(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
17. November 2005 (17.11.2005)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2005/108427 A2

(51) Internationale Patentklassifikation[7]: C07K 14/705

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2005/004056

(22) Internationales Anmeldedatum:
16. April 2005 (16.04.2005)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2004 022 435.8 6. Mai 2004 (06.05.2004) DE

(71) Anmelder *(für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US)*: **IMUSYN GMBH & CO. KG** [DE/DE]; Feodor-Lynen-Strasse 21, 30625 Hannover (DE).

(72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder *(nur für US)*: **BLASCZYK, Rainer** [DE/DE]; Am Nordberg 3, 30938 Burgwedel (DE).

(74) Anwälte: **KLOIBER, Thomas** usw.; An der Alster 84, 20099 Hamburg (DE).

(81) Bestimmungsstaaten *(soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart)*: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten *(soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:
— *ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts*

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

WO 2005/108427 A2

(54) **Title:** METHOD FOR PRODUCING SOLUBLE MHC PROTEINS

(54) **Bezeichnung:** VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG LÖSLICHER MHC-PROTEINE

(57) **Abstract:** The invention relates to a recombinant, purified MHC protein, which essentially comprises the same conformation, functional activity and binding characteristics for specific antibodies and antigens as the native MHC protein. The invention also relates to a method for producing said protein. To obtain a protein, whose characteristics resemble those of the native protein in the closest possible manner, the protein is soluble and not truncated.

(57) **Zusammenfassung:** Die Erfindung betrifft ein rekombinantes, aufgereinigtes MHC-Protein, welches im wesentlichen die gleiche Konformation, funktionelle Aktivität sowie die Bindungseigenschaften für spezifische Antikörper und Antigene wie das native MHC-Protein aufweist sowie ein Verfahren zur Herstellung des Proteins. Um ein Protein zu erhalten, was dem nativen Protein in der Gesamtheit dieser Eigenschaften möglichst nahe kommt, wird vorgeschlagen, dass es löslich und nicht trunkiert ist.

Verfahren zur Herstellung löslicher MHC-Proteine

Die Erfindung betrifft ein rekombinantes, aufgereinigtes MHC-Protein, welches im wesentlichen die gleiche Konformation, funktionelle Aktivität sowie die Bindungseigenschaften für spezifische Antikörper, Peptide, T-Zellrezeptoren und NK-Zellen und Antigene wie das native MHC-Protein aufweist.

Humane Leukozyten Antigene, oder abgekürzt HLA Moleküle sind innerhalb der adaptiven Immunabwehr von zentraler Bedeutung. Ihre Funktion besteht darin, an der Zelloberfläche Peptide gegenüber T-Lymphozyten zu präsentieren. Die Antigenspezifität der T-Zellen hängt dabei vom Major Histokompatibility Complex, abgekürzt MHC, Genotyp ab, was als MHC Restriktion bezeichnet wird. Diese MHC-gebundene Spezifität stellt die Basis für die Fähigkeit des Immunsystems dar, zwischen Selbst und Nicht-Selbst, z.B. Infektionserregern, viral infizierten Zellen oder Allotransplantaten, zu unterscheiden. Die Gene des HLA Komplexes sind auf dem kurzen Arm von Chromosom 6, 6p21, lokalisiert. Aus historischen Gründen werden drei MHC Regionen unterschieden, die zentromerwärts als Klasse II oder Klasse III sowie telomerwärts als Klasse I bezeichnet werden. Insbesondere HLA Klassen I und II sind durch einen enormen allelischen Polymorphismus gekennzeichnet, welcher nach jetzigem Kenntnisstand unter anderem 540 HLA-B Allele, und 418 HLA-DRB Allele umfasst. Bei HLA Klasse I Molekülen handelt es sich um heterodimere Glykolproteine, welche aus einer schweren, variablen α-Kette und einer leichten, invariablen β-Kette, β2-Mikroglobulin, zusammengesetzt sind. Teile der α1 und α2 Domänen bilden zusammen die Peptid-bindende Region PBR. In dieser grubenartigen Vertiefung der Plattformstruktur werden okta- bis undecamere Fragmente aus endogenen Proteinen nichtkovalent gebunden, und gegenüber $CD8^+$

zytotoxischen T-Zellen präsentiert. Die α1 und α2 Domänen sind besondere im Bereich der PBR durch einen ausgeprägten Aminosäure Polymorphismus gekennzeichnet, wohingegen die Variabilität in den weiteren Molekülabschnitten wesentlich geringer ist.

Auch bei HLA Klasse II handelt es sich um heterodimere Moleküle. Diese bestehen aus jeweils einer αund einer β Kette, welche sich im Molekulargewicht geringfügig voneinander unterscheiden. Bei HLA Klasse II sind beide Ketten mit ihrer α1 bzw. β1 Domäne gemeinsam an der Bildung der Plattformstruktur beteiligt. Im Gegensatz zu HLA Klasse I werden hier über den exogenen Antigenpräsentationsweg aufgenommene Proteinfragmente mit einer Länge von 15-24 AS präsentiert. HLA Klasse II Moleküle werden auf professionell antigenpräsentierenden Zellen (Makrophagen, dendritische Zellen, B-Lymphozyten) sowie auf aktivierten T-Zellen exprimiert. Die Präsentation der Peptide erfolgt gegenüber $CD4^+$ inflammatorischen T-Zellen oder T-Helferzellen. Die bei HLA Klasse I Molekülen an den α1 und α2 Domänen, und bei HLA Klasse II in den α1 und β1 Domänen vorhandenen Aminosäure Polymorphismen legen das Peptidbindungsverhalten des jeweiligen HLA Moleküls sowie die Konformation der präsentierten Peptide fest.

Aufgrund der in den industrialisierten Ländern bestehenden geringen durchschnittlichen Familiengröße kann nur bei ca. 30 % der für eine Stammzellentransplantation in Frage kommenden Patienten ein HLA genotypisch identischer Geschwisterspender zur Verfügung gestellt werden. Aus diesem Grunde werden mit steigender Häufigkeit Blutstammzellen von HLA gematchten Fremdspendern transplantiert. Ein wesentliches Problem bei der allogenen Blutstammzellentransplantation stellt die Graft-versus-host Erkrankung (GVHD) dar, bei welcher Donor-Lymphozyten allogene HLA Merkmale im Empfängergewebe erkennen. Der Einfluss von HLA Mismatchen auf das Risiko der Entwicklung einer

schweren akuten GVHD oder einer Transplantatabstoßung (Host-versus-graft Reaktion) wurde in einer Reihe von Studien untersucht. In der überwiegenden Mehrzahl der Untersuchungen stellten sich HLA Klasse I Mismatche, insbesondere für HLA-A und B, als deutliche Risikofaktoren sowohl in GVH, als auch in der Host-versus-graft (HVG) Richtung heraus. Hinsichtlich HLA Klasse II waren bei der überwiegenden Mehrzahl der Studien insbesondere Mismatche an den Genorten, welche DRB1 und DQB1, welche die ß-Ketten der HLA-DR und DQ Merkmale codieren, mit einem erhöhten Risiko für die Entstehung einer schweren akuten GVHD verbunden. Die Bedeutung von Mismatchen am DPB1 Genort wird derzeit kontrovers diskutiert. Hinsichtlich der übrigen HLA Klassen II Genorte liegen derzeit für eine Bewertung deren Transplantationsrelevanz zuwenig Daten vor. Unter Berücksichtigung der gegenwärtigen Datenlage besteht in Deutschland derzeit der Konsensus, dass bei der allogenen Blutstammzellentransplantation des HLA Matching von Donor und Rezipient die HLA Klasse I Merkmale HLA-A und B, d.h. niedrigauflösende Typisierung auf Allelgruppenebene, sowie die Klasse II Genorte DRB1 und DQB1, d.h. hochauflösende molekulargenetische Untersuchung auf Allelebene umfassen soll. Am Stichtag 22. Juli 2003 standen weltweit 8.575.256 potenzielle Stammzellspender bzw. Nabelschnurbluteinheiten zur Verfügung, wobei diese Zahl aufgrund von Informationskampagnen und Aufrufen zur Stammzellspende kontinuierlich wächst. Somit kann davon ausgegangen werden, dass zukünftig für eine wachsende Zahl von Patienten mehrere phänotypisch HLA identische Fremdspender verfügbar sein werden, und die Anforderungen an die Spender-Empfängerauswahl z. B. durch Erhöhung der Untersuchungsgenauigkeit oder durch Einbeziehung weiterer Merkmale erhöht werden können.

Die Organtransplantation stellt heute ein standardisiertes Verfahren zur Behandlung von Organversagen dar. Die am häufigsten transplantierten Organe betreffen Herz, Leber, Lunge, Niere und Pankreas. Im Jahr 2003

wurden im Eurotransplantverbund Belgien, Deutschland, Luxemburg, Niederlande, Österreich, Slovenien ca. 3.500 Nieren, 1.100 Lebern, 400 Pankreas, 600 Herzen und 300 Lungen transplantiert.

Nach gegenwärtigem wissenschaftlichen Kenntnisstand ist die Gewebeverträglichkeit zwischen Spender und Empfänger in der Übereinstimmung der Antigene des HLA-Systems begründet. Für Nieren- und Herztransplantationen werden die besten Ergebnisse bei völliger Identität des HLA-Antigene zwischen Spender und Empfänger erzielt. Es besteht kein Zweifel, dass immunologische Abstoßreaktionen gegen diese Organe in ihrer Inzidenz und Stärke deutlich vermindert und therapeutisch besser beherrschbar sind, wenn eine höchstmögliche Übereinstimmung für die HLA-Antigene besteht. Für die Transplantation von Leber, Lunge und Pankreas konnte klinisch bisher nicht nachgewiesen werden, dass durch HLA-Übereinstimmungen zwischen Patienten und Spender das immunologische Abstoßungsrisiko vermindert werden kann. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass präformierte oder nach Transplantationen gebildete spenderspezifische anti-HLA-Antikörper in jedem Fall zu einer humoralen Abstoßung bis zum Funktionsverlust des transplantierten Organs führen.

Die Detektion von anti-HLA Antikörpern ist im Rahmen der Transplantation von Blutstammzellen und soliden Organen ein zentraler Bestandteil der Prä- und Posttransplantations-Diagnostik. Bei allen Patienten zur Stammzellentransplantation und allen Patienten, die auf den Wartelisten zur Transplantation solider Organe geführt werden, erfolgt immer vor Transplantation und in Abhängigkeit vom klinischen Verlauf nach Transplantation ein Screening nach HLA-Antikörpern. Bei Patienten zur Nierentransplantation wird dieses Screening gemäß den Richtlinien der Eurotransplant Foundation sogar quartalsweise durchgeführt, um HLA-Antikörper-positive Patienten auf den Wartelisten sicher zu identifizieren.

In ca. 20 % der Patienten werden HLA-Antikörper gefunden, die zur Charakterisierung nicht transplantabler HLA Antigene in weiteren Untersuchungen spezifiziert werden müssen. Die zum Screening und zur Spezifizierung verwendeten Methoden basieren auf Zytotoxizitätstechniken mit vitalen Lymphozyten oder ELISA Techniken mit aus Zelllinien gewonnenen natürlichen HLA Molekülen. Aufgrund der Co-Expression aller HLA Loci sowie dem Kopplungsungleichgewicht zwischen Allelen der verschiedenen HLA Loci ist eine Identifizierung der Antikörperspezifitäten dadurch nur sehr eingeschränkt möglich. Bei hochimmunisierten Patienten ist eine Spezifierung der Antikörper mit diesen Techniken in fast keinem Fall möglich. Aber gerade in diesem Fällen ist die Identifizierung akzeptabler Mismatche, d. h., von HLA Antigenen, gegen die keine Antikörper gebildet worden sind, besonders bedeutsam, da dies häufig die einzige Chance bietet, einen kompatiblen Spender zu ermitteln.

Durch die Verwendung rekombinanter humaner MHC-Proteine, rhMHC, können diese Restriktionen durch Verwendung eines definierten Antigens pro Reaktion als ELISA oder durch durchflusszytometrische Technik gelöst werden. Durch Verwendung aller rhMHC Antigene pro Reaktion kann zudem ein effektives Antikörper-Screening System etabliert werden. Mit rhMHC kann weiterhin die Problematik der begrenzten Verfügbarkeit seltener HLA-Allele für Screeningzwecke gelöst werden. Rekombinante humane MHC stehen seit kurzem als prokaryote und eukaryote Proteine zur Verfügung, die nach den unten beschriebenen Verfahren hergestellt werden können.

Das langfristige Ziel einer allogenen Blutstammzellentransplantation SCT ist zum einen die Etablierung einer dauerhaften T-Zellantwort gegen MHC restringierte Tumorantigene und zum anderen die Entstehung einer Toleranz gegenüber gesunden Zellen. Das Potential allogener T-Zellen für

die Kontrolle von malignem Zellwachstum ist aus der engen Kopplung zwischen Graft versus Host GvH und Graft versus Leukemia (GvL) Reaktion bekannt und konnte eindrucksvoll durch die Reinduktion von Remissionen durch T-Zellen nach Stammzelltransplantationen gezeigt werden. Unter Berücksichtigung der bislang enttäuschenden Ergebnisse der autologen Immuntherapie maligner Erkrankungen mit einerseits modifizierten Tumorzellen, Tumorlysaten oder Hybridzellen und andererseits Ansätzen zur spezifischen Peptid-, Protein- oder DNA-Vakzinierungen kann vermutet werden, dass eine erfolgreiche Immuntherapie eher im allogenen als im autologen System zu erwarten ist. In die gleiche Richtung weisen die bisherigen Daten zur Identifizierung tumorassoziierter T-Zellepitope. Der allogene Ansatz beinhaltet auf der anderen Seite den wesentlichen Nachteil der Abstoßung und der schweren GvH Reaktion, die einem generellen Einsatz von Stammzellen zur Zeit entgegenstehen. Um den Verlauf eines allogenen Ansatzes therapeutisch gezielter steuern zu können, ist die Charakterisierung von MHC Liganden sowie deren gewebespezifische bzw. tumorspezifische Präsentation ein unumgängliches Ziel. Dazu war der Abschluss des Humanen Genomprojektes ein wesentlicher Meilenstein, der es in zunehmenden Maße ermöglicht, komplette zellspezifische Expressionsprofile zu definieren und der die Basis für das Nachfolgeprojekt der genomweiten Identifizierung von Single Nucleotide Polymorphismen (SNP) liefert. Mit zunehmendem Voranschreiten des SNP Projektes ist unmittelbar eine stetige Identifizierung potentieller allogen relevanter MHC Liganden zu erwarten. Eine vergleichbare Entwicklung ist in der Infektionsbiologie mit fortschreitender Aufklärung mikrobieller Genome und MHC allelspezifischer Peptidbindungsmotive zu erwarten.

Virus-spezifische und die Mehrzahl alloreaktiver T-Zellen erkennen MHC Moleküle in Peptid-abhängiger Weise. Die Identifizierung und Klonierung

Virus- und Allopeptid-restringierter T-Lymphozyten ist mit konventionellen Methoden (Zytotoxizität oder Zytokineexpression) technisch sehr schwierig und mit einem sehr hohen Anteil unspezifischer Ergebnisse belastet. Mit Hilfe prokaryonter tetramerer HLA Komplexe konnten Peptid-selektive $CD8^+$ T-Zellen nach viralen Infektionen sowie bei Autoimmunerkrankungen und Tumorpatienten direkt nachgewiesen werden. Neben der direkten Visualisierung konnte gezeigt werden, dass Tetramere zur Sortierung und Klonierung allorestringierter CTLs geeignet sind. Parallel mit der Identifizierung potentieller allogener und mikrobieller MHC Liganden wird der Bedarf nach rhMHC steigen, die mit diesen Liganden bestückt für die Identifizierung targetierbarer T-Zellepitope eingesetzt werden können. Sobald MHC allelspezifische T-Zellepitope identifiziert worden sind, kann die Kaskade diagnostischer und therapeutischer Applikationen einsetzen. Das gleiche gilt für die Detektion von NK-Zellen, deren Rezeptoren Liganden für MHC-Proteine darstellen. Hier ist jedoch noch unklar, ob diese Interaktion Peptid-selektiv oder unabhängig vom präsentierten Peptid erfolgt.

Rekombinante humane MHC-Proteine können in Prokaryonten oder Eukaryonten hergestellt werden. Die Herstellung in Eukaryonten erfolgt entweder trunkiert oder komplett. Die trunkierte Variante wird wie bei der prokaryonten Expression ohne den transmembranen Abschnitt und ohne den cytoplasmatischen Abschnitt exprimiert. Dadurch fehlt dem rekombinanten Molekül die Möglichkeit der Verankerung in der Zellmembran, so dass das Protein von den Zellen sezerniert wird. Ein solches Protein ist in der US-Offenlegungsschrift 2003/0191286 A1 beschrieben. Bei diesem Protein besteht der Nachteil, dass dem Protein der cytosolische Schwanz fehlt, obwohl er zum löslichen Teil des Proteins gehört.

Bei der Herstellung kompletter rekombinanter Moleküle wird das Protein in der Zellmembran exprimiert. Hierbei liegt der Nachteil aber darin, dass keine löslichen Proteine produziert werden.

Die Herstellung in Prokaryonten erfolgt als trunkiertes Molekül, wobei das Molekül ohne den transmembranen Abschnitt und ohne die cytoplasmatischen Abschnitte exprimiert wird. Dabei werden die einzelnen Ketten unabhängig in Prokaryonten exprimiert und in vitro zu einem funktionsfähigen MHC Molekül gefaltet. Neben dem Fehlen des cytosolischen Schwanzes bestehen die Nachteile dieser Methode darin, dass der Faltungsaufwand sehr hoch ist, den Proteinen die natürliche Glykosilierung fehlt und in der Regel nur ein einziges synthetisch hergestelltes Peptid, das zur Faltung verwendet wird, präsentiert wird.

Aufgabe der Erfindung ist es deshalb, ein MHC-Protein und ein Verfahren zu seiner Herstellung vorzuschlagen, welches löslich ist, aber dennoch die gleiche Faltung, Aktivität und die außerhalb der Membran für Antikörper zugänglichen Epitope aufweist, wie das native Protein.

Eine Lösung dieser Aufgabe sieht überraschenderweise vor, dass das rekombinante Protein löslich und nicht trunkiert, also am Ende abgeschnitten, ist. Hierdurch ergeben sich mehrere Vorteile. Durch die Löslichkeit ist zum einen die Ausbeute bei der Produktion der rekombinanten Proteine höher. Die Proteine verbleiben nicht in oder auf der Zellmembran, sondern werden sezerniert. Dadurch sind sie leichter zu ernten, weil sie nur noch aus dem Überstand des Zellkultivierungsmediums abgeschöpft werden brauchen. Zum anderen werden die produzierenden Zellen nicht beschädigt oder zerstört, was bei membranenständigen Proteinen nötig ist, um diese aus oder von der Membran zu entfernen. Auch hierdurch wird die Ausbeute verbessert. Durch ihre Löslichkeit sind die Proteine in Lösung stabiler und besser

aufzubewahren. Da die meisten physiologischen Reaktionen in wässriger Lösung ablaufen, ist es von Vorteil, wenn auch die als Reagenz verwendeten Proteine löslich sind. Hierdurch sind sie vielseitig verwendbar. Weitere Vorteile des erfindungsgemäßen Proteins ergeben sich dadurch, dass es nicht trunkiert ist. Bei herkömmlichen löslichen MHC-Proteinen ist die Aminosäuresequenz ab der Position komplett abgeschnitten, die den Beginn der transmembranen Domäne darstellt. Die Trunkierung kann beispielsweise durch eine geeignete Protease vollzogen werden. Nach dem üblichen Verfahren geschieht dies dadurch, dass mittels PCR die Nucleotidsequenz nur bis zu dem Exon amplifiziert wird, welches vor dem den Membranteil kodierenden Exon liegt. Hierdurch wird dieses Exon zwar nicht amplifiziert, allerdings auch alle in der Sequenz folgenden Exons nicht, die die intrazelluläre Domäne des Proteins kodieren. Diese Domäne kann aber für die Funktion und Konformation wichtig sein. Außerdem ist sie Träger von Epitopen für gegen MHC gerichtete spezifische Antikörper. Daher ist es von erheblichem Vorteil, wenn ein rekombinantes MHC-Protein diese Domäne aufweist.

Die transmembrane Domäne des MHC-Proteins sorgt für dessen Verankerung in der Membran und verursacht die lipophilen Eigenschaften des Proteins, die eine Löslichkeit verhindern. Das MHC-Protein kann nun dadurch in ein lösliches Protein überführt werden, dass es keine transmembrane Domäne aufweist. Dies kann dadurch erreicht werden, dass beispielsweise beim Klasse 1 Allel mittels PCR und geeigneter Primer nur die Allelabschnitte bzw. Exons amplifiziert werden, welche für die hydrophilen Domänen, also α1, α2, α3 und den Schwanzteil kodieren, während das den transmembranen Teil kodierende Exon nicht amplifiziert wird. Wird die so amplifizierte ununterbrochene Basensequenz mittels geeigneter Methoden zur Expression des Proteins verwendet, dann bleibt der C-terminale Anteil des Proteins im wesentlichen unverändert. Das Protein weist also alle Domänen einschließlich des cytosolischen

Schwanzes mit Ausnahme des transmembranen Teils auf. Eine andere Möglichkeit besteht darin, im Prinzip das gesamte Protein einschließlich des Membranteiles zu exprimieren, aber diesen hinsichtlich seiner Aminosäuresequenz zu modifizieren. Beispielweise können ein oder mehrere Codons innerhalb des den Membranteil kodierenden Exons verändert werden, so dass hydrophobe gegen hydrophile Aminosäuren ausgetauscht werden. Der Austausch eines Codons kann auch bezwecken, dass die Konformation der transmembranen Domäne funktionell derart verändert wird, dass sie ihre Verankerungsfunktion nicht mehr erfüllen kann und somit das gesamte Protein löslich wird. Hierzu kann bereits der Austausch eines Codons bzw. einer Aminosäure ausreichend sein.

Dadurch dass das rekombinante MHC-Protein einen cytosolischen Schwanz aufweist, hat es annähernd die gleiche Konformation, funktionelle Aktivität und Epitop-Struktur wie das native Protein.

Vorteilhaft ist es, dass das erfindungsgemäße rekombinante MHC-Protein die Glykolisierung des nativen MHC-Proteins aufweist. An Proteine gebundene Kohlenhydrate sind essentiell für die Konformation und Funktion dieser Proteine. Die Glykolisierung ist außerdem wichtig für die Erkennung von MHC-Proteinstrukturen durch Komponenten des Immunsystems, beispielsweise Antikörpern.

Das rekombinante MHC-Protein lässt sich dadurch isolieren, dass es mittels Affinitätschromatographie und/oder Gelchromatographie aufgereinigt wird. Eine einfache Methode zur affinitätschromatographischen Aufreinigung besteht in der Anwendung eines monoklonalen Antikörpers gegen die tag-Sequenzen der rekombinanten Moleküle z. B. antis-His, anti-V5.

Das rekombinante MHC-Protein kann ein HLA-Protein der Klasse I oder der Klasse II sein. Wie oben beschrieben wurde, werden rekombinante HLA-Proteine, also humane MHC-Proteine, dringend zum Screening von Transplantationspatienten benötigt.

Wenn das rekombinante MHC-Protein an seiner Peptid-bindenden Region ein dort gebundenes endogenes Peptid aufweist, hat dies eine Reihe von Vorteilen. Zum einen kann das MHC-Protein zum Nachweis des präsentierten Peptids durch Edman Sequenzierung und Massenspektrometrie des eluierten Peptides verwendet werden. Dadurch lassen sich zum einen Peptidbindungsmotive des betreffenden HLA Allels nachweisen und zum anderen die in der jeweiligen Zelle exprimierten Proteine, die dann als Peptid in dem rekombinanten HLA Molekül erscheinen, identifizieren. Zum anderen kann der Nachweis von Peptidbindungsmotiven für Vakzineentwicklungen bedeutsam sein. Außerdem kann der Nachweis von Peptiden aus endogen synthetisierten Proteinen der transfizierten oder transduzierten Zelle in Tumorzellen Hinweise auf relevante Tumorantigene liefern. Weiterhin kann der Nachweis von Peptiden aus endogen synthetisierten Proteinen der transfizierten oder transduzierten Zelle in natürlicherweise oder experimentell virusinfizierten Zellen Hinweise auf relevante Virusantigene liefern, die für Vakzineentwicklungen bedeutsam sein können.

Das beschriebene rekombinante MHC-Protein wird im wesentlichen nach folgendem Verfahren hergestellt:

a) Aufreinigung eines MHC Allels bestehend aus gDNA oder cDNA oder RNA.

b) PCR (Polymerase Chain Reaction) Amplifikation des MHC Allels von Exon 1 bis Exon 4 mit zwei geeigneten Primern, vorzugsweise mit dem Anfangs-Primer AE1S und dem End-Primer AE4AS.

c) PCR Amplifikation eines MHC Allels, vorzugsweise des Allels des

ersten oder zweiten Verfahrensschrittes, bis zum Ende der kodierenden Sequenz, die je nach MHC Allel in Exon 7 oder 8 liegt, also von Exon 6 bis Exon 7 oder Exon 8 mit zwei geeigneten Primern, vorzugsweise mit dem Anfangs-Primer AE6S_FS und dem End-Primer AE8AS_WOS, wobei der Anfangs-Primer, vorzugsweise AE6S_FS, eine 5´ Sequenz enthält, die zum 3´ Ende von Exon 4 komplementär ist, so dass über diese Sequenz eine Fusionssequenz hergestellt werden kann, und wobei der End-Primer, vorzugsweise AE8AS_WOS, kein Stoppcodon enthält. Dadurch können Teile des Vektors 3´wärts vom Insert in das Transcriptat übernommen werden, die für eine tag-Markierung kodieren.

d) gemeinsame PCR Amplifikation der beiden so erhaltenen Allelabschnitte als eine ununterbrochene Sequenz mittels zweier geeigneter Primer, insbesondere unter Verwendung des Anfangs-Primers aus Verfahrensschritt b, vorzugsweise AE1S, und des End-Primers aus Verfahrensschritt c, vorzugsweise AE8AS_WOS.

e) Klonierung der amplifizierten ununterbrochenen Sequenz in einen Klonierungsvektor, der auch als Expressionsvektor geeignet ist z. B. pcDNA3.1, so dass ein Vektor-Insert Konstrukt entsteht, wie z.B. HLAΔE5pcDNA3.1. Alternativ kann auch ein einfacher Klonierungsvektor verwendet werden und das klonierte Insert später in einen beliebigen Expressionsvektor umkloniert werden. Das klonierte PCR Produkt enthält kein Stoppcodon, so dass auch Teile des Vektors 3´wärts vom Insert, in das Transcriptat übernommen werden können. Dadurch können Sequenzen, die für eine tag-Markierung kodieren und aus dem Vektor stammen, mit übernommen werden. Alternativ könnte der tag, der beliebig gewählt werden kann, auch im Primer AE8AS enthalten sein. In diesem Fall wird der Primer mit einem Stoppcodon 3´wärts vom tag versehen.

f) Expansion des so erhaltenen Plasmids in geeigneten Prokaryonten, vorzugsweise in kompetenten E. coli, und anschließende kontoaminationsfreie Aufreinigung des Plasmids z. B. mit Endofree

Plasmid-Aufreinigungskit, so dass transfektierbare Plasmide gewonnen werden.

g) Transfektion von eukaryonten Zellen oder Zelllinien, z. B. K562 oder C1R Zellen, mit dem Plasmid. Die Transfektion kann mit einer beliebigen Methode, z. B. Elektroporation, Lipofektion oder Calciumchlorid-Transfektion erfolgen. Die eukaryonten Zellen können beliebige Zellen sein, die natürlicherweise MHC Moleküle bilden können. Es können auch Zellen verwendet werden, die z.B. wegen fehlender Expression der zweiten Kette des MHC Moleküls bzw. der β2-Microglobulin bei HLA Klasse I, keine MHC Moleküle bilden können. In diesem Fall kann die fehlende Kette in einem weiteren Plasmid oder im gleichen Plasmid wie das beschriebene Insert co-transfiziert werden. Bei MHC Klasse II muss die zweite Kette, die α-Kette bei HLA Klasse II, co-transfiziert werden, da sie ebenfalls in der Membran verankert ist. Die co-transfizierte Kette kann auf die gleiche Weise wie das beschriebene Insert hergestellt werden oder durch Trunkierung der zweiten Kette, so dass nur der extrazelluläre Teil dieser Kette gebildet wird, erfolgen. Bei einer Transduktion wird homolog vorgegangen. Die transfizierten oder transduzierten Zellen bilden dann die rekombinanten MHC Moleküle, die in das umgebende Medium sezerniert werden, da den rekombinanten MHC Klasse I Molekülen der normalerweise durch Exon 5 kodierte transmembrane Abschnitt und den MHC Klasse II Molekülen der normalerweise durch Exon 4 kodierte transmembrane Abschnitt fehlt. Die rekombinanten MHC Moleküle können in einem ELISA nachgewiesen werden. Dazu können monoklonale Antikörper gegen MHC, z. B. w6/32 gegen HLA Klasse I, oder gegen den tag des Proteins, z. B. Anti-His oder Anti-V5 verwendet werden.

h) Die gentechnisch veränderten Zellen oder Zelllinien können in Zellkulturflaschen und anderen Zellkulturtechniken kultiviert und expandiert werden. Aus dem Überstand können die sezernierten, rekombinanten MHC Moleküle kontinuierlich geerntet werden. Alternativ

können die produzierten Zelllinien auch in Hohlfaser-Bioreaktoren, z. B. der Firma Biovest (BioVest International, Inc., 8500 Evergreen Blvd. NW, Minneapolis, MN 55433, USA), kultiviert werden und das Medium kontinuierlich geerntet werden.

i) Aberntung der von den Zellen sezernierten, rekombinanten MHC-Moleküle.

j) Die rekombinanten Moleküle können gelchromatographisch und affinitätschromatorgraphisch aus dem geernteten Medium isoliert und gereinigt werden. Eine einfache Methode zur affinitätschromatographischen Aufreinigung besteht in der Anwendung eines monoklonalen Antikörpers gegen die tag-Sequenzen der rekombinanten Moleküle (z. B. antis-His, anti-V5).

Die beiden folgenden Tabellen zeigen jeweils in Tabelle 1 die genomische Organisation von HLA Klasse I Genen und in Tabelle 2 die genomische Organisation von HLA Klasse II Genen. Hierbei sind jeweils die nicht kodierenden Introns und die kodierenden Exons unter Angabe der Länge der Basenpaare bp und der korrespondierenden Aminosäureposition gezeigt.

Transkribierte Region (mRNA)	Größe (bp)	Nichtkodierende Region	Größe (bp)	Aminosäure Position
5´UT	23	**Promotor**	200	
Exon 1	73	**Intron 1**	130	-24 - -1
Exon 2	270	**Intron 2**	241	1 - 90
Exon 3	276	**Intron 3**	601	91 - 182
Exon 4	276	**Intron 4**	97	183 - 274
Exon 5	117	**Intron 5**	438	275 - 313
Exon 6	33	**Intron 6**	140	314 - 324
Exon 7	48	**Intron 7**	169	325 - 340
Exon 8	5			341
3´UT	405			
Gesamtgröße	1,5 kb		2,0 kb	341 AS
Gesamtgröße des Gens	3,5 kb			
Gesamtgröße des Proteins				341 AS

Tabelle 1 HLA Klasse I

Transkribierte Region (mRNA)	Größe (bp)	Nichtkodierende Region	Größe (bp)	Aminosäure Position
5´UT	62	**Promotor**	>200	
Exon 1	100	**Intron 1**	8500	-29 - +4
Exon 2	270	**Intron 2**	2250-2740	5 - 94
Exon 3	282	**Intron 3**	700	95 - 188
Exon 4	111	**Intron 4**	470	189 - 225
Exon 5	24	**Intron 5**	300-840	226 - 233
Exon 6	14			234 - 238
3´UT	>365			
Gesamtgröße	1,2 kb		12,4 – 13,5 kb	238 AA
Gesamtgröße des Gens	13.6 – 14.7 kb			
Gesamtgröße des Proteins				238 AA

Tabelle 2 HLA Klasse II

Die Erfindung wird in einer bevorzugten Ausführungsform unter Bezugnahme auf eine Zeichnung beispielhaft beschrieben, wobei weitere vorteilhafte Einzelheiten den Figuren der Zeichnung zu entnehmen sind.

Die Figuren der Zeichnung zeigen im Einzelnen:

Figur 1: Eine schematische Darstellung der genomischen Organisation von HLA Klasse I Genen;

Figur 2: eine schematische Darstellung der genomischen Organisation wie in Figur 2, aber von HLA Klasse II Genen und

Figur 3: eine schematische Darstellung der PCR Strategie am Beispiel von HLA-A.

Figur 1 zeigt eine schematische Darstellung der genomischen Organisation von HLA Klasse I Genen. Hierbei ist die Nucleotidsequenz des Gens links von 5' nach rechts Richtung 3' dargestellt. Die Exons sind

als Kästchen E1 bis E8 gezeigt, wobei der N-Terminus mit E1 beginnt und der C-Terminus an E8 endet. E1 ist das Signalpeptid SP, welches nach der intrazellulären Synthese des Proteins für den Transport über die Membran verantwortlich ist und E2 und E3 kodieren die α1 und α2 Domänen. Diese sind genetisch variabel und deshalb für die Bindung des endogenen Peptids verantwortlich. Die konservierte Region wird von den Exons E4 bis E8 gebildet. E 4 kodiert die α3 Domäne, E5 den Membranteil TM und die Exons E6 bis E8 CP den cytosolischen Schwanz.

Figur 2 zeigt eine schematische Darstellung der genomischen Organisation wie in Figur 2, aber von HLA Klasse II Genen.

Figur 3 zeigt eine schematische Darstellung der PCR Strategie am Beispiel von HLA-A. Es wird somit das wesentliche Prinzip der Erfindung dargestellt. Die Figur zeigt die Gensequenz wie in Figur 1, aber ohne Introns. Zunächst werden mittels PCR mit dem ersten Anfangs-Primer AE1S und dem ersten End-Primer AE4AS die kodierende Sequenz von Exon 1 bis Exon 4 amplifiziert. Dann wird vom gleichen Allel Exon 6 bis Exon 8 mit dem zweiten Anfangs-Primer AE6S_FS und dem zweiten End-Primer AE8AS_WOS amplifiziert. AE6S_FS enthält dabei eine 5´ Sequenz, die zum 3´ Ende von Exon 4 komplementär ist, so dass über diese Sequenz eine Fusionssequenz hergestellt werden kann. Die beiden so erhaltenen Sequenzen als eine ununterbrochene Sequenz werden zusammen mit AE1S als Anfangsprimer, und AE8AS_WOS als End-Primer amplifiziert. Es entsteht dadurch wieder die ursprüngliche ununterbrochene Sequenz, der allerdings das Exon 5 fehlt. Mit der Sequenz kann dann das nahezu native Protein ohne Membranteil in löslicher Form hergestellt werden.

Auf diese Weise ist ein lösliches rekombinante MHC Protein vorgeschlagen, das nicht trunkiert ist, und so auf überraschende Weise einen unveränderten C-Terminus aufweist.

PATENTANSPRÜCHE

1. Rekombinantes, aufgereinigtes MHC-Protein, welches im wesentlichen die gleiche Konformation, funktionelle Aktivität sowie die Bindungseigenschaften für spezifische Antikörper und Antigene wie das native MHC-Protein aufweist, **dadurch gekennzeichnet**, dass es löslich und nicht trunkiert ist.

2. Rekombinantes MHC-Protein nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass es keine transmembrane Domäne oder eine transmembrane Domäne aufweist, welche hinsichtlich ihrer Aminosäuresequenz modifiziert ist.

3. Rekombinantes MHC-Protein nach Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet**, dass es einen cytosolischen Schwanz aufweist.

4. Rekombinantes MHC-Protein nach Anspruch 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, dass es die Glykolisierung des nativen MHC-Proteins aufweist.

5. Rekombinantes MHC-Protein nach Anspruch 1 bis 4, **dadurch gekennzeichnet**, dass es mittels Affinitätschromatographie und/oder Gelchromatographie aufgereinigt ist.

6. Rekombinantes MHC-Protein nach Anspruch 1 bis 5, **dadurch gekennzeichnet**, dass es ein HLA-Protein der Klasse I oder der Klasse II ist.

7. Rekombinantes MHC-Protein nach Anspruch 1 bis 6, **dadurch gekennzeichnet**, dass es an seiner Peptid-bindenden Region ein dort gebundenes endogenes Peptid aufweist.

8. Rekombinantes MHC-Protein nach Anspruch 1 bis 7, **dadurch gekennzeichnet**, dass es im Wesentlichen nach folgendem Verfahren hergestellt ist:

a) Aufreinigung eines MHC Allels bestehend aus gDNA oder cDNA oder RNA,

b) PCR (Polymerase Chain Reaction) Amplifikation des MHC Allels von Exon 1 bis Exon 4 mit zwei geeigneten Primern, vorzugsweise mit dem Anfangs-Primer AE1S und dem End-Primer AE4AS,

c) PCR Amplifikation eines MHC Allels, vorzugsweise des Allels des ersten oder zweiten Verfahrensschrittes, von Exon 6 bis Exon 7 oder Exon 8 mit zwei geeigneten Primern, vorzugsweise mit dem Anfangs-Primer AE6S_FS und dem End-Primer AE8AS_WOS, wobei der Anfangs-Primer, vorzugsweise AE6S_FS, eine 5´ Sequenz, die zum 3´ Ende von Exon 4 komplementär ist, enthält, und wobei der End-Primer, vorzugsweise AE8AS_WOS, kein Stoppcodon enthält,

d) gemeinsame PCR Amplifikation der beiden so erhaltenen Allelabschnitte als eine ununterbrochene Sequenz mittels zweier geeigneter Primer, insbesondere unter Verwendung des Anfangs-Primers aus Verfahrensschritt b, vorzugsweise AE1S, und des End-Primers aus Verfahrensschritt c, vorzugsweise AE8AS_WOS,

e) Klonierung der amplifizierten ununterbrochenen Sequenz in einen Klonierungsvektor, der auch als Expressionsvektor geeignet ist, oder alternativ Umklonierung des Klonierungsvektors in einen Expressionsvektor,

f) Expansion des so erhaltenen Plasmids in geeigneten Prokaryonten, vorzugsweise E. coli, und anschließende Aufreinigung des Plasmids,

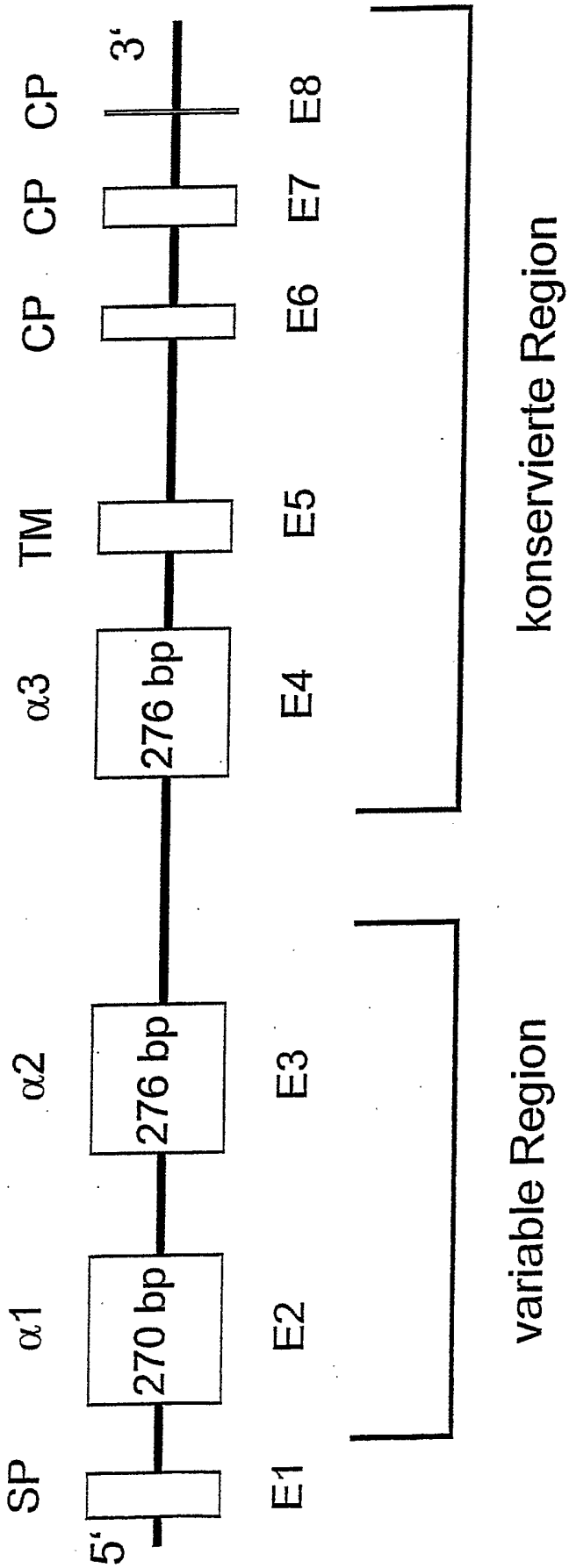
g) Transfektion oder Transduktion von eukaryonten Zellen oder Zelllinien mit dem so gewonnenen Plasmid,
h) Kultivierung und Expansion der Zellen oder Zelllinien mit geeigneten Methoden,
i) Aberntung der von den Zellen sezernierten, rekombinanten MHC-Moleküle und
j) Aufreinigung der Proteine mittels Affinitätschromatographie und/oder Gelchromatographie.

9. Verfahren zur Herstellung eines löslichen rekombinanten Proteins bestehend aus mindestens einer membranständigen und/oder transmembranen Domäne und einer oder mehrerer Domänen außerhalb der Membran, wobei ein das Protein kodierendes Gen jeweils für die Aminosäuresequenz jeder der Domänen kodierende Exons aufweist, **dadurch gekennzeichnet**, dass mittels PCR durch Wahl geeigneter Primer das oder die in einer Richtung der Sequenz benachbarten Exons amplifiziert werden, welche außerhalb der Membran befindliche Domänen kodieren und sich in genannter Richtung vor dem oder den Exons befinden, welches oder welche die Membran-Domäne kodiert, dann mittels PCR durch Wahl geeigneter Primer die in einer Richtung der Sequenz benachbarten Exons amplifiziert werden, welche außerhalb der Membran befindliche Domänen kodieren und sich in genannter Richtung hinter dem oder den Exons befinden, welches oder welche die Membran-Domäne kodiert, die so amplifizierten Sequenzen mittels PCR und geeigneter Primer als ununterbrochene Sequenz amplifiziert werden, die ununterbrochene Sequenz , als Klonierungsvektor und/oder Expressionsvektor kloniert und/oder in Zellen expandiert wird, die so modifizierten das Protein ohne Membranteil produzierenden Zellen kultiviert werden und die exprimierten löslichen Proteine

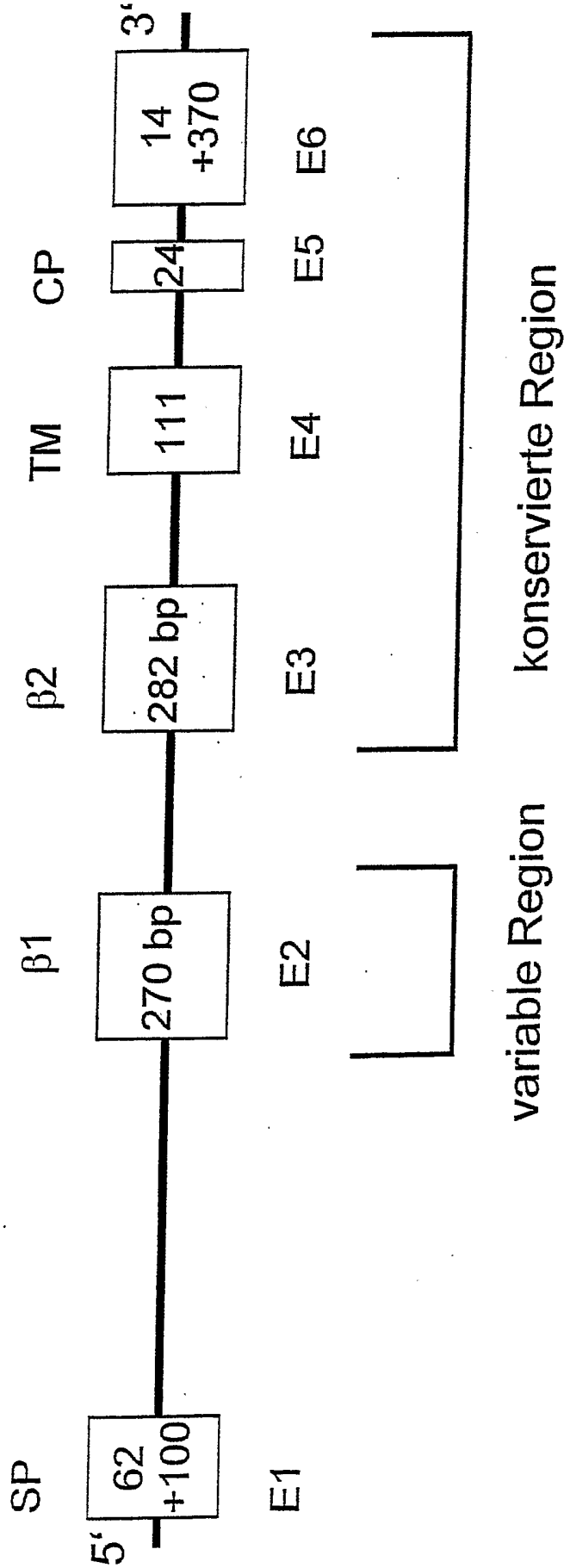
abgeernet und mittels üblicher oder sonstiger geeigneter Verfahren aufgereinigt werden.

10. Verwendung des MHC-Proteins nach Anspruch 1 bis 8, **dadurch gekennzeichnet**, dass es zum Nachweis von anti-HLA Antikörpern, zum Nachweis von T-Zellen oder NK-Zellen, zur Durchführung von Peptidbindungs-Assays oder zum Nachweis der vom rekombinanten Protein präsentierten Peptide durch Edman Sequenzierung und Massenspektrometrie verwendet wird.

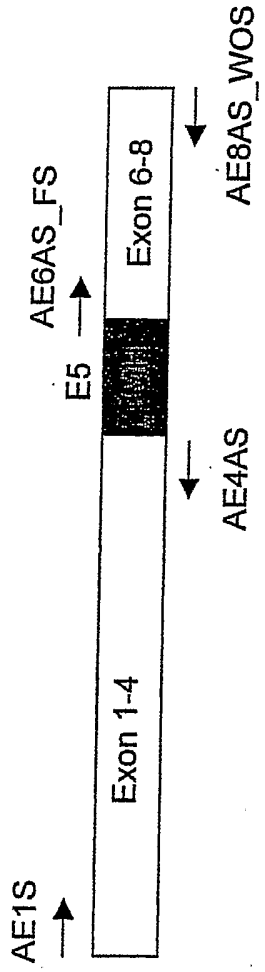
Figur 1


5'
SP
α1
270 bp
α2
276 bp
α3
276 bp
TM
CP
CP
CP
3'
E1
E2
E3
E4
E5
E6
E7
E8
variable Region
konservierte Region

Figur 2


5'
SP
62
+100
E1
β1
270 bp
E2
β2
282 bp
E3
TM
111
E4
CP
24
E5
14
+370
E6
3'
variable Region
konservierte Region

Figur 3



Imusyn.ST25.txt
SEQUENCE LISTING

<110> Imusyn GmbH & Co. KG

<120> Verfahren zur Herstellung löslicher MHC-Proteine

<130> 2123

<140> DE 10 2004 022 435.8
<141> 2004-05-06

<160> 15

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1
<211> 18
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 1
gagatggccg tcatggcg 18

<210> 2
<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 2
ccatctcagg gtgaggggct 20

<210> 3
<211> 40
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 3
ccctcaccct gagatgggat agaaaaggag ggagctactc 40

<210> 4

<211> 22

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 4
cactttacaa gctgtgagag ac 22

<210> 5

<211> 1098

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5
atggccgtca tggcgccccg aaccctcgtc ctgctactct cgggggccct ggccctgacc 60
cagacctggg cgggctccca ctccatgagg tatttctaca cctccgtgtc ccggcccggc 120
cgcggggagc cccgcttcat cgccgtgggc tacgtggacg acacgcagtt cgtgcggttc 180
gacagcgacg ccgcgagcca gaggatggag ccgcgggcgc cgtggataga gcaggagggg 240
ccggagtatt gggaccggaa cacacggaat gtgaaggccc agtcacagac tgaccgagtg 300
gacctgggga ccctgcgcgg ctactacaac cagagcgagg acggttctca caccatccag 360
aggatgtatg gctgcgacgt ggggccggac gggcgcttcc tccgcgggta ccagcaggac 420
gcttacgacg gcaaggatta catcgccctg aacgaggacc tgcgctcttg gaccgcggcg 480
gacatggcgg ctcagatcac ccagcgcaag tgggagacgg cccatgaggc ggagcagtgg 540
agagcctacc tggagggccg gtgcgtggag tggctccgca gatacctgga gaacgggaag 600
gagacgctgc agcgcacgga cgcccccaag acgcatatga ctcaccacgc tgtctctgac 660
catgaggcca ccctgaggtg ctgggccctg agcttctacc ctgcggagat cacactgacc 720
tggcagcggg atggggagga ccagacccag gacacggagc tcgtggagac caggcctgca 780
ggggatggga ccttccagaa gtgggcgtct gtggtggtgc cttctggaca ggagcagaga 840
tacacctgcc atgtgcagca tgagggtctg cccaagcccc tcaccctgag atgggagccg 900
tcttcccagc ccaccatccc catcgtgggc atcattgctg gcctggttct ctttggagct 960
gtgatcgctg gagctgtggt cgctgctgtg atgtggagga ggaagagctc agatagaaaa 1020
ggagggagct actctcaggc tgcaagcagt gacagtgccc agggctctga tatgtctctc 1080
acagcttgta aagtgtga 1098

Imusyn.ST25.txt

<210> 6

<211> 365

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Met Ala Val Met Ala Pro Arg Thr Leu Val Leu Leu Leu Ser Gly Ala
1 5 10 15

Leu Ala Leu Thr Gln Thr Trp Ala Gly Ser His Ser Met Arg Tyr Phe
20 25 30

Tyr Thr Ser Val Ser Arg Pro Gly Arg Gly Glu Pro Arg Phe Ile Ala
35 40 45

Val Gly Tyr Val Asp Asp Thr Gln Phe Val Arg Phe Asp Ser Asp Ala
50 55 60

Ala Ser Gln Arg Met Glu Pro Arg Ala Pro Trp Ile Glu Gln Glu Gly
65 70 75 80

Pro Glu Tyr Trp Asp Arg Asn Thr Arg Asn Val Lys Ala Gln Ser Gln
85 90 95

Thr Asp Arg Val Asp Leu Gly Thr Leu Arg Gly Tyr Tyr Asn Gln Ser
100 105 110

Glu Asp Gly Ser His Thr Ile Gln Arg Met Tyr Gly Cys Asp Val Gly
115 120 125

Pro Asp Gly Arg Phe Leu Arg Gly Tyr Gln Gln Asp Ala Tyr Asp Gly
130 135 140

Lys Asp Tyr Ile Ala Leu Asn Glu Asp Leu Arg Ser Trp Thr Ala Ala
145 150 155 160

Asp Met Ala Ala Gln Ile Thr Gln Arg Lys Trp Glu Thr Ala His Glu
165 170 175

Ala Glu Gln Trp Arg Ala Tyr Leu Glu Gly Arg Cys Val Glu Trp Leu
180 185 190

Arg Arg Tyr Leu Glu Asn Gly Lys Glu Thr Leu Gln Arg Thr Asp Ala
195 200 205

Pro Lys Thr His Met Thr His His Ala Val Ser Asp His Glu Ala Thr
210 215 220

Leu Arg Cys Trp Ala Leu Ser Phe Tyr Pro Ala Glu Ile Thr Leu Thr
225 230 235 240

Trp Gln Arg Asp Gly Glu Asp Gln Thr Gln Asp Thr Glu Leu Val Glu
245 250 255

Thr Arg Pro Ala Gly Asp Gly Thr Phe Gln Lys Trp Ala Ser Val Val
260 265 270

Val Pro Ser Gly Gln Glu Gln Arg Tyr Thr Cys His Val Gln His Glu
275 280 285

Gly Leu Pro Lys Pro Leu Thr Leu Arg Trp Glu Pro Ser Ser Gln Pro
290 295 300

Thr Ile Pro Ile Val Gly Ile Ile Ala Gly Leu Val Leu Phe Gly Ala
305 310 315 320

Val Ile Ala Gly Ala Val Val Ala Ala Val Met Trp Arg Arg Lys Ser
325 330 335

Ser Asp Arg Lys Gly Gly Ser Tyr Ser Gln Ala Ala Ser Ser Asp Ser
340 345 350

Ala Gln Gly Ser Asp Met Ser Leu Thr Ala Cys Lys Val
355 360 365

<210> 7

<211> 341

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Gly Ser His Ser Met Arg Tyr Phe Tyr Thr Ser Val Ser Arg Pro Gly
1 5 10 15

Arg Gly Glu Pro Arg Phe Ile Ala Val Gly Tyr Val Asp Asp Thr Gln
20 25 30

Phe Val Arg Phe Asp Ser Asp Ala Ala Ser Gln Arg Met Glu Pro Arg
35 40 45

Ala Pro Trp Ile Glu Gln Glu Gly Pro Glu Tyr Trp Asp Arg Asn Thr
50 55 60

Arg Asn Val Lys Ala Gln Ser Gln Thr Asp Arg Val Asp Leu Gly Thr
65 70 75 80

Leu Arg Gly Tyr Tyr Asn Gln Ser Glu Asp Gly Ser His Thr Ile Gln
85 90 95

Arg Met Tyr Gly Cys Asp Val Gly Pro Asp Gly Arg Phe Leu Arg Gly
100 105 110

Tyr Gln Gln Asp Ala Tyr Asp Gly Lys Asp Tyr Ile Ala Leu Asn Glu
115 120 125

Asp Leu Arg Ser Trp Thr Ala Ala Asp Met Ala Ala Gln Ile Thr Gln
130 135 140

Arg Lys Trp Glu Thr Ala His Glu Ala Glu Gln Trp Arg Ala Tyr Leu
145 150 155 160

Glu Gly Arg Cys Val Glu Trp Leu Arg Arg Tyr Leu Glu Asn Gly Lys
165 170 175

Glu Thr Leu Gln Arg Thr Asp Ala Pro Lys Thr His Met Thr His His
180 185 190

Ala Val Ser Asp His Glu Ala Thr Leu Arg Cys Trp Ala Leu Ser Phe
195 200 205

Tyr Pro Ala Glu Ile Thr Leu Thr Trp Gln Arg Asp Gly Glu Asp Gln
210 215 220

Thr Gln Asp Thr Glu Leu Val Glu Thr Arg Pro Ala Gly Asp Gly Thr
225 230 235 240

Phe Gln Lys Trp Ala Ser Val Val Val Pro Ser Gly Gln Glu Gln Arg
245 250 255

Tyr Thr Cys His Val Gln His Glu Gly Leu Pro Lys Pro Leu Thr Leu
260 265 270

Arg Trp Glu Pro Ser Ser Gln Pro Thr Ile Pro Ile Val Gly Ile Ile
275 280 285

Ala Gly Leu Val Leu Phe Gly Ala Val Ile Ala Gly Ala Val Val Ala
290 295 300

Ala Val Met Trp Arg Arg Lys Ser Ser Asp Arg Lys Gly Gly Ser Tyr
305 310 315 320

Ser Gln Ala Ala Ser Ser Asp Ser Ala Gln Gly Ser Asp Met Ser Leu
325 330 335

Thr Ala Cys Lys Val
340

<210> 8
<211> 1116
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 8
atggccgtca tggcgccccg aaccctcgtc ctgctactct cgggggccct ggccctgacc 60
cagacctggg cgggctccca ctccatgagg tatttctaca cctccgtgtc ccggcccggc 120
cgcggggagc cccgcttcat cgccgtgggc tacgtggacg acacgcagtt cgtgcggttc 180
gacagcgacg ccgcgagcca gaggatggag ccgcgggcgc cgtggataga gcaggagggg 240
ccggagtatt gggaccggaa cacacggaat gtgaaggccc agtcacagac tgaccgagtg 300
gacctgggga ccctgcgcgg ctactacaac cagagcgagg acggttctca caccatccag 360
aggatgtatg gctgcgacgt ggggccggac gggcgcttcc tccgcgggta ccagcaggac 420
gcttacgacg gcaaggatta catcgccctg aacgaggacc tgcgctcttg gaccgcggcg 480
gacatggcgg ctcagatcac ccagcgcaag tgggagacgg cccatgaggc ggagcagtgg 540
agagcctacc tggagggccg gtgcgtggag tggctccgca gatacctgga gaacgggaag 600
gagacgctgc agcgcacgga cgcccccaag acgcatatga ctcaccacgc tgtctctgac 660
catgaggcca ccctgaggtg ctgggccctg agcttctacc ctgcggagat cacactgacc 720
tggcagcggg atggggagga ccagacccag gacacggagc tcgtggagac caggcctgca 780
ggggatggga ccttccagaa gtgggcgtct gtggtggtgc cttctggaca ggagcagaga 840
tacacctgcc atgtgcagca tgagggtctg cccaagcccc tcaccctgag atgggataga 900
aaaggaggga gctactctca ggctgcaagc agtgacagtg cccagggctc tgatatgtct 960
ctcacagctt gtaaagtgaa gggcaattct gcagatatcc agcacagtgg cggccgctcg 1020
agtctagagg gcccgcggtt cgaaggtaag cctatcccta accctctcct cggtctcgat 1080
tctacgcgta ccggtcatca tcaccatcac cattga 1116

<210> 9
<211> 135
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 9
aagggcaatt ctgcagatat ccagcacagt ggcggccgct cgagtctaga gggcccgcgg 60
ttcgaaggta agcctatccc taaccctctc ctcggtctcg attctacgcg taccggtcat 120
catcaccatc accat 135

Imusyn.ST25.txt

<210> 10

<211> 117

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 10
agccgtcttc ccagcccacc atccccatcg tgggcatcat tgctggcctg gttctctttg 60

gagctgtgat cgctggagct gtggtcgctg ctgtgatgtg gaggaggaag agctcag 117

<210> 11

<211> 117

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 11
gagccgtctt cccagcccac catccccatc gtgggcatca ttgctggcct ggttctcttt 60

ggagctgtga tcgctggagc tgtggtcgct gctgtgatgt ggaggaggaa gagctca 117

<210> 12

<211> 371

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Met Ala Val Met Ala Pro Arg Thr Leu Val Leu Leu Leu Ser Gly Ala
1 5 10 15

Leu Ala Leu Thr Gln Thr Trp Ala Gly Ser His Ser Met Arg Tyr Phe
20 25 30

Tyr Thr Ser Val Ser Arg Pro Gly Arg Gly Glu Pro Arg Phe Ile Ala
35 40 45

Val Gly Tyr Val Asp Asp Thr Gln Phe Val Arg Phe Asp Ser Asp Ala
50 55 60

Ala Ser Gln Arg Met Glu Pro Arg Ala Pro Trp Ile Glu Gln Glu Gly
65 70 75 80

Pro Glu Tyr Trp Asp Arg Asn Thr Arg Asn Val Lys Ala Gln Ser Gln
85 90 95

Thr Asp Arg Val Asp Leu Gly Thr Leu Arg Gly Tyr Tyr Asn Gln Ser
100 105 110

Glu Asp Gly Ser His Thr Ile Gln Arg Met Tyr Gly Cys Asp Val Gly
115 120 125

Pro Asp Gly Arg Phe Leu Arg Gly Tyr Gln Gln Asp Ala Tyr Asp Gly
130 135 140

Lys Asp Tyr Ile Ala Leu Asn Glu Asp Leu Arg Ser Trp Thr Ala Ala
145 150 155 160

Asp Met Ala Ala Gln Ile Thr Gln Arg Lys Trp Glu Thr Ala His Glu
165 170 175

Ala Glu Gln Trp Arg Ala Tyr Leu Glu Gly Arg Cys Val Glu Trp Leu
180 185 190

Arg Arg Tyr Leu Glu Asn Gly Lys Glu Thr Leu Gln Arg Thr Asp Ala
195 200 205

Pro Lys Thr His Met Thr His His Ala Val Ser Asp His Glu Ala Thr
210 215 220

Leu Arg Cys Trp Ala Leu Ser Phe Tyr Pro Ala Glu Ile Thr Leu Thr
225 230 235 240

Trp Gln Arg Asp Gly Glu Asp Gln Thr Gln Asp Thr Glu Leu Val Glu
245 250 255

Thr Arg Pro Ala Gly Asp Gly Thr Phe Gln Lys Trp Ala Ser Val Val
260 265 270

Val Pro Ser Gly Gln Glu Gln Arg Tyr Thr Cys His Val Gln His Glu
275 280 285

Gly Leu Pro Lys Pro Leu Thr Leu Arg Trp Asp Arg Lys Gly Gly Ser
290 295 300

Tyr Ser Gln Ala Ala Ser Ser Asp Ser Ala Gln Gly Ser Asp Met Ser
305 310 315 320

Leu Thr Ala Cys Lys Val Lys Gly Asn Ser Ala Asp Ile Gln His Ser
325 330 335

Gly Gly Arg Ser Ser Leu Glu Gly Pro Arg Phe Glu Gly Lys Pro Ile
340 345 350

Pro Asn Pro Leu Leu Gly Leu Asp Ser Thr Arg Thr Gly His His His
355 360 365

His His His
370

<210> 13

<211> 24

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

Met Ala Val Met Ala Pro Arg Thr Leu Val Leu Leu Leu Ser Gly Ala
1 5 10 15

Leu Ala Leu Thr Gln Thr Trp Ala
20

<210> 14

<211> 45

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Lys Gly Asn Ser Ala Asp Ile Gln His Ser Gly Gly Arg Ser Ser Leu
1 5 10 15

Glu Gly Pro Arg Phe Glu Gly Lys Pro Ile Pro Asn Pro Leu Leu Gly
20 25 30

Leu Asp Ser Thr Arg Thr Gly His His His His His His
35 40 45

<210> 15

<211> 347

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

Gly Ser His Ser Met Arg Tyr Phe Tyr Thr Ser Val Ser Arg Pro Gly
1 5 10 15

Arg Gly Glu Pro Arg Phe Ile Ala Val Gly Tyr Val Asp Asp Thr Gln
20 25 30

Phe Val Arg Phe Asp Ser Asp Ala Ala Ser Gln Arg Met Glu Pro Arg
35 40 45

Ala Pro Trp Ile Glu Gln Glu Gly Pro Glu Tyr Trp Asp Arg Asn Thr
50 55 60

Arg Asn Val Lys Ala Gln Ser Gln Thr Asp Arg Val Asp Leu Gly Thr
65 70 75 80

Leu Arg Gly Tyr Tyr Asn Gln Ser Glu Asp Gly Ser His Thr Ile Gln
85 90 95

Arg Met Tyr Gly Cys Asp Val Gly Pro Asp Gly Arg Phe Leu Arg Gly
100 105 110

Tyr Gln Gln Asp Ala Tyr Asp Gly Lys Asp Tyr Ile Ala Leu Asn Glu
115 120 125

Asp Leu Arg Ser Trp Thr Ala Ala Asp Met Ala Ala Gln Ile Thr Gln
130 135 140

Arg Lys Trp Glu Thr Ala His Glu Ala Glu Gln Trp Arg Ala Tyr Leu
145 150 155 160

Glu Gly Arg Cys Val Glu Trp Leu Arg Arg Tyr Leu Glu Asn Gly Lys
165 170 175

Glu Thr Leu Gln Arg Thr Asp Ala Pro Lys Thr His Met Thr His His
180 185 190

Ala Val Ser Asp His Glu Ala Thr Leu Arg Cys Trp Ala Leu Ser Phe
195 200 205

Tyr Pro Ala Glu Ile Thr Leu Thr Trp Gln Arg Asp Gly Glu Asp Gln
210 215 220

Thr Gln Asp Thr Glu Leu Val Glu Thr Arg Pro Ala Gly Asp Gly Thr
225 230 235 240

Phe Gln Lys Trp Ala Ser Val Val Val Pro Ser Gly Gln Glu Gln Arg
245 250 255

Tyr Thr Cys His Val Gln His Glu Gly Leu Pro Lys Pro Leu Thr Leu
260 265 270

Arg Trp Asp Arg Lys Gly Gly Ser Tyr Ser Gln Ala Ala Ser Ser Asp
275 280 285

Ser Ala Gln Gly Ser Asp Met Ser Leu Thr Ala Cys Lys Val Lys Gly
290 295 300

Asn Ser Ala Asp Ile Gln His Ser Gly Gly Arg Ser Ser Leu Glu Gly
305 310 315 320

Pro Arg Phe Glu Gly Lys Pro Ile Pro Asn Pro Leu Leu Gly Leu Asp
325 330 335

Ser Thr Arg Thr Gly His His His His His His
340 345