

(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
12. September 2002 (12.09.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/070552 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **C07K 14/47**

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/02187

(22) Internationales Anmeldedatum:
28. Februar 2002 (28.02.2002)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
101 09 854.5 1. März 2001 (01.03.2001) DE

(71) Anmelder und

(72) Erfinder: **STANISLAWSKI, Thomas** [DE/DE];
Schlagstrasse 4, 65193 Wiesbaden (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): **THEOBALT, Matthias**
[DE/DE]; Römerstrasse 16, 55252 Mainz-Kastel (DE).
VOSS, Holger [DE/DE]; Im Bienengarten 23, 55218
Ingelheim (DE).

(74) Anwälte: **SCHOHE, Stefan** usw.; Boehmert & Boehmert,
Pettenkoferstrasse 20-22, 80336 München (DE).

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

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (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.

(54) **Title:** POLYPEPTIDE FROM A HDM2 PROTEIN SPECIFIC MURINE $\text{\$G(A)/\$G(B)}$ T-CELL RECEPTORS, NUCLEIC ACIDS CODING FOR THE ABOVE AND USE THEREOF

(54) **Bezeichnung:** POLYPEPTIDE EINES HDM2-PROTEIN SPEZIFISCHEN MURINEN $\text{\$G(A)/\$G(B)}$ T-ZELL REZEPTORS, DIESE KODIERENDE NUKLEINSÄUREN UND DEREN VERWENDUNG

(57) **Abstract:** The invention relates to polypeptides from a murine α/β T-cell receptor, mediating a hdm2 protein-specific T-cell response, or functional variants or parts thereof, or nucleic acids coding for the above, functional variants, or parts thereof. The effect of the above is that hdm2 protein-expressing cells are recognised by t-cells provided with said genes, cytokines are expressed and a t-cell-induced lysis and/or apoptosis of tumour- or leukaemic-cells is induced.

(57) **Zusammenfassung:** Die Erfindung stellt Polypeptide eines eine hdm2-Protein-spezifische T-Zell Antwort vermittelnden murinen α/β T-Zell Rezeptors oder funktioneller Varianten oder Teile davon oder diese kodierende Nukleinsäuren, funktionelle Varianten oder Teile davon zur Verfügung. Dises bewirken, dass hdm2-Protein-exprimierende Zellen von T-Zellen, die mit jenen Genen ausgestattet wurden, erkannt werden, Zytokine ausgeschüttet werden, und eine Z-Zell-induzierte Lyse und/oder Apoptose von Tumor- oder Leukämiezellen herbeigeführt wird.



A2
WO 02/070552

Polypeptide eines hdm2-Protein spezifischen murinen α/β T-Zell Rezeptors, diese kodierende Nukleinsäuren und deren Verwendung

Beschreibung

Die Erfindung betrifft Polypeptide des eine hdm2-Protein-spezifische T-Zell Antwort vermittelnden murinen α/β T-Zell Rezeptors, diese kodierende Nukleinsäuren und deren Verwendung bei der Therapie, Diagnose und/oder Prävention von mit dem hdm2-Protein assoziierten Erkrankungen.

Die Antigenerkennung durch T-Lymphozyten (TZL) ist entscheidend für die Erzeugung und Regulierung einer effektiven Immunantwort. Der charakteristische T-Zelllinien-Marker ist der T-Zell-Antigen-Rezeptor (TZR). Es gibt zwei definierte Typen von TZR: Einer ist ein Heterodimer von zwei Disulfid-verbundenen Polypeptiden (α und β); der andere ist zwar strukturell ähnlich, besteht jedoch aus γ - und δ -Polypeptiden. Beide Rezeptoren sind mit einem Set von fünf Polypeptiden, dem CD3-Komplex assoziiert und bilden so zusammen den T-Zell Rezeptor-Komplex (TZR-CD3-Komplex). Der α/β -TZR ist der funktionell bedeutendste, da er in über 95% aller T-Zellen exprimiert wird und die tragende Immunantwort vermittelt.

α/β -T-Zellen können in zwei verschiedene sich überschneidende Populationen unterteilt werden: Eine Untergruppe, die den CD4-Marker trägt und hauptsächlich die Immunantwort unterstützt (T_H) und eine Untergruppe, die den CD8-Marker trägt und im wesentlichen zytotoxisch ist (T_C). $CD8^+$ -T-Zellen erkennen Antigene in Assoziation mit MHC-Klasse-I-Molekülen. Solche Antigene können unter anderem tumorspezifische oder tumorassoziierte Peptidantigene sein. Nach Erkennung der Peptidantigene wird die betreffende Zelle abgetötet, indem die T-Zelle die Zielzelle lysiert und/oder Apoptose dieser Zielzellen induziert oder Zytokine (z.B. IL-2, IFN- γ) freisetzt.

Unter den tumorassoziierten Peptidantigenen (TAA), die im Kontext von MHC-Klasse-I-Molekülen auf der Oberfläche von Tumorzellen präsentiert werden, sind die sogenannten „universellen“ TAA von besonderem Interesse. Diese TAA leiten sich überwiegend von zellulären Proteinen ab, die in normalen Zellen schwach exprimiert und in Tumorzellen überex-

primiert werden. Zu diesen Proteinen gehört unter anderem das humane Homolog des „Mouse-Double-Minute-2“ Proto-Antigens (mdm2), das sogenannte „humane mdm2“ oder abgekürzt „hdm2“ Proto-Onkoprotein (Roth et al. 1998), das nicht nur in einer Reihe solider Tumore, sondern auch bei den hämatologischen Neoplasien (malignen hämatologischen Systemerkrankungen) AML, ALL und CLL überexprimiert wird (Zhou et al, 2000).

Oligopeptide des hdm2-Proteins können im Kontext mit MHC-Klasse-I-Molekülen auf der Zelloberfläche präsentiert werden und repräsentieren attraktive Zielstrukturen für CD8-positive T-Zellen. Das Ausmaß der T-Zell Antwort verläuft hierbei in einem definierten kinetischen Fenster (Kersh et al., 1998). Der Komplex aus Peptid-MHC und TZR-CD3 multimerisiert, um eine effiziente Signaltransduktion zu bewirken, wobei die genaue Stöchiometrie und das Ausmaß der Oligomerisierung noch umstritten ist.

Voraussetzung für die Entwicklung immuntherapeutischer Verfahren zur Behandlung von bösartigen Tumorerkrankungen ist die Identifizierung von Onkoprotein-spezifischen T-Zell Rezeptoren. Mit solchen T-Zell Rezeptoren können unter bestimmten Voraussetzungen T-Zellen mit Antigen-Spezifität im allgemeinen und Tumorreaktivität im besonderen versehen werden mit dem Ziel, daß die T-Zellen die Remission und die Eradikation eines bestimmten Tumors herbeiführen. Beschriebene Methoden zur Identifizierung von hochaffinen Peptid-spezifischen TZRs beinhalten die „phage-„ oder „yeast-display“-Methodik (Holler et al., 1999) bzw. eine Tetramer-abhängige „TCR display“-Methodik (Kessels et al., 2000).

Aus Theobald et al. („Targeting p53 as a general tumor antigen“, P.N.A.S. USA 92, pp. 11993-11997, 1995) ist die Herstellung von p53-spezifischen zytotoxischen T-Zellen nach der Injektion von Peptiden aus der Sequenz von p53 bekannt. Mittels dieser T-Zelllinien konnte anschließend eine Auswahl von menschlichen Tumorzellen lysiert werden. Die Isolierung von Genen spezifischer T-Zell Rezeptoren der gegen p53 gerichteten lytischen T-Zellen wird nicht beschrieben. Die WO 97/32603 beschreibt allgemein ein Verfahren zur Herstellung von rekombinanten T-Lymphozyten, die gegen Tumorgewebe gerichtete spezifische T-Zell Rezeptoren exprimieren. Dabei wird eine HLA-transgene Maus (in diesem Fall HLA-A2) mit tumor-assoziiertem Antigen immunisiert, um so die Produktion von zytotoxischen T-Lymphozyten zu bewirken, die spezifische T-Zell Rezeptoren auf ihrer Oberfläche exprimieren. Als tumorassoziierte Antigene werden Peptide verschiedener Gene, wie Her-2/neu, Ras, p53, Tyrosinase, MART, gp100, MAGE, BAGE und MUC-1 beschrieben. Aus den Her-2/neu

spezifischen T-Lymphozyten wird dann die Nukleotidsequenz, die mindestens eine variable Region der α - und β -Kette des entsprechenden nicht menschlichen T-Zell Rezeptors enthält isoliert und in Form verschiedener molekularbiologisch modifizierter genetischer (u.a. „humanisierter“) TZR-Konstrukte verwendet. So beschreibt die WO 97/32603 Fusionsproteine von variablen Regionen von TZR mit der ζ -Region von CD3 oder CD8 oder CD16, sowie die Verwendung von flexiblen Linker der Aminosäuresequenz (GGGS)₃.

Clay et al. („Efficient transfer of a tumor antigen-reactive TCR to human peripheral blood lymphocytes confers anti-tumor reactivity“; J. Immunology, 1999, 163: 507-513) beschreiben die Isolierung von Genen der α -TZR und β -TZR Ketten eines MART-1 spezifischen TZR und dessen Expression in humanen peripheren Blut-Lymphocyten (PBLs). Die TZR sind gegen die Aminosäuren 25-35 von MART-1 gerichtet. Weiterhin wird die Lyse von verschiedenen metastatischen Melanomzelllinien und ein retrovirales Vektorsystem unter Verwendung von IRES-Elementen beschrieben.

Darcy et al. („Redirected perforin-dependent lysis of colon carcinoma by ex vivo genetically engineered CTL“ J. Immunol., 2000, 164:3705-3712) beschreiben ein immunotherapeutisches Verfahren für Colon-Karzinome unter der Verwendung von scFv anti-CEA Rezeptor transduzierten ZTL, Perforin und γ -IFN. Das chimäre spezifische Rezeptorkonstrukt wird über einen retroviralen Vektor in primäre Maus-T-Lymphocyten transduziert. Diese Zellen wurden in Mäuse injiziert, die vorher mit Colon-Karzinomzelllinien beimpft waren.

Weijtens et al. („A retroviral vector system ,‘STITCH‘; in combination with an optimized single chain antibody chimeric receptor gene structure allows efficient gene transduction and expression in human T-lymphocytes“, Gene Therapy (1998) 5, 1195-1203) und Willemsen et al. „Grafting primary human T lymphocytes with cancer-specific single chain and two chain TCR“ Gene Therapy, 2000 7, 1369-1377) beschreiben retrovirale Vektorsysteme zur Transduktion von Genen in aktivierte T-Lymphocyten. Dieses System wird verwendet, um die Expression von Antikörper-basierten chimären Rezeptoren in der Membran von T-Zellen zu bewirken. Diese T-Zellen können dann gegen spezifische Krebszellen eingesetzt werden. Die Wirksamkeit des retroviralen Vektorsystems wird anhand der spezifischen Erkennung und Zytolyse von Nierenzellkarzinomen beschrieben. Ähnlich beschreiben Eshar. et al. („Specific activation and targeting of cytotoxic lymphocytes through chimeric single chains consisting of antibody-binding domains and the γ or ζ subunits of the immunoglobulin and T-cell re-

ceptors“ P.N.A.S. USA, 90, pp. 720-724, 1993) die Herstellung von tumorspezifischen Lymphozyten und ihre Verwendung in der Immuntherapie auf der Basis von Chimären, welche die variablen Regionen eines Antikörpers (scFV's) mit der konstanten Region des T-Zell Rezeptors umfassen (sogenannte „single-chain TCR“ (scTCR)). Diese chimären Gene konnten auf der Oberfläche von zytolytischen T-Zell-Hybridomen exprimiert werden und bewirkten die Ausschüttung von Interleukin-2 nach Kontakt mit dem Antigen.

Ein spezifisch gegen hdm2 gerichteter TZR und dessen Verwendung wird jedoch durch die oben genannten Publikationen sowie in der übrigen Literatur weder erwähnt noch nahegelegt.

Der vorliegenden Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, die murinen Gene der gegen das hdm2-Protein gerichteten T-Zell Rezeptoren α -TZR und β -TZR zur Verfügung zu stellen. Diese bewirken, daß hdm2-Protein-exprimierende Zellen von CD8-positiven T-Zellen erkannt werden, Zytokine ausgeschüttet werden, und eine T-Zell-induzierte Lyse und/oder Apoptose von Tumor- oder Leukämiezellen herbeigeführt wird.

Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe durch das Polypeptid des eine hdm2-Protein-spezifische T-Zell Antwort vermittelnden murinen α/β T-Zell Rezeptors gemäß SEQ ID Nr. 1 oder SEQ ID Nr. 2 oder funktioneller Varianten oder Teile davon oder dieses kodierende Nukleinsäuren, funktionelle Varianten oder Teile davon gelöst.

Aus einer doppelt-A2.1-transgenen Maus [huCD8 α/β x A2.1/K^b]_{F1} in C57BL/6 genetischer Hintergrund wurden die Gene des eine hdm2-Protein-spezifische T-Zell Antwort vermittelnden murinen α/β T-Zell Rezeptors isoliert, die eine HLA-A2.1 restringierte und gegen das Peptid der Aminosäuren 81-88 des hdm2-Proteins gerichtete spezifische T-Zell-Antwort vermitteln. Die Polypeptide dieses TZR waren bisher unbekannt. Die Gene wurden als Wildtyp (WT) oder modifizierte Konstrukte retroviral in humane periphere Blut-Lymphocyten (PBLs) eingeschleust und die HLA-restringierte Antigen-Erkennung funktionell durch CD8-vermittelte zytotoxische Lyse verschiedener Zell-Linien im ⁵¹Chrom-Freisetzungstest überprüft. Die erfindungsgemäßen Gene des hdm2-spezifischen TZR gehören nicht zu den bisher bekannten geeigneten Zielen für die Diagnose - wie beispielsweise der Indikation - und/oder der Behandlung - wie beispielsweise der Modulation - von mit hdm2-Protein in Zusammenhang stehenden Erkrankungen oder für die Identifizierung von pharmakologisch aktiven Substanzen, so daß sich aus dieser Erfindung völlig neue Therapieansätze ergeben.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft ein Fusionsprotein, umfassend das erfindungsgemäße Polypeptid oder funktionelle Varianten oder Teile davon oder dieses kodierende Nukleinsäuren, funktionelle Varianten oder Teile davon.

Das Fusionsprotein kann dadurch gekennzeichnet sein, daß es die ζ -Region von CD3 oder CD8 oder CD16 oder Teile davon umfaßt, insbesondere die ζ -Region von humanem CD3 oder CD8 oder CD16 oder Teile davon. Bevorzugt ist ein erfindungsgemäßes Fusionsprotein, das einen flexiblen Linker umfaßt (Whitlow et al., „An improved linker for single-chain Fv with reduced aggregation and enhanced proteolytic stability“, Prot. Engin. 6(8), pp. 989-995, 1993), insbesondere einen Linker der Aminosäuresequenz (GGGGS)₃. Insbesondere kann das erfindungsgemäße Fusionsprotein die ζ -Kette des CD3-Komplexes oder ITAM-Motive der ζ -Kette oder Teile davon umfassen, insbesondere die ζ -Kette von humanem CD3 oder Teile davon. Das Fusionsprotein kann weiterhin dadurch gekennzeichnet sein, daß es CD8 α oder das Lck-Bindungsmotiv von CD8 α umfaßt oder Teile davon, insbesondere von humanem CD8 α .

Bei dem erfindungsgemäßen Fusionsprotein kann es sich weiterhin um eine chimäre partiell oder vollständig humanisierte α und/oder β TZR-Kette handeln, insbesondere gemäß SEQ ID Nr. 3 oder SEQ ID Nr. 4. Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft ein Fusionsprotein, bei dem es sich um einen Einzelketten T-Zell Rezeptor handelt, insbesondere gemäß SEQ ID Nr. 5 oder SEQ ID Nr. 6. Das erfindungsgemäße Fusionsprotein kann aber auch dadurch gekennzeichnet sein, daß es sich um einen an andere funktionelle Komponenten gekoppelten α/β -TZR handelt, insbesondere gemäß SEQ ID Nr. 7 oder SEQ ID Nr. 8.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung eines erfindungsgemäßen Fusionsproteins zur Diagnose und/oder Behandlung von mit hdm2-Protein in Zusammenhang stehenden Erkrankungen oder zur Identifizierung von pharmakologisch aktiven Substanzen, z.B. in einer geeigneten Wirtszelle, bei dem eine erfindungsgemäße Nukleinsäure verwendet wird.

Hergestellt werden hierbei Fusionsproteine, die die oben beschriebenen erfindungsgemäßen Polypeptide enthalten, wobei die Fusionsproteine selbst bereits die Funktion eines Polypeptids der Erfindung aufweisen oder erst nach Abspaltung des Fusionsanteils die spezifische

Funktion aktiv ist. Vor allem zählen hierzu Fusionsproteine mit einem Anteil von ca. 1-200, vorzugsweise ca. 1-150, insbesondere ca. 1-100, vor allem ca. 1-50 fremden Aminosäuren. Beispiele solcher Peptidsequenzen sind prokaryotische Peptidsequenzen, die z. B. aus der Galactosidase von *E. coli* abgeleitet sein können. Weiterhin können auch virale Peptidsequenzen, wie zum Beispiel vom Bakteriophagen M13 verwendet werden, um so Fusionsproteine für das dem Fachmann bekannte "phage display"-Verfahren zu erzeugen.

Zur Aufreinigung der erfindungsgemäßen Proteine kann ein weiteres/weiterer Polypeptid("tag") angefügt sein. Erfindungsgemäße Protein-tags erlauben beispielsweise die hochaffine Absorption an eine Matrix, stringentes Waschen mit geeigneten Puffern, ohne den Komplex in nennenswertem Maße zu eluieren und anschließend die gezielte Elution des absorbierten Komplexes. Beispiele der dem Fachmann bekannten Protein-tags sind ein (His)₆-tag, ein Myc-tag, ein FLAG-tag, ein Strep-tag, ein Strep-tag II, ein Hämagglutinin-tag, Glutathion-Transferase (GST)-tag, Intein mit einem Affinitäts-Chitin-Bindungs-tag oder Maltose-bindendes Protein (MBP)-tag. Diese Protein-tags können sich N-, C-terminal und/oder intern befinden.

Neben den aus Zellen isolierten natürlichen Polypeptiden können alle erfindungsgemäßen Polypeptide oder deren Teile unter zellfreien Bedingungen hergestellt worden sein, z. B. durch Synthese oder durch *in vitro*-Translation. So kann das gesamte Polypeptid oder Teile davon zum Beispiel mit Hilfe der klassischen Synthese (Merrifield-Technik) synthetisiert werden. Teile der erfindungsgemäßen Polypeptide eignen sich insbesondere zur Gewinnung von Antisera, mit deren Hilfe geeignete Genexpressionsbanken durchsucht werden können, um so zu weiteren funktionellen Varianten des erfindungsgemäßen Polypeptids zu gelangen.

Die Erfindung betrifft auch Polypeptide, die Derivate eines Antikörpers mit Spezifität für hdm2-81-88 Peptid, insbesondere präsentiert im Kontext von HLA-A2.1 sind.

Weiterhin umfaßt die Erfindung retro-inverse Peptide oder Pseudopeptide gemäß der Polypeptidsequenz der SEQ ID Nr. 1 bis SEQ ID Nr. 8 oder funktionelle Varianten oder Teile davon. Diese Peptide weisen anstelle der -CO-NH-Peptidbindungen -NH-CO-Bindungen auf.

Die Aufgabe der Erfindung wird weiterhin durch eine erfindungsgemäße Nukleinsäure gelöst, die eine DNA, RNA, PNA (Peptide nucleic acid) oder p-NA (Pyranosyl nucleic acid), vor-

zugsweise eine DNA, insbesondere eine doppelsträngige DNA ist mit einer Länge von mindestens 8 Nukleotiden, vorzugsweise mit mindestens 18 Nukleotiden, insbesondere mit mindestens 24 Nukleotiden ist. Die Nukleinsäure kann dadurch gekennzeichnet sein, daß die Sequenz der Nukleinsäure mindestens ein Intron und/oder eine polyA-Sequenz aufweist. Sie kann auch in Form ihrer antisense-Sequenz vorliegen.

Für die Expression des betreffenden Gens ist im allgemeinen eine doppelsträngige DNA bevorzugt, wobei der für das Polypeptid kodierende DNA-Bereich besonders bevorzugt ist. Dieser Bereich beginnt mit dem ersten in einer Kozak Konsensus Sequenz (Kozak, 1987, *Nucleic Acids Res.* 15:8125-48) liegenden Start-Codon (ATG) bis zum nächsten Stop-Codon (TAG, TGA bzw. TAA), das im gleichen Leseraster zum ATG liegt. Eine weitere Verwendung der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen ist die Konstruktion von anti-sense Oligonukleotiden (Zheng und Kemeny, 1995, *Clin. Exp. Immunol.* 100:380-2) und/oder Ribozymen (Amarzguioui, et al. 1998, *Cell. Mol. Life Sci.* 54:1175-202; Vaish, et al., 1998, *Nucleic Acids Res.* 26:5237-42; Persidis, 1997, *Nat. Biotechnol.* 15:921-2). Mit anti-sense Oligonukleotiden kann man die Stabilität der erfindungsgemäßen Nukleinsäure verringern und/oder die Translation der erfindungsgemäßen Nukleinsäure inhibieren. So kann beispielsweise die Expression der entsprechenden Gene in Zellen sowohl in vivo als auch in vitro verringert werden. Oligonukleotide können sich daher als Therapeutikum eignen. Diese Strategie eignet sich beispielsweise auch für Haut, epidermale und dermale Zellen, insbesondere, wenn die antisense Oligonukleotide mit Liposomen komplexiert werden (Smyth et al., 1997, *J. Invest. Dermatol.* 108:523-6; White et al., 1999, *J. Invest. Dermatol.* 112:699-705). Für die Verwendung als Sonde oder als "antisense" Oligonukleotid ist eine einzelsträngige DNA oder RNA bevorzugt.

Neben den aus Zellen isolierten natürlichen Nukleinsäuren können alle erfindungsgemäßen Nukleinsäuren oder deren Teile auch synthetisch hergestellt worden sein. Weiterhin kann zur Durchführung der Erfindung eine Nukleinsäure verwendet werden, die synthetisch hergestellt worden ist. So kann die erfindungsgemäße Nukleinsäure beispielsweise chemisch anhand der in den SEQ ID Nr. 1 bis SEQ ID Nr. 8 beschriebenen Proteinsequenzen unter Heranziehen des genetischen Codes z. B. nach der Phosphotriester-Methode synthetisiert werden (siehe z. B. Uhlmann, E. & Peyman, A. (1990) *Chemical Reviews*, 90, 543-584).

Oligonukleotide werden in der Regel schnell durch Endo- oder Exonukleasen, insbesondere durch in der Zelle vorkommende DNasen und RNasen, abgebaut. Deshalb ist es vorteilhaft, die Nukleinsäure zu modifizieren, um sie gegen den Abbau zu stabilisieren, so daß über einen langen Zeitraum eine hohe Konzentration der Nukleinsäure in der Zelle beibehalten wird (WO 95/11910; Macadam et al., 1998, WO 98/37240; Reese et al., 1997, WO 97/29116). Typischerweise kann eine solche Stabilisierung durch die Einführung von einer oder mehrerer Internukleotid-Phosphorgruppen oder durch die Einführung einer oder mehrerer Nicht-Phosphor-Internukleotide, erhalten werden.

Geeignete modifizierte Internukleotide sind in Uhlmann und Peymann (1990 Chem. Rev. 90, 544) zusammengefaßt (WO 95/11910; Macadam et al., 1998, WO 98/37240; Reese et al., 1997, WO 97/29116). Modifizierte Internukleotid-Phosphatreste und/oder Nicht-Phosphorbrücken in einer Nukleinsäure, die bei einer der erfindungsgemäßen Verwendungen eingesetzt werden können, enthalten zum Beispiel Methylphosphonat, Phosphorothioat, Phosphoramidat, Phosphorodithioat, Phosphatester, während Nicht-Phosphor-Internukleotid-Analoga, beispielsweise Siloxanbrücken, Carbonatbrücken, Carboxymethylester, Acetamidatbrücken und/oder Thioetherbrücken enthalten. Es ist auch beabsichtigt, daß diese Modifizierung die Haltbarkeit einer pharmazeutischen Zusammensetzung, die bei einer der erfindungsgemäßen Verwendungen eingesetzt werden kann, verbessert.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft einen Vektor, vorzugsweise in Form eines Plasmids, shuttle Vektors, Phagemids, Cosmids, Expressionsvektors, adenoviralen Vektors, retroviralen Vektors (Miller, et al. „Improved retroviral vectors for gene transfer and expression“, BioTechniques Vol. 7, No. 9, p 980, 1989) und/oder gentherapeutisch wirksamen Vektors, der eine erfindungsgemäße Nukleinsäure enthält.

So kann die erfindungsgemäße Nukleinsäure in einem Vektor vorzugsweise in einem Expressionsvektor oder gentherapeutisch wirksamen Vektor enthalten sein. Vorzugsweise enthält der gentherapeutisch wirksame Vektor T-Zell spezifische regulatorische Sequenzen, die funktionell mit der erfindungsgemäßen Nukleinsäure verbunden sind. Die Expressionsvektoren können prokaryotische oder eukaryotische Expressionsvektoren sein. Beispiele für prokaryotische Expressionsvektoren sind für die Expression in *E. coli* z.B. die Vektoren pGEM oder pUC-Derivate und für eukaryotische Expressionsvektoren für die Expression in *Saccharomyces cerevisiae* z. B. die Vektoren p426Met25 oder p426GAL1 (Mumberg et al. (1994) Nucl.

Acids Res., 22, 5767-5768), für die Expression in Insektenzellen z. B. *Baculovirus*-Vektoren wie in EP-B1-0 127 839 oder EP-B1-0 549 721 offenbart, und für die Expression in Säugerzellen z. B. die Vektoren Rc/CMV und Rc/RSV oder SV40-Vektoren, welche alle allgemein erhältlich sind.

Im allgemeinen enthalten die Expressionsvektoren auch für die jeweilige Wirtszelle geeignete Promotoren, wie z. B. den trp-Promotor für die Expression in *E. coli* (siehe z. B. EP-B1-0 154 133), den Met 25, GAL 1 oder ADH2-Promotor für die Expression in Hefen (Russel et al. (1983), J. Biol. Chem. 258, 2674-2682; Mumberg, supra), den Baculovirus-Polyhedrin-Promotor für die Expression in Insektenzellen (siehe z. 13. EP-B1-0 127 839). Für die Expression in Säugetierzellen sind beispielsweise Promotoren geeignet, die eine konstitutive, regulierbare, gewebsspezifische, zellzyklusspezifische oder metabolischspezifische Expression in eukaryotischen Zellen erlauben. Regulierbare Elemente gemäß der vorliegenden Erfindung sind Promotoren, Aktivatorsequenzen, Enhancer, Silencer und/oder Repressorsequenzen. Beispiel für geeignete regulierbare Elemente, die konstitutive Expression in Eukaryonten ermöglichen, sind Promotoren, die von der RNA Polymerase III erkannt werden oder virale Promotoren, CMV-Enhancer, CMV-Promotor, CMV-LTR-Hybride, SV40 Promotor oder LTR-Promotoren z. B. von MMTV (mouse mammary tumour virus; Lee et al. (1981) Nature 214, 228-232) und weitere virale Promotor- und Aktivatorsequenzen, abgeleitet aus beispielsweise HBV, HCV, HSV, HPV, EBV, HTLV oder HIV. Ein Beispiel für ein regulierbares Element, das eine regulierbare Expression in Eukaryonten ermöglicht, ist der Tetracyclinooperator in Kombination mit einem entsprechenden Repressor (Gossen M. et al. (1994) Curr. Opin. Biotechnol. 5, 516-20).

Beispiele für regulierbare Elemente, die T-Zell spezifische Expression in Eukaryonten ermöglichen, sind Promotoren oder Aktivatorsequenzen aus Promotoren oder Enhancern von solchen Genen, die für Proteine kodieren, die nur in diesen Zelltypen exprimiert werden.

Beispiele für regulierbare Elemente, die zellzyklusspezifische Expression in Eukaryonten ermöglichen, sind Promotoren folgender Gene: cdc25, Cyclin A, Cyclin E, cdc2, E2F, B-myb oder DHFR (Zwicker J. und Müller R. (1997) Trends Genet. 13, 3-6). Beispiele für regulierbare Elemente, die metabolischspezifische Expression in Eukaryonten ermöglichen, sind Promotoren, die durch Hypoxie, durch Glukosemangel, durch Phosphatkonzentration oder durch Hitzeschock reguliert werden.

Der erfindungsgemäße Vektor kann zur Transfektion einer Wirtszelle verwendet werden, bei der es sich bevorzugterweise um eine T-Zelle handelt. Besonders bevorzugt ist eine Wirtszelle, die dadurch gekennzeichnet ist, daß sie auf ihrer Oberfläche ein erfindungsgemäßes Polypeptid oder Fusionsprotein exprimiert.

Um die Einführung von erfindungsgemäßen Nukleinsäuren und damit die Expression des Polypeptids in einer eu- oder prokaryotischen Zelle durch Transfektion, Transduktion, Transformation oder Infektion zu ermöglichen, kann die Nukleinsäure als Plasmid, als Teil eines viralen oder nicht-viralen Vektors oder Partikels vorliegen. Als virale Vektoren oder Partikel eignen sich hierbei besonders: Baculoviren, Vakziniaviren, Retroviren, Adenoviren, adenoassoziierte Viren und Herpesviren. Als nicht-virale Träger eignen sich hierbei besonders: Virosomen, Liposomen, kationische Lipide, oder poly-Lysin konjugierte DNA.

Beispiele von gentherapeutisch wirksamen Vektoren sind Virusvektoren, beispielsweise Adenovirusvektoren oder retrovirale Vektoren (Lindemann et al., 1997, Mol. Med. 3: 466-76; Springer et al., 1998, Mol. Cell. 2: 549-58; Weijtens et al. „A retroviral vector system ‘STITCH’; in combination with an optimized single chain antibody chimeric receptor gene structure allows efficient gene transduction and expression in human T-lymphocytes“, Gene Therapy (1998) 5, 1199-1203).

Ein bevorzugter Mechanismus, erfindungsgemäße Polypeptide *in vivo* zur Expression zu bringen, ist der virale Gen-Transfer, insbesondere mit Hilfe retroviraler Partikel. Diese werden vorzugsweise genutzt, entsprechende Zielzellen, vorzugsweise T-Lymphozyten, des Patienten *ex vivo* mit den für erfindungsgemäße Polypeptide kodierenden Genen oder Nukleotidsequenzen durch Transduktion zu versehen. Die Zielzellen können daraufhin im Sinne eines adoptiven Zelltransfers wieder in den Patienten reinfundiert werden, um mit der *de novo* eingefügten Spezifität tumorizide und/oder immunmodulierende Effektorfunktionen zu übernehmen. Jüngst wurden auf diesem Wege sehr gute gentherapeutische Erfolge in der Behandlung der durch Immuninkompetenz gekennzeichneten SCID-X1- Krankheit bei Neugeborenen erzielt, in dem hämatologische Vorläuferzellen mit einem analogen intakten Transgen einer in den Kindern vorkommenden nicht-funktionellen mutierten Variante des γ -Kettengens, das für die Differenzierung in die verschiedenen Effektorzellen des adaptiven Immunsystems essentiell ist, retroviral versehen wurden (Cavazzana-Calvo et al., 2000).

Weiterhin besteht die Möglichkeit den Gentransfer *in vivo* durchzuführen, einerseits durch präferentiell stereotaktische Injektion der infektiösen Partikel, andererseits durch direkte Applikation von Viren-produzierenden Zellen (Oldfield, et al. Hum. Gen. Ther., 1993, 4:39-69).

Die zum Transfer von Genen häufig eingesetzten viralen Vektoren sind nach heutigem Stand der Technik vorwiegend retrovirale, lentivirale, adenovirale und adeno-assoziierte virale Vektoren. Diese sind von natürlichen Viren abgeleitete zirkuläre Nukleotidsequenzen, in denen zumindest die viralen Strukturprotein-kodierenden Gene durch das zu transferierende Konstrukt ausgetauscht werden.

Retrovirale Vektorsysteme schaffen die Voraussetzung für eine langhaltende Expression des Transgens durch die stabile, aber ungerichtete Integration in das Wirtsgenom. Vektoren der jüngeren Generation besitzen keine irrelevanten und potentiell immunogenen Proteine, des weiteren gibt es keine vorbestehende Immunität des Empfängers gegenüber dem Vektor. Retroviren enthalten ein RNA-Genom, das in eine Lipidhülle verpackt ist, die aus Teilen der Wirtszellmembran und Virusproteinen besteht. Zur Expression viraler Gene wird das RNS-Genom revers transkribiert und mit dem Enzym Integrase in die Zielzell-DNS integriert. Diese kann daraufhin von der infizierten Zelle transkribiert und translatiert werden, wodurch virale Bestandteile entstehen, die sich zu Retroviren zusammenfügen. RNS wird ausschließlich dann in die neu entstandenen Viren eingefügt. Das Genom der Retroviren besitzt drei essentielle Gene: *gag*, das für virale Strukturproteine, sogenannte gruppenspezifische Antigene kodiert, *pol* für Enzyme wie Reverse Transkriptase und Integrase und *env* für das Hüllprotein („envelope“), das für die Bindung des wirtsspezifischen Rezeptors verantwortlich ist. Die Produktion der replikationsinkompetenten Viren findet nach Transfektion in sogenannten Verpackungszelllinien statt, die zusätzlich mit den *gag/pol*-kodierenden Genen ausgestattet wurden und diese „in trans“ exprimieren und somit die Ausbildung replikationsinkompetenter (d.h. *gag/pol*-deletierter) transgener Viruspartikel komplementieren. Eine Alternative ist die Cotransfektion der essentiellen Virusgene, wobei nur der das Transgen enthaltende Vektor das Verpackungssignal trägt.

Die Separation dieser Gene ermöglicht einerseits die beliebige Kombination des *gal/pol*-Leserahmens mit aus verschiedenen Stämmen gewonnenen *env*-Leserahmen, wodurch Pseudotypen mit verändertem Wirtstropismus entstehen, andererseits kann dadurch die Bildung

replikationskompetenter Viren innerhalb von Verpackungszellen drastisch reduziert werden. Das aus „gibbon ape leukemia virus“ (GALV) abgeleitete Hüllprotein, das im „stitch“ bzw. „bullet“-Vektorsystem Verwendung findet, ist in der Lage humane Zellen zu transduzieren und ist in der Verpackungszelllinie PG13 mit amphotropen Wirtsbereich etabliert (Miller et al., 1991). Zusätzlich wird die Sicherheit durch selektive Deletion von nicht-essentiellen Virussequenzen zur Verhinderung einer homologen Rekombination und somit der Produktion replikationskompetenter Partikel erhöht.

Neue, nicht-virale Vektoren bestehen aus autonomen, sich selbst-integrierenden DNS-Sequenzen, den Transposonen, die durch z.B. liposomale Transfektion in die Wirtszelle eingeschleußt werden und erstmals erfolgreich zur Expression humaner Transgene in Säugerzellen eingesetzt wurden (Yant et al., 2000).

Gentherapeutisch wirksame Vektoren lassen sich auch dadurch erhalten, daß man die erfindungsgemäße Nukleinsäure mit Liposomen komplexiert, da damit eine sehr hohe Transfektionseffizienz, insbesondere von Hautzellen, erreicht werden kann (Alexander und Akhurst, 1995, Hum. Mol. Genet. 4: 2279-85). Hilfsstoffe, die den Transfer von Nukleinsäuren in die Zelle erhöhen, können beispielsweise Proteine oder Peptide, die an DNA gebunden sind oder synthetische Peptid-DNA-Moleküle, die den Transport der Nukleinsäure in den Kern der Zelle ermöglichen, sein (Schwartz et al. (1999) Gene Therapy 6, 282; Brandén et al. (1999) Nature Biotech. 17, 784). Hilfsstoffe umfassen auch Moleküle, die die Freisetzung von Nukleinsäuren in das Cytoplasma der Zelle ermöglichen (Planck et al. (1994) J. Biol. Chem. 269, 12918; Kichler et al. (1997) Bioconj. Chem. 8, 213) oder beispielsweise Liposomen (Uhlmann und Peymann (1990) supra). Eine andere besonders geeignete Form von gentherapeutischen Vektoren läßt sich dadurch erhalten, daß man die erfindungsgemäße Nukleinsäure auf Goldpartikeln aufbringt und diese mit Hilfe der sogenannten "Gene Gun" in Gewebe, bevorzugt in die Haut, oder Zellen schießt (Wang et al., 1999, J. Invest. Dermatol., 112:775-81).

Für die gentherapeutische Anwendung der erfindungsgemäßen Nukleinsäure ist es auch von Vorteil, wenn der Teil der Nukleinsäure, der für das Polypeptid kodiert, ein oder mehrere nicht kodierende Sequenzen einschließlich Intronsequenzen, vorzugsweise zwischen Promotor und dem Startcodon des Polypeptids, und/oder eine polyA-Sequenz, insbesondere die natürlich vorkommende polyA-Sequenz oder eine SV40 Virus polyA-Sequenz, vor allem am 3'-Ende des Gens enthält, da hierdurch eine Stabilisierung der mRNA erreicht werden kann

(Jackson, R. J. (1993) Cell 74, 9-14 und Palmiter, R. D. et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 478-482).

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Wirtszelle, insbesondere eine T-Zelle, die mit einem erfindungsgemäßen Vektor oder einem anderen erfindungsgemäßen Genkonstrukt transformiert ist. Wirtszellen können sowohl prokaryotische als auch eukaryotische Zellen sein, Beispiele für prokaryotische Wirtszellen sind *E. coli* und für eukaryotische Zellen *Saccharomyces cerevisiae* oder Insektenzellen.

Ein besonders bevorzugte transformierte Wirtszelle ist eine transgene T-Vorläuferzelle oder eine Stammzelle, die dadurch gekennzeichnet ist, daß sie ein erfindungsgemäßes Genkonstrukt oder eine erfindungsgemäße Expressionskassette umfaßt. Verfahren zur Transformation oder Transduktion von Wirtszellen und/oder Stammzellen sind dem Fachmann gut bekannt und umfassen zum Beispiel Elektroporation oder Mikroinjektion. Eine besonders bevorzugte transformierte Wirtszelle ist eine patienteneigene T-Zelle, die nach der Entnahme mit einem erfindungsgemäßen Genkonstrukt transfiziert wird. Erfindungsgemäße Wirtszellen können insbesondere dadurch erhalten werden, daß dem Patienten eine oder mehrere Zellen, bevorzugterweise T-Zellen, insbesondere CD8⁺-T-Zellen entnommen werden, die dann *ex vivo* mit einem oder mehreren erfindungsgemäßen genetischen Konstrukten transfiziert oder transduziert werden, um so erfindungsgemäße Wirtszellen zu erhalten. Die *ex vivo* generierten spezifischen T-Zellen können dann anschließend in den Patienten reimplantiert werden. Das Verfahren ähnelt somit dem bei Darcy et al. („Redirected perforin-dependent lysis of colon carcinoma by ex vivo genetically engineered CTL“ J. Immunol., 2000, 164:3705-3712) beschriebenen Verfahren unter der Verwendung von scFv anti-CEA Rezeptor transduzierten ZTL, Perforin und γ -IFN.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft ein Verfahren zur Identifizierung von hdm2-Protein-spezifischen Antigenen das dadurch gekennzeichnet ist, daß hdm2-präsentierende Tumorzellen oder Fraktionen davon mit einer erfindungsgemäßen Wirtszelle unter Bedingungen zusammengebracht werden, bei denen die Tumorzellen oder Fraktionen davon nur dann lysiert werden, wenn der Tumor das hdm2-Protein-spezifische Antigen präsentiert, für welches das exprimierte Polypeptid oder Fusionsprotein spezifisch ist.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines Antikörpers, vorzugsweise eines polyklonalen oder monoklonalen Antikörpers zur Diagnose und Monitoring von mit hdm2-Protein assoziierten Erkrankungen oder zur Identifizierung von pharmakologisch aktiven Substanzen, bei dem ein Antikörper produzierender Organismus mit einem erfindungsgemäßen Polypeptid oder funktionelle Äquivalente davon oder Teile davon mit mindestens 6 Aminosäuren, vorzugsweise mit mindestens 8 Aminosäuren, insbesondere mit mindestens 12 Aminosäuren immunisiert oder mit einer ein erfindungsgemäßes Polypeptid kodierenden Nukleinsäure vakziniert wird.

Das Verfahren erfolgt nach dem Fachmann allgemein bekannten Methoden durch Immunisieren eines Säugetiers, beispielsweise eines Kaninchens, mit dem erfindungsgemäßen Polypeptid oder den genannten Teilen davon, gegebenenfalls in Anwesenheit von z. B. inkomplettem Freundschens Adjuvans und/oder Aluminiumhydroxidgelen (siehe z. B. Diamond, B. A. et al. (1981) The New England Journal of Medicine, 1344-1349). Die im Tier aufgrund einer immunologischen Reaktion entstandenen polyklonalen Antikörper lassen sich anschließend nach allgemein bekannten Methoden leicht aus dem Blut isolieren und z. B. über Säulenchromatographie reinigen. Monoklonale Antikörper können beispielsweise nach der bekannten Methode von Winter & Milstein (Winter, G. & Milstein, C. (1991) Nature, 349, 293-299) hergestellt werden.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Antikörper zur Diagnose und/oder Behandlung von mit hdm2-Protein assoziierten Erkrankungen oder zur Identifizierung von pharmakologisch aktiven Substanzen, der gegen ein erfindungsgemäßes Polypeptid gerichtet ist und mit den erfindungsgemäßen Polypeptiden spezifisch reagiert, wobei die oben genannten Teile des Polypeptids entweder selbst immunogen sind oder durch Kopplung an geeignete Träger, wie z. B. bovines Serumalbumin in ihrer Immunogenität gesteigert werden können. Dieser Antikörper ist entweder polyklonal oder monoklonal, bevorzugt ist ein monoklonaler Antikörper. Unter dem Begriff Antikörper versteht man gemäß der vorliegenden Erfindung auch gentechnisch hergestellte und gegebenenfalls modifizierte Antikörper bzw. antigenbindende Teile davon, wie z.B. chimäre Antikörper, humanisierte Antikörper, multifunktionelle Antikörper, monovalente bzw. oligovalente Antikörper, bi- oder oligospezifische Antikörper, einzelsträngige Antikörper, F(ab)- oder F(ab)₂-Fragmente (siehe z.B. EP-B1-0 368 684, US 4,816,567, US 4,816,397, WO 88/01649, WO 93/06213, WO 98/24884). Die erfindungsgemäßen Antikörper können zur Diagnose und/oder Behandlung von mit hdm2-Protein

assoziierten Erkrankungen oder zur Identifizierung von pharmakologisch aktiven Substanzen verwendet werden.

Die vorliegende Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von mit hdm2-Protein assoziierten Erkrankungen, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine Nukleinsäure, mindestens ein Polypeptid, mindestens eine Wirtszelle oder mindestens ein Antikörper nach einem der vorgenannten Ansprüche zusammen mit geeigneten Zusatz- und Hilfsstoffen kombiniert wird.

Die vorliegende Erfindung betrifft weiterhin ein nach diesem Verfahren hergestelltes Arzneimittel zur Behandlung von mit hdm2-Protein assoziierten Erkrankungen, das mindestens eine Nukleinsäure, mindestens ein Polypeptid oder mindestens einen Antikörper gemäß der vorliegenden Erfindung, gegebenenfalls zusammen mit geeigneten Zusatz- und Hilfsstoffen, enthält. Die Erfindung betrifft weiterhin die Verwendung dieses Arzneimittels zur Behandlung von mit hdm2-Protein assoziierten Erkrankungen.

Die Therapie der von mit hdm2-Protein assoziierten Erkrankungen kann auf herkömmliche Weise, z.B. durch Infusionen oder Injektionen erfolgen, die die erfindungsgemäßen Arzneimittel enthalten. Die Verabreichung der erfindungsgemäßen Arzneimittel kann weiterhin gegebenenfalls in Form von Liposomenkomplexen bzw. Goldpartikelkomplexen erfolgen. Die Behandlung mittels der erfindungsgemäßen Arzneimittel kann aber auch über orale Dosierungsformen, wie z.B. Tabletten oder Kapseln, über die Schleimhäute, zum Beispiel der Nase oder der Mundhöhle, oder in Form von unter die Haut implantierten Dispositoren erfolgen. TTS sind zum Beispiel aus den EP 0 944 398 A1, EP 0 916 336 A1, EP 0 889 723 A1 oder EP 0 852 493 A1 bekannt. Die erfindungsgemäßen (Poly)peptide und deren Derivate können auch zur aktiven und/oder passiven Immunisierung von Patienten mit Erkrankungen, insbesondere Tumorerkrankungen, die mit hdm2 in Zusammenhang stehen, eingesetzt werden, um die Induktion, Erzeugung und Zunahme vom hdm-spezifischen ZTL zu erreichen und die Tumor- und Leukämiezellen der betreffenden Patienten spezifisch abzutöten. Solche Erkrankungen umfassen zum Beispiel solide Tumorerkrankungen, lymphohämatopoetische Neoplasien, maligne hämatologische Erkrankungen, auch in Form eines multiplen Myeloms (oder Plastozytoms), eines histiozytischen Lymphoms und eines CML-Blastenschubs.

Bei einer besonders bevorzugten Art der Behandlung wird dem Patienten eine oder mehrere Zellen, bevorzugterweise T-Zellen, insbesondere CD8⁺-T-Zellen entnommen, die dann *ex vivo* mit einem oder mehreren erfindungsgemäßen genetischen Konstrukten transduziert oder transfiziert werden. Die *ex vivo* generierten spezifischen T-Zellen können dann anschließend in den Patienten re-implantiert werden. Das Verfahren ähnelt somit dem bei Darcy et al. („Redirected perforin-dependent lysis of colon carcinoma by *ex vivo* genetically engineered CTL“ J. Immunol., 2000, 164:3705-3712) beschriebenen immunotherapeutischen Verfahren bei Colon-Karzinomen unter der Verwendung von scFv anti-CEA Rezeptor transduzierten ZTL, Perforin und γ -IFN.

Die vorliegende Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur Herstellung eines Tests zur Auffindung funktioneller Interaktoren in Zusammenhang mit hdm2-Protein assoziierten Erkrankungen, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß mindestens eine Nukleinsäure, mindestens ein Polypeptid oder mindestens ein Antikörper gemäß der Erfindung zusammen mit geeigneten Zusatz- und Hilfsstoffen kombiniert wird.

Unter dem Begriff "funktionelle Interaktoren" im Sinne der vorliegenden Erfindung sind alle diejenigen Moleküle, Verbindungen und/oder Zusammensetzungen und Stoffgemische zu verstehen, die mit den erfindungsgemäßen Nukleinsäuren, Polypeptiden oder Antikörpern, gegebenenfalls zusammen mit geeigneten Zusatz- und Hilfsstoffen, unter geeigneten Bedingungen in Wechselwirkung treten können. Mögliche Interaktoren sind einfache chemische organische oder anorganische Moleküle oder Verbindungen, können aber auch Peptide, Proteine oder Komplexe davon umfassen. Die funktionellen Interaktoren können aufgrund ihrer Wechselwirkung die Funktion(en) der Nukleinsäuren, Polypeptide oder Antikörper *in vivo* oder *in vitro* beeinflussen oder auch nur an die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren, Polypeptide oder Antikörper binden oder mit ihnen andere Wechselwirkungen kovalenter oder nicht-kovalenter Weise eingehen.

Die Erfindung umfaßt weiterhin einen erfindungsgemäß hergestellten Test zur Identifizierung funktioneller Interaktoren in Zusammenhang von mit hdm2-Protein assoziierten Erkrankungen, der mindestens eine Nukleinsäure, mindestens ein Polypeptid oder mindestens einen Antikörper gemäß der vorliegenden Erfindung, gegebenenfalls zusammen mit geeigneten Zusatz- und Hilfsstoffen, enthält. Oft kann so das pathologische Verhalten der Zellen *in vitro* nachgeahmt werden und es können Substanzen gesucht werden, die das normale Verhalten

der Zellen wieder herstellen und die ein therapeutisches Potential besitzen. Zudem läßt sich dieses Testsystem zum Screening von Substanzen ausnutzen, die eine Interaktion zwischen dem erfindungsgemäßen Polypeptid und einem funktionellen Interaktor inhibieren.

Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch ein Arzneimittel zur Indikation und Therapie von mit hdm2-Protein assoziierten Erkrankungen, das eine erfindungsgemäße Nukleinsäure oder ein erfindungsgemäßes Polypeptid und gegebenenfalls geeignete Zusatz- oder Hilfsstoffe enthält, sowie ein Verfahren zur Herstellung eines solchen Arzneimittels zur Behandlung von mit hdm2-Protein assoziierten Erkrankungen, bei dem eine erfindungsgemäße Nukleinsäure oder ein erfindungsgemäßes Polypeptid mit einem pharmazeutisch annehmbaren Träger formuliert wird.

Als Therapeutika und/oder Prophylaktika kommen insbesondere Impfstoffe, rekombinante Partikel oder Injektionen oder Infusionslösungen in Betracht, die als Wirkstoff (a) das erfindungsgemäße TZR-Rezeptor Polypeptid und/oder seine Derivate und/oder (b) eine erfindungsgemäße Nukleinsäure enthalten und/oder (c) *in vitro* oder *ex vivo* erzeugte T-Lymphozyten, die einen spezifisch gegen hdm2 gerichteten TZR enthalten.

Für die gentherapeutische Anwendung beim Menschen ist vor allem ein Arzneimittel und/oder rekombinanter Partikel geeignet, das die erfindungsgemäße Nukleinsäure in nackter Form oder in Form eines der oben beschriebenen gentherapeutisch wirksamen Vektoren oder in mit Liposomen bzw. Goldpartikeln komplexierter Form enthält. Der pharmazeutische Träger ist beispielsweise eine physiologische Pufferlösung, vorzugsweise mit einem pH von ca. 6,0-8,0, vorzugsweise von ca. 6,8-7,8. Insbesondere von ca. 7,4 und/oder einer Osmolarität von ca. 200-400 milliosmol/Liter, vorzugsweise von ca. 290-310 milliosmol/Liter. Zusätzlich kann der pharmazeutische Träger geeignete Stabilisatoren, wie z. B. Nukleaseinhibitoren, vorzugsweise Komplexbildner wie EDTA und/oder andere dem Fachmann bekannte Hilfsstoffe enthalten.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines Polypeptids zur Diagnose und/oder Behandlung von mit hdm2-Protein in Zusammenhang stehenden Erkrankungen oder zur Identifizierung von pharmakologisch aktiven Substanzen in einer geeigneten Wirtszelle, das dadurch gekennzeichnet ist, daß eine erfindungsgemäße Nukleinsäure auf geeignete Weise exprimiert wird.

Das Polypeptid wird so beispielsweise durch Expression der erfindungsgemäßen Nukleinsäure in einem geeigneten Expressionssystem, wie oben bereits beschrieben, nach dem Fachmann allgemein bekannten Methoden hergestellt. Als Wirtszellen eignen sich beispielsweise die *E. coli* Stämme DHS, HB101 oder BL21, der Hefestamm *Saccharomyces cerevisiae*, Insektenzelllinien, z. B. von *Spodoptera frugiperda*, oder die tierischen Zellen COS, Vero, 293, HaCaT, und HeLa, die alle allgemein erhältlich sind.

Ein erfindungsgemäßes Diagnostikum zur Therapie-Überwachung enthält das erfindungsgemäße Polypeptid bzw. die oben näher beschriebenen immunologisch wirksamen Teile davon. Das Polypeptid bzw. Teile davon, die vorzugsweise an eine Festphase, z. B. aus Nitrocellulose oder Nylon, gebunden sind, können beispielsweise mit der zu untersuchenden Körperflüssigkeit, z. B. Blut, *in vitro* in Berührung gebracht werden, um so beispielsweise mit Autoimmunantikörpern reagieren zu können. Der Antikörper-Peptid-Komplex kann anschließend beispielsweise anhand markierter anti-Human-IgG- oder anti-Human-IgM-Antikörper nachgewiesen werden. Bei der Markierung handelt es sich beispielsweise um ein Enzym, wie Peroxidase, das eine Farbreaktion katalysiert. Die Anwesenheit und die Menge an anwesenden Autoimmunantikörpern kann somit über die Farbreaktion leicht und schnell nachgewiesen werden.

Ein anderes Diagnostikum zur Therapie-Überwachung enthält die erfindungsgemäßen Antikörper selbst. Mit Hilfe dieser Antikörper kann beispielsweise eine Gewebeprobe leicht und schnell dahingehend untersucht werden, ob das betreffende Polypeptid in einer erhöhten Menge vorhanden ist, um dadurch einen Hinweis auf mit hdm2-Protein in Zusammenhang stehende Erkrankungen zu erhalten. In diesem Fall sind die erfindungsgemäßen Antikörper beispielsweise mit einem Enzym, wie oben bereits beschrieben, markiert. Der spezifische Antikörper-Peptid-Komplex kann dadurch leicht und ebenso schnell über eine enzymatische Farbreaktion nachgewiesen werden.

Ein weiteres erfindungsgemäßes Diagnostikum umfaßt eine Sonde, vorzugsweise eine DNA-Sonde, und/oder Primer. Dies eröffnet eine weitere Möglichkeit, die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren, zum Beispiel durch die Isolierung aus einer geeigneten Genbank anhand einer geeigneten Sonde zu erhalten (siehe z. B. J. Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning. A La-

boratory Manual 2nd edn., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY Kapitel 8 Seite 8.1 bis 8.81, Kapitel 9 Seite 9.47 bis 9.58 und Kapitel 10 Seite 10.1 bis 10.67).

Als Sonde eignen sich beispielsweise DNA- oder RNA-Fragmente mit einer Länge von ca. 100-1000 Nukleotiden, vorzugsweise mit einer Länge von ca. 200-500 Nukleotiden, insbesondere mit einer Länge von ca. 300-400 Nukleotiden deren Sequenz aus den Polypeptiden gemäß den SEQ ID Nr. 1 bis SEQ ID Nr. 8 des Sequenzprotokolls abgeleitet werden kann.

Alternativ können anhand der abgeleiteten Nukleinsäuresequenzen Oligonukleotide synthetisiert werden, die sich als Primer für eine Polymerase Kettenreaktion eignen. Als Primer eignen sich beispielsweise DNA-Fragmente mit einer Länge von ca. 10-100 Nukleotiden, vorzugsweise mit einer Länge von ca. 15 bis 50 Nukleotiden, insbesondere mit einer Länge von 20-30 Nukleotiden deren Sequenz aus den Polypeptiden gemäß den SEQ ID Nr. 1 bis SEQ ID Nr. 8 des Sequenzprotokolls abgeleitet werden kann.

Der Begriff "kodierende Nukleinsäure" bezieht sich auf eine DNA-Sequenz, die für ein isolierbares bioaktives erfindungsgemäßes Polypeptid oder einen Vorläufer kodiert. Das Polypeptid kann durch eine Sequenz in voller Länge oder jeden Teil der kodierenden Sequenz kodiert werden, solange die spezifische, beispielsweise enzymatische Aktivität erhalten bleibt.

Es ist bekannt, daß kleine Veränderungen in der Sequenz der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren vorhanden sein können, zum Beispiel durch die Degenerierung des genetischen Codes, oder daß nicht translatierte Sequenzen am 5'- und/oder 3'-Ende der Nukleinsäure angehängt sein können, ohne daß dessen Aktivität wesentlich verändert wird. Diese Erfindung umfaßt deshalb auch sogenannte "funktionelle Varianten" der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren.

Mit dem Begriff "funktionelle Varianten" sind alle DNA-Sequenzen bezeichnet, die komplementär zu einer DNA-Sequenz sind, die unter stringenten Bedingungen mit einer abgeleiteten Referenzsequenz oder Teilen davon, insbesondere der hypervariablen V(D)JC-Region, hybridisieren und eine zu dem entsprechenden erfindungsgemäßen Polypeptid ähnliche oder identische Aktivität aufweisen.

Unter "stringenten Hybridisierungsbedingungen" sind solche Bedingungen zu verstehen, bei denen eine Hybridisierung bei 60°C in 2,5 x SSC-Puffer, gefolgt von mehreren Waschschritten bei 37°C in einer geringeren Pufferkonzentration erfolgt und stabil bleibt.

Unter dem Begriff "funktionelle Varianten" im Sinne der vorliegenden Erfindung versteht man Polypeptide, die funktionell mit dem erfindungsgemäßen Polypeptiden verwandt sind, d. h. Strukturmerkmale der Polypeptide aufweisen. Beispiele funktioneller Varianten sind die entsprechenden Polypeptide, die aus anderen Organismen als der Maus, also dem Menschen, bzw., vorzugsweise aus nicht-menschlichen Säugetieren wie z. B. Affen, Schweinen und Ratten stammen. Andere Beispiele funktioneller Varianten sind Polypeptide, die durch unterschiedliche Allele des Gens, in verschiedenen Individuen oder in verschiedenen Organen eines Organismus kodiert werden. Von der vorliegenden Erfindung werden insbesondere auch funktionelle TZR-Varianten erfaßt, die das identische Epitop des hdm2-Polypeptids erkennen und eine spezifische T-Zell Antwort auslösen.

Im weiteren Sinne versteht man darunter auch Polypeptide, die eine Sequenzhomologie, insbesondere eine Sequenzidentität, von ca. 70%, vorzugsweise ca. 80%, insbesondere ca. 90%, vor allem ca. 95% zu dem Polypeptid mit der Aminosäuresequenz gemäß einer der SEQ ID Nr. 1 bis SEQ ID Nr. 8 und/oder zu anhand der Peptidsequenzen abgeleiteten DNA Sequenzen aufweisen. Darunter zählen auch Additionen, Inversionen, Substitutionen, Deletionen, Insertionen oder chemische/physikalische Modifikationen und/oder Austausch oder Teile des Polypeptids im Bereich von ca. 1-60, vorzugsweise von ca. 1-30, insbesondere von ca. 1-15, vor allem von ca. 1-5 Aminosäuren. Beispielsweise kann die erste Aminosäure Methionin fehlen, ohne daß die Funktion des Polypeptids wesentlich verändert wird.

Die Erfindung soll nun weiter anhand der beigefügten Beispiele und Figuren erläutert werden, ohne durch diese eingeschränkt zu werden. Es zeigt:

SEQ ID Nr. 1: Polypeptid des Wildtyp-Gen Maus α TZR (muva-mu α),

SEQ ID Nr. 2: Polypeptid des Wildtyp-Gen Maus β TZR (muv β -muc β),

SEQ ID Nr. 3: Polypeptid eines chimären partiell humanisiertes TZR-Gens (muva-hu α),

SEQ ID Nr. 4: Polypeptid eines chimären partiell humanisiertes TZR-Gens (muv β -huc β),

- SEQ ID Nr. 5: Polypeptid eines Einzelketten-TZR $\text{muv}\alpha$ -Li- $\text{muv}\beta$ - $\text{muc}\beta$,
- SEQ ID Nr. 6: Polypeptid eines Einzelketten-TZR $\text{muv}\beta$ -Li- $\text{muv}\alpha$ - $\text{muc}\alpha$,
- SEQ ID Nr. 7: Polypeptid eines Doppelketten-TZR in Fusion mit humaner CD3 ζ - Kette
 $\text{muv}\alpha$ - huca - $\text{huCD3}\zeta$,
- SEQ ID Nr. 8: Polypeptid eines Doppelketten-TZR in Fusion mit humaner CD3 ζ - Kette
 $\text{muv}\beta$ - hucb - $\text{huCD3}\zeta$,
- SEQ ID Nr. 9: Primer for_bTCR_v4,
- SEQ. ID Nr. 10: Primer rev_bTCR_c4,
- SEQ. ID Nr. 11: Primer for_Eco_bTCR_v5,
- SEQ. ID Nr. 12: Primer rev_Asc_bTCR_c6,
- SEQ. ID Nr. 13: Primer for_Eco_bTCR_c2,
- SEQ. ID Nr. 14: Primer rev_Asc_bTCR_c2,
- SEQ. ID Nr. 15: Primer rev_Asc_aTCR_c1,
- SEQ. ID Nr. 16: Primer rev_aTCR_c5,
- SEQ. ID Nr. 17: Primer rev_Asc_aTCR_c4,
- SEQ. ID Nr. 18: Primer for_Eco_aTCR_c6,
- SEQ. ID Nr. 19: Primer for_NcoI_aTCR_4,
- SEQ. ID Nr. 20: Primer for_NcoI_aTCR_5b; am 5'-Ende phosphoryliert,
- SEQ. ID Nr. 21: Primer for_NcoI_bTCR_4,
- SEQ. ID Nr. 22: Primer for_NcoI_bTCR_5b; am 5'-Ende phosphoryliert,
- SEQ. ID Nr. 23: Primer rev_aTCR_BamHI_1,
- SEQ. ID Nr. 24: Primer rev_bTCR_BamHI_1,
- SEQ. ID Nr. 25: Primer for_hucaTCR_2,
- SEQ. ID Nr. 26: Primer rev_hucaTCR_2,
- SEQ. ID Nr. 27: Primer for_hucaTCR_AlwNI_3,
- SEQ. ID Nr. 28: Primer rev_hucaTCR_BamHI_1,
- SEQ. ID Nr. 29: Primer for_hucbTCR_3,
- SEQ. ID Nr. 30: Primer rev_hucbTCR_2,
- SEQ. ID Nr. 31: Primer for_hucbTCR_4; am 5'-Ende phosphoryliert,
- SEQ. ID Nr. 32: Primer rev_hucbTCR_BamHI_1,
- SEQ. ID Nr. 33: Primer T7_for,
- SEQ. ID Nr. 34: Primer T7_rev,

- SEQ. ID Nr. 35: Primer rev_hZeta_BamHI_4,
 SEQ. ID Nr. 36: Primer rev_huca-hu_tm_Zeta,
 SEQ. ID Nr. 37: Primer rev_hucb-hu_tm_Zeta,
 SEQ. ID Nr. 38: Polynukleotid des Wildtyp-Gen Maus α TZR (muv α -muc α) aus SEQ ID Nr. 1,
 SEQ. ID Nr. 39: Polynukleotid des Wildtyp-Gen Maus β TZR (muv β -muc β) aus SEQ ID Nr. 2,
 SEQ. ID Nr. 40: Polynukleotid des chimären partiell humanisiertes TZR-Gens (muv α -huc α) aus SEQ ID Nr. 3,
 SEQ. ID Nr. 41: Polynukleotid des chimären partiell humanisiertes TZR-Gens (muv β -huc β) aus SEQ ID Nr. 4,
 SEQ. ID Nr. 42: Polynukleotid des Einzelketten-TZR muv α -Li-muv β -muc β aus SEQ ID Nr. 5,
 SEQ. ID Nr. 43: Polynukleotid des Einzelketten-TZR muv β -Li-muv α -muc α aus SEQ ID Nr. 6,
 SEQ. ID Nr. 44: Polynukleotid des Doppelketten-TZR in Fusion mit humaner CD3 ζ - Kette muv α -huc α -huCD3 ζ aus SEQ ID Nr. 7; und
 SEQ. ID Nr. 45: Polynukleotid des Doppelketten-TZR in Fusion mit humaner CD3 ζ - Kette muv β -huc β -huCD3 ζ aus SEQ ID Nr. 8.

In den Primersequenzen bedeuten Y = C / T; R = A / G; V = A / C / G; W = A / C / T

Figur 1 zeigt eine FACS-Analyse (siehe 1.4) mittels eines v β 6-spezifischen FITC-markierten Antikörpers (Pharmingen). Es wurde sowohl die murine T-Zell-Linie als auch der daraus entstandene Klon 3 überprüft. Als Isotyp-Kontrolle diente anti-TCR V α 2 - FITC (BD), als Positiv-Kontrolle der anti-pan β TZR – FITC - Antikörper (BD). Als Negativ-Kontrolle diente der Influenza-Matrixprotein-spezifische T-Zell-Klon 58.

Figur 2 zeigt eine v β 6-spezifische Antikörper-Blockade des murinen T-Zell-Klons 3 im cytotoxischen 51 Chrom-Freisetzungstest (siehe 1.4). Die Blockade wurde dosisabhängig evaluiert. Als Negativ-Kontrolle diente zum einen ein anti-V α 3.2 – Antikörper (BD) und zum anderen der p53 – 264-272 – spezifische T-Zell-Klon 46, der gegenüber dessen eigenes zu

erkennendes p53-Peptid gegengeprüft wurde. Als Zielzelle fungierte die TAP-defiziente Zelllinie T2, die exogen mit 10^{-8} M Peptid beladen wurde.

Figur 3 zeigt Beispiele des Design hdm2-spezifischer Konstrukte auf DNS-Ebene (siehe 2.), wobei muV α/β murines variables α/β Gensegment; muC α/β murines konstantes α/β Gensegment; huC α/β humanes konstantes α/β Gensegment; TM: Gensegment für Transmembrane kodierend; Li: Gensegment für (GGGGS)₃-Motiv kodierend und HuCD3 ζ humanes CD3 ζ -Ketten Gensegment bedeutet. Die für die Klonierung relevanten Restriktions-Schnittstellen sind angegeben.

Figur 4 zeigt dieselben Beispiele des Design hdm2-spezifischer Konstrukte auf Protein-Ebene (siehe 2.), wobei muV α/β murine variable α/β -Domäne; muC α/β murine konstante α/β -Domäne; huC α/β humane konstante α/β -Domäne; SP: murines Wildtyp-Signalpeptid; TM: Transmembrane; Li Linker mit (GGGGS)₃ – Motiv und hu ζ : humane CD3 ζ -Kette mit 3 konsekutiven ITAM – Motiven bedeutet. Die aus den bakteriellen Klonen abgeleiteten Nummern sind für die individuellen Ketten angegeben.

Figur 5 zeigt den Polylinker des Konstrukts muv α -Li-muv β -muc β (siehe 2.3). Der Polylinker ist letztlich über *Kpn* I und *Dra* III in das resultierende Konstrukt eingesetzt worden.

Figur 6 zeigt den Polylinker des Konstrukts muv β -Li-muv α -muc α (siehe 2.3). Der Polylinker ist letztlich über *Sca* I und *Bsg* I in das resultierende Konstrukt eingesetzt worden.

Figur 7 zeigt die Fusionsstelle des chimären Doppelketten-TZR in Fusion zur humanen CD3 ζ -Kette muv α -huc α -huCD3 ζ (siehe 2.4). Das extracytosolische, über eine Disulfidbrücke dimerisierende Cystein ist mit relativer Position zum Start-Methionin angegeben.

Figur 8 zeigt die Fusionsstelle des chimären Doppelketten-TZR in Fusion zur humanen CD3 ζ -Kette muv β -huc β -huCD3 ζ (siehe 2.4). Das extracytosolische, über eine Disulfidbrücke dimerisierende Cystein ist mit relativer Position zum Start-Methionin angegeben.

Figur 9 zeigt die "fluorescence activated cell sorting" (FACS) Analyse der unter 2.) beschriebenen Konstrukte nach retroviraler Transduktion. Dargestellt sind Beispiele durchschnittlicher Transduktions-Effizienzen für OKT3-aktivierte PBL-Kulturen 6 Tage nach Transdukti-

on. Diese liegen im Bereich von 10-25% der eingestetzten CD3⁺-Lymphozyten. Als Negativ-Kontrolle diente ein Transfektions-/Transduktions – Ansatz mit dem leeren retroviralen Vektor pBullet.

Figuren 10 bis 12 zeigen Peptid-Titrations (siehe 3.4.1) wobei T2-Zielzellen exogen mit dem hdm2-81-88-Peptid in einer Konzentrationsreihe von $1 \cdot 10^{-6} \text{M}$ bis $1 \cdot 10^{-12} \text{M}$ beladen wurden. Als Referenz fungierte der murine T-Zell-Klon 3 hdm2-81-88 (Synonym: P2) der huCD8 x A2K^b – transgenen Maus. Die gezeigten ⁵¹Chrom-Freisetzungstests wurden mit transduzierten PBLs durchgeführt, die über vβ6-gerichtete magnetische Zell-Sortierung (Miltenyi-Biotec) auf über 90% vβ6⁺-T-Zellen angereichert wurden. Figur 10: als Negativ-Kontrolle diente ein Konstrukt eines nicht-funktionellen Einzelketten-T-Zell-Rezeptors (nfTCR), das sich zwar vergleichbar gut auf der Oberfläche der T-Zellen exprimieren ließ und dadurch auch über magnetische Zell-Sortierung anreicherbar war, aber keine Funktionalität im CTL-Test bewies. Figur 11: Peptid-Titration des murinen heterodimeren Wildtyp-Konstruktes muTZR/8-18. Figur 12: Peptid-Titration des chimären heterodimeren Konstruktes huTZR/10-29.

Figuren 13 bis 15 zeigen die Erkennung von maligne transformierten Zell-Linien. Die gewählten Zielzellen waren HLA-A2⁺. Als Referenz fungierte der murine T-Zell-Klon 3 hdm2-81-88 (Synonym: P2) der huCD8 x A2K^b – transgenen Maus. Die gezeigten ⁵¹Chrom-Freisetzungstests wurden mit transduzierten PBLs durchgeführt, die über vβ6-gerichtete magnetische Zell-Sortierung (Miltenyi-Biotec) auf über 90% vβ6⁺-T-Zellen angereichert wurden. Figur 13: als Negativ-Kontrolle diente ein Konstrukt eines nicht-funktionellen Einzelketten-T-Zell-Rezeptors (nfTCR), das sich zwar vergleichbar gut auf der Oberfläche der T-Zellen exprimieren ließ und dadurch auch über magnetische Zell-Sortierung anreicherbar war, aber keine Funktionalität im CTL-Test bewies. Figur 14: murine heterodimere Wildtyp-Konstrukt muTZR/8-18. Figur 15: chimäre heterodimere Konstrukt huTZR/10-29.

Beispiele

Es wurden die Gene der T-Zell-Rezeptoren αTZR und βTZR aus einer doppelt-transgenen Maus huCD8 x A2K^b präpariert, die eine HLA-A2.1 restringierte und hdm2-Protein / 81-88 Peptid-spezifische T-Zell-Antwort vermitteln. Die erhaltenen Gene wurden als Wildtyp (WT) oder modifizierte Konstrukte retroviral in humane periphere Blut-Lymphozyten (PBLs) eingeschleust und die HLA-restringierte Antigen-Erkennung funktionell durch CD8-vermittelte cytotoxische Lyse verschiedener Zell-Linien im ⁵¹Chrom-Freisetzungstest überprüft.

1.) Gewinnung der für die α - und β -Ketten der T-Zell-Rezeptoren kodierenden Gene

1.1) Präparation der cytoplasmatischen RNS

Die cytoplasmatische RNS wurde isoliert, um zum einen gezielt die noch unprozessierte, Intron-haltige RNS, DNS-Bruchstücke als auch ribosomale RNS, die vorwiegend im Zellkern lokalisiert sind, abzutrennen und eine Anreicherung der gewünschten "messenger"-RNS zu erzielen. Protokoll und Materialien entsprechen weitgehend mit kleinen Modifikationen dem "Rneasy Mini Kit" der Firma QIAGEN: für eine Präparation wurden durchschnittlich $50 \cdot 10^6$ murine Zellen des hdm2/81-88 - spezifischen T-Zell-Klons 3 aus den Kulturschalen einer "24-well-Platte" vereint und in RPMI 1640 (Biowhittaker) serumfrei gewaschen. Die Zellen wurden unter RNase-freien Bedingungen zu je $12,5 \cdot 10^6$ Zellen pro Inkubationsröhrchen aliquotiert und im Zellmembranlyse-Puffer (4°C-gekühlt) für 20 min auf Eis inkubiert:

Zellmembranlyse-Puffer:

50	mM	Tris-HCl/ pH 8.0
140	mM	NaCl
1,5	mM	MgCl ₂
0,5	%	Nonidet P40 (Roche 1 332 473)
1000	Einh.	Rnase-Inhibitor / ml ZML-P (Roche 799 017)
1	mM	DTT

Für diesen Puffer wie alle weiteren wäßrigen Lösungen, die angesetzt werden mußten, wurde DEPC-behandeltes und doppelt-autoklaviertes deionisiertes (MilliQ von Millipore) Wasser benutzt.

Die weiteren Schritte erfolgten gemäß einem dem Fachmann geläufigen Verfahren mit Hilfe des QIAGEN-Protokolls unter Rnase-freien Bedingungen bei Raumtemperatur und werden kurz beschrieben:

Die milde solubilisierten und aliquotierten Zellen wurden bei 300g / 2' (Minuten) / 4°C zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Es wurden 600 µl eines β -Mercaptoethanol- (MSH) haltigen (1.45 mM) "RLT"-Puffers hinzugesetzt, gut gemischt und 430 µl 96% ETOH unter Mischen hinzugesetzt. Es wurde die Lösung je Aliquot auf eine Silika-Minispin-Säule gegeben und für 15" (Sekunden) bei 10.000 Upm (Umdrehungen pro Minute) in einer Eppendorf-Tischfuge zentrifugiert. Es erfolgte jeweils ein Wasch in 700 µl "RW1" sowie in 500 µl 77%-ETOH-haltigen "RPE"-Puffer. Abschließend wurden 500 µl des identischen "RPE"-Puffers

hinzugegeben und die Säule für 2' bei 14.000 Upm maximal getrocknet. Die Elution der RNS erfolgte mit 54 µl Rnase-freiem Wasser bei 10.000 Upm für 2'. Die Ausbeuten lagen bei 30 µg RNS pro $12,5 \cdot 10^6$ murinen T-Zellen. Die RNS wurde zu 6 µg / 10 µl bei -20°C weggefroren.

1.2) Amplifikation des β -Ketten-Gens mittels gekoppelter RT-PCR

Die TZR-kodierende RNS mußte spezifisch in DNS umgeschrieben und amplifiziert werden, bevor diese kloniert werden konnte. Hierzu wurde methodisch die RT-PCR herangezogen, die im gleichnamigen Kit "Titan One Tube RT-PCR-System" der Firma Roche (1888 382) implementiert ist. Es wurde das "Ein-Schritt-Protokoll" gewählt, bei dem die Reverse Transkription ohne weitere Intervention von der Polymerase-Kettenreaktion gefolgt wird. Bei den verwendeten Enzymen handelte es sich um die AMV - Reverse Transkriptase und ein Gemisch der *Thermus Aquaticus* / *Pwo* - thermostabilen Polymerase ("Expand™ High fidelity" Enzym-Mix), die in einem universalen Reaktionspuffer zum Einsatz kamen. Da die Transkriptionsrate der TZR-Gene und aufgrund der Varianz der TZR-Gene die Konservierung der für die variablen Domänen kodierenden Gensequenzen gering ist, schloß sich eine "nested PCR" (Polymerase-Kettenreaktion) an, um die Spezifität und die Signalstärke der amplifizierten DNS zu erhöhen. Die Variabilität des v-Gensegmentes, dessen Subfamilienzugehörigkeit a priori nicht vorhergesagt werden konnte, wurde mit einem degenerierten Primer (**for_bTCR_v4; SeqID Nr. 9**) versucht zu erfassen, der einer Basensequenz für die ersten konservierten Aminosäuren nach dem Signalpeptid kodierend entsprach. Ein artifizielles Gensegment, das für ein murines TZR-Signalpeptid kodiert, sollte ursprünglich über synthetische Oligonukleotide vorgeschaltet werden, um eine Direktion des *in vivo* synthetisierten Proteins in das Lumen des Endoplasmatischen Retikulums zu gewährleisten. Es wurde ein innerhalb des konstanten Gensegmentes revers hybridisierender Primer (**rev_bTCR_c4; SeqID Nr. 10**) gewählt, um der zusätzlichen Varianz der beiden möglichen c-Gensegmente (c- β 1 oder c- β 2) der β -Kette, die einige Basenunterschiede an deren 3'-Ende aufweisen, zu entgegen. Die Oligonukleotide der "nested PCR" besaßen neben der TZR-Komplementarität zusätzlich an dessen 5'-Ende Sequenzen der Restriktionsschnittstellen für *EcoRI* bzw. *AscI*. Der in Vorwärtsrichtung hybridisierende Primer (**for_Eco_bTCR_v5; SeqID Nr. 11**) der nested "PCR" war in der Sequenz des v-Gensegmentes deckungsgleich zum degenerierten RT-PCR - Primer, wohingegen der zum c-Gensegment komplementäre in Rückwärtsrichtung hybridisierende Primer (**rev_Asc_bTCR_c6; SeqID Nr. 12**) mehr als 120 Basen relativ zum reversen 1. Primer des TZR-Leserahmens einwärts versetzt lag, so daß es sich genau um eine "3'-

located nested PCR" handelte. Hierdurch wurde die Spezifität der PCR erhöht, da in 2 unabhängigen PCR-Schritten an 2 unterschiedlichen Orten ein sequenzspezifisches Erkennungsereignis stattgefunden haben muß. Das komplette c-Gensegment wurde mittels eines reversen degenerierten Primers (**rev_Asc_bTCR_c2; SeqID Nr. 14**) zum Erfassen der beiden potentiell möglichen c β 1-/c β 2-Gensegmente und eines in Leserichtung entsprechenden Primers (**for_Eco_bTCR_c2; SeqID Nr. 13**) des c β -Gensegmentes über RT-PCR ohne nachgeschaltete "nested PCR" erfaßt und kloniert. Im Überlappungsbereich der beiden Amplifikate im c β -Bereich befand sich eine singuläre *NcoI*-Schnittstelle, mittels derer das trunkierte v β -/c β - und das vollständige c β -Gensegment in einer anschließenden Subklonierung zusammengefügt werden konnten.

Das Pipettierschema und das PCR-Protokoll der RT-PCR entsprach prinzipiell dem durch die Firma Roche beschriebenen Verfahren. Die anschließende "nested PCR" erfolgte analog unter Ersatz der Komponenten Rnase-Inhibitor und DTT durch autoklaviertes Wasser. Statt der 2 μ l RNA (0,1 – 1 μ g) wurde 2 μ l des Amplifikats der RT-PCR eingesetzt. Die technischen Voraussetzungen des PCR-Geräts ermöglichten den simultanen Test verschiedener Hybridisierungstemperaturen im 2. Schritt des klassischen PCR-Zyklus in einem Temperaturgradienten von 35°C - 55°C in Intervallen für 5 ausgesuchte Temperaturen von 36°C, 39°C, 44°C, 52°C und 56°C. Für die höheren Temperaturen von 44-56°C konnten singuläre Banden der gewünschten Länge erzielt werden, dessen Intensität durch die 2. PCR verstärkt wurden und ausreichend waren, um in Vektoren inseriert zu werden.

Die Sequenzierung von 8 bakteriellen Klonen ergab einige randomisierte Basenaustausche, die auf der zu anderen Polymerasen vergleichbar hohen Fehlerrate des ExpandTM - Enzym-Mixes beruhten. Die gewählten Klone trugen zudem alle die Sequenzinformation für das Signalpeptid und einen kurzen Bereich des nicht-kodogenen, 5'-untranslatierten Bereiches von weniger als 100 Basen, so daß davon ausgegangen werden konnte, daß der v-Gensegment-spezifische degenerierte Primer eine ähnliche Sequenz flußaufwärts erkannte und die zusätzliche Sequenz des Wildtyp-Signalpeptids lieferte.

1.3) Amplifikation des α -Ketten-Gens mittels RACE-PCR

Für die Sequenzermittlung der α -Kette war die RACE-PCR die zum Ziel führende Strategie: das analog dem oben beschriebenen Ansatz konzipierte degenerierte Oligonukleotid erbrachte ausschließlich die kodogene Sequenz eines aufgrund einer Leserasterverschiebung in der

CDR3-Schleife nicht-funktionellen T-Zell-Rezeptors. Die allele Exklusion ist nicht in dem selben Maße valid wie für die β -Kette des TZR. Die RACE-Technologie ist im gleichnamigen System der Firma Roche (1 734 792) etabliert und muß mit α TZR-Gen-spezifischen Oligonukleotiden ergänzt werden: hierzu wird im Rahmen der "5'-RACE-PCR" die 5'-lokalisierte Varianz der kodogenen Sequenz umgangen, indem eine bekannte, kurze Adenin-Oligonukleotid-Sequenz am 3'-Ende der revers transskribierten cDNS-Sequenz mittels der terminalen Transferase generiert wird, die in Folge als Erkennungssequenz für einen in Lese-richtung 5'-lokalisierten PCR-Primer fungiert. Die reversen PCR-Primer liegen innerhalb der invarianten Sequenz, die für die konstante Domäne kodiert. Für die reverse Transkription wurde der Primer **rev_Asc_aTCR_c1 (SeqID Nr. 15)** verwendet, der zusammen mit **for_Eco_aTCR_c6 (SeqID Nr. 18)** auch zur Amplifikation via RT-PCR des Volllängen α -Segmentes verwendet wurde. Es wurde das Konzept einer konsekutiven 2-Schritt-"nested PCR" mit Hilfe der Primerpaare "Oligo d(T)-Ankerprimer" (Komponente des RACE-PCR-Kits) / **rev_aTCR_c5 (SeqID Nr. 16)** und "PCR Ankerprimer" (Komponente des RACE-PCR-Kits) / **rev_Asc_aTCR_c4 (SeqID Nr. 17)** verfolgt, so daß auch hier die Subklonierung der vollständigen Sequenz, die für die konstante Domäne kodiert, sich anschloß. Die PCR-Primer mußten so liegen, daß im Überlappungsbereich der amplifizierten Genabschnitte die singuläre *NcoI*-Schnittstelle lag. Die trunkierte, das α -Gensegment-enthaltende PCR-Amplifikat wurde über 5'-*SalI* und 3'-*AscI* in pNEB193 (New England Biolabs) kloniert, wohingegen das konstante Gensegment über *EcoRI* und *AscI* in pNEB193 inseriert wurde. Die Amplifikate wurden klassisch kloniert (J. Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning. A Laboratory Manual 2nd edn., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor) mittels der Reinigung über LMP-Gele und Phenol/Chloroform-Extraktion, bevor diese restriktionsenzymatisch verdaut und die Enden mit Hilfe des "High Pure PCR Product Purification Kit" (Roche, 1 732 668) abgetrennt wurden.

Das Mehrschrittprotokoll lehnt sich weitgehend an das kommerzielle Protokoll an unter Zuhilfenahme eines programmierbaren PCR-Gerätes: die reverse Transkription, die Transferase-Reaktion und die anschließende 2-Schritt "nested PCR" sind im PCR-Gerät "MasterCycler" der Firma Eppendorf durchgeführt worden. Im Rahmen der spezifischen α -Ketten-Amplifikation kam die Gradiententechnologie im Hybridisierungsschritt für die Temperaturen 39°C, 44°C, 52°C und 56°C zur Anwendung. Es wurde die *Pfu*-Polymerase (Stratagene) gewählt, da zu diesem Zeitpunkt dieses als das Enzym mit der geringsten Fehlereinbaurrate galt. Die 1.PCR ergab bereits eine schwache Bande der zu erwartenden Größe von 0.9 kB im ge-

samten Temperaturspektrum, deren Intensitäten durch die nachfolgende PCR verstärkt werden konnten und zudem auftretende "Primer-Dimer" herausverdünnt werden konnten. In der abschließenden PCR ergab sich eine Verkürzung des Amplifikates um 70 Bp gemäß der theoretischen Lage der versetzt hybridisierenden Primer. Im Agarose-Gel zeichnete sich eine Doppelbande von 100 Bp Längendifferenz ab, die auf das Vorhandensein der funktionellen und der nicht-funktionellen α -Kette hinwies. Die Banden wurden gemeinsam im präparativen Gel ausgeschnitten, um beide Amplifikate in der anschließenden Klonierung zu erfassen. Es wurden 7 Klone gefunden, die für einen funktionellen Leserahmen kodierten und identische Sequenzen besaßen.

1.4) Überprüfung der gefundenen Subfamilienzugehörigkeiten

Die Existenz eines $v\beta 6$ - bzw. $v\alpha 10$ -Gensegmentes in dem murinen hdm2-Protein / 81-88 spezifischen T-Zell-Klon 3 wurde auf verschiedenen Wegen verifiziert:

- a) RT_PCR mittels eines $v\beta 6$ -spezifischen Primers bzw. eines $v\alpha 10$ -spezifischen Primers. Die RNS wurde zuvor aus dem murinen hdm2-P2 spezifischen T-Zell-Klon 3 gereinigt, indem die spezifischen T-Zellen über anti-huCD8 magnetisch markierte Antikörper von den murinen "feeder"-Zellen getrennt wurden. Als Negativ-Kontrolle diente ein Influenza-Matrixprotein-(FluM1 58-66) spezifischer T-Zell-Klon.
- b) FACS-Analyse (**Figur 1**) mittels eines $v\beta 6$ -spezifischen FITC-markierten Antikörpers (Pharmingen). Es wurde sowohl die murine T-Zell-Linie als auch der daraus entstandene Klon 3 überprüft. Als Positiv-Kontrolle diente ein FITC-markierter Antikörper, der den β -Ketten-Anteil subfamilienunabhängig erkennt.
- c) $v\beta 6$ -spezifische Antikörper-Blockade des murinen T-Zell-Klons 3 im cytotoxischen $^{51}\text{Chrom}$ -Freisetzungstest (**Figur 2**).

2.) Beispiele des Design hdm2-spezifischer Konstrukte (**Figur 3** [SEQ ID Nrn 38-45] und **4** [SEQ ID Nrn 1-8])

Der retrovirale Vektor pBullet, ein funktionelles Derivat von pStitch (Weijtens et al., 1998) gehört zu den sogenannten Spleiß-Vektoren, in denen das Transgen im selben Sequenzen-Kontext relativ zu den Spleiß-Akzeptor- und Donor-Elementen SA und SD kloniert werden muß wie das *env*-Gen, um eine maximale Expression zu gewährleisten. Hierzu wird über entsprechende Primer eine *NcoI*-Schnittstelle innerhalb des Startcodons "ccATGg" konzipiert. Dies veränderte für beide Wildtyp-Ketten αTZR und βTZR die 2. Aminosäure von Lys nach

Glu bzw. Asn nach Asp. Am 3'-Ende der Leserahmen wurde die singuläre *Bam*HI-Schnittstelle gewählt. Die Restriktionsenzyme und modifizierenden Enzyme wurden von New England Biolabs (NEB) bezogen. Bei der thermostabilen Polymerase handelte es sich zumeist um die native oder klonierte *Pfu*-DNS-Polymerase (*Pyrococcus furiosus*, Stratagene) oder um die *Pfx*-DNS-Polymerase (*Pyrococcus sp.*, Life Technologies)

2.1) Klonierung der murinen Wildtyp-Gene α TZR (*mu* $\nu\alpha$ -*mu* α ; SeqID Nrn. 1-38) und β TZR (*mu* $\nu\beta$ -*mu* β ; Seq ID Nrn. 2-39)

Für den Fall, daß die *Nco*I-Schnittstelle nicht intern existierte (partiell humanisierte Ketten), konnten die Gensegmente direkt über Primer amplifiziert und kloniert werden, die die Sequenzen für *Nco*I enthielten (**for_NcoI_aTCR_4**, SeqID Nr. 19; **for_NcoI_bTCR_4**, SeqID Nr. 21).

Da die *Nco*I-Schnittstelle für die Wildtyp-Ketten im Gensegment für die konstanten Domänen vorkam, wurden die kodogenen Leserahmen über Oligonukleotide (**for_NcoI_aTCR_5b**, SeqID Nr. 20; **for_NcoI_bTCR_5b**, SeqID Nr. 22) amplifiziert, die 5'-terminal derart verkürzte, stumpfendige *Nco*I-Schnittstellen besaßen, so daß diese nach stumpfendigem Auffüllen *Nco*I-geschnittener Vektor-DNS mit Hilfe der T4-DNS-Polymerase mit letzteren zu vollständigen *Nco*I-Schnittstellen komplementierten. **rev_aTCR_BamHI** (SeqID Nr. 23) und **rev_bTCR_BamHI_1** (SeqID Nr. 24) wurden als abschließender reverser Primer für alle murinen Doppelketten- und Einzelketten-Konstrukte benutzt.

2.2) Generierung der chimären, partiell humanisierten TZR-Gene hu α TZR (*mu* $\nu\alpha$ -*hu* α ; SeqID Nr. 40) und hu β TZR (*mu* $\nu\beta$ -*hu* β ; SeqID Nr. 41)

Für eine funktionelle Chimärisierung der murinen TZRs sollten 2 Kriterien erfüllt werden:

- a) die murinen konstanten Domänen sollten derart gegen die entsprechenden humanen Domänen ausgetauscht werden, so daß diese Domänen in ihrer Immunglobulin-ähnlichen Faltungsstruktur vollständig erfaßt werden. Ebenso waren die vollständigen variablen Domänen zu erfassen, um keine Beeinträchtigung der in dieser Domäne nahezu carboxyterminal liegenden CDR3-Schleife zu verursachen.
- b) Die Fusion hatte derart zu erfolgen, daß der Übergang möglichst kein Neoantigen generierte, das zu einer ungewollten Immunreaktion führen könnte.

Im Fall von b) ergaben sich im allgemeinen für beide Ketten im Vergleich humaner mit muriner Sequenzen folgende Eigenschaften: in einem Bereich von bis zu 8 Aminosäuren hinter dem letzten Konsensusmotiv "GxG", das die CDR3-Schleife abschließt, sind die Positionen relativ stark konserviert. Dieser Bereich wird durch eine hochkonservierte Sequenz von bis zu 11 Aminosäuren abgeschlossen. Hiernach beginnen die murinen von den humanen Sequenzen, für jede Spezies hoch konserviert, abzuweichen. Der zentrale Bereich liegt in der ausgehenden Schleife, die die variable Domäne mit der konstanten verbindet (siehe Kriterium a)). Im Idealfall war die Chimärisierung innerhalb einer hoch konservierten Aminosäure (AS)-Triplet-Seqenz vorzunehmen.

Im Fall des α TZR bestand die hochkonservierte Triplet-Seqenz aus "Q-N-P" (Base 400-408 relativ zum Startcodon des murinen α TZR). An Position 407-415 schloß sich eine singuläre *AlwNI*-Schnittstelle an, die zur Fusion genutzt werden konnte: die 3'-versetzte Lage der *AlwNI* bedingte, daß statt des in humanen Sequenzen konservierten Aspartats das in murinen Sequenzen konservierte Glutamat vorlag. Dieser konservative Aminosäureaustausch wurde als wenig immunogen und damit tolerabel erachtet. Der chimäre, hoch-konservierte Bereich lautete I¹³³-Q-N-P-E-P-A-V-Y-Q-L-R¹⁴⁴ in dem R¹⁴⁴ die erste humanspezifische Aminosäure darstellt. I¹³³ befindet sich an der neunten Position hinter dem die CDR3-Schleife abschließenden Konsensusmotiv "GxG".

Die Klonierungsstrategie sah vor, die LMP-Agarose-isolierten *EcoRI/AlwNI*-geschnittenen α -Segmente mit den *AlwNI/BamHI*-verdauten α -PCR-Amplifikaten zu ligieren, die gemischten Ligationsprodukte mit *EcoRI* und *BamHI* nachzuschneiden und das präparierte Ligationsprodukt der potentiell korrekten Fragmentlänge in den Expressionsvektor pcDNA3.1(-) (Invitrogen) zu klonieren. Ein asymmetrischer Testverdau ergab die Klonen mit der gewünschten Abfolge der Ligationsprodukte.

Die humanen konstanten Gensegmente α bzw β wurden durch klassische RT-PCR, wie sie als Bestandteil des oben beschriebenen Roche-Kits implementiert ist, mit anschließender "nested" PCR aus der humanen Leukämie-Zelllinie Jurkat isoliert.

Im Fall des humanen α - Gensegmentes mußte mit Hilfe mutagener PCR-Primer an 2 Positionen zum einen die *AlwNI*-Schnittstelle (T nach A; s. **Tabelle unten**) generiert werden und

zum anderen die Kompatibilität zur murinen Sequenz hergestellt werden (c nach a; s. **Tabelle unten**), da die mittleren 3 Positionen der *Alw*NI-Schnittstelle degeneriert sein dürfen:

AS	<u>Q</u> ¹³⁴			<u>N</u>			<u>P</u>			<u>E / D</u>			<u>P</u>			<u>A</u> ¹³⁹		
Murin	C	A	G	A	A	C	C	C	A	G	a	a	c	C	T	G	C	T
Human	C	A	G	A	A	C	C	C	T	G	a	c	c	C	T	G	C	C

Die in der murinen Sequenz natürlich vorkommende *Alw*NI-Schnittstelle ist fett dargestellt, die 3'-versetzte Schnittposition ist unterstrichen. Das degenerierte Triplet ist klein geschrieben. Die erforderlichen Basenaustausche für den humanen „Primer“ zur Beibehaltung einer Maussequenz-kompatiblen *Alw*NI-Schnittstelle sind fett dargestellt. Die 5'-initiale Base des mutagenen Primers ist kursiv. Die resultierende chimäre AS-Sequenz ist fett dargestellt (s. Text); das hoch-konservierte AS-Triplett ist zudem unterstrichen.

Die Amplifikation des α -Fragmentes erfolgte über eine „nested“ PCR. Die Mutationen wurden in den „nested“ Primer (**for_hucaTCR_AlwNI_3; SeqID Nr. 27**) gelegt, wohingegen der RT-PCR - Primer (**for_hucaTCR_2; SeqID Nr. 25**) noch der humanen Wildtyp-Sequenz entsprach. Der reverse „nested“ Primer **rev_hucaTCR_BamHI_1 (SeqID Nr. 28)** besaß sowohl das Stopcodon als auch die klonierbare *Bam*HI-Schnittstelle, wohingegen der reverse RT-PCR-Primer (**rev_hucaTCR_2; SeqID Nr. 26**) den 3'-liegenden nicht-kodogenen Bereich erkannte.

Im Fall des β TZR kam ebenso das "nested" PCR-Prinzip gekoppelt an eine stumpfendige Ligation zur Anwendung (**SeqID Nrn. 29-32**). Die hoch-konservierte Tripletsequenz bestand aus "E-D-L" (Base 400-408 relativ zum Startcodon des murinen β TZR). Deckungsgleich befand sich eine das variable Gensegment umfassende und singuläre *Bst*YI-Schnittstelle (Base 402-407). Ein für das humane konstante Domänen-Gensegment spezifischer Primer (**for_hucbTCR_4; SeqID Nr. 31**) sollte über sein 5'-terminales Ende, das mit einem phosphorylierten „T“ die letzte Base der potentiell palindromen Erkennungssequenz von *Bst*YI darstellt, das mit *Bst*YI-verdaute (produziert überhängende 5'-Enden, die mit der T4-DNS-Polymerase komplementär unter Zugabe von dNTP's aufgefüllt und nicht abgedaut werden) und stumpfendig aufgefüllte 3'-Ende des murinen variablen Domänen-Gensegmentes komplementieren, so daß der richtige Leserahmenkontext erhalten blieb. Das $\nu\beta$ -Fragment wurde mit *Eco*RI nachgeschnitten und aus einem LMP-Gel isoliert, das c β -PCR-Amplifikat wurde als zusätzlich enzymatisch phosphoryliertes (T4-Polynukleotid-Kinase, NEB) einseitig stumpf-

fendiges *Bam*HI - Fragment in der Ligation eingesetzt. Die gemischten Ligationsprodukte wurden mit *Eco*RI / *Bam*HI nachgeschnitten und das Fragment mit der potentiell richtigen Fragmentlänge in pcDNA3.1(-) kloniert. Ein asymmetrischer Testverdau ergab die Klonen mit der gewünschten Abfolge und Orientierung der Ligationsprodukte.

AS	E ¹³³			D			L		
murin	G	A	<u>G</u>	<u>G</u>	A	T	C	T	G
human	G	A	G	G	A	C	C	T	G

Die in der murinen Sequenz natürlich vorkommende *Bst*YI-Schnittstelle ist fett dargestellt, die 5'-versetzte Schnittposition, die 5'-Überhänge generiert, ist unterstrichen. Die 5'-initiale und phosphorylierte Base „T“ des humanen „nested“ Primers, die die letzte Base von *Bst*YI im chimären Konstrukt ergänzt, ist kursiv. Die resultierende chimäre AS-Sequenz ist fett dargestellt (s. Text); das hoch-konservierte AS-Triplett ist zudem unterstrichen.

Der chimäre hoch-konservierte Bereich lautete E¹³³-D-L-N¹³⁶ in dem N¹³⁶ die erste human-spezifische Aminosäure darstellt. E¹³³ befindet sich an der siebten Position hinter dem konservierten "GxG"-Motiv, das die CDR3-Schleife abschließt.

2.3) Generierung der Einzelketten-TZRs $\mu\text{v}\alpha$ -Li- $\mu\text{v}\beta$ - $\mu\text{c}\beta$ (SeqID Nr. 42) und $\mu\text{v}\beta$ -Li- $\mu\text{v}\alpha$ - $\mu\text{c}\alpha$ (SeqID Nr. 43)

Einzelketten-TZRs bestehen aus der Fusion der variablen Domänen $\text{v}\alpha$ mit $\text{v}\beta$ und einer angefügten konstanten Domäne $\text{c}\alpha$ oder $\text{c}\beta$ (Eshar et al., 1993). Der Vorteil solcher Konstrukte liegt in der definierten 1:1-Stöchiometrie der beiden variablen Domänen in einem Konstrukt und der definierten Reaktivität aufgrund der auszuschließenden heterogenen Paarung endogener mit exogener Doppelketten-TZRs. Die variablen Domänen wurden über einen flexiblen Polylinker eines redundanten (GGGGS)₃-Motivs verbunden. Die Enden des synthetischen Oligonukleotids beherbergten singuläre Schnittstellen, mit denen das carboxyterminale Ende der einen variablen Domäne, hinter der essentiellen CDR3-Schleife gelegen, mit dem Anfang der anderen variablen Domäne, hinter der Sequenz, die für das signalpeptid kodiert, liegend verknüpft werden konnten. Kozeptionell wurden fünf Kriterien beachtet:

- der Polylinker mußte lang genug sein, um die Enden der variablen Enden zu verbinden. Hierzu wurden murine TZR-Kristallstrukturen einer MHC-H-2K^b-Spezifität zu Rate gezogen.

- b) der Polylinker hatte die Enden derart zu verbinden, so daß dieser zum einen die Spezifität der CDR3-Schleife nicht beeinträchtigte, zum anderen das Signalpeptid der nachgeschalteten variablen Domäne hinreichend eliminierte unter Beibehaltung ihrer funktionellen Struktur. Um dies zu bewerkstelligen, wurden in dem Polylinker Aminosäure-Sequenzen der jeweiligen variablen Domäne mit aufgenommen für den Fall, in dem die singulären Schnittstellen nicht ideal lagen.
- c) Der Polylinker mußte zum einen flexibel sein, was mit Hilfe einer sterisch begünstigenden Aneinanderreihung von Glycin-Resten bewerkstelligt werden sollte, zum anderen hinreichend löslich sein, um Aggregatbildung und Präzipitation zu vermeiden: die Hydroxyl-Gruppe des Serin-Restes bildet Wasserstoff-Brücken mit solvatisierenden Wasser-Molekülen aus und bildet lokale Dipole.
- d) um die Transkription im richtigen Leserahmen nicht zu beeinträchtigen, wurden die kodogenen Triplets für die Glycin-Reste variiert ("GGC" und "GGA").
- e) der Polylinker mußte dieselben internen singulären Schnittstellen besitzen wie die Wildtypsequenzen, um in einem 2-Schritt-Klonierungsverfahren die Zwischenprodukte aufzuschneiden und die nahezu vollständigen Wildtypsequenzen über diese singulären Schnittstellen 3'-terminal anzufügen.

Unter diesen Voraussetzungen war es möglich zwei Orientierungen der variablen Domäne zuzulassen :

Im Fall des Konstruktes **muva-Li-muvβ-mucβ (SeqID Nr. 42; Figur 5)** wurde die singuläre Schnittstelle *KpnI* hinter dem letzten Konsensus-Motiv "GxG" der variablen vα-Domäne und *DraIII* als die die Signalpeptid kodierende Sequenz abschließende Restriktionsschnittstelle in der vβ-Domäne gewählt. In einem ersten Schritt wurde das hybridisierte, doppelsträngige Oligonukleotid beidseitig mit *KpnI* geschnitten und zwischen die vα-kodierende und α-kodierende Sequenz des Wildtyp-αTZR kloniert. Hiernach wurde das chimäre Zwischenprodukt mit *DraIII/BamHI* aufgeschnitten und die die βTZR-kodierende Sequenz, die über einen *DraIII/BamHI*-Verdau ihre die Signalpeptid-kodierende Sequenz verloren hatte, hineinkloniert. Das erste Glycin des Polylinkers lag an Position 6 relativ zum aminoterminalen Gly des "GxG"-Konsensus-Motivs in vα, das letzte Serin des Polylinkers, aufgrund einer zwischengeschalteten stumpfendigen Ligation über ein Arginin verbunden, vor Position Asp²² der vβ-Domäne.

Im Fall des Konstruktes **mu ν β -Li-mu ν α -mu α** (SeqID Nr. 43; Figur 6) wurde die singuläre Schnittstelle *ScaI* hinter dem letzten Konsensus-Motiv "GxG" der variablen $\nu\beta$ -Domäne und *BsgI* als die die Signalpeptid kodierende Sequenz abschließende Restriktionsschnittstelle in der $\nu\alpha$ -Domäne gewählt. In einem ersten Schritt wurde das hybridisierte, doppelsträngige Oligonukleotid beidseitig mit *ScaI* geschnitten und zwischen die $\nu\beta$ -kodierende und $c\beta$ -kodierende Sequenz des Wildtyp- β TZR kloniert. Hiernach wurde das chimäre Zwischenprodukt mit *BsgI/BamHI* aufgeschnitten und die die α TZR-kodierende Sequenz, die über einen *BsgI/BamHI*-Verdau ihre die Signalpeptid-kodierende Sequenz verloren hatte, hineinkloniert. Das erste Glycin des Polylinkers lag an Position 6 relativ zum aminoterminalen Gly des "GxG"-Konsensus-Motivs in $\nu\beta$, das letzte Serin des Polylinkers vor Position Val²⁴ der $\nu\alpha$ -Domäne.

2.4) Generierung der Doppelketten-TZRs in Fusion zur humanen CD3 ζ -Kette mu ν α -hu α CD3 ζ (SeqID Nr. 44; Figur 7) und mu ν β -huc β -huCD3 ζ (SeqID Nr. 45; Figur 8)

Die Signaltransduktion der Doppelketten-TZRs sollte optimiert werden. Hierzu fusionierte man die jeweiligen Doppelketten- α/β TZRs an die nahezu vollständige CD3 ζ -Untereinheit des CD3-Komplexes. Diese Fusion bewerkstelligt gemäß verschiedener Publikationen (**Eshar et al., 1994**) eine effiziente und CD3-unabhängige Kopplung des TZR an die in der Kaskade flußaufwärts bzw. flußabwärts liegenden Effektoren Lck⁵⁶ bzw. ZAP-70.

Es wurde eine modifizierte Ligations-PCR-basierende Technik etabliert, mit deren Hilfe man unabhängig von singulären Schnittstellen beliebige Fusionen zur Herstellung chimärer Proteine erzeugen konnte und die Spezifität der erhaltenen PCR-Amplifikate deutlich erhöht wurde im Vergleich zu einer konventionellen Ligations-PCR. Die genetische Fusion wird über einen reversen, chimären Primer (**rev_huca-hu_tm_Zeta**, SeqID Nr. 36, Figur 7; **rev_hucb-hu_tm_Zeta**; SeqID Nr. 37, Figur 8) definiert, der mit einem Vorwärts-Primer (**T7_for**; SeqID Nr. 33) als PCR-Amplifikat den "Mega-Primer" produziert: in einem ersten, konventionellen Ligations-PCR-Schritt wird für den 5'-liegenden Fusionspartner ein "Megaprimer" generiert, der zudem als Sequenzanhängsel eine kurze für den 3'-liegenden Fusionspartner spezifische Sequenz trägt. Um die Spezifität der PCR-Signale deutlich zu erhöhen, werden bereits in der ersten PCR Primer verwendet, die außerhalb des kodogenen, chimären Amplifikates an den vorgelegten „Templates“ hybridisieren (**T7_for**; **T7_rev**; SeqID Nr. 33, 34), um dann in der zweiten PCR inwärts-liegende ("nested") Primer zu verwenden. In dieser liefert der Mega-Primer zusammen mit einem auf den 3'-liegenden Fusionspartner hybridisierenden

reversen "nested" Primer (**rev_hZeta_BamHI_4; SeqID Nr. 35**) ein Zwischenprodukt, das mit einem dritten, am 5'-Ende "nested" liegenden Vorwärts-Primer (**for_aTCR_NcoI_5b; for_bTCR_NcoI_5b; SeqID Nr.s 20, 22**) ein an den Enden getrimmtes PCR-Amplifikat liefert.

Der Fusionspunkt wurde auf die die Disulfidbrücken-bildenden Cysteine festgelegt: hierdurch verloren die TZRs ihre cytoplasmatische Sequenz, die Transmembrane und einen kurzen Bereich extracytoplasmatisch liegender Aminosäuren bis zum dimerisierenden Cystein, die humane α -Kette verlor ebenso einen kurzen extracytoplasmatischen Abschnitt, sollte aber exklusive ihres Cystin-bildenden Cysteins für den transmembranen und cytosolischen Bereich inklusive der drei bivalenten "ITAM"-Motive kodieren. Der reverse chimäre Primer kodiert für die 3'-terminal liegenden 21 Basen des jeweiligen partiell humanisierten TZR und für die 5'-terminal liegenden 21 Basen der humanen CD3 ζ -Kette (**Figur 7**). Die chimären Konstrukte sind von der konstanten Domäne an humanisiert.

3.) Transduktion humaner peripherer Blut Lymphozyten (PBLs)

Zur Transduktion humaner peripherer T-Lymphozyten wurde ein funktionelles Derivat des pStitch-Systems (Weijtens et al., 1999), verwendet. Die zur Verpackung notwendigen retroviralen Gene werden über individuelle Plasmide im Wege einer Cotransfektion der Verpackungszelllinie 293T kodiert (Soneoka et al., 1995): pHit60 kodiert für die *gag-pol* - Struktur- und Polymerase - Gene aus dem Moloney murinen Leukämie Virus (MoMuLV), pColt-Galv für das *env* - Hüllprotein des "gibbon ape leukemia virus", das imstande ist, an den Na⁺/Phosphat-Synporter Pit humaner Zellen zu binden und damit letztere zu transduzieren. Die chimären Viruspartikel besitzen somit einen amphotropen Pseudotyp und können verschiedene Säugerzellen, außer Maus, transduzieren.

3.1) Transfektion der Verpackungszelllinie 293T

Die isolierten bakteriellen Klone der in das pStitch-Derivat klonierten T-Zell-Rezeptor-Gene wurden über Plasmid-Präparationen, die eine Entfernung residueller Endotoxine versprechen (Qiagen, Produkt 12362), gereinigt und zu 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ eingestellt. Die DNS wurde über die Calciumphosphat-Präzipitation transient in die Verpackungszelllinie 293T eingeführt (GiboBRL-Life Technologies, Produkt 18306-019). Hierbei werden im Rahmen der WT- oder modifizierten Doppelketten-T-Zell-Rezeptoren α TZR und β TZR bis zu 80 μg DNS eingesetzt:

20 μg α TZR - Konstrukt

20 µg βTZR - Konstrukt

20 µg pColt-Galv

20 µg pHit 60

Im Fall der Einzelketten-TZRs werden 60 µg DNS eingesetzt. 293T wurde in einem modifizierten DMEM-Medium (DMEM/H) kultiviert:

DMEM, 4,5% Glukose (BioWhittaker)

10% hitzeinaktiviertes FKS

2mM Glutamin

1x Penicillin/Streptomycin

1x nicht-essentielle Aminosäuren

25 mM HEPES

Am Vortag der Transfektion wurden die Zellen 293T auf $0,9 \cdot 10^6$ Zellen pro T25-Flasche und Transfektionsansatz in 5ml DMEM/H ausgesät. 4 h vor Transfektion wurde das Medium gegen frisches, auf Raumtemperatur (RT) erwärmtes DMEM-H (3ml) ersetzt. Die Transfektion erfolgte laut Vorschrift des kommerziellen Protokolls (Life Technologies). 1ml des Transfektionsansatzes wurde zu der jeweiligen Flasche unter vorsichtigem Hinzutropfen pipettiert. Das DNS- $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ -Präzipitāt sollte fein verteilt sich auf den adhärenen Zellen niederlegen.

Am darauffolgenden Morgen wurde das Medium gegen frisches, auf RT erwärmtes DMEM/H ausgetauscht. 6 h später erfolgte die Kokultivierung mit den aktivierten PBLs .

3.2) Transduktion der aktivierten PBLs

3.2.1) Aktivierung peripherer Blut-Lymphozyten (PBLs)

3 Tage vor der angesetzten Kokultivierung wurden fikollisierte PBLs zu $2 \cdot 10^6$ Zellen/ml in huRPMI-P jeweils in 2ml einer 24well-Platte (Zellgewebe-behandelte Oberflächen) ausgesät. Die Aktivierung erfolgte über den kreuz-vernetzenden Antikörper OKT-3 (Orthoclone-Diagnostics) zu 20 ng/ml.

huRPMI-P:

RPMI 1640 (2mM Glutamin) ohne Phosphat (Life Tec., 11877-032)

10 % humanes, hitzeinaktiviertes AB-Serum (HLA-A2.1 seropositiv)

25 mMHEPES

1 x Penicillin/Streptomycin (Life Tec.)

Die Platten wurden in einem Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

3.2.2) Kokultivierung

Zur Kokultivierung wurden die aktivierten PBLs aus den jeweiligen Vertiefungen einer 24well-Platte vereinigt und gezählt. Adhärenente Monozyten wurden verworfen. Die Zellen werden abzentrifugiert (1500 rpm, 5 min, RT) und in einer Konzentration von $2,5 \cdot 10^6$ Zellen/ml in frischem huRPMI-P aufgenommen und in den Brutschrank zurückgestellt. Das Medium wurde zuvor zu 400 U/ml IL-2 (Chiron) und 5 µg/ml Polybren (Sigma) eingestellt.

Jeder Transfektionsansatz wurde 6h nach Mediumwechsel nacheinander trypsiniert: hierzu wurde jede T25 mit 3ml HBSS (Life Technologies) gewaschen, mit 1 ml Trypsin-EDTA (Life Technologies) für maximal 5 Minuten inkubiert, die gelösten Zellen quantitativ aufgenommen und in 4ml vorgelegtes huRPMI-P (RT) unter Rühren getropft. Die 293T Zellen werden mit 2500 rad bestrahlt. Diese werden abzentrifugiert (1500 rpm, 5 min, RT) und in 4 ml frisches, eingestelltes huRPMI-P, mit 400U/ml IL-2 und 5µg/ml Polybren supplementiert, resuspendiert. Zu dem Ansatz wurde 1 ml der eingestellten PBLs gegeben und der Ansatz ($0,5 \cdot 10^6$ PBLs/ml) für drei Tage im Brutschrank (37°C, 5% CO₂) inkubiert.

Am Tag 3 nach Kokultivierung wurden die suspendierten PBLs abgenommen und in frischem, mit IL-2 (400 U/ml) supplementiertem Medium huRPMI-P zu $0,5 \cdot 10^6$ Zellen/ml resuspendiert. 3 Tage später erfolgte ein neuerlicher Split in frisches Medium. In diesen 7 Tagen wurde maximal expandiert bis zum Übergang auf T75-Flaschen. Diese Zellen konnten direkt in einer immunologischen Anfärbung (FACS-Analyse; Kap. 3.3, **Figur 9**) oder in einem klassischen ⁵¹Chrom-Freisetzungstest (Kap. 3.4, **Figuren 10-15**) eingesetzt werden.

3.3) Beispiele der FACS-Analyse

Die unter 2.) beschriebenen Konstrukte wurden nach retroviraler Transduktion im "fluorescence activated cell sorting" (FACS) analysiert. Hierzu wurden $0,25 \cdot 10^6$ Zellen sättigend mit Fluorophor-markierten Antikörpern gefärbt: die heterolog exprimierte β-Kette wurde mit anti-νβ6-FITC (BD) nachgewiesen; die Gesamtheit der T-Zellen über den Marker anti-CD3-PC5 (Coulter-Beckman) (**Figur 9**).

Als Negativ-Kontrolle diente eine mit dem leeren pStitch-Derivat transduzierte Probe. Der Wildtyp $\text{mu}\nu\alpha\text{-}\mu\text{u}\alpha/\text{mu}\nu\beta\text{-}\mu\text{u}\beta$ (2.1) sowie die chimären Konstrukte $\text{mu}\nu\alpha\text{-hu}\alpha/\text{mu}\nu\beta\text{-hu}\beta$ (2.2) erzielten Transduktionseffizienzen im Bereich von 10-25% 6 Tage nach Kokultivierung. Die Expression konnte in mehreren Donoren HLA-A2 - positiver T-Zellen reproduziert werden. Das cytosolisch exprimierte Grün-fluoreszierende Protein (eGFP, umklont aus eGFP-N1 der Firma Clontech) diente als externer Standard und zeigte auf, daß die vergleichbar schwache Transduktionseffizienz als Ausdruck des prozentualen Nachweises erfolgreich transduzierter T-Zellen ein methodisches Problem und kein intrinsisches Problem der TZR-Transgene ist.

3.3.1) Anreicherung $\nu\beta 6$ -positiver T-Zellen über magnetische Sortierung

Um die erfolgreich transduzierten T-Zellen anzureichern, wurden diese über magnetisch markierte $\nu\beta 6$ -Antikörper im magnetischen Feld sortiert (laut Vorschrift Miltenyi-Biotec). Hierzu wurde ein magnetisch markierter Antikörper verwendet, der den Ratten IgG-Anteil der $\nu\beta 6$ -spezifischen Antikörper erkennt (Miltenyi-Biotec "Goat anti-rat IgG MicroBeads", Produkt 485-01). Es konnten Anreicherungen $\nu\beta 6$ -positiver $\text{CD}3^+$ - T-Zellen von über 90% erreicht werden.

3.4) Cytolytische Aktivität der transduzierten T-Zellen

Die transduzierten T-Zellen wurden in einem klassischen $^{51}\text{Chrom}$ -Freisetzungstest auf ihre zytotoxische Spezifität hin überprüft. In diesem System wurden Zielzellen radioaktiv durch Inkorporation von $^{51}\text{Chrom}$ markiert. Erkannten die retroviral modifizierten Effektorzellen die Zielzelle peptidspezifisch, wurden letztere durch die Effektorfunktionen der T-Zelle in die Apoptose getrieben und durch Lyse getötet. Das Ausmaß des freigesetzten Chrom-Nuklids trifft eine Aussage über die Effektivität der Zell-Erkennung und Lyse. Die Effektivität wurde über einen weiten Bereich des Verhältnisses eingesetzter Effektor-Zellen zu Zielzellen (E:T) getestet. Als Referenz diente der murine hdm2-81-88 peptidspezifische T-Zell-Klon 3, aus dem die T-Zell-Rezeptor-Gene isoliert wurden. Als Zielzellen dienten:

T2: humane TAP-defiziente Zelllinie die exogen mit beliebigem Peptid zu beladen war. Das spezifische Peptid war hdm2-81-88, ein irrelevantes Kontroll-Peptid entstammte dem Influenza-Matrixprotein FluM1.

Saos-2/6: Transfektante der humanen Saos-2-Zelllinie, die hdm2 exprimiert und endogen prozessiert.

Saos2/143: Transfektante der humanen Saos-2-Zelllinie, die die p53-Mutante Val¹⁴³Ala trägt. Die p53-Mutante reguliert die Expression von hdm2 in positiver Weise

JY: EBV-transformierte LCL-B-Zelllinie

UocB11, EU-3: pre-B-Zell-Leukämie

IM-9: Plasmocytom

3.4.1 Peptid-Titration (Figuren 10-12)

Die Zelllinie T2 wurde exogen mit dem hdm2-81-88-Peptid in einer Konzentrationsreihe von $1 \cdot 10^{-6} \text{M}$ bis $1 \cdot 10^{-12} \text{M}$ beladen. Es konnte sowohl für $\text{mu}\nu\alpha\text{-mu}\alpha/\text{mu}\nu\beta\text{-mu}\beta$ (2.1) als auch $\text{mu}\nu\alpha\text{-hu}\alpha/\text{mu}\nu\beta\text{-hu}\beta$ (2.2) eine Peptid-spezifische und Dosis-abhängige cytotoxische T-Zell-Antwort beobachtet werden. Für die beiden Konstrukte lagen bei E:T = 20:1 die halbmaximalen Lysen im subnanomolaren Bereich eingesetzten Peptids. Als Negativ-Kontrolle fungierte ein nicht-funktioneller Einzel-Ketten T-Zell-Rezeptor, der zwar exprimiert und laut 3.3.1) anreicherbar war, aber keine Lysis-Aktivität aufwies. Als Positiv-Kontrolle diente der murine hdm2-81-88 peptidspezifische T-Zell-Klon 3.

3.4.2 Erkennung von maligne transformierten Zell-Linien (Figuren 13-15)

Die oben beschriebenen Zelllinien konnten Peptid-spezifisch lysiert werden. Einige der pre-B-Zell-Leukämien konnten im Fall der WT-Ketten bei hohen E:T's zu 100 % lysiert werden. Ebenso wie im Fall der Peptid-Titration zeigten die Wildtyp-Ketten (2.1) eine höhere Lysis-Effizienz im Vergleich zu den partiell humanisierten, chimären Ketten (2.2). Als Negativ-Kontrolle fungierte ein nicht-funktioneller Einzel-Ketten T-Zell-Rezeptor, der zwar exprimiert und laut 3.3.1) anreicherbar war, aber keine Lysis-Aktivität aufwies. Als Positiv-Kontrolle diente der murine hdm2-81-88 peptidspezifische T-Zell-Klon 3.

Patentansprüche

1. Polypeptid eines eine hdm2-Protein-spezifische T-Zell Antwort vermittelnden murinen α/β T-Zell Rezeptors gemäß SEQ ID Nr. 1 oder SEQ ID Nr. 2 oder funktioneller Varianten oder Teile davon oder dieses kodierende Nukleinsäuren, funktionelle Varianten oder Teile davon.
2. Fusionsprotein, umfassend ein Polypeptid gemäß Anspruch 1 oder funktionelle Varianten oder Teile davon oder dieses kodierende Nukleinsäuren, funktionelle Varianten oder Teile davon.
3. Fusionsprotein nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß es die ζ -Region von CD3 und/oder CD8, CD16 oder Teile davon umfaßt, insbesondere die ζ -Region von humanem CD3 und/oder CD8, CD16 oder Teile davon.
4. Fusionsprotein nach Anspruch 2 oder 3, weiterhin einen flexiblen Linker umfassend, insbesondere einen Linker der Aminosäuresequenz (GGGS)₃.
5. Fusionsprotein nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um ein chimäres, zumindest partiell humanisiertes Fusionsprotein handelt, insbesondere gemäß SEQ ID Nr. 3 oder SEQ ID Nr. 4.
6. Fusionsprotein nach einem der Ansprüche 2 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um einen Einzelketten T-Zell Rezeptor handelt, insbesondere gemäß SEQ ID Nr. 5 oder SEQ ID Nr. 6.
7. Fusionsprotein nach einem der Ansprüche 2 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um einen Doppelketten T-Zell Rezeptor handelt, insbesondere gemäß SEQ ID Nr. 7 oder SEQ ID Nr. 8.
8. α - oder β -Kette eines T-Zell-Rezeptors, der die Antigen-Erkennungssequenz eines für die Aminosäuren 81-88 des Proteins hdm2 oder eines Komplexes von hdm2 81-88 und HLA-A2 spezifischen Antikörpers umfaßt.

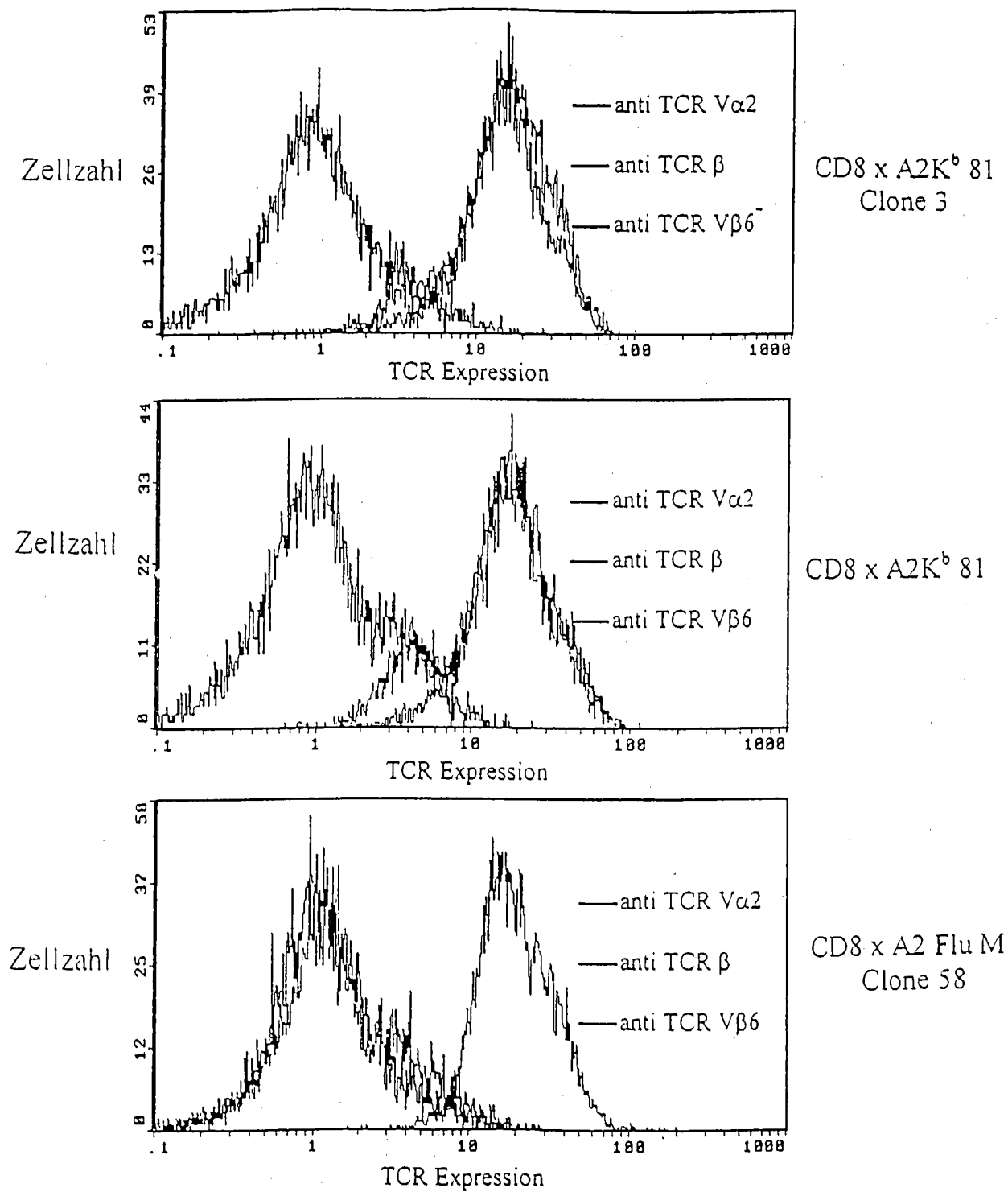
9. Polypeptid nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß das Polypeptid synthetisch hergestellt worden ist.
10. Nukleinsäure nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine DNA oder RNA, vorzugsweise eine DNA, insbesondere eine doppelsträngige DNA mit einer Länge von mindestens 8 Nukleotiden, vorzugsweise mit mindestens 18 Nukleotiden, insbesondere mit mindestens 24 Nukleotiden ist.
11. Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1, 2 oder 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Sequenz der Nukleinsäure mindestens ein Intron und/oder eine polyA-Sequenz aufweist.
12. Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1, 2, 10 oder 11 in Form ihrer komplementären „antisense“-Sequenz.
13. Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1, 2 oder 10 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure synthetisch hergestellt worden ist.
14. Vektor, vorzugsweise in Form eines Plasmids, shuttle Vektors, Phagemids, Cosmids, Expressionsvektors, retroviralen Vektors adenoviralen Vektors oder Partikels und/oder gentherapeutisch wirksamen Vektors, umfassend eine Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1, 2 oder 10 bis 13.
15. Wirtszelle, transfiziert mit einem Vektor oder infiziert oder transduziert mit einem Partikel gemäß Anspruch 14.
16. Wirtszelle nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um eine T-Zelle oder eine T-Zell-Vorläuferzelle oder eine Stammzelle handelt.
17. Wirtszelle nach Anspruch 15 oder 16, dadurch gekennzeichnet, daß auf ihrer Oberfläche ein Polypeptid oder Fusionsprotein gemäß einem der Ansprüche 1 bis 9 exprimiert wird.
18. Verfahren zur Identifizierung von hdm2-Protein-spezifischen Antigenen, dadurch gekennzeichnet, daß hdm2-präsentierende Tumorzellen oder Fraktionen davon mit einer Wirtszelle gemäß Anspruch 17 unter Bedingungen zusammengebracht werden, bei denen die

Tumorzellen oder Fraktionen davon nur dann lysiert werden, wenn der Tumor das hdm2-Protein-spezifische Antigen präsentiert, für welches das exprimierte Polypeptid oder Fusionsprotein spezifisch ist.

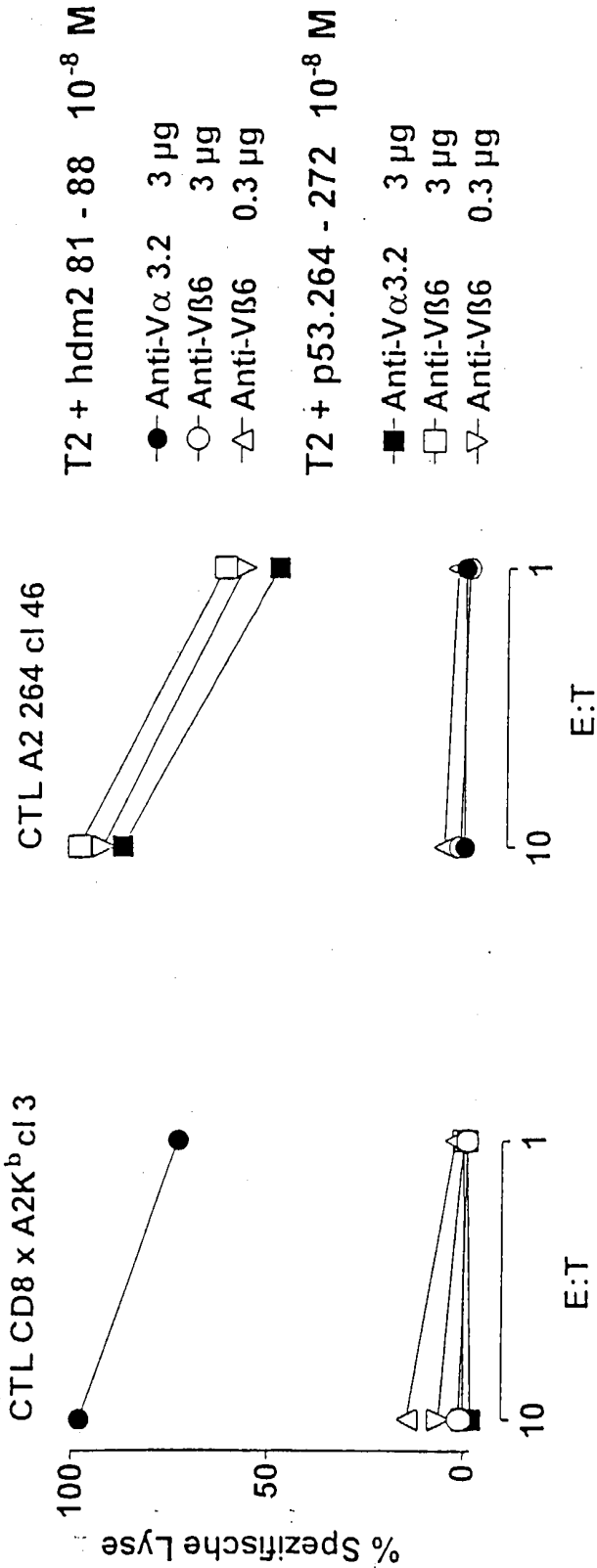
19. Verfahren zur Herstellung eines gegen ein Polypeptid, Fusionsprotein oder eine Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1 bis 13 gerichteten Antikörpers, vorzugsweise eines polyklonalen oder monoklonalen Antikörpers zur Diagnose, Behandlung und/oder Überwachung der Behandlung von mit hdm2-Protein assoziierten Erkrankungen und/oder zur Identifizierung von pharmakologisch aktiven Substanzen, dadurch gekennzeichnet, daß ein Antikörper produzierender Organismus mit einem Polypeptid oder funktionelle Äquivalente davon oder Teile davon mit mindestens 6 Aminosäuren, vorzugsweise mit mindestens 8 Aminosäuren, insbesondere mit mindestens 12 Aminosäuren nach einem der Ansprüche 1 bis 9 immunisiert bzw. mit diesen kodierenden Nukleinsäuren vakziniert wird.
20. Antikörper, hergestellt gemäß Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß er gegen ein Polypeptid nach einem der Ansprüche 1 bis 9 gerichtet ist.
21. Rekombinanter Antikörper, dadurch gekennzeichnet, daß er die Antigen-Erkennungssequenz der α - oder β -Kette eines für die Aminosäuren 81-88 des Proteins hdm2 oder eines Komplexes von hdm 2 81-88 und HLA-A2 spezifischen T-Zell-Rezeptors umfaßt.
22. Verfahren zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von mit hdm2-Protein assoziierten Erkrankungen, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine Nukleinsäure, mindestens ein Polypeptid, mindestens eine Wirtszelle oder mindestens ein Antikörper nach einem der vorgenannten Ansprüche zusammen mit geeigneten Zusatz- und Hilfsstoffen kombiniert wird.
23. Arzneimittel zur Behandlung von mit hdm2-Protein assoziierten Erkrankungen, dadurch gekennzeichnet, daß es mindestens eine Nukleinsäure, mindestens ein Polypeptid, mindestens eine Wirtszelle oder mindestens einen Antikörper nach einem der vorgenannten Ansprüche, gegebenenfalls zusammen mit geeigneten Zusatz- und Hilfsstoffen, enthält.

24. Verwendung eines Arzneimittels nach Anspruch 23 zur Behandlung von mit hdm2-Protein assoziierten Erkrankungen.
25. Verfahren zur Herstellung eines Tests zur Auffindung funktioneller Interaktoren in Zusammenhang mit hdm2-Protein assoziierten Erkrankungen, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine Nukleinsäure, mindestens ein Polypeptid oder mindestens ein Antikörper nach einem der vorgenannten Ansprüche zusammen mit geeigneten Zusatz- und Hilfsstoffen kombiniert wird.
26. Test zur Identifizierung funktioneller Interaktoren in Zusammenhang mit hdm2-Protein assoziierten Erkrankungen, dadurch gekennzeichnet, daß er mindestens eine Nukleinsäure, mindestens ein Polypeptid oder mindestens einen Antikörper nach einem der vorgenannten Ansprüche, gegebenenfalls zusammen mit geeigneten Zusatz- und Hilfsstoffen, enthält.

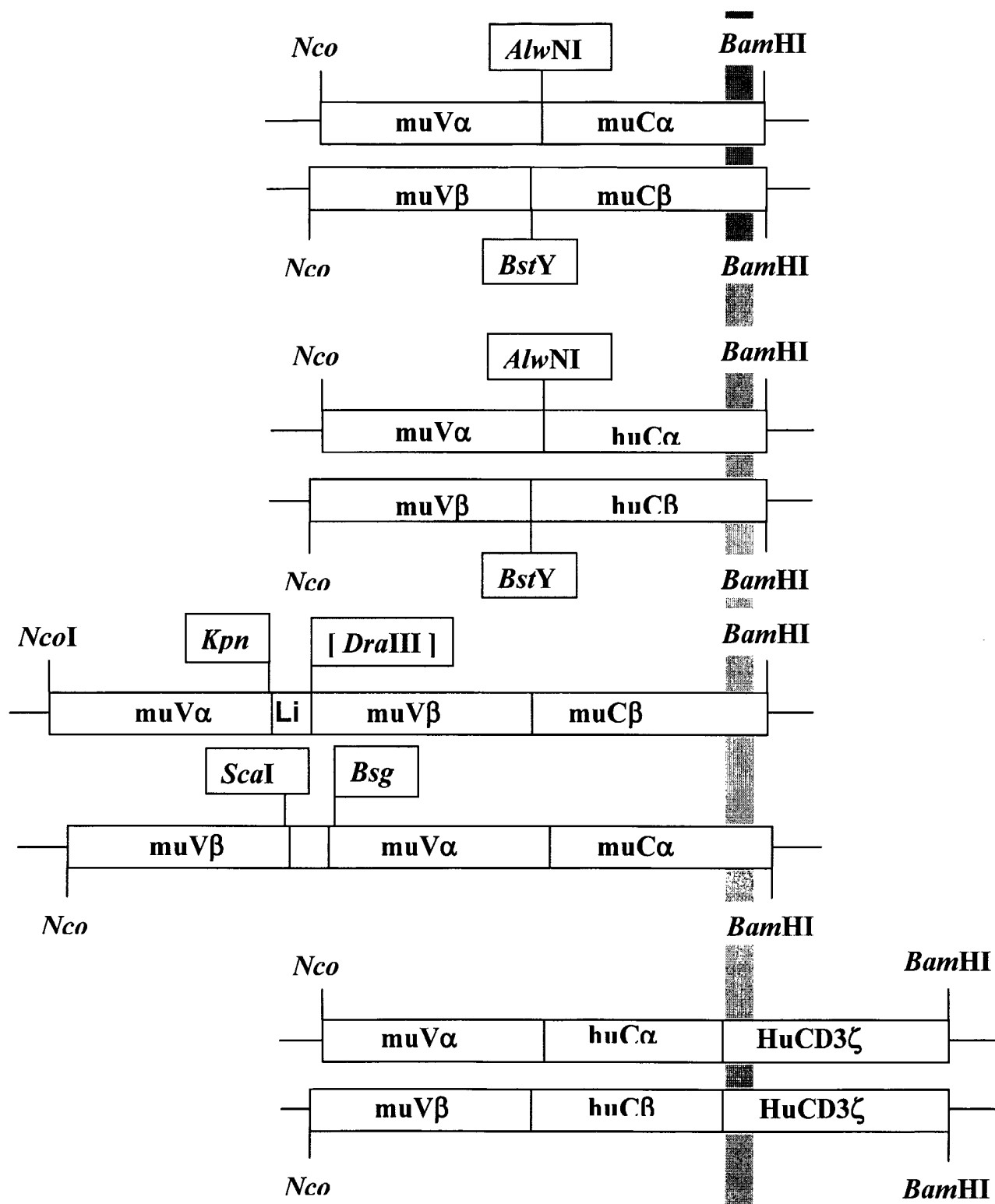
Figur 1



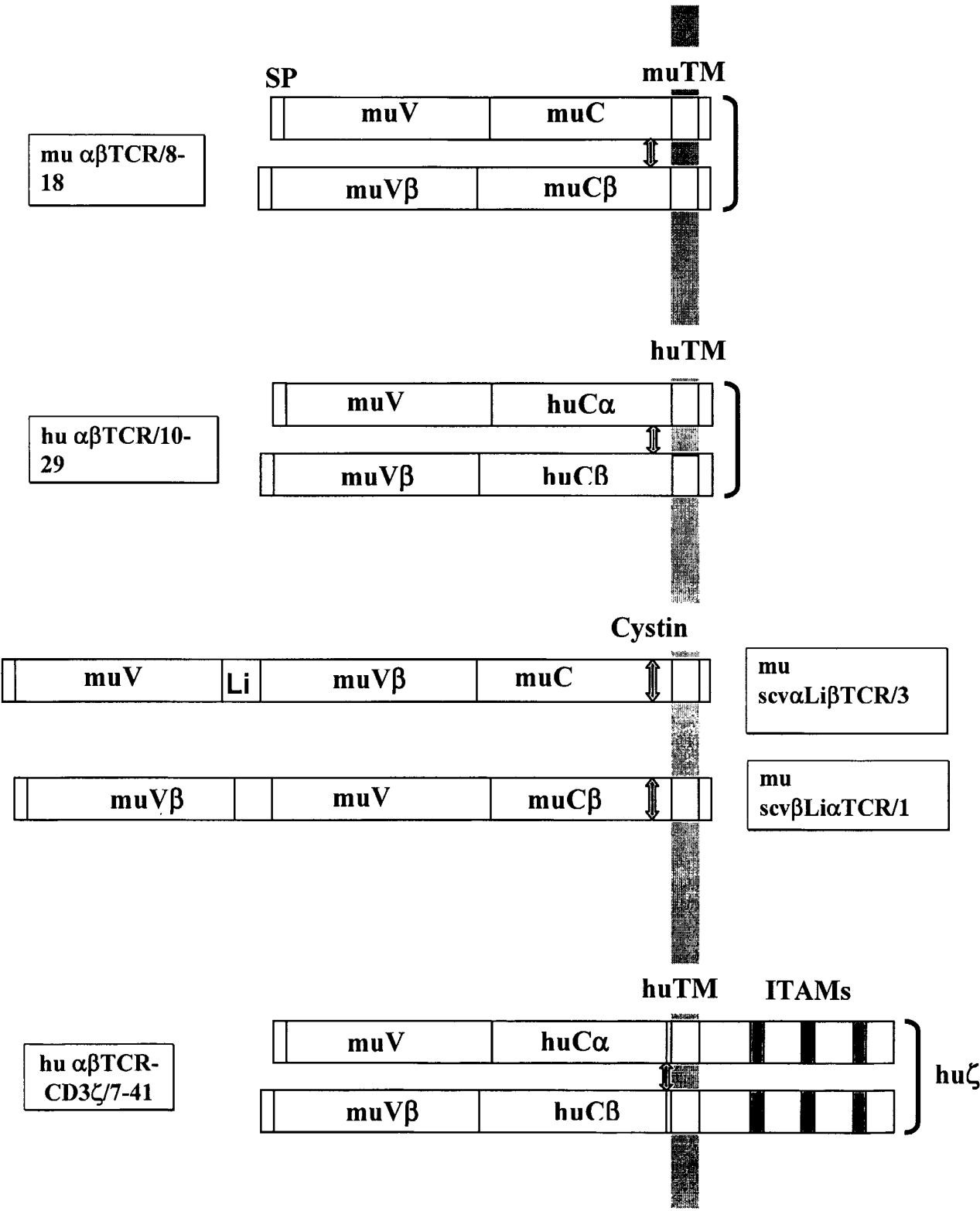
Figur 2



Figur 3



Figur 4



Figur 5

Polylinker KpnI-Li(GlyGlyGlyGlySer)₃-DraIII-KpnI

			Gly			Thr			Arg			Leu			Lys			Val			Gly			Gly		
C	G	G	G	G	T	A	C	C	A	G	A	C	T	G	A	A	G	G	T	T	G	G	C	G	G	A

KpnI

Gly			Ser			Gly			Gly			Gly			Ser			Gly			Gly			Gly		
G	G	C	A	G	C	G	G	C	G	G	C	G	G	C	A	G	C	G	G	C	G	G	C	G	A	

Gly			Ser			Gln			Gly																		
G	G	C	T	C	A	C	A	G	G	G	T	G	A	T	C	C	G	G	G	T	A	C	C	C	G		

Dra III

Kpn I

Polylinker ScaI-Li(GlyGlyGlySer)₃-BsgI-ScaI

[illegible]

Scal

[illegible][illegible]

Gly		Ser			Val			Gln			Gln			Ser			Pro			Ala			Ser			Leu			
G	G	C	C	A	G	C	G	T	G	C	A	G	C	A	G	A	G	T	C	C	T	G	C	A	T	C	T	T	G

Bsgl

[illegible]

Sea I

Figur 7

Fusion von $\text{mu}\nu\alpha\text{hu}\alpha\text{TCR}$ (hdm2 81-88) mit $\text{huCD3}\zeta$

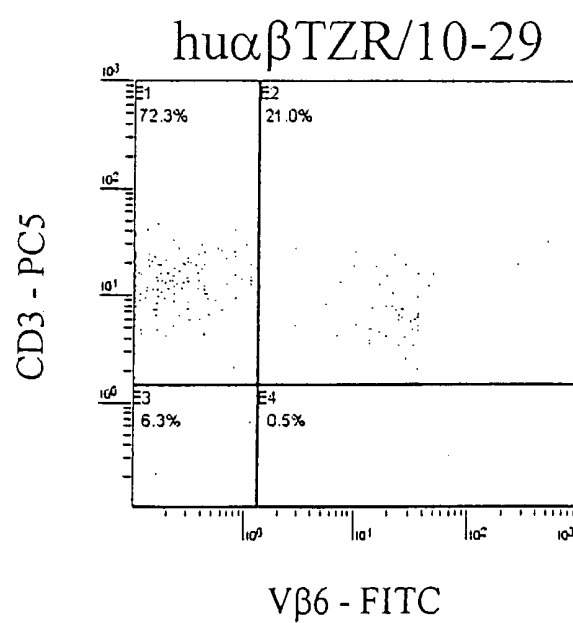
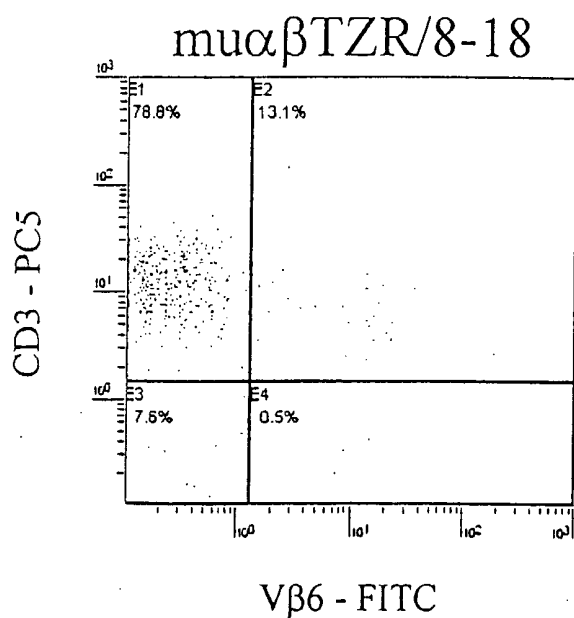
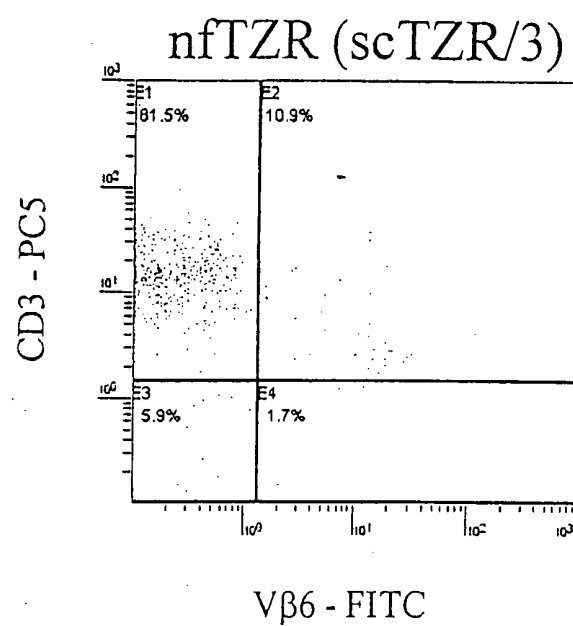
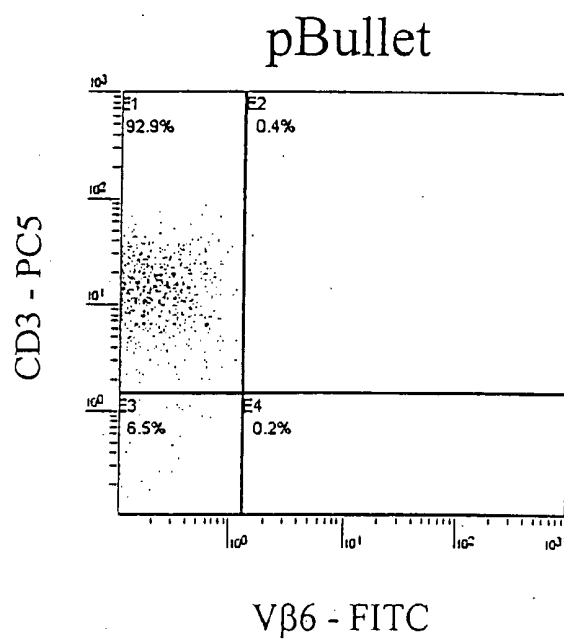
muν α hu α TCR							huCD3 ζ						
Pro	Ser	Pro	Glu	Ser	Ser	Cys ²²⁶	Tyr	Leu	Leu	Asp	Gly	Ile	Leu
CCC	AGC	CCA	GAA	AGT	TCC	TGT	TAC	CTG	CTG	GAT	GGA	ATC	CTC
GGG	TCG	GGT	CTT	TCA	AGG	ACA	ATG	GAC	GAC	CTA	CCT	TAG	GAG

Figur 8

Fusion von $\text{muv}\beta\text{huc}\beta\text{TCR}$ (hdm2 81-88) mit $\text{huCD3}\zeta$

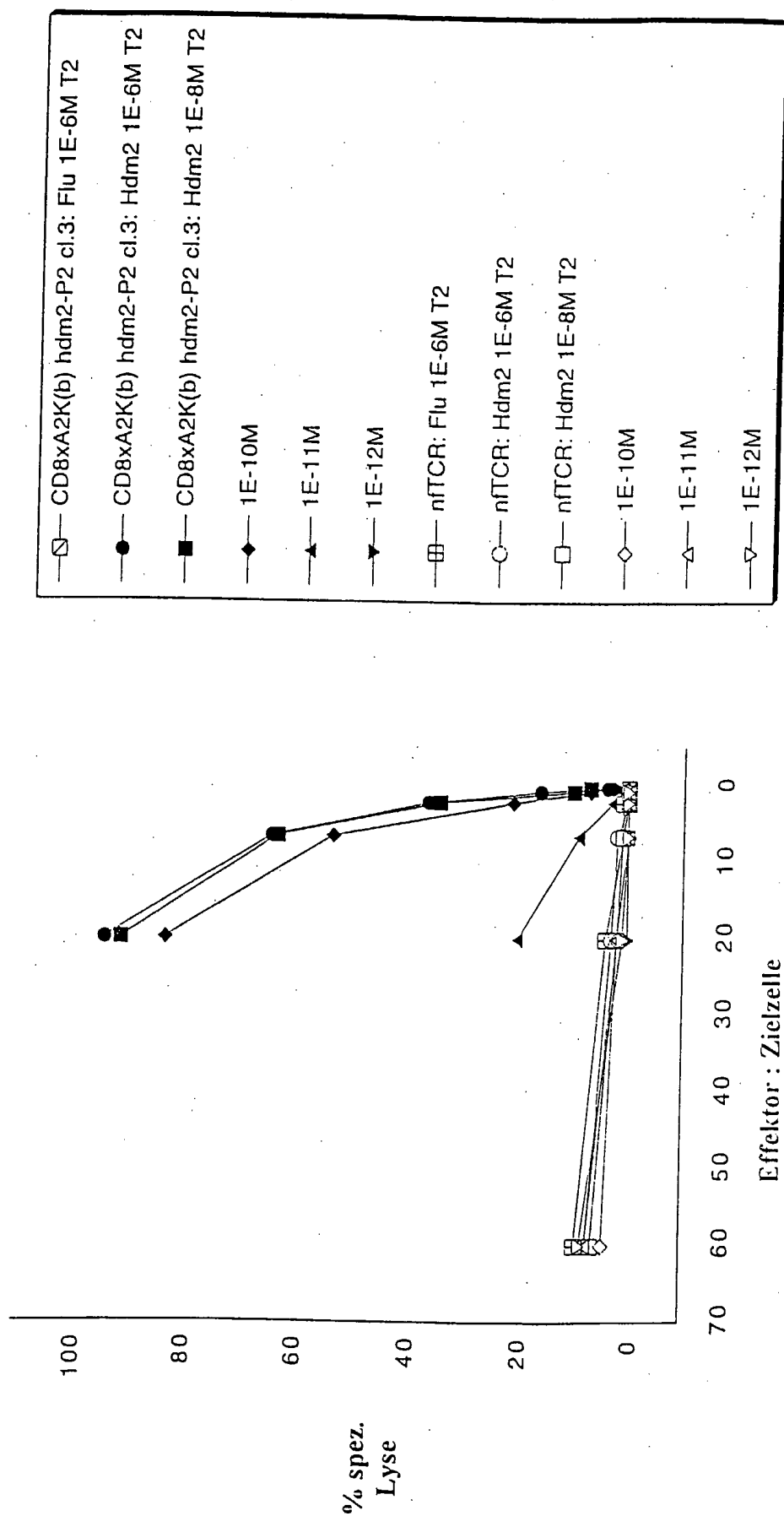
muvβhucβTCR							huCD3ζ						
Ala	Trp	Gly	Arg	Ala	Asp	Cys ²⁶⁴	Tyr	Leu	Leu	Asp	Gly	Ile	Leu
GCC	TGG	GGT	AGA	GCA	GAC	TGT	TAC	CTG	CTG	GAT	GGA	ATC	CTC
CGG	ACC	CCA	TCT	CGT	CTG	ACA	ATG	GAC	GAC	CTA	CCT	TAG	GAG

Figur 9



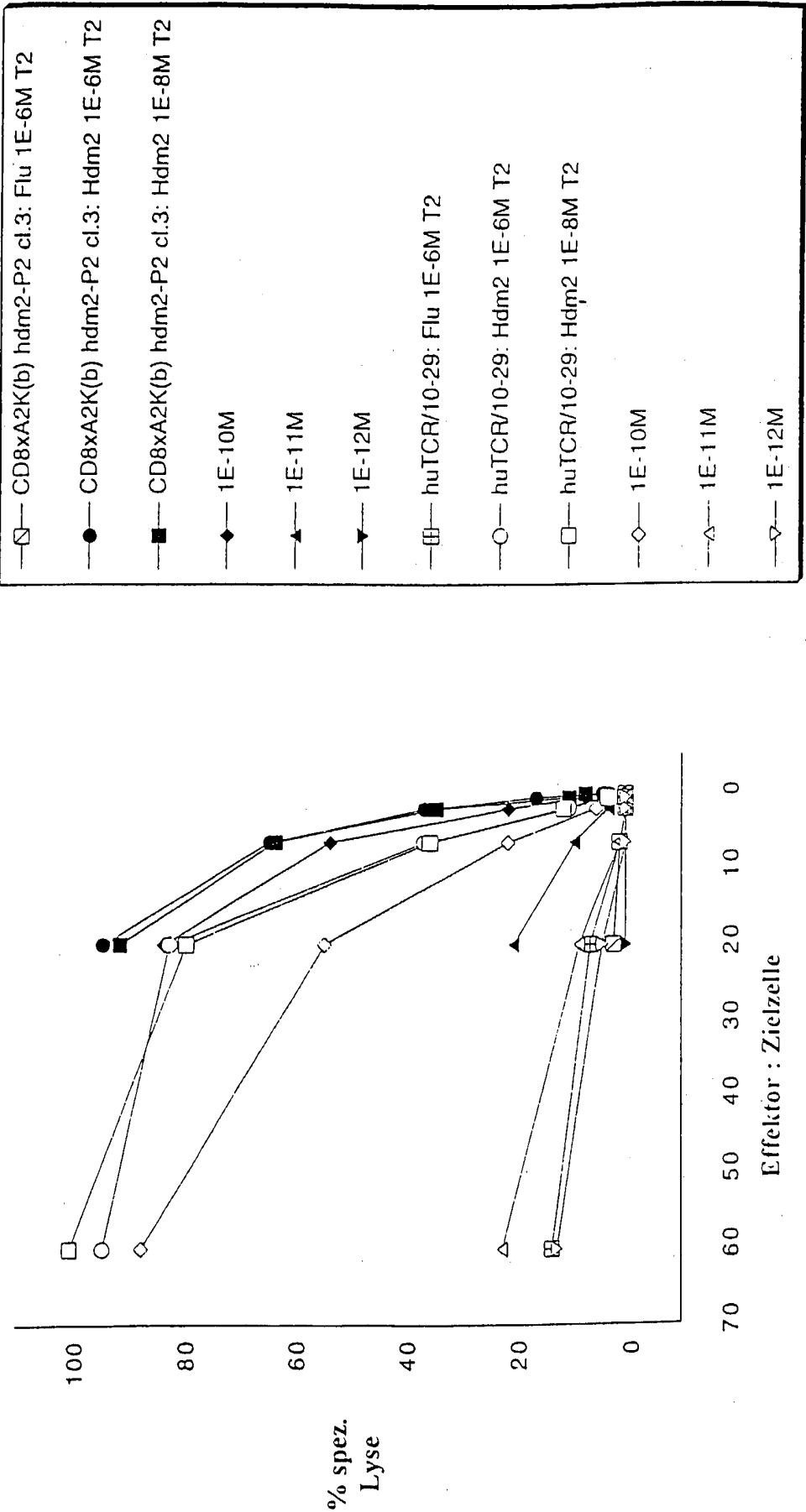
Figur 10

Peptid - Titration nFTZR (scTZR/3) - transduzierte PBLs nach vβ6 - Selektion im ⁵¹Chrom - Freisetzungstest



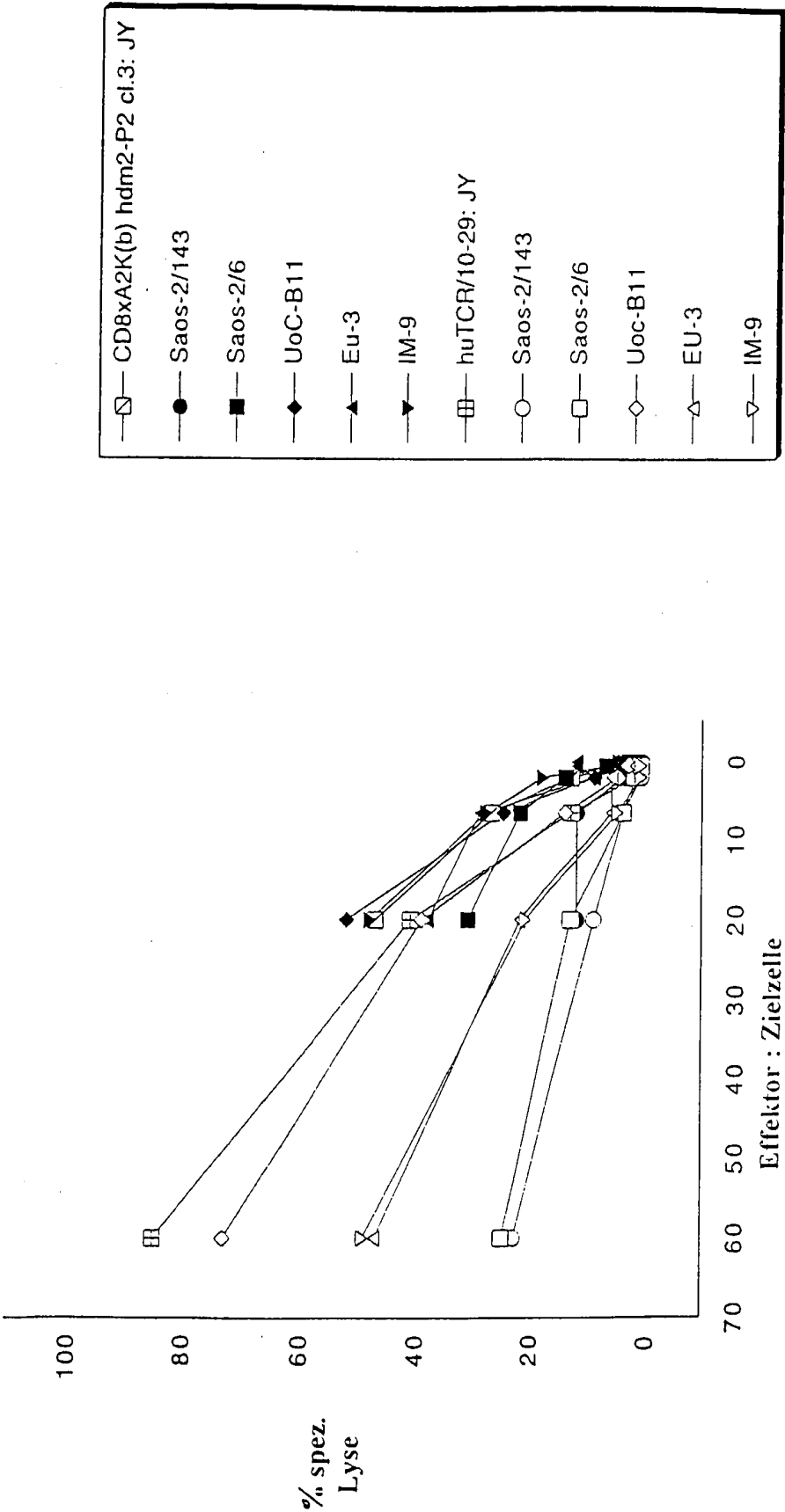
Figur 12

Peptid - Titration hu α β TZR/10-29 - transduzierte PBLs nach v β 6 - Selektion
im ⁵¹Chrom - Freisetzungstest



Figur 15

Cytotoxische Lyse maligne transformierter Zelllinien durch hu α βTZR/10-29 - transduzierte PBLs nach v β 6 - Selektion im ⁵¹Chrom-Freisetzungstest



SEQUENZPROTOKOLL

<110> Stanislawski, Thomas

<120> Polypeptide eines hdm2-Protein-spezifischen, murinen
alpha/beta T-Zell-Rezeptors, diese kodierende
Nukleinsäuren und deren Verwendung

<130> I30052PCT

<140>

<141>

<160> 45

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 268

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 1

Met	Lys	Arg	Leu	Leu	Cys	Ser	Leu	Leu	Gly	Leu	Leu	Cys	Thr	Gln	Val
1				5					10					15	

Cys	Trp	Val	Lys	Gly	Gln	Gln	Val	Gln	Gln	Ser	Pro	Ala	Ser	Leu	Val
			20					25					30		

Leu	Gln	Glu	Gly	Glu	Asn	Ala	Glu	Leu	Gln	Cys	Asn	Phe	Ser	Ser	Thr
		35					40					45			

Ala	Thr	Arg	Leu	Gln	Trp	Phe	Tyr	Gln	Arg	Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Val
	50					55					60				

Ser	Leu	Leu	Tyr	Asn	Pro	Ser	Gly	Thr	Lys	His	Thr	Gly	Arg	Leu	Thr
65					70					75					80

Ser	Thr	Thr	Val	Thr	Lys	Glu	Arg	Arg	Ser	Ser	Leu	His	Ile	Ser	Ser
				85					90					95	

Ser	Gln	Thr	Thr	Asp	Ser	Gly	Thr	Tyr	Phe	Cys	Ala	Thr	Ser	Ser	Val
			100					105					110		

Asn	Thr	Gly	Asn	Tyr	Lys	Tyr	Val	Phe	Gly	Ala	Gly	Thr	Arg	Leu	Lys
		115					120					125			

Val	Ile	Ala	His	Ile	Gln	Asn	Pro	Glu	Pro	Ala	Val	Tyr	Gln	Leu	Lys
	130					135					140				

Asp	Pro	Arg	Ser	Gln	Asp	Ser	Thr	Leu	Cys	Leu	Phe	Thr	Asp	Phe	Asp
145					150					155					160

Ser	Gln	Ile	Asn	Val	Pro	Lys	Thr	Met	Glu	Ser	Gly	Thr	Phe	Ile	Thr
			165						170					175	

Asp	Lys	Thr	Val	Leu	Asp	Met	Lys	Ala	Met	Asp	Ser	Lys	Ser	Asn	Gly
			180					185					190		

Ala	Ile	Ala	Trp	Ser	Asn	Gln	Thr	Ser	Phe	Thr	Cys	Gln	Asp	Ile	Phe
	195						200					205			

Lys	Glu	Thr	Asn	Ala	Thr	Tyr	Pro	Ser	Ser	Asp	Val	Pro	Cys	Asp	Ala
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

210	215	220
Thr Leu Thr Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Met Asn Leu Asn Phe Gln		
225	230	235 240
Asn Leu Ser Val Met Gly Leu Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala Gly		
	245	250 255
Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser		
	260	265

<210> 2
 <211> 306
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 2

Met Asn Lys Trp Val Phe Cys Trp Val Thr Leu Cys Leu Leu Thr Val
1 5 10 15
Glu Thr Thr His Gly Asp Gly Gly Ile Ile Thr Gln Thr Pro Lys Phe
20 25 30
Leu Ile Gly Gln Glu Gly Gln Lys Leu Thr Leu Lys Cys Gln Gln Asn
35 40 45
Phe Asn His Asp Thr Met Tyr Trp Tyr Arg Gln Asp Ser Gly Lys Gly
50 55 60
Leu Arg Leu Ile Tyr Tyr Ser Ile Thr Glu Asn Asp Leu Gln Lys Gly
65 70 75 80
Asp Leu Ser Glu Gly Tyr Asp Ala Ser Arg Glu Lys Lys Ser Ser Phe
85 90 95
Ser Leu Thr Val Thr Ser Ala Gln Lys Asn Glu Met Ala Val Phe Leu
100 105 110
Cys Ala Ser Gly Asp Trp Gly Tyr Glu Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr
115 120 125
Arg Leu Thr Val Leu Glu Asp Leu Arg Asn Val Thr Pro Pro Lys Val
130 135 140
Ser Leu Phe Glu Pro Ser Lys Ala Glu Ile Ala Asn Lys Gln Lys Ala
145 150 155 160
Thr Leu Val Cys Leu Ala Arg Gly Phe Phe Pro Asp His Val Glu Leu
165 170 175
Ser Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp
180 185 190
Pro Gln Ala Tyr Lys Glu Ser Asn Tyr Ser Tyr Cys Leu Ser Ser Arg
195 200 205
Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp His Asn Pro Arg Asn His Phe Arg
210 215 220
Cys Gln Val Gln Phe His Gly Leu Ser Glu Glu Asp Lys Trp Pro Glu
225 230 235 240

```
<210> 3
<211> 272
<212> PRT
<213> Mus musculus
```

<400> 3																
Met	Lys	Arg	Leu	Leu	Cys	Ser	Leu	Leu	Gly	Leu	Leu	Cys	Thr	Gln	Val	
1				5					10					15		
Cys	Trp	Val	Lys	Gly	Gln	Gln	Val	Gln	Gln	Ser	Pro	Ala	Ser	Leu	Val	
			20					25					30			
Leu	Gln	Glu	Gly	Glu	Asn	Ala	Glu	Leu	Gln	Cys	Asn	Phe	Ser	Ser	Thr	
		35					40					45				
Ala	Thr	Arg	Leu	Gln	Trp	Phe	Tyr	Gln	Arg	Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Val	
	50					55					60					
Ser	Leu	Leu	Tyr	Asn	Pro	Ser	Gly	Thr	Lys	His	Thr	Gly	Arg	Leu	Thr	
65				70					75						80	
Ser	Thr	Thr	Val	Thr	Lys	Glu	Arg	Arg	Ser	Ser	Leu	His	Ile	Ser	Ser	
				85					90					95		
Ser	Gln	Thr	Thr	Asp	Ser	Gly	Thr	Tyr	Phe	Cys	Ala	Thr	Ser	Ser	Val	
			100					105					110			
Asn	Thr	Gly	Asn	Tyr	Lys	Tyr	Val	Phe	Gly	Ala	Gly	Thr	Arg	Leu	Lys	
		115					120					125				
Val	Ile	Ala	His	Ile	Gln	Asn	Pro	Glu	Pro	Ala	Val	Tyr	Gln	Leu	Arg	
	130					135					140					
Asp	Ser	Lys	Ser	Ser	Asp	Lys	Ser	Val	Cys	Leu	Phe	Thr	Asp	Phe	Asp	
145				150					155						160	
Ser	Gln	Thr	Asn	Val	Ser	Gln	Ser	Lys	Asp	Ser	Asp	Val	Tyr	Ile	Thr	
			165					170						175		
Asp	Lys	Thr	Val	Leu	Asp	Met	Arg	Ser	Met	Asp	Phe	Lys	Ser	Asn	Ser	
			180					185					190			
Ala	Val	Ala	Trp	Ser	Asn	Lys	Ser	Asp	Phe	Ala	Cys	Ala	Asn	Ala	Phe	
		195					200					205				

```

Asn Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser
 210                215                220

Ser Cys Asp Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr Asn
225                230                235                240

Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu
                245                250                255

Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser
                260                265                270

```

```

<210> 4
<211> 310
<212> PRT
<213> Mus musculus

```

```

<400> 4
Met Asn Lys Trp Val Phe Cys Trp Val Thr Leu Cys Leu Leu Thr Val
 1                5                10                15

Glu Thr Thr His Gly Asp Gly Gly Ile Ile Thr Gln Thr Pro Lys Phe
                20                25                30

Leu Ile Gly Gln Glu Gly Gln Lys Leu Thr Leu Lys Cys Gln Gln Asn
                35                40                45

Phe Asn His Asp Thr Met Tyr Trp Tyr Arg Gln Asp Ser Gly Lys Gly
 50                55                60

Leu Arg Leu Ile Tyr Tyr Ser Ile Thr Glu Asn Asp Leu Gln Lys Gly
 65                70                75                80

Asp Leu Ser Glu Gly Tyr Asp Ala Ser Arg Glu Lys Lys Ser Ser Phe
                85                90                95

Ser Leu Thr Val Thr Ser Ala Gln Lys Asn Glu Met Ala Val Phe Leu
                100                105                110

Cys Ala Ser Gly Asp Trp Gly Tyr Glu Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr
                115                120                125

Arg Leu Thr Val Leu Glu Asp Leu Asn Lys Val Phe Pro Pro Glu Val
                130                135                140

Ala Val Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala
145                150                155                160

Thr Leu Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Phe Pro Asp His Val Glu Leu
                165                170                175

Ser Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp
                180                185                190

Pro Gln Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys
                195                200                205

Leu Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg

```

210		215		220
Asn His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp				
225		230		240
Glu Trp Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala				
	245		250	255
Glu Ala Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Val Ser Tyr Gln				
	260		265	270
Gln Gly Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys				
	275		280	285
Ala Thr Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala Met				
	290		295	300
Val Lys Arg Lys Asp Phe				
305		310		

<210> 5
 <211> 430
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 5
 Met Lys Arg Leu Leu Cys Ser Leu Leu Gly Leu Leu Cys Thr Gln Val
 1 5 10 15
 Cys Trp Val Lys Gly Gln Gln Val Gln Gln Ser Pro Ala Ser Leu Val
 20 25 30
 Leu Gln Glu Gly Glu Asn Ala Glu Leu Gln Cys Asn Phe Ser Ser Thr
 35 40 45
 Ala Thr Arg Leu Gln Trp Phe Tyr Gln Arg Pro Gly Gly Ser Leu Val
 50 55 60
 Ser Leu Leu Tyr Asn Pro Ser Gly Thr Lys His Thr Gly Arg Leu Thr
 65 70 75 80
 Ser Thr Thr Val Thr Lys Glu Arg Arg Ser Ser Leu His Ile Ser Ser
 85 90 95
 Ser Gln Thr Thr Asp Ser Gly Thr Tyr Phe Cys Ala Thr Ser Ser Val
 100 105 110
 Asn Thr Gly Asn Tyr Lys Tyr Val Phe Gly Ala Gly Thr Arg Leu Lys
 115 120 125
 Val Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 130 135 140
 Arg Asp Gly Gly Ile Ile Thr Gln Thr Pro Lys Phe Leu Ile Gly Gln
 145 150 155 160
 Glu Gly Gln Lys Leu Thr Leu Lys Cys Gln Gln Asn Phe Asn His Asp
 165 170 175
 Thr Met Tyr Trp Tyr Arg Gln Asp Ser Gly Lys Gly Leu Arg Leu Ile
 180 185 190

Tyr Tyr Ser Ile Thr Glu Asn Asp Leu Gln Lys Gly Asp Leu Ser Glu
 195 200 205
 Gly Tyr Asp Ala Ser Arg Glu Lys Lys Ser Ser Phe Ser Leu Thr Val
 210 215 220
 Thr Ser Ala Gln Lys Asn Glu Met Ala Val Phe Leu Cys Ala Ser Gly
 225 230 235 240
 Asp Trp Gly Tyr Glu Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu Thr Val
 245 250 255
 Leu Glu Asp Leu Arg Asn Val Thr Pro Pro Lys Val Ser Leu Phe Glu
 260 265 270
 Pro Ser Lys Ala Glu Ile Ala Asn Lys Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys
 275 280 285
 Leu Ala Arg Gly Phe Phe Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val
 290 295 300
 Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro Gln Ala Tyr
 305 310 315 320
 Lys Glu Ser Asn Tyr Ser Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser
 325 330 335
 Ala Thr Phe Trp His Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys Gln Val Gln
 340 345 350
 Phe His Gly Leu Ser Glu Glu Asp Lys Trp Pro Glu Gly Ser Pro Lys
 355 360 365
 Pro Val Thr Gln Asn Ile Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg Ala Asp Cys
 370 375 380
 Gly Ile Thr Ser Ala Ser Tyr His Gln Gly Val Leu Ser Ala Thr Ile
 385 390 395 400
 Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala Val Leu Val
 405 410 415
 Ser Gly Leu Val Leu Met Ala Met Val Lys Lys Lys Asn Ser
 420 425 430

<210> 6

<211> 392

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<223> sequence is partially humanized (chimeric)

<400> 6

Met Asn Lys Trp Val Phe Cys Trp Val Thr Leu Cys Leu Leu Thr Val
 1 5 10 15

Glu Thr Thr His Gly Asp Gly Gly Ile Ile Thr Gln Thr Pro Lys Phe
 20 25 30

Leu Ile Gly Gln Glu Gly Gln Lys Leu Thr Leu Lys Cys Gln Gln Asn
 35 40 45
 Phe Asn His Asp Thr Met Tyr Trp Tyr Arg Gln Asp Ser Gly Lys Gly
 50 55 60
 Leu Arg Leu Ile Tyr Tyr Ser Ile Thr Glu Asn Asp Leu Gln Lys Gly
 65 70 75 80
 Asp Leu Ser Glu Gly Tyr Asp Ala Ser Arg Glu Lys Lys Ser Ser Phe
 85 90 95
 Ser Leu Thr Val Thr Ser Ala Gln Lys Asn Glu Met Ala Val Phe Leu
 100 105 110
 Cys Ala Ser Gly Asp Trp Gly Tyr Glu Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr
 115 120 125
 Arg Leu Thr Val Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 130 135 140
 Gly Gly Ser Val Gln Gln Ser Pro Ala Ser Leu Val Leu Gln Glu Gly
 145 150 155 160
 Glu Asn Ala Glu Leu Gln Cys Asn Phe Ser Ser Thr Ala Thr Arg Leu
 165 170 175
 Gln Trp Phe Tyr Gln Arg Pro Gly Gly Ser Leu Val Ser Leu Leu Tyr
 180 185 190
 Asn Pro Ser Gly Thr Lys His Thr Gly Arg Leu Thr Ser Thr Thr Val
 195 200 205
 Thr Lys Glu Arg Arg Ser Ser Leu His Ile Ser Ser Ser Gln Thr Thr
 210 215 220
 Asp Ser Gly Thr Tyr Phe Cys Ala Thr Ser Ser Val Asn Thr Gly Asn
 225 230 235 240
 Tyr Lys Tyr Val Phe Gly Ala Gly Thr Arg Leu Lys Val Ile Ala His
 245 250 255
 Ile Gln Asn Pro Glu Pro Ala Val Tyr Gln Leu Lys Asp Pro Arg Ser
 260 265 270
 Gln Asp Ser Thr Leu Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Ile Asn
 275 280 285
 Val Pro Lys Thr Met Glu Ser Gly Thr Phe Ile Thr Asp Lys Thr Val
 290 295 300
 Leu Asp Met Lys Ala Met Asp Ser Lys Ser Asn Gly Ala Ile Ala Trp
 305 310 315 320
 Ser Asn Gln Thr Ser Phe Thr Cys Gln Asp Ile Phe Lys Glu Thr Asn
 325 330 335
 Ala Thr Tyr Pro Ser Ser Asp Val Pro Cys Asp Ala Thr Leu Thr Glu
 340 345 350
 Lys Ser Phe Glu Thr Asp Met Asn Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val
 355 360 365

Met Gly Leu Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu
 370 375 380

Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser
 385 390

<210> 7

<211> 357

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 7

Met Glu Arg Leu Leu Cys Ser Leu Leu Gly Leu Leu Cys Thr Gln Val
 1 5 10 15

Cys Trp Val Lys Gly Gln Gln Val Gln Gln Ser Pro Ala Ser Leu Val
 20 25 30

Leu Gln Glu Gly Glu Asn Ala Glu Leu Gln Cys Asn Phe Ser Ser Thr
 35 40 45

Ala Thr Arg Leu Gln Trp Phe Tyr Gln Arg Pro Gly Gly Ser Leu Val
 50 55 60

Ser Leu Leu Tyr Asn Pro Ser Gly Thr Lys His Thr Gly Arg Leu Thr
 65 70 75 80

Ser Thr Thr Val Thr Lys Glu Arg Arg Ser Ser Leu His Ile Ser Ser
 85 90 95

Ser Gln Thr Thr Asp Ser Gly Thr Tyr Phe Cys Ala Thr Ser Ser Val
 100 105 110

Asn Thr Gly Asn Tyr Lys Tyr Val Phe Gly Ala Gly Thr Arg Leu Lys
 115 120 125

Val Ile Ala His Ile Gln Asn Pro Glu Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg
 130 135 140

Asp Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp
 145 150 155 160

Ser Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr
 165 170 175

Asp Lys Thr Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser
 180 185 190

Ala Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe
 195 200 205

Asn Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser
 210 215 220

Ser Cys Tyr Leu Leu Asp Gly Ile Leu Phe Ile Tyr Gly Val Ile Leu
 225 230 235 240

Thr Ala Leu Phe Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro
 245 250 255

Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly

9/18

260 265 270
 Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro
 275 280 285
 Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr
 290 295 300
 Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly
 305 310 315 320
 Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln
 325 330 335
 Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln
 340 345 350
 Ala Leu Pro Pro Arg
 355

<210> 8
 <211> 395
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 8
 Met Asp Lys Trp Val Phe Cys Trp Val Thr Leu Cys Leu Leu Thr Val
 1 5 10 15
 Glu Thr Thr His Gly Asp Gly Gly Ile Ile Thr Gln Thr Pro Lys Phe
 20 25 30
 Leu Ile Gly Gln Glu Gly Gln Lys Leu Thr Leu Lys Cys Gln Gln Asn
 35 40 45
 Phe Asn His Asp Thr Met Tyr Trp Tyr Arg Gln Asp Ser Gly Lys Gly
 50 55 60
 Leu Arg Leu Ile Tyr Tyr Ser Ile Thr Glu Asn Asp Leu Gln Lys Gly
 65 70 75 80
 Asp Leu Ser Glu Gly Tyr Asp Ala Ser Arg Glu Lys Lys Ser Ser Phe
 85 90 95
 Ser Leu Thr Val Thr Ser Ala Gln Lys Asn Glu Met Ala Val Phe Leu
 100 105 110
 Cys Ala Ser Gly Asp Trp Gly Tyr Glu Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr
 115 120 125
 Arg Leu Thr Val Leu Glu Asp Leu Asn Lys Val Phe Pro Pro Glu Val
 130 135 140
 Ala Val Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala
 145 150 155 160
 Thr Leu Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Phe Pro Asp His Val Glu Leu
 165 170 175
 Ser Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp
 180 185 190

Pro Gln Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys
 195 200 205
 Leu Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg
 210 215 220
 Asn His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp
 225 230 235 240
 Glu Trp Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala
 245 250 255
 Glu Ala Trp Gly Arg Ala Asp Cys Tyr Leu Leu Asp Gly Ile Leu Phe
 260 265 270
 Ile Tyr Gly Val Ile Leu Thr Ala Leu Phe Leu Arg Val Lys Phe Ser
 275 280 285
 Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr
 290 295 300
 Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys
 305 310 315 320
 Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn
 325 330 335
 Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu
 340 345 350
 Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly
 355 360 365
 His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr
 370 375 380
 Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 385 390 395

<210> 9
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<400> 9
 tyatccarac wccaarvta

19

<210> 10
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<400> 10
 ggatctcata gaggatggt

19

<210> 11
 <211> 28
 <212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 11

ggaattcgty atccaracwc caarvtaa

28

<210> 12

<211> 31

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 12

aggcgcgcct ggccacttgt cctcctctga a

31

<210> 13

<211> 27

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 13

ggaattccga ggatctgaga aatgtga

27

<210> 14

<211> 34

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 14

aggcgcgcct tcaggaatty ttttytytga ccat

34

<210> 15

<211> 34

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 15

aggcgcgcct tcaactggac cacagcctca gcgt

34

<210> 16

<211> 19

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 16

aggttcatat ctgtttcaa

19

<210> 17

<211> 28

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 17

aggcgcgcct ggcgttggtc tctttgaa

28

<210> 18

<211> 32

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 18

ggaattcccc agaaccaga acctgctgtg ta

32

<210> 19

<211> 31

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 19

ccatgaccat ggaaaggctg ctgtgctctc t

31

<210> 20

<211> 20

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 20

gaaaggctgc tgtgctctct

20

<210> 21

<211> 35

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 21

ccatgaccat ggacaagtgg gttttctgct ggga

35

<210> 22

<211> 24

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 22

gacaagtggg ttttctgctg ggta

24

<210> 23

<211> 34

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 23

cgggatccgc tcaactggac cacagcctca gcgt

34

<210> 24

<211> 34

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 24

cgggatccgc tcaggaattt tttttcttga ccat

34

<210> 25

<211> 20

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 25

atatccagaa ccctgaccct

20

<210> 26

<211> 21

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 26

gggagcacag gctgtcttac a

21

<210> 27

<211> 40

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 27

cagaacccag aacctgccgt gtaccagctg agagactcta

40

<210> 28

<211> 37

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 28

cgggatcctc agctggacca cagccgcagc gtcatga

37

<210> 29

<211> 22

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 29

tagaggacct gaacaaggtg tt

22

<210> 30

<211> 25

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 30

aaccatgacg ggtagaagc tccta

25

<210> 31

<211> 22

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 31

tgaacaaggt gttcccaccc ga

22

<210> 32

<211> 40

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 32

cgggatcctc agaaatcctt tctcttgacc atggccatca

40

<210> 33

<211> 20

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 33

taatacgact cactataggg

20

<210> 34

<211> 18

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 34

tagaaggcac agtcgagg

18

<210> 35

<211> 29

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 35

cgggatcctt agcgaggggg cagggcctg

29

<210> 36

<211> 42

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 36

gaggattcca tccagcaggt aacaggaact ttctgggctg gg

42

<210> 37

<211> 42

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 37

gaggattcca tccagcaggt aacagtctgc tctacccag gc

42

<210> 38

<211> 807

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 38

atgaaaaggc tgctgtgctc tctgtctggg cttctgtgca cacaggtttg ctgggtgaaa 60
ggacagcaag tgcagcagag tcttgcaccc ttggttctgc aggaggggga gaacgcagag 120
ctgcagtgtg acttttcctc cacagcaacc cggctgcagt ggttttacca acgtcctggg 180
ggaagcctcg tcagcctggt gtacaatcct tctgggacaa agcacactgg aagactgaca 240
tccaccacag tcactaaaga acgtcgcagc tctttgcaca tttcctcctc ccagacaaca 300
gactcaggca cttattttctg tgctacgtct tccgttaata caggaaacta caaatacgtc 360

```

tttgagcag gtaccagact gaaggttata gcacacatcc agaaccacaga acctgctgtg 420
taccagttaa aagatcctcg gtctcaggac agcacccctct gcctgttcac cgactttgac 480
tcccaaata atgtgccgaa aacctatgaa tctggaacgt tcatcactga caaaactgtg 540
ctggacatga aagctatgga ttccaagagc aatggggcca ttgcctggag caaccagaca 600
agcttcacct gccaaagatat cttcaaagag accaacgcca cctaccccag ttcagacgtt 660
ccctgtgatg ccacgttgac tgagaaaagc tttgaaacag atatgaacct aaactttcaa 720
aacctgtcag ttatgggact ccgaatcctc ctgctgaaag tagccggatt taacctgtct 780
atgacgctga ggctgtgggc cagttga 807

```

<210> 39

<211> 921

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 39

```

atgaacaagt gggttttctg ctgggtaacc ctttgtctcc ttactgtaga gaccacacat 60
ggtgatgggt gcatcattac tcagacaccc aaattcctga ttggtcagga agggcaaaaa 120
ctgaccttga aatgtcaaca gaatttcaat catgatacaa tgtactggta ccgacaggat 180
tcagggaag gattgagact gatctactat tcaataactg aaaacgatct tcaaaaaggc 240
gatctatctg aaggctatga tgogtctcga gagaagaagt catctttttc tctcactgtg 300
acatctgccc agaagaacga gatggcgtt tttctctgtg ccagcgggga ctgggggtat 360
gaacagtact tcgggtcccg caccaggctc acggtttttag aggatctgag aaatgtgact 420
ccaccaagg tctccttggt tgagccatca aaagcagaga ttgcaaaca acaaaaggct 480
accctcgtgt gcttgccag gggcttcttc cctgaccacg tggagctgag ctggtgggtg 540
aatggcaagg aggtccacag tggggtcagc acggaccctc aggcctacaa ggagagcaat 600
tatagctact gctgagcag ccgctgagg gtctctgcta ccttctggca caatcctcga 660
aaccacttcc gctgccaagt gcagttccat gggctttcag aggaggacaa gtggccagag 720
ggctcaccca aacctgtcac acagaacatc agtgacagag cctggggccg agcagactgt 780
ggaatcactt cagcatccta tcacagggg gttctgtctg caaccatcct ctatgagatc 840
ctactgggga aggccacctc atatgctgtg ctggtcagtg gcctggtgct gatggccatg 900
gtcaagaaaa aaaattcctg a 921

```

<210> 40

<211> 819

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<223> sequence is partially humanized (chimeric)

<400> 40

```

atgaaaaggc tgctgtgctc tctgctgggg cttctgtgca cacaggtttg ctgggtgaaa 60
ggacagcaag tgcagcagag tcctgcatcc ttggttctgc aggaggggga gaacgcagag 120
ctgcagtga acttttcctc cacagcaacc cggctgcagt ggttttacca acgtcctggg 180
ggaagcctcg tcagcctggt gtacaatcct tctgggacaa agcacactgg aagactgaca 240
tccaccacag tactaaaga acgtcgagc tctttgcaca tttctcctc ccagacaaca 300
gactcaggca cttatttctg tgctacgtct tccgttaata caggaaacta caaatacgtc 360
tttgagcag gtaccagact gaaggttata gcacacatcc agaaccacaga acctgccgtg 420
taccagctga gagactctaa atccagtgc aagtctgtct gcctattcac cgattttgat 480
tctcaaaca atgtgtcaca aagtaaggat tctgatgtgt atatcacaga caaaactgtg 540
ctagacatga ggtctatgga cttcaagagc aacagtgtgt tggcctggag caacaaatct 600
gactttgcat gtgcaaacgc cttcaacaac agcattattc cagaagacac cttcttcccc 660
agcccagaaa gttcctgtga tgtcaagctg gtcgagaaaa gctttgaaac agatacgaac 720
ctaaactttc aaaacctgtc agtgattggg ttccgaatcc tcctcctgaa agtggccggg 780
tttaatctgc tcatgacgct gcggtgtgtg tccagctga 819

```

<210> 41

<211> 933

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<223> sequence is partially humanized (chimeric)

<400> 41

```
atgaacaagt gggttttctg ctgggtaacc ctttgtctcc ttactgtaga gaccacacat 60
ggatgatggt gcatcattac tcagacaccc aaattcctga ttggtcagga agggcaaaaa 120
ctgaccttga aatgtcaaca gaatttcaat catgatacaa tgtactggta ccgacaggat 180
tcagggaag gattgagact gatctactat tcaataactg aaaacgatct tcaaaaaggc 240
gatctatctg aaggctatga tgcgtctcga gagaagaagt catctttttc tctcactgtg 300
acatctgccc agaagaacga gatggccgtt tttctctgtg ccagcgggga ctgggggtat 360
gaacagtact tcggtcccgg caccaggctc acggttttag aggatctgaa caaggtgttc 420
ccacccgagg tcgctgtgtt tgagccatca gaagcagaga tctccacac ccaaaaggcc 480
acactgggtg gcctggccac aggtttcttc cccgaccacg tggagctgag ctggtgggtg 540
aatgggaagg aggtgcacag tggggtcagc acagaccgc agccctcaa ggagcagccc 600
gccctcaatg actccagata ctgcctgagc agccgctga ggtctcggc caccttctgg 660
cagaaccccc gcaaccactt ccgctgtcaa gtccagttct acgggctctc ggagaatgac 720
gagtggaccc aggatagggc caaacccgtc acccagatcg tcagcggcga ggccctgggt 780
agagcagact gtggctttac ctgggtgttc taccgaag gggtcctgtc tgccaccatc 840
ctctatgaga tctgtctagg gaaggccacc ctatgtctg tgctggtcag cgccctgtgtg 900
ttgatggcca tgggtcaagag aaaggatttc tga 933
```

<210> 42

<211> 1293

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 42

```
atgaaaaggc tgctgtgctc tctgtctggg cttctgtgca cacaggtttg ctgggtgaaa 60
ggacagcaag tgcagcagag tcctgcatcc ttggttctgc aggaggggga gaacgcagag 120
ctgcagtgtg acttttctc caccagcaacc cggctgcagt ggttttacca acgtcctggg 180
ggaagcctcg tcagcctgtt gtacaatcct tctgggacaa agcacactgg aagactgaca 240
tccaccacag tcaactaaaga acgtcgcagc tctttgcaca tttcctcctc ccagacaaca 300
gactcaggca cttatttctg tgctacgtct tccgttaata caggaaacta caaatacgtc 360
tttgaggcag gtaccagact gaaggttggc ggcggaggca gcggcggcgg aggcagcggc 420
ggcggaggct cacgtgatgg tggcatcatt actcagacac ccaaattcct gattgggtcag 480
gaagggcaaa aactgacctt gaaatgtcaa cagaatttca atcatgatac aatgtactgg 540
taccgacagg attcagggaa aggattgaga ctgatctact attcaataac tgaaaacgat 600
cttcaaaaag gcgatctatc tgaaggctat gatgcgtctc gagagaagaa gtcactcttt 660
tctctcactg tgacatctgc ccagaagaac gagatggcgg tttttctctg tgccagcggg 720
gactgggggt atgaacagta cttcgggtccc ggcaccaggc tcacggtttt agaggatctg 780
agaaatgtga ctccaccccaa ggtctccttg tttgagccat caaaagcaga gattgcaaac 840
aaacaaaagg ctaccctcgt gtgcttggcc aggggcttct tccctgacca cgtggagctg 900
agctggtggg tgaatggcaa ggaggtccac agtgggttca gcacggaccc tcaggcctac 960
aaggagagca attatagcta ctgcctgagc agccgctga ggtctctgct taccttctgg 1020
cacaatcctg gaaaccactt ccgctgccaa gtgcagttcc atgggctttc agaggaggac 1080
aagtggccag agggctcacc caaacctgtc acacagaaca tcagtgcaga ggcctggggc 1140
cgagcagact gtggaatcac ttcagcatcc tatcatcagg gggttctgtc tgcaaccatc 1200
ctctatgaga tcctactggg gaaggccacc ctatatgctg tgctggtcag tggcctgggtg 1260
ctgatggcca tgggtcaagaa aaaaaattcc tga 1293
```

<210> 43

<211> 1179

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 43

```
atgaacaagt gggttttctg ctgggtaacc ctttgtctcc ttactgtaga gaccacacat 60
ggatgatggt gcatcattac tcagacaccc aaattcctga ttggtcagga agggcaaaaa 120
ctgaccttga aatgtcaaca gaatttcaat catgatacaa tgtactggta ccgacaggat 180
tcagggaag gattgagact gatctactat tcaataactg aaaacgatct tcaaaaaggc 240
```

```

gatctatctg aaggctatga tgcgtctcga gagaagaagt catctttttc tctcaactgtg 300
acatctgccc agaagaacga gatggccgtt tttctctgtg ccagcgggga ctgggggtat 360
gaacagtact tcggtcccgg caccaggctc acggttggcg gcggaggcag cggcggcgga 420
ggcagcggcg gcggaggcag cgtgcagcag agtcctgcat ccttggttct gcaggagggg 480
gagaacgcag agctgcagtg taacttttcc tccacagcaa cccggctgca gtggttttac 540
caacgtcctg ggggaagcct cgtcagcctg ttgtacaatc cttctgggac aaagcacact 600
ggaagactga catccaccac agtcactaaa gaacgtcgca gctctttgca catttcctcc 660
tcccagacaa cagactcagg cacttatttc tgtgctacgt cttccgttaa tacaggaaac 720
tacaaatacg tctttggagc aggtaccaga ctgaagggtta tagcacacat ccagaaccca 780
gaacctgctg tgtaccagtt aaaagatcct cggctcagc acagcacctt ctgcctgttc 840
accgactttg actcccaaat caatgtgccg aaaaccatgg aatctggaac gttcatcact 900
gacaaaactg tgctggacat gaaagctatg gattccaaga gcaatggggc cattgcctgg 960
agcaaccaga caagcttcac ctgccaagat atcttcaaag agaccaacgc cacctacccc 1020
agttcagacg ttccctgtga tgccacgttg actgagaaaa gctttgaaac agatatgaac 1080
ctaaactttc aaaacctgtc agttatggga ctccgaatcc tcctgctgaa agtagccgga 1140
tttaacctgc tcatgacgct gaggctgtgg tccagttga 1179

```

<210> 44

<211> 1074

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<223> sequence is partially humanized (chimeric)

<400> 44

```

atggaaaggc tgctgtgctc tctgctgggg cttctgtgca cacaggtttg ctgggtgaaa 60
ggacagcaag tgcagcagag tcctgcatcc ttggttctgc aggaggggga gaacgcagag 120
ctgcagtgtg acttttcctc cacagcaacc cggctgcagt ggttttacca acgtcctggg 180
ggaagcctcg tcagcctggt gtacaatcct tctgggacaa agcacactgg aagactgaca 240
tccaccacag tcaactaaaga acgtcgcagc tctttgcaca tttcctcctc ccagacaaca 300
gactcaggca cttatttctg tgctacgtct tccgttaata caggaaacta caaatacgtc 360
tttgagcagc gtaccagact gaaggttata gcacacatcc agaaccacga acctgccgtg 420
taccagctga gagactctaa atccagtga acgtctgtct gcctattcac cgattttgat 480
tctcaaacaa atgtgtcaca aagtaaggat tctgatgtgt atatcacaga caaaaactgtg 540
ctagacatga ggtctatgga cttcaagagc aacagtgtct tggcctggag caacaaatct 600
gactttgcat gtgcaaacgc cttcaacaac agcattattc cagaagacac cttcttcccc 660
agcccagaaa gttcctgtta cctgctggat ggaatcctct tcacttatgg tgtcattctc 720
actgccttgt tcctgagagt gaagttcagc aggagcgcag acgccccgcg gtaccagcag 780
ggccagaacc agctctataa cgagctcaat ctaggacgaa gagaggagta cgatgttttg 840
gacaagagac gtggccggga ccctgagatg gggggaaagc cgagaaggaa gaacctcag 900
gaaggcctgt acaatgaact gcagaaagat aagatggcgg aggcctacag tgagattggg 960
atgaaaggcg agcgccggag gggcaagggg cagcatggcc tttaccaggg tctcagtaca 1020
gccaccaagg acacctacga cgcccttcac atgcaggccc tgccccctcg ctaa 1074

```

<210> 45

<211> 1188

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<223> sequence is partially humanized (chimeric)

<400> 45

```

atggacaagt gggttttctg ctgggtaacc ctttgtctcc ttactgtaga gaccacacat 60
ggtgatggtg gcatcattac tcagacaccc aaattcctga ttggtcagga agggcaaaaa 120
ctgaccttga aatgtcaaca gaatttcaat catgatacaa tgtactggta ccgacaggat 180
tcagggaag gattgagact gatctactat tcaataactg aaaacgatct tcaaaaaggc 240
gatctatctg aaggctatga tgcgtctcga gagaagaagt catctttttc tctcaactgtg 300
acatctgccc agaagaacga gatggccgtt tttctctgtg ccagcgggga ctgggggtat 360
gaacagtact tcggtcccgg caccaggctc acggttttag aggatctgaa caagggtgtc 420

```

```
ccacccgagg  tcgtgtgttt  tgagccatca  gaagcagaga  tctcccacac  ccaaaaggcc  480
acactggtgt  gcctggccac  aggtttcttc  cctgaccacg  tggagctgag  ctggtgggtg  540
aatgggaagg  aggtgcacag  tggggtcagc  acggaccgcg  agccctcaa  ggagcagccc  600
gccctcaatg  actccagata  ctgcctgagc  agccgcctga  gggctctggc  caccttctgg  660
cagaaccccc  gcaaccactt  ccgctgtcaa  gtccagttct  acgggtctct  ggagaatgac  720
gagtggaccc  aggatagggc  caaacccgtc  acccagatcg  tcagcgccga  ggcctggggt  780
agagcagact  gttacctgct  ggatggaatc  ctcttcatct  atggtgtcat  tctcactgcc  840
ttgttcctga  gagtgaagtt  cagcaggagc  gcagacgccc  ccggtacca  gcagggccag  900
aaccagctct  ataacgagct  caatctagga  cgaagagagg  agtacgatgt  tttggacaag  960
agacgtggcc  gggaccctga  gatgggggga  aagccgagaa  ggaagaacc  tcaggaaggc  1020
ctgtacaatg  aactgcagaa  agataagatg  gcggaggcct  acagtgagat  tgggatgaaa  1080
ggcgagcgcc  ggagggggcaa  ggggcacgat  ggcctttacc  agggctctcag  tacagccacc  1140
aaggacacct  acgacgcctt  tcacatgcag  gccctgcccc  ctcgctaa  1188
```