



HU000228310B1

(19) **HU****MAGYARORSZÁG**
Szellemi Tulajdon Nemzeti Hivatala(11) Lajstromszám: **228 310**(13) **B1**

SZABADALMI LEÍRÁS

(21) A bejelentés ügyszáma: **P 03 00841**(22) A bejelentés napja: **2001. 06. 22.**(40) A közzététel napja: **2004. 06. 28.**(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlöny és Védjegyértesítőben: **2013. 03. 28.**(51) Int. Cl.: **C07K 16/00** (2006.01)(86) A nemzetközi (PCT) bejelentési szám:
PCT/US 01/20153(87) A nemzetközi közzétételi szám:
WO 0198361

(30) Elsőbbségi adatok: 60/213,141 2000. 06. 22. US 60/238,319 2000. 10. 05. US	(73) Jogosult(ak): Genentech, Inc., South San Francisco, Kalifornia (US)
(72) Feltaláló(k): Hongo, Jo-Anne S., Redwood City, Kalifornia (US) Shelton, David L., Oakland, Kalifornia (US) Presta, Leonard G., San Francisco, Kalifornia (US) Devaux, Brigitte, Redwood City, Kalifornia (US)	(74) Képviselő: Karácsonyi Béla, ADVOPATENT Szabadalmi és Védjegy Iroda, Budapest

(54) **Agonista aktivitású anti-trkC monoklonális antitestek**

(57) Kivonat

A találmány tárgyát agonista aktivitású anti-trkC monoklonális antitestek képezik, amelyek az NT-3 bizonyos biológiai aktivitásait utánozzák, azonban mentesek az NT-3 néhány ismert hátrányától. A találmány tárgyát képezi továbbá az agonista aktivitású anti-trkC monoklonális antitestek alkalmazása celluláris degeneráció, ideértve az akut idegrendszeri sérüléssel és krónikus neurodegeneratív betegségekkel összefüggő idegsejt-károsodásokat, mint pl. a perifériás neuropathia megelőzésére és/vagy kezelésére.

MEGADÁS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ VÁLTOZAT



Agonista aktivitású anti-trkC monoklonális antitestek

A találmány technikai háttere

A találmány tárgyköre

A találmány tárgyát agonista anti-trkC monoklonális antitestek képezik. Szintén a találmány tárgyát képezi az agonista antitestek alkalmazása celluláris degeneráció (beleértve az akut idegrendszeri sérüléssel és krónikus neurodegeneratív betegségekkel, pl. perifériás neuropathiával összefüggő idegsejt-károsodást) megelőzésére és/vagy kezelésére.

A technika állása

A neurotrophinok kisméretű, bázikus proteinek családját alkotják, melyek kulcsfontosságú szerepet játszanak az idegrendszer fejlődésében és fenntartásában. E család elsőként azonosított – és valószínűleg legrészletesebben ismert – tagja az idegrendszeri növekedési faktor (NGF), amely jelentős hatást gyakorol a perifériás idegrendszer szenzoros és szimpatikus neuronjainak fejlődésére [Levi-Montalcini és Angeletti: *Physiol. Rev.* **48**, 534-569 (1968); Thoenen és mtsai.: *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **109**, 145-178 (1987)]. Bár az NGF – egerek szubmandibuláris mirigyéből származó homológiájával együtt (melynek aktív alakját gyakran – vagy 2.5S-NGF-nek nevezik) – régóta ismeretes, az NGF-fel rokon, hasonló funkciójú, de eltérő polipeptideket csak évekkel később azonosították.

A család NGF utáni első azonosított tagja az ún. agyi eredetű neurotroph faktor (BDNF) volt, melyet Leibrock és mtsai. [*Nature* **341**, 149-152 (1989)] klónoztak és szekvenáltak. Ezt a faktort eredetileg sertésagyból tisztították [ld. Barde és mtsai.: *EMBO J.* **1**, 549-553 (1982)], de NGF-fel való homológiája csak cDNS-ének klónozása és szekvenálása után vált ismertté. Az NGF és a BDNF aminosav-szekvenciája közötti azonossága – teljes hosszúságra vonatkoztatva – kb. 50 %-os. E felismerés alapján Leibrock és mtsai. arra a következtetésre jutottak, hogy a BDNF és az NGF mellett a neurotrophinok családjának egyéb, közös strukturális és funkcionális sajátosságokkal bíró tagjai is lehetnek.

Valójában azóta további, a -NGF-fel és a BDNF-fel közeli rokonságot mutató neurotrophinokat ismertek fel. Több kutatócsoport is azonosította az eredetileg neuronális faktornak (NF) nevezett neurotrophint, amelyet jelenleg neurotrophin-3 (NT-3) néven ismerünk [Ernfors és mtsai.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 5454-5458 (1990); Höhn és mtsai.: *Nature* **344**, 339 (1990); Maisonpierre és mtsai.: *Science* **247**, 1446 (1990); Rosenthal és mtsai.: *Neuron* **4**, 767 (1990); Hones és Reichardt: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 8060 (1990); Kaisho és mtsai.: *FEBS Lett.* **266**, 187 (1990)]. Az NT-3 aminosav-szekvenciája kb. 50 %-ban azonos a -NGF és BDNF (NT-2) aminosav-szekvenciájával. A proteincsalád következő tagjai a neurotrophin-4 és -5 (NT-4 és NT-5) voltak [ld. 5 364 769 számú egyesült államokbeli szabadal-

mi leírás; Hallbook és mtsai.: *Neuron* **6**, 845 (1991); Berkmeier és mtsai.: *Neuron* **7**, 857 (1991); Ip és mtsai.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 3060 (1992)]. Az eredetileg Berkmeier és mtsai. (ld. fentebb) által leírt emlőseredetű molekulát – amely később a *Xenopus* NT-4 homológjának bizonyult – rendszerint NT-4/5-nek nevezzük. Ezen túlmenően, emlősökben leírtak egy homológ savas proteint, amelyet NT-6-nak neveznek [ld. Berkmeier és mtsai.: *Somat. Cell Mol. Genet.* **18**(3), 233-245 (1992)]. Később egy másik homológ proteint (amely a *Xiphophorus* halból származik) szintén NT-6-nak nevezték el [Gotz és mtsai.: *Nature* **372**, 266-269 (1994)]. A szakirodalomban két proteint is NT-7-nek neveznek; az egyiket Lai és mtsai. [*Mol. Cell. Neurosci.* **11**(1-2), 64-76 (1998)] pontyból (*Cyprinus*), a másikat pedig Nilsson és mtsai. [*FEBS Letters* **434**(3), 285 (1998)] zebradánióból (*Danio*) klónozták. Utóbbi három, haleredetű neurotrophin egyikét sem írták le más gerinces fajban, és az emlőseredetű neurotrophinokkal való rokonságuk nem tisztázott. A zebradánióból származó neurotrophin-7 (zNT-7) aminosav-szekvenciája nagyobb hasonlóságot mutat a haleredetű idegsejt növekedési faktor (NGF) és neurotrophin-6 aminosav-szekvenciájával, mint a többi neurotrophin bármelyikével, azonban az NT-7 a haleredetű NGF-fel és az NT-6-tal csaknem teljesen egyforma fokú rokonságban áll (65 %-os, illetve 63 %-os aminosav-szekvencia azonosság), ami azt jelzi, hogy egy önálló neurotrophin-szekvenciát reprezentál. A zNT-7 az érett protein közepén egy 15 aminosavas β -redő régiót tartalmaz. A rekombináns zNT-7 képes a humán p75 neurotrophin-receptorhoz kötődni, és a patkányeredetű trkA tirozin kináz receptor tirozin-foszforilációját indukálni (bár kevésbé hatékonyan, mint a patkányeredetű NGF). A zNT-7 nem képes kölcsönhatásba lépni a patkányeredetű trkB-vel vagy trkC-vel, ami az NGF-éhez hasonló receptor-specifitásra utal. Feltételezzük, hogy a neurotrophin evolúciós fáján az NGF-alcsalád a csontos halak kialakulásakor, több új neurotrophin megjelenésével (pl. zNT-7 és NT-6) ágazott el, melyek funkcionálisan hasonlóak az NGF-hez.

A neurotrophinok, hasonlóan egyéb polipeptid növekedési faktorokhoz, célsejtjeikre sejtfelületi receptorokkal megvalósuló kölcsönhatásokon keresztül fejtik ki hatásukat. Jelenlegi ismereteink szerint a transzmembrán glikoproteinek két fajtája szolgál a neurotrophinok receptoraként. Egyensúlyi kötési vizsgálatok eredményei azt mutatták, hogy a neurotrophinnal reagálóképes neuronok egyrészt közös, kis molekulatömegű (65-80 kD-os), kis affinitású receptort (LNGFR; más néven p75^{NTR} vagy p75) hordoznak, amelynek NGF-hez, BDNF-hez és NT-3-hoz történő kötődésre vonatkozó K_D -értéke 2×10^{-9} M, másrészt nagy molekulatömegű (130-150 kD-os), nagy affinitású ($K_D = 10^{-11}$ M) receptorokat tartalmaznak, amelyek a receptor tirozin kinázok trk-családjába tartoznak.

A trk-receptorcsalád első tagját (trkA) eredetileg a tropomiozin-szekvenciák katalitikus doménjüktől történő transzlokációja által okozott onkogén transzformáció eredményeként azonosították [Martín-Zanca és mtsai.: *Mol. Cell. Biol.* **9**(1), 24 (1989)]. Később a trkA-t az NGF

szignál-transzdukciós receptoraként azonosították. A trk-receptorcsalád újabb tagjaiként két másik, rokon receptort, az egéregedetű és patkányeredetű trkB-t [Klein és mtsai.: EMBO J. 8, 3701 (1988); Middlemas és mtsai.: Mol. Cell. Biol. 11, 143 (1991); EP 455 460, közzététel napja: 1991. november 6.], valamint a sertés-, egér- és patkányeredetű trkC-t azonosították [Lambelle és mtsai.: Cell 66, 967 (1991); EP 522 530, közzététel napja: 1993. január 13.]. A trk-receptorok szerkezete igen hasonló, de az alternatív splicing növeli a család komplexitását, két ismert trkA-alakot, három ismert trkB-alakot (melyek közül kettő nem tartalmaz funkcionális tirozin kináz domént) és legalább négy trkC-alakot létrehozva (mely utóbbiak közül több funkcionális tirozin kináz domén nélküli, kettő pedig a tirozin kináz doménben kisméretű inszertet tartalmaz).

A p75 és trk-receptorok szerepe ellentmondásos. Általánosan elfogadott, hogy a trk-receptor tirozin kinázok lényeges szerepe, hogy egy adott neurotrophin számára kötőspecifitást biztosítanak, azonban a trkA-t termelő sejtvonalak nemcsak az NGF-hez kötődnek, hanem az NT-3-hoz és az NT-4/5-höz is (a BDNF-hez azonban nem), míg a trkB-t termelő sejtek a BDNF-hez, NT-3-hoz, NT-4-hez és NT-4/5-höz kötődnek (az NGF-hez azonban nem), szemben a trkC-t termelő sejtekkel, amelyek kizárólag az NT-3-hoz kötődnek. Ezen túlmenően, modell-rendszerekben kimutatták, hogy a trk-receptorok különböző alakjai – az alternatív splicing-események eredményeként – különböző intracelluláris jelátviteli reakcióutakat aktiválnak, s ezáltal feltehetően különféle *in vivo* fiziológiai funkciókat közvetítenek, nem világos azonban, hogy az egy adott trk-receptort termelő sejtek p75 hiányában kis vagy nagy affinitással kötődnek-e a neurotrophinokhoz [Meakin és Shooter: Trends Neurosci. 15, 323-331 (1992)].

Az NGF TrkA-hoz történő kötődését és az NT3 TrkC-hez történő kötődését molekuláris modellezés és mutagenézis alkalmazásával tanulmányozták [Urfer és mtsai.: JBC 273, 5829-5840 (1998)].

A különböző sejtvonalakkal végzett vizsgálatok közzétett eredményei zavarosak, és arra engednek következtetni, hogy a p75 a neurotrophinok reagálóképessége szempontjából kulcsfontosságú, vagy éppen ellenkezőleg, nélkülözhető. A csak p75-receptort termelő sejtvonalak egyensúlyi állapotban hasonlóan kis affinitással kötődnek az NGF-hez, BDNF-hez, NT-3-hoz és NT-4-hez, de a kötődési sebességi állandóik igen nagy különbségeket mutatnak. Mindezek eredményeként, bár a p75-receptorhoz való kötődés a neurotrophinok közös tulajdonsága, felvetődött, hogy a p75-receptor szerepet játszhat a ligandum-felismerésben is [Rodriguez-Tebar és mtsai.: EMBO J. 11, 917 (1992)]. Míg a trk-receptorokat hagyományosan a biológiailag szignifikáns neurotrophin-receptorokként tartják számon, az utóbbi években kimutatták, hogy trkA-expressziótól mentes melanomasejtekben az NGF – feltehetőleg a p75 révén – a biológiai viselkedés alapvető változásait képes kiváltani [Hermann és mtsai.: Mol. Cell. Biol. 4, 1205 (1993)]. Davies és mtsai. [Neuron 11, 565 (1993)] a p75-génben null-mutációt hordozó transzgenikus



egérmodellben azt tanulmányozták, hogy a p75 milyen szerepet játszik az embrionális neuronok neurotrophinokra adott túlélési reakciójának közvetítésében. Azt találták, hogy a p75 fokozza a bőr NGF-dependens szenzoros neuronjainak NGF-re vonatkozó érzékenységet. Az utóbbi időben számos kísérletben kimutatták, hogy a p75 képes a neurotrophinok legalább néhány biológiai hatásának közvetítésére. Ez a terület továbbra is ellentmondásokkal teli, de a p75-jelátvitel minden valószínűség szerint szerepet játszik a sejthalál és a neurit-kinövés szabályozásában [Barker: *Cell Death Diff.* 5, 346 (1998); Bredesen és mtsai.: *Cell Death Diff.* 5, 357 (1998); Casaccia-Bonneli és mtsai.: *Cell Death Diff.* 5, 357 (1998); Raoul és mtsai.: *Curr. Op. Neurobiol.* 10, 111 (2000); Davies: *Curr. Biol.* 10, R198 (2000)]. Lényeges, hogy a p75 stimulálásáról kimutatták, hogy módosítja a stimuláló trkC hatását [Hapner és mtsai.: *Developm. Biol.* 201, 90 (1998)].

A teljes hosszúságú, natív trkA, trkB és trkC receptorok extracelluláris doménjei öt funkcionális domént tartalmaznak, melyeket különféle egyéb proteinekben azonosított homológ vagy más módon hasonló struktúrákra való hivatkozással definiáltak. A domének, az érett trk-receptorok aminosav-szekvenciájának N-terminálisától kiindulva, a következők szerint vannak számozva: 1) első ciszteinben gazdag domén, amely a humán trkA 1. aminosav-pozíciójától kb. 32. aminosav-pozíciójáig, a humán trkB 1. aminosav-pozíciójától kb. 36. aminosav-pozíciójáig, és a humán trkC 1. aminosav-pozíciójától kb. 48. aminosav-pozíciójáig terjed; 2) leucinban gazdag domén, amely a trkA kb. 33. aminosavától kb. 104. aminosaváig, a trkB kb. 37. aminosavától kb. 108. aminosaváig, és a trkC kb. 49. aminosavától kb. 120. aminosaváig terjed; 3) második ciszteinben gazdag domén, amely a trkA kb. 105. aminosavától kb. 157. aminosaváig, a trkB kb. 109. aminosavától kb. 164. aminosaváig, és a trkC kb. 121. aminosavától kb. 177. aminosaváig terjed; 4) első immunoglobulinszerű domén, amely a trkA kb. 176. aminosavától kb. 234. aminosaváig, a trkB kb. 183. aminosavától kb. 239. aminosaváig, és a trkC kb. 196. aminosavától kb. 257. aminosaváig terjed; és 5) második immunoglobulinszerű domén, amely a trkA kb. 264. aminosavától kb. 330. aminosaváig, a trkB kb. 270. aminosavától kb. 334. aminosaváig, és a trkC kb. 288. aminosavától kb. 351. aminosaváig terjed.

A neurotrophinok a perifériás és központi neuronok elkülöníthető, de átfedő halmazaira fejtik ki hatásukat. Ezek a hatások a fejlődő neuronok túlélésének biztosításában játszott kulcsfontosságú szereptől (pl. az NGF szenzoros és szimpatikus neuronokra kifejtett hatása) a neuronok morfológiájára gyakorolt, viszonylag finom hatásokig (NT-3 hatása a Purkinje-sejtekre) terjednek. Ezen aktivitások létezése felvetette a neurotrophinok bizonyos neurodegeneratív betegségek kezelésére történő alkalmazásának lehetőségét. Az NT-3-ról felismerték továbbá, hogy elősegíti a perifériás vér leukocitáinak proliferációját, és ennek alapján javasolták az NT-3 neutropenia, fertőző betegségek és tumorok kezelésére történő alkalmazását [ld. a 6 015 552 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírást (2000. június 18.)].



Tanulmányozták a neurotrophinok cardiovascularis fejlődés szabályozásában és a sérülésekre adott vascularis reakció módosításában játszott szerepét is [ld. Donovan és mtsai.: *Nature Genetics* **14**, 210-213 (1996); Donovan és mtsai.: *A.J. Path.* **147**, 309-324 (1995); Kraemer és mtsai.: *Arteriol. Throm. and Vasc. Biol.* **19**, 1041-1051 (1999)]. A WO 00/24415 számú nemzetközi közzétételi iratban (közzététel napja: 2000. május 4.) a neurotrophinokat az angiogenezis és a vascularis integritás szabályozásának potenciális gyógyszereiként tarták fel.

A neurotrophinoknak – celluláris degeneráció (melyeket, például, neurodegeneratív betegségek és akut idegsejt-sérülések okoznak) kezelésére és az angiogenezis szabályozására történő alkalmazásuk ígéretes lehetőségei ellenére – több hátrányuk is van, melyek közül az egyik legjelentősebb a specifitás hiánya. A legtöbb neurotrophin egynél több receptorról képes keresztreakcióba lépni. Például, az NT-3, amely a trkC tirozin kináz receptor előnyös liganduma, a trkA-hoz és trkB-hez is képes kötődni és aktiválni azokat [ld. Barbacid: *J. Neurobiol.* **25**, 1386 (1994); Barbacid: *Ann. New York Acad. Sci.* **766**, 442 (1995); Ryden és Ibanez: *J. Biol. Chem.* **271**, 5623 (1996); Belliveau és mtsai.: *J. Cell Biol.* **136**, 375 (1997); Farinas és mtsai.: *Neuron* **21**, 325 (1998)]. Emiatt nehéz olyan terápiát megtervezni, amely a neuronok egy speciális populációjára irányul. A neurotrophin-terápia egy másik korlátozó tényezője, hogy a neurotrophinokról (így az NT-3-ról) ismeretes, hogy hiperalgesziát váltanak ki [Chaudhry és mtsai.: *Muscle and Nerve* **23**, 189 (2000)]. Mindezekon túlmenően, bizonyos neurotrophinok (mint pl. az NT-3) ráegcsálókban gyenge farmakokinetikai tulajdonságot és biológiai hozzáférhetőséget mutatnak, ami súlyos kérdéseket támaszt humán klinikai alkalmazhatóságukkal szemben [ld. Haase és mtsai.: *J. Neurol. Sci.* **160**, S97 (1988); a Helgren és mtsai.: *J. Neurosci.* **17**(1), 372 (1997); valamint az alábbiakban közölt adatok].

Mindezek alapján, nagy szükség van neurodegeneratív rendellenességek és akut idegsejt-sérülések kezelésére alkalmas terápiás hatóanyagokra, amelyek mentesek a neurotrophinok ismert hátrányaitól.

A találmány összefoglalása

A találmány szerinti megoldás a trkC-receptor extracelluláris doménjeiben lévő epitópok ellen irányuló, agonista aktivitású anti-trkC monoklonális antitestek kifejlesztésén és karakterizálásán alapul, melyek az NT-3 biológiai aktivitását utánozzák, azonban mentesek az NT-3 néhány ismert hátrányától. A találmány szerinti megoldás bizonyítja a szóban forgó agonista antitestek neuropathia kísérleti állatmodellben történő kezelésének hasznosságát is. Az agonista anti-trkC antitesteknek a celluláris degeneráció – például, idegsejt-károsodás, különösen a neurodegeneratív betegségekkel (pl. perifériás neuropathiákkal) összefüggő vagy külső faktorok (például, többek között, trauma, toxikus anyagok, sebészeti beavatkozás) által kiváltott idegsejt-sérülés – megelőzésszerű (profilaktikus) vagy terápiás kezelésében számos előnye van



az NT-3-mal szemben.

Egyik szempontjának megfelelően, a találmány tárgya agonista anti-trkC monoklonális antitest, amely

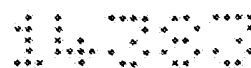
- (a) trkA-val vagy trkB-vel nem mutat jelentős mértékű keresztreaktivitást; és
- (b) felismer egy epitópot a trkC 5. doménjében.

A találmány szerinti bizonyos agonista antitestek a trkC 4. doménjében elhelyezkedő epitópot is felismerhetnek. A találmány egyik előnyös megvalósítási módja szerint az antitestek humán és rágcsálóeredetű (pl. patkány- vagy egéredetű) trkC-hez egyaránt képesek kötődni, és ezek egéredetű, kimérikus (ideértve: humanizált) vagy humán antitestek lehetnek. Az antitestek a natív trkC-ligandum, az NT-3 legalább egy aktivitását utánozzák, s így hatásosak lehetnek különböző, celluláris degenerációval jellemezhető betegségek (pl. neuropathiák, pl. ciszplatin- vagy piridoxin-indukálta neuropathia vagy diabetes-szel összefüggő neuropathia), valamint – ha a celluláris degeneráció csontvelősejtek degenerációját foglalja magában – elégtelen mennyiségű vörsejtek jelenlétével jellemezhető betegségek (pl. leukopenia, ideértve az eosinopeniát és/vagy basopeniát; limfopenia, monocitopenia és neutropenia) megelőzésére és/vagy kezelésére. A találmány egy különösen előnyös megvalósítási módja értelmében a találmány szerinti agonista antitestek az NT-3-nál sokkal jobb tulajdonságokkal bírnak: például, a betegnek beadva nem okoznak hiperalgesziát; biológiai hozzáférhetőségük fokozott mértékű, és/vagy nagyobb specifikus aktivitást mutatnak, mint az NT-3.

Egy további szempontjának megfelelően, a találmány tárgya anti-trkC antitest nehéz lánc, amely tartalmazza a következő komplementaritást meghatározó régiókat (CDR-eket): CDR1, amely az 1., 2., 3., 4. és 5. azonosítószámú szekvenciából (SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 és 5) álló csoportból van kiválasztva; CDR2, amely a 6., 7., 8., 9., 10. vagy 11. azonosítószámú szekvenciából (SEQ ID NO: 6, 7, 8, 9, 10 és 11) álló csoportból van kiválasztva; és CDR3, amely a 12., 13., 14., 15., 16. és 17. azonosítószámú szekvenciából (SEQ ID NO: 12, 13, 14, 15, 16 és 17) álló csoportból van kiválasztva.

Egy további szempontjának megfelelően, a találmány tárgya anti-trkC antitest könnyű lánc, amely tartalmazza a következő komplementaritást meghatározó régiókat (CDR-eket): CDR1, amely a 18., 19., 20., 21., 22., 23. és 24. azonosítószámú szekvenciából (SEQ ID NO: 18, 19, 20, 21, 22, 23 és 24) álló csoportból van kiválasztva; CDR2, amely a 25., 26., 27., 28., 29. és 30. azonosítószámú aminosav-szekvenciából (SEQ ID NO: 25, 26, 27, 28, 29 és 30) álló csoportból van kiválasztva; és CDR3, amely a 31., 32., 33., 34., 35. és 36. azonosítószámú szekvenciából (SEQ ID NO: 31, 32, 33, 34, 35 és 36) álló csoportból van kiválasztva.

Egy további szempontjának megfelelően, a találmány tárgya egy egéredetű anti-trkC antitest nehéz lánc, amely tartalmazza a következő komplementaritást meghatározó régiókat (CDR-eket):



(a) XaaWXaaXaaWVK (SEQ ID NO: 37) képletű CDR1, amelyben az 1. pozícióban lévő Xaa jelentése: F vagy Y; a 3. pozícióban lévő Xaa jelentése: I vagy M; és a 4. pozícióban lévő Xaa jelentése: E vagy H;

(b) EIXaaPXaaXaaXaaXaaTNYNEKFKXaa (SEQ ID NO: 38) képletű CDR2, amelyben a 3. pozícióban lévő Xaa jelentése: L vagy Y; a 6. pozícióban lévő Xaa jelentése: S vagy N; a 7. pozícióban lévő Xaa jelentése: D vagy G; a 8. pozícióban lévő Xaa jelentése: N vagy R; és a 16. pozícióban lévő Xaa jelentése: G vagy S; és

(c) KNRNYYGNYYV (SEQ ID NO: 12) vagy KYYYGNSYRSWYFDV (SEQ ID NO: 13) képletű CDR3.

Egy további szempontjának megfelelően, a találmány tárgya egy humán anti-trkC antitest nehéz lánc, amely tartalmazza a következő komplementaritást meghatározó régiókat:

(a) XaaXaaXaaYYWXaa (SEQ ID NO: 39) képletű CDR1-régió, amelyben az 1. pozícióban lévő Xaa jelentése: S vagy I; a 2. pozícióban lévő Xaa jelentése: G vagy S; a 3. pozícióban lévő Xaa jelentése: G, T vagy Y; és a 7. pozícióban lévő Xaa jelentése: S vagy N;

(b) XaaIXaaXaaSGSXaaTXaaNPSLKS (40. azonosítószámú szekvencia) általános képletű CDR2-régió, amelyben az 1. pozícióban lévő Xaa jelentése: Y vagy R; a 3. pozícióban lévő Xaa jelentése: Y vagy F; a 4. pozícióban lévő Xaa jelentése: Y vagy T; a 8. pozícióban lévő Xaa jelentése: S vagy R; és a 10. pozícióban lévő Xaa jelentése: N vagy Y; és

(c) CDR3, amely a következőkből álló csoportból van kiválasztva: DRDYDSTGDYYSYVGMDV (SEQ ID NO: 14), DGGYSNPF (SEQ ID NO: 15) vagy ERIAAAGXaaDYYYNGLXaaV (41. azonosítószámú szekvencia; ahol a 8. pozícióban lévő Xaa jelentése: A vagy T, és a 16. pozícióban lévő Xaa jelentése: D vagy A).

Egy további szempontjának megfelelően, a találmány tárgya agonista aktivitású anti-trkC monoklonális antitest, amely 14. igénypont szerinti egérszárú anti-trkC antitest nehéz láncának komplementaritást meghatározó régióit tartalmazó nehéz láncot könnyű láncához kapcsolva tartalmaz. Az antitest előnyösen humán antitest vagy humán vázrégióból származó aminosavakat tartalmazó antitest, és előnyösen nem mutat jelentős mértékű keresztreaktivitást a trkA-val vagy trkB-vel. A találmány leírásában az antitest kifejezést legáltalánosabb értelmében használjuk; ideértjük az antitest-fragmenseket, pl. az Fv-, Fab-, Fab'- és F(ab')₂-fragmenseket, valamint valamennyi immunglobulin-osztályt és izotípust is, de különösen előnyösek az IgG-antitestek, közülük is az IgG-2 és IgG-4.

Egy következő szempontjának megfelelően, a találmány tárgya izolált nukleinsav, amely agonista aktivitású, egérszárú vagy humán anti-trkC antitest nehéz vagy könnyű láncát (vagy fragmensét) kódolja. Az egyik konkrét megvalósítási mód értelmében a szóban forgó nukleinsav az ATCC-nél 2000. június 21-én, a következő deponálási számokon letétbe helyezett nukleinsav-molekulák egyike: PTA-2133, PTA-2134, PTA-2135, PTA-2136, PTA-2137, PTA-

2138, PTA-2139, PTA-2140, PTA-2141, PTA-2142 és PTA-2143.

Egy további szempontjának megfelelően, a találmány tárgya egy vektor, amely tartalmaz egy nukleinsav-molekulát, amely egy fentebb meghatározott antitest nehéz és/vagy könnyű láncát kódolja. A találmány tárgyát képezik továbbá a találmány szerinti nukleinsavval transzformált sejtek, illetve hibridóma-sejtvonalak, valamint az ilyen hibridómasejtek által termelt antitestek.

Egy további szempontjának megfelelően, a találmány tárgyát képezi egy gyógyászati készítmény, amely egy fentebb definiált, agonista anti-trkC monoklonális antitest hatásos mennyiségét, valamint gyógyászati szempontból elfogadható hordozót tartalmaz.

Szintén a találmány tárgyát képezi egy eszköz sejtd degenerációval jellemezhető betegség vagy állapot kezelésére, amely magában foglalja a találmány szerinti, agonista anti-trkC antitest hatásos mennyiségének emlősnak történő adagolását.

Egy további szempontjának megfelelően, a találmány tárgyát képezi egy eszköz neuropathia vagy neurodegeneratív betegség kezelésére vagy károsodott idegsejt regenerálására, amely magában foglalja a találmány szerinti agonista anti-trkC antitest hatásos mennyiségének emlősnak történő adagolását. A neuropathia, például, perifériás neuropathia lehet, beleértve, többek között, a diabetes-szel összefüggő neuropathiát és a vastag rostos szenzoros idegek neuropathiáját. A neurodegeneratív betegségek közé tartozik, például, az amyotrophiás lateral sclerosis (ALS), az Alzheimer-kór, a Parkinson-kór és a Huntington-kór. A károsodott neuronok lehetnek perifériás neuronok, így pl. szenzoros neuronok (pl. dorzális gyökganglionok), motoros neuronok (pl. gerincvelői neuronok) vagy központi idegrendszeri neuronok, és a sérülés különböző külső és belső faktorok (pl. traumák, neurotoxinok, anyagcsere-betegségek, fertőző anyagok és hasonlók) következményeként alakulhat ki.

Egy további szempontjának megfelelően, a találmány tárgyát képezi egy eljárás perifériás neuronok fejlődésének, proliferációjának, fennmaradásának vagy regenerálásának elősegítésére, mely eljárás magában foglalja az ilyen neuronok találmány szerinti antitest hatásos mennyiségével történő érintkeztetést.

Egy másik szempontjának megfelelően, a találmány tárgyát képezi egy eljárás sejtd degenerációval jellemezhető betegség vagy állapot kezelésére emlősből (beleértve a megelőzést is), mely eljárás magában foglalja egy anti-trkC antitestet kódoló nukleinsav páciens sejtjébe történő bejuttatását. juttatunk be. A találmány szerinti eljárás (génterápia) előnyösen neuropathia vagy neurodegeneratív betegség kezelésére vagy károsodott idegsejt regenerálására alkalmazható. Ennek megfelelően, a recipiens sejtek előnyösen idegsejtek.

Szintén a találmány tárgyát képezik az anti-trkC antitestet kódoló genetikai anyagot (nukleinsavat) tartalmazó, génterápiás felhasználásra alkalmas hordozók.

Egy további szempontjának megfelelően, a találmány tárgyát képezi egy eljárás

angiogenezis indukálására egy találmány szerinti anti-trkC antitest angiogenezis indukálására hatásos mennyiségének célbajuttatásával. Közelebbről, a célbajuttatás antitestek adagolását és az antitesteket kódoló nukleinsav célbajuttatását (például génterápiában) foglalja magában.

Egy további szempontjának megfelelően, a találmány tárgyát képezi egy izolált nukleinsav-molekula, amely egéredetű vagy humán agonista anti-trkC antitest nehéz vagy könnyű láncát kódolja, és amely a következőkből álló csoportból van kiválasztva: SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70 és SEQ ID NO: 71. A találmány tárgyát képezi továbbá egy polipeptid, amelyet egy vagy több izolált nukleinsav molekula kódol.

Egy következő szempontjának megfelelően, a találmány tárgyát képezi egy teljes sejt, egéredetű vagy humán agonista anti-trkC antitest nehéz láncát vagy könnyű láncát (vagy mindkettőt) kódoló nukleinsavval van transzformálva.

Az ábrák rövid leírása

Az 1/A-1/D ábrákon különböző, trkC-receptor elleni humán (1/A és 1/C), illetve egéredetű (1/B és 1/D) monoklonális antitestek – KIRA-teszttel (1/A és 1/B) és PC12 neuritkinövési teszttel (1/C és 1/D) kimutatott agonista aktivitását szemléltetjük. Protein-A oszlopon tisztított monoklonális antitesteket KIRA stimulációs pufferrel [2 % szarvasmarhaszérumalbumint (BSA, Intergen Co., Purchase, NY, USA) és 25 μ M HEPES-puffert tartalmazó, 1:1 arányú F12/DMEM-elegy; 0,2 μ m-es filteren szűrve] 27 μ g/ml koncentrációra hígítottunk. A monoklonális antitesteket ezután stimulációs tápközegben 1:3 arányban hígítottuk (összesen nyolc hígítás, 0,01 nM-től 180 nM-ig terjedő antitest-koncentrációval). Ezt követően GD-vel transzfektált CHO-sejteket (5×10^4 sejt/üreg) NT-3-mal vagy monoklonális antissal (a hígításokat két példányban teszteltük) 6 óra hosszat stimuláltunk, és a tesztet a példákban ismertetett módon hajtottuk végre (1/A ábra: humán monoklonális antissal végzett kísérlet eredménye; 1/B ábra: egéredetű monoklonális antissal végzett kísérlet eredménye). A tisztított monoklonális antissal agonista aktivitásának PC12 neuritkinövési teszttel végzett vizsgálatát a példákban leírtak szerint végeztük. Patkányeredetű PC12-sejteket teljes hosszúságú humán trkC-génnel transzfektáltunk, és a sejteket 1000 sejt/üreg mennyiségben mikrotiter-tálcákra szélesztettük. A transzfekció után három nappal a transzfektánsokat tartalmazó üregekhez – 0,0002 nM és 2,7 nM közötti koncentrációkban, három ismétléssel – monoklonális antissal adtuk, és 37 °C-on további három napos inkubálást végeztünk. A sejteket fáziskontraszt-mikroszkópiával vizsgáltuk, és összeszámoltuk azokat a sejteket, amelyekből átmérőjük kétszeresét meghaladó hosszúságú neuritek nőttek ki.

A 2. ábrán az agonista aktivitású monoklonális antissal (reprezentatív példaként a

6.1.2-es antitest) trkC-hez történő specifikus kötődését szemléltetjük.

A 3. ábrán azt szemléltetjük, hogy az agonista anti-trkC monoklonális antitestek a humán trkC-t hatékonyabban ismerik fel, mint a patkányeredetű trkC-t. A monoklonális antitestek patkányeredetű trkC-hez való kötődési képességét a receptor immunadhezin-konstrukciójának alkalmazásával határoztuk meg. trkC-t (humán trkC-gD-t vagy patkányeredetű trkC-IgG-t mikrotiter-tálcákon egy éjszakán át immobilizáltunk [100 µl 1 µg/ml oldat 50 mM karbonátpufferben (pH = 9,5) hígítva]. A tálcákat lemostuk, majd blokkoltuk. A monoklonális antitesteket – 0,5 % szarvasmarha-szérumalbumint és 0,05 % Tween-20-at tartalmazó foszfátpufferelt sóoldatban 1 µg/ml koncentrációra hígítottuk, majd hozzáadtuk a megfelelő üregekhez (100 µl/üreg), és szobahőmérsékleten egy óra hosszat inkubáltuk. A tálcákat lemostuk, majd az üregekhez hozzáadtuk a megfelelő HRP-konjugátumot (humán monoklonális antitestek esetén kecskeeredetű anti-humán κ-HRP, 1:5000; egéreredetű monoklonális antitestek esetén kecskeeredetű anti-moIgG (Fc)-HRP, 1:5000), és szobahőmérsékleten egy óra hosszat inkubáltuk, végül a tálcákat lemostuk, előhívtuk és leolvastuk.

A 4. ábrán kompetíciós ELISA-tesztel végzett epitóp-térképezés jellemző példáját mutatjuk be. A biotinilált humán 6.1.2-es monoklonális anti-trkC antitestet – különböző, jelöletlen anti-trkC monoklonális antitestek feleslegének jelenlétében vagy hiányában – immobilizált trkC-vel inkubáltuk.

Az 5. ábrán a kompetíciós ELISA-tesztel végzett epitóp-térképezés eredményeit foglaljuk össze.

A 6/A-6/C ábrákon különféle trkC-kimérák (1/A) sematikus diagramját, valamint ezeknek a trkC – agonista aktivitású humán (1/B), illetve egéreredetű (1/C) anti-trkC monoklonális antitestek által felismert – epitópjainak térképezésére történő alkalmazását szemléltetjük.

A 7. ábrán a humán trkC 4. és 5. doménjének aminosav-szekvenciáját mutatjuk be, megjelölve azokat az aminosavakat, amelyeket mutagenézisnek vetettünk alá, hogy megállapítsuk az agonista anti-trkC monoklonális antitestek általi felismerésben betöltött szerepüket.

A 8. ábrán a trkC és az anti-trkC monoklonális antitestek által alkotott komplex háromdimenziós diagramját mutatjuk be, kiemelve a trkC azon aminosavait, amelyek valószínűleg fontos szerepet játszanak a trkC-receptor – anti-trkC antitestek komplementaritást meghatározó régiói általi – felismerésében.

A 9. ábrán agonista aktivitású, egéreredetű és humán anti-trkC monoklonális antitestek nehéz lánc variábilis (V_H) régiójának aminosav-szekvenciáját mutatjuk be. A három CDR-régió (CDR1, CDR2 és CDR3) aminosavait félkövér betűtípussal szedtük. A 2250-es és 2253-as nehéz lánc CDR1-régiójának aminosav-szekvenciája az 1. azonosítószámú szekvencia (SEQ ID NO: 1); a 2256-os nehéz lánc CDR1-régiójának aminosav-szekvenciája a 2. azonosítószámú szekvencia (SEQ ID NO: 2); a 6.1.2-es és 2345-ös nehéz lánc CDR1-régiójának aminosav-

szekvenciája a 3. azonosítószámú szekvencia (SEQ ID NO: 3); a 6.4.1-es nehéz lánc CDR1-régiójának aminosav-szekvenciája a 4. azonosítószámú szekvencia (SEQ ID NO: 4); a 2349-es nehéz lánc CDR1-régiójának aminosav-szekvenciája az 5. azonosítószámú szekvencia (SEQ ID NO: 5); a 2250-es és 2253-as nehéz lánc CDR2-régiójának aminosav-szekvenciája a 6. azonosítószámú szekvencia (SEQ ID NO: 6); a 2256-os nehéz lánc nehéz lánc CDR2-régiójának aminosav-szekvenciája a 7. azonosítószámú szekvencia (SEQ ID NO: 7); a 6.1.2-es nehéz lánc CDR2-régiójának aminosav-szekvenciája a 8. azonosítószámú szekvencia (SEQ ID NO: 8); a 6.4.1-es nehéz lánc CDR2-régiójának aminosav-szekvenciája a 9. azonosítószámú szekvencia (SEQ ID NO: 9); a 2345-ös nehéz lánc CDR2-régiójának aminosav-szekvenciája a 10. azonosítószámú szekvencia (SEQ ID NO: 10); a 2349-es nehéz lánc CDR3-régiójának aminosav-szekvenciája a 11. azonosítószámú szekvencia (SEQ ID NO: 11); a 2250-es és 2253-as nehéz lánc CDR3-régiójának aminosav-szekvenciája a 12. azonosítószámú szekvencia (SEQ ID NO: 12); a 2256-os nehéz lánc CDR3-régiójának aminosav-szekvenciája a 13. azonosítószámú szekvencia (SEQ ID NO: 13); a 6.1.2-es nehéz lánc CDR3-régiójának aminosav-szekvenciája a 14. azonosítószámú szekvencia (SEQ ID NO: 14); a 6.4.1-es nehéz lánc CDR3-régiójának aminosav-szekvenciája a 15. azonosítószámú szekvencia (SEQ ID NO: 15); a 2345-ös nehéz lánc CDR3-régiójának aminosav-szekvenciája a 16. azonosítószámú szekvencia (SEQ ID NO: 16); és a 2349-es nehéz lánc CDR3-régiójának aminosav-szekvenciája a 17. azonosítószámú szekvencia (SEQ ID NO: 17).

A 10. ábrán agonista aktivitású egéredetű és humán anti-trkC monoklonális antitestek könnyű lánc variábilis (V_L) régiójának aminosav-szekvenciáját mutatjuk be. A három CDR-régió (CDR1, CDR2 és CDR3) aminosavait félkövér betűtípussal szedtük. A 2250-es könnyű lánc CDR1-régiójának aminosav-szekvenciája a 18. azonosítószámú szekvencia (SEQ ID NO: 18); a 2253-as könnyű lánc CDR1-régiójának aminosav-szekvenciája a 19. azonosítószámú szekvencia (SEQ ID NO: 19); a 2256-os könnyű lánc CDR1-régiójának aminosav-szekvenciája a 20. azonosítószámú szekvencia (SEQ ID NO: 20); a 6.1.2-es könnyű lánc CDR1-régiójának aminosav-szekvenciája a 21. azonosítószámú szekvencia (SEQ ID NO: 21); a 6.4.1-es könnyű lánc CDR1-régiójának aminosav-szekvenciája a 22. azonosítószámú szekvencia (SEQ ID NO: 22); a 2345-ös könnyű lánc CDR1-régiójának aminosav-szekvenciája a 23. azonosítószámú szekvencia (SEQ ID NO: 23); a 2349-es könnyű lánc CDR1-régiójának aminosav-szekvenciája a 24. azonosítószámú szekvencia (SEQ ID NO: 24); a 2250-es könnyű lánc CDR2-régiójának aminosav-szekvenciája a 25. azonosítószámú szekvencia (SEQ ID NO: 25); a 2253-as könnyű lánc CDR2-régiójának aminosav-szekvenciája a 26. azonosítószámú szekvencia (SEQ ID NO: 26); a 2256-os könnyű lánc CDR2-régiójának aminosav-szekvenciája a 27. azonosítószámú szekvencia (SEQ ID NO: 27); a 6.1.2-es könnyű lánc CDR2-régiójának aminosav-szekvenciája a 28. azonosítószámú szekvencia (SEQ ID NO: 28); a 6.4.1-es könnyű lánc CDR2-régiójának



aminosav-szekvenciája a 29. azonosítószámú szekvencia (SEQ ID NO: 29); a 2345-ös és 2349-es könnyű lánc CDR2-régiójának aminosav-szekvenciája a 30. azonosítószámú szekvencia (SEQ ID NO: 30); a 2250-es könnyű lánc CDR3-régiójának aminosav-szekvenciája a 31. azonosítószámú szekvencia (SEQ ID NO: 31); a 2253-as könnyű lánc CDR3-régiójának aminosav-szekvenciája a 32. azonosítószámú szekvencia (SEQ ID NO: 32); a 2256-os könnyű lánc CDR3-régiójának aminosav-szekvenciája a 33. azonosítószámú szekvencia (SEQ ID NO: 33); a 6.1.2-es könnyű lánc CDR3-régiójának aminosav-szekvenciája a 34. azonosítószámú szekvencia (SEQ ID NO: 34); a 6.4.1-es könnyű lánc CDR3-régiójának aminosav-szekvenciája a 35. azonosítószámú szekvencia (SEQ ID NO: 35); a 2345-ös és 2349-es könnyű lánc CDR3-régiójának aminosav-szekvenciája a 36. azonosítószámú szekvencia (SEQ ID NO: 36).

A 11. ábrán agonista aktivitású, egéreredetű és humán anti-trkC monoklonális antitestek nehéz és könnyű variábilis láncai CDR-régióinak aminosav-szekvenciáit mutatjuk be. Az ábrán feltüntetettük azokat a családokat is, amelyekhez e szekvenciák tartoznak (adatbázisokban hozzáférhető CDR-szekvenciákkal mutatott homológia alapján).

A 12. ábrán azt szemléltetjük, hogy az agonista anti-trkC monoklonális antitestek javított *in vivo* felezési idővel és biológiai hozzáférhetőséggel rendelkeznek.

A 13. ábrán az agonista aktivitású anti-trkC monoklonális antitestek ciszplatin-indukálta neuropathiára gyakorolt hatását szemléltetjük.

A 14. ábrán a marker-expresszió piridoxin-indukálta neuropathia által okozott csökkenését mutatjuk be.

A 15. ábrán a piridoxin kis dózisa hatásának agonista aktivitású anti-trkC monoklonális antitestek általi mérséklését szemléltetjük.

A 16. ábrán a piridoxin nagy dózisa hatásának agonista aktivitású anti-trkC monoklonális antitestek általi mérséklését szemléltetjük.

A 17. ábrán a piridoxin-indukálta neuropathia agonista aktivitású anti-trkC monoklonális antitestek általi enyhítését szemléltetjük.

A 18. ábrán az agonista aktivitású anti-trkC monoklonális antitestek patkányok „létramaszásának” piridoxin-indukálta romlását enyhítő hatását szemléltetjük.

A 19. ábrán azt szemléltetjük, hogy az NT-3 terápiás dózisa hiperalgesziát okoznak, az agonista aktivitású anti-trkC monoklonális antitestek azonban nem.

A 20. ábrán a humán trkC-receptor aminosav-szekvenciáját (56. azonosítószámú szekvencia, SEQ ID NO: 56) mutatjuk be, feltüntetve a 4. és 5. domén határait.

A 21. ábrán a humán trkC-receptor nukleotidszekvenciáját (57. azonosítószámú szekvencia, SEQ ID NO: 57) mutatjuk be.

A 22. ábrán a 2250-es agonista aktivitású anti-trkC monoklonális antitest nehéz láncát kódoló nukleotidszekvenciát (A; 58. azonosítószámú szekvencia; SEQ ID NO: 58), illetve

könnyű láncát kódoló nukleotidszekvenciát (B; 59. azonosítószámú szekvencia; SEQ ID NO: 59) mutatjuk be.

A 23. ábrán a 2253-as agonista aktivitású anti-trkC monoklonális antitest nehéz láncát kódoló nukleotidszekvenciát (A; 60. azonosítószámú szekvencia; SEQ ID NO: 60), illetve könnyű láncát kódoló nukleotidszekvenciát (B; 61. azonosítószámú szekvencia; SEQ ID NO: 61) mutatjuk be.

A 24. ábrán a 2256-os agonista aktivitású anti-trkC monoklonális antitest nehéz láncát kódoló nukleotidszekvenciát (A; 62. azonosítószámú szekvencia; SEQ ID NO: 62), illetve könnyű láncát kódoló nukleotidszekvenciát (B; 63. azonosítószámú szekvencia; SEQ ID NO: 63) mutatjuk be.

A 25. ábrán a 2345-ös agonista aktivitású anti-trkC monoklonális antitest nehéz láncát kódoló nukleotidszekvenciát (A; 64. azonosítószámú szekvencia; SEQ ID NO: 64), illetve könnyű láncát kódoló nukleotidszekvenciát (B; 65. azonosítószámú szekvencia; SEQ ID NO: 65) mutatjuk be.

A 26. ábrán a 2349-es agonista aktivitású anti-trkC monoklonális antitest nehéz láncát kódoló nukleotidszekvenciát (A; 66. azonosítószámú szekvencia; SEQ ID NO: 66), illetve könnyű láncát kódoló nukleotidszekvenciát (B; 67. azonosítószámú szekvencia; SEQ ID NO: 67) mutatjuk be.

A 27. ábrán a 6.1.2-es agonista aktivitású anti-trkC monoklonális antitest nehéz láncát kódoló nukleotidszekvenciát (A; 68. azonosítószámú szekvencia; SEQ ID NO: 68), illetve könnyű láncát kódoló nukleotidszekvenciát (B; 69. azonosítószámú szekvencia; SEQ ID NO: 69) mutatjuk be.

A 28. ábrán a 6.4.1-es agonista aktivitású anti-trkC monoklonális antitest nehéz láncát kódoló nukleotidszekvenciát (A; 70. azonosítószámú szekvencia; SEQ ID NO: 70), illetve könnyű láncát kódoló nukleotidszekvenciát (B; 71. azonosítószámú szekvencia; SEQ ID NO: 71) mutatjuk be.

A találmány előnyös megvalósítási módjainak részletes leírása

A) Definíciók

A „neurotrophin” kifejezés (és szinonimái) az idegrendszeri növekedési faktor (NGF) és annak később azonosított homológjainak polipeptid-családjára vonatkozik. E család napjainkig azonosított tagjai a következők: NGF, agyi eredetű növekedési faktor (BDNF, NT-2), neurotrophin-3 (NT-3), neurotrophin-4 és -5 (NT-4/5), neurotrophin-6 (NT-6) és neurotrophin-7 (NT-7).

A „neurotrophin” kifejezés jelentése magában foglalja bármely ember vagy állatfaj natív neurotrophinját, valamint ezek funkcionális származékait, függetlenül attól, hogy termé-

szetes forrásból végzett tisztítással, rekombináns DNS-technológiai módszerekkel, kémiai szintézissel vagy ezen vagy egyéb eljárások kombinációival vannak-e előállítva. A „natív” vagy „natív szekvenciájú” neurotrophinok emberben vagy egyéb állatfajokban természetes állapotban előforduló neurotrophinok aminosav-szekvenciáját tartalmazó neurotrophinok, ideértve ezek természetben előforduló, lerövidített alakjait és változatait, valamint természetben előforduló allélváltozatait.

A „trk”, „trk-poliipeptid”, „trk-receptor” és hasonló kifejezéseket egymás szinonimáiként alkalmazzuk, és a tirozin kináz receptor-főcsaládba tartozó poliipeptidekre vonatkoznak, melyek legalább egy natív neurotrophin megkötésére képesek. E család eddig azonosított tagjai a trkA (p140^{trkA}), trkB és trkC.

A találmány ismertetése során használt értelemben, az „extracelluláris domén” vagy „ECD” kifejezésen olyan poliipeptid-szekvenciát értünk, amely egy természetben előforduló receptor extracelluláris doménjének ligandumkötő aktivitásával bír. Az extracelluláris domén ligandumkötő aktivitása a poliipeptid ligandumot megkötő képességére vonatkozik. Ennek megfelelően, a poliipeptid-szekvenciának nem szükséges magában foglalnia a teljes extracelluláris domént, mivel bebizonyosodott, hogy kisebb szakaszok is elegendőek a ligandum megkötéséhez. A lerövidített extracelluláris domén általában oldható. Az ECD kifejezés jelentése kiterjed azon poliipeptid-szekvenciákra is, amelyekben az érett receptor hidrofób transzmembrán szekvenciája (és, adott esetben a transzmembrán domén 1-20 C-terminális és/vagy N-terminális aminosava) deletálva van.

Az „agonista aktivitású anti-trkC antitest” kifejezésen olyan antitestet értünk, amely képes egy natív szekvenciájú trkC-receptorhoz – és/vagy a trkC jelátviteli funkció által közvetített reakcióút későbbi tagjaihoz – kötődni és az(oka)t aktiválni (utánozva ezáltal a receptor natív ligandumának, konkrétan az NT-3-nak biológiai aktivitását. például, az agonista aktivitású antitest egy trkC-receptor ECD-doménjéhez kötődhet, és ezáltal a receptor dimerizációját okozza, ami az intracelluláris katalitikus kináz-domén aktiválását eredményezi. Következésképpen, ez a receptort termelő sejtek *in vitro* és/vagy *in vivo* szaporodásának és/vagy differenciálódásának serkentését eredményezheti. A találmány szerinti agonista aktivitású antitestek előnyösen a humán trkC-receptor 5. doménjének (kb. 266-381. aminosavak) és/vagy 4. doménjének (kb. 178-265. aminosavak) legalább egy részét magában foglaló epitópot – vagy egy nem humán (pl. egérreredetű) trkC-receptor megfelelő epitóját – ismerik fel.

A találmány szerinti agonista anti-trkC antitestek vonatkozásában használt „biológiai aktivitás” kifejezésen általában a trkC natív ligandumára, az NT-3-ra jellemző effektor-funkciót értünk. Az effektor-funkció előnyösen a trkC tirozin kináz receptor és/vagy a trkC jelátviteli funkció által közvetített reakcióút későbbi tagjai megkötésének és aktiválásának képességét jelenti. A találmány szerinti megoldás szempontjából előnyös biológiai aktivitások közé tarto-



zik, többek között, a károsodott sejtek, elsősorban idegsejtek [ideértve a perifériás (szimpatikus, paraszimpatikus, szenzoros és enterikus) neuronokat, motoneuronokat és centrális (agyi és gerincvelői) neuronokat], valamint egyéb sejtek, pl. perifériás vér leukocitái *in vitro* vagy *in vivo* fejlődését, proliferációját, fennmaradását és/vagy regenerálását elősegítő aktivitás. A találmány szempontjából különösen előnyös biológiai aktivitás a neuropathia (pl. perifériás neuropathia) vagy egyéb neurodegeneratív betegségek kezelésének képessége (ideértve a megelőzést is), illetve a károsodott idegsejtek regenerálásának képessége. A károsodott neuronok lehetnek szenzoros, szimpatikus, paraszimpatikus vagy enterikus neuronok, pl. dorzális gyökérganglionok, motoros neuronok és centrális neuronok (pl. gerincvelői neuronok), a károsodás pedig lehet trauma, toxikus anyagok, sebészeti beavatkozás, stroke, ischaemia, fertőzés, anyagcsere-betegség, tápanyaghiány és különféle malignáns betegségek következménye. A találmány szerinti antitestek egy másik specifikus biológiai aktivitása az angiogenezist indukáló képesség.

A találmány ismertetése során használt értelemben, a „kezelés” kifejezésen jótékony vagy kívánatos klinikai eredmények elérését célzó beavatkozást értünk. A találmány céljaira a jótékony vagy kívánatos klinikai eredmények közé tartozik, többek között, a tünetek enyhítése, a betegség kiterjedésének csökkentése, a betegség stádiumának stabilizálása (azaz rosszabbodásának elkerülése), a betegség progressziójának késleltetése vagy lassítása, a betegség státuszának enyhítése vagy csillapítása, és a részleges vagy teljes remisszió, függetlenül attól, hogy detektálható vagy sem. A „kezelés” jelentheti a páciens túlélésének – kezelés nélkül várható túléléshez viszonyított – meghosszabbítását is. A „kezelés” a rendellenesség kialakulásának megelőzése vagy lefolyásának megváltoztatása céljából végzett beavatkozás. Ennek megfelelően, a „kezelés” kifejezés jelentése a terápiás célú, illetve a megelőzési célú (profilaktikus) kezelésre egyaránt kiterjed. A kezelésre szoruló páciensek közé tartoznak a már rendellenességtől szenvedők, illetve azok, akiknél a rendellenesség kifejlődésének megelőzésére van szükség. A kezelés célja lehet a celluláris degeneráció vagy károsodás (pl. idegsejt-károsodás) közvetlen megelőzése, lefolyásának lassítása vagy mérséklése, illetve a sejtek (pl. neuronok) egyéb terápiás hatóanyagokkal végzett kezelésre vonatkozó fogékonyságának növelése. Az egyik előnyös megvalósítási mód szerint a kezelés csökkenti vagy lassítja a célneuronok funkciójának leépülését és/vagy serkenti azok regenerálását.

Egy (krónikus) neurodegeneratív betegség vagy akut idegrendszeri sérülés „patológiája” magában foglalja a páciens komfortérzését befolyásoló valamennyi jelenséget, ideértve, többek között, a neuronok diszfunkcióját, degenerációját, sérülését és/vagy pusztulását.

A „neurodegeneratív betegség” vagy „neurodegeneratív rendellenesség” kifejezésen olyan rendellenességeket értünk, amelyek lefolyása neuronális degenerációt és/vagy diszfunkciót foglal magában, ideértve, többek között, a perifériás neuropathiákat; motoneuronos rendellenességeket, mint pl. az amyotrophiás lateral sclerosis (ALS, Lou Gehrig-kór),

facialisbénulást és különféle, spinalis muscularis atrophíával vagy paralízissel jellemezhető állapotokat; valamint egyéb humán neurodegeneratív betegségeket (pl. Alzheimer-kór, Parkinson-kór, epilepszia, sclerosis multiplex, Huntington-kór, Down-szindróma, idegsüketség és Meniere-kór).

A „perifériás neuropathia” kifejezésen a perifériás idegeket érintő neurodegeneratív betegséget értünk, amely többnyire motoros, szenzoros, szenzomotoros vagy autonóm diszfunkcióként (vagy ezek kombinációjaként) nyilvánul meg. A perifériás neuropathia, például, lehet öröklött, okozhatja szisztémás betegség vagy indukálhatja toxikus ágens, pl. neurotoxikus drog (pl. tumorelleses hatóanyag) vagy ipari vagy környezeti szennyezés. A „perifériás szenzoros neuropathia” a perifériás szenzoros neuronok degenerálódásával jellemezhető, ami lehet idiopathiás, lehet diabetes következménye (diabetes-szel összefüggő neuropathia), okozhatja citosztatikummal – pl. kemoterápiás hatóanyag [pl. vincristin, cisplatin, methotrexat, 3'-azido-3'-deoxitimidin vagy taxánok, mint pl. a paclitaxel (TAXOL[®], Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ, USA) és a doxetaxel (TAXOTERE[®], Rhone-Poulenc Rorer, Antony, Franciaország)] alkalmazásával – végzett rákterápia, alkoholizmus, szerzett immunhiányos szindróma (AIDS) vagy genetikai eredetű fogékonyság. Az öröklött perifériás neuropathiák közé tartozik, például, a Refsum-kór, Krabbe-kór, metachromaticus leukodystrophia, Fabry-kór, Dejerine-Sottas szindróma, abetalipoproteinémia és Charcot-Marie-Tooth (CMT) leukodystrophia (más néven pronealis muscularis atrophia vagy öröklött motoros-szenzoros neuropathia (HMSN). A perifériás neuropathiák legtöbb típusa lassan (hónapok vagy évek alatt) alakul ki – a klinikai gyakorlatban az ilyen neuropathiákat krónikusnak nevezzük. Bizonyos esetekben a perifériás neuropathia gyorsan (napok alatt) fejlődik ki, amit akut folyamatnak nevezünk. A perifériás neuropathia rendszerint a szenzoros és motoros (érző és mozgató) idegeket együtt érinti, ami vegyes szenzoros-motoros neuropathiát eredményez, de ismeretes tisztán szenzoros és tisztán motoros neuropathia is.

A találmány ismertetése során használt értelemben, a „toxikus ágens” kifejezésen olyan anyagot értünk, amely kémiai hatása révén rongálja, károsítja vagy gátolja az idegrendszer valamely komponensének működését. A toxikus ágensek (más néven „neurotoxikus ágensek”) példái közé tartoznak, többek között, a fentebb felsorolt kemoterápiás hatóanyagok, alkoholok, fémek, ipari toxinok, élelmiszer és gyógyszer szennyezések és hasonlóak.

Gyógykezelés vonatkozásában az „emlős” kifejezésen az emlősök osztályába sorolt állatokat értünk, ideértve az embert, a háziállatokat és a gazdasági haszonállatokat, állatkerti állatokat, sportolási, ill. kedvtelési célból tartott állatokat, így pl. kutyákat, lovakat, macskákat, szarvasmarhákat, stb.

A „trkC-immunadhezín” és a szinonimájaként használt „trkC-immunglobulin kiméra” kifejezésen olyan kimérikus molekulát értünk, amelyben egy trkC-protein (általában annak

extracelluláris doménje) immunglobulin-szekvenciával van kombinálva. Az immunglobulin-szekvencia előnyösen – de nem szükségszerűen – egy immunglobulin konstans doménje. szakember számára jól ismertek az olyan kiméramolekulák, amelyek megfelelő immunglobulin konstans domén szekvenciához kapcsolt receptor-szekvenciából állnak. Az idevonatkozó szakirodalomban leírt immunadhezinek közé tartoznak a következő vegyületek fúziói: T-sejt-receptor* [Gascoigne és mtsai.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 2936 (1987)]; CD4* [Capon és mtsai.: *Nature* **337**, 525 (1989); Trautnecker és mtsai.: *Nature* **339**, 68 (1989); Zettmeissl és mtsai.: *DNA Cell Biol.* **9**, 347 (1990); Byrn és mtsai.: *Nature* **344**, 667 (1990)]; L-szelektin (homíng receptor) [Watson és mtsai.: *J. Cell Biol.* **110**, 2221 (1990); Watson és mtsai.: *Nature* **349**, 164 (1991)]; CD44* [Aruffo és mtsai.: *Cell* **61**, 1303 (1990)]; CD28* és B7* [Linsley és mtsai.: *J. Exp. Med.* **173**, 721 (1991)]; CLTA-4* [Linsley és mtsai.: *J. Exp. Med.* **174**, 561 (1991)]; CD22* [Stamenkovic és mtsai.: *Cell* **66**, 1133 (1991)]; TNF-receptor [Ashkenazi és mtsai.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 10535 (1991); Lesslauer és mtsai.: *Eur. J. Immunol.* **27**, 2883 (1991); Peppel és mtsai.: *J. Exp. Med.* **174**, 1483 (1991)]; NP-receptorok [Bennett és mtsai.: *J. Biol. Chem.* **266**, 23060 (1991)]; és IgE-receptor- α * [Ridgway és mtsai.: *J. Cell Biol.* **115**, 1448 (kivonat) (1991)]. A felsorolásban a csillaggal (*) jelölt receptorok az immunglobulin szupercsalád tagjai.

A találmány ismertetése során használt értelemben, az „izolált nukleinsav vagy polipeptid” kifejezésen olyan azonosított nukleinsavat, illetve polipeptidet értünk, amely állati vagy humán forrásában jelen lévő szennyező nukleinsavaktól vagy polipeptidektől el van különítve. A nukleinsav, illetve polipeptid diagnosztikai célokra vagy próbaként történő alkalmazáshoz az alábbiakban, a diagnosztikai tesztek ismertetésénél említett jelölőanyagokkal jelölhető.

Az „amínosav-szekvencia változat” kifejezésen általában olyan molekulákat értünk, amelyek amínosav-szekvenciája – egy vonatkoztatási (pl. natív szekvenciájú) polipeptiddel összehasonlítva – bizonyos módosításokat tartalmaz. Az ilyen módosítások a natív amínosav-szekvenciában bekövetkezett szubsztitúciók, inszerciók, delécioók és ezek kombinációi lehetnek.

A „kódoló DNS-szekvencia”, „kódoló DNS” és „kódoló nukleinsav” kifejezéseken dezoxiribonukleinsav-szállban elhelyezkedő dezoxiribonukleotidok sorrendjét vagy szekvenciáját értjük. A dezoxiribonukleotidok sorrendje határozza meg a polipeptid-láncban lévő aminosavak sorrendjét, így a DNS-szekvencia aminosav-szekvenciát kódol.

A „replikációra képes expressziós vektor” és „expressziós vektor” kifejezéseken olyan – rendszerint kettős szálú – DNS-szakaszt értünk, amely inszertált idegen DNS-szakaszt hordozhat. Az idegen DNS olyan heterológ DNS-ként definiálható, amely a gazdasejtben természetes állapotban nem található meg. A vektor az idegen vagy heterológ DNS megfelelő gazdasejtbe történő bejuttatására alkalmazható. A gazdasejtbe jutva a vektor a gazda kromoszómális DNS-étől függetlenül replikálódhat, miáltal a vektor (és a vektorba inszertált idegen DNS) több

kópiája hozható létre. Ezen túlmenően, a vektor olyan elemeket is tartalmaz, amely az idegen DNS polipeptiddé történő translációjának szabályozásához szükségesek. Ilyen módon az idegen DNS által kódolt polipeptid számos molekulája állítható elő.

A „szabályozószekvenciák” kifejezésen olyan DNS-szekvenciákat értünk, amelyek a hozzájuk működőképesen kapcsolt kódolószekvencia adott gazdaszervezetben történő expresszáltatásához szükségesek. A prokarióta gazdasejtekben történő expresszáltatásra szabályozószekvenciaként, például, promóter, adott esetben operátor-szekvencia, riboszómakötőhely, és egyéb, kevésbé ismert szekvenciák alkalmazhatók. Az eukarióta sejtekről ismert, hogy promótereket, poliadenilációs szignálokat és erősítőszekvenciákat alkalmaznak.

Egy nukleinsav akkor van „működőképesen kapcsolva”, ha egy másik nukleinsav-szekvenciával funkcionális kapcsolatban van. Például, egy pre-szekvencia vagy szekréción vezetészekvencia DNS-e akkor van működőképesen egy polipeptidet kódoló DNS-hez kapcsolva, ha olyan pre-proteinként expresszáldódik, amely részt vesz a polipeptid szekrécijában. Egy promóter vagy egy erősítőszekvencia akkor van működőképesen egy kódolószekvenciához kapcsolva, ha hatással van a szekvencia transzkripciójára. Egy riboszómakötőhely akkor van működőképesen egy kódolószekvenciához kapcsolva, ha elősegíti a translációt. A „működőképesen kapcsolt” kifejezés általában azt jelenti, hogy az összekapcsolt DNS-szekvenciák egymással határosak, és – szekréción vezetészekvencia esetében – egymással határosak és azonos leolvasási fázisban vannak, ugyanakkor, az erősítőszekvenciák esetében nem követelmény, hogy összeérőek legyenek. Az összekapcsolás szokványos restriktions helyeknél ligálással valósulhat meg. Ha ilyen helyek nem léteznek, az általános gyakorlatnak megfelelően szintetikus oligonukleotid-adapterek vagy kapcsolószekvenciák alkalmazhatók.

A leírásban a „sejt”, „sejtvonal” és „sejtenyészet” kifejezéseket egymás szinonimáiként alkalmazzuk, és valamennyi ilyen megjelölés magában foglalja az utódsejteket is. Ilyenformán, a „transzformáns” és „transzformált sejt” kifejezések jelentése kiterjed az elsődleges, eredeti sejtre és a belőle származó tenyészetekre (függetlenül az átoltások számától). Természetesen az utódsejtek DNS-tartalmukban nem pontosan egyformák, ami a szándékos vagy véletlenszerű mutációk következménye. A funkciójuk és biológiai aktivitásuk tekintetében azonos mutáns utódsejtek szintén a kifejezés jelentéskörébe tartoznak.

A találmány ismertetése során használt értelemben, az „exogén” kifejezést olyan nukleinsav-szekvenciaként definiáljuk, amely az adott sejtben idegen, vagy a sejttel homológ, de a gazdasejt nukleinsavának olyan pozíciójában helyezkedik el, amelyben normális esetben nem található meg.

Az „antitestek” és „immunglobulinok” (Ig-k) azonos strukturális sajátosságokkal bíró glikoproteinek. Míg az antitestek egy adott antigénre irányuló kötési specifitást mutatnak, az immunglobulinok közé tartoznak az antitestek és egyéb, antitest-szerű molekulák is, amelyekből

hiányzik az antigén-specifitás. Az utóbbi típusba tartozó polipeptideket, például, a nyirokrendszer kis mennyiségben, a myelomák pedig fokozott mennyiségben termelik.

A „natív antitestek” rendszerint kb. 150 000 Dalton molekulatömegű heterotetramer glikoproteinek, amelyek két azonos könnyű (L) láncból és két azonos nehéz (H) láncból állnak. Mindkét könnyű lánc egy kovalens diszulfid-kötéssel kapcsolódik a nehéz láncához, míg a különböző immunglobulin-izotípusokban a nehéz láncok között eltérő számú diszulfid-kötés található. A nehéz és könnyű láncokban, egymástól szabályos távolságokra, láncon belüli diszulfid-kötések helyezkednek el. Mindkét nehéz lánc egyik végén variábilis domén (V_H) található, melyet számos konstans domén követ. A könnyű láncok egyik végén variábilis domén (V_L), másik végén konstans domén helyezkedik el; a könnyű lánc konstans doménje a nehéz lánc első konstans doménjével, míg a könnyű lánc variábilis doménje a nehéz lánc variábilis doménjével illeszkedik. Úgy tartják, hogy a nehéz és a könnyű lánc variábilis doménjei között bizonyos aminosavak határfelületet képeznek.

Az antitestekkel összefüggésben használt „variábilis” kifejezés arra vonatkozik, hogy a variábilis domén bizonyos részeinek aminosav-szekvenciája az egyes antitestekben nagymértékben eltér egymástól, és ezek a szakaszok felelősek az adott antitest adott antigénre vonatkozó specifitásáért. Mindazonáltal, a variabilitás az antitest variábilis doménjeiben nem egyenletesen oszlik meg, hanem három szakaszra koncentrálódik: ezek az úgynevezett hipervariábilis régiók, amelyek a könnyű lánc és a nehéz lánc variábilis doménjeiben egyaránt megtalálhatók. A variábilis domén konzerváltabb szakaszait vázrégióknak (FR) nevezzük. A natív antitestek nehéz és könnyű láncainak variábilis doménjei egyenként négy vázrégiót (FR1, FR2, FR3 és FR4) tartalmaznak (melyek többnyire β -redős konfigurációt vesznek fel), és ezeket három hipervariábilis régió köti össze, melyek hurkokat képeznek, és ezek a hurkok kapcsolják össze a β -redős struktúrát (és néhány esetben annak részét is képezik). Az egyes láncokban a vázrégiók szorosan összetartják a hipervariábilis régiókat, melyek – a másik láncban lévő hipervariábilis régiókkal együtt – az antitest antigénkötő helyeinek létrehozásában játszanak szerepet [ld. Kabat és mtsai.: „Sequences of Proteins of Immunological Interest”, 5. kiadás, 647-669. old., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)]. A konstans domének közvetlenül nem játszanak szerepet az antitest antigénhez történő kötődésében, azonban különféle effektor-funkciókat töltenek be – pl. az antitest részvétele az antitest-dependens celluláris citotoxicitásban.

A találmány ismertetése során használt értelemben, a „hipervariábilis régió” kifejezésen egy antitest antigénkötésért felelős aminosavaiból álló régiót értünk. A hipervariábilis régió általában „komplementaritást meghatározó régióból” (CDR) származó aminosavakat tartalmaz – azaz a könnyű lánc variábilis doménjének 24-34. aminosavait (L1), 50-56. aminosavait (L2) és 89-97. aminosavait (L3), valamint a nehéz lánc variábilis doménjének 31-35. aminosavait

(H1), 50-65. aminosavait (H2) és 95-102. aminosavait (H3) [ld. Kabat és mtsai.: „Sequences of Proteins of Immunological Interest”, 5. kiadás, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)] –, és/vagy „hipervariábilis hurokból” származó aminosavakat [azaz a könnyű lánc variábilis doménjének 26-32. aminosavait (L1), 50-52. aminosavait (L2) és 91-96. aminosavait (L3), valamint a nehéz lánc variábilis doménjének 26-32. aminosavait (H1), 53-55. aminosavait (H2) és 96-101. aminosavait (H3); Chothia és Lesk: J. Mol. Biol. 196, 901 (1987)] tartalmaz. A vázrégiót („framework” vagy FR) alkotó aminosavak a variábilis domén azon aminosavai, amelyek nem a fentebb definiált hipervariábilis régió részét képezik.

Az antitestek papainos emésztése két azonos antigénkötő fragmenst (Fab-fragmensek, melyek egy-egy antigénkötő helyet tartalmaznak), valamint egy maradék Fc-fragmenst eredményez, amelynek neve kristályosodási hajlamát („crystallize”) tükrözi. A pepszines emésztés eredményeként $F(ab')_2$ -fragmens jön létre, amely két antigén-kombinálódási helyet tartalmaz, és képes az antigén keresztkötésére.

Az „Fv-fragmens” az a minimális antitest-fragmens, amely komplett antigén-felismerő és -kötő helyet tartalmaz. Ez a régió egy nehéz lánc variábilis domén és egy könnyű lánc variábilis domén dimere, amelyben a domének nem kovalens kötéssel vannak szorosan egymáshoz kapcsolva. Ez a konfiguráció teszi lehetővé, hogy az egyes variábilis doménekben a három-három hipervariábilis régió interakcióba lépve a V_H - V_L dimer felületén antigénkötő helyet hozzon létre. A hat hipervariábilis régió együttesen biztosítja az antitest antigénkötő specifitását, azonban egyetlen variábilis domén (vagy egy Fv-fragmens fele, amely csak három, antigénre specifikus hipervariábilis régiót tartalmaz) is képes az antigén felismerésére és megkötésére (bár kisebb affinitással, mint a teljes kötőhely).

A Fab-fragmens tartalmazza a könnyű lánc konstans doménjét és a nehéz lánc első konstans doménjét (CH1) is. A Fab'-fragmens annyiban tér el a Fab-fragmenstől, hogy a nehéz lánc CH1-doménjének C-terminálisán néhány plusz aminosavat tartalmaz (köztük a az antitest csukló- („hinge”) régiójának egy vagy több ciszteinjét). A Fab'-SH olyan Fab'-fragmens, amelyben a konstans domének ciszteinje(i) szabad tiolcsoportokat tartalmaznak. Az $F(ab')_2$ -fragmenst eredetileg Fab'-fragmensek párjaként állították elő, a két Fab'-fragmens között csukló-régióból származó ciszteinekkel. Az antitest-fragmensek egyéb kémiai kapcsolásai szintén ismeretesek.

A gerinces fajokból származó antitestek (immunglobulinok) „könnyű láncai” – konstans doménjeik aminosav-szekvenciája alapján – a két jól elkülöníthető típusba (κ és λ) sorolhatók.

Az immunglobulinok – nehéz láncuk konstans doménjének aminosav-szekvenciája alapján – különböző osztályokba sorolhatók. Az immunglobulin öt fő osztálya létezik: IgA, IgD, IgE, IgG és IgM, melyek közül több további alosztályokra (izotípusokra) osztható, például:

IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 vagy IgA2. A nehéz lánc konstans doméneket, az egyes immunoglobulin-osztályoknak megfelelően, a következők szerint jelöljük: α , δ , ϵ , γ , illetve μ . Ezen immunoglobulin-osztályok alegység-szerkezete és háromdimenziós konfigurációja szakember számára jól ismert.

A találmány ismertetése során az „antitest” kifejezést legtágabb értelmében használjuk, s jelentése egyaránt kiterjed a humán, nem humán (pl. egérezeredetű) és humanizált monoklonális antitestekre (teljes hosszúságú monoklonális antitestekre), poliklonális antitestekre, multispecifikus antitestekre (pl. bispecifikus antitestekre), valamint az antitest-fragmensekre, feltéve, hogy azok képesek a kívánt biológiai aktivitás kifejtésére.

Az „antitest-fragmensek” egy teljes antitest részletét, általában annak antigénkötő vagy variábilis doménjét tartalmazzák. Az antitest-fragmensek példáulként említhetők a következők: Fab-fragmens, Fab'-fragmens, F(ab')₂-fragmens és Fv-fragmens; diatestek; lineáris antitestek; egyláncú antitest-molekulák; és antitest-fragmensekből álló multispecifikus antitestek.

A találmány ismertetése során használt értelemben, a „monoklonális antitest” kifejezésen lényegében homogén antitest-populációból származó antitestet értünk, vagyis a populációt alkotó egyes antitestek – az esetlegesen kis mennyiségben előforduló természetes mutációktól eltekintve – azonosak. A monoklonális antitestek rendkívül specifikusak: egyetlen antigén ellen irányulnak. Ezen túlmenően, ellentétben a hagyományos (poliklonális) antitest-készítményekkel, amelyek különböző determinánsok (epitópok) elleni különböző antitesteket tartalmaznak, minden egyes monoklonális antitest az antigén egyetlen determinánsa ellen irányul. A „monoklonális” jelző az antitest azon sajátására utal, hogy antitestek lényegében homogén populációjából nyerhető, és nem utal arra, hogy az antitest bármilyen konkrét eljárással lenne előállítható. Például, a találmány szerinti megoldás értelmében alkalmazható monoklonális antitestek az elsőként Kohler és mtsai. [Nature 256, 495 (1975)] által leírt hibridóma-eljárással vagy rekombináns DNS-technikák (ld. pl. 4 816 567 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírás) alkalmazásával állíthatók elő. A „monoklonális antitestek” fág antitest-könyvtárakból is izolálhatók, például, a Clackson és mtsai. [Nature 352, 624 (1991)] és Marks és mtsai. [J. Mol. Biol. 222, 581 (1991)] által leírt technikák alkalmazásával.

A monoklonális antitestek közé tartoznak a „kimérikus” antitestek is, amelyekben a nehéz és/vagy könnyű lánc egy része azonos vagy homológ egy adott fajból származó – vagy egy adott antitest-osztályhoz vagy -alosztályhoz tartozó – antitestek megfelelő szekvenciáival, míg a lánc(ok) többi része azonos vagy homológ egy másik fajból származó – vagy egy másik antitest-osztályba vagy -alosztályba tartozó – antitestek megfelelő szekvenciáival. Szintén a monoklonális antitestek közé tartoznak az ilyen kimérikus antitestek fragmensei, feltéve, hogy képesek a kívánt biológiai aktivitás kifejtésére [4 816 567 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírás; Morrison és mtsai.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 6851 (1984)].

A nem humán (pl. egéredetű) antitestek „humanizált” alakjai olyan kimérikus antitestek, amelyekben a nem humán immunglobulinból származó szekvenciák aránya minimális. A humanizált antitestek többnyire olyan humán immunglobulinok (recipiens antitest), amelyekben a recipiens antitest hipervariábilis régiójának aminosavai egy nem humán fajból (pl. egérből, patkányból, nyúlból vagy nem humán főemlősből) származó antitest (donor antitest) kívánt specifitású, affinitású és kapacitású hipervariábilis régiójának aminosavaival vannak helyettesítve. Néhány esetben a humán immunglobulin vázrégiójának (FR) aminosavai nem humán immunglobulin megfelelő aminosavaival vannak helyettesítve. Ezenfelül, a humanizált antitestek olyan aminosavakat is tartalmazhatnak, amelyek nem találhatók meg sem a recipiens, sem a donor antitestben. Ezek a módosítások az antitest további finomítása céljából hajthatók végre. A humanizált antitest általában egy – jellemzően két – variábilis domén lényegében egészét tartalmazza, mely(ek)ben a hipervariábilis régiók mindegyike vagy lényegében mindegyike megfelel egy nem humán immunglobulin hipervariábilis régióinak, és a vázrégiók mindegyike vagy lényegében mindegyike megfelel egy humán immunglobulin-szekvencia vázrégiójának. A humanizált antitest, adott esetben, egy immunglobulin (jellemzően egy humán immunglobulin) konstans régiójának (Fc) legalább egy részét is tartalmazza. További részleteket illetően ld. Jones és mtsai.: *Nature* **321**, 522 (1986); Riechmann és mtsai.: *Nature* **332**, 323 (1988); Presta: *Curr. Op. Struct. Biol.* **2**, 593 (1992).

Az „egyláncú Fv” vagy „scFv” antitest-fragmensek egy antitest V_H - és V_L -doménjeit egyazon polipeptid-láncon tartalmazzák. Az Fv-polipeptid a V_H - és V_L -domén között általában kapcsolópolipeptidet is tartalmaz, amely az scFv-fragmens számára lehetővé teszi az antigén megkötéséhez szükséges struktúra kialakítását. Az scFv-fragmensek összefoglaló áttekintését illetően ld. Pluckthun: *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies* **113**, 269 (1994).

A „diatest” kifejezés két antigénkötő helyet tartalmazó, kisméretű antitest-fragmensekre vonatkozik, amelyek egyazon polipeptid-láncon könnyű lánc variábilis doménhez (V_L) kapcsolt nehéz lánc variábilis domént (V_H) tartalmaznak (V_H - V_L). Az ugyanazon láncon lévő két domén közötti párosodás bekövetkezéséhez túl rövid kapcsolószekvencia alkalmazásával a domének arra vannak kényszerítve, hogy egy másik lánc komplementer doménjeivel alkossanak párt, miáltal két antigénkötő hely jön létre. A diatestek részletesebb leírását illetően ld. az EP 404 097 számú európai szabadalmi leírást és a WO 93/11161 számú nemzetközi közzétételi iratot; valamint Hollinger és mtsai.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 6444 (1993)].

A találmány ismertetése során használt értelemben, a „lineáris antitestek” kifejezés a Zapata és mtsai. [*Protein Eng.* **8**(10), 1057 (1995)] által leírt antitestekre vonatkozik, amelyek tandem Fd-szegmensekből (VH - $CH1$ - CH - $CH1$) álló párt tartalmaznak, mely Fd-szegmensek antigénkötő régió párt alkotnak. A lineáris antitestek bispecifikusak vagy monospecifikusak egyaránt lehetnek.

Az „epitóp” kifejezésen protein-antigénekben lévő kötőhelyeket értünk, amelyekhez a monoklonális vagy poliklonális antitestek kötődni képesek.

A natív szekvenciájú humán trkC 5. és/vagy 4. doménjéhez (vagy egy natív szekvenciájú, nem humán trkC-receptor egyenértékű epitópjához) kötődő antitesteket „epitóp-térképezéssel” azonosíthatjuk. Az epitópok proteineken való elhelyezkedésének térképezésére és karakterizálására számos eljárás ismeretes, mint például, az antitest-antigén komplex kristályszerkezetének feloldása, kompetíciós tesztek, génfragmens-expressziós tesztek és szintetikus peptiden alapuló vizsgálati eljárások [ld. pl. Harlow és Lane: „Using Antibodies, a Laboratory Manual”, 11. fejezet, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA (1999)]. Az 1. példában kompetíciós ELISA-tesztet ismertetünk. A génfragmens-expressziós tesztekben a proteint kódoló nyitott leolvasási fázist véletlenszerűen vagy specifikus genetikai konstrukciókkal fragmentáljuk, és meghatározzuk a termeltetett proteinfragmensek tesztelni kívánt antitestre vonatkozó reaktivitását. A génfragmensek, például, polimeráz-lánreakcióval állíthatók elő, majd *in vitro* transzkripcióval és transzlációval – radioaktív aminosavak jelenlétében – proteinné alakíthatók. Az antitest radioaktívan jelölt proteinfragmensekhez történő kötődését immunprecipitáció és gélelektroforézis alkalmazásával határozhatjuk meg. Bizonyos epitópok fágreszecskek felületén megjelenített random peptidszekvenciák nagyméretű könyvtárai (fágkönyvtárak) alkalmazásával is azonosíthatók. Más módon, átfedő peptidfragmensek meghatározott könyvtárát egyszerű kötési tesztben a vizsgálandó antitesthez történő kötődésre tesztelhetünk. Ez az utóbbi megközelítési mód kb. 5-15 aminosavas lineáris epitópok meghatározására alkalmas.

Egy antitest akkor kötődik egy vonatkoztatási antitesttel „lényegében azonos epitóphoz”, ha a két antitest azonos vagy térbelileg átfedő epitópokat ismer fel. Ennek megállapításának legáltalánosabban alkalmazott és gyors eljárásai a kompetíciós tesztek, amelyek különböző formátumokban (jelölt antigén vagy jelölt antitest alkalmazásával) hajthatók végre. Az antigént rendszerint 96 üregű mikrotiter-tálcán immobilizáljuk, és a jelöletlen antitestek jelölt antitestek kötődését gátló képességét radioaktív vagy enzimátikus jelölők alkalmazásával mutatjuk ki. Az 1. példában egy kompetíciós ELISA-tesztet ismertetünk.

A találmány ismertetése során használt értelemben, az „aminosav” kifejezésen természetben előforduló L- vagy D-aminosavakat értünk, melyeket a változatok leírásánál ismertetünk részletesebben. A leírásban az aminosavak általánosan alkalmazott egy és három betűs rövidítéseit használjuk [ld. Bruce Alberts és mtsai.: „Molecular Biology of the Cell”, 3. kiadás, Garland Publishing, Inc., New York (1994)].

A hibridizációt előnyösen „sztringens feltételek” mellett hajtjuk végre, a következők szerint: (1) kis ionerősségű oldatban, magas hőmérsékleten végzett mosás; például, 50 °C-on 0,015 M nátrium-klorid/0,0015 M nátrium-citrát/0,1 % nátrium-dodecil-szulfát összetételű ol-

dattal végzett mosás; vagy (2) denaturálószer (pl. formamid) jelenlétében végzett hibridizáció, például, 50 % (V/V) formamidot tartalmazó 0,1 % szarvasmarha-szérumalbumin/0,1 % Ficoll/0,1 % polivinilpirrolidon/50 mM nátrium-foszfát puffer (pH = 6,5) eleggyel végzett hibridizáció és 42 °C-on 750 mM nátrium-klorid/75 mM nátrium-citrát oldattal végzett mosás. További példaként említhető az 50 % formamid, 5xSSC-oldat (0,75 M NaCl, 0,075 M nátrium-citrát), 50 mM nátrium-foszfát (pH = 6/8), 0,1 % nátrium-pirofoszfát, 5 x Denhardt-oldat, ultrahangkezelt lazacsperma-DNS (50 g/ml), 0,1 % SDS és 10 % dextrán-szulfát összetételű oldatban, 42 °C-on végzett hibridizáció és 0,1 % SDS-t tartalmazó 0,2xSSC-oldattal, 42 °C-on végzett mosás.

B) A találmány gyakorlati megvalósítására alkalmas eljárások

A találmány tárgyát agonista aktivitású, humán és nem humán monoklonális antitestek képezik (ideértve az utóbbiak humanizált alakjait is), amelyek a trkC-receptor natív liganduma, az NT-3 bizonyos biológiai tulajdonságait utánozzák. Az egérezetű és humán anti-trkC antitestek előállításának alábbiakban ismertetésre kerülő, általános technikai szakember számára jól ismertek. További részleteket – köztük az agonista aktivitású antitestek szelektálását – az 1. példában ismertetünk.

1) Antitestek előállítása

(i) Poliklonális antitestek

A poliklonális antitestek előállítási módszerei jól ismertek. A poliklonális antitestek, például, immunizálóanyag (és, kívánt esetben, egy adjuváns) egy vagy több injekciójának beadását követően, emlősökben termeltethetők. Az immunizálóanyagot és/vagy adjuvánt rendszerint több szubkután vagy intraperitoneális injekcióval adjuk be az emlősnek. Az immunizálóanyagot hasznos lehet olyan proteinnel konjugálni, amelyről ismeretes, hogy az immunizálni kívánt emlősben immunogén aktivitású (pl. szérumalbumin vagy szójabab tripszin-inhibitor). Az immunizálásra alkalmazható adjuvánsok példáulként említhető a Freund-féle komplett adjuváns és az MPL-TDM.

(ii) Monoklonális antitestek

A monoklonális antitestek az elsőként Kohler és mtsai. [Nature 256, 495 (1975)] által leírt hibridóma-eljárással, valamint rekombináns DNS-technikák (ld. a 4 816 567 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírást) alkalmazásával állíthatók elő.

A hibridóma-eljárás során egeret vagy egyéb alkalmas gazdaállatot (pl. hörcsögöt vagy makákót) a fentebb leírtak szerint immunizálunk, hogy olyan limfociták termelődését váltssuk ki, amelyek az immunizálásra alkalmazott proteinhez specifikusan kötődő antitesteket termelnek (illetve azok termelésére képesek). Más módon, a limfocitákat *in vitro* immunizálhatjuk, ezt

követően a limfocitákat megfelelő fuzionáltató ágens (pl. polietilén-glikol) alkalmazásával myelomasejtekhez fuzionáljuk, miáltal hibridómasejteket kapunk [Goding: „Monoclonal Antibodies: Principles and Practice”, 59-103. old., Academic Press (1986)].

Az így létrehozott hibridómasejteket megfelelő – előnyösen a fuzionálatlan kiindulási myelomasejtek szaporodását és túlélését gátló egy vagy több anyagot tartalmazó – tenyésztő tápközegben szaporítjuk. Például, ha a kiindulási myelomasejtekből hiányzik a hipoxanthin guanin foszforibozil transzferáz enzim (HGPRT vagy HPRT), a hibridómák tenyésztésére rendszerint hipoxanthint, aminopterint és timidint tartalmazó tápközeget (HAT-tápközeg) alkalmazunk, amely gátolja a HGPRT-deficiens sejtek szaporodását.

A fuzionáltatásra előnyösen olyan myelomasejteket alkalmazunk, amelyek hatékonyan fuzionálhatók; elősegítik a kiválasztott antitest-termelő sejtek stabil és nagymértékű antitest-termelését; és valamely tápközegre (pl. HAT-tápközegre) érzékenyek. Ezek közül előnyösen egéreredetű myelomasejteket alkalmazunk; ilyenek például a MOPC-21 és M.C.-11 egértumorokból származó sejtvonalak (Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, Kalifornia, USA) és az SP-2 vagy X63-Ag8-653 sejtek (American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA). Humán monoklonális antitestek termelésére humán myelomasejtek és egér/humán heteromyelomasejtek alkalmazását is leírták [ld. Kozbor: J. Immunol. 133, 3001 (1984); Brodeur és mtsai.: Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications”, 51-63. old., Marcel Dekker, Inc., New York (1987)].

A tenyésztő tápközeget (amelyben a hibridómasejteket szaporítottuk) az antigén elleni monoklonális antitestek termelődésére teszteljük. A hibridómasejtek által termelt monoklonális antitestek kötési specifitását előnyösen immunprecipitációval vagy *in vitro* kötési teszttel – pl. radioimmun-teszttel (RIA) vagy enzimmötött immunszorbens vizsgálati eljárással (ELISA) – határozzuk meg.

A monoklonális antitest kötési affinitása, például, a Munson és mtsai. [Anal. Biochem. 107, 220 (1980)] által leírt Scatchard-analízissel határozható meg.

A kívánt specifitású, affinitású és/vagy aktivitású antitesteket termelő hibridómasejtek azonosítása után a klónokat limitáló hígítással szubklónozzhatjuk és szokványos eljárásokkal szaporíthatjuk [ld. Goding: „Monoclonal Antibodies: Principles and Practice”, 59-103. old. (Academic Press, 1986)]. Az e célra alkalmas tenyésztő tápközegek példái közé tartozik a D-MEM és az RPMI-1640 tápközeg. Más módon, a hibridómasejtek hasúri tumorokként állatokban *in vivo* is szaporíthatók.

A szubklónok által kiválasztott monoklonális antitesteket előnyösen hagyományos immunoglobulin-tisztítási technikák (pl. protein-A Sepharose, hidroxilapatit-kromatográfia, gélelektroforézis, dialízis vagy affinitási kromatográfia) alkalmazásával választjuk el a tenyésztő tápközegtől, hasúri folyadéktól vagy szérumtól.



A monoklonális antitesteket kódoló DNS-ek szokványos eljárásokkal egyszerűen izolálhatók és szekvenálhatók (pl. specifikusan az egéredetű antitestek nehéz, ill. könnyű láncát kódoló génekhez hibridizáló oligonukleotid-próbák alkalmazásával). Az ilyen DNS-ek előnyös forrásul hibridómasejtek szolgálnak. Izolálás után a DNS-t expressziós vektorokba inszertálhatjuk, és a vektorokkal gazdasejteket – pl. *E. coli* sejteket, majomeredetű COS-sejteket, kínai hőresőg petefészkek (CHO) sejteket vagy myelomasejteket (melyek egyébként immunglobulin-proteint nem termelnek) – transzfektálhatunk, miáltal a rekombináns gazdasejtekben monoklonális antitestek termelődését idézzük elő. Az antitestet kódoló DNS-t módosíthatjuk is, például, oly módon, hogy a humán nehéz és könnyű lánc konstans doménjeinek kódolószekvenciájával egéredetű antitestek homológ szekvenciáit helyettesítjük [ld. Morrison és mtsai.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 6851 (1984)], vagy az immunglobulin kódolószekvenciájához kovalens kötással egy nem immunglobulin-poliipeptid kódolószekvenciájának egészét vagy részét kapcsoljuk. Ezzel a módszerrel „kimérikus” vagy „hibrid” antitestek állíthatók elő, amelyek találmány szerinti anti-trkC monoklonális antitest kötőspecifitásával bírnak.

Az ilyen nem immunglobulin-poliipeptidekkel rendszerint a találmány szerinti antitestek konstans doménjeit helyettesítjük, vagy más módon, egy találmány szerinti antitest egy antigén-kombinálódási helyének variábilis doménjeit helyettesítjük velük, hogy olyan bivalens kiméra antitestet hozzunk létre, amely egy trk-receptorra specifikus antigén-kombinálódási helyet, valamint egy másik antigénre specifikus másik antigén-kombinálódási helyet tartalmaz.

Kimérikus vagy hibrid antitestek a szintetikus proteinkémiában ismert eljárások alkalmazásával (ideértve a keresztkötésképző reagensek alkalmazását), *in vitro* is előállíthatók. Például, diszulfid-kicserélődési reakció alkalmazásával vagy tioéter-kötés létrehozásával immunotoxinokat állíthatunk elő. Az e célra alkalmas reagensek jellemző példái közé tartozik az iminotiolát és metil-4-merkaptobutirimidát.

Az antitestek előállításának rekombináns módszereit az alábbiakban ismertetjük részletesen.

(iii) Humanizált antitestek

A humanizált antitest általában egy vagy több, nem humán forrásból származó aminosavat tartalmaz. Ezeket a nem humán aminosavakat gyakran „import” aminosavaknak nevezzük, melyek rendszerint egy „import” variábilis doménből származnak. Az antitestek humanizálását lényegében Winter és mtsai. eljárásával hajthatjuk végre [Jones és mtsai.: *Nature* **321**, 522 (1986); Riechmann és mtsai.: *Nature* **332**, 323 (1988); Verhoyen és mtsai.: *Science* **239**, 1534 (1988)], oly módon, hogy egy humán antitest megfelelő szekvenciáit rágszálóeredetű CDR-ekkel vagy CDR-szekvenciákkal helyettesítjük.

Ennek megfelelően, az ilyen „humanizált” antitestek kimérikus antitestek (Cabilly, ld. fentebb), amelyekben az antitest – teljes humán variábilis doménnél lényegesen kisebb – része van helyettesítve egy nem humán fajból származó, megfelelő szekvenciával. A gyakorlatban a humanizált antitestek rendszerint olyan humán antitestek, amelyekben a komplementaritást meghatározó régió néhány aminosava – és esetleg a vázrégió (FR) néhány aminosava – rágcslóeredetű antitestek analóg pozícióiból származó aminosavakkal van helyettesítve.

Lényeges, hogy az antitestek a humanizálást követően is megtartsák antigénre vonatkozó affinitásukat és egyéb kedvező biológiai tulajdonságaikat. Ennek érdekében, az egyik előnyös eljárás szerint, a humanizált antitesteket a kiindulási szekvenciák és a különböző lehetséges humanizált termékek – háromdimenziós modellek felhasználásával végzett – analízisát követően állítjuk elő. Az immunglobulinok háromdimenziós modelljei széles körben hozzáférhetők és szakember számára jól ismertek. Számítógépes programok állnak rendelkezésre a kiválasztott lehetséges immunglobulin-szekvenciák valószínű háromdimenziós konformációs struktúráinak illusztrálására és megjelenítésére. Az így megjelenített struktúrák tanulmányozása elősegíti az egyes aminosavaknak a lehetséges immunglobulin-szekvencia működésében betöltött szerepének vizsgálatát, azaz a lehetséges immunglobulin antigénhez kötődő képességét befolyásoló aminosavak vizsgálatát. Ezen a módon kiválaszthatók a vázrégió aminosavai, és a recipiens és import szekvenciákból úgy kombinálhatók, hogy a kívánt antitest-tulajdonságokat (pl. a célantigén(ek)re vonatkozó fokozott affinitást) kapjuk. A komplementaritást meghatározó régió aminosavai általában közvetlenül és jelentős mértékben játszanak szerepet az antigénkötés befolyásolásában. További részleteket illetően ld. a 07/934 373 számú egyesült államokbeli szabadalmi bejelentést (1992. augusztus 21.), amely a 07/715 272 számú szabadalmi bejelentésen (1991. június 14.) alapuló, részben folytatólagos bejelentés.

(iv) Humán antitestek

A humán monoklonális antitestek a hibridóma-eljárás alkalmazásával állíthatók elő. Humán monoklonális antitestek termeltetésére humán myeloma és egér/humán heteromyeloma sejtek alkalmazását is leírták [ld. például, Kozbor: J. Immunol. **133**, 3001 (1984); Brodeur és mtsai.: Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications”, 51-63. old., Marcel Dekker, Inc., New York (1987)].

Napjainkra lehetőség van olyan transzgenikus állatok (pl. egerek) létrehozására, amelyek immunizálást követően – endogén immunglobulin-termelődés nélkül – képesek a humán antitestek teljes repertoárjának termelésére. Például, leírták, hogy kimérikus és csíravonal-mutáns egerekben az antitest nehéz lánc kapcsolódási régiójának (J_H) génjében bekövetkezett homozigóta delécia az endogén antitest-termelődés teljes gátlását eredményezi. A humán csíravonal-eredetű immunglobulin-gének ilyen csíravonal-mutáns egerekbe történő bejuttatása –

antigén-stimulus hatására – humán antitestek termelődését eredményezi [ld. pl. Jakobovits és mtsai.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 2551 (1993); Jakobovits és mtsai.: Nature 362, 255 (1993)]

Mendez és mtsai. [Nature Genetics 15, 146 (1997)] tovább fejlesztették a technológiát, és „Xenoegér II” („*Xenomouse II*”) elnevezésű transzgenikus egérvonalat hoztak létre, amely – antigén-stimulus hatására – nagy affinitású, teljes egészében humán antitesteket termel. Ezt ezer kilobázis nagyságrendű humán nehéz lánc és könnyű lánc lokuszok – endogén J_H -szegmensben homozigóta deléció – egerekbe történő csírvonal-integrációjával valósították meg. A Xenoegér II 1020 kb-os – hozzávetőleg 66 V_H -gént, teljes D_H - és J_H -régiókat és három különböző konstans régiót (μ , δ és χ) tartalmazó – humán nehéz lánc lokuszt, valamint 800 kb-os – 32 V_k -gént, K_k -szegmenseket és C_k -géneket tartalmazó – humán κ -lokuszt hordoz. Az ilyen egerekben termelődő antitestek minden tekintetben hasonlóak az emberekben termelődőkhöz, ideértve a génátrendeződést, génösszerendeződést és repertoárt. Az egerekben az endogén J_H -szegmensben végrehajtott deléció (ami megakadályozza az egérlokuszban a génátrendeződést) következtében inkább a humán antitestek, és nem az endogén antitestek termelődnek.

Más módon, humán antitestek és antitest-fragmensek – immunizálatlan donorokból származó immunglobulin variábilis (V) domént kódoló gének készletéből történő – *in vitro* előállítására a McCafferty és mtsai. [Nature 348, 552 (1990)] által leírt fágfelületen való megjelenítési („fág-display”) technika is alkalmazható. E technika szerint antitest variábilis doménjeit kódoló géneket – azonos leolvasási fázisban – fonalas bakteriofág (pl. M13 vagy fd) nagy vagy kis burokprotein-génjébe klónoznak, és a fágreszcse felületén működőképes antitest-fragmenseket jelenítenek meg. Mivel a fonalas fágreszcse a fág genomjának egyszálú DNS-kópiáját tartalmazza, az antitest funkcionális tulajdonságain alapuló szelekció az e tulajdonságokat mutató antitestet kódoló gén kiválasztását eredményezi. Ilyenformán, a fág a BG-sejt bizonyos tulajdonságait utánozza. A fág-display való megjelenítési technika különböző formátumokban hajtható végre; összefoglaló áttekintést illetően ld. pl. Johnson és mtsai.: Current Opinion in Structural Biology 3, 564 (1993). E technikához a V-génszegmensek számos forrása alkalmazható. Clackson és mtsai. [Nature 352, 624 (1991)] immunizált egerek lépjéből származó V-gének kisméretű, random kombinatorikus könyvtárából anti-oxazolón antitestek diverz sorozatát izolálták. Lényegében Marks és mtsai. [J. Mol. Biol. 222, 581 (1991)] vagy Griffith és mtsai. [EMBO J. 12, 725 (1993)] által leírt eljárásokkal immunizálatlan emberekből származó V-gének repertoárja állítható elő, illetve antigének (köztük sajátantigének) diverz sorozata elleni antitestek izolálhatók. A természetes immunreakciók során az antitesteket kódoló gének nagy gyakoriságú mutációkat halmoznak fel (szomatikus hipermutáció). E változások némelyike nagyobb affinitást eredményez, és későbbi antigén-stimulus során elsősorban azok a B-sejtek sokszorozódnak és differenciálódnak, amelyek felületükön ilyen nagy affinitású felületi im-

immunglobulint hordoznak. Ez a természetes folyamat az ún. lánckombinálási („chain-shuffling”) technika [ld. Marks és mtsai.: *Bio/Technology* 10, 779 (1992)] alkalmazásával utánozható. A lánckombinálási eljárás során a fágfelületen való megjelenítési technikával azonosított „elsődleges” humán antitestek affinitása úgy javítható, hogy a nehéz és könnyű láncok V-régióit kódoló géneket egymás után – V-domén gének immunizálatlan donorokból származó, természetes változataival helyettesítjük. E technika nM nagyságrendbe tartozó affinitású antitestek és antitest-fragmensek előállítását teszi lehetővé. Waterhouse és mtsai. [*Nucl. Acids Res.* 21, 2265 (1993)] nagyon nagyméretű fágkönyvtárak (ún. „mother-of-all” könyvtárak) előállítási módszerét írták le, míg nagy affinitású humán antitest ilyen nagyméretű fágkönyvtárból történő izolálását Griffith és mtsai. [*EMBO J.* (1994), sajtó alatt] tárták fel. A génkombinálási technika humán antitestek rágsálóeredetű antitestekből történő leszármaztatására is alkalmazható, amikor is a humán antitest hasonló affinitású és specifitású, mint a kiindulási rágsálóeredetű antitest. Az eljárás (melyet „epitóp-imprinting”-nek is neveznek) rágsálóeredetű antitestek (fágon való megjelenítési technikával kapott) nehéz vagy könnyű lánc variábilis domén géneit humán variábilis doméneket kódoló génekkel helyettesítik, miáltal rágsáló/humán kimérák jönnek létre. Antigénnel végzett szelekció eredményeként működőképes antigénkötő hely helyreállítására képes humán variábilis domén izolálható, vagyis az epitóp irányítja a kötőpartner kiválasztását. Ha ezt az eljárást a maradék rágsálóeredetű variábilis domén helyettesítése céljából megismételjük, humán antitestet kapunk (ld. WO 93/06213 számú nemzetközi közzétételi irat). Ez az eljárás – ellentétben a rágsálóeredetű antitestek CDR-átültetéssel végzett hagyományos humanizálási technikájával – teljes mértékben humán antitesteket eredményez, melyek vázrégiójukban vagy komplementaritást meghatározó régióikban nem tartalmaznak rágsálóeredetű aminosavakat.

(v) Bispecifikus antitestek

A bispecifikus antitestek – előnyösen humán vagy humanizált – monoklonális antitestek, amelyek legalább két különböző antigénre mutatnak kötési specifitást. A találmány szerinti bispecifikus antitestek esetében az egyik kötési specifitás a trkC-receptorra irányul, ami agonista aktivitású antitestet eredményez, a másik kötési specifitás pedig tetszőleges antigénre (előnyösen egy másik receptorra vagy receptor-alegységre) irányul.

A bispecifikus antitestek előállítási eljárásai szakember számára jól ismertek. A bispecifikus antitestek szokványos előállítási módja két immunglobulin nehéz lánc/könnyű lánc pár együttes expresszálatásán alapul, ahol is a két lánc különböző specifitású [ld. Millstein és Cuello: *Nature* 305, 537 (1983)]. Az immunglobulin nehéz és könnyű láncainak véletlenszerű összetételű készletei miatt e hibridómák (kvadrómák) potenciálisan tíz különböző antitest-molekula elegyét tartalmazzák, melyek közül csupán egy rendelkezik a megfelelő bispecifikus



szerkezettel. A megfelelő molekula – általában affinitási kromatográfiával végzett – tisztítása igen munkaigényes, és a kitermelési százaléka is alacsony. Hasonló eljárások leírását illetően ld. a WO 93/08829 számú nemzetközi közzétételi iratot, valamint Traunecker és mtsai.: EMBO J. 10, 3655 (1991).

Egy másik – és előnyösebb – megközelítési mód szerint az antitestek kívánt kötési specifikus variábilis doménjeit (antitest-antigén kombinálódási helyek) immunglobulin konstans domén szekvenciáihoz fuzionáljuk. A fúziót előnyösen egy immunglobulin nehéz lánc konstans doménjével valósítjuk meg, amely legalább a csukló-, CH2- és CH3-régió részét tartalmazza. Előnyös, ha a konstans domén tartalmazza – a könnyű lánchoz történő kötődéshez szükséges helyet magában foglaló – első nehéz lánc konstans régiót (CH1). Az immunglobulin nehéz lánc fúziókat – és kívánt esetben az immunglobulin nehéz láncot – kódoló DNS-eket külön expressziós vektorokba inszertáljuk, és azokat együttesen megfelelő gazdaorganizmusba transzfektáljuk. Ez nagy rugalmasságot biztosít a három polipeptid relatív arányának beállításában, azon megvalósítási módokban, ahol az optimális hozam elérése érdekében a konstrukcióban a három különböző polipeptid-láncot nem azonos arányokban alkalmazzuk. Mindazonáltal, lehetőség van arra is, hogy két vagy mindhárom polipeptid-lánc kódolószekvenciáját egyazon expressziós vektorba inszertáljuk (olyan esetekben, ha legalább két polipeptid-lánc azonos arányban történő expressziója eredményezi a nagy hozamot vagy ha a láncok relatív arányának nincs különösebb jelentősége). E megoldás egy előnyös megvalósítási módja értelmében a bispecifikus antitestek – az egyik karon – hibrid immunglobulin nehéz láncból (első kötő-specifikitással) és – a másik karon – egy hibrid immunglobulin nehéz lánc/könnyű lánc párból (második kötő-specifikitással) állnak. Azt találtuk, hogy ez az asszimmetrikus struktúra elősegíti a kívánt bispecifikus vegyület nem kívánatos immunglobulin-lánckombinációktól történő elválasztását, mivel az immunglobulin könnyű láncnak a bispecifikus molekula csupán egyik felében való jelenléte egyszerű elkülönítést tesz lehetővé. E megoldás leírását illetően ld. a WO 94/04690 számú nemzetközi közzétételi iratot (közzététel napja: 1994. március 3.).

A bispecifikus antitestek előállításának további részleteit ld. pl. Suresh és mtsai.: Methods in Enzymology 121, 210 (1986).

(vi) Heterokonjugált antitestek

A találmány oltalmi köréhez tartoznak a heterokonjugált antitestek is, amelyek két – egymáshoz kovalens kötéssel kapcsolódó – antitestből állnak. Az ilyen antitestek alkalmazását, például, az immunrendszer sejtjeinek nem kívánatos sejtek elleni célbajuttatására (ld. a 4 676 980 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírást) és HIV-fertőzés kezelésére javasolták (WO 91/00360 és WO 92/200373 számú nemzetközi közzétételi irat és EP03089 számú európai szabadalmi leírás). A heterokonjugált antitestek bármely alkalmas keresztkötés-képző eljárással

előállíthatók. Az ilyen célra megfelelő keresztkötés-képző ágensek jól ismertek (leírásukat illetően – különféle keresztkötési technikákkal együtt – ld. a 4 676 980 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírást).

(vii) Antitest-fragmensek

A találmány bizonyos megvalósítási módjai értelmében az anti-trkC antitest (ideértve az egéreredetű, humán és humanizált antitesteket és antitest-változatokat) egy antitest-fragmens. Az antitest-fragmensek előállítására különféle technikákat fejlesztettek ki. Ezek a fragmensek hagyományosan intakt antitestek proteolitikus emésztésével hozhatók létre [ld. pl. Morimoto és mtsai.: *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* **24**, 107 (1992); és Brennan és mtsai.: *Science* **229**, 81 (1985)], azonban ezek a fragmensek rekombináns gazdasejtek alkalmazásával közvetlenül is előállíthatók. Például, a Fab'-SH fragmensek *E. coli*-ból közvetlenül kinyerhetők, és kémiai kapcsolással F(ab')₂-fragmensekké alakíthatók [ld. Carter és mtsai.: *Bio/Technology* **10**, 163 (1992)]. Egy másik megvalósítási mód értelmében a F(ab')₂-fragmensek – a F(ab')₂-molekula összeállításának elősegítése érdekében – GNC4 leucin-cipzár alkalmazásával hozhatók létre. Egy másik lehetőség szerint az Fv-, Fab- vagy F(ab')₂-fragmensek rekombináns gazdasejt-tenyésztéssel közvetlenül izolálhatók. Az antitest-fragmensek előállításának egyéb technikái szakember számára jól ismertek.

(viii) Az antitestek aminosav-szekvencia változatai

Az anti-trkC antitestek aminosav-szekvencia változatai az anti-trkC antitest DNS-ében megfelelő nukleotid-módosítások beiktatásával, illetve peptidszintézissel hozhatók létre. Az ilyen változatok közé tartoznak, például, a példákban ismertetett anti-trkC antitestek aminosav-szekvenciáját érintő deléciók és/vagy inszerciók és/vagy szubsztitúciók. A végső konstrukció létrehozása céljából a deléciók, inszerciók és szubsztitúciók bármely kombinációja alkalmazható, feltéve, hogy a végtermék a kívánt tulajdonságokkal bír. Az aminosav-változtatások módosíthatják a humanizált anti-trkC antitest vagy antitest-változat poszt-transzlációs érési folyamatait is (pl. a glikozilációs helyek számának vagy pozíciójának változtatásával).

Az anti-trkC antitest – mutagenézis helyszíneként előnyös – aminosavai vagy régiói azonosításának egyik hasznos eljárása az „alanin-pásztázási mutagenézis” („*alanine scanning mutagenesis*”) néven ismert technika [ld. Cunningham és Wells: *Science* **244**, 1081 (1989)]. Ezen eljárás szerint azonosítunk egy aminosavat vagy célaminosavak csoportját (pl. töltéssel bíró aminosavak, pl. Arg, Asp, His, Lys és Glu), és ez(ek)e(t) semleges vagy negatív töltésű aminosavval (legelőnyösebben alaninnal vagy polialaninnal) helyettesítjük, abból a célból, hogy befolyásoljuk az aminosavak és a trkC-antigén közötti kölcsönhatást. A szubsztitúcióra funkcionális érzékenységet mutató aminosav-pozíciók meghatározását ezután úgy finomíthatjuk, hogy a szubsztitúció helyén vagy annak közelében újabb vagy egyéb mutációkat hozunk létre. Ilyen-

formán, bár az aminosav-módosítások helye előre meghatározott, a mutáció természete önmagában nem előre meghatározott. Például, az adott helyen végrehajtott mutáció eredményének vizsgálata céljából a célkodonnál vagy célrégióban alanin-pasztázást vagy random mutagenézist végzünk, és az expresszált anti-trkC antitest-változatokat a kívánt aktivitásra szelektáljuk.

Az aminosav-szekvencia inszerciói lehetnek N- és/vagy C-terminális fúziók, amelyek egy aminosavtól száz vagy még több aminosav hosszúságig terjedő polipeptid aminosav-szekvenciához történő hozzákapcsolását jelentik, illetve egy vagy több aminosavas, szekvencián belüli inszerciók lehetnek. A terminális inszerciók példái közé tartoznak az N-terminális metionint tartalmazó anti-trkC antitestek, a citotoxikus polipeptidhez fuzionált antitestek, továbbá az antitest N- vagy C-terminálisának enzimhez vagy olyan polipeptidhez történő fuzionálása, amely fokozza az antitest vérsavóban mérhető felezési idejét (ld. lentebb).

Az aminosav-szekvencia változatok egy másik típusát képezik az aminosav-szubsztitúciós változatok. Az ilyen változatok esetében az anti-trkC antitest-molekula legalább egy aminosava egy másik aminosavval van helyettesítve. Az antitest szubsztitúciós mutagenézisének legnagyobb jelentőségű pontjai a hipervariábilis régiók, de a vázrégióban végrehajtott szubsztitúciók is jelentős hatásúak lehetnek. A konzervatív szubsztitúciókat az 1. táblázat „előnyös szubsztitúciók” oszlopában mutatjuk be. Ha ezek a helyettesítések a biológiai aktivitás megváltozását eredményezik, úgy további, jelentősebb szubsztitúciós módosításokat végezhetünk, melyeket az 1. táblázat „lehetséges szubsztitúciók” oszlopában (illetve, később, az aminosavak csoportosítása kapcsán) mutatunk be, és az így létrehozott változatokat szkrinéljük.

1. táblázat

Eredeti aminosav	Lehetséges szubsztitúciók	Előnyös szubsztitúciók
Ala (A)	Val, Leu, Ile	Val
Arg (R)	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn (N)	Gln, His, Asp, Lys, Arg	Gln
Asp (D)	Glu, Asn	Glu
Cys (C)	Ser, Ala	Ser
Gln (Q)	Asn, Glu	Asn
Glu (E)	Asp, Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile (I)	Leu, Val, Met, Ala, Phe, norleucin	Leu
Leu (L)	Norleucin, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys (K)	Arg, Gln, Asn	Arg

I. táblázat (folytatás)

Eredeti aminosav	Lehetséges szubsztitúciók	Előnyös szubsztitúciók
Met (M)	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe (F)	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr, Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val (V)	Ile, Leu, Met, Phe, Ala, norleucin	Leu

Az antitestek biológiai tulajdonságai szempontjából lényeges módosítások úgy valósíthatók meg, hogy kiválasztjuk azokat a szubsztitúciókat, amelyek a következők tekintetében jelentős mértékben különböznek az eredeti aminosavtól: (a) a szubsztitúció közelében a polipeptid-váz szerkezetének fenntartásában (pl. redős vagy helikális konformáció); (b) a molekula célhelyén a töltés és hidrofobitás fenntartásában; vagy (c) az oldallánc fizikai kiterjedésének fenntartásában. A természetben előforduló aminosavakat – oldalláncaik tulajdonságai alapján – a következő csoportokba soroljuk:

- (1) hidrofób: norleucin, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) semleges, hidrofil: Cys, Ser, Thr;
- (3) savas: Asp, Glu;
- (4) bázisos: Asn, Gln, His, Lys, Arg;
- (5) láncorientációt befolyásoló aminosavak: Gly, Pro;
- (6) aromás: Trp, Tyr, Phe.

A nem konzervatív szubsztitúció azt jelenti, hogy az egyik csoportba tartozó aminosav egy másik csoportba tartozó aminosavval van helyettesítve.

A humanizált vagy módosított anti-trkC antitest pontos konformációjának fenntartásában szerepet nem játszó ciszteinek szintén helyettesíthetők (általában szerinnel), ami növeli a molekula oxidatív stabilitását, és megakadályozza a rendellenes keresztkötés-képzést. Ezzel szemben, az antitest stabilitásának növelése érdekében cisztein-kötések iktathatók be (különösen, ha az antitest egy antitest-fragmens, pl. Fv-fragmens).

A szubsztitúciós változatok egy különösen előnyös típusa az eredeti antitest (pl. humanizált vagy humán antitest) hipervariábilis régiója egy vagy több aminosavának szubsztitúcióját foglalja magában. A további javításra kiválasztott változat(ok) az eredeti antitesthez képest javított biológiai tulajdonságú(ak) lesz(nek). Az ilyen szubsztitúciós változatok létrehozásának

egyik alkalmas módja a fágfelületen történő megjelenítéssel végzett affinitás-fejlesztés. Röviden összefoglalva; a hipervariábilis régió több helyén (pl. 6-7 helyen) mutagenezist végzünk, hogy mindegyik helyen valamennyi lehetséges aminosav-szubsztitúciót létrehozunk. Az így kapott többértékű antitesteket külön-külön, fonalas fágreszececskéken az M13 – fágreszececskébe csomagolt – III. géntermékével képzett fúziós proteinekként jelenítjük meg. A fágon megjelenített változatokat biológiai aktivitásukra (pl. kötési affinitásukra) teszteljük. A hipervariábilis régió módosításra alkalmas helyeinek azonosítása céljából alanin-pásztaázasi mutagenezist végezhetünk, amellyel meghatározható, hogy a hipervariábilis régió mely aminosavai járulnak hozzá jelentős mértékben az antigénkötéshez. Más módon, vagy emellett, az antitest és a humán trkC közötti érintkezési pontok azonosítása céljából előnyös lehet az antigén-antitest komplex kristályszerkezetének vizsgálata. Az ilyen érintkezési (kontakt) aminosavak és az ezekkel szomszédos aminosavak a szóban forgó technikával végzett szubsztitúcióra kiszemelt aminosavakat reprezentálják. Az ilyen változatok létrehozása után a változatok sorozatát az itt ismertetett módon szkríneljük, és további fejlesztésre az egy vagy több releváns tesztben kimagasló tulajdonságúnak bizonyuló antitesteket választjuk ki.

(ix) Glikozilációs antitest-változatok

Az antitestek konstans régióik konzervált pozícióiban vannak glikozilálva [Jefferis és Lund: *Chem. Immunol.* **65**, 111 (1997); Wright és Morrison: *TibTECH* **15**, 26 (1997)]. Az immunoglobulinok oligoszacharid-oldalláncai befolyásolják a protein funkcióját [Boyd és mtsai.: *Mol. Immunol.* **32**, 1311 (1996); Wittwe és Howard: *Biochem.* **29**, 4175 (1990)] és a glikoprotein részletei közötti intramolekuláris interakciót, ami képes a glikoprotein konformációjának és háromdimenziós felületének módosítására [Hefferis és Lund, *Id. fentebb*; Wyss és Wagner: *Current Opin. Biotech.* **7**, 409 (1996)]. Ezenfelül, az oligoszacharidok elősegíthetik egy adott glikoprotein bizonyos molekulákhoz – - specifikus felismerési struktúrák alapján – - történő célbajuttatását is. Például, leírták, hogy az agalaktozilált IgG-ben az oligoszacharid-gyökök „kiugrik” a CH₂ közötti térből, és terminális N-acetil-glükózamin-gyökök válnak szabadddá a mannoz-kötő proteinhez történő kapcsolódásra [Malhotra és mtsai.: *Nature Med.* **1**, 237 (1995)]. A CHO-sejtekben termeltetett CAMPATH-1H (amely a humán limfociták CDw52-antigénjét felismerő, rekombináns humanizált egérszárú monoklonális IgG1-antitest) oligoszacharidjainak glikopeptidázos eltávolítása a komplement-közvetítette lízis (CMCL) teljes eliminálását eredményezte [Boyd és mtsai.: *Mol. Immunol.* **32**, 1311 (1996)], míg a szialinsav-gyökök neuraminidázal végzett szelektív eltávolítása nem okozta a CMCL megszűnését. Leírták továbbá, hogy az antitestek hatással van az antitest-dependens celluláris citotoxicitásra (ADCC) is. A $\beta(1,4)$ -N-acetil-glükózaminil-transzferáz-III (GnTIII; elágazó GlcNAc képződését katalizáló glikoziltranszferáz) tetraciklin-szabályozta termelődésével jel-



lemezhető CHO-sejtekről leírták, hogy javított ADCC-aktivitást mutatnak [ld. Umana és mtsai.: *Mature Biotech.* 17, 176 (1999)].

Az antitestek glikozilációs változatai olyan változatok, amelyekben az antitest glikozilációs mintázata módosítva van. A módosításon az antitest egy vagy több szénhidrát-gyökének delécióját, egy vagy több szénhidrát-gyök antitesthez történő kapcsolását, a glikoziláció összetételének (glikozilációs mintázat) módosítását, a glikoziláció mértékének megváltoztatását és hasonlókat értünk. A glikozilációs változatok, például, az antitestet kódoló nukleinsav-szekvencia egy vagy több glikozilációs helyének eltávolításával, módosításával és/vagy addíciójával hozhatók létre.

Az antitestek glikozilációja jellemzően N- vagy O-kötésű. Az „N-kötésű” azt jelenti, hogy a szénhidrát-gyök egy aszparaginsav oldalláncához kapcsolódik. A szénhidrát-gyök aszparagin-oldalláncához történő enzimátikus kapcsolásának felismerési helyétől az aszparagin-X-szerin és aszparagin-X-treonin tripeptid-szekvenciák (amelyekben „X” jelentése – a prolin kivételével – tetszőleges aminosav) szolgálnak. Ilyenformán, az antitestekben az ilyen tripeptid-szekvenciák jelenléte potenciális glikozilációs helyet teremt. Az „O-kötésű” glikoziláció azt jelenti, hogy N-acetil-galaktózamin, galaktóz vagy xilóz valamelyike hidroxiaminosavhoz (többnyire szerinhez vagy treoninhez) kötődik, bár 5-hidroxiprolin vagy 5-hidroxilizin is alkalmazható.

A glikozilációs helyek antitesthez történő hozzáadását az aminosav-szekvencia módosításával hajthatjuk végre, oly módon, hogy az (N-kötésű glikozilációs helyek létrehozása céljából) a fentebb említett tripeptid-szekvenciák közül egyet vagy többet tartalmazzon, illetve – O-kötésű glikozilációs helyek létrehozása érdekében – az eredeti antitest szekvenciájában egy vagy több szerin vagy treonin addícióját vagy szubsztitúcióját hajtjuk végre.

Az anti-trkC antitest aminosav-szekvencia változatait kódoló nukleinsav-molekulák különféle, szakember számára jól ismert eljárásokkal állítható elő. Az ilyen módszerek közé tartozik, többek között, a természetes forrásból történő izolálás (természetben előforduló aminosav-szekvencia változatok esetében), valamint az anti-trkC antitest korábban előállított, variáns vagy nem variáns változatának oligonukleotid-közvetítette (vagy helyspecifikus) mutagenézise, PCR-mutagenézise vagy kazetta-mutagenézise.

Az antitestek glikozilációja (glikozilációs mintázata) a kódoló nukleotidszekvencia módosítása nélkül is megváltoztatható. A glikoziláció nagyrészt az antitest termeltetésére alkalmazott gazdasejtől függ. Mivel a rekombináns glikoproteinek (pl. antitestek, mint potenciális gyógyszerek) termeltetésére alkalmazott sejtek ritkán natív típusúak, az antitestek glikozilációs mintázatának jelentős változékonyságára számíthatunk [ld. pl. Hse és mtsai.: *J. Biol. Chem.* 272, 9062 (1997)]. Az antitestek rekombináns módszerekkel végzett termeltetése során a glikozilációt befolyásoló tényezők közé tartozik – a gazdasejtek kiválasztása mellett – a

sejttenyésztés módja, az alkalmazott tápközeg összetétele, a tenyészet sejtsűrűsége, oxigénellátottsága, pH-ja, az alkalmazott tisztítási módszer, stb. Az egy adott gazdaszervezetben elért glikozilációs mintázat módosítására különféle eljárásokat dolgoztak ki, melyek egyik példája az oligoszacharid-termelésben szerepet játszó bizonyos enzimek gazdasajtbe történő bejuttatása, illetve túlzott mértékű termeltetése [ld. az 5 047 335, 5 510 261 és 5 278 299 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírásokat]. A glikoziláltság (illetve bizonyos glikoziláltsági típusok) a glikoprotein enzimátikus emésztésével – pl. endoglikozidáz-H (Endo-H) alkalmazásával – megszüntethető, vagy más módon, a rekombináns gazdasajt génsebészeti módszerekkel manipulálható (pl. bizonyos típusú poliszacharidok érési folyamatában defektusok beiktatásával). Ezen és hasonló technikák szakember számára jól ismertek.

Az antitestek glikozilációs szerkezete szokványos szénhidrát-analízises módszerekkel egyszerűen vizsgálható. E módszerek jellemző példái a következők: lektin-kromatográfia, NMR, tömegspektrometria, HPLC, GPC, monoszacharid-összetétel analízis, szekvenciális enzimátikus emésztés és HPAEC-PAD, amelyben az oligoszacharidok töltésen alapuló elválasztására nagy pH-jú anioncserélő-kromatográfiát alkalmazunk. Az oligoszacharidok analitikai célokra történő felszabadításának módszerei szintén ismeretesek; ide tartozik, többek között, az enzimátikus kezelés (általában peptid-N-glikozidáz-F/endo- β -galaktozidáz alkalmazásával végrehajtva), főként az O-kötésű struktúrák felszabadítása céljából erősen lúgos feltételek mellett végzett elimináció, valamint vízmentes hidrazinnal végzett kémiai eljárások (N- és O-kötésű oligoszacharidok felszabadítására).

(x) Az antitestek egyéb módosításai

A találmány szerinti anti-trkC antitestek immunliposzómák alakjában is készítménybe foglalhatók. Az antitestet tartalmazó liposzómák ismert eljárások alkalmazásával állíthatók elő [ld. pl. Epstein és mtsai.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA **82**, 3688 (1985); Hwang és mtsai.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA **77**, 4030 (1980); 4 485 045 és 4 544 545 számú Egyesült Államok-beli szabadalmi leírás; és WO 97/38731 számú nemzetközi közzétételi irat]. Az 5 013 556 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírásban olyan liposzómákat tártak fel, amelyek a keringésben fokozott felezési időt mutatnak.

A különösen hasznos liposzómák – foszfatidil-kolint, koleszterint és PEG-gel derivatizált foszfatidil-etanol-amint (PEG-PE) tartalmazó – lipidkészítmény alkalmazásával végzett reverz fázisú bepárlási eljárással állíthatók elő. A liposzómákat meghatározott pórusméretű szűrőn átpasszírozva kívánt átmérőjű liposzómákat hozhatunk létre. A találmány szerinti antitest Fab'-fragmensei diszulfid-cserés reakcióval, Martin és mtsai. leírása szerint [J. Biol. Chem. **257**, 286 (1982)] konjugálhatók a liposzómákhoz. A liposzómák adott esetben kemoterápiás hatóanyagot is tartalmazhatnak [ld. Gabizon és mtsai.: J. National Cancer Inst. **81**(19),

1484 (1989)].

A találmány szerinti antitest ADEPT-terápiában is alkalmazható, oly módon, hogy az antitestet pro-drog-aktiváló enzimmal konjugáljuk, mely enzim a pro-drogot (pl. kemoterápiás peptidil-hatóanyagot, ld. WO 81/01145 számú nemzetközi közzétételi irat) aktív rákellenes hatóanyaggá alakítja át (ld. pl. WO 88/07378 számú nemzetközi közzétételi irat és 4 975 278 számú Egyesült Államok-beli szabadalmi leírás).

Az ADEPT-terápiában alkalmazható immunkonjugátum enzimkomponenseként bármely olyan enzim felhasználható, amely egy pro-drogot aktív citotoxikus alakjává képes alakítani.

A találmány szerinti eljárásban alkalmazható enzimek közé tartoznak, többek között, a foszfát-tartalmú pro-drogokat szabad hatóanyaggá alakító alkalikus foszfatazok; a szulfát-tartalmú pro-drogokat szabad hatóanyaggá alakító aril-szulfatazok; a nem toxikus 5-fluorocitozin rákellenes hatóanyaggá (5-fluoruracillá) történő átalakítására képes citozin dezamináz; a peptidtartalmú pro-drogok szabad hatóanyaggá történő átalakítására képes proteázok [pl. *Serratia*-eredetű proteáz, termolizin, szubtilizin, karboxipeptidázok és cathepinek (cathepsin-B és -L)]; a D-aminosav-szubsztituenseket tartalmazó pro-drogok átalakítására képes D-alanil-karboxipeptidázok; a glikozilált pro-drogok szabad hatóanyaggá történő átalakítására képes szénhidrát-hasító enzimek, mint pl. a β -galaktozidáz és a neuraminidáz; a β -laktámokkal derivatizált hatóanyagok szabad hatóanyaggá történő átalakítására képes β -laktamáz; valamint az amin-nitrogénatomjukon fenoxi-acetil- vagy fenil-acetil-csoporttal derivatizált hatóanyagok szabad hatóanyaggá történő átalakítására képes penicillin-amidázok (pl. penicillin-V-amidáz, illetve penicillin-G-amidáz). Más módon, az enzimatis aktivitású antitestek („abzimék”) szintén felhasználhatók a találmány szerinti pro-drogok aktív hatóanyaggá történő átalakítására [Massey: *Nature* 328, 457 (1987)]. Az antitest-abzim konjugátumok a leírásban az „abzimék” tumorsejtekhez történő célbajuttatásával kapcsolatban ismertetett módon állíthatók elő.

A találmány szerinti enzimek jól ismert eljárásokkal (pl. a fentebb említett, heterodifunkciós kereszkötés-képző reagensek alkalmazásával), kovalens kötéssel kapcsolhatók az antitest-mutánsokhoz. Más lehetőség szerint, az olyan fúziós proteinek, amelyek a találmány szerinti antitestnek legalább az antigénkötő régióját egy találmány szerinti enzim legalább egy funkcionálisan aktív részéhez kapcsolva tartalmazzák, jól ismert rekombinációs DNS-technikák alkalmazásával állíthatók elő [Neuberger és mtsai.: *Nature* 312, 604-608 (1984)].

A találmány bizonyos megvalósítási módjaiban teljes antitest helyet antitest-fragmens alkalmazása lehet előnyös. Ilyen esetekben szükség lehet az antitest-fragmens szérumban mérhető felezési idejének növelésére. Ennek megvalósítása céljából az antitest-fragmensbe ún. „salvage-receptor-kötő epitópot” („salvage receptor binding epitope”) építhetünk be [például, az antitest-fragmens megfelelő régiójának mutagenézisével vagy az epitópot egy peptid-

toldalékba („tag”) építve, amelyet azután az antitest-fragmenshez (annak bármelyik végéhez vagy közepéhez) fuzionáltatunk, pl. DNS- vagy peptidszintézissel; ld. WO 96/32478 számú nemzetközi közzétételi irat (1996. október 17.)].

A salvage-receptor-kötő epitóp általában olyan régiót képez, amelyben az Fc-domén egy vagy két hurokjából származó egy vagy több aminosav (előnyösebben az Fc-domén egy vagy két hurokjából származó három vagy több aminosav) az antitest-fragmens egy hasonló pozíciójába van áthelyezve. Még előnyösebben az epitóp, például, egy IgG Fc-régiójának CH2-doméjéből származik, és az antitest CH1-, CH3- vagy V_H- régiójába (vagy több ilyen régióba) van áthelyezve. Más módon, az epitóp az Fc-régió CH2-doménjéből származik, és az antitest-fragmens C_L- régiójába, V_L- régiójába (vagy mindkettőbe) van áthelyezve.

A humanizált anti-trkC antitestek vagy módosított anti-trkC antitest-változatok (ideértve a glikozilációs változatokat) kovalens módosításai szintén a találmány oltalmi körébe tartoznak. A kovalens módosítású változatok kémiai szintézissel vagy az antitest enzimátikus vagy kémiai hasításával állíthatók el. Az antitest kovalens módosításainak egyéb típusainak végrehajtása céljából az antitest kiválasztott aminosavait szerves derivatizáló reagenssel reagáltatjuk, amely képes a kiválasztott oldalláncokkal vagy N- vagy C-terminális aminosavakkal reagálni. A polipeptidek jellemző kovalens módosításait az 5 534 615 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírásban tárták fel (melyet teljes terjedelmében a kitanítás részének tekintünk). Az antitestek kovalens módosításainak előnyös típusa az antitest nem protein jellegű polimerhez (pl. polietilén-glikolhoz, polipropilén-glikolhoz vagy polioxialkilénekhez) történő kapcsolását foglalja magában, ami a 4 640 835, 4 496 689, 4 301 144, 4 670 417, 4 791 192 vagy 4 179 337 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírásokban feltárt módon hajtható végre.

2) Vektorok, gazdasejtek és rekombináns eljárások

Szintén a találmány tárgyát képezik a találmány szerinti nem humán (pl. egérszervi) és humán anti-trkC antitesteket (ideértve a nem humán antitestek humanizált változatait) kódoló izolált nukleinsavak, az ilyen nukleinsavakat hordozó vektorok és gazdasejtek, valamint rekombináns eljárások az antitestek előállítására.

Egy antitest rekombináns módszerekkel történő előállítása céljából az antitestet kódoló nukleinsavat izoláljuk, majd – további klónozás (DNS-amplifikálás) vagy expresszáltatás érdekében – replikációra képes vektorba inszertáljuk. Egy másik megvalósítási mód szerint az antitestet homológ rekombináció alkalmazásával, például, az 5 204 244 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírásban (melyet teljes terjedelmében a kitanítás részének tekintünk) feltárt módon állítjuk elő. A monoklonális antitestet kódoló DNS szokványos eljárásokkal (pl. az antitest nehéz és könnyű láncait kódoló génekhez specifikusan kötődő oligonukleotid-próbák alkalmazásával) egyszerűen izolálható és szekvenálható. Az inszertálásra számos vektor alkalmas; az

ilyen vektorok általában, többek között, a következő vektorkomponensek közül egyet vagy többet is tartalmazhatnak: szignálszekvencia, replikációs kezdőhely, egy vagy több markergén, erősítőszekvencia, promóter és transzkripció terminációs szekvencia [ld. pl. az 5 534 615 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírást (1996. július 9.), melyet teljes terjedelmében a kitartás részének tekintünk).

A vektorokba foglalt DNS klónozására vagy expresszáltatására alkalmas gazdasejtek a fentebb leírt prokarióta, élesztő- és magasabb rendű eukarióta sejtek. Az e célra alkalmas prokarióta sejtek közé Gram-negatív és Gram-pozitív baktériumok tartoznak, mint pl. az bélbaktériumok (*Enterobacteriaceae*), pl. *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella* (pl. *Salmonella typhimurium*), *Serratia* (pl. *Serratia marcescens*), *Shigella*, valamint a *Bacillus* fajok (pl. *Bacillus subtilis* és *B. licheniformis*) [a *B. licheniformis* 41P-törzs leírását ld. a DD 266 710 számú (1989. április 12-én közzétett) szabadalmi leírásban], *Pseudomonas* fajok (pl. *P. aeruginosa*) és *Streptomyces* fajok. A találmány szerinti megoldás szempontjából egyik előnyös *E. coli* klónozó törzs az *E. coli* 294-es törzs (ATCC 31446), de egyéb *E. coli* törzsek is alkalmazhatók, így pl. az *E. coli* B-törzs, *E. coli* X1776-törzs (ATCC 31537) és *E. coli* W3110-törzs (ATCC 27325). A felsorolt példák inkább szemléltető jellegűek, ami nem jelenti azt, hogy az alkalmazható törzsek csupán ezekre korlátozódnának.

Az anti-trkC antitestet kódoló DNS-t hordozó vektorok klónozó vagy expressziós gazdasejtjeiként – a prokariótákon kívül – eukarióta mikroorganizmusok, így pl. fonalas gombák és élesztők is alkalmasak. Az alacsonyabb rendű mikroorganizmusok közül a *Saccharomyces cerevisiae* (sütőélesztő) a legáltalánosabban alkalmazott gazdasejt, a találmány szerinti megoldás gyakorlati kivitelezésére azonban számos egyéb faj, nemzetség és törzs is alkalmas, melyek példái a következők: *Schizosaccharomyces pombe*; *Kluyveromyces* fajok, pl. *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12424), *K. bulgaricus* (ATCC 16045), *K. wickerhamii* (ATCC 24178), *K. waltii* (ATCC 56500); *K. drosophilae* (ATCC 36906), *K. thermotolerans* és *K. marxianus*; *Yarrowia* (EP 402 226); *Pichia pastoris* (EP 183 070); *Candida*; *Trichoderma reesei* (EP 244 234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces* fajok, pl. *Schwanniomyces occidentalis*; és fonalas gombák, pl. *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium* és *Aspergillus* fajok, pl. *A. nidulans* és *A. niger*.

A glikozilált anti-trkC antitestek expresszáltatására soksejtű organizmusokból származó gazdasejtek alkalmasak. A gerinctelenekből származó sejtek példáulként növényi sejtek és rovarsejtek emlithetők. Számos baculovírus törzset és változatot (illetve ezekkel fertőzhető rovarsejteket) azonosítottak; ilyen pl. a *Spodoptera frugiperda* (hernyó), *Aedes aegypti* (szúnyog), *Aedes albopictus* (szúnyog), *Drosophila melanogaster* (gyümölcslégy) és *Bombix mori*. Számos transzfekcióra alkalmas vírustörzs ismeretes, mint pl. az *Autographa californica* NPV L-1-változata és a *Bombyx mori* NPV Bm-5-törzse, és az ilyen vírusok találmány szerinti vírusként,

elsősorban *Spodoptera frugiperda* sejtek transzfektálására alkalmazhatók. Gazdasejtként növényi sejtek (pl. gyapot, kukorica, burgonya, szójabab, petúnia, paradicsom és dohánynövény sejtek) tenyésztési is alkalmazhatók.

Mindazonáltal, legnagyobb érdeklődés a gerincesekből származó sejtekre irányult, és gerinceseredetű sejtek tenyésztésben (szövettenyésztésben) történő szaporítása rutinszerű eljárásá vált. Az emlőseredetű gazdasejt-vonalak példáulként a következők említhetők: SV40-vírussal transzformált majomvese CV1-vonal (COS-7, ATCC CRL 1651); humán embrionális vesesejtvonal [293-as sejtek vagy szuszpenzió-tenyésztésben végzett szaporításhoz szubklónozott 293-as sejtek; Graham és mtsai.: J. Gen. Virol. 36, 59 (1977)]; újszülött hörcsög vesesejtek (BHK; ATCC CCL 10); Kínai hörcsög petefészek-sejtek/-DHFR [CHO; Urlaub és mtsai.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 4216 (1980)]; egéreredetű Sertoli-sejtek (TM4; Mather: Biol. Reprod. 23, 243 (1980)]; majomvese-sejtek (CV1; ATCC CCL 70); Afrikai zöldmajom vesesejtek (VERO-76; ATCC CRL-1587); humán méhnyakrák-carcinoma sejtek (HeLa; ATCC CCL 2); kutyavesse-sejtek (MDCK; ATCC CCL 34); Buffalo-patkány májsejtek (BRL 3A; ATCC CRL 1442); humán tüdősejtek (W138; ATCC CCL 75); humán májsejtek (Hep G2; HB 8065); egér emlőtumorsejtek (MMT 060562; ATCC CCL51); TRI-sejtek [Mather és mtsai.: Annals N.Y. Acad. Sci. 383, 44 (1982)]; MRC-5-sejtek; és FS4-sejtek.

A gazdasejteket a fentebb leírt expressziós és klónozóvektorokkal transzformáljuk, és hagyományos (a promóterek indukálásához, a transzformánsok szelektálásához, illetve a kívánt szekvenciákat kódoló gének amplifikálásához megfelelően módosított) tápközegben tenyésztjük.

A találmány szerinti anti-trkC antitestek előállítására alkalmazott gazdasejteket számos különböző tápközegben tenésztethetjük. A gazdasejtek tenyésztésére alkalmazhatunk kereskedelmi forgalomban beszerezhető tápközégeket; ilyen pl. a Ham-féle F10-tápközeg (Sigma), a Minimál Esszenciális Tápközeg (MEM, Sigma), az RPMI-1640-tápközeg (Sigma) és a Dulbecco-féle módosított Eagle-tápközeg (DMEM, Sigma). Ezeken kívül a következő forrásokban leírt tenyésztő tápközégek is alkalmazhatók: Ham és mtsai.: Meth. Enzymol. 58, 44 (1979); Barnes és mtsai.: Anal. Biochem. 102, 255 (1980); 4 767 704, 4 657 866, 4 927 762, 4 560 655 és 5 122 469 számú Egyesült Államok-beli szabadalmi leírások, WO 90/03430 és WO 87/00195 számú nemzetközi szabadalmi bejelentés, valamint U.S Patent Re. 30 985. A felsorolt tápközégek bármelyike szükség szerint kiegészíthető, pl. hormonokkal és/vagy egyéb növekedési faktorokkal (pl. inzulin, transferrin vagy epidermális növekedési faktor), sókkal (pl. nátrium-, kalcium- és magnézium-kloriddal és foszfátokkal), pufferekkel (pl. HEPES-pufferrel), nukleotidokkal (pl. adenzinnal és timidinnel), antibiotikumokkal (pl. gentamicinnel), nyomelemekkel (rendszerint μM tartományba tartozó végkoncentrációban jelen lévő szervetlen vegyületek), valamint glükózzal vagy más, egyenértékű energiaforrással. A tápközeg – a



fentieken kívül – egyéb szükséges (megfelelő koncentrációjú) anyagokkal is kiegészíthető. A tenyésztési feltételek (hőmérséklet, pH, stb.) azonosak az expresszáltatásra kiválasztott gazdasajt esetében korábban alkalmazottakkal, és szakember számára jól ismertek.

Rekombináns technikák alkalmazása esetén az antitest intracellulárisan, a periplazmikus térben vagy közvetlenül a tápközegbe kiválasztva állítható elő. Amennyiben az antitestet intracellulárisan termeltetjük, a tisztítás első lépéseként a sejttörmelék – pl. centrifugálással vagy ultraszűréssel – eltávolítjuk. Carter és mtsai. leírtak egy eljárást *E. coli* periplazmikus terébe kiválasztott antitestek izolálására [ld. Carter és mtsai.: *Bio/Technology* 10, 163 (1992)]. Röviden összefoglalva: a sejtmasszát nátrium-acetát (pH = 3,5), EDTA és fenilmetil-szulfonil-fluorid (PMSF) jelenlétében kb. 30 perc alatti felolvasztjuk, majd a sejttörmelék centrifugálással eltávolítjuk. Amennyiben a antitest a tápközegbe szekretálódott, az ilyen expressziós rendszerek felülcszóját először kereskedelmi forgalomban beszerezhető proteintöményítő szűrő (pl. Amicon vagy Millipore Pellicon ultraszűrő egység) alkalmazásával töményítjük be. A proteolízis megakadályozása céljából a tisztítás bármelyik lépésében proteáz-inhibitor (pl. PMSF) alkalmazható, illetve, a szennyező mikroorganizmusok szaporodásának gátlása céljából antibiotikumok adagolhatók.

A sejtekből nyert antitest-készítmény, például, hidroxilapatit-kromatográfiával, gélelektroforézissel, dialízissel vagy affinitás-kromatográfiával tisztítható, melyek közül az affinitás-kromatográfia alkalmazása előnyös. A protein-A affinitási ligandumként történő kiválasztása az antitestben lévő immunglobulin-Fc-domén fajtájától és izotípusától függ. A protein-A a humán $\gamma 1$, $\gamma 2$ vagy $\gamma 4$ nehéz láncokon alapuló antitestek tisztítására alkalmazható [Lindmark és mtsai.: *J. Immunol. Meth.* 62, 1-13 (1983)], míg a protein-G az összes egéregedetű immunglobulin-izotípus és a humán $\gamma 3$ esetén alkalmas [Guss és mtsai.: *EMBO J.* 5, 1567 (1986)]. Az affinitási ligandumot leggyakrabban agarózhoz kapcsoljuk, de egyéb közegek is rendelkezésre állnak. A mechanikailag stabil közegek – pl. a szabályozott pórusméretű üveg vagy poli(sztírol-divinil)-benzol – az agarózzal elérhetőnél nagyobb átfolyási sebességet és rövidebb feldolgozási időt tesznek lehetővé. Amennyiben az antitest C_H3 -domént tartalmaz, a tisztításra „Bakerbond ABXTM” gyanta (J.T. Baker, Philipsburg, NJ) alkalmazható. Az adott antitesttől függően egyéb proteintisztítási technikák is alkalmazhatók, mint pl. az ioncserélő oszlopon végzett frakcionálás, az etanolos precipitáció, a reverz fázisú, nagyteljesítményű folyadékkromatográfia (RP-HPLC), szilikagélen végzett kromatografálás, heparin-Sepharose™ oszlopon végzett kromatografálás, anion- vagy kationcserélő oszlopon (pl. poliaszparaginsav-oszlopon) végzett kromatográfia, kromatofókuszálás, SDS-PAGE és ammónium-szulfátos precipitáció.

Az esetleges előzetes tisztítási lépés(ek)e)t követően a kérdéses antitestet és szennyezőanyagokat tartalmazó elegyet kis pH-jú hidrofób kölcsönhatási kromatográfiának vetjük alá,

melyet kb. 2,5-4,5-es pH-jú eluáló puffer alkalmazásával, előnyösen kis sókoncentráció (pl. kb. 0-0,25 M) mellett hajtunk végre.

3) Agonista aktivitású anti-trkC antitestek azonosítása

Az agonista aktivitású antitestek, például, az 5 766 863 és 5 891 650 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírásokban feltárt kináz receptor aktiválási (KIRA) vizsgálati eljárás alkalmazásával azonosíthatók. Ez az ELISA-típusú teszt – egy receptor protein tirozin kináz (rPTK, pl. trk-receptor) kináz-doménje autofoszforylációjának mérésével – a kináz-aktiválás mennyiségi vagy minőségi mérésére szolgál, és lehetővé teszi a kiválasztott rPTK potenciális agonistájának vagy antagonistájának azonosítását és karakterizálását. A teszt első szakasza egy kináz-receptor (esetünkben trkC-receptor) kináz-doménjének foszforylálását foglalja magában, mely receptor egy eukarióta sejt sejtmembránjában helyezkedik el. A receptor lehet endogén receptor vagy a sejtbe transzformált, receptort kódoló nukleinsav vagy receptor-konstrukció. Általában egy első szilárd fázist (pl. egy első tesztelő tálca üregét) ilyen sejtek (rendszerint emlőseredetű sejtvonal) lényegében homogén populációjával vonjuk be, oly módon, hogy a sejtek a szilárd fázishoz tapadjanak. Gyakran a sejtek adherensek, és természetes módon tapadnak az első szilárd fázishoz. Amennyiben „receptor-konstrukciót” alkalmazunk, az rendszerint egy kináz-receptor és egy „jelző” („flag”) polipeptid fúziójából áll. A flag-polipeptidet – a vizsgálati eljárás ELISA-szakaszában – egy befogó reagens (gyakran befogó antitest) ismeri fel. Ezt követően a vizsgálandó anyagot (pl. egy lehetséges agonistát) hozzáadjuk a letapadt sejteket hordozó üregekhez, oly módon, hogy a tirozin kináz receptor (pl. trkC-receptor) a vizsgálandó anyaggal érintkezzen. Ez a vizsgálati eljárás az adott tirozin kináz receptor (pl. trkC) agonista aktivitású ligandumainak azonosítását teszi lehetővé. E teszt alkalmazható továbbá a tirozin kináz receptor antagonistáinak azonosítására is. Az antagonisták aktivitású ligandum (amely gátolja egy agonista receptorhoz történő kötődését) jelenlétének kimutatása céljából a letapadt sejteket először a feltételezett antagonisták ligandummal, majd az agonista ligandummal érintkeztetjük, ezáltal mérhető a receptor megkötésének és aktiválásának kompetitív gátlása. Ezen túlmenően, a teszttel azonosíthatunk olyan antagonistát is, amely az agonista ligandumhoz kötődik, és ezáltal csökkenti vagy gátolja annak rPTK-hoz kötődő és azt aktiváló képességét. Az ilyen antagonisták kimutatása céljából a feltételezett antagonistát és az rPTK agonista ligandumát együttesen inkubáljuk, és a letapadó sejteket az inkubálás után érintkeztetjük a ligandumok elegyével. A vizsgálandó anyaggal való érintkeztetést követően a letapadó sejteket – szolubilizáló detergenst tartalmazó – lizáló pufferrel, óvatos keveréssel szolubilizáljuk, s az így kapott sejtlizátumot közvetlenül a vizsgálati eljárás ELISA-teszt részében teszteljük, anélkül, hogy szükség lenne a sejtlizátum betöményítésére vagy derítésére.

Az ELISA-teszt első lépéseként – a tirozin kináz receptorhoz (vagy, receptor-

konstrukció esetén, a flag-polipeptidhez) specifikusan kötődő – befogó reagenssel (gyakran befogó antitesttel) egy második szilárd fázist (rendszerint ELISA-tálca üregét) vonunk be. E második szilárd fázis bevonását úgy hajtjuk végre, hogy a befogó reagens hozzátapadjon a második szilárd fázishoz. Befogó reagensként rendszerint monoklonális antitestet alkalmazunk, de – ahogy a kísérleti példákban leírjuk – poliklonális antitestek is felhasználhatók. A kapott sejtlyizátumot ezután a szilárd fázishoz tapadt befogó reagenssel érintkeztetjük, miáltal a receptor vagy receptor-konstrukció a második szilárd fázishoz tapad. Ezt követően a szilárd hordozót – a meg nem kötődött sejtlyizátum eltávolítása érdekében – lemoszuk, miáltal a második szilárd fázison befogott receptor vagy receptor-konstrukció marad vissza, melyet anti-foszfotirozin antitesttel érintkeztetünk, amely a tirozin kináz receptorban lévő foszforilált tirozinokat azonosítja. Az előnyös megvalósítási mód szerint az anti-foszfotirozin antitestet – közvetlenül vagy közvetve – olyan enzimhez konjugáljuk, amely egy nem radioaktív kolorimetrikus reagens színváltozását katalizálja, így a receptor foszforilációja a reagens színváltozása alapján mérhető. Az enzimet közvetlenül kapcsolhatjuk az anti-foszfotirozin antitesthez, vagy más módon, az antitesthez egy konjugálómolekulát (pl. biotint) konjugálunk, és az enzimet a konjugálómolekulán keresztül kapcsoljuk az anti-foszfotirozin antitesthez. Végül, az anti-foszfotirozin antitest befogott receptorhoz vagy receptor-konstrukcióhoz történő kötődését, például, a kolorimetrikus reagens színváltozása alapján határozzuk meg.

Az azonosítást követően az agonista aktivitást – célzott biológiai aktivitások mérésére szolgáló – biotesztekkel ellenőrizhetjük, illetve finomíthatjuk. Például, az anti-trkC monoklonális antitestek NT-3 aktivitását utánozó képességét az 1. példában leírt PC12 neuritkinövési teszttel határozhatjuk meg, és a neurodegeneratív betegségek ismert állatmodelljei (pl. a cisplatin- és piridoxin-indukálta neuropathiák 2. példában leírt kísérleti modelljei) alkalmazásával ellenőrizhetjük.

3) Az agonista aktivitású anti-trkC antitestek terápiás és diagnosztikai alkalmazásai

A találmány szerinti agonista aktivitású anti-trkC antitesteket hasznosnak tartjuk a celluláris degenerációval vagy diszfunkcióval jellemezhető rendellenességek kezelésére (ideértve a megelőzést is). Közelebbről, az agonista aktivitású anti-trkC antitestek ígéretes jelöltek a különböző (krónikus) neurodegeneratív betegségek és akut idegsejt-sérülések kezelésére. Az ilyen neurodegeneratív rendellenességek közé tartoznak, többek között, a következők: perifériás neuropathiák; motoneuronos rendellenességek, mint pl. az amyotrophiás lateral sclerosis (ALS, Lou Gehrig-kór), facialisbénulás és különféle, spinalis muscularis atrophiával vagy paralízissel jellemezhető állapotok; egyéb humán neurodegeneratív betegségek (pl. Alzheimer-kór, Parkinson-kór, epilepszia, sclerosis multiplex, Huntington-kór, Down-szindróma, idegsüketség és Meniere-kór); továbbá a trauma vagy gerincvelő-sérülés okozta akut idegsejt-sérülések.

A találmány szerinti anti-trkC antitesteket különösen alkalmasnak véljük perifériás neuropathia kezelésére, amely olyan neurodegeneratív rendellenesség, amely a perifériás idegeket érinti, és többnyire motoros, szenzoros, szenzomotoros vagy autonóm diszfunkcióként (vagy ezek kombinációiként) manifesztálódik. A perifériás neuropathia lehet öröklött, okozhatja szisztémás betegség, indukálhatja toxikus ágens, így pl. neurotoxikus drog (pl. antineopláziás hatóanyag), továbbá okozhatja ipari vagy környezeti szennyezés, illetve lehet idiopathiás. Ilyenformán, a perifériás szenzoros neuropathia a perifériás szenzoros neuronok degenerációjával, illetve funkciójuk csökkenésével vagy károsodásával jellemezhető, ami, például, cukorbetegség (diabetes-szel összefüggő neuropathia), citosztatikus drogtérápia (pl. kemoterápiás hatóanyaggal, pl. vincristinnel, cisplatinnal, methotrexáttal vagy 3'-azido-3'-deoxitimidinnel végzett kezelés), alkoholizmus, szerzett immunhiányos szindróma (AIDS) vagy genetikai eredetű fogékonyság következtében alakulhat ki. Az öröklött perifériás neuropathiák közé tartozik, például, a Refsum-kór, Krabbe-kór, metachromaticus leukodystrophia, Fabry-kór, Dejerine-Sottas szindróma, abetalipoproteinémia és Charcot-Marie-Tooth (CMT) leukodystrophia (más néven pronealis muscularis atrophia vagy öröklött motoros-szenzoros neuropathia (HMSN).

Az NT-3 (a trkC-receptor natív liganduma) perifériás vér leukocitáinak proliferációját elősegítő, bizonyított képessége alapján, a találmány szerinti agonista aktivitású anti-trkC antitestek terápiás hatóanyagként alkalmazhatók neutropenia, különböző fertőzések és tumorok kezelésére is. Mivel a trkC termelődése nem korlátozódik a neuronokra, az agonista aktivitású anti-trkC antitestek várhatóan alkalmasak a celluláris degenerációval általánosan jellemezhető rendellenességek megelőzésére vagy kezelésére is.

A találmány szerinti anti-trkC antitestek angiogenezis indukálására, illetve olyan kóros állapotok vagy betegségek kezelésére is alkalmazhatók, amelyek esetében angiogenezis indukálása kívánatos. Az ilyen kóros állapotok jellemző példái közé tartozik, például, a szívizom ischemia (az alapbetegségtől függetlenül), ideértve az elégtelen agyi vérkeringés okozta cerebrovascularis rendellenességeket. Az angiogenezisre sebek (p. fekélyek, sarlósejtes betegség diabeteses komplikációi és sebészeti beavatkozások utáni sebek) kezelése esetén is szükség lehet.

A találmány szerinti anti-trkC antitestek celluláris degenerációval jellemezhető betegségek, közelebbről, a fentebb felsorolt neurodegeneratív betegségek diagnosztizálására is hasznosak.

Diagnosztikai célokra az antitestet rendszerint detektálható jelölővel jelöljük. Számos jelölőanyag ismeretes, melyek általánosan a következő csoportokba sorolhatók:

(a) Radioaktív izotópok (pl. ^{35}S , ^{14}C , ^{125}I , ^3H vagy ^{131}I). A polipeptid-változat radioaktív izotópos jelölése, például, a következő forrásban leírtak szerint hajtható végre: „Current Protocols in Immunology”, 1. és 2. kötet, szerk.: Coligen, Wiley-Interscience, New York, New



York Pubs. (1991), és a radioaktivitás szcintillációs számlálással mérhető.

(b) Fluoreszcens jelölők, pl. ritkaföldfém-kelátok (európium-kelátok) vagy fluoreszcein és származékai, rodamin és származékai, dansyl, Lissamine, fikoeritrin és Texas-vörös. A fluoreszcens jelölők antitesthez történő konjugálását illetően ld. pl. a fentebb idézett forrást. A fluoreszcencia fluoriméter alkalmazásával mérhető.

(c) Enzim-szubsztrát jelölők; néhányuk leírását illetően ld. a 4 275 149 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírást. Az enzim rendszerint egy kromogén szubsztát kémiai átalakulását katalizálja, ami különféle technikák alkalmazásával mérhető. Például, az enzim a szubsztátban színváltozást katalizál, ami spektrofotometriai módszerrel mérhető. Más módon, az enzim megváltoztatja a szubsztát fluoreszcenciáját vagy kemilumineszcenciáját. A fluoreszcencia-változás kvantitatív meghatározási módszereit fentebb ismertettük. A kemilumineszcens szubsztát kémiai reakció következtében elektromosan gerjesztődik, és fényt emittál, ami, például, kemiluminométerrel mérhető, vagy egy fluoreszcens fogadómolekulának energiát ad át. Az enzimátikus jelölők példái közé tartoznak a luciferázok (pl. szentjánosbogár-luciferáz és bakteriális luciferáz; 4 737 456 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírás); luciferin, 2,3-dihidro-ftalazin-dionok, malát dehidrogenáz, ureáz, peroxidáz (pl. tormaperoxidáz; HRP), alkalikus foszfatáz, β -galaktozidáz, glükóamiláz, lizozim, cukor oxidázok (pl. glükóz oxidáz, galaktóz oxidáz és glükóz-6-foszfát dehidrogenáz), heterociklikus oxidázok (pl. urikáz és xantin oxidáz), laktoperoxidáz és mikroperoxidáz. Az enzimek antitestekhez történő konjugálásának módszereit illetően ld.: O' Sullivan és mtsai.: *Methods in Enzym.* 73, 147 (1981).

Az enzim-szubsztrát kombinációk jellemző példáiként említhetők a következők:

(i) Tormaperoxidáz (HRP) és szubsztátként hidrogén-peroxidáz; a hidrogén-peroxidáz színezék-prekurzort oxidál [pl. ortofenilén-diamin (OPD) vagy 3,3',5,5'-tetrametil-benzidin-hidroklorid (TMB)]

(ii) alkalikus foszfatáz (AP) és para-nitro-fenil-foszfát (kromogén szubsztát); és

(iii) β -D-galaktozidáz (β -D-Gal) és kromogén szubsztát (pl. p-nitro-fenil- β -D-galaktozidáz) vagy fluorogén szubsztát (4-metil-umbelliferil- β -D-galaktozidáz).

Szakember számára számos egyéb enzim-szubsztrát kombináció ismeretes. Ezek összefoglaló áttekintését illetően ld. a 4 275 149 és 4 318 980 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírásokat.

Bizonyos esetekben a jelölőt közvetve kapcsoljuk az antitesthez; ennek technikai szakember számára jól ismertek. Például, az antitestet biotinhoz konjugálhatjuk, és a jelölőanyagok fentebb felsorolt három csoportjába tartozók bármelyike avidinhez konjugálható (és fordítva). A biotin szelektíven kötődik az avidinhez, és így a jelölő indirekt módon konjugálható a többértékű antitesthez. Más módon, a jelölő többértékű antitesthez történő közvetett konjugálása érdekében a többértékű antitestet kisméretű hapténhez (pl. digoxin) kapcsoljuk, és a jelölők fen-

tebb említett valamely másik típusát anti-haptén polipeptid-változattal (pl. anti-digoxin antitesttel) konjugáljuk. Ezzel a módszerrel a jelölőanyag közvetett módon konjugálható az antitesthez.

A találmány egy másik megvalósítási módja értelmében az anti-trkC antitestet nem szükséges jelölővel ellátni; az anti-trkC antitest jelenléte egy hozzá kötődni képes, jelölt antitest alkalmazásával detektálható.

A találmány szerinti antitestek bármely ismert vizsgálati eljárásban felhasználhatók, így például, kompetitív kötődési tesztekben, direkt és indirekt szendvics-tesztekben és immunprecipitációs tesztekben [Zola: „Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques”, 147-158. old., CRC Press, Inc. (1987)].

A kompetitív kötési tesztek egy jelölt standard azon képességén alapulnak, hogy egy tesztmintában lévő vizsgálandó anyaggal – egy antitest korlátozott mennyiségéhez történő kötődés vonatkozásában – kompetícióba lépjen. A tesztmintában a trkC-protein mennyisége fordítottan arányos az antitesthez kötődött standard mennyiségével. A megkötődött standard mennyiségi meghatározásának elősegítése érdekében az antitesteket a kompetíció előtt vagy után oldhatatlanná tesszük, hogy az antitestekhez kötődött standard és vizsgálandó anyag egyszerűen elkülöníthető legyen a kötetlen állapotban maradt standardtól és vizsgálandó anyagtól.

Az ún. szendvics-tesztek két antitest alkalmazásán alapulnak, melyek a kimutatni kívánt protein más-más immunogén részletéhez vagy epitópjához kötődnek. A szendvics-tesztek során a tesztmintában lévő vizsgálandó anyagot szilárd hordozón immobilizált első antitesttel kötjük meg, majd a második antitest hozzákötődik a vizsgálandó anyaghoz, miáltal három részes, oldhatatlan komplex képződik (ld. a 4 376 110 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírást). A második antitest önmaga detektálható jelölővel lehet jelölve (direkt szendvics-teszt) vagy detektálható jelölővel jelzett anti-immunglobulin antitest alkalmazásával mutatható ki (indirekt szendvics-teszt). Például, a szendvics-tesztek egyik típusa az ELISA-teszt, amelyben detektálható jelölőként enzimet alkalmazunk.

Az antitestek *in vivo* diagnosztikai tesztekben is alkalmazhatók; az antitestet általában radionukliddal (pl. ^{111}In , ^{99}Tc , ^{14}C , ^{131}I , ^{125}I , ^3H , ^{32}P vagy ^{35}S) jelöljük, oly módon, hogy az antigén (vagy az antigént termelő sejtek) immunszcintigráfias módszerrel lokalizálható(k) legyen(ek).

Az antitestek, jól ismert technikák alkalmazásával, patológiai színezék-reagensekként is alkalmazhatók.

A találmány szerinti anti-trkC antitestek terápiás hatóanyagként számos vonatkozásban előnyösebbek az NT-3-nál, ideértve fokozott hatékonyságukat, javított farmakokinetikai tulajdonságaikat (pK) és biológiai hozzáférhetőségüket, valamint az adagolás utáni hiperalgesia hiányát.

4) Gyógyászati készítmények

A találmány szerinti antitestek tárolásra alkalmas gyógyászati készítményeinek előállítása céljából a kívánt tisztaságú antitestet megfelelő, fiziológiai szempontból elfogadható hordozóval, segédanyaggal vagy stabilizálóanyaggal [ld. „Remington’s Pharmaceutical Sciences”, 16. kiadás, szerk.: A. Osol (1980)] elegyítjük (vízes oldat, liofilizátum vagy más szárított készítmény alakjában). Az erre a célra alkalmas hordozók, segédanyagok és stabilizálószerke az alkalmazott dózisokban és koncentrációkban nem lehetnek toxikusak a páciensre. Az ilyen anyagok jellemző példái a következők: pufferek (pl. foszfát, citrát és egyéb szerves savak); antioxidánsok (pl. aszkorbinsav és metionin); tartósítószerke [pl. oktaecil-dimetil-benzil-ammónium-klorid, hexamethonium-klorid; benzalkonium-klorid, benzethonium-klorid, fenol, butil- vagy benzilalkohol, alkilparabének (pl. metil- vagy propilparabén), catechol, rezorcínol, ciklohexanol, 3-pentanol, és m-krezol]; kis molekulatömegű (legfeljebb kb. 10 aminosavas) polipeptidok; proteinek (pl. szérumalbumin, zselatin vagy immunglobulinok); hidrofí polimerke (pl. polivinilpirrolidon); aminosavak (pl. glicin, glutamin, aszparagin, hisztidin, arginin vagy lizin); monoszacharidok, diszacharidok és egyéb szénhidrátok (pl. glükóz, mannóz vagy dextrinek); kelátképzők (pl. EDTA); cukrok (pl. szacharóz, mannitol, trehalóz vagy szorbitol); sóképző ellenionok (pl. nátrium); fémkomplexek (pl. Zn-protein komplexek); és/vagy nemionos felületaktív anyagok [pl. Tween™, Pluronic™ vagy polietilén-glikol (PEG)].

A találmány szerinti gyógyászati készítmény – az adott indikációtól függően – egynél több (előnyösen egymás hatását károsan nem befolyásoló) aktív hatóanyagot is tartalmazhat. Az ilyen molekulákat előnyösen az elérni kívánt célnak megfelelő kombinációban alkalmazzuk.

Az aktív összetevők mikrokapszulába is foglalhatók, amely, például, koacervációs technikával (hidroxil-metilcellulóz vagy zselatin mikrokapszula) vagy határfelületi polimerizációval állítható elő [poli(metil-metakrilát)-mikrokapszula]. Más módon, az aktív összetevők kolloidális célbajuttató-rendszerekbe (pl. liposzómák, albumin-mikrogömbök, mikroemulziók, nanoszemcsék és nanokapszulák) vagy makroemulziókba foglalhatók. Az ilyen technikák leírását ld.: Remington’s Pharmaceutical Sciences, 16. kiadás, szerk.: Osol (1980)].

Az *in vivo* adagolásra szánt készítményeknek sterilnek kell lenniük, ami steril szűrőmembránok alkalmazásával végzett szűréssel egyszerűen biztosítható.

Nyújtott hatású („*sustained release*”) készítmények is előállíthatók. Az ilyen készítmények jellemző példái közé tartoznak a többértékű antitestet tartalmazó, szilárd hidrofób polimerkeből készített félígátereszítő ágyazóanyagok, amelyek pl. filmek vagy mikrokapszulák formájában állíthatók elő. A nyújtott hatóanyag-felszabadulást biztosító mátrixok (ágyazóanyagok) példái a következők: poliészterek; hidrogélek [pl. poli(2-hidroxietil-metakrilát) vagy polivinilalkohol]; polilaktidok (3 773 919 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírás); L-

glutaminsav és γ -etil-L-glutamát kopolimerei; lebonthatatlan etilén-vinilacetát kopolimerek; lebontható tejsav-glikolsav kopolimerek (pl. LUPRON DEPOT™, amely tejsav-glikolsav kopolimerből és leuprolid-acetátból álló, injektálható mikrogömb készítmény); és poli-D-(-)-3-hidroxivajsav. Míg az olyan polimerek, mint az etilén-vinilacetát és a tejsav-glikolsav kopolimer, a beléjük ágyazott molekulák felszabadulását 100 napnál hosszabb ideig biztosítják, bizonyos hidrogélek a proteíneket rövidebb idő alatt bocsátják ki. Ha az ágyazóanyagba foglalt antitestek hosszú ideig maradnak a testben, a nedvesség és a 37 °C-os hőmérséklet együttes hatásának következtében denaturálódhatnak vagy aggregálódhatnak, ami biológiai aktivitásuk csökkenését és immunogenitásuk esetleges változását eredményezi. Az adott mechanizmustól függően stabilizációs stratégiák tervezhetők. Például, ha az aggregáció tio-diszulfid átalakulás következtében kialakult intermolekuláris S-S kötéssel következik be, a stabilizáció a szulfhidril-gyökök módosításával, savas oldatokból végzett liofilizálással, a nedvességtartalom szabályozásával (megfelelő adalékanyagok alkalmazásával), és specifikus polimer ágyazóanyag-készítmények kifejlesztésével valósítható meg.

A találmány szerinti antitest gyógykezelésre alkalmas, hatásos mennyisége például az elérni kívánt céltól, az adagolás módjától és a beteg állapotától függ. Ennek megfelelően, az dózizozást és az adagolás módját a kezelőorvosnak az optimális terápiás hatás elérésének megfelelően kell megválasztani. A jellemző napi dózis – az említett tényezőktől függően – rendszerint kb. 1 $\mu\text{g/kg}$ -tól 100 mg/kg -ig terjedhet, de alkalmazhatók nagyobb dózisok is. A találmány szerinti molekulát általában olyan dózis eléréséig kell adagolni, amely a kívánt biológiai hatást biztosítja. A kezelés hatása hagyományos vizsgálati eljárások alkalmazásával könnyen ellenőrizhető.

Az adagolást szokványos módon, többek között, intravénásan, szubkután, helyileg, intramuszkulárisan, intratracheálisan, intracerebrálisan, intranazálisan, intrapulmonárisan vagy intraparyncalisan végezhetjük.

4) Génterápia

A találmány szerinti antitestet kódoló nukleinsav különféle (krónikus) neurodegeneratív betegségek és akut idegsejt-sérülések, elsősorban öröklött perifériás neuropathiák génterápiájára is alkalmazhatjuk. A génterápiának két fő módját fejlesztették ki: az *ex vivo* és az *in vivo* génterápiát. Az *ex vivo* génterápia során a páciensből sejteket izolálunk, és azokat *in vitro* tenyésztjük. A sejtekbe *in vitro* funkcionális helyettesítő gént juttatunk be, az így módosított sejteket tenyészetben szaporítjuk, majd a módosított sejteket visszajuttatjuk a páciens testébe. *In vivo* génterápia esetén a célsejteket nem távolítjuk el a páciensből, hanem a megfelelő gént a recipiens sejtjeibe *in situ* juttatjuk be.

Számos, emberekben végzett *ex vivo* génterápiás kísérletről számoltak be, melyek átte-



kintését illetően ld. Anderson és mtsai.: Science 256, 808 (1992); és Miller: Nature 357, 455 (1992).

Az *in vivo* génterápia működőképességét számos állatmodellben igazolták [összefoglalásukat ld. Felgner és mtsai.: Nature 349, 351 (1991)]. Közvetlen génbejuttatást írtak le, például, izomszövetbe [Ferry és mtsai.: Proc. Natl. Acad. Sci. 88, 8377 (1991); Quantin és mtsai.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 2581 (1992)]; artériák falába [Nabel és mtsai.: Science 244, 1342 (1989)]; és idegrendszerbe [Price és mtsai.: Proc. Natl. Acad. Sci. 84, 156 (1987)].

Ennek megfelelően, a találmány értelmében feltárunk olyan célhajuttató hordozókat is, amelyek agonista aktivitású anti-trkC antitestet kódoló polinukleotid sejtekbe – *in vivo* vagy *ex vivo* – történő bejuttatására alkalmasak. Az antitestet (pl. lineáris antitestet vagy antitest-láncokat) kódoló polinukleotidot általában működőképesen egy promóterhez és egy heterológ polinukleotidhoz kapcsolunk. A találmány szerinti antitestet kódoló polinukleotid gazdasejtbe történő bejuttatására alkalmas célhajuttató hordozók példái a virális és a nem virális vektorok [Verma és Somia: Nature 389, 239 (1997)].

A találmány szerinti antitestet kódoló polinukleotidok célhajuttatására alkalmas, nem virális hordozók számos fajtája ismeretes. Például, anti-trkC antitestet kódoló polinukleotidot csupasz DNS-ként juttathatunk be a sejtekbe (ld. 5 692 622 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírás és WO 97/40163 számú nemzetközi közzétételi irat). Más módon, találmány szerinti anti-trkC antitestet kódoló polinukleotidot különféle anyagokkal kombinálva juttathatunk be a sejtekbe, mely anyagok jellemző példái közé tartoznak, többek között, a következők: kationos lipidek, biokompatibilis polimerek (természetes és szintetikus polimerek), lipoproteinek, polipeptidek, poliszacharidok, lipopoliszacharidok, mesterséges vírus-”envelope” proteinek, fémrészecskék és baktériumok. Célhajuttató hordozóként alkalmazhatók továbbá mikroszemcsék, valamint a felsorolt anyagok elegyei és konjugátumai is. Az antitestet kódoló polinukleotid e hordozókhoz kovalens vagy nem kovalens kötéssel kapcsolható. A liposzómák egy adott sejttípusra (pl. glomerularis epithelsejtekre) irányulhatnak.

A virális vektorok közé tartoznak, többek között, a DNS-vírus vektorok, például, az adenovírusokon, herpes simplex víruson, himlővírusokon (pl. vaccinia víruson) és parvovírusokon (ideértve az adeno-asszociált vírust) alapuló vektorok, valamint az RNS-vírus vektorok, mint pl. a retrovírus vektorok. A retrovirális vektorok közé tartozik az egérleukózis vírus és a lentivírusok, pl. a humán immundeficiencia vírus [Naldini és mtsai.: Science 272, 263 (1996)].

Az anti-trkC antitestet kódoló polinukleotidot tartalmazó, nem virális célhajuttató hordozók gazdasejtbe és/vagy célsejtekbe történő bejuttatására az ismert eljárások bármelyike alkalmazható, így pl. a kalcium-foszfátos együttes precipitációval végzett transzfekció, elektroporáció, elektropermeabilizálás, liposzóma-közvetítette transzfekció, ballisztikus

transzfekció, bioliztikus technikák, pl. mikrorészecske-bombázás, tű nélküli és tűs injektlás, illetve mikroinjektlás. Szakember számára számos transzfekciós eljárás ismeretes.

A vírális célbajuttató hordozók infekcióval juttathatók be a sejtekbe. Más módon, a vírális hordozók a fentebb leírt, nem vírális hordozók bármelyikébe beépíthetők; például, a vírális vektorok elegyíthetők kationos lipidekkel [ld. Hodgson és Solaiman: *Nature Biotechnol.* **14**, 339 (1996)] vagy lamelláris liposzómákkal [Wilson és mtsai.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 3471 (1977); Faller és mtsai.: *J. Virol.* **49**, 269 (1984)].

Az egyik előnyös megvalósítási mód értelmében egy találmány szerinti anti-trkC anti-test nehéz és könnyű láncait (ideértve fragmenseit is) egyaránt kódoló nukleinsav elhelyezhető ugyanazon policisztronos expressziós vektorban (mint pl. a 4 965 196 és 4 713 339 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírásokban feltárt vektorokban). A policisztronos expressziós vektorok a kívánt proteint kódoló szekvencián felül egy másodlagos proteint kódoló szekvenciát is tartalmaznak, és e két szekvencia expresszióját ugyanazon promóter szabályozza. A kódolószekvenciákat transzlációs kezdőhely és stop-kodonok választják el egymástól. A másodlagos szekvencia expressziója szabályozza a kívánt proteint kódoló szekvencia expresszióját, és a másodlagos protein a transzfektált sejtek szelekciós markereként funkcionál.

In vivo génterápia esetén a vektort, például, intravénás (i.v.) injekcióval juttathatjuk be a betegbe. A megfelelő titereket számos tényezőtől – így pl. a kiválasztott vektortól, a gazdától, az alkalmazott promóter erősségétől és a kezelni kívánt betegség érzékenységtől – függően határozzuk meg.

A találmány szerinti megoldást a továbbiakban kísérleti példák bemutatásán keresztül szemléltetjük.

1. példa

Agonista aktivitású anti-trkC monoklonális antitestek termelése és karakterizálása

Vad típusú Balb/C-egereket és humán IgG2-t vagy IgG4-et termelő transzgenikus egereket [Xenoegér („*Xenomouse*”); ld. Mendez és mtsai.: *Nature Genetics* **15**, 146-156 (1997)] intraperitoneálisan, hátsó talppárnán keresztül vagy szubkután – Freund-féle adjuvánssal vagy Ribi-adjuvánssal együtt (Mendez és mtsai., ld. fentebb) – 20 µg humán trkC-IgG-vel [Shelton és mtsai.: *J. Neurosci.* **15**, 477 (1995)] hiperimmunizáltunk. Az immunizált egerek lépsejtjeit myelomasejtekkel (X63.Ag8.653; ATCC, Rockville, MD, USA) fuzionáltattuk; 253 Xenoegér és 35 vad típusú Balb/C-egér alkalmazásával összesen 33 fuzionáltatást végeztünk. Mikrotiter-tálcákat (összesen 21 734 üreg) először trkC-IgG alkalmazásával, közvetlen ELISA-tesztel szkríneltünk, miáltal 684 trkC-pozitív hibridómát azonosítottunk, melyek mindegyikét később trkC-KIRA-tesztel agonista aktivitásra teszteltük. A KIRA-tesztel 14 Xenoegér-eredetű és 22,

vad típusú Balb/C-egérből származó hibridómát azonosítottunk, melyek agonista aktivitású anti-trkC antitesteket választottak ki. Ezeket a hibridómákat limitáló hígítással szubklónoztuk, az agonista aktivitás igazolása érdekében ismételt tesztnak vetettük alá, és pristannal indukált Balb/C-egerek vagy csupasz egerekbe injektálva hasúri folyadékképződést indukáltunk [Hongo és mtsai.: Hybridoma 14, 253 (1995)]. A hasúri folyadékban lévő monoklonális antitesteket protein-A affinitási kromatográfiával tisztítottuk (Hongo és mtsai., ld. fentebb). A Xenoegerekből és a vad típusú Balb/C-egerekből származó lépsejtek fúziói esetében a specifikus fúziós hatékonyság (pozitív üregek száma/összes szkrinelt üregek száma) egyaránt 3 %-nak bizonyult. A Xenoegerekből és a vad típusú Balb/C-egerekből származó lépsejtek fúziói esetében az agonista aktivitású monoklonális antitestek előfordulása (agonista aktivitást adó hibridómák száma/ELISA trkC-pozitív hibridómák száma) 3 %, illetve 8 % volt. Az egéredetű monoklonális antitestek izotípusát a GIBCO BRL „dipstick” elnevezésű vagy a Zymed „mouse-typer” elnevezésű izotípusáló reagenskészlet alkalmazásával, a forgalmazók útmutatása szerint határoztuk meg. A Xenoegerek IgG₂ vagy IgG₄ törzsek voltak, és ennek megfelelő izotípusú antitesteket termeltek. A különböző humán és egéredetű anti-trkC monoklonális antitest izotípusait a 2. táblázatban mutatjuk be. Összesen nyolc humán IgG₂, hat humán IgG₄, hét egér IgG₁, tíz egér IgG_{2a} és öt egér IgG_{2b} monoklonális antitestet azonosítottunk. A részletesebb karakterizálásra azokat a monoklonális antitesteket választottuk ki, amelyek KIRA-tesztben a legnagyobb agonista aktivitást mutatták (a 2. táblázatban csillaggal jelölve).

2. táblázat

Humán monoklonális antitestek (összesen 14)

IgG ₂ izotípus (8 antitest)	IgG ₄ izotípus (6 antitest)
2.5.1 *	4.8
6.1.2 *	2337
6.4.1 *	2338
2342	2339
2343	2348
2344 *	2349 *
2345 *	
2346	

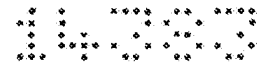
2. táblázat (folytatás)

Egéreredetű monoklonális antitestek (összesen 22)			
IgG ₁ (7)	IgG _{2a} (10)	IgG _{2b} (5)	IgG ₃
2249	2248*	2252	
2250*	2272	2273	
2253*	2251	2277	
2254	2255	2279	
2256*	2274	2280	
2257	2275		
2260	2276		
	2278		
	2281		
	2282		

Az agonista aktivitás meghatározása

a) KIRA-teszt

Az anti-trkC monoklonális antitestek NT-3 agonista aktivitásának meghatározására két biotesztet alkalmaztunk. A fentebb leírt kináz receptor aktiválási (KIRA) teszttel a trkC – transzfektált sejtekben, ligandummal (pl. NT-3-mal vagy agonista aktivitású monoklonális antitestekkel végzett stimuláció hatására bekövetkező – tirozin-foszforilációja mérhető [Sadick és mtsai.: Exp. Cell Res. 234, 354 (1997)]. A monoklonális antitesteket KIRA stimulációs pufferben [2 % szarvasmarha-szérumalbumint (BSA, Intergen Co., Purchase, NY) és 25 mM HEPES-puffert tartalmazó, 1:1 arányú F12/DMEM elegy] 27 µg/ml koncentrációra hígítottuk. Az antitesteket ezután stimulációs tápközegben 1:3 hígítási lépésekkel tovább hígítva hígítássorozatot készítettünk (összesen nyolc hígítás 0,01 nM-tól és 180 nM-ig). Egy HSV-glikoprotein-D-ből (gD) származó, 26 aminosavas polipeptid-toldalék epitóppal fuzionált trkC-vel stabilan transzfektált CHO-sejteket 96 üregű sejtenyészítő tálcákra ültettünk (5×10^4 sejt/üreg) és tenyésztettük. A sejteket ezután NT-3-mal (pozitív kontroll) vagy különböző anti-trkC monoklonális antitestekkel (sorozathígítás 0,1 ng/ml, 1,56 ng/ml, 3,13 ng/ml, 6,25 ng/ml, 12,5 ng/ml, 25 ng/ml, 50 ng/ml és 100 ng/ml koncentrációban) stimuláltuk. Valamennyi hígítást kétszeri ismétléssel, hat óra hosszat teszteltük. A tesztet lényegében Sadick és mtsai. [Exp. Cell Res. 234, 354 (1997)] leírása szerint hajtottuk végre. Röviden összefoglalva: a sejteket Triton X-100 alkalmazásával feltártuk, és a lizátumban lévő trkC-t ELISA-tesztben, a gD-epitóp elleni antitestek alkalmazásával befogtuk, és a foszforilált trkC-t – enzimmel alkalmas módon konjugált – anti-foszfortirozin antitestek alkalmazásával detektáltuk és mennyiségi meghatározásnak vetettük alá. Negatív kontrollként olyan monoklonális antitestet alkalmaztunk, amely nem trkC



ellen irányul (Xenoegér-eredetű humán anti-IL-8 IgG₂ antitest vagy egéregredetű anti-gp120 IgG₁ monoklonális antitest). Ahogy az 1/A és 1/B ábrán látható, valamennyi kiválasztott anti-trkC monoklonális antitest képes volt az NT-3 aktivitását olyan mértékben utánozni, hogy stimulálják a trkC-receptor tirozin-foszforilációját. A humán anti-trkC monoklonális antitestek (1/A ábra) nagyobb agonista aktivitásúak voltak, mint az egéregredetű anti-trkC monoklonális antitestek (1/B ábra). Például, a legnagyobb aktivitású humán anti-trkC monoklonális antitest tízszer hatásosabb, mint a legjobb egéregredetű antitest, sőt, a humán monoklonális antitestek a kisebb koncentráció-tartományban csaknem ugyanolyan hatékonyak voltak, mint az NT-3.

b) PC12 neurit-kínövési teszt

Az anti-trkC monoklonális antitest NT-3-at utánzó aktivitásának meghatározására alkalmazott másik teszt a PC12 neurit-kínövési teszt, amellyel patkányeredetű pheochromocytoma-sejtek (PC12) – megfelelő ligandumokkal végzett stimulálás hatására bekövetkező – neuritnyúlvány-növesztését mérjük. A PC12-sejtek endogén trkA-t termelnek, s így reagálnak az NGF-re, azonban nem termelnek endogén trkC-t, ezért ezeket a sejteket – az NT-3-ra és annak agonistáira irányuló reakció kiváltása érdekében – trkC expressziós konstrukcióval transzfektáltuk. A PC12-sejteket teljes hosszúságú humán trkC-vel transzfektáltuk [Urfer és mtsai.: *Biochem.* **36**, 4774 (1997); Tsoulfas és mtsai.: *Neuron* **10**, 975 (1993)], és a 1000 sejt/üreg mennyiségben 96 üregű szövettenyésztő tálcákra vittük fel. A transzekció után három nappal a sejtekhez anti-trkC monoklonális antitesteket adtunk (0,0002 nM és 2,7 nM közötti koncentrációban, minden koncentrációban háromszori ismétléssel), és a sejteket 37 °C-on további három napig inkubáltuk. Az inkubálás után a sejteket fáziskontraszt mikroszkóppal vizsgáltuk, és a sejt átmérőjének kétszeresét meghaladó hosszúságú neuriteket növesztő sejteket összeszámoltuk. A humán és egéregredetű anti-trkC monoklonális antitestek PC12-sejtekben neuritkínövést képesek stimulálni (ld. 1/C, illetve 1/D ábra). A humán anti-trkC monoklonális antitestek (1/C ábra) sokkal nagyobb aktivitásúak voltak, mint az egéregredetű anti-trkC monoklonális antitestek (1/D ábra), ami megerősíti a KIRA-teszttel kapott eredményeket. Ezen túlmenően, a KIRA-teszt eredményeivel összhangban, a humán anti-trkC monoklonális antitestek nagyjából hasonló mértékű stimulációt mutattak, mint az NT-3. A két bioteszttel kapott eredmények bizonyítják az anti-trkC monoklonális antitestek NT-3 (amely a trkC-receptor természetes liganduma) aktivitását utánzó képességét.

A monoklonális antitestek agonista aktivitását a KIRA-tesztben és a PC12 neuritkínövési tesztben meghatározott tirozin-foszforiláció maximális indukciója és a foszforilációs görbék számított EC₅₀-értéke alapján rangsoroltuk. A 3. táblázatban különböző, agonista aktivitású anti-trkC monoklonális antitestek tulajdonságait foglaljuk össze.

3. táblázat

Monoklonális antitest	Izotípus	Agonista aktivítás	Kötődés patkány trkC-hez	Immunoblot		Affinitás K_d (nM)
Humán		(KIRA/PC12)		NR	Red.	
2.5.1	G2	+++ / +++	nem	++	++	12
6.1.2	G2	++++ / +++++	nem	+	+	12,5
6.4.1	G2	++++ / +++++	igen	+	+	12
2344	G2	+++ / +++	nem	++	+	19
2345	G2	++++ / +++++	nem	++	++	12,1
2349	G4	++++ / +++++	nem	++	+	23
Egéreredetű						
2248	G2a	++	nem	+++	+	5,9
2250	G1	++ / ++	nem	++	++	8,7
2253	G1	++ / +	nem	++	++	42
2256	G1	++	igen	++	+	62

Az anti-trkC monoklonális antitest specifikitásának tesztelése

A trkC elleni monoklonális antitestek specifikitását direkt ELISA-teszt alkalmazásával teszteltük. Mikrotiter-tálcákat egy éjszakán át – befogó antigénként – trkA-IgG, trkB-IgG, illetve trkC-IgG immunadhezín-konstrukció [ld. Shelton és mtsai.: *J. Neurosci.* **15**, 477 (1995)] 50 mM karbonát-pufferben (pH = 9,5) készített, 1 µg/ml koncentrációjú oldatának 100 µl-ével vontunk be. Negatív kontrollként befogó antigén helyett CD4-IgG konstrukciót [Capon és mtsai.: *Nature* **337**, 525 (1989)] alkalmaztunk. A bevont tálcákat szobahőmérsékleten egy óra hosszat – 0,5 % szarvasmarha-szérumalbumint és 0,05 % Tween-20-at tartalmazó foszfátpufferrel sóoldatban hígított – anti-trkC monoklonális antitestek különböző koncentrációival (100 µl; 0,01 µg/ml-től 1 µg/ml-ig) inkubáltuk. A nem kötődött antitestek eltávolítása céljából végzett mosás után az üregekhez megfelelő HRP-konjugátumot (a humán monoklonális antitestek esetében: kecskeeredetű anti-humán κ -lánc/HRP konjugátum, 1:5000 hígítás; egéreredetű monoklonális antitestek esetében: kecskeeredetű anti-egér IgG (Fc)/HRP konjugátum, 1: 5000 hígítás) adtunk, és a tálcákat szobahőmérsékleten egy óra hosszat inkubáltuk. A tálcákat ezután lemostuk, előhívtuk és leolvastuk [ld. Hongo és mtsai.: *Hybridoma* **14**, 253 (1995)]. A 2. ábrán – jellemző példaként – a 6.1.2 humán anti-trkC monoklonális antitest trkC-receptorra vonatkozó kötési specifikitását szemléltetjük. A 6.1.2 antitest igen specifikusnak bizonyult a trkC-re, és sem a trkB-vel, sem a trkA-val nem mutatott jelentős mértékű keresztkreakciót. Hasonlóan, a többi humán és egéreredetű anti-trkC monoklonális antitestek is specifikusan felismerte a trkC-

receptort.

A különféle anti-trkC monoklonális antitestek humán trkC-hez és patkányeredetű trkC-hez történő kötődését – lényegében a fentebb leírtak szerint végzett – direkt ELISA-teszt alkalmazásával hasonlítottuk össze, azzal a különbséggel, hogy a humán trkC-hez történő kötődés vizsgálatára befogó antigénként a trkC-IgG helyett trkC-gD-t alkalmaztunk. A 3. ábrán látható eredmények azt jelzik, hogy a humán anti-trkC monoklonális antitestek közül csak a 6.4.1-es reagált jelentős mértékben a patkányeredetű trkC-vel, míg a többi specifikus volt a humán trkC-re. Hasonlóan, az egéreredetű monoklonális antitestek közül csak a 2256-os reagált jelentős mértékben a patkányeredetű trkC-vel, a többi specifikusan csak a humán trkC-t ismerte fel.

Affinitási vizsgálatok

Az agonista aktivitású anti-trkC monoklonális antitestek affinitását BIAcore-2000™ felületi plazmonrezonancia (SPR) rendszer (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ, USA) alkalmazásával határoztuk meg. CMS-ös bioszenzor-chipeket a forgalmazó útmutatása szerint N-etil-N'-(3-dimetil-amino-propil)-karbodiimid-hidrokloriddal (EDC) és N-hidroxí-szukeinimiddel (NHS) aktiváltunk. A kötési kísérletek első sorozatában az antigént (trkC-gD konstrukció) 10 mM nátrium-acetát pufferben (pH = 4,8) hígítottuk, és 0,09 mg/ml koncentrációban az aktivált chipre fecskendeztük. Különböző érintkezési idővel négy antigén-denzitási tartományt kaptunk: 14000-17000 reakcióegység (RE), 7000-9000 RE, 2000-3000 RE és 400-600 RE. A bioszenzor-chipet etanolammal blokkoltuk.

A kinetikai mérések első kísérletsorozatában az anti-trkC monoklonális antitesteket (IgG-ket) futtatópufferben (0,05 % Tween-20-at és 0,01 % nátrium-azidot tartalmazó foszfát-pufferelt sóoldat) hígítottuk, és az oldat 0,03 ml-ét (667 nM) 25 °C-on, 0,01 ml/perc áramlási sebességgel a bioszenzor-chipre fecskendeztük. A regenerálást 30 másodperc elteltével 10 mM sósavval végzett impulzuskezeléssel, majd egy perc elteltével 100 mM Tris-HCl puffer (pH = 8,0) végzett impulzuskezeléssel és két mosási lépéssel hajtottuk végre.

A második kísérletsorozatban az IgG-ket [10 nM nátrium-acetátban (pH = 4,8) 0,1 mg/ml antitest-koncentráció] a fentiek szerint immobilizáltuk, azzal a különbséggel, hogy az antitest-denzitást 1000-2000 reakció-egységre korlátoztuk. A kinetikai mérések elvégzéséhez a bioszenzor-chipekre a fentebb leírtak szerint a gD-trkC kétszeres hígítási lépésenként (3,7 M-tól 29 nM-ig) készített hígítássorozatát fecskendeztük.

Minden egyes kinetikus görbe disszociációs fázisát egy exponenciális disszociációs rátához (k_{off}) illesztettük, és ezeket a rátákat alkalmaztuk az asszociációs ráta (k_{on}) injektálási fázisból történő kiszámítására (egyszerű 1:1 Langmuir kötési modellt alkalmazva; ld. Lofas és Johnson, 1990).

A felületi plazmonrezonancia (SPR) mérésekből az egyensúlyi disszociációs állandókat

(K_d) k_{off}/k_{on} arányként számítottuk ki.

Az anti-trkC antitestek gD-trkC-re vonatkozó affinitását – immobilizált antigén vagy antitest alkalmazásával végzett – SPR kinetikai kísérletekben mértük. A kis denzitású (0,4-0,6 ng/mm²) immobilizált antigén alkalmazásával végzett kísérletekben meghatározott látszólagos affinitások általában összhangban voltak az immobilizált IgG alkalmazásával végzett kísérletekben meghatározottakkal (ld. 2. táblázat). Mindazonáltal, nagyobb sűrűségű immobilizált gD-trkC alkalmazása esetén az egyes antitestek látszólagos kötési affinitása fokozatosan (akár 10-szeres mértékben) szűkült, feltehetően a bivalens IgG általi kötődés aviditási hatása miatt (ábrát nem közlünk). Bizonyos esetekben, ha az immobilizált IgG-re trkC-t fecskendeztünk, nem detektáltunk kötődést, amit valószínűleg az okozott, hogy az IgG immobilizálása az antigénköti hely térbeli gátlásához vezetett. Valamennyi tesztelt feltétel mellett a 2248-as antitest mutatta a legnagyobb látszólagos kötési affinitást ($K_d = 5,6-8,5$ nM).

4. táblázat

Felületi plazmonrezonancia vizsgálattal meghatározott kötési affinitások (Az eredmények IgG antitestek immobilizált gD-trkC-hez (400-600 RE) történő kötődésére, illetve a gD-trkC immobilizált IgG antitestekhez (1000-3000 RE) történő kötődésére vonatkoznak. n.d.k. = nincs detektálható kötődés)

Antitest (IgG)	K_d (nM)	
	Immobilizált gD-trkC	Immobilizált IgG
2248	5,9	8,5
2250	8,7	28
2253	42	51
2256	62	300
2344	19	n.d.k.
2345	12	n.d.k.
2349	23	n.d.k.
6.4.1	12	28
6.1.2	13	16
2.5.1	12	n.d.k.

Kompetíciós ELISA-teszt

Kompetíciós ELISA-tesztet alkalmaztunk abból a célból, hogy előzetes információkat szerezzünk azokról a különböző csoportokról, amelyekbe a vizsgált antitestek – a trkC általuk felismert epitópjától (epitópjaitól) függően – tartoznak. A teszt során a mikrotiter-tálca bevoná-

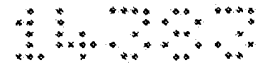


sára befogó antigénként trkC-gD-t (1 µg/ml) alkalmaztunk. A bevont tálcához specifikus, biotinilált anti-trkC monoklonális antitestet (1 µg/ml) adtunk (önmagában vagy egy másik, jelöletlen anti-trkC monoklonális antitest jelenlétében, amelyet a jelölt antitesthez képest feleslegben (50 µg/ml) alkalmaztunk). Ha a biotinilált antitest és a jelöletlen antitest ugyanazon vagy átfedő epitópot ismer fel, egymással kompetícióba lépnek az immobilizált trkC-hez történő kötődésért, ami a jelölt antitest csökkent mértékű kötődését eredményezi. Ha a kétféle antitest különböző és nem átfedő epitópokat ismer fel, nem alakul ki kompetíció, és a jelölt antitest immobilizált trkC-hez történő kötődése nem változik. Negatív kontrollként jelöletlen humán IgG2-t és egérszűz IgG-t alkalmaztunk. A 4. ábrán bemutatott reprezentatív eredmények alapján látható, hogy az immobilizált trkC-hez történő kötődés vonatkozásában – a 2248-as egérszűz anti-trkC monoklonális antitest kivételével – valamennyi anti-trkC monoklonális antitest kompetícióba lépett a jelölt 6.1.2-es humán anti-trkC monoklonális antissal, ami arra utal, hogy a 2248-as egérszűz antitest a trkC olyan epitópját ismeri fel, amely különbözik a többi anti-trkC monoklonális antissal által felismert epitóp(ok)tól.

Megjegyezzük, hogy ha az immobilizált trkC-hez először a jelöletlen 2248-as egérszűz antissal kötődött, a többi (biotinilált) antissal egyike sem volt képes kötőhelyéhez férni, ami azt sugallja, hogy a térbeli gátoltság az epitópok különbözősége ellenére is szerepet játszhat. Az ilyen páronkénti összehasonlítás értékes információkat nyújthat, és lehetővé teszi, hogy az ugyanazon antigén ellen irányuló antissákat epitóp-felismerésük alapján különböző csoportokba sorolhassuk. Az összehasonlítás összefoglalását az 5. ábrán mutatjuk be. Az eredmények azt mutatják, hogy az antissák két külön csoportba sorolhatók: az 1. csoportba tartozik valamennyi vizsgált monoklonális antiss (a 2248-as kivételével), míg a 2. csoportba csak a 2248-as antiss tartozik.

Epitóp-térképezés domén-cserés mutánsok alkalmazásával

További epitóp-térképezési kísérletet végeztünk, melynek során olyan kimérikus trkC-receptorokat alkalmaztunk, amelynek bizonyos doménjei a trkA- vagy trkB-receptor megfelelő doménjeivel voltak helyettesítve. Ezt a megközelítési módot az tette lehetővé, hogy az anti-trkC antissák nem adnak jelentős mértékű keresztreakciót a trkA-val vagy trkB-vel. Az ilyen domén-cserés mutánsok alkalmazása egyértelműen előnyösebb a deléciós mutánsok alkalmazásánál, mivel egy domén deléciója megbonthatja a protein másodlagos szerkezetét, míg egy domén hasonló méretű – és lényegében hasonló aminosav-szekvenciájú –, megfelelő doménnel végzett helyettesítése olyan rokon proteint eredményez, amelynek valószínűleg megmarad az eredeti másodlagos szerkezete. A trk-receptorok extracelluláris doménje öt doménből áll (ld. 6/A ábra). A D1 és D3 ciszteinben gazdag domének, a D2 leucinban gazdag domén, míg a D4 és D5 immunglobulinszerű domének. A trkC olyan domén-cserés mutánsait hoztuk létre, ame-



lyekben a D1, D4 és D5 domén a trkB vagy trkA megfelelő doménjeivel van helyettesítve [ld. Urfer és mtsai.: *EMBO J.* **14**, 2795 (1995)]. Pozitív kontrollként vad típusú trkC-receptort, negatív kontrollként pedig vad típusú trkA-receptort alkalmaztunk. A trkC doméncsere mutánsait a helyettesített domén forrása alapján nevezzük el. Például, az s1B-mutáns a trkB D1-doménjét, az s4B-mutáns a trkB D4-doménjét, az s5B-mutáns a trkB D5-doménjét, az s5A-mutáns pedig a trkA D5-doménjét tartalmazza. Valamennyi mutánst immunadhezinként, vagyis IgG-hez fuzionálva termeltettük és tisztítottuk.

Az agonista aktivitású anti-trkC monoklonális antitestek doméncsere mutánsokhoz történő kötődését ELISA-tesztel vizsgáltuk. Az immunadhezinek (trkC-IgG, trkA-IgG és a trkC doméncsere mutánsai) sorozathígításainak (100 µg/ml-től 2,4 ng/ml-ig, 100 µl/üreg, szobahőmérsékleten egy óra) befogóreagenseként a mikrotiter-tálcákat kecskeeredetű anti-humán IgG antitest F(ab')₂-fragmensével vontuk be. Ezután az immobilizált immunadhezineket tartalmazó tálcák üregeihez jelöletlen humán vagy biotinilált egéreredetű anti-trkC monoklonális antitesteket (100 µL/üreg, 1 µg/ml, szobahőmérsékleten egy óra) adtunk, a tálcákat a felesleges, nem kötődött reagentek eltávolítása érdekében lemostuk, és HRP-vel konjugált kecskeeredetű anti-humán κ-lánccal vagy sztreptavidinnel inkubáltuk. Ahogy a 6/B ábrán látható, valamennyi humán anti-trkC monoklonális antitest képes volt felismerni a D1- vagy D4-domén helyettesítését tartalmazó doméncsere trkC-mutánsokat. Mindazonáltal, a D5-domén trkB- vagy trkA-receptorból származó, megfelelő doménnel végzett helyettesítése az anti-trkC antitestek általi felismerést tönkretette: az anti-trkC antitestek az ilyen trkC-mutánsokhoz ugyanolyan kis mértékben kötődtek, mint a negatív kontrollhoz (trkA). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a tesztelt humán anti-trkC monoklonális antitestek mindegyike olyan epitópot ismer fel, amely valahol a D5-doménben helyezkedik el.

Egéreredetű anti-trkC monoklonális antitestekkel lényegében azonos módon végeztünk kísérleteket, azzal a különbséggel, hogy második antitestként HRP-vel konjugált kecskeeredetű anti-egér IgG Fc-fragmenst alkalmaztunk. Hasonlóan a humán anti-trkC antitestek esetében megfigyeltekhez, a D5-domén helyettesítése az összes tesztelt egéreredetű anti-trkC monoklonális antitesthez történő kötődést megszüntette (6/B ábra). Ezen túlmenően, a D4-domén helyettesítése a 2248-as egéreredetű anti-trkC antitesthez történő kötődését is megszüntette. A humán és egéreredetű agonista anti-trkC monoklonális antitestek, minden valószínűség szerint, egy 5. doménben található epitópot ismernek fel, kivéve a 2248-as egéreredetű antitestet, amely egy 4. doménben lévő determinánst is felismer. Úgy tűnik, a 2248-as epitóp egy olyan lineáris epitóp, amely a 4. és 5. domén határán átfedő. Más lehetőség szerint, a 2248-as antitest egy másodlagos struktúrát ismerhet fel, amelyet egy nem folytonos epitóp a 4. és 5. doménből származó determinánsokkal alkot. Érdekes, hogy korábban Urfer és mtsai. [*J. Biol. Chem.* **273**, 5829 (1998)] megállapították a trkC-receptor 5. doménjének NT-3-mal való köl-



csönhatásban betöltött kiemelkedő szerepét. Meglepő módon, a találmány szerinti antitestek a trkC olyan epitópjához kötődnek, amely nagymértékben átfedő az NT-3 által felismert epitóppal. Ez az NT-3 és az immunglobulin-molekulák relatív mérete és alakja miatt meglepő. Ezen aktivátorok valószínű hatásmechanizmusa két trkC-molekula extracelluláris doménjeinek keresztkötése, oly módon, hogy azok intracelluláris tirozin kináz doménjeit érintkezésbe hozzák, és kereszt-foszforilálják, illetve aktiválják azokat.

Megállapították, hogy a homodimer NT-3-ban a molekula trkC-receptorral interakcióba lépő két területe a molekula átmérőjét tekintve egymással szemben (180° -ban) helyezkedik el. A két terület közötti távolság 16 Angström nagyságrendű. Ezzel szemben, a találmány szerinti immunglobulin-molekulákban a trkC-val interakcióba lépő két hely nem egymással szemben helyezkedik el. Azon túlmenően, hogy a immunglobulinok trkC-kötő doménjei az NT-3 doménjeitől eltérő szögben helyezkednek el, az immunglobulinokban a trkC-kötő doméneket sokkal nagyobb távolság választja el egymástól, mint az NT-3-ban, ami a két Fab-domén pontos szögétől függően változik, de 50-150 Angström tartományba esik. Mindezek alapján, nehéz lett volna előre látni, hogy két ilyen nagyon különböző keresztkötő reagens, mint az NT-3 és a találmány szerinti, agonista aktivitású monoklonális antitestek, a trkC ugyanazon helyére kötődve agonistaként működjenek.

Helyspecifikus mutagenézis

Az 5. domén egyes kiválasztott aminosavainak az anti-trkC antitestek általi felismerésben betöltött szerepének meghatározására helyspecifikus mutagenézist alkalmaztunk. A 7. ábrán a humán trkC 4. és 5. doménjének aminosav-szekvenciáját mutatjuk be. A pontokkal megjelölt aminosavakat alaninnal helyettesítettük, kivéve a 284. leucint (L), a 286. leucint és a 287. glutaminsavat (E), melyeket – sorrendben – glutaminsavval (E), hisztidinnel (H), illetve lizinnel (K) helyettesítettünk [Urfer és mtsai.: J. Biol. Chem. **273**, 5829 (1998)]. Összesen 26 egyszeres aminosav-mutációt hajtottunk végre, és vizsgáltuk ezek hatását a receptor anti-trkC monoklonális antitestekhez történő kötődésére. Az 5. táblázatban látható értékek a mutáns trkC, illetve a vad típusú trkC anti-trkC antitesthez történő kötődésének arányát reprezentálják. A variáció minimalizálása és hatékony összehasonlítás biztosítása érdekében mindegyik antitest esetében mindegyik mutánsra meghatároztuk az EC_{50} -értékeket, és azt elosztottuk a vad típusú trkC-re kapott EC_{50} -értékkel.

5. táblázat

trkC- mutáns	NT- 3*	2.5.1	6.1.2	6.4.1	2344	2345	2349	2248	2250	2253	2256	1436
trkC	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
R275A	1,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E280A	0,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E283A	1,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L284E	1,1	n.k.	n.k.	n.k.	n.k.	n.k.	n.k.	0,7	0,6	0,7	1,1	0,8
R285A	1,5	1,1	1,2	0,8	0,9	1,0	0,9	0,8	2,6	0,9	n.k.	0,4
L286H	1,2	0,6	1,3?	n.k.	0,9	0,5	0,6	0,6	0,4	0,4	0,6	0,6
E287K	27,3	n.k.	n.k.	n.k.	n.k.	n.k.	n.k.	0,6	0,8	0,7	0,7	0,6
E291A	1,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R295A	11,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Q309A	1,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R312A	0,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
K315A	0,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H318A	1,0	0,8	1,1	0,7	0,8	1,0	0,7	1,0	1,0	0,8	0,8	1
E320A	1,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E324A	1,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E329A	1,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N335A	37,8	n.k.	n.k.	0,3	n.k.	n.k.	1,5	0,6	0,5	0,5	0,5	0,6
K336A	0,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T338A	30,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H339A	1,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
K350A	1,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Q358A	1,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
K366A	0,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E367A	1,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D372A	1,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E373A	1,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

A „-” jelek azt jelzik, hogy az adott mutáns a kezdeti tesztben nem befolyásolta a monoklonális antitest kötődését, ezért további tesztelésnek nem vetettük alá. A monoklonális antitest kötődését teljesen megszüntető mutációkat „n.k.”-val jelöltük (nem tapasztalható kötődés). A vizsgálat eredményei azt mutatják, hogy a tesztelt agonista aktivitású anti-trkC monoklonális antitestek trkC-felismeréséhez a trkC-receptor L284, E287 és N335 aminosavai járulnak hozzá legna-



gyobb mértékben. Az trkC 5. doménjének NT-3-mal alkotott komplexének modellje megmutatja az antitest komplementaritást meghatározó régióival közeli kontaktusban lévő aminosavak elhelyezkedését (8. ábra). E modell a trkA 5. doménje és az NGF között kialakult komplex kristályszerkezetén alapul. További részleteket illetően ld. pl. Urfer és mtsai.: *J. Biol. Chem.* **273**, 5829 (1998) vagy Ultsch és mtsai.: *J. Biol. Chem.* **290**, 149 (1999).

Az antitest variábilis régióinak klónozása és szekvenálása

A trkC és az anti-trkC monoklonális antitestek közötti interakció molekuláris alapjának jobb megértése érdekében az agonista aktivitású antitestek nehéz és könnyű láncai variábilis szekvenciáit klónoztuk, és meghatároztuk a kódoló DNS-szekvenciákat. A humán és egérezedett anti-trkC monoklonális antitesteket termelő hibridómasejtekből – RNS-izoláló reagenskészlet (La Jolla, CA, USA) alkalmazásával – össz-RNS-t izoláltunk. Az izolált RNS-t „SuperScript II” rendszer (Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD, USA) felhasználásával és a megfelelő nehéz, illetve könnyű lánc alcsoportból [Kabat és Wu, *J. Immunol.* **147**, 1709 (1991)] származó 4. vázregió szekvenciáin alapuló specifikus 3'-primerk alkalmazásával végzett reverz transzkripcióval cDNS-sé írtuk át. A polimeráz-láncreakciót a nehéz és könnyű láncok N-terminális aminosav-szekvenciája alapján tervezett, specifikus 5'-primerek, illetve a cDNS-szintézisnél használtakkal azonos 3'-primerek alkalmazásával, 2,5 M DMSO jelenlétében, AmpliTaq DNS-polimerázzal (Perkin Elmer, Foster City, CA, USA) hajtottuk végre. A PCR-termékeket F(ab)'₂-vektorba szubklónoztuk, amely humán nehéz és könnyű láncból származó konstans régiókat egyaránt tartalmazott [Carter és mtsai.: *Bio/Technology* **10**, 163 (1992)]. A V_H- és V_L-doménéből öt-öt klónt szekvenáltunk, és azonosítottunk egy konszenzus-szekvenciát.

Az agonista aktivitású anti-trkC monoklonális antitestek nehéz láncának leszármaztatott aminosav-szekvenciáit a 9. ábrán mutatjuk be [2250: 42. azonosítószámú szekvencia (SEQ ID NO: 42); 2253: 43. azonosítószámú szekvencia (SEQ ID NO: 43); 2256: 44. azonosítószámú szekvencia (SEQ ID NO: 44); 6.1.2: 45. azonosítószámú szekvencia (SEQ ID NO: 45); 6.4.1: 46. azonosítószámú szekvencia (SEQ ID NO: 46); 2345: 47. azonosítószámú szekvencia (SEQ ID NO: 47); és 2349: 48. azonosítószámú szekvencia (SEQ ID NO: 48)]. Az agonista anti-trkC monoklonális antitestek könnyű láncának leszármaztatott aminosav-szekvenciáit a 10. ábrán mutatjuk be [2250: 49. azonosítószámú szekvencia (SEQ ID NO: 49); 2253: 50. azonosítószámú szekvencia (SEQ ID NO: 50); 2256: 51. azonosítószámú szekvencia (SEQ ID NO: 51); 6.1.2: 53. azonosítószámú szekvencia (SEQ ID NO: 53); 6.4.1: 53. azonosítószámú szekvencia (SEQ ID NO: 53); 2345: 54. azonosítószámú szekvencia (SEQ ID NO: 54); és 2349: 55. azonosítószámú szekvencia (SEQ ID NO: 55)]. A 9. és 10. ábrán a komplementaritást meghatározó régiókat CDR1-nek, CDR2-nek és CDR3-nak nevezzük, és az e régiókat alkotó aminosavakat félkövér betűtípussal szedve jelöljük. A 11. ábrán különböző anti-trkC monoklonális antitestek

nehéz, illetve könnyű lánc CDR-régióinak aminosav-szekvenciáit foglaljuk össze, feltüntetve azokat a nehéz, illetve könnyű lánc variábilis családokat, amelyekhez e szekvenciák tartoznak.

Az agonista aktivitású anti-trkC monoklonális antitestek nehéz és könnyű láncai CDR-régióinak meghatározott aminosav-szekvenciája alapján e régiók közül többre is érvényes általános képletet írhatunk le. Az egérszárított antitestek nehéz láncának CDR1-régiója a következő általános képlettel írható le: XaaWXaaXaaWVK (37. azonosítószámú szekvencia; SEQ ID NO: 37), amelyben az 1. pozícióban lévő Xaa jelentése: F vagy Y; a 3. pozícióban lévő Xaa jelentése: I vagy M; és a 4. pozícióban lévő Xaa jelentése: E vagy H. Az egérszárított antitestek nehéz láncának CDR2-régiója a következő általános képlettel írható le: EIXaaPXaaXaaXaaXaaTNYNEKFKXaa (38. azonosítószámú szekvencia; SEQ ID NO: 28), amelyben a 3. pozícióban lévő Xaa jelentése: L vagy Y; a 6. pozícióban lévő Xaa jelentése: S vagy N; a 7. pozícióban lévő Xaa jelentése: D vagy G; a 8. pozícióban lévő Xaa jelentése: N vagy R; és a 16. pozícióban lévő Xaa jelentése: G vagy S. Az egérszárított antitestek nehéz láncának CDR3-régiója a következő képletekkel írható le: KNRNYYGNYYVV (12. azonosítószámú szekvencia; SEQ ID NO: 12) vagy KYYYGNYSYRSWYFDV (13. azonosítószámú szekvencia; SEQ ID NO: 13). A humán anti-trkC antitestek esetében a nehéz lánc CDR1-régió a következő általános képlettel írható le: XaaXaaXaaYYWXaa (39. azonosítószámú szekvencia; SEQ ID NO: 39), amelyben az 1. pozícióban lévő Xaa jelentése: S vagy I; a 2. pozícióban lévő Xaa jelentése: G vagy S; a 3. pozícióban lévő Xaa jelentése: G, T vagy Y; és a 7. pozícióban lévő Xaa jelentése: S vagy N. A humán nehéz lánc CDR2-régió a következő általános képlettel írható le: XaaIXaaXaaSGSXaaTXaaNPSLKS (40. azonosítószámú szekvencia; SEQ ID NO: 40), amelyben az 1. pozícióban lévő Xaa jelentése: Y vagy R; a 3. pozícióban lévő Xaa jelentése: Y vagy F; a 4. pozícióban lévő Xaa jelentése: Y vagy T; a 8. pozícióban lévő Xaa jelentése: S vagy R; és a 10. pozícióban lévő Xaa jelentése: N vagy Y. A humán antitestek nehéz lánc CDR3-régiója az alábbi képletekkel írható le: DRDYDSTGDYYSYGMMDV (14. azonosítószámú szekvencia; SEQ ID NO: 14), DGGYSNPFD (15. azonosítószámú szekvencia; SEQ ID NO: 15) vagy ERLAAAGXaaDYYYNGLXaaV (41. azonosítószámú szekvencia; SEQ ID NO: 28; ahol a 8. pozícióban lévő Xaa jelentése: A vagy T, és a 16. pozícióban lévő Xaa jelentése: D vagy A).

A nehéz és könnyű láncok variábilis régióinak leszármaztatott aminosav-szekvenciáját ezen antitestek N-terminális peptidszekvenciájának meghatározásával ellenőriztük. A proteint elektroblot módszerrel BioRad „Trans-Blot” cellában, 250 mA konstans áramerősség alkalmazásával, egy óra alatt Millipore „Immobilon-PSQ” típusú membránokra vittük át [Matsudaira: J. Biol. Chem. 262, 10035 (1987)]. A PVDF-membránt 50 %-os metanolban 0,1 % Coomassie-Blue R250 festékkel 30 másodpercig festettük, majd a felesleges színezéket 10 % ecetsavat tartalmazó 50 %-os metanollal végzett 2-3 perces kezeléssel eltávolítottuk. A memb-

ránt vízzel alaposan leöblítettük, megszáritottuk és 20 °C-on tároltuk. Az automatizált proteinszekvenálást Perkin-Elmer 494A típusú proteinszekvenátor (Perkin-Elmer Corporation, Foster City, CA, USA) és hozzá on-line kapcsolt PTH-analizátor alkalmazásával végeztük. A PVDF-membránra elektroblot módszerrel átvitt proteint 6 mm-es üvegkazettában szekvenáltuk. A csúcsokat – Nelson Analytical 760 interface-ek alkalmazásával – Justice Innovation szoftverrel integráltuk. A szekvencia interpretálására DEC Alpha-t alkalmaztunk [Henzel és mtsai.: J. Chromatography 404, 41-52 (1987)]. A 6. táblázatban agonista aktivitású, humán és egérezetű anti-trkC monoklonális antitestek – N-terminális aminosav-szekvenciájukon alapuló – osztályozását foglaljuk össze.

6. táblázat

Humán anti-trkC	Nehéz lánc	Könnyű lánc
6.1.2	II. alcsoport	Kappa-I
6.4.1	II. alcsoport	Kappa-I
2345	II. alcsoport	Kappa-III
2349	II. alcsoport	Kappa-III
2.5.1	II. alcsoport	Kappa-I
2344	II. alcsoport	Kappa-I
Egérezetű anti-trkC		
2248	IIA alcsoport	Kappa-I
2250	IIA alcsoport	Kappa-I
2253	IIA alcsoport	Kappa-IV
2256	IIA alcsoport	Kappa-III

2. példa

Az agonista aktivitású anti-trkC monoklonális antitestek neuropathiákra gyakorolt hatása kísérleti állatmodellben

Az NT-3 agonistáinak alapvető alkalmazási területe a perifériás neuropathiák kezelése és/vagy megelőzése. Ismeretes, hogy a helyzetérzékelés (proprioceptio) és rezgésérzékelés közvetítésében szerepet játszó, vastag rostú, myelinhüvelyes szenzoros neuronok trkC-t termelnek, amely az NT-3 nagy affinitású receptoraként funkcionál. Az ilyen vastag rostos neuropathiák általánosan jellemzőek a cukorbetegségre (diabetes), és kialakulásukat bizonyos kemoterápiás hatóanyagok (különösen a ciszplatin és piridoxin) is indukálják. Az NT-3 a kísérleti diabeteses neuropathia és a ciszplatin-indukálta neuropathia állatmodelljeiben hatékonyan bizonyult, azonban alkalmazhatóságát erősen korlátozza gyenge biológiai hozzáférhetősége, amit rácsa-

lómodellben bizonyítottak. Az anti-trkC monoklonális antitestek NT-3 agonistáiként történő alkalmazása számos előnyt kínál, és megoldást nyújt több, NT-3 alkalmazásával összefüggő potenciális problémára.

Az agonista aktivitású anti-trkC monoklonális antitestek *in vivo* felezési idejének megállapítása érdekében az antitesteket intravénásan vagy szubkután kísérleti állatokba injektáltuk. A 12. ábrán a 2256-os monoklonális antitest patkányok vérsavójában – 1 mg/kg dózissal intravénásan (IV), illetve 5 mg/kg dózissal szubkután (subQ) végzett injektálás után különböző időpontokban – mért koncentrációit mutatjuk be. A vérsavó-koncentrációkat KIRA-teszt alkalmazásával határoztuk meg, amelyben a teljesen működőképes 2256-os antitest mennyiségét a trkC tirozin-autofoszforylációját növelő képessége alapján mértük. A kapott adatok azt jelzik, hogy patkányban a 2256-os monoklonális antitest felezési ideje 9 nap, biológiai hozzáférhetősége pedig 69 % (szubkután adagolást követően). Ezek az eredmények összhangban vannak az egyéb antitestekre kapott értékekkel, és élesen különböznek az NT-3 eredményeitől. A 12. ábrán feltüntetjük az NT-3 (2256-os monoklonális antitest esetén alkalmazottakkal) azonos dózisaiknak azonos módon (1 mg/kg i.v.; 5 mg/kg szubkután) végzett adagolását követően kapott koncentrációit. Ezek az adatok azt jelzik, hogy az NT-3 felezési ideje nagyságrendileg 4-5 perc, szubkután biológiai hozzáférhetősége pedig 7 %. Ezen eredmények tanúsága szerint az antitestek – a biológiai hozzáférhetőség és az *in vivo* felezési idő tekintetében – jelentős javulást jelentenek az NT-3-hoz képest.

A vastag rostos szenzoros neuropathia két állatmodelljében kimutatták, hogy az NT-3 képes a kémiai behatás hatásaival szembeni védelemre, illetve a káros hatások visszafordítására. Az NT-3 igen nagy dózisairól bebizonyosodott, hogy a vastag rostú szenzoros neuronokat megvédi a piridoxin nagy dózisainak toxikus hatásaitól, míg az NT-3 kisebb dózisairól kimutatták, hogy a ciszplatín káros hatásainak visszafordítását eredményezik. Mivel az NT-3 és a találmány szerinti, agonista aktivitású monoklonális antitestek szöveti megoszlása között különbségek lehetnek, lényeges megállapítani, hogy a monoklonális antitestek *in vitro* aktivitása állatmodellekben hatásosnak bizonyul-e.

A ciszplatín-indukálta neuropathia állatmodelljének létrehozása érdekében kifejlett patkányoknak intraperitoneálisan, 16 héten át hetente kétszer 1 mg/kg ciszplatint adagoltunk. Ezt követően a patkányokat négy csoportra osztottuk; mind a négy csoportnak folytattuk a ciszplatín hetente kétszeri adagolását, és ezen felül, az első csoportnak 1 mg/kg dózisban, hetente háromszor NT-3-at; a második csoportnak 1 mg/kg dózisban, hetente egyszer 2256-os monoklonális antitestet; a harmadik csoportnak 1 mg/kg dózisban, hetente egyszer 6.4.1-es monoklonális antitestet, a negyedik csoportnak pedig hetente háromszor sóoldatot adtunk. Az NT-3-at szubkután, míg a monoklonális antitesteket és a sóoldatot intravénásan adagoltuk. Ezt a kezelési sémát további négy héten át végeztük, így a ciszplatint összesen húsz héten át adagoltuk.



A vastag rostos szenzoros neuronok funkcióját a kísérleti állatokban elektrofiziológias módszerrel, H-hullám regisztrálással [Gao és mtsai.: *Ann. Neurol.* **38**(1), 30 (1995)] értékeltük. Ahogy a 13. ábrán látható, a szenzoros ingerületvezetési sebesség a cisplatinnal és csak sóoldattal kezelt állatokban nagyon alacsony volt. A hetente háromszori NT-3-kezelés e csökkentett vezetési sebesség javulását eredményezte, csakúgy, mint a 2256-os, illetve 6.4.1-es monoklonális antitesttel végzett heti egyszeri kezelés. A hetente egyszer alkalmazott monoklonális antitestek által előidézett javulás nagysága legalább akkora volt, mint a hetente háromszor adagolt NT-3 által eredményezett javulás.

Szintén ismeretes a piridoxin szenzoros neuropathiát okozó hatása, amely elsősorban a szenzoros neuronok vastag myelinhüvellyű alpopulációját károsítja [Helgren és mtsai.: *J. Neurosci.* **17**(1), 372 (1997)]. Helgren és mtsai. kimutatták, hogy az NT-3 nagy dózisokban gátolja a neuropathia e fajtájának kialakulását. Az állatok két különböző piridoxin-dózissal (400 vagy 600 mg/kg/nap), intraperitoneálisan végzett kezelése a DRG vastag neuronjainak károsodását eredményezi, ami több olyan protein termelődésének csökkenésével mutatható ki, melyekről ismert, hogy elsősorban vagy kizárólag a DRG vastag rostú neuronjai termelik. E markerek expressziós szintjét a kódoló mRNS mennyiségének mérése alapján, TAQMAN RT-PCR technika alkalmazásával határoztuk meg.

A trkC-agonista hatások „Taqman” RT-PCR analízise

A) Próbák és láncindító oligonukleotidok (primerek)

NFL:

5'-primer: CAGCAGAACAAGGTCCTGGAA (21mer, 72. azonosítószámú szekvencia; SEQ ID NO: 72);

3'-primer: AGCGGGAAGGCTCTGAGTG (19mer, 73. azonosítószámú szekvencia; SEQ ID NO: 77);

Próba: AGCTGTTGGTGCTGCGCCAGAA (22mer, 74. azonosítószámú szekvencia; SEQ ID NO: 74);

NSE:

5'-primer: TCCATTGAAGACCCATTCGAC (21mer, 75. azonosítószámú szekvencia; SEQ ID NO: 75);

3'-primer: GCCGACATTGGCTGTGAAC (19mer, 76. azonosítószámú szekvencia; SEQ ID NO: 76);

Próba: AGGATGACTGGGCAGCTTGGTCCA (24mer, 77. azonosítószámú szekvencia; SEQ ID NO: 77);

TRKC:

5'-primer: CAGCCCACTGCACCATATCA (20mer, 78. azonosítószámú szekvencia; SEQ ID

NO: 78);

3'-primer: CTGTATCCGGCCCAGCAT (18mer, 79. azonosítószámú szekvencia; SEQ ID NO: 79);

Próba: CCATGGCATCACTACACCTTCATCGCT (27mer, 80. azonosítószámú szekvencia; SEQ ID NO: 80);

CALRET:

5'-primer: TGGGAAAATTGAGATGGCAGA (21mer, 81. azonosítószámú szekvencia; SEQ ID NO: 81);

3'-primer: GCTGCCTGAAGCACAAAAGG (20mer, 82. azonosítószámú szekvencia; SEQ ID NO: 82);

Próba: CGCAGATCCTGCCAACCGAAGAGA (24mer, 83. azonosítószámú szekvencia; SEQ ID NO: 83);

PARVALB.:

5'-primer: GACACCACTCTTCTGGAAAATGC (23mer, 84. azonosítószámú szekvencia; SEQ ID NO: 84);

3'-primer: TTGCCAAACCAACACCTACCA (21mer, 85. azonosítószámú szekvencia; SEQ ID NO: 85);

Próba: ATCGGACACCACCTGTAGGGAGGACC (26mer, 86. azonosítószámú szekvencia; SEQ ID NO: 86);

GAPDH:

5'-primer: CAGTGGCAAAGTGGAGATTGT (21mer, 87. azonosítószámú szekvencia; SEQ ID NO: 87)

3'-primer: AATTGCGCGTGAGTGGAGTC (20mer, 88. azonosítószámú szekvencia; SEQ ID NO: 88)

Próba: CCATCAACGACCCCTTCATTGACCTC (26mer, 89. azonosítószámú szekvencia; SEQ ID NO: 89).

A próbákat és primereket Primer Express (ABI-Perkin-Elmer) alkalmazásával terveztük. A primerek és próbák kiválasztásának alapelveit illetően ld. Williams és Tucker: PCR Applications, Academic Press, 365-375. old. (1999).

B) Össz-RNS előállítása és mennyiségi analízise

Foszfátpufferelt sóoldattal perfuzionált patkányokból L4-et és L5-öt metszettünk ki. A bal és jobb oldalakat külön kémcsővekben izoláltuk. A standard görbék készítéséhez használt össz-RNS kinyeréséhez a kontroll patkányokból valamennyi DRG-t kivágtuk. Az össz-RNS-t „Qiagen Rneasy” mini oszlopok alkalmazásával izoláltuk. A szövet homogenizálását a gyártó útmutatásai szerint végeztük. Az össz-RNS mennyiségi analízisét „Ribogreen Quantitation”

reagenskészlet (Molecular Probes) alkalmazásával, a gyártó útmutatásai szerint hajtottuk végre.

C) Reverz transzkriptázos polimeráz-láncreakció

50 µl reakcióelegyben 25 ng össz-RNS-t alkalmaztunk, kivéve a standard görbe elkészítéséhez használt reakcióelegyeket, melyek esetében 500 ng, 250 ng, 25 ng, illetve 2,5 ng össz-RNS-t használtunk. A reakcióelegyek összetétele a következő volt: mindkét primerből 25 pmol; mindegyik dNTP-ből 0,2 mM; 100 nM fluoreszcens jelölésű oligonukleotid-próba; 1xRT-PCR-puffer (PE Biosystems); 2,0 mM MgCl₂; 20 egység RNáz-inhibitor; 12,5 MuLV reverz transzkriptáz (RT, PE Biosystems); és 2,5 egység Ampitaq Gold polimeráz (PE Biosystems). A reverz transzkripciót 48 °C-on 30 perces, majd – az Ampitaq Gold polimeráz aktiválása és a reverz transzkriptáz inaktiválása érdekében – 95 °C-on 10 perces inkubálással végeztük, és a polimeráz-láncreakciót 40 ciklus ismétlésével, ciklusonként 95 °C-on 15 másodpercig és 60 °C-on 90 másodpercig végzett inkubálással hajtottuk végre.

D) A génexpresszió mennyiségi analízise

A háztartási gén és a vizsgált gének standard görbéinek elkészítéséhez – mindegyik „Taqman” reakció esetében – kontroll RNS-t alkalmaztunk. A standard görbét úgy kaptuk, hogy a „Taqman” reakcióval kapott ciklus határértéket (Ct, „*threshold cycle*” a detektálási limit eléréséhez szükséges ciklusszám) a hozzáadott kontroll össz-RNS mennyisége tízes alapú logaritmusának függvényében ábrázoljuk. A kapott lineáris egyenletet a log RNS értékre oldottuk meg. A kísérleti Ct-érték behelyettesítésével a kísérleti génexpressziós értékhez jutunk, és tízet ezen érték hatványára emelve a kísérleti génexpresszió nanogrammban kifejezett nagyságát kapjuk.

Ahogy a 14. ábrán látható, a két hetes piridoxinos kezelés dóziszfüggő módon csökkentette a neurofilament könnyű lánc (NFL), neuronspecifikus enoláz (NSE), trkC és calretinin expresszióját. Az expresszió csökkentésének dóziszfüggése, illetve nagyságrendje markerről markerre változó, ami azt jelzi, hogy e proteinek a neuronkárosodás különböző érzékenységgű markereiként funkcionálnak.

A 15. ábrán a piridoxin kisebb dóziséval (400 mg/kg/nap) és a 2256-os monoklonális antitest két különböző dóziséval kezelt állatok esetében kapott eredményeket mutatjuk be. Az NFL és NSE expressziója e piridoxin-dózissal jelentős mértékű csökkentést mutatott. A 2256-os monoklonális antitest 1 mg/kg/hét dóziséval szubkután végzett kezelés teljesen gátolta az expresszió csökkenését, míg ugyanezen antitest 1 mg/kg/hét dózisa nem befolyásolta kimutathatóan a proteinek expresszióját. A kis dózísú piridoxin-kezelés sem a trkC-expressziót, sem a calretinin-expressziót nem befolyásolta jelentős mértékben, azonban a 2256-os monoklonális antissztel végzett kezelés a trkC-expressziót ténylegesen a kontroll szint fölé növelte.

Ha az állatokat a piridoxin nagyobb (600 mg/kg/nap) dóziséval kezeljük, az NFL, NSE és calretinin expressziója nagyon alacsony szintre csökken, míg a trkC-expresszió a kontroll érték kb. 50 %-ára esik vissza (ld. 16. ábra). Ha a piridoxinnal együtt a 2256-os monoklonális antitestet is adagoltuk (1 vagy 5 mg/kg dózisban), a trkC és calretinin expressziójának csökkenése jelentős mértékben (de nem teljesen) gátlás alá került. A 2256-os antitesttel kezelt állatokban az NFL és NSE expressziója esetében is látható némi védettség, de ez statisztikailag nem szignifikáns. Ilyenformán, a 2256-os monoklonális antitest – a vastag rostú szenzoros neuropathia több biokémiai markerének alkalmazása esetén – alkalmasnak bizonyult a piridoxinos kezelés toxicitásának enyhítésére.

A piridoxin-indukálta neuropathia elektrofiziológiai és viselkedéstani hatásainak tanulmányozása céljából patkányokat 8 napon keresztül, naponta kétszer 400 mg/kg piridoxinnal kezeltünk. A patkányok nagy átmérőjű szenzoros afferens idegpályáinak működését elektrofiziológiai módszerrel – az ún. ülőideg (nervus ischiadicus) combnál és lábikránál végzett stimulálása után –, a lábizmok M-hullám (direkt motoros) és H-hullám (reflex szenzoros) reakcióinak regisztrálásával teszteltük [ld. Gao és mtsai.: *Ann. Neurol.* 38(1), 30 (1995)]. A piridoxinnal végzett nyolcnapos kezelés a szenzoros reakció amplitúdójának (motoros reakcióéhoz viszonyított) jelentős mértékű csökkenését eredményezte (ld. 18. ábra). A 2256-os monoklonális antitesttel végzett együttes kezelés jelentős mértékben gátolta a szenzoros reakció amplitúdójának piridoxin-indukálta csökkenését; ez hasonló az NT-3 nagyon nagy dózisainak (20 mg/kg/nap) – Helgren és mtsai. [ld. fentebb] által leírt – hatásához.

A piridoxinnal fentiek szerint kezelt állatokat proprioceptív (helyzet- és mozgásérzékelő) funkciókra is teszteltük. A patkányokat arra tréningeztük, hogy erős fény- és hanginger elől egy vízszintes létrán sötét dobozba meneküljenek. Az állatokat alulról videófelvételen rögzítettük, és – kezelésüket nem ismerő megfigyelővel – arra vonatkozólag értékeltettük, hogy hátsó lábukat miként helyezik a létrafokokra. Minden egyes lépést a következők alapján kellett értékelni: jó lépés: lécfogás a lábközépcsont (metatarsus) elülső részén, közvetlenül az ujjak mögött, és az ujjak a létrafokot azonnal átfogják; kemény lépés: a talp nem közvetlenül a lábujjak utáni részen, de szilárdan érinti a létrafokot, miközben a lábujjak gyakran nem fogják át azt; részleges lábhiba: a talp alig (az ujjak elülső részén vagy a sarok hátsó részén) érinti a létrafokot, de tartja a testsúlyt; lábhiba: a talp nem érinti a létrafokot vagy olyan gyengén érinti, hogy testsúly-áthelyezéskor az állat lába a lécek közé esik. A normális patkányok nagyon gyorsan megtanulják a helyes lépéseket, ami a hátsó láb térbeli helyzetének kiváló proprioceptív érzékelését igényli. Piridoxinnal (400 mg/kg, nyolc napig naponta kétszer) végzett kezelést követően a feladat megoldása kevésbé volt sikeres: a jó lépések százalékos aránya csaknem 30 %-kal csökkent, miközben a lábhibák és részleges lábhibák százalékos aránya nőtt (ld. 18. ábra). Ha a patkányoknak a piridoxinos kezelés ideje alatt 2256-os monoklonális antitestet adagoltunk, az

állatok sokkal jobb teljesítményt mutattak: a jó lépések aránya kevésbé csökkent, a lábhibák és részleges lábhibák aránya pedig kisebb mértékben nőtt.

Összegzésül; a 2256-os monoklonális antitesttel végzett együttes kezelés enyhíti a piridoxin toxikus hatásait, amit biokémiai, elektrofiziológiai és viselkedési jellemzők egyaránt alátámasztanak.

Miután megállapítottuk, hogy az anti-trkC monoklonális antitestek terápiás szempontból legalább olyan hatásosak, mint az NT-3, a zavaró hiperalgesziás jelenség előfordulását vizsgáltuk. Az NT-3 adagolásának ezen mellékhatása rácsálóknál (ld. 19. ábra), illetve emberekben tapasztalható [Chaudhary és mtsai.: *Muscle and Nerve* 23, 189 (2000)]. Patkányokat Hargreaves készülék alkalmazásával a hátsó lábak hőérzékelésére tréningeztünk és teszteltünk, majd intravénásan 1 mg/kg 2256-os monoklonális antitestet vagy tarkójukba szubkután 1 mg/kg NT-3-at adtunk be. Az oltást követően két, négy és hat órával ismét meghatároztuk a hőre reagálva adott lábelhúzások latenciáidejét. Ahogy a 19. ábrán látható, az NT-3 adagolása az injekciót követően négy és hat órával jelentős mértékű hiperalgesziát okozott, míg a 2256-os monoklonális antitest semmilyen hatást nem gyakorolt a hő okozta fájdalomérzetre. Ilyenformán, a neuropathia visszafordítására vagy megelőzésére hatásosnak bizonyult dózisokban, az NT-3 a túlzott fájdalomérzet növekedését eredményezi, miközben a 2256-os monoklonális antitestnek nincs ilyen hatása.

A ciszplatin (amely általánosan használt kemoterápiás hatóanyag) olyan szenzoros neuropathiát okoz, amelyre a rezgésérzékelés és helyzetérzékelés szelektív romlása jellemző. Kísérleteinkkel bizonyítottuk, hogy a neurotrophin-3 (NT-3), amely a neurotroph faktorok idegsejt-eredetű növekedési faktor családjának tagja, patkányokban normális szintre állítja vissza a H-reflexszel összefüggő szenzoros idegek ingerületvezetési sebességének ciszplatin-indukálta csökkenését. Az NT-3-mal végzett kezelés helyreállította a dorzális gyökérganglion vastag rostos szenzoros neuronjaiban lévő neurofilament-protein rendellenes citoplazmikus eloszlását és a lábikra-idegekben lévő myelinhüvelyes rostok számának ciszplatin-indukálta csökkenését. A ciszplatin-indukálta neurotoxicitás NT-3-dependens visszafordítása azt sugallja, hogy az NT-3 alkalmazható lehet a perifériás szenzoros neuropathia kezelésére.

Kifejlett patkányokat piridoxin (B6-vitamin) nagy dózisaival hosszú ideig végzett kezelése a proprioceptív érzékelés jelentős romlását idézte elő, hasonlóan az e vitamin túladagolása vagy a ciszplatinos kezelés által emberekben okozott hatásokhoz. A piridoxin toxicitása az egyszerű és pontos mozgató és érzékelő idegi funkciók hiányaként és a nagy átmérőjű, vastag rostú gerincvelői szenzoros neuronok degenerációjaként manifesztálódik. A neurotrophin-3 (NT-3) 5-20 mg/kg/nap dózisainak – hosszú időtartamú piridoxinos kezeléssel együttes – szubkután adagolása nagymértékben csökkentette a piridoxin toxicitásával kapcsolatos viselkedési és elektrofiziológiai következményeket, amit kvantitatívan a perifériás idegstimuláció által keltett

H-hullámok EMG-regisztrálásával határoztunk meg. Ezen túlmenően, az NT-3 adagolása megelőzte a gerincvelő dorzális oszlopában lévő szenzoros idegrostok degenerációját. Ezek az eredmények összhangban vannak azzal a ténnyel, hogy az NT-3 az izmok szenzoros afferens idegpályáinak céleredetű neurotroph faktora, és arra utalnak, hogy az NT-3 farmakológiai dózissai hatásosak lehetnek a vastag rostos szenzoros neuropathiák kezelésére.

Biológiai anyagok letétbe helyezése

Az alábbi hibridóma-sejtvonalakat és plazmidokat 2000. június 21-én az American Type Culture Collection-nél (ATCC; 10801 University Boulevard, Manassas, CA 20110-2209, USA), helyeztük letétbe:

<u>Hibridóma/plazmid jelölése</u>	<u>ATCC nyilvántartási szám</u>
2.5.1	PTA
6.1.2	PTA-2148
6.4.1	PTA-2150
2344	PTA-2144
2345	PTA-2146
2349	PTA-2153
2248	PTA-2147
2250	PTA-2149
2253	PTA-2145
2256	PTA-2152
DNS pXCA-2250HL	PTA-2136
DNS pXCA-2253HL	PTA-2137
DNS pXCA-2256HL	PTA-2138
DNS pXCA-6.1.2H	PTA-2141
DNS pXCA-6.4.1H	PTA-2143
DNS pXCA-2345H	PTA-2142
DNS pXCA-2349H	PTA-2133
DNS vegf4chim-6.1.2L	PTA-2134
DNS vegf4chim-6.4.1L	PTA-2135
DNS vegf4chim-2345L	PTA-2139
DNS vegf4chim-2349L	PTA-2140

A hibridómákat és plazmidokat a mikroorganizmusok szabadalmi eljárás céljából történő letétbe helyezése nemzetközi elismeréséről szóló Budapesti Szerződés értelmében helyeztük

letétbe, ami biztosítja az életképes tenyészetek letétbe helyezés dátumától számított 30 évig történő fenntartását. A letétbe helyezett organizmusoknak – a Budapesti Szerződés rendelkezéseinek és a Genentech Inc. és az ATCC közötti megállapodásnak megfelelően [amely a vonatkozó egyesült államokbeli szabadalom megadása vagy az egyesült államokbeli vagy más országbeli szabadalmi bejelentés közzététele után (akármelyik is történjék korábban) a tenyészetek utódsejteinek folyamatos és korlátlan hozzáférhetőségét biztosítja a köz számára, valamint az U.S. Commissioner of Patents and Trademarks szerint (a 35 USC 122. paragrafus, valamint a vonatkozó törvények alapján, ideértve a 37 CFR 1.12 paragrafust, különös tekintettel a 886 OG 638-ra) arra jogosultak számára] – az ATCC-nél hozzáférhetőnek kell lenniük.

Azon letétbe helyezett anyagok vonatkozásában, amelyekre európai szabadalmat kívánnak bejegyeztetni, a letétbe helyezett mikroorganizmus mintáját az európai szabadalom megadásának közzétételéig vagy a szabadalmaztatási igény elutasításának, visszavonásának vagy a visszavonás vélelmezett időpontjáig hozzáférhetőnek kell maradnia, oly módon, hogy a mintát kérő által megnevezett szakértő számára mintát adnak [28(4) EPC törvény].

A jelen találmány jogosultja megállapodást kötött, hogy amennyiben a letétbe helyezett tenyészetek megfelelő feltételek mellett végzett tenyésztés során elpusztulnának, elvésznek vagy megsemmisülnének, bejelentés alapján azonos tenyészet életképes mintáival azonnal pótlásra kerülnek. A letétbe helyezett törzsek hozzáférhetősége nem tekinthető arra vonatkozó engedélyként, hogy a találmány szerinti megoldás gyakorlati kivitelezése a szabadalmi törvények biztosította jogok megsértésével végrehajtható lenne.

A találmány leírását elégségesnek tartjuk arra, hogy a találmány szerinti megoldás szakember számára kivitelezhető legyen. A találmány oltalmi köre nem korlátozódik a letétbe helyezett konstrukciókra, mivel azok a találmány bizonyos szempontjainak szemléltetését szolgálják, és valamennyi, funkcionálisan egyenértékű konstrukció a találmány igényelt oltalmi körébe tartozik. A fentebb említett anyagok letétbe helyezése nem jelenti annak elismerését, hogy a találmány leírása elégtelen a találmány szerinti megoldás bármely szempontja gyakorlati kivitelezéséhez (ideértve azok legjobb megvalósítási módjait is), illetve nem jelentik az igénypontok specifikus megvalósítási módokra történő korlátozását. A találmány leírása alapján szakember számára kézenfekvő, hogy a találmány szerinti megoldás gyakorlati kivitelezésében különféle módosítások hajthatók végre anélkül, hogy eltérnénk a találmányi gondolat lényegétől. Az ilyen megoldások az igényelt oltalmi körön belül maradnak.

A leírás alapján szakember számára nem okoz gondot a kitanítás konkrét problémák vagy helyzetek megoldására való alkalmazása. A találmány szerinti termékeket, valamint az azok jellemző izolálási, alkalmazási és előállítási eljárásait bemutató példák nem tekinthetők a találmány igényelt oltalmi körének korlátozásaként.

Szekvencialista

Szekvenciák száma: 89

<110> Genentech, Inc.

Devaux, Brigitte

Hongo, Jo-Anne S.

Presta, Leonard G.

Shelton, David L.

<120> AGONISTA ANTI-TRK-C MONOKLONÁLIS ANTITESTEK

<130> GENENT.040QPC

<140> 60/238,319

<141> 2000-10-05

<160> 89

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 7

<212> PRT

<213> Egér

<400> 1

Phe Trp Ile Glu Trp Val Lys
1 5

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> Egér

<400> 2

Tyr Trp Met His Trp Val Lys
1 5

<210> 3

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Ser Gly Gly Tyr Tyr Trp Ser
1 5

<210> 4

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Ile Ser Thr Tyr Tyr Trp Asn

1

5

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Ser Gly Tyr Tyr Tyr Trp Ser
1 5

<210> 6

<211> 17

<212> PRT

<213> Egér

<400> 6

Glu Ile Leu Pro Gly Ser Asp Asn Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15
Gly

<210> 7

<211> 17

<212> PRT

<213> Egér

14353

<400> 7

Glu	Ile	Tyr	Pro	Ser	Asn	Gly	Arg	Thr	Asn	Tyr	Asn	Glu	Lys	Phe	Lys
1				5					10					15	
Ser															

<210> 8

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Tyr	Ile	Tyr	Tyr	Ser	Gly	Ser	Thr	Asn	Tyr	Asn	Pro	Ser	Leu	Lys	Ser
1				5					10					15	

<210> 9

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Arg	Ile	Tyr	Thr	Ser	Gly	Ser	Thr	Asn	Tyr	Asn	Pro	Ser	Leu	Lys	Ser
1				5					10					15	

<210> 10

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Tyr	Ile	Phe	Tyr	Ser	Gly	Arg	Thr	Tyr	Tyr	Asn	Pro	Ser	Leu	Lys	Ser
1				5					10					15	

<210> 11

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Tyr	Ile	Tyr	Tyr	Ser	Gly	Arg	Thr	Tyr	Tyr	Asn	Pro	Ser	Leu	Lys	Ser
1				5					10					15	

14353

<210> 12

<211> 11

<212> PRT

<213> Egér

<400> 12

Lys Asn Arg Asn Tyr Tyr Gly Asn Tyr Val Val
1 5 10

<210> 13

<211> 15

<212> PRT

<213> Egér

<400> 13

Lys Tyr Tyr Tyr Gly Asn Ser Tyr Arg Ser Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10 15

<210> 14

<211> 18

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Asp Arg Asp Tyr Asp Ser Thr Gly Asp Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Gly Met
1 5 10 15
Asp Val

<210> 15

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

Asp Gly Gly Tyr Ser Asn Pro Phe Asp

1

5

<210> 16

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

Glu	Arg	Ile	Ala	Ala	Ala	Gly	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Tyr	Asn	Gly	Leu	Asp
1				5					10					15	
Val															

<210> 17

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

Glu	Arg	Ile	Ala	Ala	Ala	Gly	Thr	Asp	Tyr	Tyr	Tyr	Asn	Gly	Leu	Ala
1				5					10					15	
Val															

<210> 18

<211> 15

<212> PRT

<213> Egér

<400> 18

Arg	Ala	Ser	Lys	Ser	Val	Ser	Thr	Ser	Gly	Tyr	Ser	Tyr	Met	His
1				5					10				15	

<210> 19

<211> 10

<212> PRT

<213> Egér

<400> 19

Ser	Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Ser	Tyr	Met	Tyr
1				5				10	

<210> 20

<211> 15

<212> PRT

<213> Egér

1433

<400> 20

Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Ile Ser Phe Met Asn
1 5 10 15

<210> 21

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

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

<210> 22

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

Lys Ser Ser Gln Ser Val Ser Tyr Ser Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15
Ala

<210> 23

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn Tyr Leu Thr
1 5 10

<210> 24

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

Arg Ala Ser Gln Ser Gly Ser Ser Thr Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 25

<211> 7

<212> PRT

<213> Egér

<400> 25

Leu Val Ser Asn Leu Glu Ser
1 5

<210> 26

<211> 7

<212> PRT

<213> Egér

<400> 26

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser

1

5

<210> 27

<211> 7

<212> PRT

<213> Egér

<400> 27

Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser
1 5

<210> 28

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 29

<211> 7

14353

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 29

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
1 5

<210> 30

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

<210> 31

<211> 9

<212> PRT

<213> Egér

<400> 31

Gln His Ile Arg Glu Leu Thr Arg Ser
1 5

<210> 32

<211> 9

<212> PRT

<213> Egér

<400> 32

Gln Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Leu Thr
1 5

<210> 33

<211> 9

<212> PRT

<213> Egér

<400> 33

Gln Gln Ser Lys Glu Val Pro Arg Thr
1 5

<210> 34

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 34

Leu Gln His Asn Ser Leu Pro Leu Thr
1 5

<210> 35

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 35

Gln Gln His Tyr Asn Thr Pro Leu Thr
1 5

<210> 36

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 36

Gln Gln Tyr Gly Arg Ser Pro Pro Ile Thr
1 5 10

<210> 37

<211> 7

<212> PRT

<213> Egér

<220>

<221> UNSURE

<222> 1

<223> Xaa = F vagy Y

<221> UNSURE

<222> 3

<223> Xaa = I vagy M

<221> UNSURE <222> 4

<223> Xaa = E vagy H

<400> 37

Xaa	Trp	Xaa	Xaa	Trp	Val	Lys
1				5		

<210> 38

<211> 17

<212> PRT

<213> Egér

<220>

<221> UNSURE

<222> 3

<223> Xaa = L vagy Y

<221> UNSURE

<222> 5

<223> Xaa = G vagy S

<221> UNSURE

<222> 6

<223> Xaa = S vagy N

<221> UNSURE

<222> 7

<223> Xaa = D vagy G

<221> UNSURE

<222> 8

<223> Xaa = N vagy R

<221> UNSURE

<222> 17

<223> Xaa = G vagy S

<400> 38

Glu	Ile	Xaa	Pro	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Thr	Asn	Tyr	Asn	Glu	Lys	Phe	Lys
1				5					10					15	
Xaa															

<210> 39

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> UNSURE

<222> 1

<223> Xaa = S vagy I

<221> UNSURE

<222> 2

<223> Xaa = G vagy S

<221> UNSURE

<222> 3

<223> Xaa = G, T vagy Y

<221> UNSURE

<222> 7

<223> Xaa = S vagy N

<400> 39

Xaa	Xaa	Xaa	Tyr	Tyr	Trp	Xaa
1				5		

<210> 40

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> UNSURE

<222> 1

<223> Xaa = Y vagy R

<221> UNSURE

<222> 3

<223> Xaa = Y vagy F

<221> UNSURE

<222> 4

<223> Xaa = Y vagy T

<221> UNSURE

<222> 8

<223> Xaa = S vagy R

<221> UNSURE

<222> 10

<223> Xaa = N vagy Y

<400> 40

Xaa	Ile	Xaa	Xaa	Ser	Gly	Ser	Xaa	Thr	Xaa	Asn	Pro	Ser	Leu	Lys	Ser
1				5					10					15	

<210> 41

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> UNSURE

<222> 8

<223> Xaa = A vagy T

<221> UNSURE

<222> 16

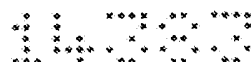
<223> Xaa = D vagy A

<400> 41

Glu	Arg	Ile	Ala	Ala	Ala	Gly	Xaa	Asp	Tyr	Tyr	Tyr	Asn	Gly	Leu	Xaa
1				5					10					15	
Val															

<210> 42

<211> 122



<212> PRT

<213> Egér

<400> 42

Asn	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Leu	Met	Gln	Pro	Gly
1			5					10						15	
Ala	Ser	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ser	Thr	Gly	Tyr	Thr	Phe	Ser	Asn
		20						25					30		
Phe	Trp	Ile	Glu	Trp	Val	Lys	Gln	Arg	Pro	Gly	His	Gly	Leu	Glu	Trp
	35					40					45				
Ile	Gly	Glu	Ile	Leu	Pro	Gly	Ser	Asp	Asn	Thr	Asn	Tyr	Asn	Glu	Lys
	50					55				60					
Phe	Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Phe	Thr	Ala	Asp	Thr	Ser	Ser	Asn	Thr	Ala
65				70					75					80	
Tyr	Met	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr
			85					90					95		
Cys	Ala	Arg	Lys	Asn	Arg	Asn	Tyr	Tyr	Gly	Asn	Tyr	Val	Val	Trp	Gly
			100					105					110		
Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ala	Cys						
		115					120								

<210> 43

<211> 122

<212> PRT

<213> Egér

<400> 43

Asn	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Leu	Met	Gln	Pro	Gly
1			5					10						15	
Ala	Ser	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ser	Thr	Gly	Tyr	Thr	Phe	Ser	Asn
		20						25					30		
Phe	Trp	Ile	Glu	Trp	Val	Lys	Gln	Arg	Pro	Gly	His	Gly	Leu	Glu	Trp
	35					40					45				
Ile	Gly	Glu	Ile	Leu	Pro	Gly	Ser	Asp	Asn	Thr	Asn	Tyr	Asn	Glu	Lys
	50					55				60					
Phe	Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Phe	Thr	Ala	Asp	Thr	Ser	Ser	Asn	Thr	Ala
65				70					75					80	
Tyr	Met	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr
			85					90					95		
Cys	Ala	Arg	Lys	Asn	Arg	Asn	Tyr	Tyr	Gly	Asn	Tyr	Val	Val	Trp	Gly
			100					105					110		
Ala	Gly	Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Cys								
		115					120								

<210> 44

<211> 126

<212> PRT

<213> Egér

14303

<400> 44

```

Asn Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly
 1          5          10          15
Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser
 20          25          30
Tyr Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp
 35          40          45
Ile Gly Glu Ile Tyr Pro Ser Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys
 50          55          60
Phe Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala
 65          70          75          80
Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr
 85          90          95
Cys Ala Arg Lys Tyr Tyr Tyr Gly Asn Ser Tyr Arg Ser Trp Tyr Phe
100          105          110
Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Cys
115          120          125

```

<210> 45

<211> 130

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 45

```

Asn Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser
 1          5          10          15
Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser
 20          25          30
Gly Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu
 35          40          45
Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro
 50          55          60
Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln
 65          70          75          80
Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
 85          90          95
Tyr Cys Thr Arg Asp Arg Asp Tyr Asp Ser Thr Gly Asp Tyr Tyr Ser
100          105          110
Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
115          120          125
Ser Cys
130

```

<210> 46

<211> 119

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 46

```

Asn Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg Pro Ser
 1          5          10          15

```

14000

```

Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Thr
      20      25      30
Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Ala Gly Lys Gly Leu Glu Trp
      35      40      45
Ile Gly Arg Ile Tyr Thr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
      50      55      60
Lys Ser Arg Val Thr Met Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
      65      70      75      80
Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
      85      90      95
Ala Arg Asp Gly Gly Tyr Ser Asn Pro Phe Asp Trp Gly Gln Gly Thr
      100      105      110
Leu Val Thr Val Ser Ser Cys
      115

```

<210> 47

<211> 129

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 47

```

Asn Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser
  1      5      10      15
Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser
      20      25      30
Gly Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln His Pro Glu Lys Gly Leu
      35      40      45
Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Phe Tyr Ser Gly Arg Thr Tyr Tyr Asn Pro
      50      55      60
Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln
      65      70      75      80
Phe Ser Leu Lys Leu Asn Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
      85      90      95
Tyr Cys Ala Arg Glu Arg Ile Ala Ala Gly Ala Asp Tyr Tyr Tyr
      100      105      110
Asn Gly Leu Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
      115      120      125
Cys

```

<210> 48

<211> 129

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 48

```

Asn Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser
  1      5      10      15
Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser
      20      25      30
Gly Tyr Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu
      35      40      45
Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro
      50      55      60
Ser Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln
      65      70      75      80

```

14383

Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Ala Arg Glu Arg Ile Ala Ala Gly Thr Asp Tyr Tyr Tyr
 100 105 110
 Asn Gly Leu Ala Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125
 Cys

<210> 49

<211> 112

<212> PRT

<213> Egér

<400> 49

Asn Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu
 1 5 10 15
 Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Tyr Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr
 20 25 30
 Ser Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Asn Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro
 35 40 45
 Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile
 65 70 75 80
 His Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ile
 85 90 95
 Arg Glu Leu Thr Arg Ser Ala Arg Gly Gln Ser Trp Lys Lys Arg Cys
 100 105 110

<210> 50

<211> 109

<212> PRT

<213> Egér

<400> 50

Asn Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro
 1 5 10 15
 Gly Gln Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr
 20 25 30
 Met Tyr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Leu Trp Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala
 65 70 75 80
 Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Cys
 100 105

<210> 51

<211> 114

<212> PRT

<213> Egér

<400> S1

```

Asn Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu
 1          5          10          15
Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn
          20          25          30
Tyr Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro
          35          40          45
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro
          50          55          60
Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Asn Ile
          65          70          75          80
His Pro Met Glu Glu Asp Asp Thr Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser
          85          90          95
Lys Glu Val Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Met Lys
          100          105          110
Arg Cys

```

<210> 52

<211> 110

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 52

```

Asn Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1          5          10          15
Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn
          20          25          30
Asp Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu
          35          40          45
Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
          50          55          60
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
          65          70          75          80
Pro Glu Asp Phe Ala Thr Phe Tyr Cys Leu Gln His Asn Ser Leu Pro
          85          90          95
Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Cys
          100          105          110

```

<210> 53

<211> 116

<212> PRT

<213> Homo sapiens



<400> 53

```

Asn Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu
 1          5          10          15
Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Ser Tyr
          20          25          30
Ser Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
          35          40          45
Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly
          50          55          60
Val Pro Asp Arg Ile Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu
65          70          75          80

```

```

Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln
          85          90          95
Gln His Tyr Asn Thr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu
          100          105          110
Ile Lys Arg Cys
          115

```

<210> 54

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 54

```

Asn Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro
 1          5          10          15
Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser
          20          25          30
Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu
          35          40          45
Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe
          50          55          60
Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu
65          70          75          80
Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Arg Ser
          85          90          95
Pro Pro Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg Cys
          100          105          110

```

<210> 55

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens



<400> 55

Asn	Gly	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Gly	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro
1			5						10				15		
Gly	Gln	Arg	Ala	Thr	Phe	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Gly	Ser	Ser
		20					25					30			
Thr	Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu
	35					40					45				
Leu	Ile	Tyr	Gly	Ala	Ser	Ser	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	Asp	Arg	Phe
	50				55					60					
Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Arg	Leu
65				70					75					80	
Glu	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Gly	Arg	Ser
			85					90					95		
Pro	Pro	Ile	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Arg	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	Cys
		100					105						110		

<210> 56

<211> 808

<212> PRT

<213> Homo sapiens

14300

<400> 56

Cys Pro Ala Asn Cys Val Cys Ser Lys Thr Glu Ile Asn Cys Arg Arg
 1 5 10 15
 Pro Asp Asp Gly Asn Leu Phe Pro Leu Leu Glu Gly Gln Asp Ser Gly
 20 25 30
 Asn Ser Asn Gly Asn Ala Asn Ile Asn Ile Thr Asp Ile Ser Arg Asn
 35 40 45
 Ile Thr Ser Ile His Ile Glu Asn Trp Arg Ser Leu His Thr Leu Asn
 50 55 60
 Ala Val Asp Met Glu Leu Tyr Thr Gly Leu Gln Lys Leu Thr Ile Lys
 65 70 75 80
 Asn Ser Gly Leu Arg Ser Ile Gln Pro Arg Ala Phe Ala Lys Asn Pro
 85 90 95
 His Leu Arg Tyr Ile Asn Leu Ser Ser Asn Arg Leu Thr Thr Leu Ser
 100 105 110
 Trp Gln Leu Phe Gln Thr Leu Ser Leu Arg Glu Leu Gln Leu Glu Gln
 115 120 125
 Asn Phe Phe Asn Cys Ser Cys Asp Ile Arg Trp Met Gln Leu Trp Gln
 130 135 140
 Glu Gln Gly Glu Ala Lys Leu Asn Ser Gln Asn Leu Tyr Cys Ile Asn
 145 150 155 160
 Ala Asp Gly Ser Gln Leu Pro Leu Phe Arg Met Asn Ile Ser Gln Cys
 165 170 175
 Asp Leu Pro Glu Ile Ser Val Ser His Val Asn Leu Thr Val Arg Glu
 180 185 190
 Gly Asp Asn Ala Val Ile Thr Cys Asn Gly Ser Gly Ser Pro Leu Pro
 195 200 205
 Asp Val Asp Trp Ile Val Thr Gly Leu Gln Ser Ile Asn Thr His Gln
 210 215 220
 Thr Asn Leu Asn Trp Thr Asn Val His Ala Ile Asn Leu Thr Leu Val
 225 230 235 240
 Asn Val Thr Ser Glu Asp Asn Gly Phe Thr Leu Thr Cys Ile Ala Glu
 245 250 255
 Asn Val Val Gly Met Ser Asn Ala Ser Val Ala Leu Thr Val Tyr Tyr
 260 265 270
 Pro Pro Arg Val Val Ser Leu Glu Glu Pro Glu Leu Arg Leu Glu His
 275 280 285
 Cys Ile Glu Phe Val Val Arg Gly Asn Pro Pro Pro Thr Leu His Trp
 290 295 300
 Leu His Asn Gly Gln Pro Leu Arg Glu Ser Lys Ile Ile His Val Glu
 305 310 315 320
 Tyr Tyr Gln Glu Gly Glu Ile Ser Glu Gly Cys Leu Leu Phe Asn Lys
 325 330 335
 Pro Thr His Tyr Asn Asn Gly Asn Tyr Thr Leu Ile Ala Lys Asn Pro
 340 345 350
 Leu Gly Thr Ala Asn Gln Thr Ile Asn Gly His Phe Leu Lys Glu Pro
 355 360 365
 Phe Pro Glu Ser Thr Asp Asn Phe Ile Leu Phe Asp Glu Val Ser Pro
 370 375 380
 Thr Pro Pro Ile Thr Val Thr His Lys Pro Glu Glu Asp Thr Phe Gly
 385 390 395 400
 Val Ser Ile Ala Val Gly Leu Ala Ala Phe Ala Cys Val Leu Leu Val
 405 410 415
 Val Leu Phe Val Met Ile Asn Lys Tyr Gly Arg Arg Ser Lys Phe Gly
 420 425 430
 Met Lys Gly Pro Val Ala Val Ile Ser Gly Glu Glu Asp Ser Ala Ser
 435 440 445
 Pro Leu His His Ile Asn His Gly Ile Thr Thr Pro Ser Ser Leu Asp
 450 455 460

14353

Ala	Gly	Pro	Asp	Thr	Val	Val	Ile	Gly	Met	Thr	Arg	Ile	Pro	Val	Ile
465					470					475					480
Glu	Asn	Pro	Gln	Tyr	Phe	Arg	Gln	Gly	His	Asn	Cys	His	Lys	Pro	Asp
			485						490						495
Thr	Tyr	Val	Gln	His	Ile	Lys	Arg	Arg	Asp	Ile	Val	Leu	Lys	Arg	Glu
			500					505					510		
Leu	Gly	Glu	Gly	Ala	Phe	Gly	Lys	Val	Phe	Leu	Ala	Glu	Cys	Tyr	Asn
	515						520					525			
Leu	Ser	Pro	Thr	Lys	Asp	Lys	Met	Leu	Val	Ala	Val	Lys	Ala	Leu	Lys
	530					535					540				
Asp	Pro	Thr	Leu	Ala	Ala	Arg	Lys	Asp	Phe	Gln	Arg	Glu	Ala	Glu	Leu
545					550					555					560
Leu	Thr	Asn	Leu	Gln	His	Glu	His	Ile	Val	Lys	Phe	Tyr	Gly	Val	Cys
			565						570					575	
Gly	Asp	Gly	Asp	Pro	Leu	Ile	Met	Val	Phe	Glu	Tyr	Met	Lys	His	Gly
	580							585					590		
Asp	Leu	Asn	Lys	Phe	Leu	Arg	Ala	His	Gly	Pro	Asp	Ala	Met	Ile	Leu
	595						600					605			
Val	Asp	Gly	Gln	Pro	Arg	Gln	Ala	Lys	Gly	Glu	Leu	Gly	Leu	Ser	Gln
	610					615					620				
Met	Leu	His	Ile	Ala	Ser	Gln	Ile	Ala	Ser	Gly	Met	Val	Tyr	Leu	Ala
625					630					635					640
Ser	Gln	His	Phe	Val	His	Arg	Asp	Leu	Ala	Thr	Arg	Asn	Cys	Leu	Val
			645						650					655	
Gly	Ala	Asn	Leu	Leu	Val	Lys	Ile	Gly	Asp	Phe	Gly	Met	Ser	Arg	Asp
	660							665					670		
Val	Tyr	Ser	Thr	Asp	Tyr	Tyr	Arg	Leu	Phe	Asn	Pro	Ser	Gly	Asn	Asp
	675						680					685			
Phe	Cys	Ile	Trp	Cys	Glu	Val	Gly	Gly	His	Thr	Met	Leu	Pro	Ile	Arg
	690					695					700				
Trp	Met	Pro	Pro	Glu	Ser	Ile	Met	Tyr	Arg	Lys	Phe	Thr	Thr	Glu	Ser
705					710					715					720
Asp	Val	Trp	Ser	Phe	Gly	Val	Ile	Leu	Trp	Glu	Ile	Phe	Thr	Tyr	Gly
			725						730					735	
Lys	Gln	Pro	Trp	Phe	Gln	Leu	Ser	Asn	Thr	Glu	Val	Ile	Glu	Cys	Ile
			740					745					750		
Thr	Gln	Gly	Arg	Val	Leu	Glu	Arg	Pro	Arg	Val	Cys	Pro	Lys	Glu	Val
	755						760					765			
Tyr	Asp	Val	Met	Leu	Gly	Cys	Trp	Gln	Arg	Glu	Pro	Gln	Gln	Arg	Leu
	770					775					780				
Asn	Ile	Lys	Glu	Ile	Tyr	Lys	Ile	Leu	His	Ala	Leu	Gly	Lys	Ala	Thr
785					790					795					800
Pro	Ile	Tyr	Leu	Asp	Ile	Leu	Gly								
				805											

<210> 57

<211> 2607

<212> DNS

<213> Homo sapiens

<400> 57

```

tgccctgcaa attgtgtctg cagcaagact gagatcaatt gccggcgccc ggaagatggg 60
aacctcttcc cctccttgga agggcaggat tcagggaaca gcaatgggaa cgccaatctc 120
aacatcacgg acatctcagg gaatatcact tccatacaca tagagaactg gcgcagtctt 180
cacacgctca aogccgtgga catggagctc tacaccggac ttcaaaagct gaccatcaag 240
aactcaggac ttccggagcat tcagcccaga gcctttgcca agaaccoccc tttgcgttat 300
ataaacctgt caagtaaccg gctcaccaca ctctcgtggc agctcttcca gacgctgagt 360

```



cttcgggaat	tgcagttgga	gcagaacttt	ttcaactgca	gctgtgacat	ccgctggatg	420
cagctctggc	aggagcaggg	ggaggccaag	ctcaacagcc	agaacctcta	ctgcatcaat	480
gctgatggct	cccagcttcc	tctcttccgc	atgaacatca	gtcagtggtg	ccttccctgag	540
atcagcgtga	gccacgtcaa	cctgaccgta	cgagaggggtg	acaatgctgt	tatcaacttgc	600
aattgctctg	gatcaccctt	tctgtatgtg	gactggatag	tcaactgggt	gcagtccatc	660
aacactcacc	agaccaatct	gaactggacc	aattgttcag	ccatcaactt	gacgctgggt	720
aattgtgaga	gtgaggacaa	tggcttcacc	ctgacgtgca	ttgcagagaa	cgtggtgggc	780
atgagcaatg	ccagtgttgc	cctcaactgtc	tactatcccc	cacgtgtggt	gagcctggag	840
gagcctgagc	tggccttggg	gcactgcac	gagtttgttg	tgcgtggcaa	ccccccacca	900
acgctgcact	ggctgcacaa	tgggcagcct	ctgcggggagt	ccaagatcat	ccatgtggaa	960
tactaccaag	agggagagat	ttccgagggc	tgcctgctct	tcaacaagcc	cacccactac	1020
aacaatggca	actataccct	cattgccaac	aacccactgg	gcacagccaa	ccagaccatc	1080
aattggccact	tcccaagga	gccccttcca	gagagcacgg	ataactttat	cctgtttgac	1140
gaagtggatc	ccacacctcc	tatcaactgtg	acccacaaac	cagaagaaga	cacttttggg	1200
gtatccatag	cagttggact	tgcgtctttt	gcctgtgtcc	tgttgggtgt	tctcttctgc	1260
atgatcaaca	aatatggctg	acggtccaaa	tttggaaatga	agggtccctg	ggctgtcatc	1320
agtgtgtgag	aggactcagc	cagccactgc	caccacatca	accacggcat	caccacgccc	1380
tctgactcgg	atgcggggcc	cgacactgtg	gtcattggca	tgactcgcac	ccctgtcatt	1440
gagaccccc	agtacttccg	tcaggggacac	aactgccaca	agccggacac	gtatgtgcag	1500
cacattaaga	ggagagacat	cgtgctgaag	cgagaactgg	gtgagggagc	ctttggaaag	1560
gtcttctcgg	ccgagtgcct	caaacctcagc	ccgaccaagg	acaagatgct	tgtggctgtg	1620
aaggccctga	aggatccac	cctggctgcc	cggaaggatt	tccagagggg	ggccgagctg	1680
ctcaccacac	tgcagcatga	gcacattgtc	aagttctatg	gagtgtgcgg	cgatggggac	1740
ccccctcatc	tggctcttga	atacatgaag	catggagacc	tgaataagtt	cctcagggcc	1800
catggggcag	atgcaatgat	ccttgtggat	ggacagccac	gccaggccaa	gggtgagctg	1860
gggctctccc	aaatgctcca	cattgccagt	cagatcgccct	cggttatggt	gtacctggcc	1920
tcccagcact	ttgtgcaccc	agacctggcc	accaggaact	gcctgggttg	agcgaatctg	1980
ctagtgaaga	ttggggactt	cgcatgtctc	agagatgtct	acagcaogga	ttattacagg	2040
ctctttaatc	catctggaaa	tgatttttgt	atatgggtgtg	agggtggagg	acacaccatg	2100
ctcccccattc	gctggatgcc	tcctgaaaagc	atcatgtacc	ggaagttcac	tacagagagt	2160
gatgtatgga	gcttcggggg	gatcctctgg	gagatcttca	cctatggaaa	gcagccatgg	2220
ttccaaactct	caaacacgga	ggtcattgag	tgcatcacc	aaggctcgtg	tttggagcgg	2280
ccccgagctc	gccccaaaga	ggtgtacgat	gtcatgctgg	ggtgctggca	gagggaaaca	2340
cagcagcggt	tgaacatcaa	ggagatctac	aaaatcctcc	atgctttggg	gaaggccacc	2400
ccaatctacc	tggacattct	tggctagtgg	tggctggtgg	tcatgaattc	atactctgtt	2460
gcctcctctc	tccttgcttc	acatctccct	tccacctcac	aactccttcc	atccttgact	2520
gaagcgaaca	tcttcatata	aactcaagtg	cctgctacac	atacaacact	gaaaaaagga	2580
aaaaaaaaga	aaaaaaaaaa	aaaccgc				2607

<210> 58

<211> 360

<212> DNS

<213> Egér

<400> 58

caggccaac	tgcagcagtc	tggggctgag	ctgatgcagc	ctggggcctc	agtgaagata	60
tccctgaagt	ctactggcta	cacattcagt	aacttctgga	tagagtgggt	aaagcagagg	120
cctggacatg	gccttgagtg	gattggagag	atcttaactg	gcagtataaa	tactaaactac	180
aattgagaagt	tcaaggggca	ggccacattc	actgcagata	catcctocaa	cacagccctac	240
atgcaactca	gcagcctgac	atctgaggac	tctgccgtct	attactgtgc	aagaagaagt	300
cgttaactact	atggtaacta	cgttgtatgg	ggccaaggga	ctctggtcac	tgtctctgca	360

<210> 59

<211> 330

<212> DNS

<213> Egér

<400> 59

```

gacattgtga tgaaccagtc tctgtcttcc ttagctgtat ctctggggca gaggggccacc 60
atctcataca gggccagcaa aagtgtcagt acatctggct atagtatat gcactgggaa 120
caacagaaac caggacagcc acccagactc ctcatctatc ttgtatccaa cctagaatct 180
gggggtccctg ccagggttcag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat 240
cctgtggagg agggagatgc tgcaacctat tactgtcagc acattaggga gottacacgt 300
tcggctcggg gacaaagttg gaaaaaacgg                                     330

```

<210> 60

<211> 360

<212> DNS

<213> Egér

<400> 60

```

cagggtccagc tgcagcagtc tggagctgag ctgatgcagc ctggggcctc agtgaagata 60
tcttgcaagt ctactggcta cacattcagt aacttctgga tagagtgggt aaagcagagg 120
cctggacatg gccttgagtg gattggagag attttacctg gcagtgataa tactaactac 180
aatgagaagt tcaagggcaa ggccacattc actgcagata catcctccaa cacagcctac 240
atgcaactca gcagcctgac atctgaggac tctgccgtct attactgtgc aagaaagaat 300
cgtaactact atggttaacta cgttgtctgg ggcgcaggca ccactctcac agtctcctca 360

```

<210> 61

<211> 321

<212> DNS

<213> Egér

<400> 61

```

caaattgtgc tgaaccagtc tccagcaatc atgtctgcac ctccagggga gaaggtcacc 60
ataacctgca gtgccagctc aagtgttaagt tacatgtact ggttccagca gaagccaggg 120
acttctccca aactctggat ttatagtaca tccaacctgg ctctctggag cctgtctcgc 180
ttcagtgga gtggatctgg gaactcttac tctctcacia tcagccgaat ggaggctgaa 240
gatgtgcca cttattactg ccagcaaagg agtagttacc cgctcacgtt cgggtgctggg 300
accaagctgg aactaaaacg g                                     321

```

<210> 62

<211> 372

<212> DNS

<213> Egér

<400> 62

```

cagggtccagc tgcagcagcc tggggctgaa ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagctg 60
tcttgcaagg cttctggcta caccctcacc agctactgga tgcactgggt gaagccaggg 120
cctggacaag gccttgagtg gattggagag atttatctca gcaacggctg tactaactac 180
aatgagaagt tcaagagcaa ggccacactg actgtagaca aatcctccag cacagcctac 240
atgcaactca gcagcctgac atctgaggac tctgccgtct attactgtgc aagaaaatat 300
tactaaggta atagctatcg ttcttggtac ttgatgtct ggggcgcagg caccactctc 360
acagtcctct ca

```

<210> 63

<211> 336

<212> DNS

<213> Egér

<400> 63

```
gacattgtgc tgaaccagtc tccagcttct ttggtgtgt ctctagggca gaggggccacc 60
atctcctgca gagccagcga aagtgttgat aattatggca ttagttttat gaactggttc 120
caacagaaac caggacagcc acccaaaactc ctcatctatg ctgcatecaa ccaaggatcc 180
```

```
ggggtccctg ccaggttttag tggcagtggg tctgggacag acttcagcct caacatccat 240
cctatggagg aggatgatac tgcaatgtat ttctgtcagc aaagtaagga ggttcctcgg 300
acgttcggtg gaggcaccaa gctggagatg aaacgg 336
```

<210> 64

<211> 381

<212> DNS

<213> Homo sapiens

<400> 64

```
caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc ctccacagac cctgtccctc 60
acctgcactg tctctgggtg ctccatcagc agtgggtggtt actactggag ctggatccgc 120
cagcaccagc aaaagggcct ggagtggatt gggatcatct ttacagtgg gaggacctac 180
tacaacccgt cctcaagag tcgagttacc atatcagtag acacgtctaa gaaccagttc 240
tccctgaagc tgaactctgt gactgcgcgc gacacggcgc tgtattactg tgcgagagag 300
cggatagcag cagctgggtc ggaactactc tacaacggtt tggacgtctg gggccaaggg 360
accaaggcca ccgtctcctc a 381
```

<210> 65

<211> 330

<212> DNS

<213> Homo sapiens

<400> 65

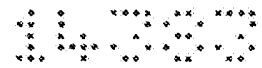
```
gaaattgtgt tgaacagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtc gagtgttagc agcaactact taacctggta ccagcagaaa 120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcattcc gcagggccac tggcatccca 180
gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaacctcag cagartggag 240
cctgaagatt ttgcagtgtt ttactgtcag cagtatggtc ggtcacctcc gatcaacctc 300
ggccaaggga cagcactgga gattaaacga 330
```

<210> 66

<211> 381

<212> DNS

<213> Homo sapiens



<400> 66

```
cagggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcacagac cctgtccctc 60
acctgcactg tctctggtgg ctccatcagc agtgggttatt attattggag ctggatccgc 120
cagcaccacag ggaagggcct ggagtggatt gggtagatct attacagtgg gaggacctac 180
tacaaccctg cctcaagag tgcattacc atatcagtag acacgtctaa gaaccagttc 240
tccctgaagc tgagctctgt gactgccgcg gacacggcgg tgtattactg tgcgagagag 300
cggtatgcag cagctggaac ggactactac tacaacgggt tggccgtctg gggccaaggg 360
accacggta cctctctctc a 381
```

<210> 67

<211> 330

<212> DNS

<213> Homo sapiens

<400> 67

```
ggaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccact 60
ttctcctgca gggccagtc gagtggttagc agcacctact tagcctggta ccagcagaaa 120
cctggccagg ctccagggt cctcatctat ggtgcattca gcagggccac tggcatccca 180
gacaggttca gtggcagtg gtctgggaca gacttcactc tcacctcag cagactggag 240
cctgaagatt ttgcagtgt ttactgtcag cagtattgga ggtcacctcc gatcacctc 300
ggccaagggg cagcactgga gattaaacga 330
```

<210> 68

<211> 384

<212> DNS

<213> Homo sapiens

<400> 68

```
cagggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcacagac cctgtccctc 60
acctgcactg tctctggtgg ctccatcagc agtgggtggt actactggag ctggatccgc 120
cagcaccacag ggaagggcct ggagtggatt gggtagatct attacagtgg gaggaccaa 180
tacaaccctg cctcaagag tgcattacc atatcagtag acacgtctaa gaaccagttc 240
tccctgaagc tgagctctgt gactgccgcg gacacggcgg tgtattactg tacgagagat 300
ogggactatg atagtaccgg ggattactac tctactacg gtatggacgt ctggggccaa 360
gggacacagc tcacctctc ctca 384
```

<210> 69

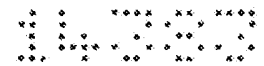
<211> 324

<212> DNS

<213> Homo sapiens

<400> 69

```
gatattcaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcct ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttggc gggcaagtc gggcattaga aatgatttag gctggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagcgcct gatctatgct gcattcagtt tgcaagtggt ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca caatcagcag cctgcagcct 240
gaagattttg caacttttta ctgtctacag cataatagtc ttccgctcac tttcggcgga 300
gggaccaagg tggagatcaa acga 324
```



<210> 70

<211> 354

<212> DNS

<213> Homo sapiens

<400> 70

```
cagggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaggc cttcggagac cctgtccctc 60
acctgcactg tctctggtgg ctccatcagt acttactact ggaactggat ccggcagccc 120
gccgggaagg gactggagtg gattgggcgt atctatacca gtgggagcac caactacaac 180
ccctccctca agagtccagt caccatgtca gtagacacgt ccaagaacca gttctccctg 240
aagctgagct ctgtgaccgc cgcggacacg gccgtgtatt actgtgcgag agatgggggc 300
tacagtaacc cttttgacta ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctaa 354
```

<210> 71

<211> 342

<212> DNS

<213> Homo sapiens

<400> 71

```
gatatacaga tgaccacagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggaga gagggccacc 60
atcaactgca agtcacagca gagtgtttca tacagctcca acaataagaa ctacttagct 120
tggtaccagg agaaacctgg acagcctcct aagctgtctc tttactgggc atctaccggg 180
gaatccgggg tccctgaccg aatcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc 240
atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcaacaaca ttataatact 300
ccactcactt tcggcggagg gaccaagggt gagatcaaac ga 342
```

<210> 72

<211> 21

<212> DNS

<213> Mesterséges szekvencia

<220>

<223> Szintetikus oligonukleotid

<400> 72

cagcagaaca aggtcctgga a 21

<210> 73

<211> 19

<212> DNS

<213> Mesterséges szekvencia

<220>

<223> Szintetikus oligonukleotid

<400> 73

agcgggaagg ctctgagtg 19

<210> 74.

<211> 22

<212> DNS

<213> Mesterséges szekvencia

<220>

<223> Szintetikus oligonukleotid

<400> 74

agctgttggt gctgcgccag aa 22

<210> 75

<211> 21

<212> DNS

<213> Mesterséges szekvencia

<220>

<223> Szintetikus oligonukleotid

<400> 75

tccattgaag acccattga c 21

<210> 76

<211> 19

<212> DNS

<213> Mesterséges szekvencia

<220>

<223> Szintetikus oligonukleotid

<400> 76

gccgacattg gctgtgaac 19

<210> 77

<211> 24

<212> DNS

<213> Mesterséges szekvencia

<220>

<223> Szintetikus oligonukleotid

<400> 77

aggatgactg gccagcttgg tcca 24

<210> 78

<211> 20

<212> DNS

<213> Mesterséges szekvencia

<220>

<223> Szintetikus oligonukleotid

<400> 78

cagccacatg caccatatca 20

<210> 79

<211> 18

<212> DNS

<213> Mesterséges szekvencia

<220>

<223> Szintetikus oligonukleotid

<400> 79

ctgtatccgg cccagcat 18

<210> 80

<211> 27

<212> DNS

<213> Mesterséges szekvencia

<220>

<223> Szintetikus oligonukleotid

<400> 80

ccatggcaic actaacatt catcgt 27

<210> 81

<211> 21

<212> DNS

<213> Mesterséges szekvencia

<220>

<223> Szintetikus oligonukleotid

<400> 81

tgggaaaatt gagatggcag a 21

<210> 82

<211> 20

<212> DNS

<213> Mesterséges szekvencia

<220>

<223> Szintetikus oligonukleotid

<400> 82

gctgcctgaa gcacaaaagg 20

<210> 83

<211> 24

<212> DNS

<213> Mesterséges szekvencia

<220>

<223> Szintetikus oligonukleotid

<400> 83

cgcagatcct gccaacggaa gaga 24

<210> 84

<211> 23

<212> DNS

<213> Mesterséges szekvencia

<220>

<223> Szintetikus oligonukleotid

<400> 84

gacaccactc ttctggaaaa tgc 23

<210> 85

<211> 21

<212> DNS

<213> Mesterséges szekvencia

<220>

<223> Szintetikus oligonukleotid

<400> 85

ttgccaaacc aacacctacc a 21



<210> 86

<211> 26

<212> DNS

<213> Mesterséges szekvencia

<220>

<223> Szintetikus oligonukleotid

<400> 86

atcggacacc acctgtaggaggaggacc 26

<210> 87

<211> 21

<212> DNS

<213> Mesterséges szekvencia

<220>

<223> Szintetikus oligonukleotid

<400> 87

cagtggcaaa gtggagattg t 21

<210> 88

<211> 20

<212> DNS

<213> Mesterséges szekvencia

<220>

<223> Szintetikus oligonukleotid

<400> 88

aatttggccgt gattggagtc 20

<210> 89

<211> 26

<212> DNS

<213> Mesterséges szekvencia

<220>

<223> Szintetikus oligonukleotid

<400> 89

ccatcaacga cccttcatt gacctc 26

Szabadalmi igénypontok

1. Agonista anti-trkC monoklonális antitest, amely
 - (a) nem mutat jelentős mértékű keresztreaktivitást a trkA-val vagy trkB-vel; és
 - (b) felismer egy epitópot a trkC 5. doménjében.
2. Az 1. igénypont szerinti antitest, amely a trkC 4. doménjében is felismer egy epitópot.
3. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti antitest, amely humán és patkányeredetű trkC-hoz egyaránt kötődik.
4. Az 1-3. igénypontok bármelyike szerinti antitest, amely humán antitest.
5. Az 1-3. igénypontok bármelyike szerinti antitest, amely egéreredetű antitest.
6. Az 5. igénypont szerinti antitest, amely humanizálva van.
7. Az 1-6. igénypontok bármelyike szerinti antitest, amely hatásos a cisplattinnal vagy piridoxinnal indukált neuropathia kezelésére.
8. Az 1-7. igénypontok bármelyike szerinti antitest, amely hatásos a diabeteses neuropathia kezelésére.
9. Az 1-8. igénypontok bármelyike szerinti antitest, amely betegnek történő adagolás során nem okoz hiperalgesziát.
10. Az 1-9. igénypontok bármelyike szerinti antitest, amely az NT-3-hoz képest fokozott biológiai hozzáférhetőségű.
11. Az 1-10. igénypontok bármelyike szerinti antitest, amely nagyobb specifikus aktivitású, mint az NT-3.
12. Agonista anti-trkC antitest, amely tartalmaz egy nehéz láncot, mely nehéz lánc a következő komplementaritást meghatározó régiókat (CDR) tartalmazza:
 - CDR1, amely a következő azonosítószámú szekvenciákból álló csoportból van kiválasztva: SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 és 5;
 - CDR2, amely a következő azonosítószámú szekvenciákból álló csoportból van kiválasztva: SEQ ID NO: 6, 7, 8, 9, 10 és 11; és
 - CDR3, amely a következő azonosítószámú szekvenciákból álló csoportból van kivá-



lasztva: SEQ ID NO: 12, 13, 14, 15, 16 és 17;
és amely antitest tartalmaz egy könnyű láncot, mely könnyű lánc a következő komplementaritást meghatározó régiókat (CDR) tartalmazza:

CDR1, amely a következő azonosítószámú szekvenciákból álló csoportból van kiválasztva: SEQ ID NO: 18, 19, 20, 21, 22, 23 és 24;

CDR2, amely a következő azonosítószámú szekvenciákból álló csoportból van kiválasztva: SEQ ID NO: 25, 26, 27, 28, 29 és 30; és

CDR3, amely a következő azonosítószámú szekvenciákból álló csoportból van kiválasztva: SEQ ID NO: 31, 32, 33, 34, 35 és 36;

ahol az „antitest” kifejezés magában foglalja a teljes hosszúságú antitesteket, multispecifikus antitesteket és antitest-fragmenseket, és ahol az említett agonista antitest hatásos egy trkC-receptor natív liganduma biológiai aktivitásának utánzására.

13. Egéreredetű agonista anti-trkC antitest, amely tartalmaz egy nehéz láncot, mely nehéz lánc a következő CDR-eket tartalmazza:

(a) XaaWXaaXaaWVK (SEQ ID NO: 37) általános képletű CDR1-régió, amelyben az 1. pozícióban lévő Xaa jelentése: F vagy Y; a 3. pozícióban lévő Xaa jelentése: I vagy M; és a 4. pozícióban lévő Xaa jelentése: E vagy H;

(b) EIXaaPXaaXaaXaaXaaTNYNEKFKXaa (SEQ ID NO: 38) általános képletű CDR2-régió, amelyben a 3. pozícióban lévő Xaa jelentése: L vagy Y; a 6. pozícióban lévő Xaa jelentése: S vagy N; a 7. pozícióban lévő Xaa jelentése: D vagy G; a 8. pozícióban lévő Xaa jelentése: N vagy R; és a 16. pozícióban lévő Xaa jelentése: G vagy S; és

(c) KNRNYYGNYYV (SEQ ID NO: 12) vagy KYYYGNSYRSWYFDV (SEQ ID NO: 13) képletű CDR3-régió;

és amely tartalmaz egy könnyű láncot, mely könnyű lánc a következő CDR-eket tartalmazza:

CDR1, amely a következő azonosítószámú szekvenciákból álló csoportból van kiválasztva: SEQ ID NO: 18, 19, 20, 21, 22, 23 és 24;

CDR2, amely a következő azonosítószámú szekvenciákból álló csoportból van kiválasztva: SEQ ID NO: 25, 26, 27, 28, 29 és 30; és

CDR3, amely a következő azonosítószámú szekvenciákból álló csoportból van kiválasztva: SEQ ID NO: 31, 32, 33, 34, 35 és 36;

ahol az „antitest” kifejezés magában foglalja a teljes hosszúságú antitesteket, multispecifikus antitesteket és antitest-fragmenseket, és ahol az említett agonista antitest hatásos egy trkC-receptor natív liganduma biológiai aktivitásának utánzására.

14. Humán agonista anti-trkC antitest, amely tartalmaz egy nehéz láncot, mely nehéz lánc a következő komplementaritást meghatározó régiókat (CDR) tartalmazza:



(a) XaaXaaXaaYYWXaa (SEQ ID NO: 39) általános képletű CDR1-régió, amelyben az 1. pozícióban lévő Xaa jelentése: S vagy I; a 2. pozícióban lévő Xaa jelentése: G vagy S; a 3. pozícióban lévő Xaa jelentése: G, T vagy Y; és a 7. pozícióban lévő Xaa jelentése: S vagy N;

(b) XaaIXaaXaaSGSXaaTXaaNPSLKS (SEQ ID NO: 40) általános képletű CDR2-régió, amelyben az 1. pozícióban lévő Xaa jelentése: Y vagy R; a 3. pozícióban lévő Xaa jelentése: Y vagy F; a 4. pozícióban lévő Xaa jelentése: Y vagy T; a 8. pozícióban lévő Xaa jelentése: S vagy R; és a 10. pozícióban lévő Xaa jelentése: N vagy Y; és

(c) DRDYDSTGDYYSYYGMDV (SEQ ID NO: 14), DGGYSNPFD (SEQ ID NO: 15) vagy ERIAAAGXaaDYYYNGLXaaV (SEQ ID NO: 41; melyben a 8. pozícióban lévő Xaa jelentése: A vagy T, és a 16. pozícióban lévő Xaa jelentése: D vagy A) képletű CDR3-régió;

ahol az „antitest” kifejezés magában foglalja a teljes hosszúságú antitesteket, multispecifikus antitesteket és antitest-fragmenseket, és ahol az említett agonista antitest hatásos egy trkC-receptor natív liganduma biológiai aktivitásának utánzására.

15. A 13. igénypont szerinti antitest, amely tartalmaz humán vázrégió („framework”) aminosavakat.

16. A 15. igénypont szerinti antitest, amely nem mutat jelentős mértékű keresztreaktivitást a trkA-val vagy trkB-vel.

17. A 15. igénypont szerinti antitest, amely diszulfid-kötéssel egymáshoz kapcsolt két nehéz antitest-lánc/könnyű antitest-lánc párból álló homotetramer szerkezettel rendelkezik.

18. A 15. igénypont szerinti antitest, amely az Fv, Fab, Fab' és F(ab')₂ fragmensekből álló csoportból kiválasztott antitest-fragmens.

19. A 14. igénypont szerinti antitest, amely nem mutat jelentős mértékű keresztreaktivitást a trkA-val vagy trkB-vel.

20. A 19. igénypont szerinti antitest, amely diszulfid-kötéssel egymáshoz kapcsolt két nehéz antitest-lánc/könnyű antitest-lánc párból álló homotetramer szerkezettel rendelkezik.

21. A 19. igénypont szerinti antitest, amely az Fv, Fab, Fab' és F(ab')₂ fragmensekből álló csoportból kiválasztott antitest-fragmens.

22. A 19. igénypont szerinti antitest, amely egy IgG.

23. A 22. igénypont szerinti antitest, amely egy IgG-2 vagy IgG-4.

24. Egéreredetű anti-trkC agonista antitest, amely a következő antitestekből álló cso-



portból van kiválasztva: 2248 (PTA-2147), 2250 (PTA-2149), 2253 (PTA-2145) és 2256 (PTA-2152).

25. Humán anti-trkC agonista antitest, amely a következő antitestekből álló csoportból van kiválasztva: 6.1.2 (PTA 2148), 6.4.1 (PTA-2150), 2345 (PTA-2146), 2349 (PTA-2153), 2.5.1 (PTA-2151) és 2344 (PTA-2144).

26. A 25. igénypont szerinti antitest, amely a következő antitestekből álló csoportból van kiválasztva: 6.1.2 (PTA 2148), 6.4.1 (PTA-2150), 2345 (PTA-2146) és 2349 (PTA-2153).

27. Izolált nukleinsav-molekula, amely egy 24. igénypont szerinti egérezetű anti-trkC agonista antitestet kódol.

28. Izolált nukleinsav-molekula, amely egy 25. igénypont szerinti humán anti-trkC agonista antitestet kódol.

29. Nukleinsav-molekula, amely az ATCC-nél 2000. június 21-én a következő nyilvántartási számok egyikén lett letétbe helyezve: PTA-2136, PTA-2137 és PTA-2138.

30. Nukleinsav-molekula, amely az ATCC-nél 2000. június 21-én a következő nyilvántartási számok egyikén lett letétbe helyezve: PTA-2133, PTA-2134, PTA-2135, PTA-2139, PTA-2140, PTA-2141, PTA-2142 és PTA-2143.

31. Vektor, amely a 27-30. igénypontok bármelyike szerinti nukleinsav-molekulát tartalmaz.

32. Gazdasejt-vonal, amely a 27-30. igénypontok bármelyike szerinti nukleinsav-molekulával van transzformálva.

33. Hibridóma-sejtvonal, amely a 27-30. igénypontok bármelyike szerinti nukleinsav-molekulával van transzformálva.

34. Antitest, amelyet egy 33. igénypont szerinti hibridóma-sejtvonal termelt.

35. Izolált nukleinsav-molekula, amely egy agonista anti-trkC monoklonális antitest nehéz láncát kódolja, és amely a következő azonosítószámú szekvenciákból álló csoportból kiválasztott nukleinsav-molekulát tartalmaz: SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 68 és SEQ ID NO: 70.

36. Izolált nukleinsav-molekula, amely egy agonista anti-trkC monoklonális antitest



könnyű láncát kódolja, és amely a következő azonosítószámú szekvenciákból álló csoportból kiválasztott nukleinsav-molekulát tartalmaz: SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 69 és SEQ ID NO: 71.

37. Vektor, amely 35. vagy 36. igénypont szerinti nukleinsav-molekulát tartalmaz.

38. Gazdasejt, amely 35. vagy 36. igénypont szerinti nukleinsav-molekulával van transzformálva.

39. Gazdasejt, amely egy 35. igénypont szerinti nukleinsav-molekulával és egy 36. igénypont szerinti nukleinsav-molekulával van transzformálva.

40. Hibridóma-sejtvonal, amely 35. vagy 36. igénypont szerinti nukleinsav-molekulával van transzformálva.

41. Hibridóma-sejtvonal, amely 35. igénypont szerinti nukleinsav-molekulával és egy 36. igénypont szerinti nukleinsav-molekulával van transzformálva.

42. Antitest, amelyet a 41. igénypont szerinti hibridóma-sejtvonal termel.

43. Gyógyászati készítmény, amely gyógyászatilag elfogadható hordozóval elegyítve az 1-26. igénypontok bármelyike szerinti antitest hatásos mennyiségét tartalmazza.

44. Az 1-26. igénypontok bármelyike szerinti antitest kezelési eljárásban történő alkalmazásra.

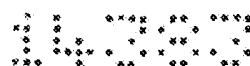
45. A 44. igénypont szerinti antitest, ahol a kezelés neuropathia vagy neurodegeneratív betegség kezelésére vagy sérült idegsejt regenerálására szolgál.

46. A 45. igénypont szerinti antitest, ahol az említett neuropathia a következőkből álló csoportból van kiválasztva: perifériás neuropathia, diabeteses neuropathia és vastag rostos szenzoros neuropathia.

47. A 45. igénypont szerinti antitest, ahol az említett neurodegeneratív betegség az amyotrophiás lateral sclerosis (ALS).

48. A 45. igénypont szerinti antitest, ahol az említett idegsejt egy szenzoros neuron vagy motoros neuron.

49. A 48. igénypont szerinti antitest, ahol az említett szenzoros neuron a dorzális gyökérganglionból származik.



50. A 48. igénypont szerinti antitest, ahol az említett motoros neuron a gerincvelőből származik.

51. A 45-50. igénypontok bármelyike szerinti antitest, amely intravénás vagy szubkután adagolásra alkalmas.

52. A 45-50. igénypontok bármelyike szerinti antitest, amely topikus adagolásra alkalmas.

53. A 44. igénypont szerinti antitest, ahol a kezelés a perifériás neuronok proliferációjának, fenntartásának vagy regenerálódásának serkentésére szolgál.

54. Az 1-26. igénypontok bármelyike szerinti antitestet kódoló izolált nukleinsav kezelési eljárásban történő alkalmazásra.

55. Az 54. igénypont szerinti nukleinsav, ahol a kezelés idegsejt-degenerációval járó betegség vagy állapot emlős páciensben történő kezelését jelenti, mely betegség vagy állapot a következőkből álló csoportból van kiválasztva: neuropathia, neurodegeneratív betegség és idegsejt-károsodás.

56. Az 55. igénypont szerinti nukleinsav, ahol a betegség vagy állapot a következőkből álló csoportból van kiválasztva: neuropathia és neurodegeneratív betegség.

57. Az 55. igénypont szerinti nukleinsav, ahol az említett sejt perifériás idegsejt.

58. Az 55. igénypont szerinti nukleinsav, ahol az említett nukleinsav *ex vivo* van a sejtbe juttatva.

59. Az 55. igénypont szerinti nukleinsav, ahol az említett nukleinsav az említett sejtbe történő *in vivo* bejuttatásra alkalmas.

60. Eljárás agonista anti-trkC antitest előállítására, amely

(a) nem mutat jelentős mértékű keresztreaktivitást a trkA-val vagy trkB-vel; és

(b) felismer egy epitópot a trkC 5. doménjében;

mely eljárás olyan antitest előállítását foglalja magában, amely a trkC natív NT-3 ligandumának kötési helyével átfedő helyen specifikusan kötődik a trkC-hez.

61. A 60. igénypont szerinti eljárás, ahol az említett antitest ugyanazon a helyen köti meg a trkC-t, mint a trkC natív NT-3 liganduma.

62. A 60. igénypont szerinti eljárás, ahol az említett antitest kötődik egy, a trkC 5. doménjén belüli epitóphoz.

63. A 60. igénypont szerinti eljárás, ahol az említett trkC egy natív humán trkC-polipeptid.

64. A 62. igénypont szerinti eljárás, ahol az említett epitóp magában foglalja az említett humán trkC L284, E287 és N335 aminosavait.

65. Az 1-26. igénypontok bármelyike szerinti antitest alkalmazása a 45-47. igénypontok bármelyikében megadott rendellenességek kezelésére alkalmas gyógyszer előállítására.

66. A 65. igénypont szerinti alkalmazás, ahol a kezelés a 48-50. igénypontok bármelyikében megadott sejtek kezelését jelenti.

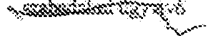
67. A 65. vagy 66. igénypont szerinti alkalmazás, ahol az említett gyógyszer az 51. vagy 52. igénypontban megadott adagolásra alkalmas.

68. Az 1-26. igénypontok bármelyike szerinti antitestet kódoló nukleinsav alkalmazása az 55. vagy 56. igénypontban megadott rendellenességek kezelésére szolgáló gyógyszer előállítására.

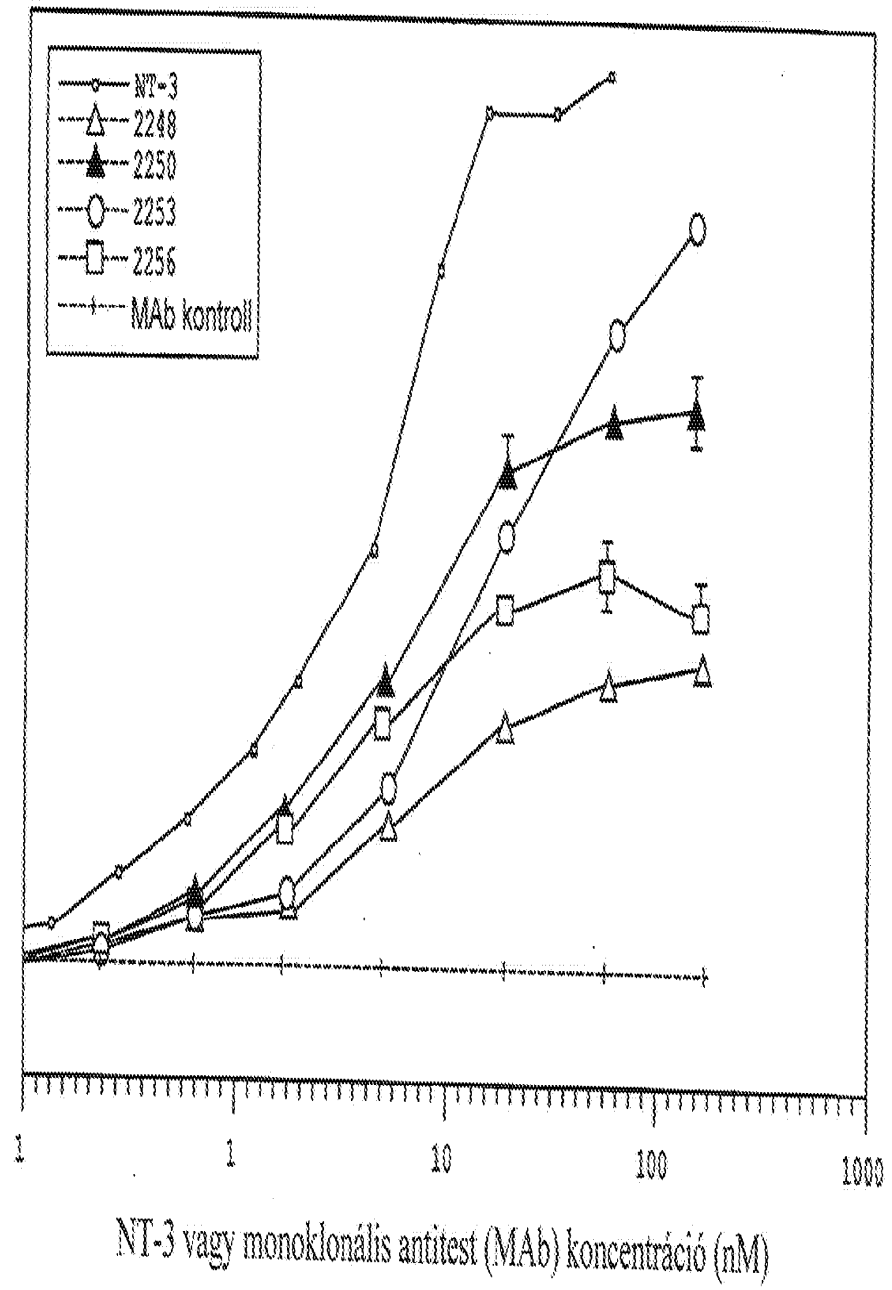
69. A 68. igénypont szerinti alkalmazás, ahol a kezelés egy perifériás idegsejt kezelését jelenti.

70. A 68. vagy 69. igénypont szerinti alkalmazás, ahol az említett nukleinsav az 58. vagy 59. igénypontban megadott bejuttatásra alkalmas.

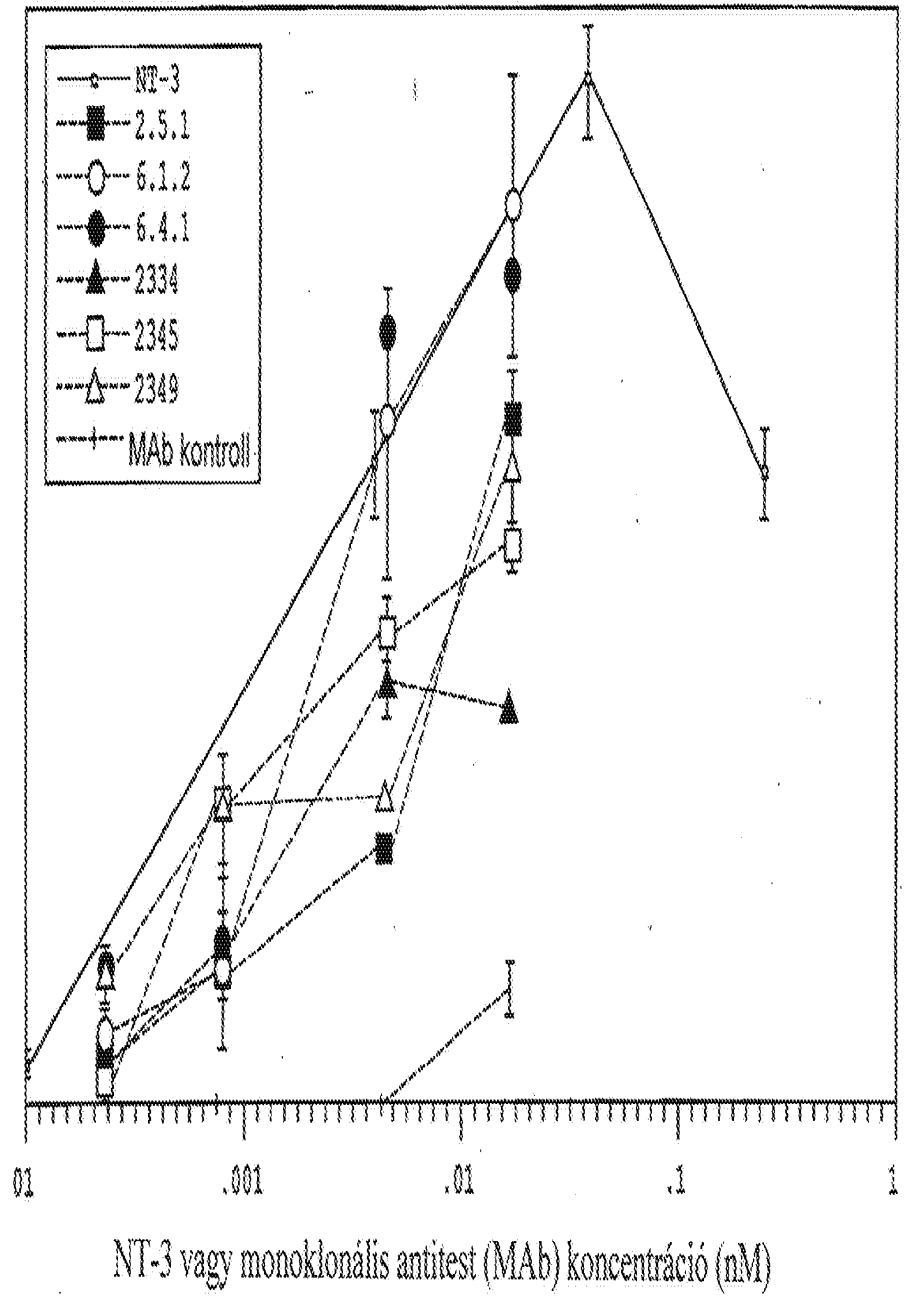
A meghatalmazott:

ADVOPATENT
SZABADALMI ÉS VEDŐJEGY IRODA
KARÁCSORI SÉLA




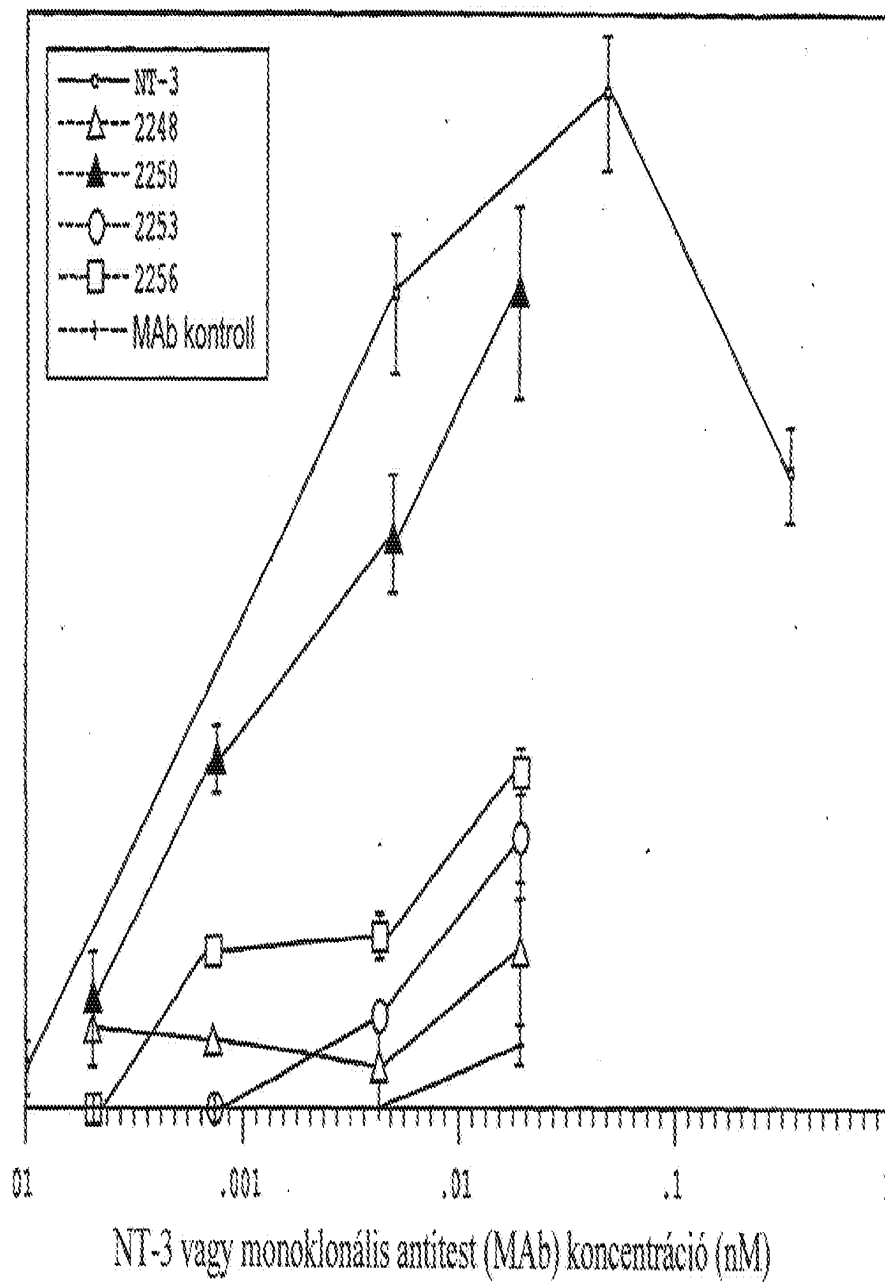


1/B ÁBRA



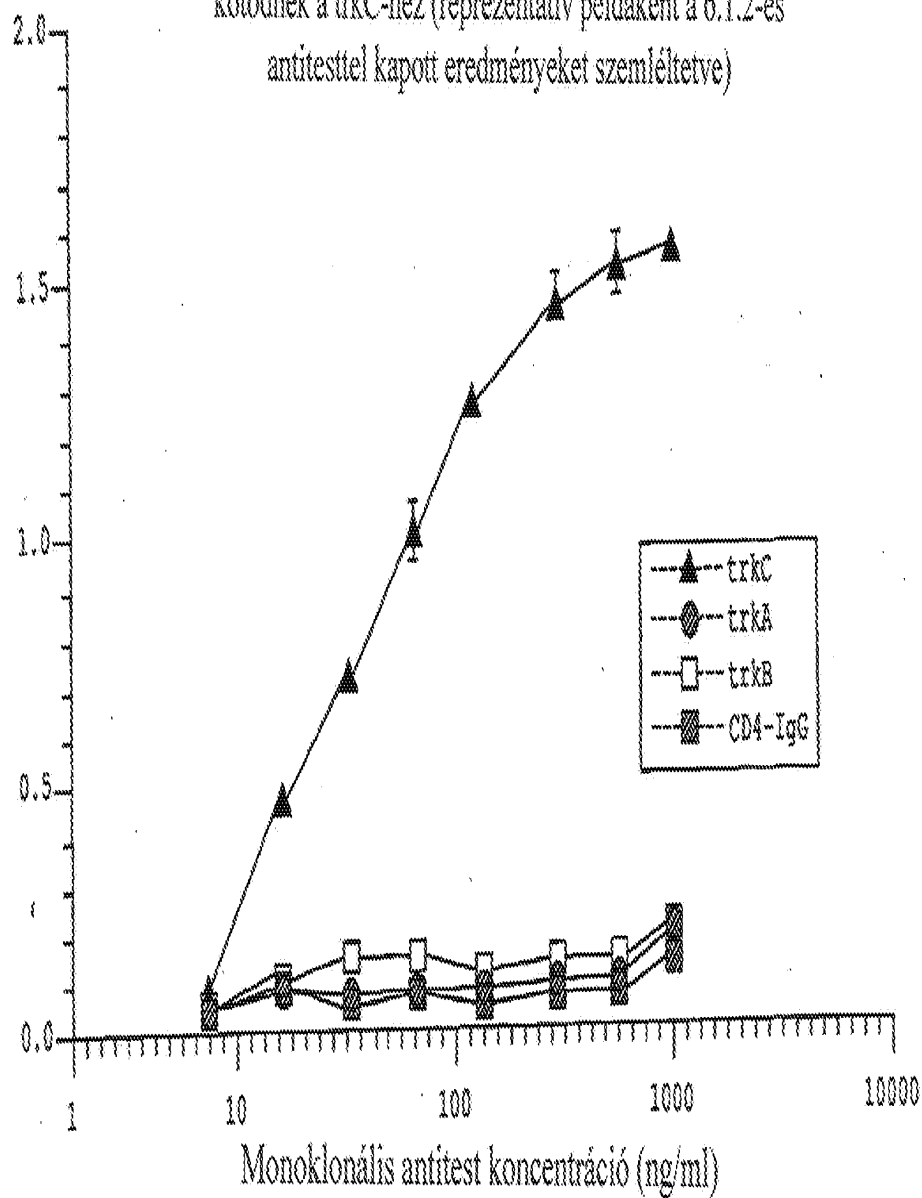
1/C ÁBRA

1
 2
 3
 4
 5
 6
 7
 8
 9
 10
 11
 12
 13
 14
 15
 16
 17
 18
 19
 20
 21
 22
 23
 24
 25
 26
 27
 28
 29
 30
 31
 32
 33
 34
 35
 36
 37
 38
 39
 40
 41
 42
 43
 44
 45
 46
 47
 48
 49
 50
 51
 52
 53
 54
 55
 56
 57
 58
 59
 60
 61
 62
 63
 64
 65
 66
 67
 68
 69
 70
 71
 72
 73
 74
 75
 76
 77
 78
 79
 80
 81
 82
 83
 84
 85
 86
 87
 88
 89
 90
 91
 92
 93
 94
 95
 96
 97
 98
 99
 100
 101
 102
 103
 104
 105
 106
 107
 108
 109
 110
 111
 112
 113
 114
 115
 116
 117
 118
 119
 120
 121
 122
 123
 124
 125
 126
 127
 128
 129
 130
 131
 132
 133
 134
 135
 136
 137
 138
 139
 140
 141
 142
 143
 144
 145
 146
 147
 148
 149
 150
 151
 152
 153
 154
 155
 156
 157
 158
 159
 160
 161
 162
 163
 164
 165
 166
 167
 168
 169
 170
 171
 172
 173
 174
 175
 176
 177
 178
 179
 180
 181
 182
 183
 184
 185
 186
 187
 188
 189
 190
 191
 192
 193
 194
 195
 196
 197
 198
 199
 200
 201
 202
 203
 204
 205
 206
 207
 208
 209
 210
 211
 212
 213
 214
 215
 216
 217
 218
 219
 220
 221
 222
 223
 224
 225
 226
 227
 228
 229
 230
 231
 232
 233
 234
 235
 236
 237
 238
 239
 240
 241
 242
 243
 244
 245
 246
 247
 248
 249
 250
 251
 252
 253
 254
 255
 256
 257
 258
 259
 260
 261
 262
 263
 264
 265
 266
 267
 268
 269
 270
 271
 272
 273
 274
 275
 276
 277
 278
 279
 280
 281
 282
 283
 284
 285
 286
 287
 288
 289
 290
 291
 292
 293
 294
 295
 296
 297
 298
 299
 300
 301
 302
 303
 304
 305
 306
 307
 308
 309
 310
 311
 312
 313
 314
 315
 316
 317
 318
 319
 320
 321
 322
 323
 324
 325
 326
 327
 328
 329
 330
 331
 332
 333
 334
 335
 336
 337
 338
 339
 340
 341
 342
 343
 344
 345
 346
 347
 348
 349
 350
 351
 352
 353
 354
 355
 356
 357
 358
 359
 360
 361
 362
 363
 364
 365
 366
 367
 368
 369
 370
 371
 372
 373
 374
 375
 376
 377
 378
 379
 380
 381
 382
 383
 384
 385
 386
 387
 388
 389
 390
 391
 392
 393
 394
 395
 396
 397
 398
 399
 400
 401
 402
 403
 404
 405
 406
 407
 408
 409
 410
 411
 412
 413
 414
 415
 416
 417
 418
 419
 420
 421
 422
 423
 424
 425
 426
 427
 428
 429
 430
 431
 432
 433
 434
 435
 436
 437
 438
 439
 440
 441
 442
 443
 444
 445
 446
 447
 448
 449
 450
 451
 452
 453
 454
 455
 456
 457
 458
 459
 460
 461
 462
 463
 464
 465
 466
 467
 468
 469
 470
 471
 472
 473
 474
 475
 476
 477
 478
 479
 480
 481
 482
 483
 484
 485
 486
 487
 488
 489
 490
 491
 492
 493
 494
 495
 496
 497
 498
 499
 500
 501
 502
 503
 504
 505
 506
 507
 508
 509
 510
 511
 512
 513
 514
 515
 516
 517
 518
 519
 520
 521
 522
 523
 524
 525
 526
 527
 528
 529
 530
 531
 532
 533
 534
 535
 536
 537
 538
 539
 540
 541
 542
 543
 544
 545
 546
 547
 548
 549
 550
 551
 552
 553
 554
 555
 556
 557
 558
 559
 560
 561
 562
 563
 564
 565
 566
 567
 568
 569
 570
 571
 572
 573
 574
 575
 576
 577
 578
 579
 580
 581
 582
 583
 584
 585
 586
 587
 588
 589
 590
 591
 592
 593
 594
 595
 596
 597
 598
 599
 600
 601
 602
 603
 604
 605
 606
 607
 608
 609
 610
 611
 612
 613
 614
 615
 616
 617
 618
 619
 620
 621
 622
 623
 624
 625
 626
 627
 628
 629
 630
 631
 632
 633
 634
 635
 636
 637
 638
 639
 640
 641
 642
 643
 644
 645
 646
 647
 648
 649
 650
 651
 652
 653
 654
 655
 656
 657
 658
 659
 660
 661
 662
 663
 664
 665
 666
 667
 668
 669
 670
 671
 672
 673
 674
 675
 676
 677
 678
 679
 680
 681
 682
 683
 684
 685
 686
 687
 688
 689
 690
 691
 692
 693
 694
 695
 696
 697
 698
 699
 700
 701
 702
 703
 704
 705
 706
 707
 708
 709
 710
 711
 712
 713
 714
 715
 716
 717
 718
 719
 720
 721
 722
 723
 724
 725
 726
 727
 728
 729
 730
 731
 732
 733
 734
 735
 736
 737
 738
 739
 740
 741
 742
 743
 744
 745
 746
 747
 748
 749
 750
 751
 752
 753
 754
 755
 756
 757
 758
 759
 760
 761
 762
 763
 764
 765
 766
 767
 768
 769
 770
 771
 772
 773
 774
 775
 776
 777
 778
 779
 780
 781
 782
 783
 784
 785
 786
 787
 788
 789
 790
 791
 792
 793
 794
 795
 796
 797
 798
 799
 800
 801
 802
 803
 804
 805
 806
 807
 808
 809
 810
 811
 812
 813
 814
 815
 816
 817
 818
 819
 820
 821
 822
 823
 824
 825
 826
 827
 828
 829
 830
 831
 832
 833
 834
 835
 836
 837
 838
 839
 840
 841
 842
 843
 844
 845
 846
 847
 848
 849
 850
 851
 852
 853
 854
 855
 856
 857
 858
 859
 860
 861
 862
 863
 864
 865
 866
 867
 868
 869
 870
 871
 872
 873
 874
 875
 876
 877
 878
 879
 880
 881
 882
 883
 884
 885
 886
 887
 888
 889
 890
 891
 892
 893
 894
 895
 896
 897
 898
 899
 900
 901
 902
 903
 904
 905
 906
 907
 908
 909
 910
 911
 912
 913
 914
 915
 916
 917
 918
 919
 920
 921
 922
 923
 924
 925
 926
 927
 928
 929
 930
 931
 932
 933
 934
 935
 936
 937
 938
 939
 940
 941
 942
 943
 944
 945
 946
 947
 948
 949
 950
 951
 952
 953
 954
 955
 956
 957
 958
 959
 960
 961
 962
 963
 964
 965
 966
 967
 968
 969
 970
 971
 972
 973
 974
 975
 976
 977
 978
 979
 980
 981
 982
 983
 984
 985
 986
 987
 988
 989
 990
 991
 992
 993
 994
 995
 996
 997
 998
 999
 1000
 1001
 1002
 1003
 1004
 1005
 1006
 1007
 1008
 1009
 1010
 1011
 1012
 1013
 1014
 1015
 1016
 1017
 1018
 1019
 1020
 1021
 1022
 1023
 1024
 1025
 1026
 1027
 1028
 1029
 1030
 1031
 1032
 1033
 1034
 1035
 1036
 1037
 1038
 1039
 1040
 1041
 1042
 1043
 1044
 1045
 1046
 1047
 1048
 1049
 1050
 1051
 1052
 1053
 1054
 1055
 1056
 1057
 1058
 1059
 1060
 1061
 1062
 1063
 1064
 1065
 1066
 1067
 1068
 1069
 1070
 1071
 1072
 1073
 1074
 1075
 1076
 1077
 1078
 1079
 1080
 1081
 1082
 1083
 1084
 1085
 1086
 1087
 1088
 1089
 1090
 1091
 1092
 1093
 1094
 1095
 1096
 1097
 1098
 1099
 1100
 1101
 1102
 1103
 1104
 1105
 1106
 1107
 1108
 1109
 1110
 1111
 1112
 1113
 1114
 1115
 1116
 1117
 1118
 1119
 1120
 1121
 1122
 1123
 1124
 1125
 1126
 1127
 1128
 1129
 1130
 1131
 1132
 1133
 1134
 1135
 1136
 1137
 1138
 1139
 1140
 1141
 1142
 1143
 1144
 1145
 1146
 1147
 1148
 1149
 1150
 1151
 1152
 1153
 1154
 1155
 1156
 1157
 1158
 1159
 1160
 1161
 1162
 1163
 1164
 1165
 1166
 1167
 1168
 1169
 1170
 1171
 1172
 1173
 1174
 1175
 1176
 1177
 1178
 1179
 1180
 1181
 1182
 1183
 1184
 1185
 1186
 1187
 1188
 1189
 1190
 1191
 1192
 1193
 1194
 1195
 1196
 1197
 1198
 1199
 1200
 1201
 1202
 1203
 1204
 1205
 1206
 1207
 1208
 1209
 1210
 1211
 1212
 1213
 1214
 1215
 1216
 1217
 1218
 1219
 1220
 1221
 1222
 1223
 1224
 1225
 1226
 1227
 1228
 1229
 1230
 1231
 1232
 1233
 1234
 1235
 1236
 1237
 1238
 1239
 1240
 1241
 1242
 1243
 1244
 1245
 1246
 1247
 1248
 1249
 1250
 1251
 1252
 1253
 1254
 1255
 1256
 1257
 1258
 1259
 1260
 1261
 1262
 1263
 1264
 1265
 1266
 1267
 1268
 1269
 1270
 1271
 1272
 1273
 1274
 1275
 1276
 1277
 1278
 1279
 1280
 1281
 1282
 1283
 1284
 1285
 1286
 1287
 1288
 1289
 1290
 1291
 1292
 1293
 1294
 1295
 1296
 1297
 1298
 1299
 1300
 1301
 1302
 1303
 1304
 1305
 1306
 1307
 1308
 1309
 1310
 1311
 1312
 1313
 1314
 1315
 1316
 1317
 1318
 1319
 1320
 1321
 1322
 1323
 1324
 1325
 1326
 1327
 1328
 1329
 1330
 1331
 1332
 1333
 1334
 1335
 1336
 1337
 1338
 1339
 1340
 1341
 1342
 1343
 1344
 1345
 1346
 1347
 1348
 1349
 1350
 1351
 1352
 1353
 1354
 1355
 1356
 1357
 1358
 1359
 1360
 1361
 1362
 1363
 1364
 1365
 1366
 1367
 1368
 1369
 1370
 1371
 1372
 1373
 1374
 1375
 1376
 1377
 1378
 1379
 1380
 1381
 1382
 1383
 1384
 1385
 1386
 1387
 1388
 1389
 1390
 1391
 1392
 1393
 1394
 1395
 1396
 1397
 1398
 1399
 1400
 1401
 1402
 1403
 1404
 1405
 1406
 1407
 1408
 1409
 1410
 1411
 1412
 1413
 1414
 1415
 1416
 1417
 1418
 1419
 1420
 1421
 1422
 1423
 1424
 1425
 1426
 1427
 1428
 1429
 1430
 1431
 1432
 1433
 1434
 1435
 1436
 1437
 1438
 1439
 1440
 1441
 1442
 1443
 1444
 1445
 1446



1/D ÁBRA

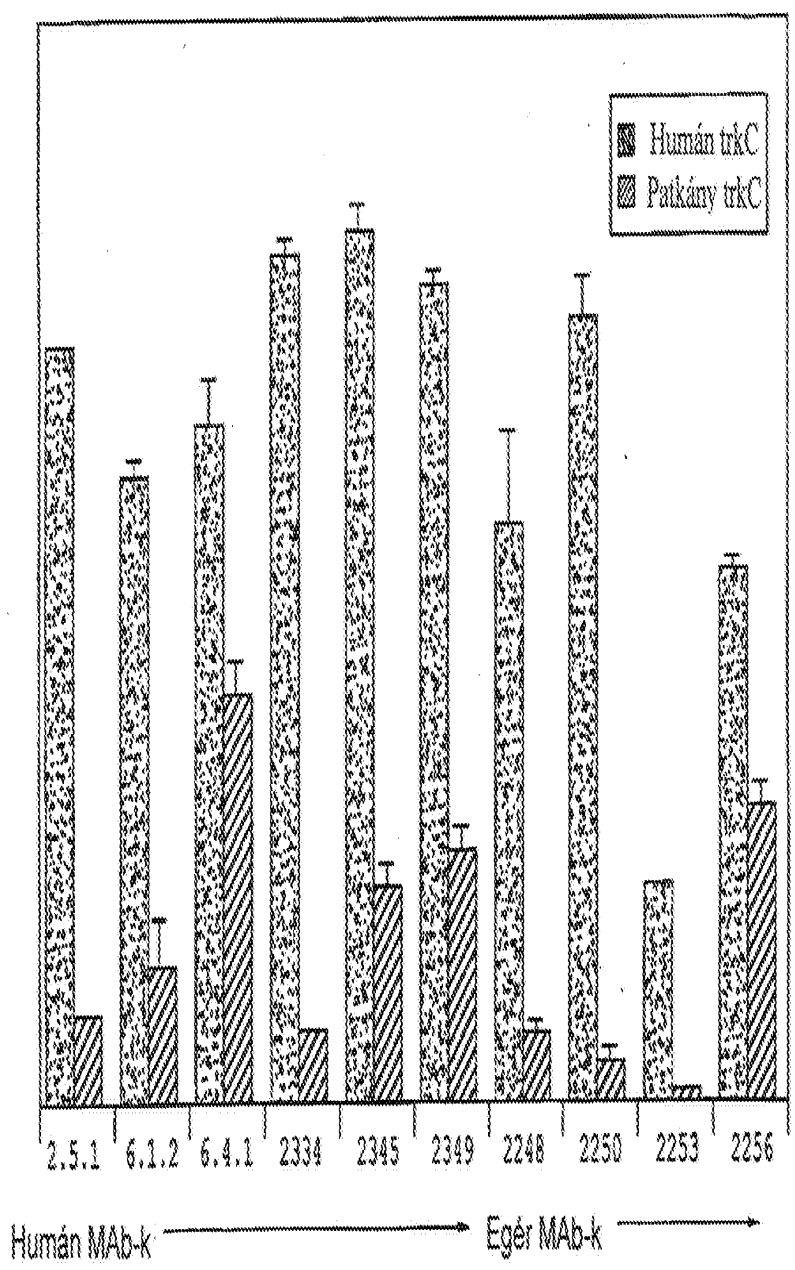
Az agonista monoklonális antitestek SPECIFIKUSAN
kötődnek a trkC-hez (reprezentatív példaként a 6.1.2-es
antitesttel kapott eredményeket szemlélítve)



Tesztformátum: trk-IgG vagy CD4-IgG + MAb + megfelelő HRP-konjugátum

2. ÁBRA

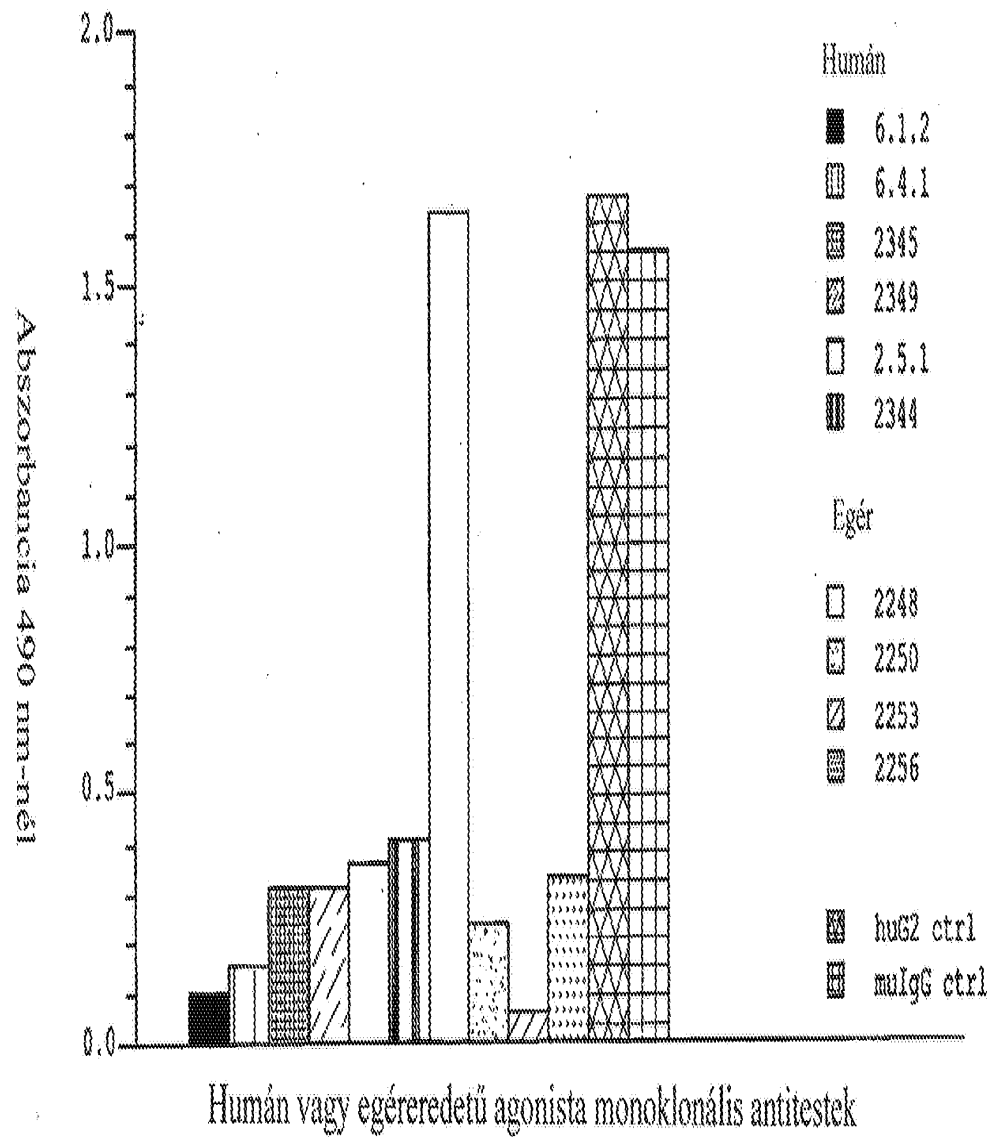
ADVOGÁTIKAI
SZAKADALOM ÉS NEMZETI KÖZSÉG
KÖZÖSSÉGI ÉRTÉKELÉSE



3. ÁBRA



Kereszt-blokkolási analízissel a trkC-n két
immundomináns agonista epitóp mutatható ki



Teszt formátum: trkC ECD + jelöletlen MAb-k + biotinilált 6.1.2 + SA-HRP

4. ÁBRA

38/8

ADVOPIENT
SZABADALMI ÉS VEDŐJEL
KÖZLÖNY
2004. évi 1. szám

5. ÁBRA

5/A ÁBRA	5/B ÁBRA
-------------	-------------

38/9

1 2 3 4 5 6 7 8 9

ADYOPATERNÉ
GÁR BADAJÓVÉ ÉS VÉRTŐKÉVÉ
KÖZÖSSÉGI SZERZŐI JOG
VÉDELME ALÁ VESZŐ

Epitóp-térképezés (összefoglalás)

				Jelöletlen MAb						
	2344	2345	2349	2.5.1	6.1.2	6.4.1	2248	2250	2253	2256
biotin-MAb										
2344	0.02	0	0	0.01	0	0	1.52	0	0	0
2345	0.26	0.04	0.02	0.17	0.11	0.08	1.48	0.04	0.07	0.05
2349	0.09	0.01	0	0.06	0.04	0.03	1.55	0.02	0.03	0.02
2.5.1	0.06	0.01	0.01	0.03	0.03	0.02	1.54	0.01	0.02	0.01
6.1.2	0.3	0.24	0.24	0.27	0.08	0.12	1.55	0.2	0.05	0.23
6.4.1	0.2	0.12	0.1	0.15	0.06	0.07	1.56	0.1	0.03	0.1
2248	1.52	1.53	1.54	1.5	0.74	1.12	0.01	1.4	0.04	1.48
2250	0.27	0.1	0.05	0.21	0.08	0.07	1.57	0.01	0.07	0.21
2253	1.35	1.4	1.45	1.4	0.66	0.9	1.55	1.24	0	1.34
2256	0.52	0.15	0.07	0.38	0.13	0.12	1.63	0.01	0.02	0.02

38/10

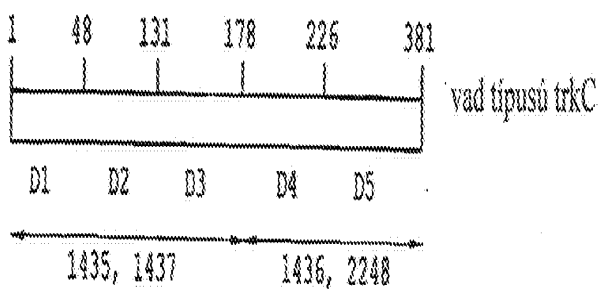
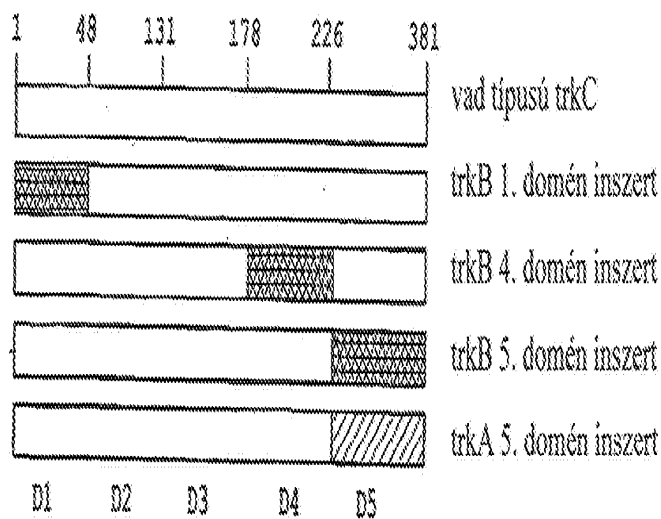
5/A ÁBRA

5/10

1. csop.	1b csop.	2. csop.	3. csop.							
2344	~~2250~~	2248	2253							
2345	~~2253?~~									
2349	~~2256~~									
2.5.1										
6.1.2										
6.4.1										
2250										
2256										
A doméntérképezési eredmények igazolják az 1. és 2. csoportra történő felosztást (a 2248 az egyetlen monoklonális antitest, amely a 4. és 5. doménhez is kötődik; a többi D5-specifikus)										
A pontmutációk arra utalnak, hogy az R285 része a 2250, 2253 és 2256 építőjének										

Teszt formátum: gd-irkC + jelöletlen MAh + biotinilált + SA-HRP
 (1 mg/ml) (50 mg/ml) (1 mg/ml) (1:1k)

5/B ÁBRA



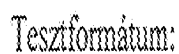
2.5.1 2250
6.1.2 2253
6.4.1 2256
2344
2345
2349

6/A ÁBRA

38/12

ADYOPATENT
SZABADALOMI HATÁLYOS
KÖZLÖNY

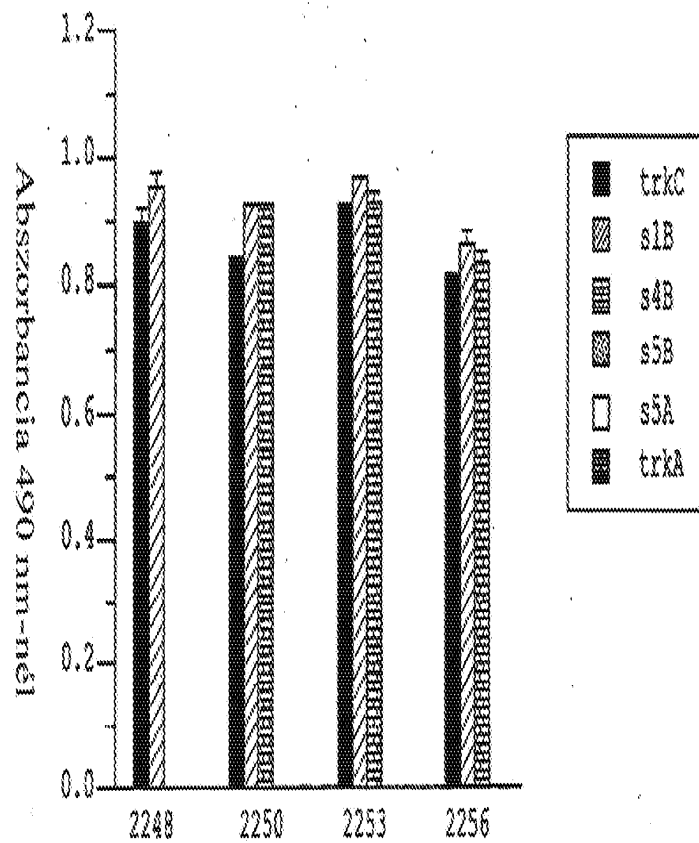
W
8
1
W

kecske F(ab')₂ anti-huIgG Fc + trkC + MAb + kecske anti-hu kappa-HRP

6/B ÁBRA

4 5
 6 7 8 9
 10
 11 12 13
 14
 15 16 17
 18 19
 20 21 22
 23 24 25
 26 27 28
 29 30 31
 32 33 34
 35 36 37
 38 39 40
 41 42 43
 44 45 46
 47 48 49
 50 51 52
 53 54 55
 56 57 58
 59 60 61
 62 63 64
 65 66 67
 68 69 70
 71 72 73
 74 75 76
 77 78 79
 80 81 82
 83 84 85
 86 87 88
 89 90 91
 92 93 94
 95 96 97
 98 99 100
 101 102 103
 104 105 106
 107 108 109
 110 111 112
 113 114 115
 116 117 118
 119 120 121
 122 123 124
 125 126 127
 128 129 130
 131 132 133
 134 135 136
 137 138 139
 140 141 142
 143 144 145
 146 147 148
 149 150 151
 152 153 154
 155 156 157
 158 159 160
 161 162 163
 164 165 166
 167 168 169
 170 171 172
 173 174 175
 176 177 178
 179 180 181
 182 183 184
 185 186 187
 188 189 190
 191 192 193
 194 195 196
 197 198 199
 200 201 202
 203 204 205
 206 207 208
 209 210 211
 212 213 214
 215 216 217
 218 219 220
 221 222 223
 224 225 226
 227 228 229
 230 231 232
 233 234 235
 236 237 238
 239 240 241
 242 243 244
 245 246 247
 248 249 250
 251 252 253
 254 255 256
 257 258 259
 260 261 262
 263 264 265
 266 267 268
 269 270 271
 272 273 274
 275 276 277
 278 279 280
 281 282 283
 284 285 286
 287 288 289
 290 291 292
 293 294 295
 296 297 298
 299 300 301
 302 303 304
 305 306 307
 308 309 310
 311 312 313
 314 315 316
 317 318 319
 320 321 322
 323 324 325
 326 327 328
 329 330 331
 332 333 334
 335 336 337
 338 339 340
 341 342 343
 344 345 346
 347 348 349
 350 351 352
 353 354 355
 356 357 358
 359 360 361
 362 363 364
 365 366 367
 368 369 370
 371 372 373
 374 375 376
 377 378 379
 380 381 382
 383 384 385
 386 387 388
 389 390 391
 392 393 394
 395 396 397
 398 399 400
 401 402 403
 404 405 406
 407 408 409
 410 411 412
 413 414 415
 416 417 418
 419 420 421
 422 423 424
 425 426 427
 428 429 430
 431 432 433
 434 435 436
 437 438 439
 440 441 442
 443 444 445
 446 447 448
 449 450 451
 452 453 454
 455 456 457
 458 459 460
 461 462 463
 464 465 466
 467 468 469
 470 471 472
 473 474 475
 476 477 478
 479 480 481
 482 483 484
 485 486 487
 488 489 490
 491 492 493
 494 495 496
 497 498 499
 500 501 502
 503 504 505
 506 507 508
 509 510 511
 512 513 514
 515 516 517
 518 519 520
 521 522 523
 524 525 526
 527 528 529
 530 531 532
 533 534 535
 536 537 538
 539 540 541
 542 543 544
 545 546 547
 548 549 550
 551 552 553
 554 555 556
 557 558 559
 560 561 562
 563 564 565
 566 567 568
 569 570 571
 572 573 574
 575 576 577
 578 579 580
 581 582 583
 584 585 586
 587 588 589
 590 591 592
 593 594 595
 596 597 598
 599 600 601
 602 603 604
 605 606 607
 608 609 610
 611 612 613
 614 615 616
 617 618 619
 620 621 622
 623 624 625
 626 627 628
 629 630 631
 632 633 634
 635 636 637
 638 639 640
 641 642 643
 644 645 646
 647 648 649
 650 651 652
 653 654 655
 656 657 658
 659 660 661
 662 663 664
 665 666 667
 668 669 670
 671 672 673
 674 675 676
 677 678 679
 680 681 682
 683 684 685
 686 687 688
 689 690 691
 692 693 694
 695 696 697
 698 699 700
 701 702 703
 704 705 706
 707 708 709
 710 711 712
 713 714 715
 716 717 718
 719 720 721
 722 723 724
 725 726 727
 728 729 730
 731 732 733
 734 735 736
 737 738 739
 740 741 742
 743 744 745
 746 747 748
 749 750 751
 752 753 754
 755 756 757
 758 759 760
 761 762 763
 764 765 766
 767 768 769
 770 771 772
 773 774 775
 776 777 778
 779 780 781
 782 783 784
 785 786 787
 788 7

Egéreredetű anti-trkC agonista monoklonális antitestek specifikus
kötődése a trkC 4. vagy 5. doménjéhez



Tesztformátum:

kecske F(ab')₂ anti-huIgG Fc + trkC + MAb + kecske anti-hu kappa-HRP

6/C ÁBRA

ADY-OPAJEKT
SZABADALMI ÉS VÉDELMI IRODA
KÖZLÖNYV
2007.01.01.

4. DOMÉN

N- LPEISVSHVNLTVREGDNAVITCNGSGSPLPDVDWIVTGLQSINTHQTNLNWYNVH

178

AINLTLVNVTSEDNGFTLLTCAENVVCGMSNASVALTVYYPPRVVSLEEPELRLEHCIE

266

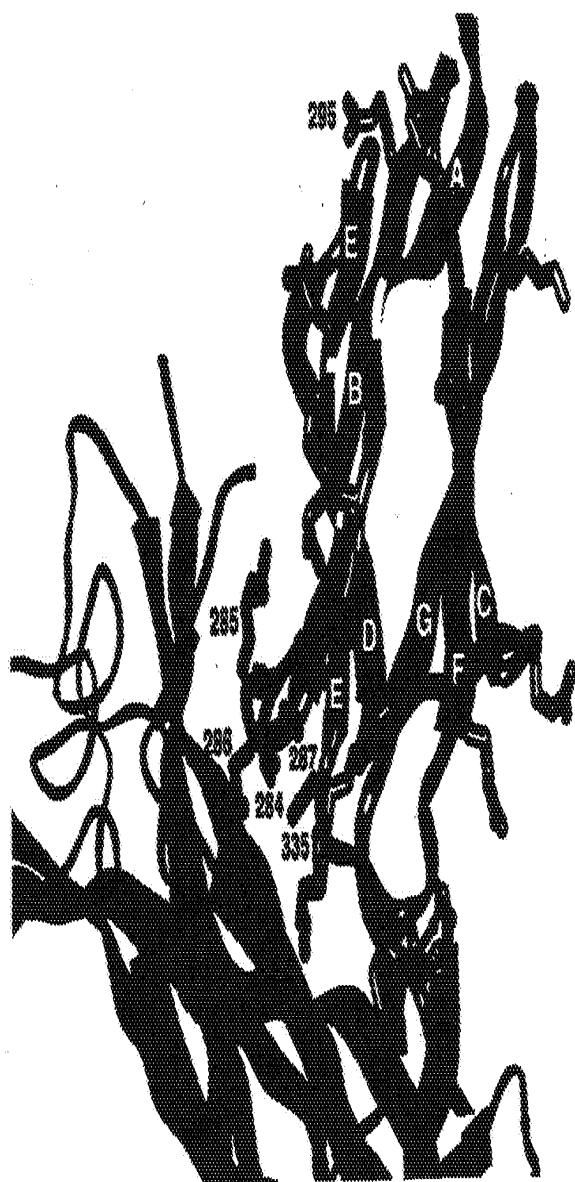
5. DOMÉN

FVVRGNPPPTLHVLHNNNGQPLRESKIIHVEYYQEGEISEGCLLFNKPTHYNNNGNYTLIAK

NPLGTANQTINGHFLKEPFFVDEV -C

381

7. ÁBRA



8. ÁBRA

...

ADYOPATENT
SZABADALMI ÉS
KÖZHASZNÚ
VÉDELMI
HIVATAL

Anti-rkC agonista monoklonális antitestek nehéz lánc szekvenciái

	<u>CDR1</u>	<u>CDR2</u>
2250	: N-QVQLQESGAEIMQPGASVKISCKSTGYTFSNFWIEWVKQRP	--HGLEWIGETILPGSDNTYNEKFKG
2253	: N-QVQLQESGAEIMQPGASVKISCKSTGYTFSNFWIEWVKQRP	--HGLEWIGETILPGSDNTYNEKFKG
2256	: N-QVQLQESGAEIMQPGASVKISCKSTGYTFSNFWIEWVKQRP	--QGLEWIGETIYPSNGRTYNEKFKS

6.1.2	: N-QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISGGYVNSWIRQHPKGLEWIGYIYISG-STYINPSLKS
6.4.1	: N-QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISGGYVNSWIRQHPKGLEWIGYIYISG-STYINPSLKS
2345	: N-QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISGGYVNSWIRQHPKGLEWIGYIYISG-STYINPSLKS
2349	: N-QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISGGYVNSWIRQHPKGLEWIGYIYISG-STYINPSLKS

	<u>CDR3</u>
2250	: KATFTADTSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARKN---RN---YVGNVYVWGQGTILTVSSA-C
2253	: KATFTADTSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARKN---RN---YVGNVYVWGAGTILTVSS-C
2256	: KATFTADTSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARKY---YVGNVYVWGAGTILTVSS-C

6.1.2	: RVTISVDTSKNQPSLKLSSVTAADTAVYYCTRDROYDSTGDIYSYGGMDVWGQGTITVTVSS-C
6.4.1	: RVTMSVDTSKNQPSLKLSSVTAADTAVYYCARDGGYSNPF-----WGQGTITVTVSS-C
2345	: RVTISVDTSKNQPSLKLSSVTAADTAVYYCAREE-IAAGADYYINGLAVWGQGTITVTVSS-C
2349	: RLTISVDTSKNQPSLKLSSVTAADTAVYYCAREE-IAAGADYYINGLAVWGQGTITVTVSS-C

9. ÁBRA

Anti-rkC agonista monoklonális antitestek könnyű lánc szekvenciái

001

002

2250 : N-DIVMTQSPASLAVSLGQRATISYRASKSVSTSC--YSYMHWNQKPKGQPPRLLIYLVSNLESGVPAF
2253 : N-QIVLTQSPAIMASAPGKVTITCSASSSVSY-----MYWFQKPKGTPSKLNIYSTNLASGVPAF
2256 : N-DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESDNYG--ISFHWFWQKPKGQPPKLLIYAASNQSGVPAF

6.1.2 : N-DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQGIEM-----DLGWYQOKPGKAPKRLIYAASSLQSGVPSRF
6.4.1 : N-DIQMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVSYSENNKYLAWYQOKPGQPCKLLIYWASTRESCVPDR
2345 : N-EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSS-----NYLTWYQOKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRF
2349 : N-GIVLTQSPGTLSSLSPGERATFSCRASQSGSS-----TYLAWYQOKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRF

003

2250 : SGSGSGDTFTLNIHPVEEEDAATYYCQHIRE-LTRSARGQSNKKR---C
2253 : SGSGSGCTSYSLTISRMEAEEDAATYYCQQRSS-YPLTFGAGTKLELKR-C
2256 : SGSGSGDTDFSLNIHPMEEDDTAMYFCQQSKE-VPRTFGGGKTLEMKR-C

6.1.2 : SGSGSGTDFTLTIISSLPEDFAVFYCLOHNS-LPLTFGGGKVEIKR-C
6.4.1 : SGSGSGTDFTLTIISSLAQEDVAVFYCQOHYN-TPLTFGGGKVEIKR-C
2345 : SGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVFYCQQYGRSPPIITFGQSTRLEIKR-C
2349 : SGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVFYCQQYGRSPPIITFGQSTRLEIKR-C

10. ÁBRA

3818

[illegible]

ADJOINTS
STANDARDING UNIT
KALAMAZOO MI
11/11/67

AntitestNehéz láncok

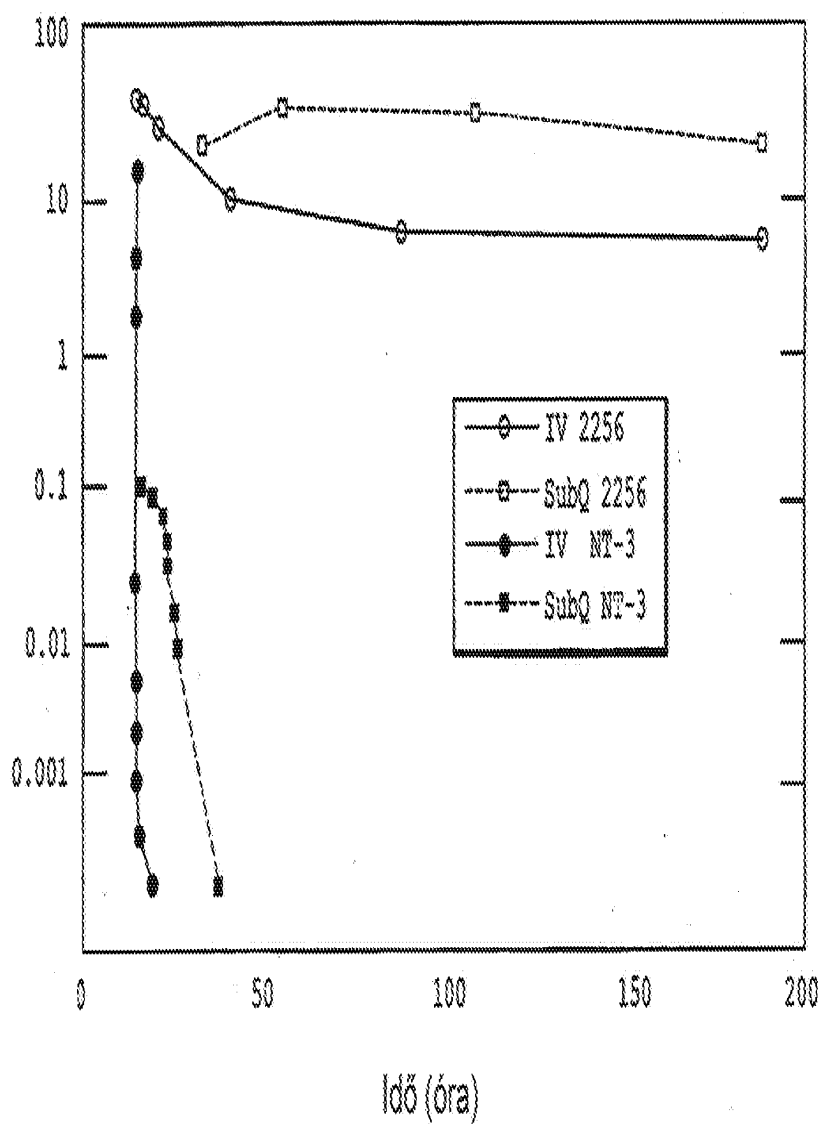
Egér	Család	CDR1	CDR2	CDR3
2250	VHII	FWIEWVK	EILPGSDNTNYNEKFKG	KNRN----YYGNTVV
2253	VHII	FWIEWVK	EILPGSDNTNYNEKFKG	KNRN----YYGNTVV
2256	VHII	YWMHWVK	EIYPSNCRNTNYNEKFKS	KYYYGNSYRSWYFDV
Humán				
6.1.2	VHII	SGGYWS	YIYSGSTNYNPSLKS	DRDYDSTGDYYSYYGMDV
6.4.1	VHII	ISTYYWN	RIYTSGSTNYNPSLKS	DGGYSNPPD-----
2345	VHII	SGGYWS	YIFYSGRTYYNPSLKS	ER-IAAAGADYYYNGLDV
2349	VHII	SGYYYWS	YIYSGSTYYNPSLKS	ER-IAAAGTDYYYNGLAV

AntitestKönnyű láncok

Egér	Család	CDR1	CDR2	CDR3
2250	V KappaI	RASKSVSTSGYSYMH	LVSNLES	QHIRELTRS
2253	V KappaIV	SASSSVS-----YMY	STSNLAS	QQRSSYPLT
2256	V KappaIII	RASESVDNYGISPMN	AASNQGS	QQSKEVPRT
Humán				
6.1.2	V KappaI	RASQGIRN-----DLG	AASSLQS	LQHNS-LPLT
6.4.1	V KappaI	KSSQSVSYSSNNKNYLA	WASTRES	QQHYN-TPLT
2345	V KappaIII	RASQSVSS-----NYLT	GASSRAT	QQYGRSPFIT
2349	V KappaIII	RASQSGSS-----TYLA	GASSRAT	QQYGRSPFIT

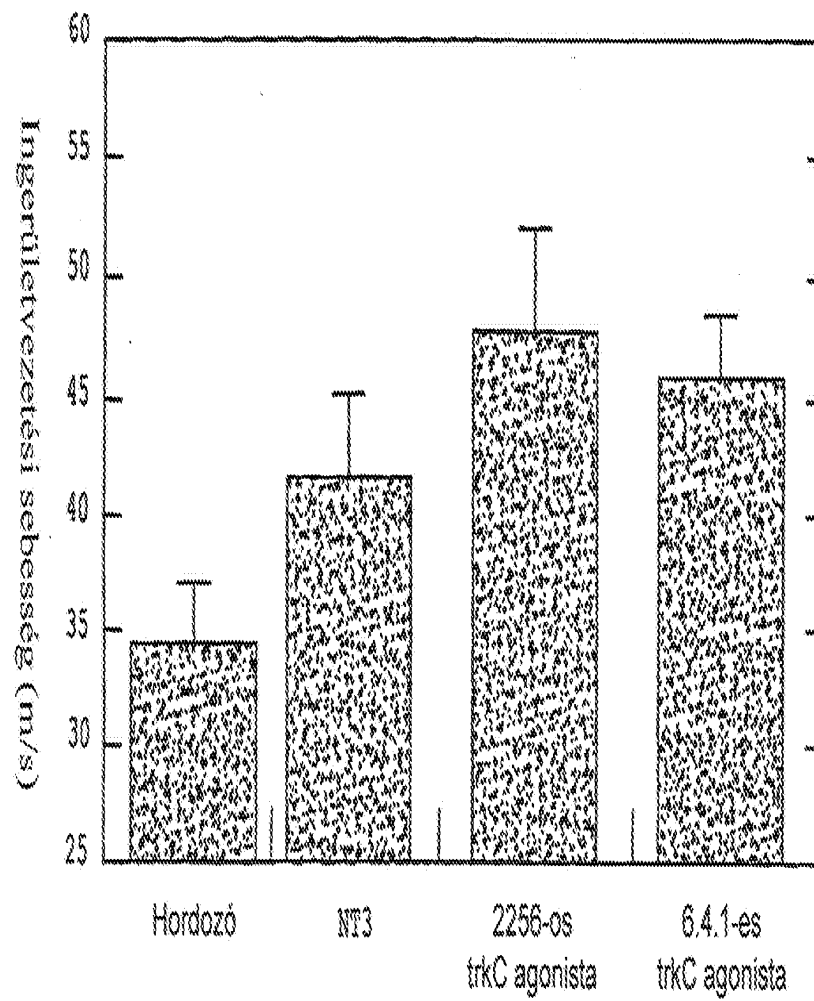
11. ÁBRA

A trkC agonista monoklonális antitestek javított *in vivo* felezési idővel és biológiai hozzáférhetőséggel rendelkeznek



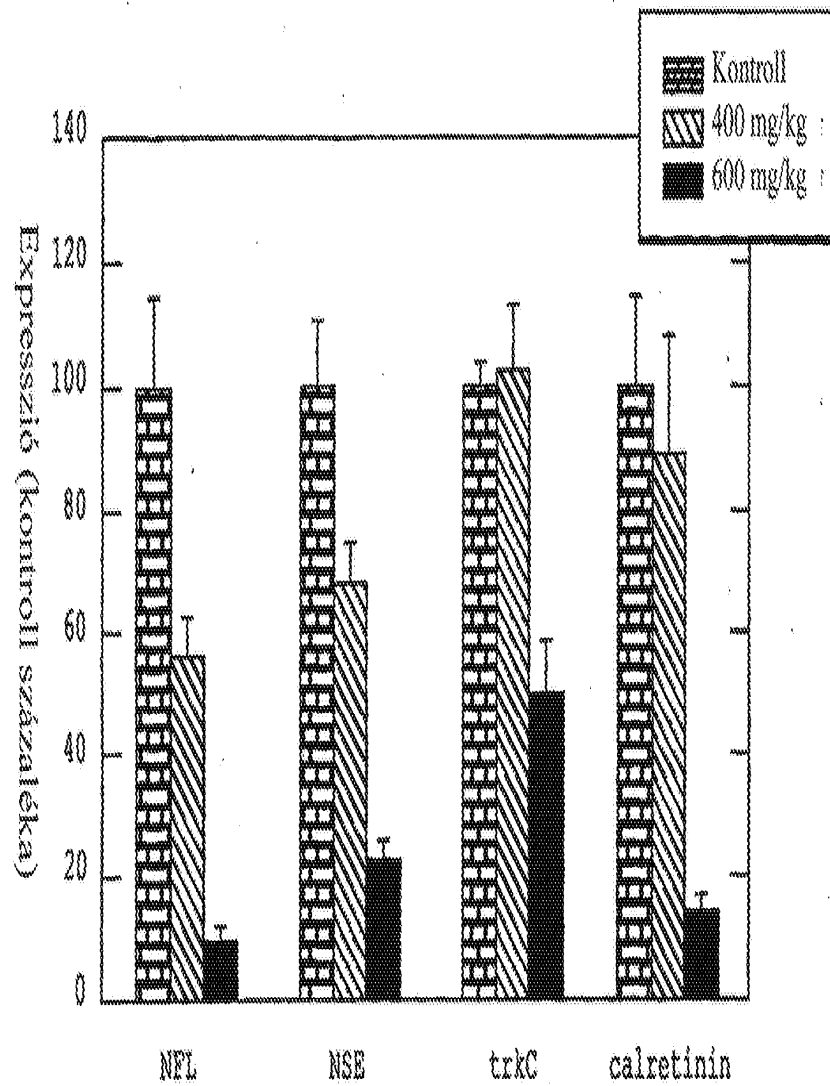
12. ÁBRA

A trkC agonistákkal végzett kezelés visszafordítja a cisplatinum-indukálta szenzoros neuropathiát



13. ÁBRA

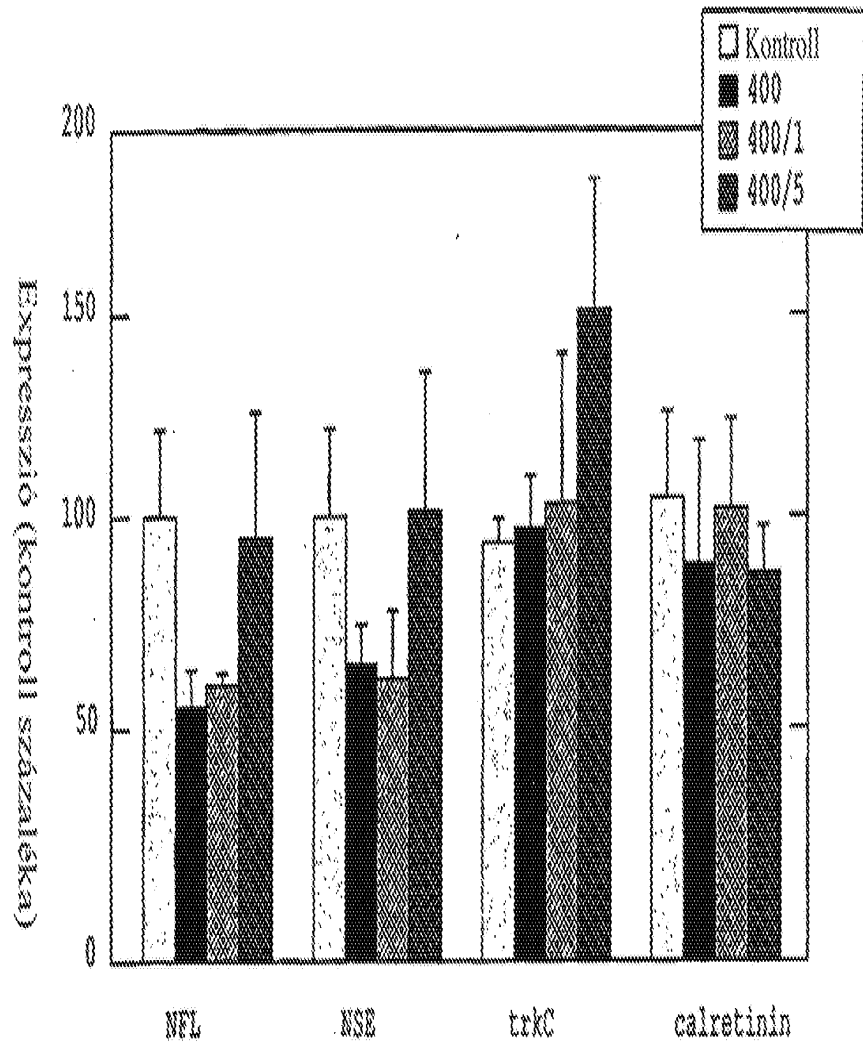
A piridoxin-indukálta neuropathia a marker-expresszió csökkenését eredményezi



14. ÁBRA



Az agonista monoklonális antitest enyhíti a kis dózisu piridoxin hatásait

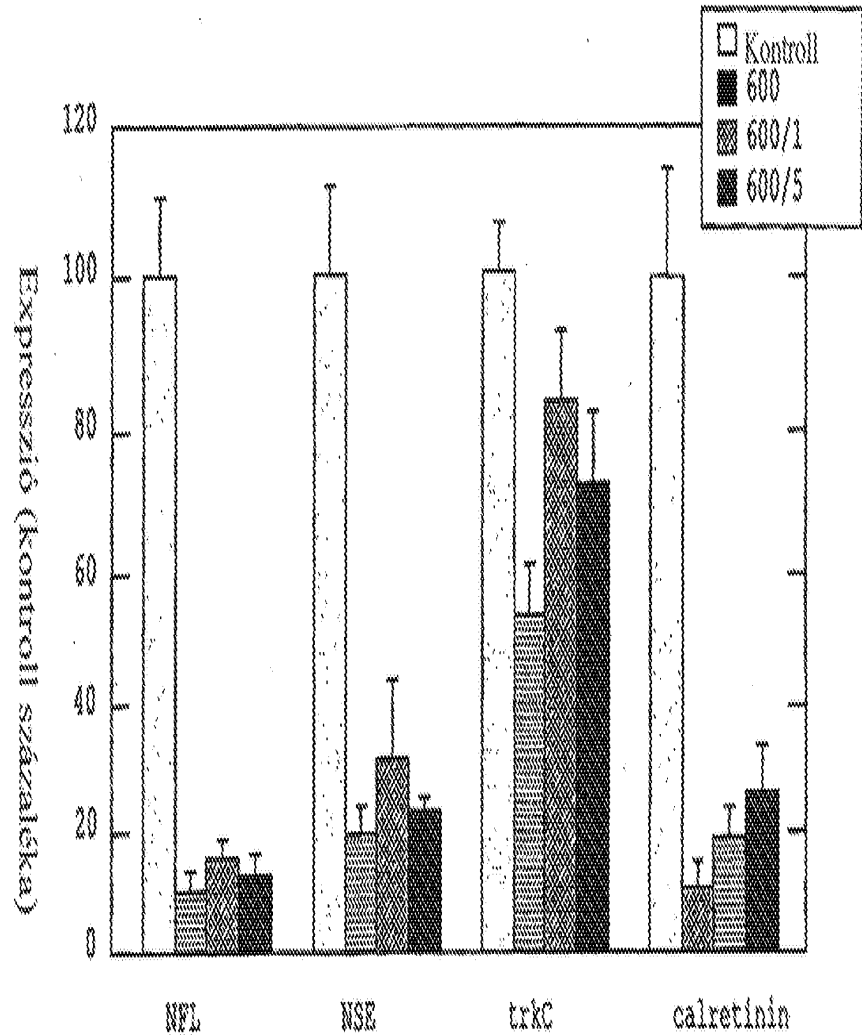


38/23

15. ÁBRA

ADVO-PATENT
KARADALAT ÉS VÉDELŐ IRODA
KÖZTÁRSASÁGI PÁRT
KÖZTÁRSASÁGI PÁRT

Az agonista monoklonális antitest enyhíti a kis dózisu piridoxin hatásait



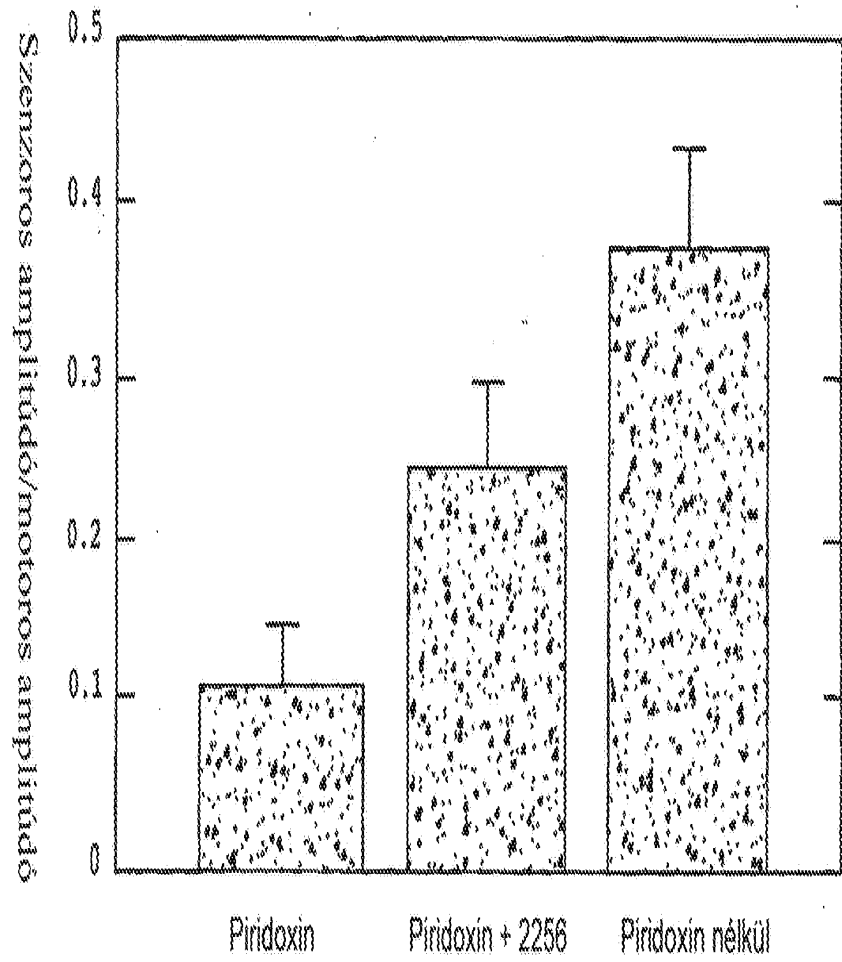
38/24

16. ÁBRA

5500

ADVERZANUS
HATÁSOK
KÖVETKEZÉSEI
KÖVETKEZÉSEI
KÖVETKEZÉSEI

Az agonista monoklonális antitest enyhíti a piridoxin-indukálta neuropathiát



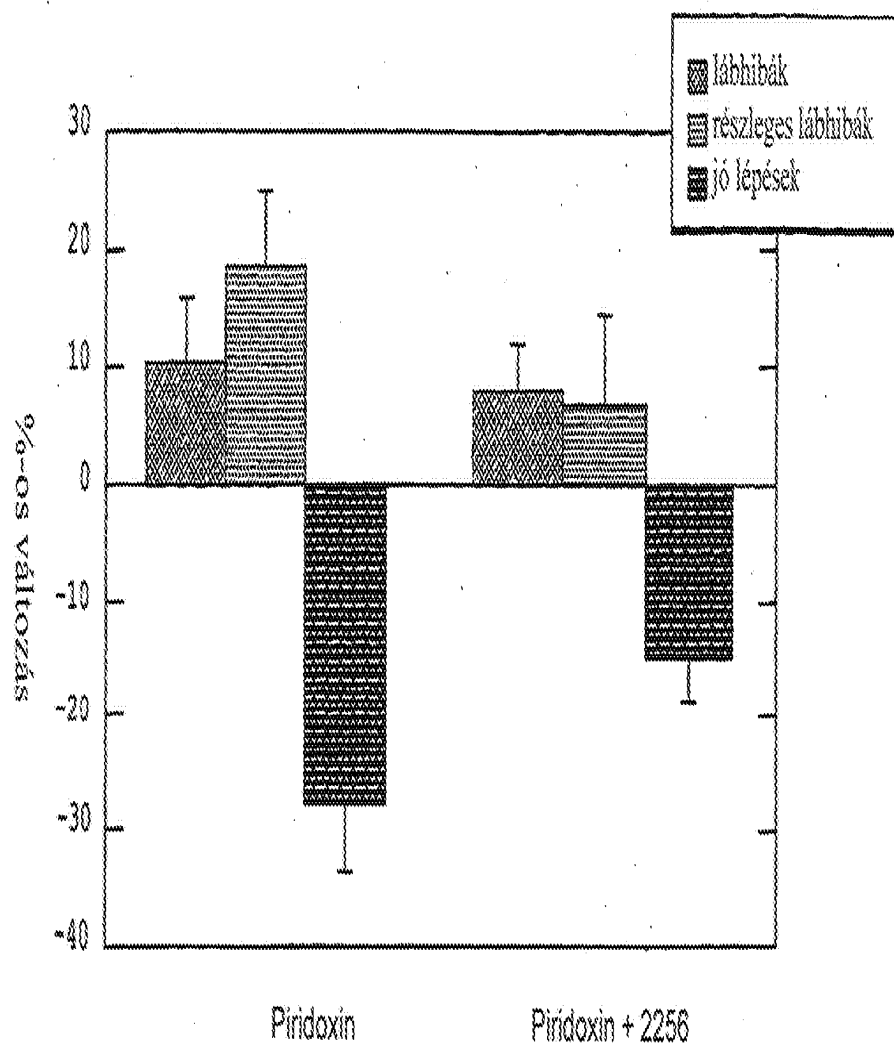
38/25

17. ÁBRA

17. ÁBRA
A piridoxin-indukálta neuropathiát enyhíti az agonista monoklonális antitest (2256).
A grafikon a szenzoros és motoros amplitúdókat mutatja a három csoportban.
A Piridoxin + 2256 csoportban a neuropathia enyhül, ami a magasabb amplitúdókban tükröződik.

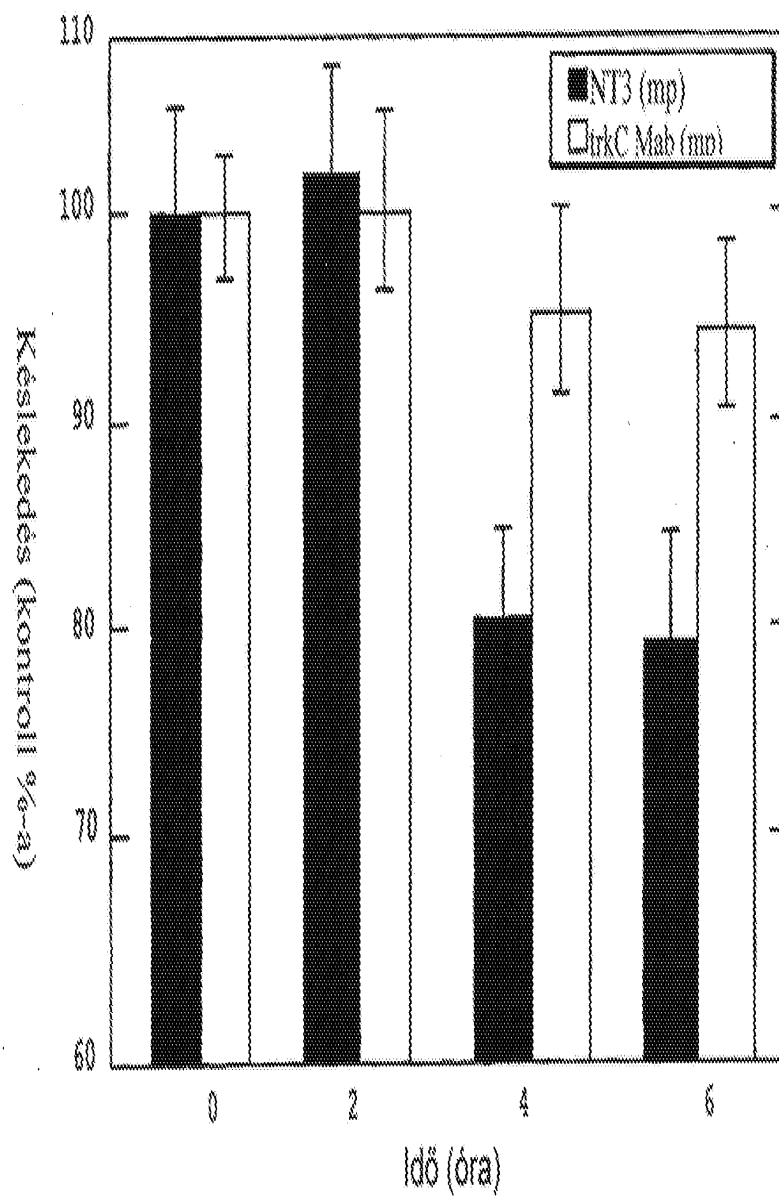
17. ÁBRA
A piridoxin-indukálta neuropathiát enyhíti az agonista monoklonális antitest (2256).
A grafikon a szenzoros és motoros amplitúdókat mutatja a három csoportban.
A Piridoxin + 2256 csoportban a neuropathia enyhül, ami a magasabb amplitúdókban tükröződik.

A trkC monoklonális antitest enyhíti a patkányok „létramászási” képességének
piridoxin-indukálta romlását



18. ÁBRA

A hőhatásra adott lábelhúzási reakcióidő változása



19. ÁBRA

38/27

1 CPANCYCSKT EINCRRPDG NLFILLEGQD SGNSGNHANI NITDISRNT SIHIEWRSL HTINAVDMEL YTCIQKLTIX NSGLRSIQPR AFKKNPHLY

101 INLSSNRITP LSWQLPQLS LRELQLEQNT FNCSDIRNM QLMQEQEAR LNSQNYCIN AIGSQPLPR MNISQCOLPE ISVSHVNLTV REGDNAVITC

^ 4. domén kezdete

201 NGSGSFLPDV DWYVTGLOSI NTHQINLNTV NVHAINLTV NVTSQNGFT LTCIAENVG MSNASVALTV YTPRVSLE EPELRIENTI EFVVRGNPPT

^ 5. domén kezdete

301 TLANLENGQP LRESKIHVE YIQGEISEG CLLFNKPTHY NNGNYTLAK NPLGTAMQTI NCHFLKEPTT ESTONFILED EVSPTPTIVT THKREDTFC

5. domén vége ^

401 VSIACLAAP ACVLIVLVLEW MINKYGRSK FGNKCPVAVI SGEESASPL HHINHGITP SSIDAGPOTV VIGNTRIPVI ENQYTRQGH NCHKPTTVQ

501 NIKRDIYIX RELCEGAPK VTLACYNLS PYDMNIVV KALKSFTLAK KQDQREAL LYNLQHENIV KENCVCQGD PLIMVFRYMK HGLNKLRA

601 HCPDAMILVD GQPRQARGEL GLSQMLIAS QIASQNYLA SQBVRDLA TRNCLVGANL LVKIGQFMS RQVSTOYVR LQNSGNDEC INCEVGGHM

701 LPIRWPPES IMYKFTTES DWSEGVILN EIFTYGRQW FQLSNTEVIE CITQGRVLER PRVCPKENVY VMLCQORRP QQRINIKELY KILHALGRAT

801 PIVLDILG

38/28

20. ÁBRA

.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

ÁNYORVOSI
SZAKDOKTORI ÉS VÉGELŐI
KÖZVETLEN KÖZVETLEN
KÖZVETLEN KÖZVETLEN

1 TGGCTGCGA ATTCTGTCTG CAGCAGACT GAGATCAAT GCGGCGGCGC GGACGTEGG ARCTCTTCC CTTCTCTGA AGGGCAGGAT TCAGGGAACA
 AGGGGACGTT TACACAGAC GTCTTCTGA CTCTAGTTAA CCGGCGGCGC CTTCTCTACC TTGAGAGAGG GGGAGGACCT TCCCTCTTA AGTCCCTGT

101 GCAATGCGAA CCGCAATATC AACATCAGG ACATCTCAAG GAATATCACT TCATACACA TAGAGACTG GCGAGTCTT CACAGCTCA ACAGCTTGA
 CTTTCCCTT GCGGTATAG TTCTAGTCC TTGAGACTTC CTATAGTGA AGTATGTGT ATCTCTGAC CCGCTAGAA GTCTGCGAGT TGCGGACCT

201 CATGAGCTC TACACGGAC TTCAAAGCT GACATCAAG AACTCAGAC TTGGAGCAT TCAGGCGAG GCTTTGCGA AGAGCGCGA TTGCGCTAT
 GTACTCGAG ATGTGCGCTG AAGTTTCTA CTGTACTTC TTGAGTCTG AAGCTCTGA AGTGGGCTT CCGAAGCTT TCTGCGCTT AAGCGAATA

301 ATAACTCTT CAGTAACTG GCTCAGACA CTCTCTGTC AGCTCTTCA GAGCTCAGT CTCTGGGAT TCGATTGGA GCAGACTTT TTCACTGCA
 TATTGCGCA GTTCTTGGC CAGCTGTGT GAGAGTCCG TCAGAGAGT CTGGACTCA GAGCGCTTA AGTCAACTT CTCTCTGAA AGCTGACCT

401 GCTGTGACT CCGTGGATG CAGCTCTGC AGAGCGGCG GGAGGCGAG CTCAACAGC AGAGCTCTA CTGATCAAT GTGATGGCT CCGAGCTTC
 CGACACTGA GCGAGCTAC GTGAGAGCG TCTCTGTC CTTCTGCTC GAGTTTCTG TCTGAGAT GAGTATTA CAGTACGA GGTGCGAGG

501 TCTCTTCCG ATGACATCA CTCAGTCTG CTCTCTGAG ATCAGCTGA GCGAGCTCA CCGAGCTTA CTGATCAAT GTGATGGCT CCGAGCTTC
 AGAGAGGCG TACTTGTAT CAGTCACT GAGAGCTC TACTCTCAT CCGTCTGAT GAGTCTGAT GTCTCTGAC TATTAGACA ATATCTTAC

4. domén kezdete

601 AATGCTCTG GATCAGCTT TCTGATCTG GAGTCTGAT TCAGTGGCT GAGTCTATC AACCTCAGC AGGCAATCT GAGTCTGAG AATGCTCTG
 TTACCGAGC CTAGTGGGA AGGACTAC CAGCTTATC AGTCTCTGA CCGAGGATG TTGAGTCTG TCTGTTACA CTGAGCTCG TTCACTATC

701 CCATCACTT GAGCTCTG AATCTGAGA GTGAGGAGA TGGCTTACC CTGAGTCTA TTGAGAGA CCGTCTGCG ATCAGCAATG CAGTCTCTG
 GTAGTTGAA CTGAGAGC TTCACTCTT CAGCTCTGT ACGAGTCTG GAGTCTCTT AAGTCTCTT GAGTCTCTG TACTCTCTG GTGAGAGC

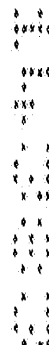
5. domén kezdete

801 CTTCTCTCT TACTATCCC CAGTCTGAT GAGCTCTGAG GAGCTCTGAG TGGCTCTGA GAGTCTCTT GAGTCTCTG TGGCTCTGA CCGCTCTGA
 GAGTCTCTG ATGATAGGG GTGAGCTCA CCGAGCTG CCGAGCTG AGGCGACT CCGAGCTG CTGAGCTG AGGCGACT CCGAGCTG

21. ÁBRA

21/A	21/B	21/C
ÁBRA	ÁBRA	ÁBRA

38/29



901 AGGCTGCACT GGTGTCACAA TGGGAGCCCT CTGGGGGAGT CCAAGATCAT CCAATGTGAA TACTACCAAG AGGAGAGAGT TTCCGAGGCG TGGCTGCTCT
TGGGACCTGA CCGAGCTGTT ACCGCTGCGA GAGGCGCTCA GGTCTAGTA GGTACACCTT ATGATGCTTC TGGCTCTGTA AAGGCTCCCG AGGAGAGAGA

1001 TCAACAGCC CACCCACTAC AACAAAGCCA ACTATACCTT CATTGCCAAA AAGGAGCTGG GCACAGCCAA CCGAGCCTAT AATGGCCTCT TCTCAAGGA
CGTACCTCTT CGGCTTATAG TTGAGTGGC TGTAGAGTTC CTTATAGTGA AGTATGCTT ATCTCTTGC CCGCTCAGAA GTGTGGAGT TCGGCACTT

1101 GCGCTTTCA GAGAGACGG ATAATTAT CTGCTTTGAC GAAGTGCCT CCACACTTC TATCACTGT ACCACAAAC CAGAGAGAA CACTTTTGG
CGGGAAGGT CTCTGCTGC TATGAAATA GAAAGATG CTTACTGAG GGTGTGAG AGTGTGAC TGGGTCTTGT GTCTCTCTT GTGAAACCG

5. domén vége

1201 GTATCCATAG CAGTGGAGT TGTCTCTTT GCTGTGTCC TGTGTGTGT TCTCTCTCT ATGATCAACA AATATGCTCG AGGCTCCAA TTGGAATGA
CATAGGTATC GTACACCTGA ACGACGAAA CGGACACAGG ACAACACCA AGAGAGTAG TACTACTGT TTATACAGC TGGCAGCTTT AAAGCTTACT

1301 AGGCTCCCT GGTCTCTAT AGTGTGTGG AGGACTGAG CAGTCCATG CACACATCA ACCACGAT CACACGCT TGTCTACTGG ATGCGGGCC
TGGCAGGCA CCGACAGTAC TCACACCTCT TGTGAGTGG GTGGGTGAC GTGTGTAGT TGTGTCTTA GTGGTGGCG AGCAGTGACC TACGGCTCG

1401 GCGACTGTG GTATTGGCA TGACTGCAAT CCGTGTCTT GAGACCCCT AGTACTTCC TCAGGACAC AATGTCTACA ACCGGACAC GTATGTGAG
GCTGTGACAC CAGTACCTT ACGAGGCTA GGGACAGTA CTCTTGGGG TCATGAGGC AGTCCCTGTG TTGACGCTGT TCGGCTGTG CATACAGCT

1501 CACATTAGA GGGAGACAT CGCTGTGAG CAGAGACTGG GTAGGAGCT CTTTGGAAAG GTCTCTCTG CCGAGTCTA CAGCTTACG CCGACAGG
GTGTAATCTT CCTCTCTGA GCAGACTTC GCTCTGACC CAGTCTCTG GAACTTTC CAGAGGACC GGTACAGT GTTGGAGTGG GGTGTCTTC

1601 ACAGATGCT TGTGCTGTG AAGGCTGTA AGATGCCAC CTTGCTTCC CCGAGGATT TCAGAGGA GGTGAGCTG CTACCTAAC TCGAGCTGA
TGTCTACGA ACACGACAC TTGCTGACT TCTAGGCTG GAGCGAGCG GCTTCTTA AGTCTCTCT CCGCTGAC GAGTGTGG AGTCTTACT

1701 GGCATTTTC AATCTCTAG GAGTGTGCG CGATGGGAC CCGCTCTCA TGGCTTTGA ATACATGAG CAGGAGACC TGAATAGTT CCGAGGCG
CGTGTACAG TTGAGATC CTCACGCG CTTACCGCT GGGAGTACT ACCGAACT TATCTACTT GTACTCTGG ACTATTCAA GAGTCCCG

21/B ÁBRA

38/30

...

1801 CATTGGCCAG ATGCAATGAT CTTGTGGAT GGCAGCCAC GGCAGCCAA GGTGGGCTG GGCCTCTCC AAATGTCCA CATTGCCAGT CAGATGCCCT
GTACCGGCTC TACCTTACTA GGCACACTA CTTGTGGAT GGTGGGCTC CCACTGAC CCGAGAGGG TTACGAGGT GTACGGTCA GTCTAGCGA

1901 CCGGTATGGT GTACCTGGCC TCCAGCACT TTGTGCACG AGACTGGCC ACCAGCACT CCGTGGTGG AGCAATCTG CTAGCTAAGA TTGGGGACTT
GCCATACCA CATTGACGG AGGTCTCTA AACAGTGGC TTGTGACGG TGTCTCTTA CCGACCAAC TCGCTAGAC GATCACTCT AACCCCTGA

2001 CGCATGTCC AGAGTGTCT ACAGCAGGA TTATTACGG CTTTAAATC CATCTGAAA TGAATTTGT ATATGGTGG AGGTGGGAG ACACACCTG
GCCCTACAG TTCTACAGA TGTCTGCTT AATAATGTC GCAATATAG GTAGACCTT ACTAAACA TATACACAC TCCACCTCT TGTGTGTAC

2101 CTTCCCTTC CTTGGATGC TCTTAAAC ATCTGTAC GAGTGTAC TACGAGAT GTGTATGA CTTCCGGGT GATCTCTG GAGTCTTA
GGGGGTAG CCACTACGG AGGCTTTC TATACATG CTTCACTG ATCTCTCA CTACACTCT GAGGCCCA CTAGAGAC CTTAGACT

2201 CTTATGAAA GCAGCTGG TTCACTCT CAACACGA GGCATTA TCAATACC AAGTCTGT TTGGAGCG CCGGAGCT GCCCAAGA
GATACCTT CTTGGTAC AGGTTCGA GTTGTGCT CAGTATCT AGTAATGG TTCAACCA AACCTGCC GGGCTAGA CCGGTTCT

2301 GGTGTACAT GTCTCTGG GGTCTGCA GAGGACCA CAGAGCGT TCAATCA GAGATCTAC AAATCTCT ATCTTTGG GAGGCTAC
CCATGCTA CAGTACGC CACAGCCCT CTTCTGCT GTCTGCTA ACTTGTAGT CTTCTAGT TTTTAGAG TACGAACC CTTCTGCT

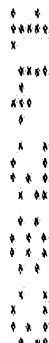
2401 CCAATCTAC TGCATCTCT TGTCTCTG TGTCTGCT TCAATATC ATCTCTCT GCTCTCTC TCTCTCTC ACATCTCT TCACTCTC
GTTAGATG ACCTTAAGA ACCATCAC ACCACCTC ACTACTAG TATACACCA CAGAGAGAG AGGAGGAG TGTAGAGGA AGTGGAGT

2501 AACTCTCTC ATCTCTCT GAGGAGCA TCTCATATA AACTCACT CTTCTACAC ATCAACACT GAAAAAGA AAAAAAGA AAAAAAA
TTAGAGAG TACGACTCA CTTCTCTT AGAGTAT TTAGTCTC GAGGAGTG TATCTGTGA CTTTCTCT TTTTCTCT TTTTCTCT

2601 AAACCC
TTTGGCG

38/31

21/C ÁBRA



REPRODUCED FROM
ORIGINAL DOCUMENT
BY THE NATIONAL
ARCHIVES

2250-es MAb nehéz lánc

CAGGTCCAACTGCAGCAGTCTGGGGCTGAGCTGATGCAGCCTGGGGCTCAGTGAAGATA
TCCTGCAAGTCTACTGGCTACACATTCAGTAACTCTGATAGAGTGGGTAAGCAGAGG
CCTGGACATGGCCTTGAGTGAATTCAGAGATTTTACCTGGCAGTGATAATACTAACTAC
AATGAGAAGTTCAGGGCAGGGCTACATTCAGTGCAGATACATCCTCCAACACAGCTTAC
ATGCAACTCAGCAGCTGACATCTGAGGACTCTGCCGCTATTACTGTGCAAGAAGAAAT
CGTAACACTATGGTAACTACGTTGTATGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA

22/A ÁBRA

2250-es MAb könnyű lánc

GACATTGTGATGACCCAGTCTCCTGCTTCTTAGTGTATCTCTGGGECAGAGGGCCACC
ATCTCATAAGGGCCAGCAAAAGTGTCACTACATCTGGCTATAGTTATATGCACTGGAAG
GGGGTCCCTGGCAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGCAGACTTCACCTTCACATCTAT
CCTGTGGAGGAGGAGGATGCTGAACCTATTACTGTGAGCAGATTAGGGAGCTTACAGT
TGGCTCGGGCACAAGTTGCAAAAACGG

22/B ÁBRA

38/32

38/32

2250-es MAb nehéz lánc

CAGGTCACAGTCGACAGCTCTGGAGCTGACCTGATGACGCTTGGGGCTTCAGTGAAGATA
TCCTGCAAGTCTACTGGCTACACATTGAGTAACCTTCGCTAGAGCTGGGTAAAGCAGGCG
CCTGGACATGGCCCTTCACTGGGATTTGGAGAACTTTTACCTGGCAGTGCATAATACTAATCTACA
ATGAGAGGTTCAAGGGCAGGCCACATTCCTCTCAGTACATCTCTCAACACAGCTTCA
TGCACCTCAGCAGCTGACATCTGAGGACTCTGGCGCTATTACTGTGCAGAAAGAAATC
GTAACTACTAATGTAACCTACCTTGTCTGGGGGCGAGCAACCACTCTCAGAGTCTCTCA

23/A ÁBRA

CAAATTGTGTGACCCAGTCTCCAGCATATGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGTCAAC
 ATAACCTGCCAGTCCAGCTCAAGTGTAAGTTACATGTACTGGTT
 CCAGCAGAAAGCCAGGACCTTTCTCCAAACTCTGGATTATATAGTACATCCAACTGGCTTC
 TGGAGTCCCTGTCTGCTTCAGTGGCAGTGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATCAG
 CCGAATGACAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTCCAGCAAGAGGAGTACTTACCGCT
 CACCTTCGGTGTCTGGGACCAAGCTTGGAACTTAAACGG

23/B ÁBRA

ww
w
w
w

CAGGTCACAGCTGCACGACGCTTGGGGCTGAACCTGGTCAAGCCTGGGGCTTCACTGAAGCTG
TCTTCCAGAGGCTTCTGGCTACACCTTCACAGCTACTGGATGCACTGGGTGAAGTAGAGG
CCTGCACAGGCTTTCAGTGGATGGAGAGATTATCTTAGCAAGGCTCGTACTAAGTAC
AATGAGAGTTCAGAGCAAGGCCACAG
ACTGTAGACAAATCTCTCAGCAGCCTACHTGCAACTCAGCAGCTGCATCTGAGGAC
TCTGGGGCTATTACTGTGCAAGAAAATATTACTACGGTAATAGCTATCGTTCCTGGTAC
TTCTGATGCTTGGGGCGAGGCACCTCTCAGACTCTCTCA

24/A ÁBRA

GACATTTGCTGACCCAGCTCTCCAGCTTCTTTGGCTGTGTCCTTAGGGCAGAGGGCCACC
ATCTCCTGTCAGAGGCCAGCGAAGATGTGTAATATATGGCATTAAGTTTATGAACTGGTTC
CAACAGAAACCCAGGACAGCCACCCAAACTUUTCATCTATGCTGCATCCAAACCAAGGATCC
GGGGTCCCTGCCAGGTTTAGTGGCAGTGGGTCTGGACAGAGCTTCAGCCTCAACATCCAT
CCTATGCAAGAGATGATACATGCATGTATTTCTGTGCACAAAGTAAGGAGGTTCTCTGG
ACUUTTCGGTGGAGGCCACCAAGCTGGAGATGAACGG

24/B ÁBRA

3834

[illegible]

A C C T G C A C T G T C T C T G G T G G G T C C A T C A G C A G T G G T G G T T A C T A C T G G A G C T G G A T C G C
 C A G C A C C C A G A A A G G G C T G G A G T G G T T G G G T A C A T C T T T T A C A S T G G G A G G A C C T A C T
 A C A A C C C G T C C C T C A A G A G T C G A G T T A C A T A T C A G T A C A C A C G T C T A A G A A C C A G T T C T C
 C C T G A A G C T G A A C T C T G T G A C a G C C C C G G A C A C G C C G T G T A T T A C T G T G C G A G A G A G C G
 G A T A G C A G C A G C T G G T G C G G A C T A C T A C T A C A A C G G T T T G G A C G T C T G G G G C C A A G G G A C
 C A C G T C A C C G T C T C C T C A

25/A ÁBRA

GAAATTTGTTGACCCAGTCTCCAGGCACCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACC
CTCTCCTGCAGGGCCAGTCAAGTGTTAGCAGCACTACTTAACCTGGTACCAGCAGAAA
CCTGGCCAGGCTCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCA
GACAGGTTCAAGTGCAGTGGGCTGGGACAGACTTCACTCTCAACATCAGCAGACTGGAG
CCTGAAGATTTTCAGTGTATTACTGTCAAGTATGGTGGTCACTCCGATCACCTTC
GGCCAAAGGGACACCACTGGAGATTAAACGA

25/B ÁBRA

50

[illegible]

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCCTTCACAGACCCCTGTCCCTC
ACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCATTACAGCAGTGGTTATTATTATTGGAGCTGGATCGC
CAGCACCCAGGGAAGGGCTGGAGTGGATTGGGTACATCTATTACAGTGGGAGCACCTAC
TACAACCCGTCCTCAGAGTCGACTTACTATCAGTAGACAGCTCTAAGAACAGTTCTC
CTGAAGCTGAGCTCTGTGACTGCCGGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGAGCG
GATAGCAGCAGCTGGAACGGACTACTACTACAACGGTTTGGCCGTCTGGGGCCCAAGGCAC
CAGGGTCACCGTCTCCTCA

26/A ÁBRA

3806

GGAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCCACCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAGAGCCACT
TTCTCTCTGCAGGGGCCAGTCAGACTGGTAGCAGCACTTACTTAGCTGGTACCAGCAGAAAC
CTGGCCAGGCTCCAGGCTCCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGGCCACTGGCATCCCAG
ACAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGC
CTGAAGATTTGCACTGTATTACTGTCCAGCAGTATGGTAGGTCACCTCCGATCACCTTCG
GCCAAGGGACACGACTGGAGATTAACGA

26/B ÁBRA

~~CONFIDENTIAL~~

[illegible]

6.1.2 MAb nehéz lánc

CAGGTGCAGCTGCAGAGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCTGTGCTC
ACCTGCACCTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTGGTGGTTACTACTGGAGCTGGATCCG
GAGCACCCAGGAGAGGGCTGGAGTGGATTGGGTACATCTATTACAGTGGGAGCACCAAC
TACAACCCGTCCTCAAGAGTCGAGTTACCATCAGTGGACACCTCTAAGAACAGTTC
TCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACTGCGCGACACGGCGGTATTACTGTACGAGAGAT
CGGCACTATGATAGTACCGGGATTACTACTCTACTACGGTATGGAGCTCTGGGGCAA
GGGACCACGGTCAAGCTCTCTCTCA

27/A ÁBRA

6.1.2 MAb könnyű lánc

GATATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC
 ATCACTTGGCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGAAATGATTTAGGCTGGTATCAGCAGAAACA
 GGGAAAGCCCTTAAGCGCCTGATCTATGCTGCAATCCAGTTTGCAAGTGGGGTCCCATCA
 AGGTTTCAGGGGAGTGGATCTGGGACAGAAATCACTCTCACAATCGCAGGCTGCAGCCT
 GAAGATTTTGCACCTTTTACTGTCTACAGCATTAATAGTCTTCCCTCACTTTGGGGGA
 GGGACCAAGGTCAGATCAACA

27/B ÁBRA

6.4.1 MAb nehéz lánc

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCCAGGACTGGTGAGGCCTTCGGAGACCCCTGTCCCTC
ACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGTACTTACTACTGGAACTGGATCCGGCAGCCC
GCCCCGAAGGGACTGGAGTGGATTGGGCGTATCTATACAGTGGGAGCACCACACTACAAC
CCCTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATGTTCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTGTCCCTG
AAGCTGAGCTCTGTGACCGCCCGGGACACGGCGTGTATTACTGTGGGAGAGATGGGGGC
TACAGTAACCCCTTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCCTCA

28/A ÁBRA

38/38

6.4.1 MAb könnyű lánc

GATATCCAGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAGAGGGCCACC
ATCAACTGCAAGTCCAGCCAGAGTGTTCATACAGCTCCAACAATAAGAACTACTTAGCT
TGGTACCAGCAGAAACCTGGACAGCCTCCTAAGCTG
CTCATTTACTGGGCATCTACCGGGAATCCGGGTCCTTGACCGAATCAGTGGCAGCGGG
TCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGGCTGAAGATGTGGCAGTTTAT
TACTGTCAACACATTATAATACTCCACTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATC
AAACGA

28/B ÁBRA

38/38