid

<400> 45

Ser Asn Glu Asn Met Glu Thr Met
1 5

Patentansprüche

1. Verfahren zur Produktion einer aktivierten $CD8^+$-T-Zelle in vitro, umfassend das In-vitro-Kontaktieren einer $CD8^+$-T-Zelle mit einem Antigen-beladenen menschlichen Klasse-I-MHC-Molekül, das auf der Oberfläche einer Insektenzelle ausreichend lange exprimiert wird, um die $CD8^+$-T-Zelle Antigen-spezifisch zu aktivieren.

2. Verfahren nach Anspruch 1, worin das Verfahren weiters:
(a) das Trennen der aktivierten $CD8^+$-T-Zelle vom Antigen-beladenen Klasse-I-MHC-Molekül; und
(b) das Suspendieren der aktivierten $CD8^+$-T-Zelle in einem annehmbaren Träger oder Arzneimittelträger umfasst.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, worin die Insektenzelle eine Drosophila-Zelle ist.

4. Verfahren nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, worin die Insektenzelle eine Armyworm-Zelle ist.

5. Verfahren nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, worin die Insektenzelle eine Motten-, Seidenraupen- oder Stechmückenzelle ist.

6. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, worin die $CD8^+$-T-Zelle von einem Menschen stammt.

7. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, worin die $CD8^+$-T-Zelle ein menschliches Klasse-I-MHC-Gen unter der Steuerung eines induzierbaren Promotors und ein exprimierbares menschliches β-2-Mikroglobulin-Gen umfasst.

8. Verfahren nach Anspruch 7, worin leere MHC-Klasse-I-Moleküle auf der Oberfläche der Insektenzelle exprimiert werden und die Insektenzelle mit einem Antigenpeptid kontaktiert wird.

9. Verfahren nach Anspruch 7, worin der induzierbare Promotor ein Metallothionein-Promotor ist.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 9, worin das menschliche Klasse-I-MHC-Gen und das menschliche β-2-Mikroglobulin-Gen in die Insektenzelllinie transfiziert werden.

11. Verfahren nach Anspruch 7, worin das menschliche Klasse-I-MHC-Antigen B7, B27 oder A2.1 ist.

12. Verfahren nach Anspruch 8, worin das Peptid von einem Virusprotein abgeleitet ist.

Es folgen 19 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

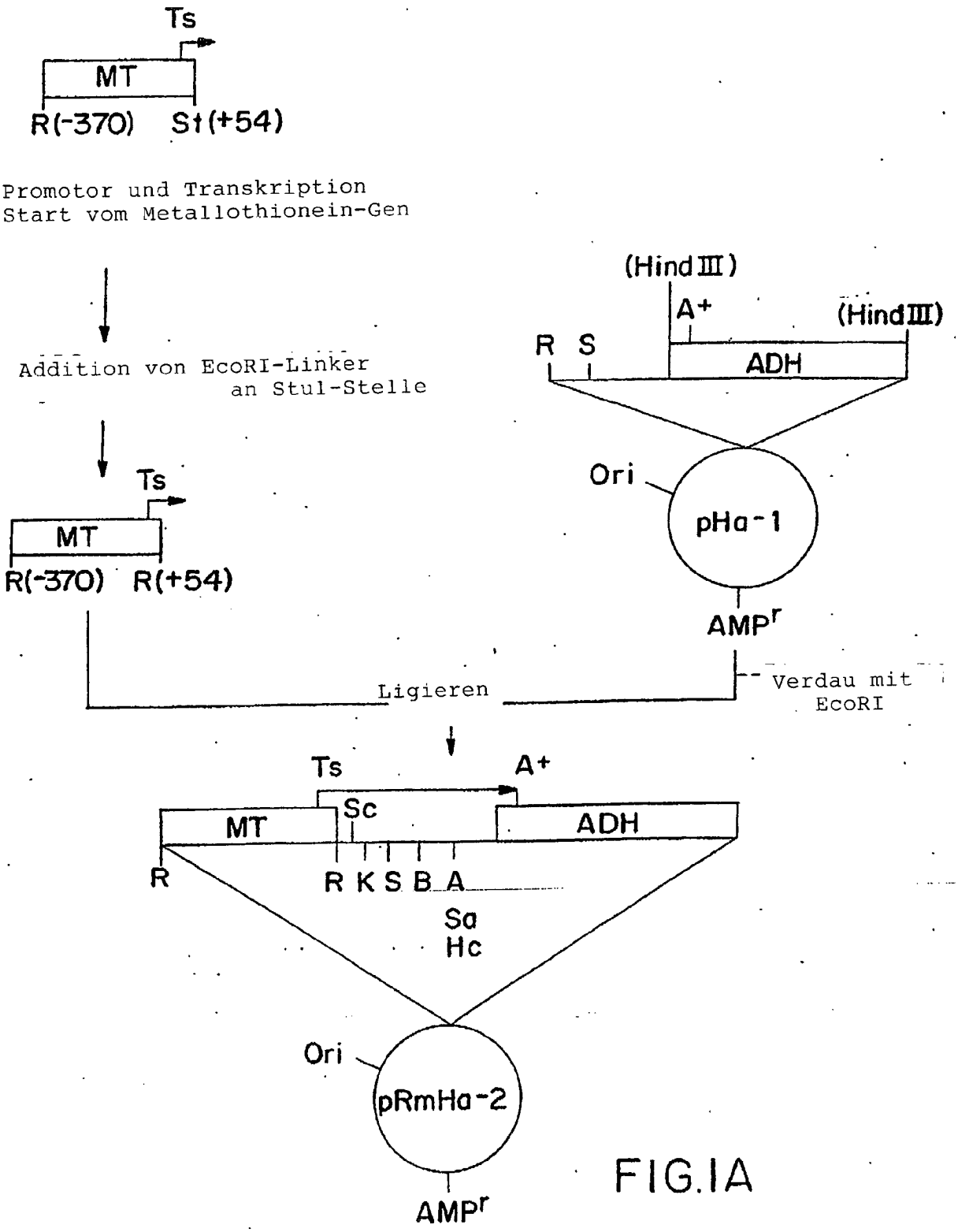


FIG.1A

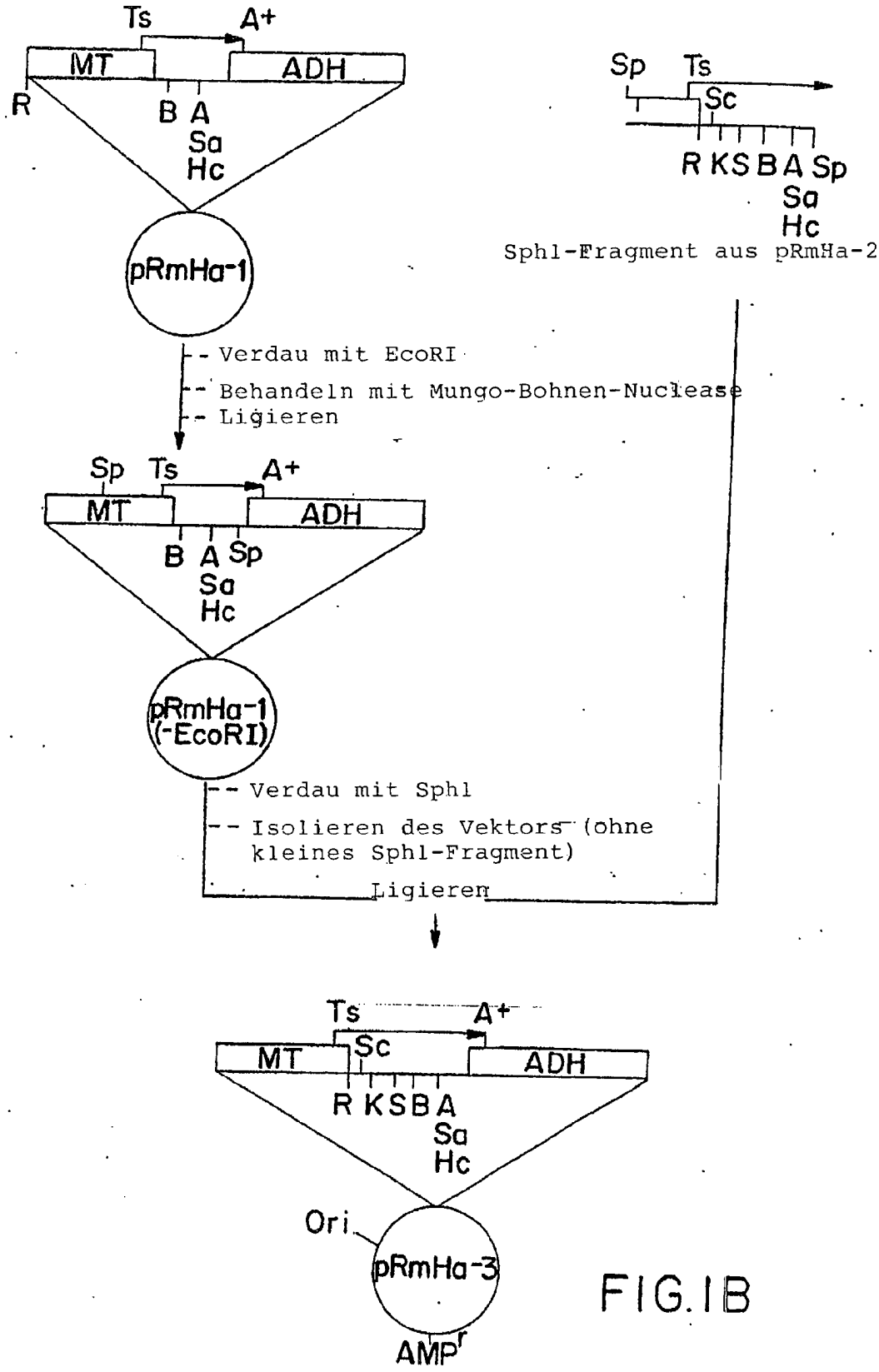

Ts
A+
MT
ADH
R
B A
Sa
Hc
pRmHa-1
Sp Ts
Sc
R KS B A Sp
Sa
Hc
Sphl-Fragment aus pRmHa-2
- Verdau mit EcoRI
- Behandeln mit Mungo-Bohnen-Nuclease
- Ligieren
Sp Ts
A+
MT
ADH
B A Sp
Sa
Hc
pRmHa-1
(-EcoRI)
- Verdau mit Sphl
- Isolieren des Vektors (ohne kleines Sphl-Fragment)
Ligieren
Ts
A+
Sc
MT
ADH
R KS B A
Sa
Hc
Ori
pRmHa-3
AMP^r

FIG.1B

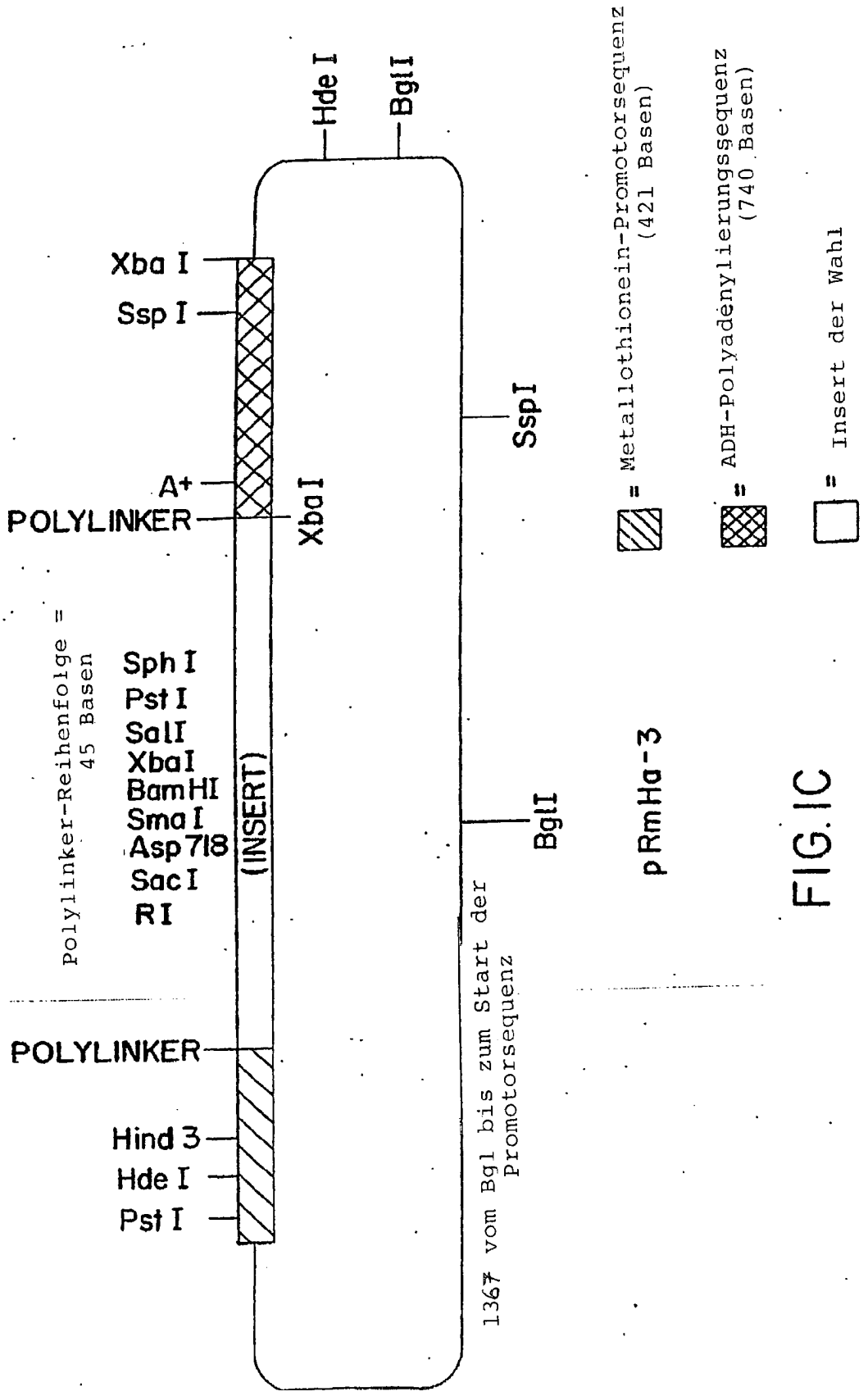

Hde I
BglI
Xba I
Ssp I
SspI
A+
POLYLINKER
XbaI
Polylinker-Reihenfolge = 45 Basen
Sph I
Pst I
SalI
XbaI
BamHI
SmaI
Asp718
SacI
RI
(INSERT)
BglI
POLYLINKER
Hind 3
Hde I
Pst I
1367 vom Bgl bis zum Start der Promotorsequenz
pRmHa-3
= Metallothionein-Promotorsequenz (421 Basen)
= ADH-Polyadenylierungssequenz (740 Basen)
= Insert der Wahl

FIG. IC

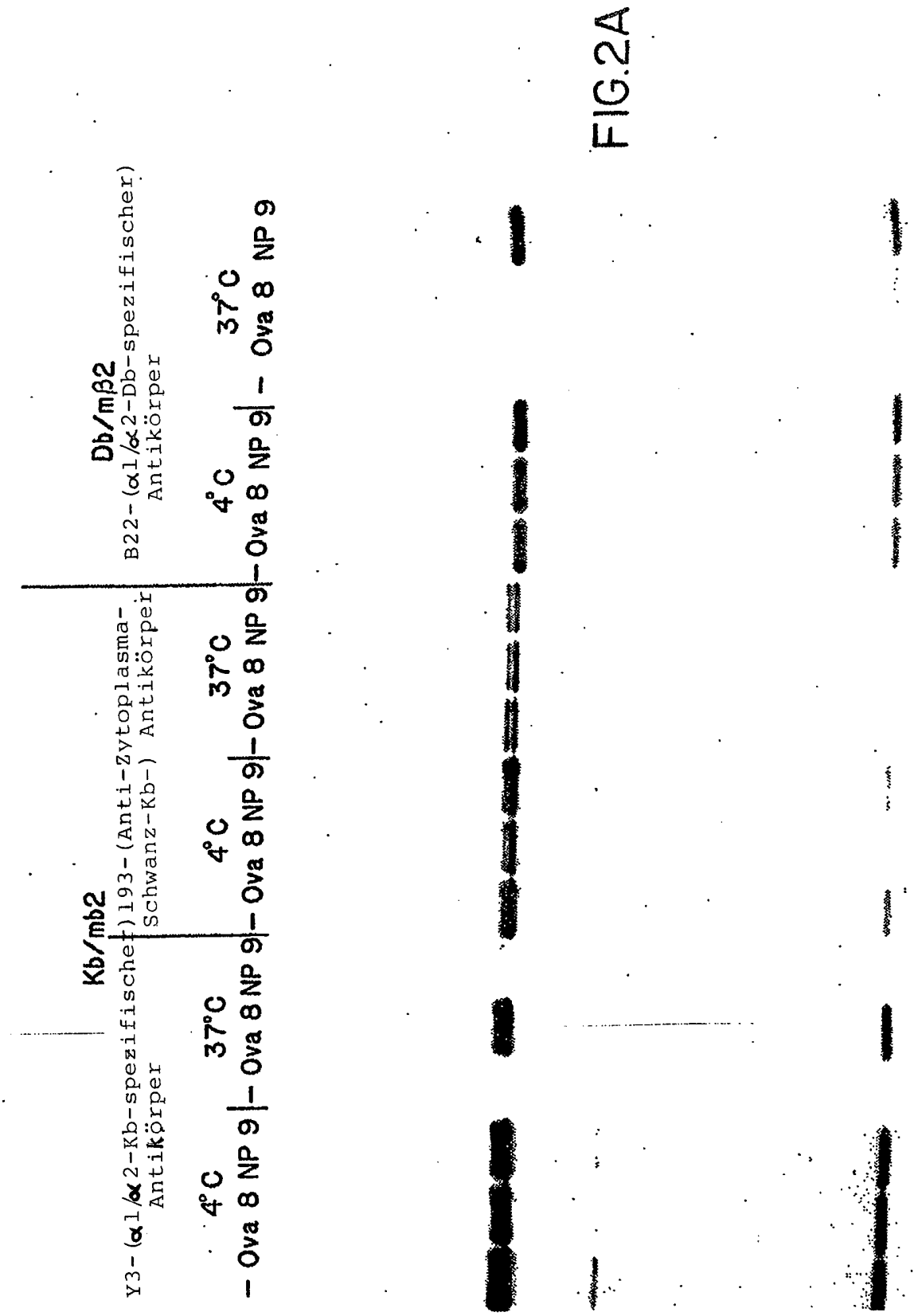

Kb/mb2
Y3-(α1/α2-Kb-spezifischer) Antikörper
193-(Anti-Zytoplasma-Schwanz-Kb-) Antikörper
Db/mβ2
B22-(α1/α2-Db-spezifischer) Antikörper
4°C
37°C
4°C
37°C
- Ova 8 NP 9
- Ova 8 NP 9
- Ova 8 NP 9
- Ova 8 NP 9
- Ova 8 NP 9
- Ova 8 NP 9
- Ova 8 NP 9
- Ova 8 NP 9

FIG.2A

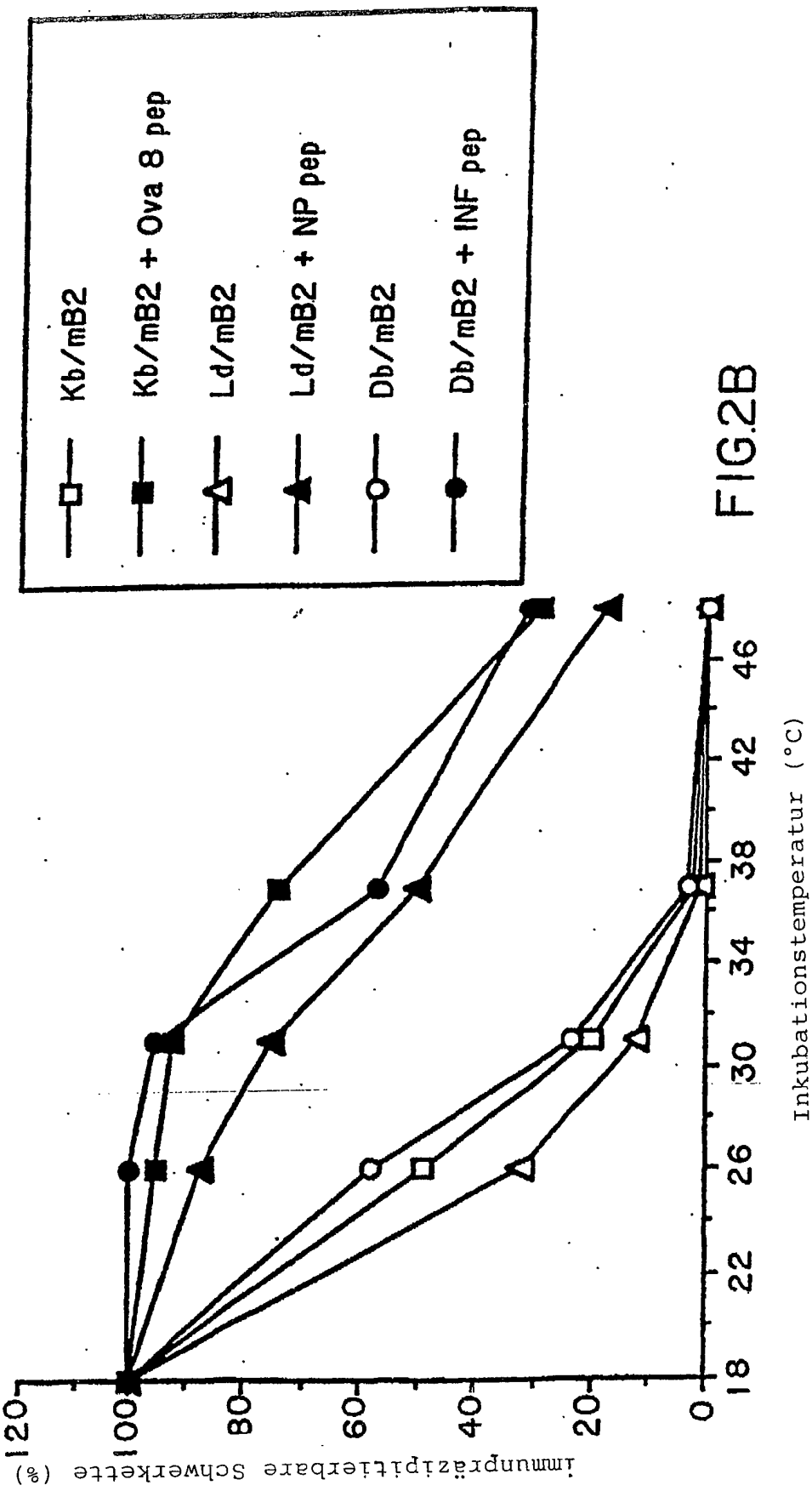

Kb/mB2
Kb/mB2 + Ova 8 pep
Ld/mB2
Ld/mB2 + NP pep
Db/mB2
Db/mB2 + INF pep
immunpräzipitierbare Schwerkette (%)
120
100
80
60
40
20
0
18
22
26
30
34
38
42
46
Inkubationstemperatur (°C)

FIG.2B

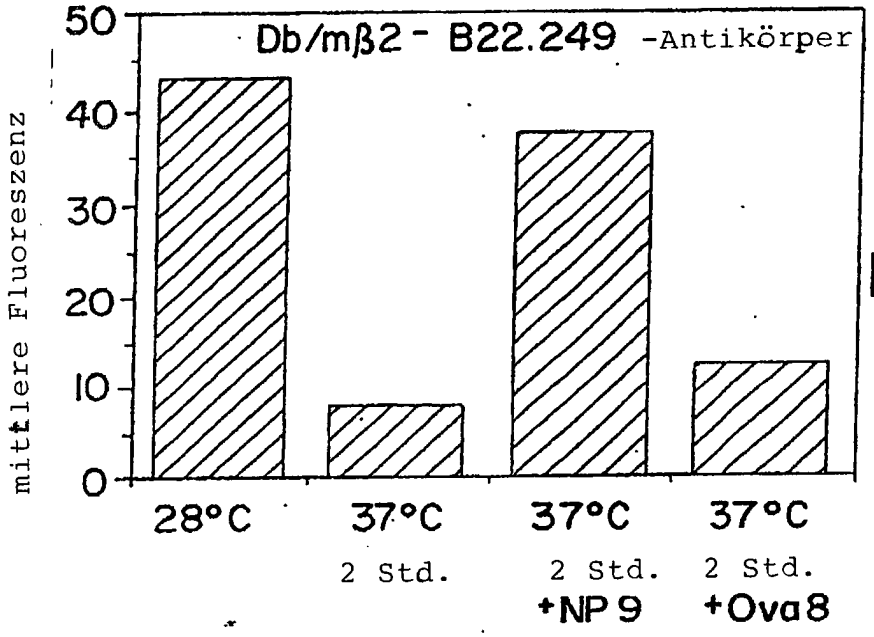

Db/mβ2 - B22.249 -Antikörper
mittlere Fluoreszenz
50
40
30
20
10
0
28°C
37°C
2 Std.
37°C
2 Std.
+NP 9
37°C
2 Std.
+Ova 8

FIG.3A

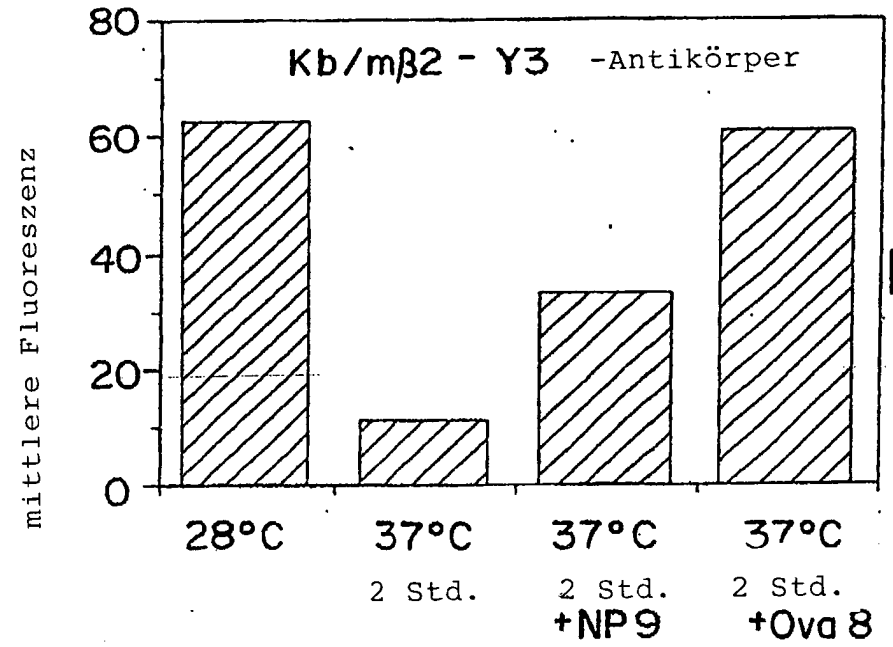
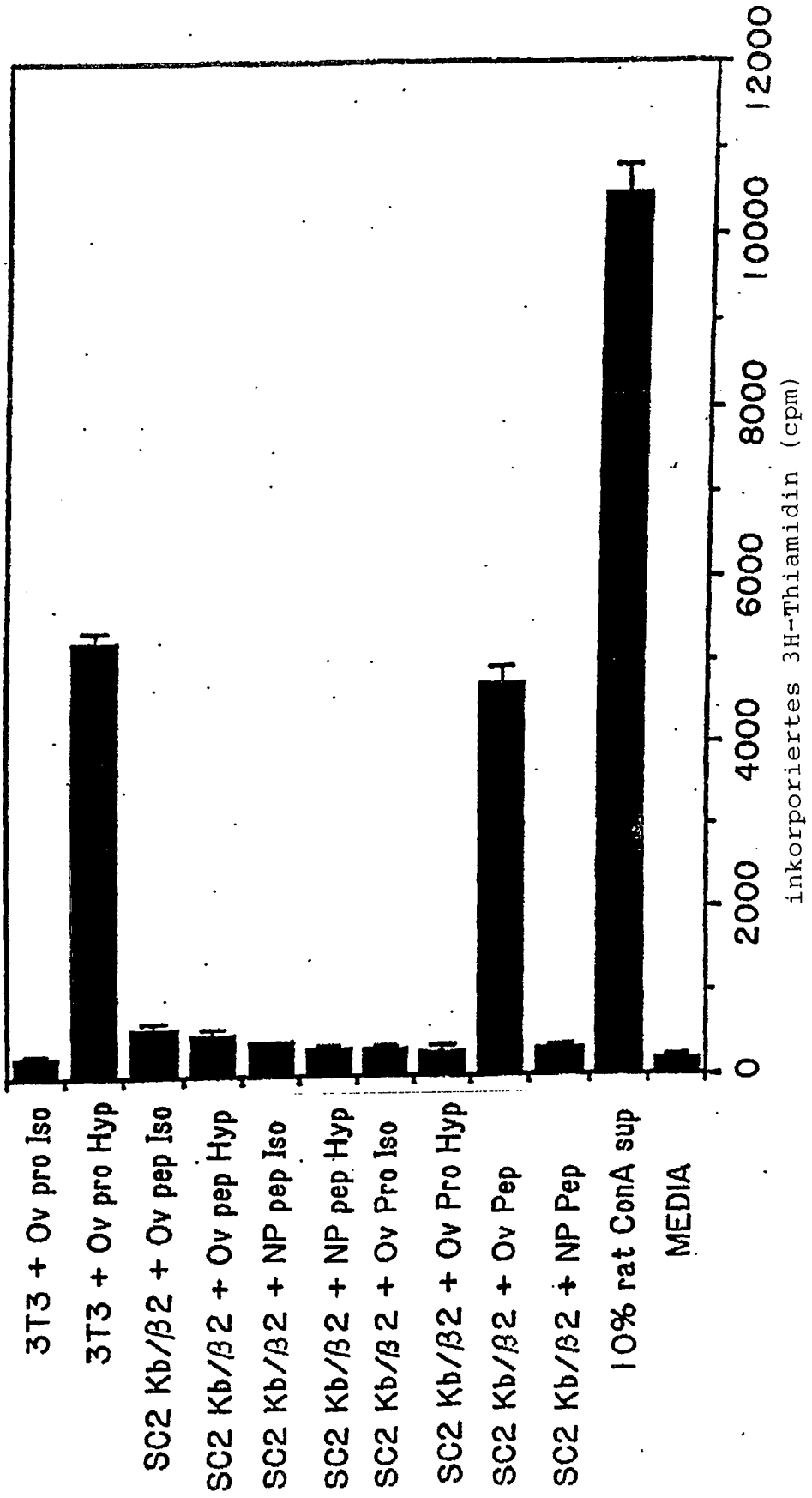

Kb/mβ2 - Y3 -Antikörper
mittlere Fluoreszenz
80
60
40
20
0
28°C
37°C
2 Std.
37°C
2 Std.
+NP 9
37°C
2 Std.
+Ova 8

FIG.3B

FIG.4


0
2000
4000
6000
8000
10000
12000
inkorporiertes 3H-Thiamidin (cpm)
3T3 + Ov pro Iso
3T3 + Ov pro Hyp
SC2 Kb/β2 + Ov pep Iso
SC2 Kb/β2 + Ov pep Hyp
SC2 Kb/β2 + NP pep Iso
SC2 Kb/β2 + NP pep Hyp
SC2 Kb/β2 + Ov Pro Iso
SC2 Kb/β2 + Ov Pro Hyp
SC2 Kb/β2 + Ov Pep
SC2 Kb/β2 + NP Pep
10% rat ConA sup
MEDIA

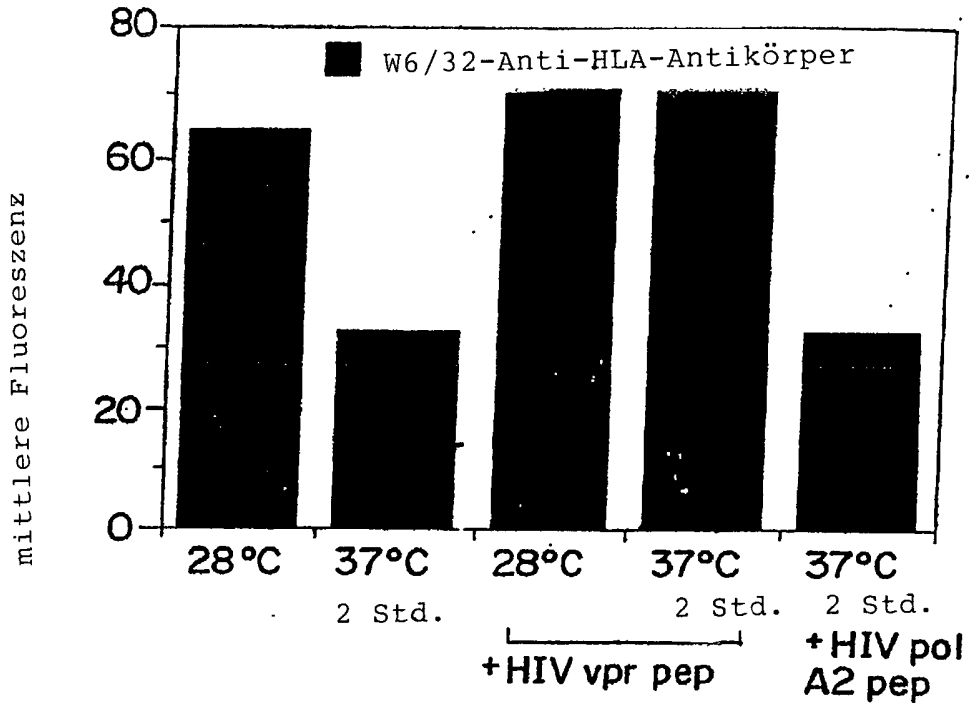


FIG.5A-1

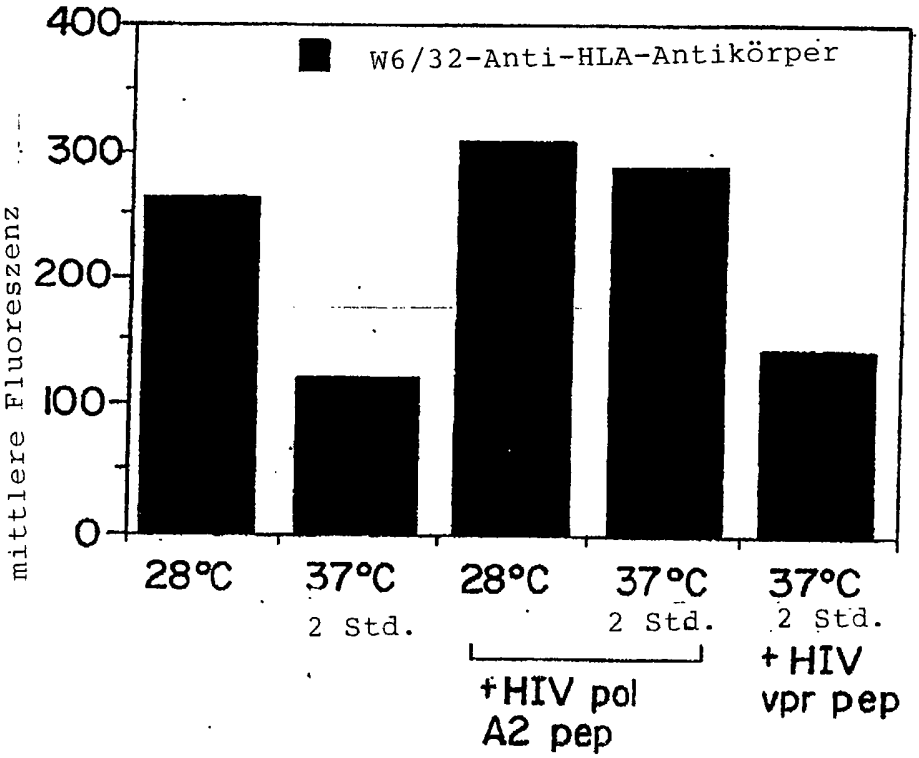


FIG.5A-2

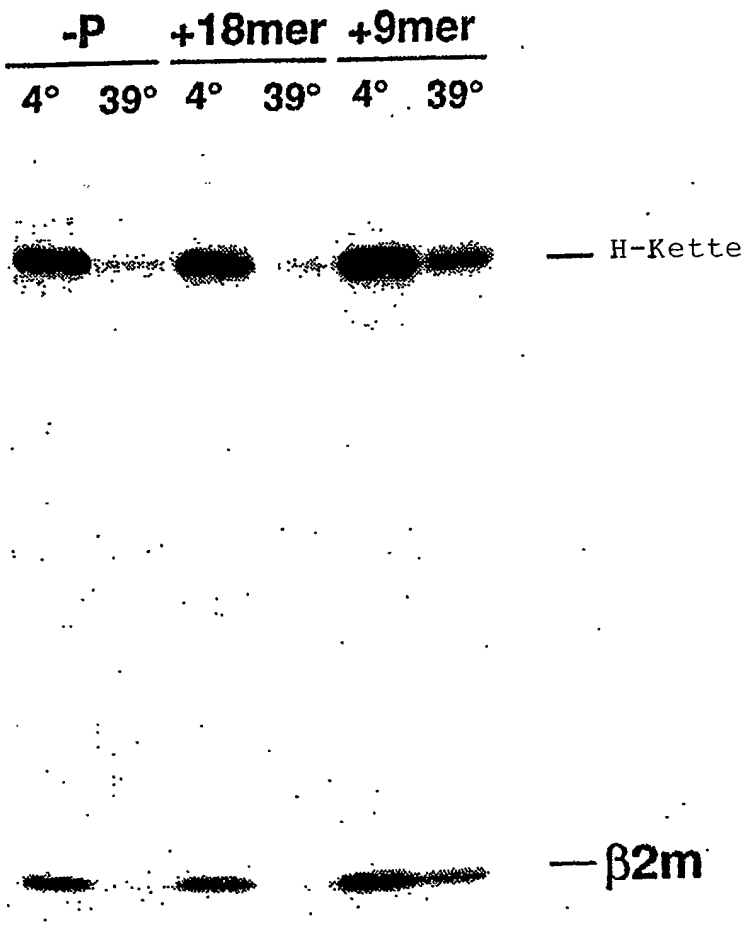


FIG. 5B

Stabilisierung von HLA A2.2 in Triton X100-Lysaten durch Peptid

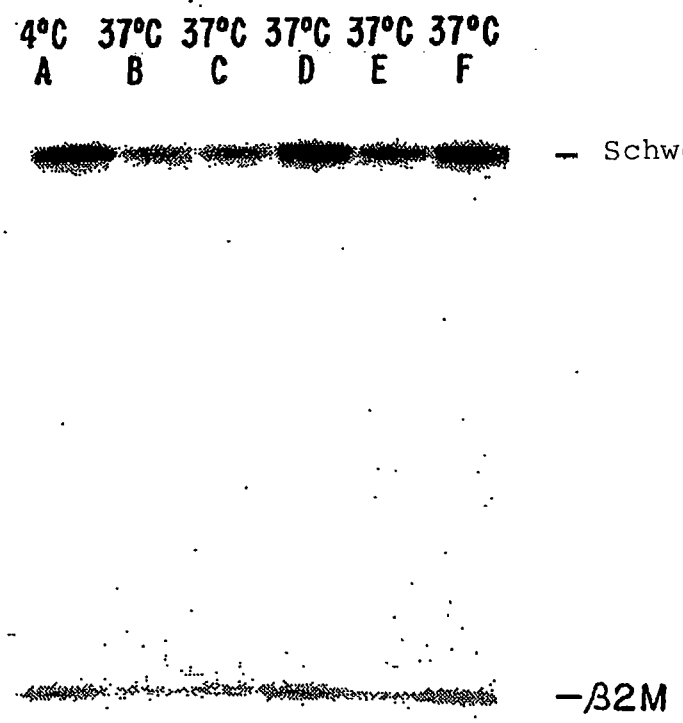


FIG.5C

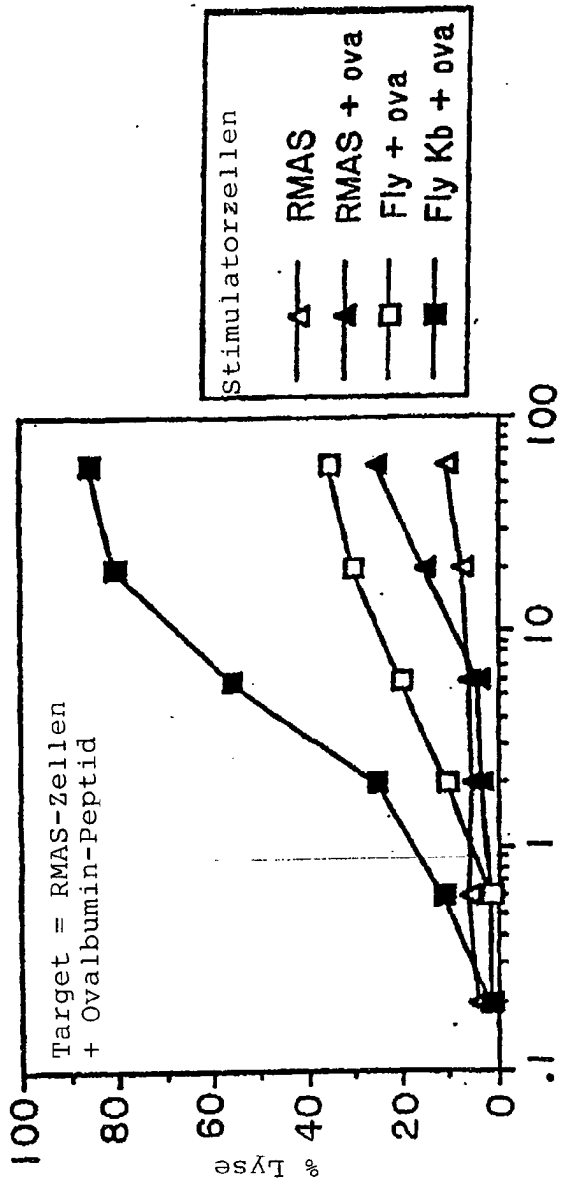

Stimulatorzellen
RMAS
RMAS + ova
Fly + ova
Fly Kb + ova
Target = RMAS-Zellen
+ Ovalbumin-Peptid
% Lyse
Effektor/Target-Verhältnis

FIG.6A

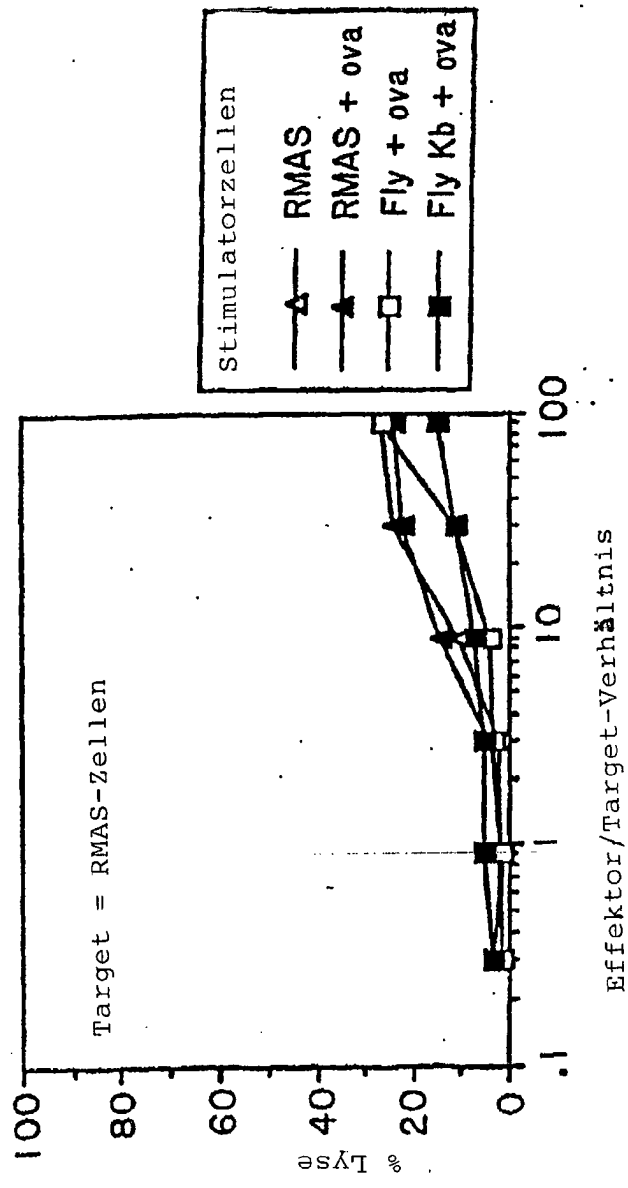
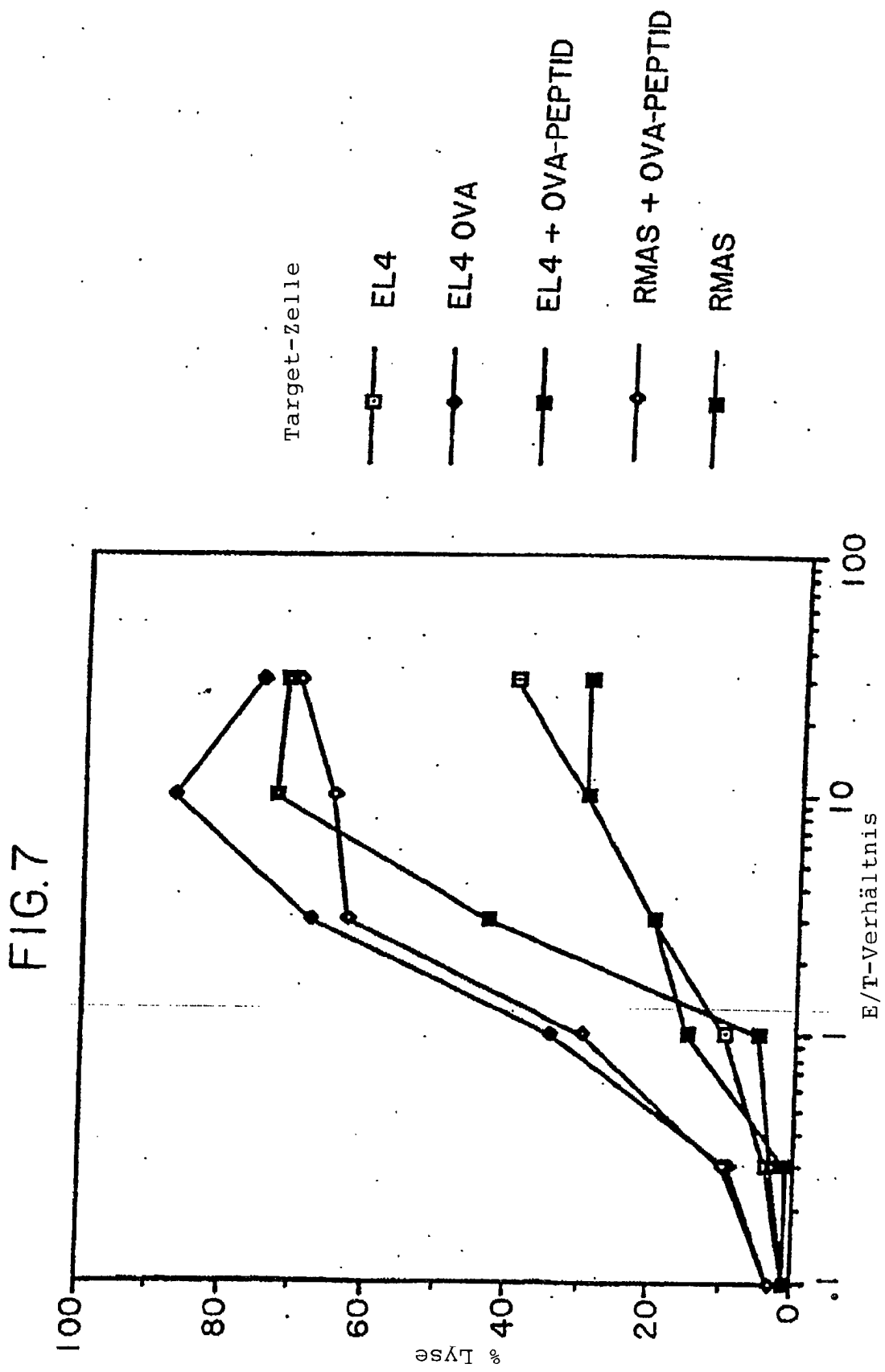

Stimulatorzellen
RMAS
RMAS + ova
Fly + ova
Fly Kb + ova
Target = RMAS-Zellen
% Lyse
Effektor/Target-Verhältnis

FIG.6B

FIG.7


Target-Zelle
EL4
EL4 OVA
EL4 + OVA-PEPTID
RMAS + OVA-PEPTID
RMAS
% Lyse
0
20
40
60
80
100
E/T-Verhältnis
1
10
100

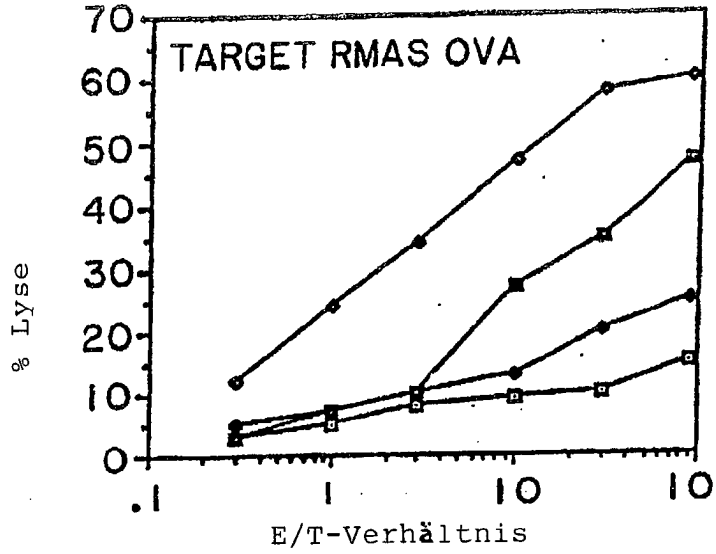


FIG.8A

Stimulator-FLY-Zelle

KB
KB OVA fixiert
KB OVA fixiert+ S/N
KB OVA

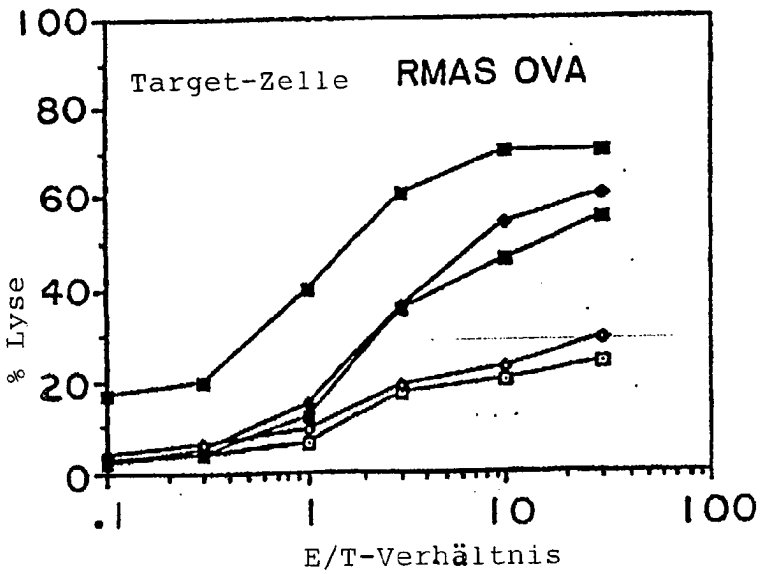


FIG.8B

Stimulator-FLY-Zelle

KB
KB OVA
KBOVA IN VIVO/KB OVA IN VITRO
KBOVA IN VIVO/DBOVA IN VITRO
DB OVA

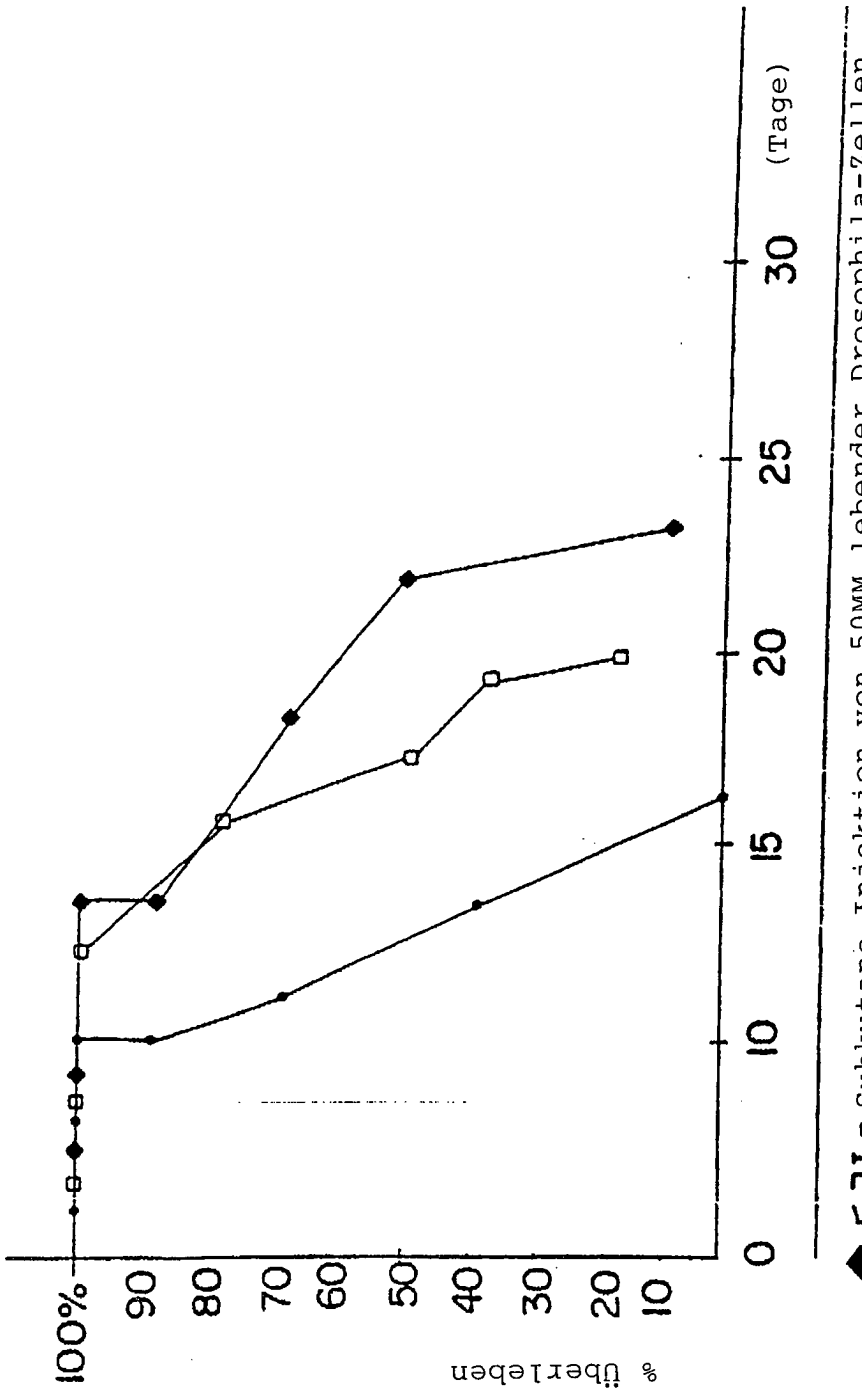

% überleben
100%
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
10
15
20
25
30
(Tage)
I - Subkutane Injektion von 50MM lebender Drosophila-Zellen K^b/OVA 5 Tage nach EL4-Injektion exprimierend
II - Subkutane Injektion von 50MM fixierter Drosophila-Zellen mit K^b/OVA 5 Tage nach EL4-Injektion
III - Kontrollgruppe; keine zusätzliche Injektion nach EL4-Injektion

FIG.9

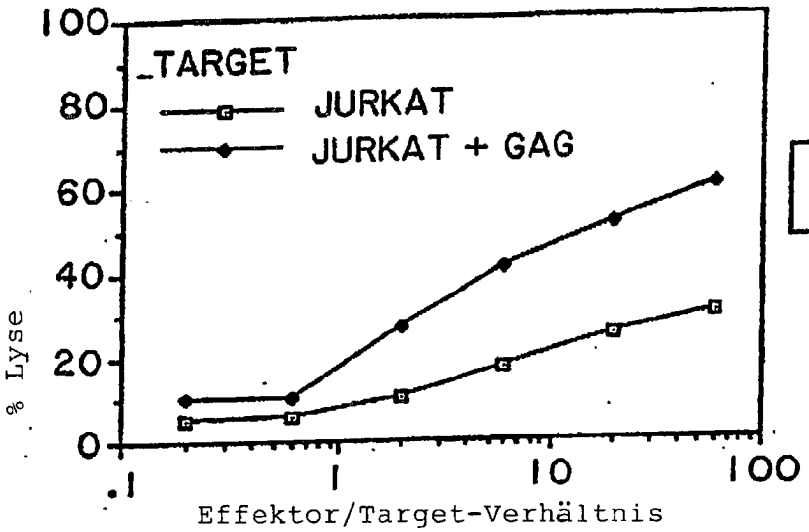


FIG. 10A

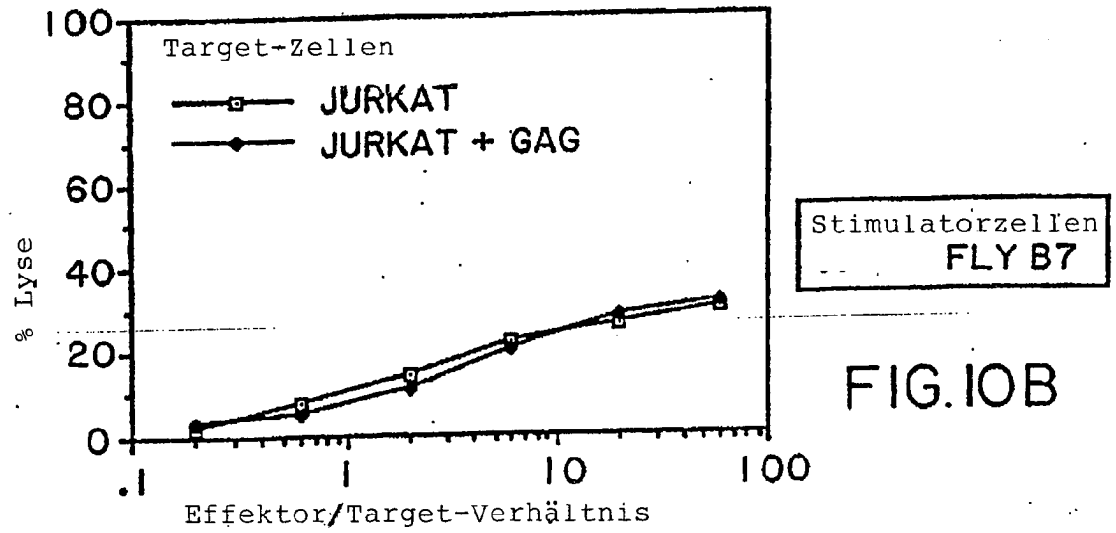


FIG. 10B

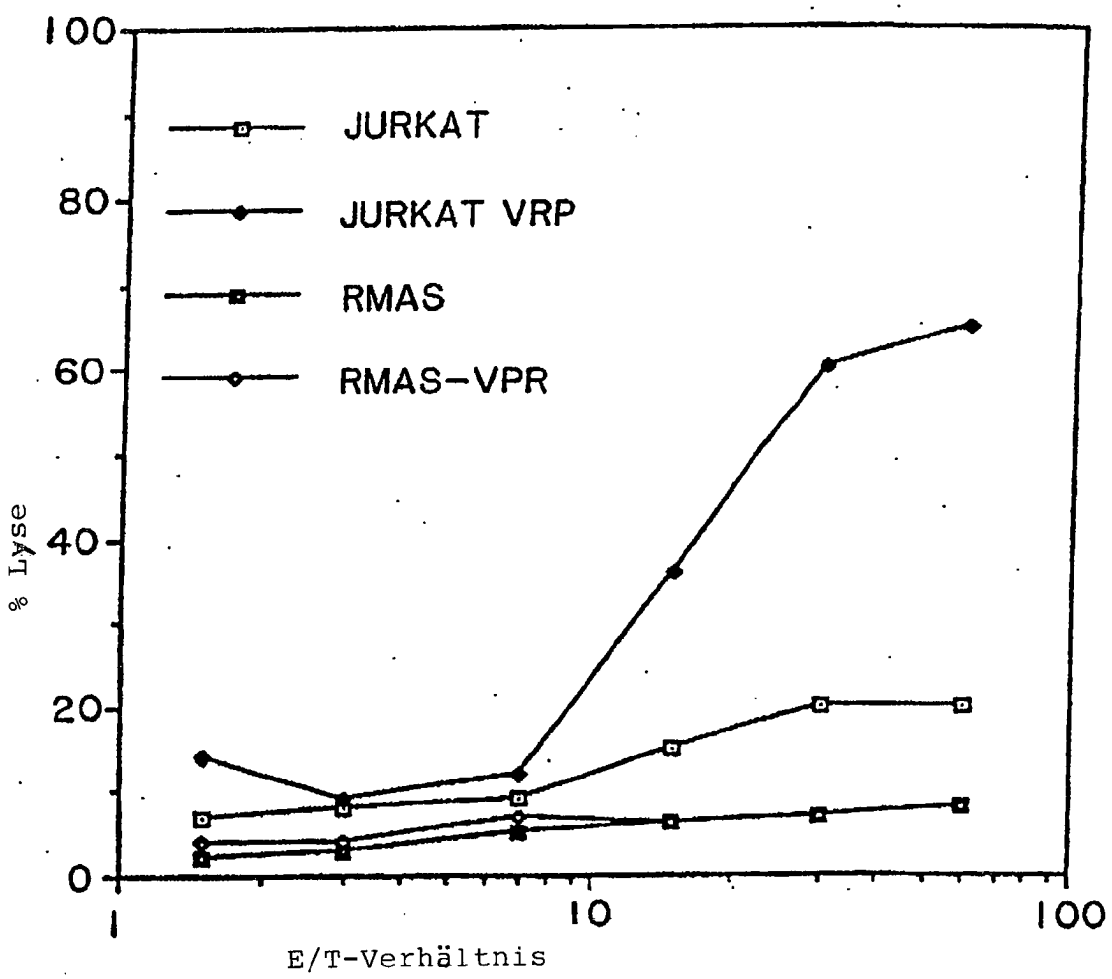

100
80
60
40
20
0
% Lyse
JURKAT
JURKAT VRP
RMAS
RMAS-VPR
1
10
100
E/T-Verhältnis

FIG.10C

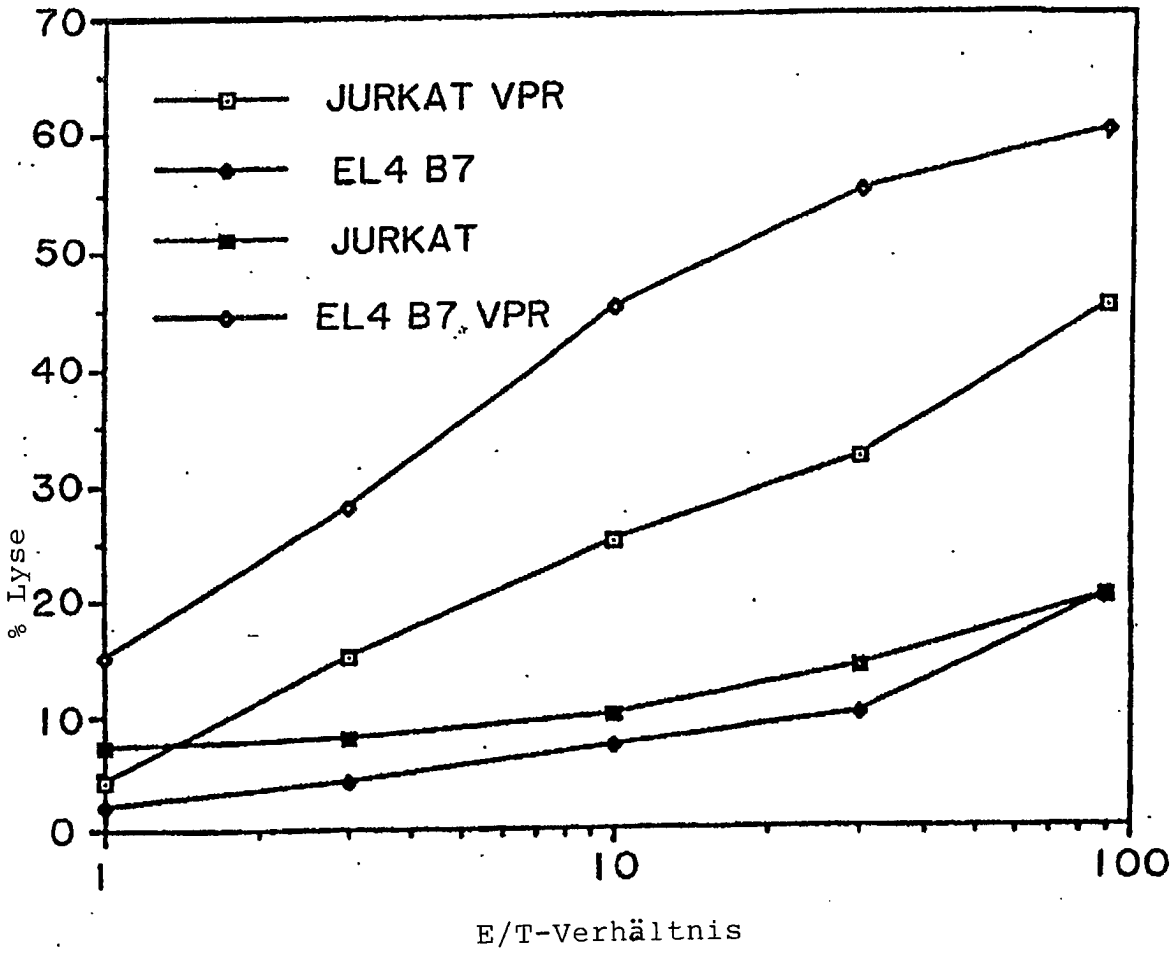

70
60
50
40
30
20
10
0
% Lyse
JURKAT VPR
EL4 B7
JURKAT
EL4 B7 VPR
1
10
100
E/T-Verhältnis

FIG.IIA

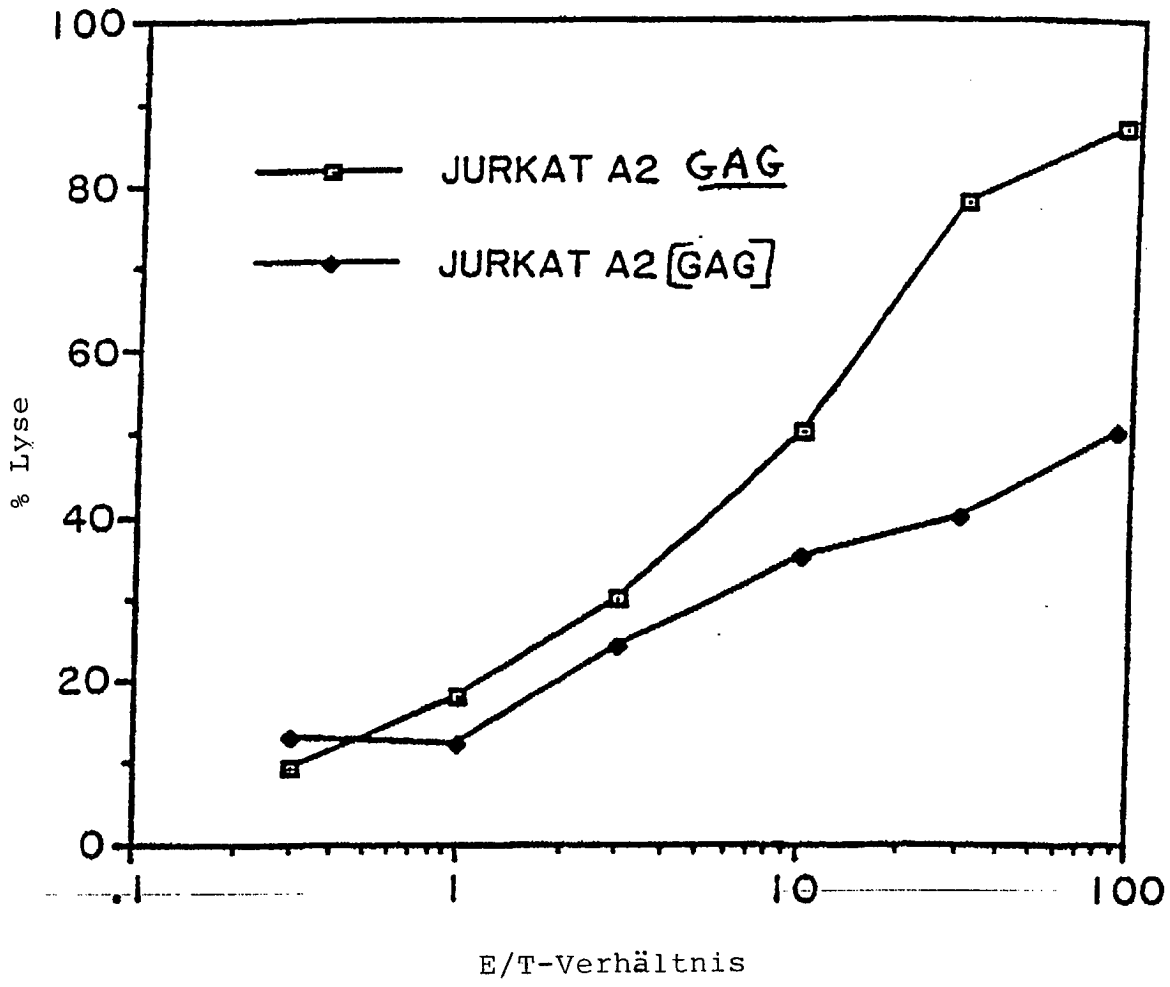

100
80
60
40
20
0
% Lyse
JURKAT A2 GAG
JURKAT A2 [GAG]
0,1
1
10
100
E/T-Verhältnis

FIG.11B

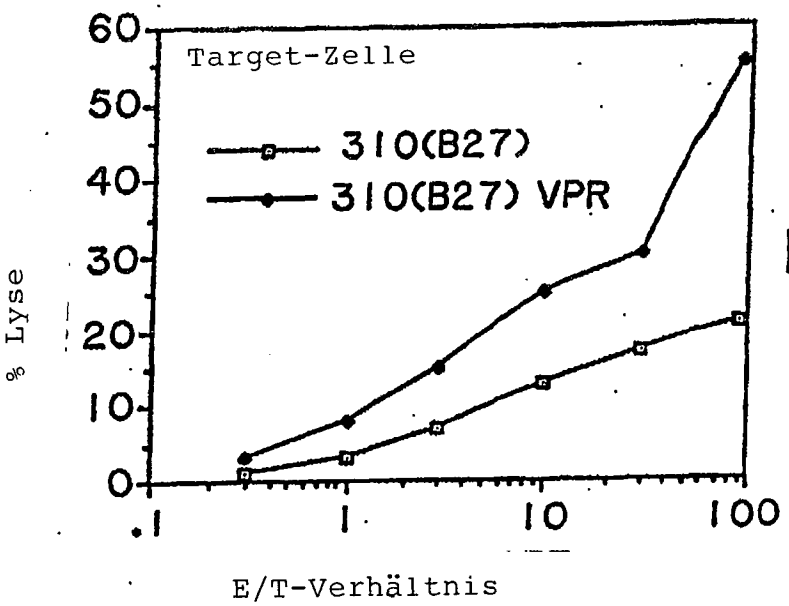


FIG.11C

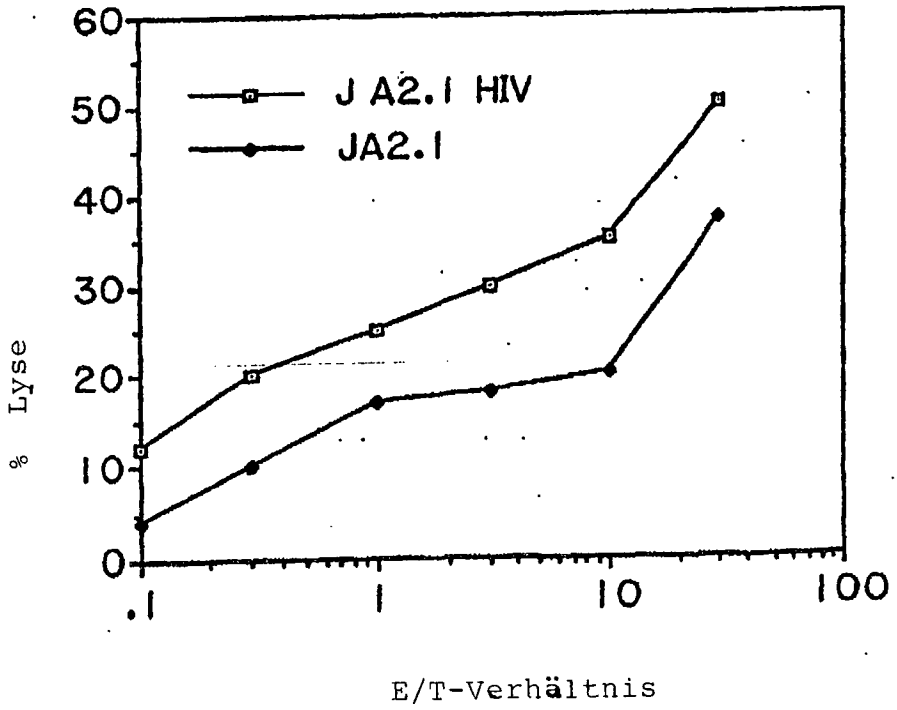


FIG.12