

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : C12N 15/87, 15/12, C07K 14/47, C12N 15/62, A61K 38/12, 39/00, C07K 16/00, 16/46		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/53790 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 14. September 2000 (14.09.00)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/01612 (22) Internationales Anmeldedatum: 26. Februar 2000 (26.02.00) (30) Prioritätsdaten: 199 10 419.0 10. März 1999 (10.03.99) DE (71) Anmelder: AVENTIS PHARMA DEUTSCHLAND GMBH [DE/DE]; Brünningstrasse 50, D-65929 Frankfurt am Main (DE). (72) Erfinder: KONTERMANN, Roland; Auf dem Brunkel 27, D-35085 Ebsdorfergrund (DE). NETTELBECK, Dirk; Steinweg 41, D-35037 Marburg (DE). SEDLACEK, Hans-Harald; Sonnenhang 3, D-35041 Marburg (DE). MÜLLER, Rolf; Poitiersstrasse 8, D-35037 Marburg (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> <i>Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>	
(54) Title: TARGET CELL-SPECIFIC, MULTIVALENT PROTEINS (MVP) (54) Bezeichnung: ZIELZELLSPEZIFISCHE, MULTIVALENTE PROTEINE (MVP) (57) Abstract The invention relates to a target cell-specific, multivalent protein (MVP) characterized in being comprised of the following components which are covalently bound to one another: a) a binding structure (a)_n specific for the vector; b) a linker (b)_m and; d) at least two binding structures (c)_o for the target cell, whereby, independent of one another, n=1, m=1-10 and o=2-10. The invention also relates to the production and use of said multivalent protein. (57) Zusammenfassung Die Erfindung bezieht sich auf ein zielzellspezifisches, multivalentes Protein (MVP) dadurch charakterisiert, dass das MVP aus folgenden kovalent miteinander verbundenen Komponenten besteht: a) einer Bindestruktur (a)_n spezifisch für den Vektor, b) einem Linker (b)_m, und d) mindestens zwei Bindestrukturen (c)_o für die Zielzelle; wobei unabhängig voneinander n=1, m=1-10 und o=2-10 sind, seine Herstellung und Verwendung.			

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbajdschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland			TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	NZ	Neuseeland		
CM	Kamerun			PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

Beschreibung

Zielzellspezifische, multivalente Proteine (MVP)

5 1. Einleitung

In der Natur kommen zahlreiche monovalente Proteine vor. Diese monovalenten Proteine binden mit ihrem Bindungspartner, z. B. einem Zellmembranrezeptor, in einem stöchiometrischen Verhältnis von 1:1. Beispiele für derartige monovalente
10 Proteine sind Wachstumsfaktoren, Cytokine, Chemokine, Peptidhormone und Komplementrezeptoren. Des weiteren kommen in der Natur auch Bindungen in einem stöchiometrischen Verhältnis von $\geq 2:1$ vor. So binden beispielsweise zwei Moleküle des Wachstumsfaktors VEGF in Form eines Dimers an einen Zellmembranrezeptor, den VEGF-Rezeptor, um diesen zu aktivieren, während die
15 Bindung von Monomeren keine Aktivierung dieses Rezeptors bewirken kann.

Die Menge an Bindungsprodukten zwischen derartigen monovalenten Proteinen und beispielsweise ihren Rezeptoren wird hierbei bestimmt von der Stärke der Bindungskräfte zwischen beiden Bindungspartnern und ihren jeweiligen
20 Konzentrationen.

Zur Erhöhung der Menge an Bindungsprodukten werden von der Natur bereits bivalente und multivalente Proteine hergestellt. Derartige bivalente und multivalente Proteine sind beispielsweise Dimere oder Multimere von monovalenten Proteinen.
25 Beispiele hierfür sind Antikörper (über SH-Gruppen miteinander verbundene Dimere zweier gleicher, über SH-Gruppen miteinander verbundener Heterodimere, jeweils bestehend aus einer L-Kette und einer H-Kette) oder der T-Zell-Rezeptor, bestehend aus einer α -Kette und einer β -Kette.

30 Die in natürlicher Weise vorkommenden bivalenten und multivalenten Proteine haben jedoch folgende Nachteile:

- sie binden nur an einen Bindepartner

- ihre Molekülgröße ist beträchtlich
 - ihre Penetrationsfähigkeit durch Zellmembranen und durch die extrazelluläre Matrix ist äußerst gering
 - sie binden nur homogene, nicht heterogene Bindepartner
- 5 - ihre biotechnologische Herstellung ist äußerst aufwendig.

Gegenstand der Erfindung sind nunmehr neue zielzellspezifische, multivalente Proteine (MVP), welche mindestens zwei Bindestrukturen haben, die an ein Molekül eines Bindepartners oder mindestens an zwei unterschiedliche Bindepartner binden.

10

Gegenstand der Erfindung sind des weiteren zielzellspezifische, multivalente Proteine (MVP), welche ein fusogenes Peptid enthalten und mit Hilfe dieses fusogenen Peptids durch Zellmembranen penetrieren können.

- 15 Gegenstand der Erfindung sind desweiteren zielzellspezifische, multivalente Proteine (MVP), welche eine Spaltsequenz für eine Protease enthalten.

Gegenstand der Erfindung ist darüber hinaus die Verwendung eines derartigen zielzellspezifischen, multivalenten Proteins für die Prophylaxe, Therapie oder

- 20 Diagnose einer Erkrankung.

Zielzellspezifische, multivalente Proteine sind bereits als Liganden für virale oder nicht virale Vektoren beschrieben worden.

- 25 Zur Zielsteuerung von Adenoviren wurden bisher zwei verschiedene Strategien beschrieben (Curiel, D.T. et al., 1998, Tumor Targeting 3:59). Eine Möglichkeit ist die Modifikation des adenoviralen "fiber"-Proteins an der für die Bindung an Zellen verantwortlichen "knob"-Domäne. Dazu muß das adenovirale Genom modifiziert werden. Bei der zweiten Strategie werden Fusionsproteine aus einer
- 30 neutralisierenden Domäne und einem Liganden an die Viren gebunden. Als neutralisierende Domäne werden bisher Antikörper verwendet, die an die "knob"-Domäne des Adenovirus binden und so die Bindung des Virus an Zellen verhindern, d.h. die Adenoviren "neutralisieren". Der fusionierte Ligand bedingt durch Bindung

an den entsprechenden, spezifischen zellulären Rezeptor eine Zielsteuerung des Virus an jene Zellen, die diesen Rezeptor exprimieren. Eine Modifikation des fibrozyten ist bei diesem Ansatz nicht notwendig und es können mit vergleichsweise geringem Aufwand viele verschiedene Liganden getestet werden.

5

Im Sinne der oben beschriebenen Strategien sind folgende Techniken beschrieben worden:

- 10 – die genetische Modifikation von Viren (im besonderen Adenoviren), so daß auf ihrer Oberfläche zusätzliche Peptidsequenzen zur Konjugation von den gewünschten Liganden exprimiert werden (WO 95/26412)
- die Komplexierung eines Virus (im besonderen Adenovirus) mit einem Fusionsprotein bestehend aus dem zellexternen Teil des zellulären Rezeptors für das Virus, einem Linker und einem Liganden für einen Rezeptor auf der
15 gewünschten Zielzelle (WO 98/33929)
- die Komplexierung eines Virus (im besonderen Adenovirus) mit einem Fusionsprotein bestehend aus einem Antikörper bzw. Antikörperfragment spezifisch für ein Protein auf dem Viruskapsid und einem Liganden spezifisch für die gewünschte Zielzelle (WO 94/10323, WO 98/40508)
- 20 – die Komplexierung eines Virus (im besonderen Adenovirus) mit einem Fusionsprotein (bestehend aus einem Antikörper bzw. Antikörperfragment spezifisch für ein Epitop in der Hexonregion des Virus und einem kationischen Peptid) und einem Plasmid (EP A 0 535 576 A1).

- 25 Des weiteren wurden beispielsweise mit gentechnologischen Methoden zellspezifische Bindestrukturen wie Heregulin (Han et al., PNAS 92, 9747 (1995)), Erythropoietin (Kasahara et al., Science 266, 1373 (1994)), Antikörperfragmente wie "single chain Fv" (Marin et al., J. Virol. 70, 2957 (1996)) oder Rezeptoren wie der extrazelluläre Teil des Fc-Rezeptors (Dougherty et al., Transfusion Science 17, 121
30 (1996)) in die Hüllglykoproteine von retroviralen Vektoren eingebaut und hierdurch eine Zielzellspezifität bewirkt.

Nichtvirale Vektoren bestehen im einfachsten Falle aus Plasmiden komplexiert mit kationischen Molekülen, wie beispielsweise kationische Polymeren oder kationische Lipiden. Um derartige Vektoren selektiv in Zellen eines bestimmten Typs einbringen zu können, wurden beispielsweise mit chemischen Methoden zellspezifische

5 Bindestrukturen, wie das Asialoglykoprotein (Wu et al., J. Biol. Chem. 269, 1152 (1994)) oder synthetische Derivate hiervon (Merwin et al., Bioconjugate Chem. 5, 612 (1994)) mit Polylysin verknüpft und dieses entweder mit dem Genkonstrukt komplexiert oder an Hüllproteine von adenoviralen Vektoren chemisch gebunden.

10 Eine weitere Methode war zellspezifische Bindestrukturen an Streptavidin zu binden, welches sich wiederum an Biotin, konjugiert an die Phospholipidkopfgruppen von Liposomen bindet, wobei die Liposomen mit Genkonstrukten komplexiert sind (Redelmeir et al., Drug Deliv. J. Deliv. Targeting Therap. Agents 2, 98 (1995)). Eine Weiterentwicklung bestand in der Herstellung künstlicher Ligandensysteme
15 bestehend aus einer zielzellspezifischen Bindestruktur, einer vektorspezifischen Bindestruktur und ggf. einem fusogenen Peptid. ein erstes derartiges Ligandensystem wurde von Fominaya et al., J. Biol. Chem. 271, 10560 (1996) vorgestellt.

20 Dieses Ligandensystem besteht aus einem Antikörperfragment spezifisch für den Erb B2-Rezeptor auf Tumorzellen, dem fusogenen Peptid des Pseudomonas Exotoxin A und der DNA-bindenden Domäne des Gal4-Proteins der Hefe, die an die korrespondierende Gal4-Bindesequenz, eingefügt in ein das Transgen enthaltende Plasmid, bindet. Dieses Ligandensystem führt zwar zu einer zielzellspezifischen
25 Transfektion, besitzt jedoch den Nachteil der Immunogenität des Gal4-Proteins der Hefe.

Eine deutliche Verbesserung fusogener Ligandensysteme für virale und nicht virale Vektoren erfolgte mit dem Aufbau von mehrfach funktionellen Ligandensystemen
30 unter Bevorzugung nicht oder nur gering immunogener Komponenten (EP-A 0 846 772). Des weiteren ermöglicht die Technologie für einzelkettige, zweifachantigenbindende Moleküle (DE 198161417, nicht veröffentlicht), relativ

einfach zielzellspezifische, künstliche Ligandensysteme mit oder ohne fusogene Peptide für virale oder nichtvirale Vektoren herzustellen.

Die Funktionsfähigkeit dieser verschiedenen Techniken für zielzellspezifische
5 Liganden von Vektoren wurde in den aufgeführten unterschiedlichen
Veröffentlichungen und Patentanmeldungen beschrieben. Gemeinsam ist diesen
Ligandensystemen jedoch der Nachteil, daß die Aufnahme der Vektoren in die Zelle
durch Pinozytose oder Endozytose nur unzureichend ist. Es besteht somit ein
beträchtlicher Bedarf an einer Verbesserung von künstlichen zielzellspezifischen
10 Ligandensystemen auch in der Gentherapie.

2. Kurzbeschreibung der Erfindung

Gegenstand der Erfindung sind zielzellspezifische, multivalente Proteine (MVP) für
15 die Prophylaxe, Therapie oder Diagnose einer Erkrankung, dadurch charakterisiert,
daß das MVP mindestens zwei gleiche Bindestrukturen aufweist, die an ein Molekül
eines Bindepartners auf der Zielzelle binden. Gegenstand der Erfindung sind des
weiteren MVP, welche mindestens zwei unterschiedliche Bindestrukturen spezifisch
für gleiche oder unterschiedliche Bindepartner auf der Zielzelle aufweisen. Durch die
20 erfindungsgemäßen Moleküle wird eine verbesserte Bindung an, Aufnahme in die
oder Vernetzung mit der Zielzelle ermöglicht. Die vorliegende Erfindung ist eine
Weiterentwicklung der Erfindung, offenbart in der Patentanmeldung EP-A 0 846 772,
in welcher multifunktionelle Liganden beschrieben werden, sowie eine
Weiterentwicklung der Technologie zur Herstellung einzelkettiger, zweifach-
25 antigenbindender Moleküle (DE 198161417, nicht veröffentlicht). Auf beide
Patentanmeldungen wird mit dieser Erfindung ausdrücklich Bezug genommen.

Die zellspezifischen Bindestrukturen gemäß der vorliegenden Erfindung können sein
zellmembranbindende Wirkstoffe, wie beispielsweise Homodimere oder
30 Homomultimere eines Adhäsionsmoleküles, eines Wachstumsfaktors, eines
Cytokins, eines Chemokins, eines Hormons, eines Antikörpers oder eines
Antikörperfragmentes oder aber die zellmembranbindenden Teile dieser Wirkstoffe,
welche nur an ein Molekül eines Zellmembranrezeptors binden.

Diese Bindestrukturen können des weiteren sein Heterodimere oder Heteromultimere aus zellmembranbindenden Wirkstoffen, wie beispielsweise aus Adhensionsmolekülen, Wachstumsfaktoren, Cytokinen, Chemokinen, Hormonen, Antikörpern oder Antikörperfragmenten oder aber die zellmembranbindenden Teile dieser Wirkstoffe, welche an mindestens zwei unterschiedliche Zellmembranrezeptoren binden und diese vernetzen.

Die erhöhte Bindung an oder die Kreuzvernetzung von gleichen oder unterschiedlichen Zellmembranrezeptoren hat beispielsweise zur Folge, daß die erfindungsgemäße MVP verstärkt an die Zielzelle binden und/oder in die Zielzelle aufgenommen werden (beispielsweise durch Pinozytose, Endozytose oder Phagozytose).

Die erhöhte Bindung an andere Zielstrukturen als Zellmembranrezeptoren kann beispielsweise eine verstärkte Komplexbildung mit der Zielstruktur zu Folge haben.

Entsprechend dieser Erfindung kann das MVP aus folgenden Komponenten aufgebaut sein:

- a) aus mindestens einem Wirkstoff [Komponente $a)_n$]
- b) aus einem oder mehreren Linkern, die ein fusogenes Peptid und/oder eine Spaltsequenz für eine Protease enthalten können [Komponente $b)_m$]
- c) aus mindestens zwei Bindestrukturen, [Komponente $c)_o$],

wobei unabhängig voneinander $n=1-10$, $m=1-10$ und $o=2-10$ sind und n , m und o ganze Zahlen sind.

Im Sinne der Erfindung sind hierbei die Komponenten $a)_n$, $b)_m$ und $c)_o$ durch eine beliebige Peptidsequenz mit einer Länge von vorzugsweise 0-30 Aminosäuren derartig miteinander zu verbinden, daß das hieraus resultierende MVP einen Proteineinzelstrang darstellt und die Funktion bzw. Wirkung jeder einzelnen Komponente $a)_n$, $b)_m$ und $c)_o$ vollständig erhalten bleibt.

Gegenstand der Erfindung sind des weiteren zielzellspezifische, multivalente Proteine, bei welchen mindestens zwei MVP miteinander verbunden sind. Diese Verbindung kann zwischen den Komponenten $a)_n$, $b)_m$ und/oder $c)_o$ erfolgen und nicht kovalent oder kovalent sein, beispielsweise im Sinne einer Peptidbindung oder einer -S-S-Bindung.

Beispiele für die sich aus dieser Erfindung ergebenden Möglichkeiten sind schematisch in den Figuren 1 und 2 (a-c) dargestellt.

Entsprechend dieser Erfindung kann die Komponente $a)_n$ gleich oder unterschiedlich zur Komponente $c)_o$ sein. Die Komponente a bzw. die Komponente c kann ausgewählt sein aus einer Gruppe beispielsweise umfassend:

- eine Bindestruktur für ein Virus, wie beispielsweise für AdV, AAV, ein Lentivirus, ein RTV, Vacciniavirus, HSV, Influenzavirus, HIV
- einen rekombinanten Antikörper spezifisch für ein Virusprotein, für einen nichtviralen Vektor oder für eine Nukleinsäure, wie beispielsweise ein IgG, $F(ab')_2$, Fab, rec. Fv, Diabody oder einzelkettiges, doppelantigenbindendes Protein
- ein Peptid mit Bindeaffinität zu einer definierten Nukleinsäuresequenz, wie beispielsweise LexA, Gal4 oder die DNA-Bindedomäne eines Transkriptionsfaktors oder ein Antikörper
- eine Transmembrandomäne oder ein Glykophospholipidanker,
- einen Wirkstoff wie beispielsweise der den Liganden bindenden Teil eines Rezeptors, der Ligand für einen Rezeptor oder die den Rezeptor bindende Teilsequenz des Liganden; ein Peptidhormon; ein Cytokin; ein Wachstumsfaktor; ein Wachstumsfaktoringhibitor; ein Chemokin; ein Interferon; ein Mediator; ein kreislaufwirksames Peptid; ein Enzym, welches eine inaktive Vorstufe eines Wirkstoffes in einen aktiven Wirkstoff überführt; ein Protein, welches die Gerinnung aktiviert oder inhibiert; ein Protein, welches die Fibrinolyse aktiviert oder inhibiert; ein Protein, welches das Komplementsystem aktiviert oder inhibiert; eine oder mehrere konstante Domänen eines Immunglobulins; ein zytotoxisches Peptid; ein die Apoptose induzierendes Peptid; ein die Apoptose

hemmendes Peptid; ein Tumorantigen oder das Antigen eines Infektionserregers, wie beispielsweise ein bakterielles Antigen oder ein virales Antigen; ein Peptid enthaltend Cystein zur Herstellung von Dimeren des erfindungsgemäße Moleküls: und/oder ein di- bzw. multimerisierendes Peptid (Plückthun und Pack,

5 Immunotechnol. 3, 83-105 (1997))

oder eine Bindestruktur für eine Zielzelle ausgewählt aus einer Gruppe beispielsweise umfassend:

- 10 – einen rekombinanten Antikörper spezifisch für eine Membranstruktur auf der Zielzelle, beispielsweise IgG, F(ab')₂, Fab, rec. Fc, Diabody oder einzelkettige, doppelantigenbindende Proteine
- das Fc-Teil eines Immunglobulins
- einen Wachstumsfaktor
- ein Cytokin
- 15 – ein Chemokin
- ein Peptidhormon
- ein Adhäsionsmolekül
- einen Mediator
- die Zellmembran-bindende Domäne eines Virushüllproteins.

20

Des weiteren kann entsprechend dieser Erfindung die Komponente b)_m einen oder mehrere Linker enthalten, ausgewählt aus einer Gruppe beispielsweise umfassend

- ein Peptid beliebiger Länge
- 25 – ein Peptid mit mindestens zwei Cysteinen
- die Hingeregion eines Immunglobulins
- ein homo- oder heterodimerisierendes Peptid
- eines der bereits aufgeführten Peptide verbunden mit einem fusogenen oder Translokationspeptid
- 30 – eines der bereits aufgeführten Peptide mit einer Spaltstelle für Proteinase.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Nukleinsäure kodierend für ein erfindungsgemäßes Molekül. Die Nukleinsäure ist im allgemeinen eine DNA oder RNA, vorzugsweise eine doppelsträngige DNA.

- 5 Für die gegebenenfalls gewünschte Sekretion des erfindungsgemäßen Expressionsproduktes enthält die erfindungsgemäße Nukleinsäure am 5'-Ende eine Nukleotidsequenz kodierend für eine Signal- oder Transmembransequenz (siehe z.B. EP-A 0 848 063 oder EP-A 0848 061). Ein Beispiel für geeignete Signal- oder
- 10 Transmembransequenzen ist die Signalsequenz für das Immunglobulin (DNA-Position ≤ 63 bis ≥ 107 , die Signalsequenz für das CEA (DNA-Position ≤ 33 bis ≥ 134) oder die Signalsequenz des Human Respiratory Syncytial Virus Glycoproteins (cDNA der Aminosäuresequenzen ≤ 38 bis ≥ 50 oder 48 bis 65).
- 15 In einer weiteren Ausführungsform enthält die erfindungsgemäße Nukleinsäure am 5'-Ende einen Promotor und/oder Aktivator. Der Aktivator ist vorzugsweise zellspezifisch, zellzyklusspezifisch, metabolisch-spezifisch und/oder durch einen Wirkstoff aktivierbar oder suprimierbar. Derartige Aktivatorsequenzen einschließlich ihrer Kombinationen sind in EP-A 0 790 313, EP-A 0 805 209, EP-A 0 848 063, EP-A
- 20 0 848 061, EP-A 0 857 781, EP-A 0 860 445 bzw. EP-A 0 864 651 beschrieben.

In einer bevorzugten Ausführungsform enthält die erfindungsgemäße Nukleinsäure am 5'-Ende des Startkodons die Sequenz GCCACC oder GCCGCC, welche eine Verstärkung der Translation bewirken kann.

25

- Eine andere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung bezieht sich auf einen Vektor enthaltend die erfindungsgemäße Nukleinsäure. Der Vektor kann hierbei ein viraler oder nicht viraler Vektor sein. Ein nicht viraler Vektor ist bevorzugterweise ausgewählt aus einer Gruppe umfassend ein kationisches Lipid, ein kationisches
- 30 Polymer, ein kationisches Peptid oder ein kationisches Porphyrin.

Ein viraler Vektor ist bevorzugterweise ausgewählt aus einer Gruppe umfassend RTV, AV, AAV, HSV, Vaccinia Virus, Lenti Virus, Influenzavirus.

Zur Herstellung der erfindungsgemäßen Moleküle wird die beschriebene Nukleinsäure in einen Expressionsvektor, beispielsweise ein geeignetes Plasmid kloniert, in eine geeignete Zelle, beispielsweise in eine Bakterien-, Hefe-, Insekten- oder Säugerzelle eingebracht, die so transformierte oder transfizierte Zelle kultiviert und das Expressionsprodukt gegebenenfalls isoliert. Die Methoden sind dem Fachmann allgemein bekannt und beispielsweise bei Sambrook J. et al., Molecular Cloning, A Laboratory Handbook 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, näher beschrieben.

- 10 In einer besonderen Ausführungsform der vorliegenden Erfindung exprimieren diese Zellen ein erfindungsgemäßes Molekül mit einer Bindestruktur [Komponente a)_n oder c)_o], wobei diese Bindestruktur vorzugsweise eine Transmembrandomäne ist.

- 15 So kann beispielsweise die DNA-Sequenz kodierend für die Transmembransequenz des menschlichen Makrophagenkolonie-stimulierenden Faktors (DNA-Position ≤ 1485 bis ≥ 1554) oder die DNA-Sequenz kodierend für die Signal- und Transmembranregion des menschlichen Respiratory Syncytical Virus (RSV)-Glykoproteins G (Aminosäuren 1 bis 63 oder deren Teilsequenz Aminosäuren 38 bis 63) oder die DNA-Sequenz kodierend für die Signal- und Transmembranregion der
20 Influenzavirus-Neuraminidase (Aminosäuren 7 bis 35 oder die Teilsequenz Aminosäuren 7 bis 27) zwischen der Promotorsequenz und der DNA-Sequenz des erfindungsgemäßen Moleküls oder auch am 3'-Ende des Gens eingefügt werden.

- 25 Zur Verankerung des erfindungsgemäßen Moleküls in die Zellmembran der das erfindungsgemäße Molekül exprimierenden Zellen kann jedoch auch eine Nukleotidsequenz kodierend für einen Glykophospholipid-Anker in das Nukleinsäurekonstrukt eingefügt werden.

- 30 Die Einfügung eines Glykophospholipid-Ankers erfolgt im allgemeinen am 3'-Ende der Nukleotidsequenz kodierend für das erfindungsgemäße Molekül und kann zusätzlich zur Einfügung einer Signalsequenz erfolgen.

Glykophospholipid-Anker sind beispielsweise für das CEA, für das N-CAM und für weitere Membranproteine, wie beispielsweise Thy-1, beschrieben worden.

- Durch diese Transmembranregion exprimiert die jeweilige Zelle das
- 5 erfindungsgemäße Molekül auf der Zellmembran und erhält somit einen "Rezeptor", der für diejenigen Ziel- oder Effektorstrukturen spezifisch ist, welche durch die antigenbindenden Teile des erfindungsgemäßen Moleküls erkannt werden. Eine andere bevorzugte Bindestruktur ist die transmembran- bzw. signaltransduzierende Domäne eines Rezeptors, beispielsweise der T-Zell-Rezeptor
- 10 oder der M-CSF-Rezeptor. Hierdurch kann die das erfindungsgemäße Molekül auf der Zellmembran exprimierende Zelle durch Bindung der Zielstrukturen zu spezifischen Funktionen aktiviert werden. Derartige spezifische Funktionen können beispielsweise eine zytotoxische Reaktion von T-Lymphozyten, Phagozytosereaktionen von Makrophagen und Granulozyten oder
- 15 Exozytosereaktionen von Granulozyten, Monozyten und Makrophagen sein.

- Ein anderer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher eine Zelle enthaltend eine erfindungsgemäße Nukleinsäure oder eine erfindungsgemäßen Vektor, insbesondere eine Bakterien-, Insekten-, Hefe- oder Säugerzelle. Als Säugerzellen
- 20 sind neben den allgemein bekannten Zellen zur Expression von Nukleinsäuren, wie z.B. CHO- oder BHK-Zellen, auch ein Lymphozyt, ein Makrophage, eine Gliazelle, eine Epithelzelle, eine Leberzelle, eine Nierenzelle, eine Knochenmarkszelle, eine Endothelzelle, eine glatte oder quergestreifte Muskelzelle oder ein Fibroblast geeignet.

- 25 Die zuletzt genannten Zellen sind insbesondere für eine gentherapeutische Anwendung geeignet, da diese Zellen, welche das erfindungsgemäße Nukleinsäurekonstrukt enthalten, einem Patienten lokal oder parenteral, z.B. intravenös, intraarteriell, in eine Körperhöhle, in ein Organ oder subkutan injiziert
- 30 werden können, um so zur Prophylaxe oder Therapie einer Erkrankung zu dienen.

Für die gentherapeutische Behandlung von Erkrankungen können jedoch auch die erfindungsgemäßen Nukleinsäurekonstrukte direkt dem Patienten lokal, in eine

Körperhöhle, in ein Organ, in das Blutgefäßsystem, subkutan oder intramuskulär verabreicht werden.

Ein anderer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher auch ein Arzneimittel
5 enthaltend ein erfindungsgemäßes MVP, eine erfindungsgemäße Nukleinsäure kodierend für ein MVP oder eine erfindungsgemäße Zelle, welche ein MVP exprimiert.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Diagnostikum enthaltend
10 ein erfindungsgemäßes Molekül, welches mit seiner Bindestruktur [Komponente a)_n oder c)_o] gegen einen Analyten gerichtet ist.

Das erfindungsgemäße MVP, die erfindungsgemäße Nukleinsäure, der erfindungsgemäße Vektor oder die erfindungsgemäße Zelle eignen sich somit zur
15 Therapie, Prophylaxe oder Diagnose von beispielsweise Tumorerkrankungen, Autoimmunerkrankungen, Entzündungserkrankungen, Erkrankungen des Blutes, insbesondere des Blutgerinnungs- und/oder Blutkreislaufsystems, Erkrankungen des Nervensystems und/oder Infektionserkrankungen.

20 Die Wahl der einzelnen Komponenten a)_n, b)_m und c)_o richtet sich hierbei im allgemeinen nach der Verwendung der erfindungsgemäßen Gegenstände. Im folgenden werden die einzelnen Komponenten und deren Verwendungen allgemein und beispielhaft näher beschrieben:

25 3. Beschreibung der Komponente a)_n und/oder Komponente c)_o

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung enthält die Komponente a und/oder Komponente c)_o bevorzugterweise mindestens ein ganzes Antikörpermolekül oder
mindestens ein Epitop-bindendes Fragment eines Antikörpers. Diese Antikörper sind
30 bevorzugt komplett humanen Ursprungs.

Die murinen monoklonalen Antikörper sind bevorzugt in humanisierter Form einzusetzen. Die Humanisierung erfolgt in der von Winter et al. (Nature 349, 293 (1991)) und Hoogenboom et al. (Rev. Tr. Transfus. Hemobiol. 36, 19 (1993)) dargestellten Weise. Antikörperfragmente und rekombinante Fv-Fragmente werden
5 entsprechend dem Stand der Technik, und wie nachfolgend beschrieben, hergestellt.

Die Spezifität des Antikörpers kann gerichtet sein gegen ein oder mehrere gleiche oder unterschiedliche Epitope auf den Hüllproteinen des Virus.

– Antikörper gegen Hüllproteine von Viren, die als Vektoren Verwendung finden
10 können, sind beispielsweise Antikörper gegen das

- * murine Leukämie Virus
- * HIV-Virus
- * Adenovirus
- * Herpes Simplex Virus
- 15 * Cytomegalovirus
- * Minute Virus of mice
- * adenoassoziiertes Virus
- * Sindbis-Virus
- * Vaccinia Virus

20 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung enthält die Komponente a)_n und/oder c)_o mindestens einen zellexternen Teil eines Fc-Rezeptors. An diesen Fc-Rezeptor bindet über sein Fc-Teil einer der bereits erwähnten Antikörper, welcher mit seinem antigenbindenden Teil direkt oder indirekt
25 an das Genkonstrukt bindet.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform enthält die Komponente a)_n und/oder c)_o den Rezeptor für das Hüllprotein eines Virus.

30 Derartige Rezeptoren sind beispielsweise für folgende Viren beschrieben worden:

- HIV

- * das CD4-Molekül (löslich oder nativ)
- * Galactosylceramid
- * Rezeptoren für Chemokine
- HBV
- 5 * der IL-6 Rezeptor
- * Annexin oder Apolipoprotein
- HTLV
- * der IL-2 Rezeptor (die β - wie auch die γ -Kette)
- Masern Virus
- 10 * das CD46 Molekül
- Friend Leukemia Virus
- * der Erythropoietin Rezeptor
- Varizella Zoster
- * das Fc-Fragment von humanem Immunglobulin G
- 15 – Sendai Virus
- * das Glycophorin
- Influenza C-Virus
- * die N-acetyl-9-acetamido-9-deoxy-neuraminsäure
- * die 9-O-acetyl-N-acetyl-neuraminsäure
- 20 – Foot and Mouth Disease Virus
- * das integrin $\alpha V\beta 3$
- EBV
- * der Complement Rezeptor 2 (CD21)
- Herpes simplex Virus
- 25 * der 275-kDa Mannose-6-Phosphat-Rezeptor oder der 46-kDa Mannose-6-Phosphat-Rezeptor
- adenovirales Virus
- * der CAR (Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor)
- 30 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform dieser Erfindung enthält die Komponente a)_n und/oder c)_o mindestens einen Wirkstoff, der zugleich auch eine Bindestruktur für eine Zelle sein kann.

Die Wahl dieses Wirkstoffes richtet sich nach der Erkrankung, welche durch Gabe des MVP oder des das MVP kodierenden Genes verhütet (prophylaktische Anwendung) oder behandelt (therapeutische Anwendung) werden soll. Bei Verabreichung einer Nukleotidsequenz für ein MVP sind die Promotorsequenzen für die Nukleotidsequenz, welche den Wirkstoff kodiert im Hinblick auf die Art der Therapie der Erkrankung und unter Berücksichtigung der zu transduzierenden Zielzelle auszuwählen.

Beispielsweise sind bei folgenden Erkrankungen folgende Wirkstoffe bzw. folgende Kombinationen von Promotorsequenzen (Beispiele siehe Abschnitt CI) und Nukleotidsequenzen kodierend für die Wirkstoffe zu wählen (eine detaillierte Beschreibung erfolgte bereits in den Patentanmeldungen EP-A 0 804 601, EP-A 0 790 313, EP-A 0 805 209, EP-A 0 848 063 und EP-A 0 848 061, auf die Bezug genommen wird).

Therapie von Tumoren

1) Zielzellen:

- proliferierende Endothelzellen oder
- der Endothelzelle benachbarte Stromazellen und Muskelzellen oder
- Tumorzellen oder Leukämiezellen

2) Promotoren:

- endothelzellspezifisch und zellzyklusspezifisch oder
- zellunspezifisch oder muskelspezifisch und zellzyklusspezifisch oder
- tumorzellspezifisch (solide Tumoren, Leukämien) und zellzyklusspezifisch

3) Wirkstoffe oder deren Nukleotidsequenzen:

3a) Inhibitoren der Zellproliferation, zum Beispiel

- das Retinoblastomprotein (pRb=p110) oder die verwandten p107 und p130 Proteine

Das Retinoblastomprotein (pRb/p110) und die verwandten p107 und p130 Proteine werden durch Phosphorylierung inaktiviert. Bevorzugt sind solche Gene dieser Zellzyklusinhibitoren zu verwenden, welche

Mutationen für die Inaktivierungsstellen der exprimierten Proteine aufweisen, ohne daß diese hierdurch in ihrer Funktion beeinträchtigt werden. Beispiele für diese Mutationen wurden beschrieben für das p110.

5 In analoger Weise wird die DNA-Sequenz für das p107 Protein oder das p130 Protein mutiert.

- das p53 Protein

Das Protein p53 wird in der Zelle inaktiviert entweder durch Bindung an spezielle Proteine, wie beispielsweise MDM2, oder durch

10 Oligomerisierung des p53 über das dephosphorylierte C-terminale Serin. Bevorzugt wird somit eine DNA-Sequenz für ein p53 Protein verwendet, welches C-terminal verkürzt ist um das Serin 392.

- das p21 (WAF-1)

- das p16 Protein

15 – andere cdk-Inhibitoren

- das GADD45 Protein

- das bak Protein

3b) Gerinnung induzierende Faktoren und Angiogeneseinhibitoren, zum

20 Beispiel:

- Plasminogenaktivatorinhibitor-1 (PAI-1)

- PAI-2

- PAI-3

- Angiostatin, Endostatin

25 – Interferone (IFN α , IFN β oder IFN γ)

- Platelet factor 4

- IL-12

- TIMP-1

- TIMP-2

30 – TIMP-3

- Leukemia Inhibitory Factor (LIF)

- Tissue Factor (TF) und dessen gerinnungsaktive Fragmente

3c) zytostatische und zytotoxische Proteine, zum Beispiel

- Perforin
- Granzym
- IL-2
- 5 – IL-4
- IL-12
- Interferone, wie beispielsweise IFN- α , IFN β oder IFN γ
- TNF, wie TNF α oder TNF β
- Oncostatin M
- 10 – Sphingomyelinase
- Magainin und Magainin-Derivate

3d) zytostatische oder zytotoxische Antikörper und Fusionsproteine zwischen antigenbindenden Antikörperfragmenten mit zytostatischen, zytotoxischen oder entzündungserregenden Proteinen oder Enzymen.

- Zu den zytostatischen oder zytotoxischen Antikörpern gehören solche gerichtet gegen Membranstrukturen von Endothelzellen wie sie beispielsweise von Burrows et al. (Pharmac. Ther. 64, 155 (1994)), Hughes et al., (Cancer Res. 49, 6214 (1989)) und Maruyama et al., (PNAS USA 87, 5744 (1990)) beschrieben wurden. Insbesondere zählen hierzu Antikörper gegen die VEGF-Rezeptoren.
- Des weiteren gehören hierzu zytostatische oder zytotoxische Antikörper gerichtet gegen Membranstrukturen auf Tumorzellen. Derartige Antikörper wurden zum Beispiel von Sedlacek et al., Contrib. to Oncol. 32, Karger Verlag, München (1988) und Contrib. to Oncol. 43, Karger Verlag, München (1992) übersichtlich dargestellt. Weitere Beispiele stellen dar Antikörper gegen Sialyl Lewis_x; gegen Peptide auf Tumoren, welche von T-Zellen erkannt werden; gegen von Onkogenen exprimierte Proteine; gegen Ganglioside wie GD3, GD2, GM2, 9-0-acetyl GD3, 25 Fucosyl GM1; gegen Blutgruppenantigene und deren Vorläufer; gegen Antigene auf dem polymorphen epithelialen Mucin; gegen Antigene auf 30 Heat Shock Proteinen

- Des weiteren gehören hierzu Antikörper gerichtet gegen Membranstrukturen von Leukämiezellen. Eine große Anzahl derartiger monoklonaler Antikörper sind bereits für diagnostische und therapeutische Verfahren beschrieben worden (Übersichten bei Kristensen, Danish Medical Bulletin 41, 52 (1994); Schranz, Therapia Hungarica 38, 3 (1990); Drexler et al., Leuk. Res. 10, 279 (1986); Naeim, Dis. Markers 7, 1 (1989); Stickney et al., Curr. Opin. Oncol. 4, 847 (1992); Drexler et al., Blut 57, 327 (1988); Freedman et al., Cancer Invest. 9, 69 (1991)). Je nach Typ der Leukämie sind als Liganden beispielsweise monoklonalen Antikörper oder deren antigenbindende Antikörperfragmente gerichtet gegen folgende Membranantigene geeignet:

Zellen	Membranantigen
AML	CD13 CD15 CD33 CAMAL Sialosyl-Le
B-CLL	CD5 CD1c CD23 Idiotypen und Isotypen der Membranimmoglobuline
T-CLL	CD33 M38 IL-2-Rezeptoren T-Zell-Rezeptoren
ALL	CALLA CD19 Non-Hodgkin Lymphoma

- Die Humanisierung muriner Antikörper, die Herstellung und Optimierung der Gene für Fab und rek. Fv Fragmente erfolgt entsprechend der dem Fachmann bekannten Technik (Winter et al., Nature 349, 293 (1991); Hoogenboom et al., Rev. Tr. Transfus. Hemobiol. 36, 19 (1993); Girol. Mol.

Immunol. 28, 1379 (1991) oder Huston et al., Intern. Rev. Immunol. 10, 195 (1993)). Die Fusion der rek. Fv-Fragmente mit Genen für zytostatische, zytotoxische oder entzündungserregende Proteinen oder Enzymen erfolgt gleichermaßen entsprechend dem dem Fachmann bekannten Stand der Technik.

3e) Induktoren von Entzündungen, zum Beispiel

- IL-1
- IL-2
- RANTES (MCP-2)
- monocyte chemotactic and activating factor (MCAF)
- IL-8
- macrophage inflammatory protein-1 (MIP-1 α , - β)
- neutrophil activating protein-2 (NAP-2)
- IL-3
- IL-5
- human leukemia inhibitory factor (LIF)
- IL-7
- IL-11
- IL-13
- GM-CSF
- G-CSF
- M-CSF
- Cobra venom factor (CVF) oder Teilsequenzen vom CVF, welche dem menschlichen Komplementfaktor C3b funktionell entsprechen, d.h. welche an den Komplementfaktor B binden können und nach Spaltung durch den Faktor D eine C3 Konvertase darstellen
- der menschliche Komplementfaktor C3 oder seine Teilsequenz C3b
- Spaltprodukte des menschlichen Komplementfaktors C3, welche funktionell und strukturell dem CVF ähneln
- bakterielle Proteine, welche Komplement aktivieren oder Entzündungen auslösen, wie beispielsweise Porine von salmonella typhimurium,

"clumping" Faktoren von staphylococcus aureus, Moduline besonders von gram-negativen Bakterien, "Major outer membrane protein" von Legionellen oder von haemophilus influenzae Typ B oder von Klebsiellen oder M-Moleküle von Streptokokken Gruppe G.

5

3f) Enzyme für die Aktivierung von Vorstufen von Zytostatika, zum Beispiel für Enzyme, welche inaktive Vorsubstanzen (Prodrugs) in aktive Zytostatika (Drugs) spalten.

10

Derartige Substanzen und die jeweils zugehörigen Prodrugs und Drugs sind bereits von Deonarain et al. (Br. J. Cancer 70, 786 (1994)), Mullen,

(Pharmac. Ther. 63, 199 (1994)) und Harris et al. (Gene Ther. 1, 170 (1994)) übersichtlich beschrieben worden. Beispielsweise ist die DNA-

15

Sequenz eines der folgenden Enzyme zu verwenden:

- Herpes Simplex Virus thymidinkinase
- Varizella Zoster Virus Thymidinkinase
- bakterielle Nitroreduktase
- 20 – bakterielle β -Glucuronidase
- pflanzliche β -Glucuronidase aus Secale cereale
- humane β -Glucuronidase
- humane Carboxypeptidase (CB) zum Beispiel CB-A der Mastzelle, CB-B des Pankreas oder bakterielle Carboxypeptidase
- 25 – bakterielle β -Laktamase
- bakterielle Cytosine deaminase
- humane Catalase bzw. Peroxidase
- Phosphatase, im besonderen humane alkalische Phosphatase, humane saure Prostataphosphatase oder Typ 5 saure Phosphatase
- 30 – Oxidase, im besonderen humane Lysyloxidase oder humane D-aminosäure oxidase

- Peroxidase, im besonderen humane Glutathion Peroxidase, humane Eosinophilen Peroxidase oder humane Schilddrüsen Peroxidase
- Galaktosidase

5 Therapie von Autoimmunerkrankungen und Entzündungen

(eine detaillierte Beschreibung erfolgte bereits in der Patentanmeldung EP-A 0 807 183 und EP-A 0 848 061, auf die Bezug genommen wird)

1) Zielzellen:

- 10
- proliferierende Endothelzellen oder
 - Makrophagen und/oder Lymphozyten oder
 - Synovialzellen

15 2) Promotoren:

- endothelzellspezifisch und Zellzyklusspezifisch oder
- makrophagen- und/oder lymphozytenspezifisch und/oder zellzyklusspezifisch oder
- synovialzellspezifisch und/oder Zellzyklusspezifisch

20

3) Wirkstoffe oder deren Nukleotidsequenzen

3a) Wirkstoffe zur Therapie von Allergien, zum Beispiel

- 25
- IFN β
 - IFN γ
 - IL-10
 - Antikörper bzw. Antikörperfragmente gegen IL-4
 - lösliche IL-4-Rezeptoren
 - IL-12
 - TGF β

30

3b) Wirkstoffe zur Verhinderung der Abstoßung von transplantierten Organen, zum Beispiel

- IL-10
- TGF β
- lösliche IL-1-Rezeptoren
- lösliche IL-2-Rezeptoren
- 5 – IL-1-Rezeptorantagonisten
- lösliche IL-6-Rezeptoren
- immunsuppressive Antikörper oder deren V_H und V_L enthaltende
Fragmente oder deren über einen Linker verbundene V_H- und V_L-
Fragmente. Immunsuppressive Antikörper sind beispielsweise Antikörper
10 spezifisch für den T-Zell-Rezeptor oder seinen CD3-Komplex, gegen CD4
oder CD8 des weiteren gegen den IL-2-Rezeptor, IL-1-Rezeptor oder IL-
4-Rezeptor oder gegen die Adhäsionsmoleküle CD2, LFA-1, CD28 oder
CD40

- 15 3c) Wirkstoffe zur Therapie von Antikörper-mediierten
Autoimmunerkrankungen, zum Beispiel
 - TGF β
 - IFN α
 - IFN β
 - 20 – IFN γ
 - IL-12
 - lösliche IL-4-Rezeptoren
 - lösliche IL-6-Rezeptoren
 - immunsuppressive Antikörper oder deren V_H und V_L-enthaltende
25 Fragmente

- 3d) Wirkstoffe zur Therapie von Zell-mediierten Autoimmunerkrankungen, zum
Beispiel
 - IL-6
 - 30 – IL-9
 - IL-10
 - IL-13

- $\text{TNF}\alpha$ oder $\text{TNF}\beta$
- einen immunsuppressiven Antikörper oder dessen V_H - und V_L -enthaltende Fragmente

5 3e) Inhibitoren der Zellproliferation, zytostatische oder zytotoxische Proteine und Enzyme für die Aktivierung von Vorstufen von Zytostatika

Beispiele für Wirkstoffe oder für Gene kodierend für derartige Proteine sind bereits im Abschnitt "Strukturgene für die Therapie von Tumoren" aufgeführt.

10

In gleicher Form wie dort bereits beschrieben, können im Sinne der Erfindung Wirkstoffe verwendet werden, welche Fusionsproteine aus Antikörpern bzw. Fab oder rek. Fv-Fragmenten dieser Antikörper oder anderen Liganden spezifisch für die Zielzelle und den o.a. Cytokinen, Wachstumsfaktoren, Rezeptoren, zytostatischen oder zytotoxischen Proteinen und Enzymen darstellen.

15

3f) Wirkstoffe zur Therapie der Arthritis

20

Im Sinne der Erfindung werden Wirkstoffe bzw. deren Nukleinsäuresequenzen ausgewählt, die die Entzündung beispielsweise im Gelenk direkt oder indirekt hemmen und/oder die Rekonstitution von extrazellulärer Matrix (Knorpel, Bindegewebe) im Gelenk fördern.

25

Hierzu gehören zum Beispiel

- IL-1-Rezeptorantagonist (IL-1-RA);
IL-1-RA inhibiert die Bindung von $\text{IL-1}\alpha$, β

- löslicher IL-1-Rezeptor;

30

löslicher IL-1-Rezeptor bindet und inaktiviert IL-1

- IL-6

IL-6 erhöht die Sekretion von TIMP und Superoxiden und vermindert die Sekretion von IL-1 und $\text{TNF}\alpha$ durch Synovialzellen und Chondrozyten

- löslicher TNF-Rezeptor
löslicher TNF-Rezeptor bindet und inaktiviert TNF.
- IL-4
IL-4 inhibiert die Bildung und Sekretion von IL-1, TNF α und MMP
- 5 – IL-10
IL-10 inhibiert die Bildung und Sekretion von IL-1, TNF α und MMP und erhöht die Sekretion von TIMP
- Insulin-like growth factor (IGF-1)
IGF-1 stimuliert die Synthese von extrazellulärer Matrix.
- 10 – TGF β , im speziellen TGF β 1 und TGF β 2
TGF β stimuliert die Synthese von extrazellulärer Matrix.
- Superoxiddismutase
- TIMP, im speziellen TIMP-1, TIMP-2 oder TIMP-3

- 15 Therapie der mangelhaften Bildung von Zellen des Blutes
(eine detaillierte Beschreibung erfolgte bereits in der Patentanmeldung EP A
0 807 183, auf die Bezug genommen wird)

1) Zielzellen:

- 20 – proliferierende, unreife Zellen des blutbildenden Systems oder
– Stromazellen benachbart den blutbildenden Zellen

2) Promotoren:

- spezifisch für blutbildende Zellen und/oder Zellzyklusspezifisch
- 25 – zellunspezifisch und zellzyklusspezifisch

3) Wirkstoffe oder deren Nukleinsäuresequenzen:

3a) Wirkstoffe zur Therapie der Anämie, zum Beispiel

- Erythropoietin

30 3b) Wirkstoffe zur Therapie der Leukopenie, zum Beispiel

- G-CSF
– GM-CSF

- M-CSF

3c) Wirkstoffe zur Therapie der Thrombozytopenie, zum Beispiel

- IL-3
- 5 – Leukemia Inhibitory Factor (LIF)
- IL-11
- Thrombopoietin

Therapie von Schäden des Nervensystems

10 1) Zielzellen:

- Gliazellen oder
- proliferierende Endothelzellen

2) Promotoren:

- 15 – Gliazell-spezifisch und zellzyklusspezifisch oder
- Endothelzell-spezifisch und Zellzyklusspezifisch oder
- unspezifisch und Zellzyklusspezifisch

3) Wirkstoffe oder deren Nukleinsäuresequenzen:

20 3a) neuronale Wachstumsfaktoren, zum Beispiel

- FGF
- Nerve growth factor (NGF)
- Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)
- Neurotrophin-3 (NT-3)
- 25 – Neurotrophin-4 (NT-4)
- Ciliary neurotrophic factor (CNTF)

3b) Enzyme, zum Beispiel

- Tyrosinhydroxylase
- 30 – Dopadecarboxylase

3c) Cytokine und deren Inhibitoren, welche die neurotoxische Wirkung von $\text{TNF}\alpha$ inhibieren oder neutralisieren, zum Beispiel

- $\text{TGF}\beta$
- lösliche TNF-Rezeptoren
- TNF-Rezeptoren neutralisieren $\text{TNF}\alpha$
- IL-10

IL-10 inhibiert die Bildung von $\text{IFN}\gamma$, $\text{TNF}\alpha$, IL-2 und IL-4

- lösliche IL-1-Rezeptoren
- IL-1-Rezeptor I
- IL-1-Rezeptor II
- lösliche IL-1-Rezeptoren neutralisieren die Aktivität von IL-1
- IL-1-Rezeptor-Antagonist
- lösliche IL-6-Rezeptoren

15 Therapie von Störungen des Blutgerinnungs- und Blutkreislaufsystems
(eine detaillierte Beschreibung erfolgte bereits in den Patentanmeldungen EP-A 0 777 739, EP-A 0 805 209 und EP-A 0 848 063, auf welche Bezug genommen wird)

1) Zielzellen:

- Endothelzellen oder
- proliferierende Endothelzellen oder
- somatische Zellen in Nachbarschaft von Endothelzellen und glatte Muskelzellen oder
- Makrophagen

2) Promotoren:

- zellunspezifisch und zellzyklusspezifisch oder
- spezifisch für Endothelzellen, glatte Muskelzellen oder Makrophagen und zellzyklusspezifisch

3) Wirkstoffe oder deren Nukleinsäuresequenzen

3a) Wirkstoffe zur Inhibition der Gerinnung oder für die Förderung der Fibrinolyse, zum Beispiel

- Tissue Plasminogen Activator (tPA)
- Urokinase-type Plasminogen Activator (uPA)
- Hybride von tPA und uPA
- Protein C
- 5 – Hirudin und Analoga von Hirudin
- Serin Proteinase Inhibitoren (Serpine), wie beispielsweise C-1S-Inhibitor, α 1-Antitrypsin oder Antithrombin III
- Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI)

- 10 3b) Wirkstoffe zur Förderung der Gerinnung, zum Beispiel
 - F VIII
 - F IX
 - von Willebrand factor
 - F XIII
 - 15 – PAI-1
 - PAI-2
 - Tissue Factor and Fragmente hiervon

- 20 3c) Angiogenesefaktoren, zum Beispiel
 - VEGF (1-4)
 - FGF
 - TIE-2

- 25 3d) Wirkstoffe zur Blutdrucksenkung, zum Beispiel
 - Kallikrein
 - Endothelzell "nitric oxide synthase"

- 30 3e) Wirkstoffe zur Inhibition der Proliferation von glatten Muskelzellen nach Verletzungen der Endothelschicht, zum Beispiel
 - ein antiproliferatives, zytostatisches oder zytotoxisches Protein oder
 - ein Enzym zur Aufspaltung von Vorstufen von Zytostatika in Zytostatika wie bereits oben (unter Tumor) aufgeführt oder

- ein Fusionsprotein eines dieser Wirkstoffe mit einem Liganden, beispielsweise einem Antikörper oder Antikörperfragmenten spezifisch für Muskelzellen

5 3f) Blutplasmae, zum Beispiel

- Albumin
- C1-Inaktivator
- Serum Cholinesterase
- Transferrin
- 10 – 1-Antitrypsin

Impfungen

(eine detaillierte Beschreibung erfolgte bereits in den Patentanmeldungen EP-A 0 807 183, EP-A 0 805 209, EP-A 0 848 063 und EP-A 0 848 061, auf welche Bezug
15 genommen wird)

1) Zielzellen:

- Muskelzellen oder
- Makrophagen, dendritische Zellen und/oder Lymphozyten

20 2) Promotoren:

- unspezifisch und zellzyklusspezifisch oder
- zielzellspezifisch und zellzyklusspezifisch

3) Wirkstoffe oder deren Nukleinsäuresequenzen:

25 3a) Wirkstoffe zur Prophylaxe von Infektionserkrankungen

Die Möglichkeiten, auf konventionellem Wege wirkungsvolle Impfstoffe herzustellen, sind beschränkt.

30 Die erfindungsgemäßen MVP, enthaltend ein Protein zur Prophylaxe von Infektionserkrankungen, versprechen eine größere Wirksamkeit aufzuweisen als konventionelle Impfstoffantigene.

Des weiteren verspricht eine Nukleinsäuresequenz, kodierend für ein MVP, enthaltend ein Impfstoffantigen, eine größere Wirksamkeit zu

besitzen, als eine konventionelle DNA Vakzine. Deren Wirksamkeit ist eingeschränkt (Fynan et al., Int. J. Immunopharm. 17, 79 (1995); Donnelly et al., Immunol. 2, 20 (1994)).

5 Als Wirksubstanz ist ein vom Infektionserreger gebildetes Protein (oder die dieses Protein kodierende Nukleinsäuresequenz) auszuwählen, welches durch Auslösung einer Immunreaktion, d.h. durch Antikörperbindung und/oder durch zytotoxische T-Lymphozyten zur Neutralisierung und/oder zur Abtötung des Erregers führt. Derartige sogenannte
10 Neutralisationsantigene werden als Impfantigene bereits angewandt (siehe Übersicht bei Ellis, Adv. Exp. Med. Biol. 327, 263 (1992)).

Bevorzugt im Sinne der Erfindung werden als Wirkstoffe die Neutralisationsantigene (oder deren Nukleinsäuresequenzen) folgender
15 Erreger ausgewählt:

- Influenza A-Virus
- HIV
- Tollwut-Virus
- HSV (Herpes Simplex Virus)
- 20 – RSV (Respiratory Syncytial Virus)
- Parainfluenza-Virus
- Rotavirus
- VZV (Varizella Zoster Virus)
- CMV (Cytomegalo-Virus)
- 25 – Masern-Virus
- HPV (Humanes Papillomvirus)
- HBV (Hepatitis B-Virus)
- HCV (Hepatitis C-Virus)
- HDV (Hepatitis D-Virus)
- 30 – HEV (Hepatitis E-Virus)
- HAV (Hepatitis A-Virus)
- vibrio Cholerae-Antigen
- borrelia Burgdorferi
- helicobacter pylori
- 35 – Malaria-Antigen
- Zu derartigen Wirksubstanzen im Sinne der Erfindung gehört jedoch auch ein Antiidiotyp-Antikörper oder dessen Antigen-bindenden

Fragmente, dessen Antigenbindungsstrukturen (die "complementarity determining regions") Kopien der Protein- oder Kohlenhydratstruktur des Neutralisationsantigens des Infektionserregers darstellen.

5 Derartige Antiidiotyp-Antikörper können besonders Kohlenhydratantigene bei bakteriellen Infektionserregern ersetzen.

10 Derartige antiidiotypische Antikörper und ihre Spaltprodukte wurden von Hawkins et al. (J. Immunother. 14, 273 (1993)) und Westerink und Apicella (Springer Seminars in Immunopathol. 15, 227 (1993)) übersichtlich beschrieben.

3b) Wirkstoffe für "Tumorstoffe"

15 – Hierzu gehören Antigene auf Tumorzellen. Derartige Antigene wurden zum Beispiel von Sedlacek et al., Contrib. to Oncol. 32, Karger Verlag, München (1988) und Contrib. to Oncol 43, Karger Verlag, München (1992) übersichtlich dargestellt.

20 Weitere Beispiele stellen die Gene für folgende Antigene bzw. für folgende Antiidiotypantikörper dar:

- 25 – Sialyl Lewis ?
 – Peptide auf Tumoren, welche von T-Zellen erkannt werden
 – von Onkogenen exprimierte Proteine
 – Blutgruppenantigene und deren Vorläufer
 – Antigene auf dem polymorphen epithelialen Mucin
 – Antigene auf Heat Shock Proteinen

30 die Therapie von chronischen Infektionserkrankungen (eine detaillierte Beschreibung erfolgte bereits in den Patentanmeldungen EP-A 0 807 183, EP-A 0 805 209, EP-A 0 848 063 und EP-A 0 848 061, auf welche Bezug genommen wird)

1) Zielzelle:

- 35 – Leberzelle
 – Lymphozyt und/oder Makrophage
 – Epithelzelle

- Endothelzelle

2) Promotoren:

- virusspezifisch oder zellspezifisch und zellzyklusspezifisch

5

3) Wirkstoffe oder deren Nukleinsäuresequenzen:

3a) Wirkstoffe, beispielsweise

- ein Protein, welches zytostatische, apoptotische oder zytotoxische Wirkungen aufweist.
- ein Enzym, welches eine Vorstufe einer antiviralen oder zytotoxischen Substanz in die aktive Substanz spaltet.

10

3b) antivirale Wirkstoffe

15

- antiviral wirksame Cytokine und Wachstumsfaktoren. Hierzu zählen beispielsweise $\text{IFN}\alpha$, $\text{IFN}\beta$, $\text{IFN-}\gamma$, $\text{TNF}\beta$, $\text{TNF}\alpha$, IL-1 oder $\text{TGF}\beta$
- Antikörper einer Spezifität, die das jeweilige Virus inaktiviert oder dessen V_H und V_L enthaltende Fragmente oder dessen über einen Linker verbundene V_H und V_L Fragmente herstellt wie bereits beschrieben.

20

Antikörper gegen Virusantigen sind beispielsweise:

anti HBV

anti HCV

anti HSV

25

anti HPV

anti HIV

anti EBV

anti HTLV

Anti Coxsackie Virus

30

anti Hantaan Virus

- ein Rev bindendes Protein. Diese Proteine binden an die Rev-RNA und inhibieren Rev-abhängige posttranskriptionelle Stufen der Retrovirus-Genexpression. Beispiele für Rev-bindende Proteine sind:

35

RBP9-27

RBP1-8U

RBP1-8D

Pseudogene von RBP1-8

- 5 – Ribozyme, welche die mRNA von Genen für Zellzykluskontrollproteine oder die mRNA von Viren verdauen. Ribozyme katalytisch für HIV wurden beispielsweise von Christoffersen et al., J. Med. Chem. 38, 2033 (1995) übersichtlich beschrieben.

3c) antibakterielle Wirkstoffe

- 10 Zu den antibakteriellen Proteinen gehören beispielsweise Antikörper, die bakterielle Toxine neutralisieren oder Bakterien opsonieren. Beispielsweise gehören hierzu Antikörper gegen

- 15 Meningokokken C oder B
E. coli
Borrelia
Pseudomonas
helicobacter pylori
staphylococcus aureus

20

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung kann die Komponente a)_n und/oder c)_o einen Wirkstoff, einen Teil des Wirkstoffes oder ein Analogon des Wirkstoffes enthalten, welcher an einen Rezeptor der Zielzelle bindet.

25 Derartige Wirkstoffe sind beispielsweise:

- Wachstumsfaktoren wie VEGF, PDGF, EGF, TGF α , TGF β , KGF, SDGF, FGF, IGF, HGF, NGF, BDNF, Neurotrophine, BMF, Bombesin, M-CSF, Thrombopoietin, Erythropoietin, SCF, SDGF, Oncostatin, PDEGF, Endothelin-1
- 30 – Cytokine wie IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15
- Interferon α , β und γ
- Tumornekrosisfaktoren TNF α , - β
- Chemokine wie RANTES, MCAF, MIP-1 α oder - β , NAP, β -Thromboglobulin

- Peptidhormone wie SRH, SIH oder STH, MRH oder MSH, PRH, PIH oder Prolaktin, GnRH, LH-RH, FSH-RH, LH/ICSH oder FSH, TRH oder TSH, CRH oder ACTH
- Angiotensin, Kinine, Histamin, Homologe oder Analoge hiervon
- 5 – Steroidhormone wie Östrogene, Gestagene, Androgene, Glukokortikoide, Mineralokortikoide, Homologe oder Analoge hiervon
- Vitamine wie z.B. Folsäure

10 Im Rahmen der vorliegenden Erfindung kann die Komponente a)_n und/oder c)_o auch ein Adhäsionsmolekül, ein Teil des Adhäsionsmoleküls oder ein Analogon eines Adhäsionsmoleküls sein, welches an ein korrespondierendes zellmembranständiges Adhäsionsmolekül oder an eine andere spezifische Bindestruktur für ein Adhäsionsmolekül auf der Zielzelle bindet.

15 Derartige als Komponente a)_n und/oder c)_o funktionsfähige Adhäsionsmoleküle sind beispielsweise

- lewis X (für GMP-140)
- S-lewis X (für ELAM-1).
- 20 – LFA-1 (für ICAM-1 und ICAM-2)
- MAC-1 (für ICAM-1)
- VLA-4 (für VCAM-1)
- PECAM (für PECAM)
- Vitronectin (für den Vitronectinrezeptor)
- 25 – GMP-140 (für lewis X)
- S-lewis X (für ELAM-1)
- ICAM-1, ICAM-2 (für LFA-1, MAC-1)
- VCAM-1 (für VLA-4)
- Fibronectin (für VLA-4)
- 30 – Laminin (für VLA-6)
- Fibronectin, Laminin (für VLA-1, VLA-2, VLA-3)
- Fibronectin (für VLA-4)

- Fibrinogen (für GPIIb-IIIa)
- B7 (für CD28)
- CD28 (für B7)
- CD40 (für CD40L)
- 5 – CD40L (für CD40)

Im Rahmen der vorliegenden Verbindung kann die Komponente a)_n und/oder c)_o auch der extrazelluläre Teil eines Fc-Rezeptors sein (Dougherty et al., Transfusion Science 17, 121 (1996)), an welchem ein Antikörper spezifisch für die Zielzelle über
10 seinen Fc-Teil gebunden wird.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung kann die Komponente c)_o auch ein Antikörpermolekül oder der epitopbindende Teil eines Antikörpermoleküls sein.

- 15 Die murinen monoklonalen Antikörper sind bevorzugt in humanisierter Form einzusetzen. Die Humanisierung erfolgt in der von Winter et al. (Nature 349, 293 (1991) und Hoogenboom et al. (Rev. Tr. Transfus. Hemobiol. 36, 19 (1993)) dargestellten Weise. Antikörperfragmente werden entsprechend dem Stand der Technik hergestellt, beispielsweise in der von Winter et al., Nature 349, 293 (1991),
20 Hoogenboom et al., Rev. Tr. Transfus. Hemobiol. 36, 19 (1993), Girol, Mol. Immunol. 28, 1379 (1991) oder Huston et al., Int. Rev. Immunol. 10, 195 (1993) beschriebenen Weise.

- 25 Rekombinante Antikörperfragmente werden direkt aus existierenden Hybridomen hergestellt oder werden mit Hilfe der "phage display"-Technologie aus Bibliotheken muriner bzw. Humaner Antikörperfragmente isoliert. Diese Antikörperfragmente werden dann auf genetischer Ebene direkt für weitere Manipulationen (z.B. der Fusion mit anderen Proteinen) eingesetzt.

- 30 Zur Herstellung von rekombinanten Antikörperfragmenten aus Hybridomen wird die genetische Information, die für die antigenbindenden Domänen (VH, VL) der Antikörper kodiert, durch Isolierung der mRNA, die reverse Transkription der RNA in

cDNA und die anschließende Amplifikation mittels Polymerasekettenreaktion und Oligonukleotiden komplementär zu den 5'- bzw. 3'-Enden der variablen Fragmente gewonnen. Die VH- und VL-Fragmente werden dann in bakterielle Expressionsvektoren z.B. in Form von Fv-Fragmenten, einzelkettigen Fv-

5 Fragmenten (scFv) oder als Fab-Fragmente kloniert.

Neue Antikörperfragmente können mittels der "phage-display"-Technologie auch direkt aus Antikörperbibliotheken (Immunbibliotheken, naive Bibliotheken) murinen oder humanen Ursprungs isoliert werden. Beim "phage display" von

10 Antikörperfragmenten werden die antigenbindenden Domänen als Fusionsproteine mit dem Hüllprotein g3P filamentöser Bakteriophagen entweder in das Phagengenom oder in Phagemid-Vektoren in Form von scFv-Fragmenten oder als Fab-Fragmente kloniert. Antigen-bindende Phagen werden an antigenbeladenen Plastikgefäßen (panning), an antigenkonjugierten, paramagnetischen "beads" oder
15 durch Bindung an Zelloberflächen selektioniert.

Immunbibliotheken werden hergestellt durch PCR-Amplifikation der variablen Antikörperfragmente aus B-Lymphozyten immunisierter Tiere oder Patienten. Dazu werden Kombinationen von Oligonukleotiden die spezifisch sind für murine oder
20 humane Immunglobulingene bzw. für die humanen Immunglobulin-Genfamilien verwendet.

Unter Verwendung nichtimmunisierter Spender als Quelle der Immunglobulingene lassen sich naive Bibliotheken herstellen. Alternativ können Immunglobulin-

25 Keimbahngene zur Herstellung semisynthetischer Antikörperrepertoires eingesetzt werden, wobei die Komplementarität-bestimmende Region 3 der variablen Fragmente durch PCR mit Hilfe degenerierter Primer ergänzt wird. Diese sogenannten "single pot"-Bibliotheken haben gegenüber Immunbibliotheken den Vorteil, daß Antikörperfragmente gegen eine Vielzahl von Antigenen aus einer
30 einzigen Bibliothek isoliert werden können.

Die Affinität von Antikörperfragmenten kann mittels der "phage display"-Technologie weiter erhöht werden, wobei neue Bibliotheken von bereits existierenden

Antikörperfragmenten durch zufällige, kodonbasierende oder gezielte Mutagenese, durch "chain shuffling" einzelner Domänen mit Fragmenten aus naiven Repertoires oder unter Zuhilfenahme von bakteriellen Mutatorstämmen hergestellt werden und durch Reselektion unter stringenten Bedingungen Antikörperfragmente mit

- 5 verbesserten Eigenschaften isoliert werden. Zusätzlich können murine Antikörperfragmente durch stufenweisen Austausch einer der variablen Domänen gegen ein humanes Repertoire und anschließende Selektion mit dem ursprünglichen Antigen ("guided selection") humanisiert werden. Alternativ erfolgt die Humanisierung muriner Antikörper durch zielgerichteten Austausch der
- 10 hypervariablen Regionen humaner Antikörper durch die korrespondierenden Regionen des originalen murinen Antikörpers.

Entsprechend der Erfindung sollen mindestens zwei gleiche oder unterschiedliche Bindestrukturen für die Zielzelle [Komponente c)₀] im erfindungsgemäßen Liganden

- 15 enthalten sein. Eine besondere Form von bispezifischen oder multispezifischen, rekombinanten Antikörpern stellen einzelkettige, zweifach- oder mehrfach-antigenbindende Moleküle dar. Die Herstellung dieser Moleküle wurde in der Patentanmeldung DE 198161417 (nicht veröffentlicht) beschrieben. Auf diese Patentanmeldung wird zur beispielsweise Herstellung der Komponente c)₀
- 20 ausdrücklich Bezug genommen.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung kann die Komponente c)₀ auch das Hüllprotein oder ein Teil des Hüllproteins von Viren darstellen, welche über ihr Hüllprotein an ausgewählte Zellen spezifisch binden.

25

Die Wahl der Bindestruktur für eine Zielzelle richtet sich nach der Zielzelle, an welche das MVP binden soll.

Als Beispiele hierfür gelten:

30

- Bindestrukturen für aktivierte Endothelzellen

Hierzu gehören im Sinne der Erfindung Antikörper oder Antikörperfragmente, gerichtet gegen Membranstrukturen von Endothelzellen wie sie beispielsweise von Burrows et al. (Pharmac. Ther. 64, 155 (1994), Hughes et al. (Cancer Res. 49, 6214 (1989) und Maruyama et al. (PNAS-USA 87, 5744 (1990)) beschrieben wurden. Insbesondere zählen hierzu Antikörper gegen die VEGF-Rezeptoren.

Zu den Bindestrukturen gehören des weiteren alle Wirkstoffe, welche an Membranstrukturen oder Membranrezeptoren auf Endothelzellen binden. Beispielsweise gehören hierzu Substanzen, die endständig Mannose enthalten des weiteren IL-1 oder Wachstumsfaktoren oder deren Fragmente bzw. Teilsequenzen von ihnen, die an Rezeptoren exprimiert durch Endothelzellen binden, wie beispielsweise PDGF, bFGF, VEGF, TGF β (Pusztai et al., J. Pathol. 169, 191 (1993)).

Des weiteren gehören hierzu Adhäsionsmoleküle, welche an aktivierte und/oder proliferierende Endothelzellen binden. Derartige Adhäsionsmoleküle, wie beispielsweise Slex, LFA-1, MAC-1, LECAM-1, VLA-4, Vitronectin oder RGD-Peptide wurden bereits beschrieben (Übersichten bei Augustin-Voss et al., J. Cell Biol. 119, 483 (1992), Pauli et al., Cancer Metast. Rev. 9, 175 (1990), Honn et al., Cancer Metast. Rev. 11, 353 (1992)).

Zu den Bindestrukturen im Sinne dieser Erfindung gehören insbesondere Glykoproteine der Hülle von Viren, die einen Tropismus für Endothelzellen haben. Zu diesen Viren gehören beispielsweise:

- Filoviren, beispielsweise
 - * das Marburg-Virus
mit seinem Hüllprotein GP (glycoprotein) und sGP (second glycoprotein)
 - * oder das Ebola-Virus
jeweils mit seinem Hüllprotein GP und sG
- das Cytomegalovirus
besonders mit seinem gB-Protein
- das Herpes Simplex-Virus Type I

- das HIV-1 Virus
- das Masern-Virus
- das Hantaan-Virus
- Alphaviren, wie Semliki Forest-Virus
- 5 – das Virus des epidemischen, haemorrhagischen Fiebers
- das Poliovirus
- Enteroviren (wie z.B. Echo 9, Echo 12, Coxsackie B3)
- Bindestrukturen für aktivierte Makrophagen und/oder aktivierte Lymphozyten

10 Zu den Bindestrukturen im Sinne der Erfindung gehören des weiteren Substanzen, welche an die Oberfläche von Immunzellen spezifisch binden. Hierzu gehören Antikörper oder Antikörperfragmente gerichtet gegen Membranstrukturen von Immunzellen, wie sie beispielsweise von Powelson et al., Biotech. Adv. 11, 725 (1993) beschrieben wurden.

15 Des weiteren gehören zu den Bindestrukturen auch monoklonale oder polyklonale Antikörper oder Antikörperfragmente, die mit ihrem antigenbindenden variablen Teil an Fc- γ - oder Fc- ϵ - oder Fc- μ Rezeptoren von Immunzellen binden (Rojanasakul et al., Pharm. Res. 11, 1731 (1994)).

20 Des weiteren gehört hierzu das Fc-Fragment von humanem monoklonalem oder polyklonalem Immunglobulin. Derartige Fc-Fragmente werden beispielsweise gentechnisch mit Hilfe rekombinierter DNA oder entsprechend der Methoden von Haupt et al., Klin. Wschr. 47, 270 (1969), Kranz et al., Dev. Biol. Standard 44, 19 (1979); Fehr et al., Adv. Clin. Pharmac. 6, 64 (1974),
25 Menninger et al., Immunochem. 13, 633 (1976) hergestellt.

Zu den Bindestrukturen gehören des weiteren alle Substanzen, welche an Membranrezeptoren auf der Oberfläche von Immunzellen binden. Hierzu
30 gehören Zytokine wie beispielsweise IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-10, TNF α , GM-CSF, M-CSF des weiteren Wachstumsfaktoren wie beispielsweise EGF,

TGF, FGF, IGF oder PDGF oder deren Fragmente bzw. Teilsequenzen von ihnen, die an Rezeptoren exprimiert durch Immunzellen binden.

5 Hierzu gehören des weiteren Adhäsionsmoleküle und andere Liganden, welche an Zellmembranstrukturen, wie beispielsweise an den Mannose 6-Phosphat-Rezeptor auf Makrophagen in Milz, Leber, Lunge und andere Gewebe binden.

10 Eine Auswahl dieser Liganden und Membranstrukturen ist übersichtlich bei Perales et al., Eur. J. Biochem. 226, 255 (1994) beschrieben.

Zu den Bindestrukturen im Sinne dieser Erfindung gehören jedoch auch Glykoproteine der Hülle von solchen Viren, die einen Tropismus für Lymphozyten und/oder Makrophagen haben.

15 Zu diesen Makrophagen infizierenden Viren gehören beispielsweise:

- HIV-1
besonders solche Stämme mit Mutationen in der V3-Region von gp120, die zu einer erhöhten Bindung an Makrophagen führen
- 20 – HIV-2
- Hantaviren, beispielsweise des Puumalavirus
- Cytomegalovirus
- Respiratory Syncytial Virus
- Herpes simplex-Virus
- 25 – Filoviren.

Zu den Lymphozyten infizierenden Viren gehören beispielsweise:

- Varizella-Zoster-Virus (VZV);
30 VZV infiziert besonders T-Zellen
- Herpes Virus 6 (HHV-6);
HHV-6 infiziert besonders T-Zellen

- Rabies-Virus;
das Rabies-Virus Hüllprotein bindet besonders an TH2-Zellen
- HIV-1;
das Glykoprotein gp120 bindet bevorzugt an das CD4 Molekül von T-Zellen
- 5 – HTLV-II;
HTLV-II infiziert besonders B-Zellen
- HTLV-I;
HTLV-I infiziert besonders T-Zellen
- Influenza C-Viren;
10 Influenza-C-Viren binden über das Haemagglutinin-Esterase-Fusions-(HEF)-Protein an N-acetyl-9-O-acetylneuraminsäure (Neu 5,9 Ac2), welche bevorzugt auf B-Lymphozyten, weniger oder nicht auf T-Lymphozyten vorkommt
- Influenza C-Viren mit Mutation in der Nukleotidposition 872 (die die Position
15 284 des HEF der Aminosäuresequenz kodiert), beispielsweise ein Austausch des Threonins durch Isoleucin. Das Oberflächenprotein HEF mit dieser Mutation hat eine deutlich stärkere Affinität zum N-acetyl-9-O-acetylneuraminsäure-Rezeptor als das Wildvirus
- HEF Spaltprodukte des Influenza C-Virus, welche die Bindestruktur für N-
20 acetyl-9-O-acetylneuraminsäure enthalten. Diese Bindestruktur ist definiert durch die katalytische Triade Serin-71, Histidin 368 oder - 369 und Asparaginsäure 261
- epstein-barr Virus;
EBV infiziert besonders B-Zellen
- 25 – Herpes simplex-Virus-2;
HSV-2 infiziert besonders T-Zellen
- Masernvirus
- Bindestrukturen für Muskelzellen
30 Hierzu gehören beispielsweise Antikörper oder Antikörperfragmente, gerichtet gegen Membranstrukturen von Muskelzellen, insbesondere von glatten Muskelzellen. Derartige Antikörper sind beispielsweise

- der Antikörper 10F3
- Antikörper gegen Actin
- Antikörper gegen Angiotensin II-Rezeptoren
- 5 – Antikörper gegen Rezeptoren für Wachstumsfaktoren

oder Antikörper gerichtet beispielsweise gegen

- EGF-Rezeptoren
- 10 – oder gegen PDGF-Rezeptoren
- oder gegen FGF-Rezeptoren
- oder Antikörper gegen Endothelin A-Rezeptoren.

15 Zu den Bindestrukturen gehören des weiteren alle Wirksubstanzen, welche an Membranstrukturen oder Membranrezeptoren auf Muskelzellen binden (Übersicht bei Pusztai et al., J. Pathol. 169, 191 (1993), Harris, Curr. Opin. Biotechnol. 2, 260 (1991)). Beispielsweise gehören hierzu Wachstumsfaktoren oder deren Fragmente bzw. Teilsequenzen von ihnen, die an Rezeptoren exprimiert durch glatte Muskelzellen binden wie beispielsweise

- 20 – PDGF
- EGF
- TGF β
- TGF α
- 25 – FGF
- Endothelin A

Zu den Bindestrukturen im Sinne dieser Erfindung gehören jedoch auch Glykoproteine der Hülle von solchen Viren, die einen Tropismus für Muskelzellen haben. Zu diesen Viren gehört beispielsweise das Cytomegalovirus.

5 – Bindestrukturen für blutbildende Zellen

Zu den Bindestrukturen gehören Antikörper oder Antikörperfragmente, gerichtet gegen Rezeptoren exprimiert auf gering differenzierten Blutzellen.

10 Derartige Antikörper sind beispielsweise für folgende Rezeptoren beschrieben worden:

- Stem Cell Factor Receptor
- IL-1-Rezeptor (Type I)
- 15 – IL-1-Rezeptor (Type II)
- IL-3-Rezeptor α
- IL-3-Rezeptor β
- IL-6-Rezeptor
- GM-CSF-Rezeptor.

20

Des weiteren gehören zu den Bindestrukturen auch monoklonale oder polyklonale Antikörper oder Antikörperfragmente, die mit ihren konstanten Domänen an Fc- γ Rezeptoren von Immunzellen binden.

25 Zu den Bindestrukturen gehören des weiteren alle Substanzen, welche an Membranstrukturen oder Membranrezeptoren auf der Oberfläche von gering differenzierten Blutzellen binden. Beispielsweise gehören hierzu Wachstumsfaktoren, wie SCF, IL-1, IL-3, IL-6, GM-CSF oder deren Fragmente bzw. Teilsequenzen von ihnen, die an Rezeptoren exprimiert durch Blutzellen
30 binden.

– Bindestrukturen für Synovialzellen und Entzündungszellen

Hierzu gehören monoklonale oder polyklonale Antikörper oder Antikörperfragmente, die mit ihren variablen Domänen an Membranstrukturen von Synovialzellen oder Entzündungszellen binden. Solche Membranstrukturen sind
5 beispielsweise

- Vimentin
- Fibronectin oder
- Fc-Rezeptoren.

10 Hierzu gehören auch monoklonale oder polyklonale Antikörper oder Antikörperfragmente, die mit ihren konstanten Domänen an Fc-Rezeptor binden.

Hierzu gehören des weiteren alle Wirkstoffe, welche an Membranstrukturen oder
15 Membranrezeptoren auf Synovialzellen binden. Beispielsweise gehören hier Cytokine oder Wachstumsfaktoren oder deren Fragmente bzw. Teilsequenzen von ihnen, die an Rezeptoren exprimiert durch Synovialzellen binden wie beispielsweise IL-1-RA, $TNF\alpha$, IL-4, IL-6, IL-10, IGF, $TGF\beta$.

20 Des weiteren gehören hierzu Bindestrukturen, deren wesentlicher Bestandteil endständige Mannose ist, welche an Mannose-6-Phosphatrezeptoren auf Makrophagen bindet.

- Bindestrukturen für mit Viren infizierte Zellen

25 Zu den Bindestrukturen gehören Antikörper oder Antikörperfragmente, gerichtet gegen die Virusantigene exprimiert auf der Zellmembran von virusinfizierten Zellen.

30 Derartige Antikörper sind beispielsweise für mit folgenden Viren infizierten Zellen beschrieben worden:

- HBV

- HCV
- HSV
- HPV
- HIV
- 5 – EBV
- HTLV.

– Bindestrukturen für Leberzellen und weitere Gewebezellen

- 10 Zu den Bindestrukturen gehören alle Substanzen, welche an Membranstrukturen oder Membranrezeptoren auf der Oberfläche von Leberzellen binden.

Beispielsweise gehören hierzu Wachstumsfaktoren, wie Zytokine, EGF, TGF, FGF oder PDGF, oder deren Fragmente bzw. Teilsequenzen von ihnen, die an

- 15 Rezeptoren exprimiert durch derartige Zellen binden.

Hierzu gehören des weiteren Bindestrukturen, welche an Zellmembranstrukturen binden, welche selektiv sind für bestimmte Gewebe. Hierzu zählen beispielsweise:

Membranstruktur	Bindestruktur	Gewebezellen
Asialoglycoprotein-Rezeptor	Asialoorosomucoid Neoglycoprotein Galactose	Leberzellen
Transferrin-Rezeptor	Transferrin	Leber, andere Gewebezellen
Insulin-Rezeptor	Insulin	Leber, andere Gewebezellen
Mannose-6-Phosphat-Rezeptor	Mannose	Makrophagen in Milz, Leber, Lunge, andere Gewebe
Fc- γ -Rezeptoren	Immunglobulin G	retikuloendotheliales System, andere Gewebe

Diese Binde- und Membranstrukturen sind übersichtlich bei Perales et al., Eur. J. Biochem. 226, 255 (1994) beschrieben.

5

Zu den Bindestrukturen im Sinne der Erfindung gehören jedoch besonders Glykoproteine der Hülle von Viren, die einen Tropismus für ausgewählte Zellen haben, wie beispielsweise für

10

- Bronchialepithelzellen
 - * Respiratory syncytial virus
- Leberzellen
 - * Hepatitis C-Virus, Hepatitis B-Virus, Hepatitis A-Virus
 - * Filoviren

15

- Leberzellen binden z.B. das Marburg-Virus über den Asialoglykoprotein-Rezeptor
 - * Hepatitis B-Virus
- Leberzellen binden bevorzugt über den Asialoglykoprotein-Rezeptor an der preS2 und preS1 Domäne von HBV

20

- * Hepatitis D-Virus
- lebersinusoidale Zellen

* Hepatitis V-Virus

HBV wird gebunden über Fibronectin.

– Bindestrukturen für Gliazellen

5

Hierzu gehören Antikörper oder Antikörperfragmente gerichtet gegen Membranstrukturen von Gliazellen, wie sie beispielsweise von Mirsky et al. (Cell and Tissue Res. 240, 723 (1985)), Coakham et al. (Prog. Exp. Tumor Res. 29, 57 (1985)) und McKeever et al. (Neurobiol. 6, 119 (1991)) berichtet wurden. Zu diesen Membranstrukturen gehören des weiteren Neuraladhäsionsmoleküle wie N-CAM, insbesondere dessen Polypeptidkette C.

10

Hierzu gehören des weiteren alle Wirkstoffe, welche an Membranstrukturen oder Membranrezeptoren auf Gliazellen binden. Beispielsweise gehören hierzu Substanzen, die endständig Mannose tragen und an den Mannose-6-Phosphatrezeptor binden, Insulin und Insulin-like growth factor, PDGF und diejenigen Fragmente dieser Wachstumsfaktoren, welche an die zugehörigen Membranrezeptoren binden.

15

20

Zu den Bindestrukturen im Sinne der Erfindung gehören insbesondere Glykoproteine der Hülle von solchen Viren, die einen Tropismus für Gliazellen haben.

Zu diesen Viren gehören beispielsweise:

25

- HIV-1 Subtyp JRF1
- Herpes simplex-Virus I

– Bindestrukturen für Leukämiezellen

30

Hierzu gehören Antikörper oder Antikörperfragmente, gerichtet gegen Membranstrukturen von Leukämiezellen. Eine große Anzahl derartiger monoklonaler Antikörper sind bereits für diagnostische und therapeutische

- Verfahren beschrieben worden (Übersichten bei Kristensen, Danish Medical Bulletin 41, 52 (1994); Schranz, Therapia Hungarica 38, 3 (1990); Drexler et al., Leuk. Res. 10, 279 (1986); Naeim, Dis. Markers 7, 1 (1989); Stickney et al., Curr. Opin. Oncol. 4, 847 (1992); Drexler et al., Blut 57, 327 (1988); Freedman et al., Cancer Invest. 9, 69 (1991)). Je nach Typ der Leukämie sind als Liganden beispielsweise monoklonalen Antikörper oder deren antigenbindende Antikörperfragmente mit Spezifität für folgende Antigene geeignet:

Zellen	Membranantigen
AML	CD13
	CD14
	CD15
	CD33
	CAMAL
	sialosyl-le
B-CLL	CD5
	CD1c
	CD23
	Idiotypen und Isotypen der Membranimmun- globuline
T-CLL	CD33
	M38
	IL-2-Rezeptoren
	T-Zell-Rezeptoren
ALL	CALLA
	CD19
	non-hodgkin lymphoma

- 10 Zu den Bindestrukturen gehören des weiteren alle Wirkstoffe, welche an Membranstrukturen oder Membranrezeptoren von Leukämiezellen binden. Beispielsweise gehören hierzu Wachstumsfaktoren oder deren Fragmente bzw. Teilsequenzen von ihnen, die an Rezeptoren exprimiert durch Leukämiezellen binden.

15

Derartige Wachstumsfaktoren wurden bereits beschrieben (Übersichten bei Cross et al., Cell 64, 271 (1991); Aulitzky et al., Drugs 48, 667 (1994); Moore, Clin. Cancer

Res. 1, 3 (1995); Van Kooten et al., Leuk. Lymph. 12, 27 (1993)). Beispielsweise gehören zu ihnen:

- IFN α bei non-hodgkin Lymphomen
- 5 – IL-2, besonders bei T-Zell-Leukämien
- FGF bei T-Zell-, monozytären, myeloiden, erythroiden und megakaryoblastischen Leukämien
- TGF β bei Leukämien
- Retinoide, z.B. "Retinoic acid" bei akuter promyelozytärer Leukämie.

10

– Bindestrukturen für Tumorzellen

Hierzu gehören Antikörper und Fragmente dieser Antikörper, gerichtet gegen Membranstrukturen auf Tumorzellen. Derartige Antikörper wurden zum Beispiel von Sedlacek et al., Contrib. to Oncol. 32, Karger Verlag, München (1988) und

15 Contrib. to Oncol. 43, Karger Verlag, München (1992) übersichtlich dargestellt.

Weitere Beispiele stellen dar Antikörper gegen:

- 20 – Sialyl Lewis
- Peptide auf Tumoren, welche von T-Zellen erkannt werden
- von Onkogenen exprimierte Proteine
- Ganglioside wie GD3, GD2, GM2, 9-O-acetyl GD3, Fucosyl GM1
- Blutgruppenantigene und deren Vorläufer
- 25 – Antigene auf dem polymorphen epithelialen Mucin
- Antigene auf Heat Shock Proteinen

4a) Beschreibung des Linkers [Komponente b)_m]

- 30 Die Wahl des Linkers richtet sich nach der chemischen Natur der Komponenten a)_n und c)_o und nach der Methode, mit welcher diese Komponenten über den Linker miteinander verbunden werden.

- Sind die Bindestrukturen Peptide oder Proteine, so wird vorzugsweise ein Peptid oder Protein als Linker verwendet und die Verbindung des Linkers mit den Komponenten a)_n und c)_o erfolgt vorzugsweise über eine Peptidbindung.

Derartige Moleküle werden vorzugsweise als Fusionsproteine mit Hilfe der rekombinierten DNA-Technologie hergestellt.

- Ist die Komponente c)_o kein Peptid oder Protein, so stellt der Linker in seiner einfachsten Form eine Struktur dar, welche die Komponente a)_n mit der Komponente c)_o verbindet. Derartige Strukturen resultieren aus den verschiedenen chemischen Konjugationsmethoden, mit Hilfe derer Moleküle an Aminogruppen, Hydroxygruppen, SH-Gruppen, Carboxylgruppen oder an Aldehydgruppen in Proteinen gebunden werden (Übersicht der Methoden siehe Sedlacek et al., Contrib. to Oncol. 32, 42-49 und 81-85, Karger Verlag, München (1988)).

Der Linker [die Komponente a)_n und die Komponente b)_m] können jedoch auch selbst jeweils ein Peptid oder Protein sein. In diese Falle erfolgt die Verbindung zwischen beiden vorzugsweise über eine Peptidbindung und zur Komponente c)_o über eine der chemischen Konjugationsmethoden.

Ob der Linker ein fusogenes Peptid oder ein Translokalisationspeptid enthält, richtet sich nach der Verwendung des erfindungsgemäßen Moleküls. Soll das erfindungsgemäße Molekül extravaskulär im Bindegewebe oder in der Zelle seine Wirkung entfalten, ist der Linker vorzugsweise ein Molekül mit fusogener Eigenschaft. Diese fusogene Eigenschaft erleichtert die Passage des erfindungsgemäßen Moleküls durch die Zellmembran.

Im Sinne dieser Erfindung werden als Linker mit fusogener Eigenschaft virale oder bakterielle Peptide oder Proteine wie auch synthetische Peptide verwendet.

Moleküle mit fusogener Eigenschaft sind beispielsweise (Details siehe Patentanmeldung EP-A 0 846 772):

* Peptide enthaltend die Translokationsdomäne (Domäne II) des Exotoxins A von *Pseudomonas*

* Peptide enthaltend das Peptid

GLFEALLELLESLWELLLEA (SEQ ID NO.: 1)

5 * Peptide enthaltend das Peptid

AALAEA[LAEA]₄LAAAAGC (SEQ ID NO.: 2)

* Peptide enthaltend das Peptid

FAGV-VLAGAALGVAAAAQI (SEQ ID NO.: 3)

des Fusionsproteins des Masern-Virus

10 * Peptide enthaltend das Peptid

GLFGAIAGFIEGGWWGMIDG (SEQ ID NO.: 4)

des HA2 Proteins von Influenza A

* Peptide enthaltend das Peptid

GLFGAIAGFIENGWEGMIDGGGLFGAIAGFIENGWEGMIDG (SEQ ID NO.: 5)

15 oder das Peptid

GLFGAIAGFIE; (SEQ ID NO.: 6)

ALFGAIAGFIE; (SEQ ID NO.: 7)

LFLGAIAGFIE; (SEQ ID NO.: 8)

LLLGAIAGFIE; (SEQ ID NO.: 9)

20 LILLGAIAGFIE; (SEQ ID NO.: 10)

GIFGAIAGFIE; (SEQ ID NO.: 11)

GLLLGAIAGFIE; (SEQ ID NO.: 12)

GLFAAAGFIE; (SEQ ID NO.: 13)

GLFEAAGFIE; (SEQ ID NO.: 14)

25 GLFGAMAGFIE; (SEQ ID NO.: 15)

GLFGAIAGLIE; (SEQ ID NO.: 16)

GLFGAIAGFIV; (SEQ ID NO.: 17)

GLFEAIAEFIEGGWEGLIEG (SEQ ID NO.: 18) oder

GLLEALAELEGGWEGLLEG (SEQ ID NO.: 19)

30

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung werden desweiteren Proteine von Viren verwendet, welche fusogene Eigenschaften haben. Eine Reihe von Viren besitzt fusogene und/oder translozierende Hüllproteine, so beispielsweise Paramyxoviren,

Retroviren und Herpesviren. Hierzu gehören beispielsweise das TAT-Protein von HIV oder dessen translokalisierende Aminosäuresequenz oder das VP22-Protein von HSV.

- 5 Eine Reihe von Viren besitzen des weiteren Glykoproteine, die verantwortlich sind sowohl für die Virusanheftung als auch nachfolgend für die Zellmembranfusion (Gaudin et al., J. Gen. Viro. 76, 1541 (1995)).

10 Derartige Proteine werden beispielsweise von Alpha-, Rhabdo- und Orthomyxoviren gebildet.

Virale fusogene Proteine im Sinne der Erfindung wurden übersichtlich beschrieben von Hughson, Curr. Biol. 5, 265 (1995); Hoekstra, J. Bioenergetics Biomembranes 22, 121 (1990); White, Ann. Rev. Physiol. 52, 675 (1990).

15

Fusogene Proteine im Sinne dieser Erfindung sind beispielsweise:

- das Haemagglutinin von Influenza A- oder B-Viren, insbesondere die HA2-Komponente
- 20 – das M2-Protein von Influenza A-Viren
alleine oder in Kombination mit dem Haemagglutinin von Influenza eingesetzt oder mit Mutanten von Neuraminidase von Influenza A, denen die Enzymaktivität fehlt, die jedoch Haemagglutination bewirken.
- Peptidanaloga des Influenza-Virus Haemagglutinins
- 25 – das HEF-Protein des Influenza C-Virus
Die Fusionsaktivität des HEF-Proteins wird aktiviert durch Spaltung des HEFo in die Untereinheiten HEF1 und HEF2.
- das Transmembranglykoprotein von Filoviren, wie beispielsweise
 - * des Marburg-Virus
 - 30 * des Ebola-Virus
- das Transmembranglykoprotein des Tollwutvirus
- das Transmembranglykoprotein (G) des Vesicular Stomatitis-Virus

- das Fusionsprotein des HIV-Virus, insbesondere die gp41-Komponente und fusogene Komponenten hiervon
- das Fusionsprotein des Sendai-Virus, insbesondere die aminoterminalen 33 Aminosäuren der F1-Komponente
- 5 – das Transmembranglykoprotein des semliki Forest-Virus, insbesondere die E1-Komponente
- das Transmembranglykoprotein des Tick-borne Enzephalitis-Virus
- das Fusionsprotein des menschlichen respiratorischen syncytialen Virus (RSV) (im besonderen die gp37-Komponente)
- 10 – das Fusionsprotein (S-Protein) des Hepatitis B-Virus
- das Fusionsprotein des Masern-Virus
- das Fusionsprotein des newcastle Disease Virus
- das Fusionsprotein des Visna-Virus
- das Fusionsprotein vom murinen Leukämie-Virus (im besonderen p15E)
- 15 – das Fusionsprotein vom HTL-Virus (im besonderen das gp21)
- das Fusionsprotein des Simian Immunodeficiency Virus (SIV)

Virale fusogene Proteine werden entweder durch Lösung der Hüllproteine aus einer Virusanreicherung mit Hilfe von Detergentien (wie beispielsweise β -D-octylglucopyranosid) und Abtrennung durch Zentrifugation (Übersicht bei Mannio et al., BioTechniques 6, 682 (1988)) gewonnen oder aber mit Hilfe von dem Fachmann bekannten molekularbiologischen Methoden.

5) Die Verknüpfung der Komponenten zu einem MVP

Die Verknüpfung der Komponenten $a)_n$, $b)_m$ und $c)_o$ zu einem MVP erfolgt vorzugsweise über Peptidbindungen. Um die Wirksamkeit bzw. die Funktionsfähigkeit der einzelnen Komponenten $a)_n$, $b)_m$ oder $c)_o$ nicht zu beeinträchtigen, wird zwischen diesen Komponenten eine beliebig lange Peptidsequenz eingefügt, vorzugsweise eine Peptidsequenz von 0-30 Aminosäuren.

6) Herstellung eines Moleküls aus mindestens zwei zielzellspezifischen, multivalenten Proteinen (MVP)

Ein derartiges Molekül wird hergestellt aus der Verbindung mindestens zweier MVPs durch Verbindung der jeweiligen Komponenten $a)_n$, $b)_m$ und/oder $c)_o$.

Derartige Verbindungen werden hergestellt in der Form, daß die natürlicherweise vorkommende Dimerisierung (oder Multimerisierung) von Proteinen ausgenutzt wird oder daß Verbindungsteile in die Komponenten a, b und/oder c eingefügt werden und diese Verbindungsteile die Verknüpfungen ermöglichen. Derartige Verbindungsteile können entsprechend der Erfindung beispielsweise sein:

- 10 – mehr als 3 Cysteine
- die Hinge Region der schweren Kette eines Antikörpers
- der zellinterne Teil von CD4 einerseits und die CD4 Bindedomäne von p56 LcK andererseits
- das Gal80 Protein einerseits und die Gal80 Bindedomäne von Gal4 andererseits.
- 15 Hierdurch resultieren zielzellspezifische, multivalente Proteine (MVP), deren Di- oder Multimerisierung erfolgt ist durch eine nicht kovalente oder kovalente Verbindung (z.B. durch S-S-Brücken, Peptidverbindungen)
 - der Komponente $a)_n$
 - der Linker [Komponente $b)_m$] oder
 - 20 – der Komponente $c)_o$.

Das zielzellspezifische, multivalente Protein (MVP) wird anhand folgender Beispiele näher verdeutlicht:

25 Beispiele zur Verdeutlichung des Erfindungsgedankens

Beispiel 1

Vorarbeiten: Herstellung eines homodimeren s.c. Fv anti AV-VEGF2 Moleküls
30 entsprechend dem Stand der Technik zur zielgesteuerten Transduktion von Adenoviren

Die Expression einer scFv-VEGF-Polypeptidkette führt zur Ausbildung eines Homodimers, das zwei Bindungsstellen für Adenoviren und zwei Bindungsstellen für VEGF-Rezeptoren besitzt. Die Verbindung zum Dimer erfolgt hierbei über VEGF (= Zellbindestruktur) unter Ausbildung von Disulfidbrücken. Zur Herstellung dieses

5 Konstruktes wurde zunächst die Rezeptor-bindende Domäne des VEGF (Aminosäuren 1-114) in einen eukaryotischen Expressionsvektor kloniert und in Säugerzellen exprimiert. Für eine Bindung an Flk-1 ist ein VEGF-Fragment von Aminosäure 11 bis 109 ausreichend (Siemeister et al., J. Biol. Chem. 273,11115 (1998)). Dieses VEGF-Fragment wurde N-terminal durch einen kurzen Linker mit

10 dem einzelkettigen Fv-Fragment (scFv) anti AV (S11) fusioniert. S11 bindet an die "knob"-Domäne des adenoviralen "fiber"-Proteins und neutralisiert die Bindung an den zellulären Adenovirus-Rezeptor. Die Expression erfolgte ebenfalls in Säugerzellen. Die Funktionalität der Bindungsstellen wird immunologisch (ELISA, Immunzytologie, Durchflußzytometrie) bzw. in Proliferationsassays mit primären

15 humanen Endothelzellen verifiziert. Die zielgesteuerte Transduktion wird mit Hilfe von Adenoviren, die das lacZ-Gen unter der Kontrolle des CMV-Promotors exprimieren, durchgeführt.

Klonierung des Expressionsplasmids pSecTag-VEGF

20 Für die Klonierung sämtlicher Expressionskonstrukte wurde pSecTagA (Invitrogen, Expressionsvektor mit Igk-leader-Sequenz) als Vektor verwendet. Die in diesen Vektor klonierte VEGF-cDNA wurde mittels PCR aus genomischer DNA der humanen Tumorzelllinie LNCaP mit Taq-Polymerase (Pharmacia) amplifiziert (30

25 Zyklen, Annealingtemperatur: 58°C). Dazu wurden folgende Oligonukleotide verwendet (Restriktionsstellen unterstrichen, Nummern = Aminosäureposition VEGF-cDNA nach Leader s. Leung et al., Science 246, 1306 (1989)):

VEGF back1

30

				1												
		D	P	A	A	A	P	M	A	E	G	G	G	Q	N	
5'	GC	TGG	GAT	CCG	GCG	GCC	GCA	CCC	ATG	GCA	GAA	GGA	GGA	GGG	CAG	AAT
		BamHI			NotI											

VEGF for1 (bottom strand)

114

5 E C R P K K D R A R Q E H H H H
5' GAA TGC AGA CCA AAG AAA GAT AGA GCA AGA CAA GAA CAT CAT CAC CAT
CTT ACG TCT GGT TTC TTT CTA TCT CGT TCT GTT CTT GTA GTA GTG GTA

H H * (SEQ ID NO.: 20)

10

CAC CAT TGA GAA TTC GTC ACG (SEQ ID NO.: 21)

GTG GTA ACT CTT AAG CAG TGC 5' (SEQ ID NO.: 22)

15

EcoRI

Die PCR-Produkte wurden mit QIAquick™ Spin-Säulen (Qiagen) nach Anleitung des Herstellers aufgereinigt, mit den Restriktionsenzymen BamHI und EcoRI verdaut und nach Auftrennung durch Agarosegelelektrophorese erneut mit QIAquick™ Spin-Säulen aufgereinigt. Die verdauten PCR-Produkte wurden anschließend in den
20 entsprechend geschnittenen und aufgereinigten Vektor pSeqTagA ligiert (T4-Ligase, promega). Eine Plasmid-Präparation erfolgte mit qiagen tip 500-Säulen nach Angaben des Herstellers. Die Korrektheit des Konstrukts wurde durch Sequenzierung bestätigt.

25

Die Klonierung des s.c. Fv (anti AV)-VEGF-Konstruktes erfolgte durch 2-Fragment-Ligation. Das s.c. Fv (anti AV)-Fragment wurde mittels PCR (s.o) unter Verwendung folgender Oligonukleotide hergestellt:

PelB Metminus

A A Q P A T A Q V (SEQ ID NO.: 23)

5' TAA CTC GCG GCC CAG CCG GCC ACG GCC CAG GT 3' (SEQ ID NO.: 24)

5 Sfil

LMB2

5' GTA AAA CGA CGG CCA GT 3' (SEQ ID NO.: 25)

10

Dabei diente das Plasmid anti AV-pUC119mycHis (R. Hawkins in: Watkins et al., Gene Therapy 4, 1104 (1997)) als Template. Das PCR-Produkt wurde mit QIAquick™ Spin-Säulen (Qiagen) nach Anleitung des Herstellers aufgereinigt und mit den Restriktionsenzymen Sfil und NotI verdaut.

15

Das 2. Fragment, VEGF, wurde durch Restriktionsverdau des VEGF-Plasmids mit den Restriktionsenzymen NotI und EcoRI erhalten. Der Vektor, pSecTagA, wurde mit Sfil und EcoRI verdaut. Nach Auftrennung der Restriktionsverdau-Produkte durch Agarosegelelektrophorese wurde erneut mit QIAquick™ Spin-Säulen

20 aufgereinigt. Die Fragmente 1 und 2 wurden anschließend in den geschnittenen und aufgereinigten Vektor ligiert (T4-Ligase, promega). Eine Plasmid-Präparation erfolgte mit qiagen tip 500-Säulen nach Angaben des Herstellers. Die Korrektheit des Konstrukts wurde durch Sequenzierung bestätigt. Die Nukleotid- und Proteinsequenz des Konstrukts s.c. Fv anti AV-VEGF ist in Figur 3 dargestellt.

25

Expression von VEGF

Eine in vitro-Transkription und -Translation (promega, nach Angaben des Herstellers) des VEGF-Konstruktes ergab ein Protein, das im SDS-Polyacrylamidgel

30 mit der erwarteten Größe von etwa 20 kd lief. Die Transfektion des Plasmids in HEK293-Zellen wurde mit lipofektamin (gibco) nach Angaben des Herstellers unter Verwendung von 5 µg Plasmid und 30 µl lipofektamin pro 6 cm Schale durchgeführt. Transient transfizierte Zellen zeigten in der Immunfluoreszenz (1. Antikörper:

- monoklonaler anti-His-Tag, dianova; 2. Antikörper: Ziege-anti-Maus-Cy3, dianova) ein deutliches Signal. Hier waren v.a. die Kompartimente des zellulären Sekretionsweges dargestellt. Stabile Klone wurden durch Selektion in 200 µg/µl Zeocin erhalten. Die Aufreinigung erfolgte aus dem Zellkulturüberstand durch
- 5 immobilisierte Metallaffinitätschromatographie (IMAC) mittels sechs C-terminaler Histidinreste.

Expression von s.c. anti AV (S11)-VEGF

- 10 Die Expression von s.c. anti AV-VEGF erfolgt ebenfalls durch stabil transfizierte HEK293-Zellen. Wie VEGF kann auch dieses Fragment mittels IMAC aufgereinigt werden.

Herstellung des erfindungsgemäßen monomeren scFv-anti AV-scVEGF2-Moleküls zur zielzellspezifischen Transduktion von Adenoviren

- 15 In einem scFv-scVEGF2-Molekül (sc für "single chain" = einzelkettig) wird ein scFv-Fragment mit zwei VEGF-Einheiten, die über einen zusätzlichen Peptid-Linker verbunden sind, fusioniert. Dieses Molekül liegt somit als Monomer vor und besitzt
- 20 eine Bindungsstelle für das adenovirale "fiber"-Protein und zwei Bindungsstellen für die VEGF-Rezeptoren. Die Funktionalität dieser Bindungsstellen wird immunologisch (ELISA, Immunzytologie, Durchflußzytometrie) bzw. in Proliferationsassays mit primären humanen Endothelzellen verifiziert. Die zielgesteuerte Transduktion wird mit Hilfe von Adenoviren, die das lacZ-Gen unter der Kontrolle des CMV-Promotors
- 25 exprimieren, durchgeführt.

Klonierung der Expressionsplasmide

- 30 Zunächst wurde ein scVEGF2-Konstrukt (Aminosäuren 1 - 109, GGGSGGGRASG-GGS-Linker (SEQ ID NO.: 26) und Aminosäuren 6 - 114) kloniert und exprimiert. Zur Klonierung dieses Konstruktes wurden 2 PCR-Reaktionen (siehe unter 1) mit folgenden Oligonukleotiden durchgeführt:

- mit VEGF back 1 (s. unter 1) und VEGF for 2 (s.u.)
- mit VEGF back 2 (s.u.) und VEGF for 1 (s. unter 1)

5

VEGF back2

6

10 5' G R A S G G G S G G G Q N H
GAC TCG GGG CGC GCC TCG GGA GGC GGT AGT GGA GGA GGG CAG AAT CAT

Ascl

H E V V K

(SEQ ID NO.: 27)

CAC GAA GTG GTG AAG

(SEQ ID NO.: 28)

15

VEGF for2 (bottom strand)

109 (SEQ ID NO.: 29)

20 Q H N K C E C R P K K D G G G S
5' CAG CAC AAC AAA TGT GAA TGC AGA CCA AAG AAA GAT GGT GGA GGC AGC
GTC GTG TTG TTT ACA CTT ACG TCT GGT TTC TTT CTA CCA CCT CCG TCG

G G G R A

GGA GGC GGG CGC GCC ACT GTG (SEQ ID NO.: 30)

CCT CCG CCC GCG CGG TGA CAC 5' (SEQ ID NO.: 31)

25

Ascl

(Restriktionsstellen und Linker unterstrichen, Nummern = Aminosäureposition VEGF cDNA nach Leader s. Leung et al., Science 246, 1306 (1989)).

30 Die PCR-Produkte wurden mit QIAquick™ Spin-Säulen (Qiagen) nach Anleitung des Herstellers aufgereinigt, mit den Restriktionsenzymen BamHI und Ascl (1) bzw. Ascl und EcoRI (2) verdaut und nach Auftrennung durch Agarosegelelektrophorese erneut mit QIAquick™ Spin-Säulen aufgereinigt. Die verdauten PCR-Produkte (1) und (2) wurden anschließend in den entsprechend geschnittenen und aufgereinigten Vektor pSeqTagA ligiert (T4-Ligase, Promega). Eine Plasmid-Präparation erfolgte

mit Qiagen tip 500-Säulen nach Angaben des Herstellers. Die Korrektheit des Konstrukts wurde durch Sequenzierung bestätigt.

Zur Klonierung von S11-scVEGF2 wurde das scVEGF2-Plasmid mit dem

5 Restriktionsenzym EcoRI verdaut und unter Verwendung von klenow-Fragment (Boehringer Mannheim) wurde der einzelsträngige Überhang aufgefüllt.

Anschließend wurde mit NotI verdaut. Als Vektor wurde das S11-VEGF-Plasmid mit dem Restriktionsenzym XhoI verdaut, der einzelsträngige Überhang aufgefüllt und anschließend mit NotI verdaut. Die Produkte wurden mit QIAquick™ Spin-Säulen
10 aufgereinigt und ligiert. Eine Plasmid-Präparation erfolgte mit Qiagen tip 500-Säulen nach Angaben des Herstellers. Die Nukleotid- und Proteinsequenz des Konstrukts S11-scVEGF2 ist in Figur 4 dargestellt.

Expression von scVEGF2

15

Eine in vitro-Transkription und -Translation (promega, nach Angaben des Herstellers) des scVEGF2-Konstruktes ergab ein Protein, das im SDS-Polyacrylamidgel mit der erwarteten Größe von etwa 34 kd lief. Die Transfektion des Plasmids in HEK293-Zellen erfolgte wie unter Beispiel 1 aufgeführt. Transient
20 transfizierte Zellen zeigten in der Immunfluoreszenz (s. Beispiel 1) ein deutliches Signal. Hier waren v.a. die Kompartimente des zellulären Sekretionsweges dargestellt. Stabile Klone wurden durch Selektion in 200 µg/µl Zeocin erhalten. Die Aufreinigung erfolgte aus dem Zellkulturüberstand durch immobilisierte Metallaffinitätschromatographie (IMAC) mittels sechs C-terminalen Histidinresten.

25

Expression von s.c. Fv-anti AV (S11)-scVEGF2

Die Expression von s.c. Fv anti AV (S11)- scVEGF2 erfolgt ebenfalls durch stabil transfizierte HEK293-Zellen. Wie scVEGF2 wird auch dieses Fragment mittels IMAC
30 aufgereinigt.

Beispiel 2

Vorarbeiten: Herstellung eines homodimeren s.c. Fv anti CD3-VEGF2 Moleküls
entsprechend dem Stand der Technik

5

In den hier beschriebenen Beispielen wurden zielzellspezifische multivalente Proteine für eine systemische Therapie von Krebs entwickelt. Ziel ist eine selektive Bindung des MVP an Tumor- oder Tumorendothelzellen. Dies ist eine Voraussetzung für die Verwendung toxischer Proteine oder Prodrug-aktivierender Systeme zur zielgesteuerten Zerstörung von Tumoren ohne toxische Effekte auf gesundes Gewebe.

10

15

Durch die Bindung des MVP an Tumorendothelzellen wirkt der im MVP enthaltene Wirkstoff auf die Tumorendothelzellen ein. Deren Zerstörung führt zu einer Behinderung der Blutzufuhr des Tumors und zu dessen Absterben.

20

25

Bei den hier dargestellten Beispielen wird als Ligand VEGF ("vascular endothelial growth factor") - in unterschiedlichen Konfigurationen - für eine zielgerichtete Bindung an Tumorendothelzellen eingesetzt. VEGF ist ein Wachstumsfaktor, der an die endothelspezifischen Rezeptoren KDR ("kinase insert domain-containing receptor") und flt-1 ("fms-like tyrosine kinase") bindet (Thomas, K.A., 1996, J. Biol. Chem. 271: 603). Diese sind in Tumorendothelzellen verstärkt exprimiert (Gerber, H.-P., 1997, J. Biol. Chem 272: 23659; Waltenberger J., 1996, Circulation 94: 1647; Takahashi, Y., 1995, Cancer Res. 55: 3964). VEGF bindet als disulfidverbundenes Dimer an seine Rezeptoren.

30

Als Wirkstoff wurde das rekombinante scFv-Fragment eines ausgewählten Antikörpers verwendet. Dieser Antikörper bindet an das CD3 Molekül des humanen T-Zell-Rezeptors.

Die Expression einer scFv-VEGF-Polypeptidkette führt zur Ausbildung eines Homodimers, das zwei Bindungsstellen für CD3 und zwei Bindungsstellen für VEGF-Rezeptoren besitzt. Die Verbindung zum Dimer erfolgt hierbei über VEGF

(= Zellbindestruktur) unter Ausbildung von Disulfidbrücken. Zur Herstellung dieses Konstruktes wurde zunächst die Rezeptor-bindende Domäne des VEGF (Aminosäuren 1-114) in einen eukaryotischen Expressionsvektor kloniert und in Säugerzellen exprimiert. Für eine Bindung an Flk-1 ist ein VEGF-Fragment von Aminosäure 11 bis 109 ausreichend (Siemeister et al., J. Biol. Chem. 273,11115 (1998)). Dieses VEGF-Fragment wurde N-terminal durch einen kurzen Linker mit dem einzelkettigen Fv-Fragment (scFv) anti CD3 fusioniert. Anti CD3 bindet an die CD3 Untereinheit des T-Zell-Rezeptors. Die Expression erfolgte ebenfalls in Säugerzellen. Die Funktionalität der Bindungsstellen wird immunologisch (ELISA, Immunzytologie, Durchflußzytometrie) bzw. in Proliferationsassays mit primären humanen Endothelzellen verifiziert. Des weiteren durch Bindung von T-Zellen an Endothelzellen über das erfindungsgemäße MVP.

Klonierung des Expressionsplasmids pSecTag-VEGF

Für die Klonierung sämtlicher Expressionskonstrukte wurde pSecTagA (Invitrogen, Expressionsvektor mit Igk-leader-Sequenz) als Vektor verwendet. Die in diesen Vektor klonierte VEGF-cDNA wurde mittels PCR aus genomischer DNA der humanen Tumorzelllinie LNCaP mit Taq-Polymerase (Pharmacia) amplifiziert (30 Zyklen, Annealingtemperatur: 58°C). Dazu wurden Oligonukleotide publiziert von Leung et al., Science 246, 1306 (1989) verwendet.

Die PCR-Produkte wurden mit QIAquick™ Spin-Säulen (Qiagen) nach Anleitung des Herstellers aufgereinigt, mit den Restriktionsenzymen BamHI und EcoRI verdaut und nach Auftrennung durch Agarosegelelektrophorese erneut mit QIAquick™ Spin-Säulen aufgereinigt. Die verdauten PCR-Produkte wurden anschließend in den entsprechend geschnittenen und aufgereinigten Vektor pSeqTagA ligiert (T4-Ligase, Promega). Eine Plasmid-Präparation erfolgte mit Qiagen tip 500-Säulen nach Angaben des Herstellers. Die Korrektheit des Konstrukts wurde durch Sequenzierung bestätigt.

Die Klonierung des s.c. Fv anti CD3-VEGF-Konstruktes erfolgte durch 2-Fragment-Ligation.

Das 2. Fragment, VEGF, wurde durch Restriktionsverdau des VEGF-Plasmids mit den Restriktionsenzymen NotI und EcoRI erhalten. Der Vektor, pSecTagA, wurde mit SfiI und EcoRI verdaut. Nach Auftrennung der Restriktionsverdau-Produkte durch Agarosegelelektrophorese wurde erneut mit QIAquick™ Spin-Säulen aufgereinigt. Die Fragmente 1 und 2 wurden anschließend in den geschnittenen und aufgereinigten Vektor ligiert (T4-Ligase, Promega). Eine Plasmid-Präparation erfolgte mit Qiagen tip 500-Säulen nach Angaben des Herstellers. Die Korrektheit des Konstrukts wurde durch Sequenzierung bestätigt.

10 Expression von VEGF

Eine in vitro-Transkription und -Translation (Promega, nach Angaben des Herstellers) des VEGF-Konstruktes ergab ein Protein, das im SDS-Polyacrylamidgel mit der erwarteten Größe von etwa 20 kd lief. Die Transfektion des Plasmids in HEK293-Zellen wurde mit Lipofektamin (Gibco) nach Angaben des Herstellers unter Verwendung von 5 µg Plasmid und 30 µl Lipofektamin pro 6 cm Schale durchgeführt.

Transient transfizierte Zellen zeigten in der Immunfluoreszenz (1. Antikörper: monoklonaler anti-His-Tag, Dianova; 2. Antikörper: Ziege-anti-Maus-Cy3, Dianova) ein deutliches Signal. Hier waren v.a. die Kompartimente des zellulären Sekretionsweges dargestellt. Stabile Klone wurden durch Selektion in 200 µg/µl Zeozin erhalten. Die Aufreinigung erfolgte aus dem Zellkulturüberstand durch immobilisierte Metallaffinitätschromatographie (IMAC) mittels sechs C-terminaler Histidinreste.

Expression von s.c. Fv anti CD3-VEGF

Die Expression von s.c. Fv anti CD3-VEGF erfolgt ebenfalls durch stabil transfizierte HEK293-Zellen. Wie VEGF kann auch dieses Fragment mittels IMAC aufgereinigt werden.

Herstellung eines erfindungsgemäßen monomeren scFv-scVEGF2-Moleküls

- In einem scFv-scVEGF2-Molekül (sc für "single chain" = einzelkettig) wird ein scFv-Fragment mit zwei VEGF-Einheiten, die über einen zusätzlichen Peptid-Linker verbunden sind, fusioniert. Dieses Molekül liegt somit als Monomer vor und besitzt eine Bindungsstelle für das CD3 Molekül des T-Zell-Rezeptors und zwei Bindungsstellen für einen VEGF-Rezeptor. Die Funktionalität dieser Bindungsstellen wird immunologisch (ELISA, Immunzytologie, Durchflußzytometrie) bzw. in Proliferationsassays mit primären humanen Endothelzellen verifiziert. Die zielgesteuerte Bindung von T-Zellen wird an Hand deren Zytotoxizität für die Endothelzelle gemessen.

Klonierung der Expressionsplasmide

- 15 Zunächst wurde ein scVEGF2-Konstrukt (Aminosäuren 1 - 109, GGGSGGGRASG-GGS-Linker und Aminosäuren 6 - 114) kloniert und exprimiert. Zur Klonierung dieses Konstruktes wurden 2 PCR-Reaktionen (siehe unter 1) mit folgenden Oligonukleotiden durchgeführt:
- 20 - mit VEGF back 1 (s. unter 1) und VEGF for 2 (s.u.)
 - mit VEGF back 2 (s.u.) und VEGF for 1 (s. unter 1)

VEGF back2

25

6

G R A S G G G S

5' GAC TCG GGG CGC GCC TCG GGA GGC GGT AGT GGA GGA GGG CAG AAT CAT

Ascl

30

H E V V K
 CAC GAA GTG GTG AAG

(SEQ ID NO.: 32)
 (SEQ ID NO.: 33)

35 VEGF for2 (bottom strand)

109

Q H N K C E C R P K K D G G G S

5' CAG CAC AAC AAA TGT GAA TGC AGA CCA AAG AAA GAT GGT GGA GGC AGC
GTC GTG TTG TTT ACA CTT ACG TCT GGT TTC TTT CTA CCA CCT CCG TCG

5

G G G R A

(SEQ ID NO.: 34)

GGA GGC GGG CGC GCC ACT GTG

(SEQ ID NO.: 35)

CCT CCG CCC GCG CGG TGA CAC 5'

(SEQ ID NO.: 36)

10

Ascl

(Restriktionsstellen und Linker unterstrichen, Nummern = Aminosäureposition VEGF cDNA nach Leader s. Leung et al., Science 246, 1306 (1989)).

- 15 Die PCR-Produkte wurden mit QIAquick™ Spin-Säulen (Qiagen) nach Anleitung des Herstellers aufgereinigt, mit den Restriktionsenzymen BamHI und Ascl (1) bzw. Ascl und EcoRI (2) verdaut und nach Auftrennung durch Agarosegelelektrophorese erneut mit QIAquick™ Spin-Säulen aufgereinigt. Die verdauten PCR-Produkte (1) und (2) wurden anschließend in den entsprechend geschnittenen und aufgereinigten
- 20 Vektor pSeqTagA ligiert (T4-Ligase, Promega). Eine Plasmid-Präparation erfolgte mit Qiagen tip 500-Säulen nach Angaben des Herstellers. Die Korrektheit des Konstrukts wurde durch Sequenzierung bestätigt.

- Zur Klonierung von s.c. anti CD3-scVEGF2 wurde das scVEGF2-Plasmid mit dem
- 25 Restriktionsenzym EcoRI verdaut und unter Verwendung von Klenow-Fragment (Boehringer Mannheim) wurde der einzelsträngige Überhang aufgefüllt. Anschließend wurde mit NotI verdaut. Als Vektor wurde das s.c. Fv anti CD3-scVEGF2-Plasmid mit dem Restriktionsenzym XhoI verdaut, der einzelsträngige Überhang aufgefüllt und anschließend mit NotI verdaut. Die Produkte wurden mit
- 30 QIAquick™ Spin-Säulen aufgereinigt und ligiert. Eine Plasmid-Präparation erfolgte mit Qiagen tip 500-Säulen nach Angaben des Herstellers. Die Nukleotid- und Proteinsequenz des Konstrukts BMA031-scVEGF2 ist in Figur 4 dargestellt.

Expression von scVEGF2

35

Eine in vitro-Transkription und -Translation (Promega, nach Angaben des Herstellers) des scVEGF2-Konstruktes ergab ein Protein, das im SDS-

Polyacrylamidgel mit der erwarteten Größe von etwa 34 kd lief. Die Transfektion des Plasmids in HEK293-Zellen erfolgte wie unter Beispiel 1 aufgeführt. Transient transfizierte Zellen zeigten in der Immunfluoreszenz (s. Beispiel 1) ein deutliches Signal. Hier waren v.a. die Kompartimente des zellulären Sekretionsweges dargestellt. Stabile Klone wurden durch Selektion in 200 µg/µl Zeocin erhalten. Die Aufreinigung erfolgte aus dem Zellkulturüberstand durch immobilisierte Metallaffinitätschromatographie (IMAC) mittels sechs C-terminalen Histidinresten.

Expression von s.c. Fv anti CD3-scVEGF2

Die Expression von s.c. Fv anti CD3-scVEGF2 erfolgt ebenfalls durch stabil transfizierte HEK293-Zellen. Wie scVEGF2 wird auch dieses Fragment mittels IMAC aufgereinigt.

MVL-IIIb1 = MVL der durch Di- bzw. Multimerisierung der Zellbindestruktur entsteht, wobei diese Zusammenlagerung durch Ausbildung von Disulfidbrücken stabilisiert wird.

Figurenlegende:

Figur 1:

Erfindungsgemäße MVP's enthaltend mindestens eine Bindestruktur für den Vektor, mindestens zwei Bindestrukturen für die Zielzelle und mindestens einen Linker.

Figur 2:

Erfindungsgemäße MVP's enthaltend mehrere Liganden; A. mindestens einfach verbunden über gleiche oder verschiedene Bindestrukturen für den Vektor; B. mindestens einfach verbunden über gleiche oder verschiedene Linker; C. mindestens einfach verbunden über gleiche oder verschiedene Bindestrukturen für die Zielzelle.

Tabelle 1

S11-VEGF in pSecTagA

5	1/1	31/11
	aga acc cac tgc tta ctg gct tat cga aat taa tac gac tca cta tag gga gac cca agc	
	61/21	91/31
10	tgg cta gcc acc atg gag aca gac aca ctc ctg cta tgg gta ctg ctg ctc tgg gtt cca	
	M E T D T L L L W V L L L W V P	
	→ Ig kappa leader-Sequenz	
	121/41	Sfil 151/51
15	ggt tcc act ggt gac gcg gcc cag ccg gcc acg gcc CAG GTG CAA CTG CAG CAG TCA GGG	
	G S T G D A A Q P A T A Q V Q L Q Q S G	
	→ S11-VH	
	181/61	211/71
20	GCT GTA CTG GTG AGG CCT GGG TCC TCA GTG AAG ATT TCC TGC AAG GCT TCT GGC TAT GTA	
	A V L V R P G S S V K I S C K A S G Y V	
	241/81	271/91
25	TTC AGT AGT TAC TGG ATG AAC TGG GTG AAA CAG AGG CCT GGA CAG GGT CTT GAG TGG ATT	
	F S S Y W M N W V K Q R P G Q G L E W I	
	301/101	331/111
30	GGA CAG ATT CAT CCT GGA GAT GGT GAT ACT AAT TAC AAT GGA AAC CTC AAG GGT CAA GCC	
	G Q I H P G D G D T N Y N G N L K G Q A	
	361/121	391/131
35	ACA GTG ACT GCA GAC AAA TCC TCC AAC ACA GCC TAC ATG CAG TTC AGC AGC CTA AAA TCT	
	T V T A D K S S N T A Y M Q F S S L K S	
	421/141	451/151
40	GAG GAC TCT GCG GTC TAT TTC TGT GTC AGA GGA AGG GGA TGG CCT TAT GCT ATG GAC TAC	
	E D S A V Y F C V R G R G W P Y A M D Y	
	481/161	511/171
45	TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA GGT GGA GGC GGT TCA GGC GGA GGT GGC	
	W G Q G T T V T V S S <u>G G G G S G G G G</u>	
	scFv-Linker	
	541/181	571/191
50	TCT GGC GGT GGC GGA TCG GAC ATC CAG ATG ACT CAG TCT CCA TCT TAT CTT GCT GCA TCT	
	S G G G G S D I Q M T Q S P S Y L A A S	
	→ S11-VL	
	601/201	631/211
55	CCT GGA GAA ACC ATT ACT ATT AAT TGC AGG GCA AGT AAG AGC ATT AGC AAA TAT TTA GCC	
	P G E T I T I N C R A S K S I S K Y L A	
	661/221	691/231
60	TGG TAT CAA GAG AAA CCT GGG AAA ACT AAT AAG CTT CTT ATC TAC TCT GGA TCC ACT TTG	
	W Y Q E K P G K T N K L L I Y S G S T L	
	721/241	751/251
65	CAA TCT GGA ATT CCA TCA AGG TTC AGT GGC AGT CGA TCT GGT ACA GAT TTC ACT CTC ACC	
	Q S G I P S R F S G S R S G T D F T L T	
	781/261	811/271
70	ATC AGT AGC CTG GAG CCT GAA GAT TTT GCA ATG TAT TAC TGT CAA CAG TAT AAT GAA TAT	
	I S S L E P E D F A M Y Y C Q Q Y N E Y	

841/281 871/291 NotI
 CCA TTC ACG TTC GGC TCG GGG ACC AAG CTG GAA ATA AAA CGG GCG GCC GCA ccc atg gca
 P F T F G S G T K L E I K R A A A P M A
 Linker → VEGF

901/301 931/311
 gaa gga gga ggg cag aat cat cac gaa gtg gtg aag ttc atg gat gtc tat cag cgc agc
 E G G G Q N H H E V V K F M D V Y Q R S

961/321 991/331
 tac tgc cat cca atc gag acc ctg gtg gac atc ttc cag gag tac cct gat gag atc gag
 Y C H P I E T L V D I F Q E Y P D E I E

1021/341 1051/351
 tac atc ttc aag cca tcc tgt gtg ccc ctg atg cga tgc ggg ggc tgc tgc aat gac gag
 Y I F K P S C V P L M R C G G C C N D E

1081/361 1111/371
 ggc ctg gag tgt gtg ccc act gag gag tcc aac atc acc atg cag att atg cgg atc aaa
 G L E C V P T E E S N I T M Q I M R I K

1141/381 1171/391
 cct cac caa ggc cag cac ata gga gag atg agc ttc cta cag cac aac aaa tgt gaa tgc
 P H Q G Q H I G E M S F L Q H N K C E C

1201/401 1231/411 EcoRI
 aga cca aag aaa gat aga gca aga caa gaa CAT CAT CAC CAT CAC CAT TGA GAA TTC tgc
 (SEQ ID NO.: 37)

R P K K D R A R Q E H H H H H H *
 (SEQ ID NO.: 38)
 His-Tag

Tabelle 2
 S11-scVEGF₂ in pSecTagA

1/1 31/11
 aga acc cac tgc tta ctg gct tat cga aat taa tac gac tca cta tag gga gac cca agc

61/21 91/31
 tgg cta gcc acc atg gag aca gac aca ctc ctg cta tgg gta ctg ctg ctc tgg gtt cca
 M E T D T L L L W V L L L W V P
 Ig kappa leader sequence

121/41 Sfil 151/51
 ggt tcc act ggt gac gcg gcc cag ccg gcc acg gcc CAG GTG CAA CTG CAG CAG TCA GGG
 G S T G D A A Q P A T A Q V Q L Q Q S G
 → S11-VH

181/61 211/71
 5 GCT GTA CTG GTG AGG CCT GGG TCC TCA GTG AAG ATT TCC TGC AAG GCT TCT GGC TAT GTA
 A V L V R P G S S V K I S C K A S G Y V

241/81 271/91
 10 TTC AGT AGT TAC TGG ATG AAC TGG GTG AAA CAG AGG CCT GGA CAG GGT CTT GAG TGG ATT
 F S S Y W M N W V K Q R P G Q G L E W I

301/101 331/111
 15 GGA CAG ATT CAT CCT GGA GAT GGT GAT ACT AAT TAC AAT GGA AAC CTC AAG GGT CAA GCC
 G Q I H P G D G D T N Y N G N L K G Q A

361/121 391/131
 20 ACA GTG ACT GCA GAC AAA TCC TCC AAC ACA GCC TAC ATG CAG TTC AGC AGC CTA AAA TCT
 T V T A D K S S N T A Y M Q F S S L K S

421/141 451/151
 25 GAG GAC TCT GCG GTC TAT TTC TGT GTC AGA GGA AGG GGA TGG CCT TAT GCT ATG GAC TAC
 E D S A V Y F C V R G R G W P Y A M D Y

481/161 511/171
 TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA GGT GGA GGC GGT TCA GGC GGA GGT GGC
 25 W G Q G T T V T V S S G G G G S G G G G
 scFv-Linker

541/181 571/191
 30 TCT GGC GGT GGC GGA TCG GAC ATC CAG ATG ACT CAG TCT CCA TCT TAT CTT GCT GCA TCT
S G G G S D I Q M T Q S P S Y L A A S
 → S11-VL

601/201 631/211
 35 CCT GGA GAA ACC ATT ACT ATT AAT TGC AGG GCA AGT AAG AGC ATT AGC AAA TAT TTA GCC
 P G E T I T I N C R A S K S I S K Y L A

661/221 691/231
 40 TGG TAT CAA GAG AAA CCT GGG AAA ACT AAT AAG CTT CTT ATC TAC TCT GGA TCC ACT TTG
 W Y Q E K P G K T N K L L I Y S G S T L

721/241 751/251
 CAA TCT GGA ATT CCA TCA AGG TTC AGT GGC AGT CGA TCT GGT ACA GAT TTC ACT CTC ACC
 45 Q S G I P S R F S G S R S G T D F T L T

781/261 811/271
 ATC AGT AGC CTG GAG CCT GAA GAT TTT GCA ATG TAT TAC TGT CAA CAG TAT AAT GAA TAT
 50 I S S L E P E D F A M Y Y C Q Q Y N E Y

841/281 871/291 NotI
 CCA TTC ACG TTC GGC TCG GGG ACC AAG CTG GAA ATA AAA CGG GCG GCC GCA ccc atg gca
 P F T F G S G T K L E I K R A A A P M A
 Linker → VEGF(1)

901/301 931/311
 55 gaa gga gga ggg cag aat cat cac gaa gtg gtg aag ttc atg gat gtc tat cag cgc agc
 E G G G Q N H H E V V K F M D V Y Q R S

961/321 991/331
 60 tac tgc cat cca atc gag acc ctg gtg gac atc ttc cag gag tac cct gat gag atc gag
 Y C H P I E T L V D I F Q E Y P D E I E

1081/361

ggc ctg gag tgt gtg ccc act gag gag tcc aac atc acc atg cag att atg cgg atc aaa

1141/381

cct cac caa ggc cag cac ata gga gag atg agc ttc cta cag cac aac aaa tgt gaa tgc

1201/401

aga cca aag aaa gat GGT GGA GGC AGC GGA GGC GGG CGC GCC TCG GGA GGC GGT AGT gga

1261/421

gga ggg cag aat cat cac gaa gtg gtg aag ttc atg gat gtc tat cag cgc agc tac tgc

1321/441

cat cca atc gag acc ctg gtg gac atc ttc cag gag tac cct gat gag atc gag tac atc

1381/461

ttc aag cca tcc tgt gtg ccc ctg atg cga tgc ggg ggc tgc tgc aat gac gag ggc ctg

35 1441/481

gag tgt gtg ccc act gag gag tcc aac atc acc atg cag att atg cgg atc aaa cct cac

1501/501

40 caa ggc cag cac ata gga gag atg agc ttc cta cag cac aac aaa tgt gaa tgc aga cca

1561/521

1591/531

EcoRI

aag aaa gat aga gca aga caa gaa CAT CAT CAC CAT CAC CAT TGA GAA TTC tgc aga tat (SEQ ID NO.: 39)

45 K K D R A R Q E H H H H H H * (SEQ ID NO.: 40)

His-Tag

Patentansprüche

1. Zielzellspezifisches, multivalentes Protein (MVP), dadurch charakterisiert, daß das MVP aus folgenden kovalent miteinander verbundenen Komponenten besteht:
- 5 a) einer Bindestruktur $(a)_n$ spezifisch für den Vektor,
b) einem Linker $(b)_m$, und
c) mindestens zwei Bindestrukturen $(c)_o$ für die Zielzelle; wobei unabhängig voneinander $n=1-10$, $m=1-10$ und $o=2-10$ sind.
- 10 2. MVP nach Anspruch 1, in welchen die Komponente b mindestens ein fusogenes Peptid oder ein Translokalisationspeptid enthält.
3. MVP nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch charakterisiert, daß die Bindestruktur für den Vektor ausgewählt ist aus einer Gruppe umfassend
- 15 – einen zellulären Rezeptor für ein Virus, wie beispielsweise für AdV, AAV, ein Lentivirus, ein RTV, Vacciniavirus, HSV, Influenzavirus, HIV
– einen rekombinanten Antikörper spezifisch für ein Virusprotein, für einen nichtviralen Vektor oder für eine Nukleinsäure, wie beispielsweise ein IgG, F(ab')₂, Fab, rec. Fv, Diabody oder einzelkettiges, doppelantigenbindendes Protein
- 20 – ein Peptid mit einer reaktiven Gruppe zur Konjugation an ein Virusprotein
– ein Peptid mit Bindeaffinität zu einer definierten Nukleinsäuresequenz, wie beispielsweise LexA, Gal4 oder die DNA-Bindedomäne eines Transkriptionsfaktors.
- 25 4. MVP nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch charakterisiert, daß die Bindestruktur für die Zielzelle ausgewählt ist aus einer Gruppe umfassend
- einen rekombinanten Antikörper spezifisch für eine Membranstruktur auf der Zielzelle, beispielsweise IgG, F(ab)₂, Fab, rec. Fc, Diabody oder einzelkettige, doppelantigenbindende Proteine
- 30 – das Fc-Teil eines Immunglobulins

- einen Wachstumsfaktor
 - ein Cytokin
 - ein Chemokin
 - ein Peptidhormon
- 5 – ein Adhäsionsmolekül
- einen Mediator
- die Zellmembran-bindende Domäne eines Virushüllproteins
5. MVP nach einem der Ansprüche 1 bis 4, bei welchem die Komponenten a und c
- 10 humanen Ursprungs sind.
6. Nukleinsäurekonstrukt, kodierend für ein MVP nach einem der Ansprüche 1 bis 5.
7. Ein Bakterium, eine Hefe oder eine Säugerzelle, in welche ein
- 15 Nukleinsäurekonstrukt nach Anspruch 6 eingeführt worden ist.
8. MVP gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5, an dessen Komponente a ein Vektor gebunden ist.
- 20 9. MVP gemäß Anspruch 8, wobei der Vektor ausgewählt wird aus einer Gruppe umfassend RTV, AdV, AAV, Influenzavirus, HSV, Vacciniavirus und Lentivirus.
10. MVP gemäß Anspruch 8, wobei der Vektor ausgewählt wird aus einer Gruppe
- 25 enthaltend einen nichtviralen Vektor, DNA, RNA und Plasmide.
11. MVP gemäß Anspruch 10, wobei der nichtvirale Vektor ausgewählt wird aus einer Gruppe umfassend kationische Lipide, kationische Polymere und Porphyrine.
- 30 12. Verwendung eines MVP gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5 oder 8 bis 11 zur Herstellung eines Heilmittels zur Behandlung von Zellen außerhalb des Gewebeverbandes bei Erkrankungen der Haut, der Schleimhaut, des Nervensystems, der inneren Organe, der Gerinnung, des blutbildenden Systems,

des Immunsystems, der Muskulatur, des Stützgewebes oder der Gelenke und zur Impfung zur Vorbeuge oder Therapie dieser Erkrankungen.

5 13. Verwendung eines MVP's gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5 oder 8 bis 11 zur Herstellung eines Heilmittels

10 a) zur lokalen Verabreichung bei Erkrankungen der Haut, der Schleimhaut, des Nervensystems, der inneren Organe, der Gerinnung, des blutbildenden Systems, des Immunsystems, der Muskulatur, des Stützgewebes oder der Gelenke und zur Impfung zur Vorbeuge oder Therapie dieser Erkrankungen;

15 b) zur Injektion bei Erkrankungen der Haut, der Schleimhaut, des Nervensystems, der inneren Organe, der Gerinnung, des blutbildenden Systems, des Immunsystems, der Muskulatur, des Stützgewebes oder der Gelenke und zur Impfung zur Vorbeuge oder Therapie dieser Erkrankungen.

20 14. Herstellung eines MVP's gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5 oder 8 bis 11 durch Expression eines Nukleinsäurekonstrukts gemäß Anspruch 8, Reinigung der exprimierten Proteine und gegebenenfalls Assoziierung verschiedener Expressionsprodukte.

25 15. MVP, bestehend aus einem scFv-Fragment mit einer Bindungsstelle für das adenovirale „fiber“-Protein und zwei VEBF-Einheiten, die über einen Peptidlinker verbunden sind.

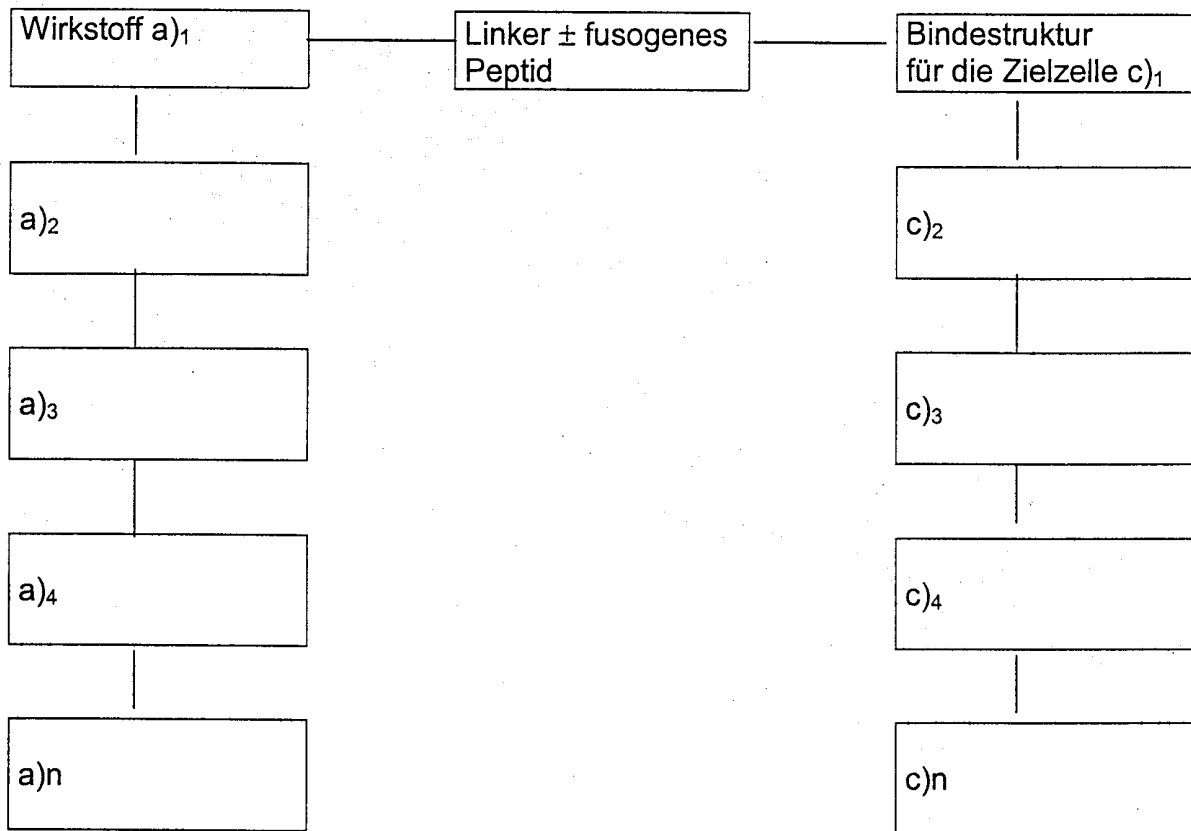
16. MVP, bestehend aus einem scFv-Fragment mit einer Bindungsstelle für das CD3-Molekül und zwei VEGF-Einheiten, die über einen Peptidlinker verbunden sind.

30 17. Komplex, bestehend aus mindestens zwei LVP's gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei bei jedem der einzelnen Liganden $\alpha=1$ sein kann.

18. Komplex gemäß Anspruch 17, wobei die Verbindung zwischen den Komponenten a), b) oder c) erfolgt.

1/2

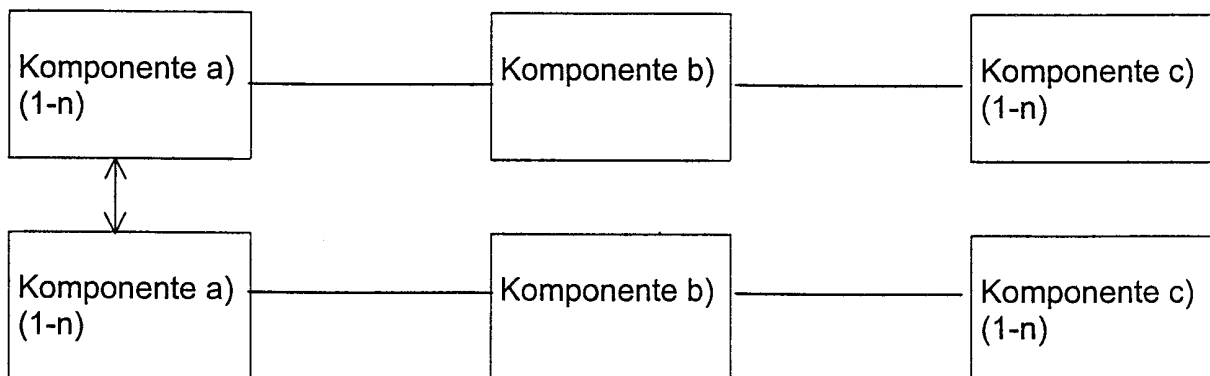
Figur 1



5

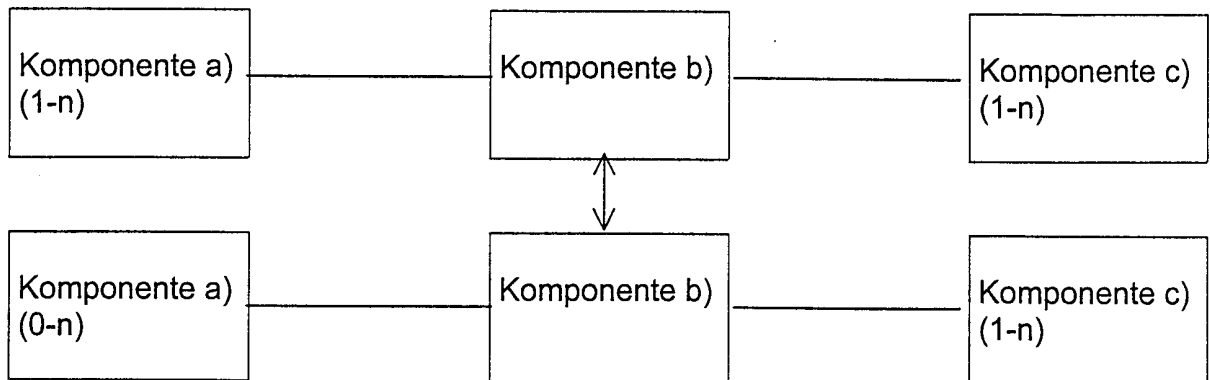
Figur 2

10 A



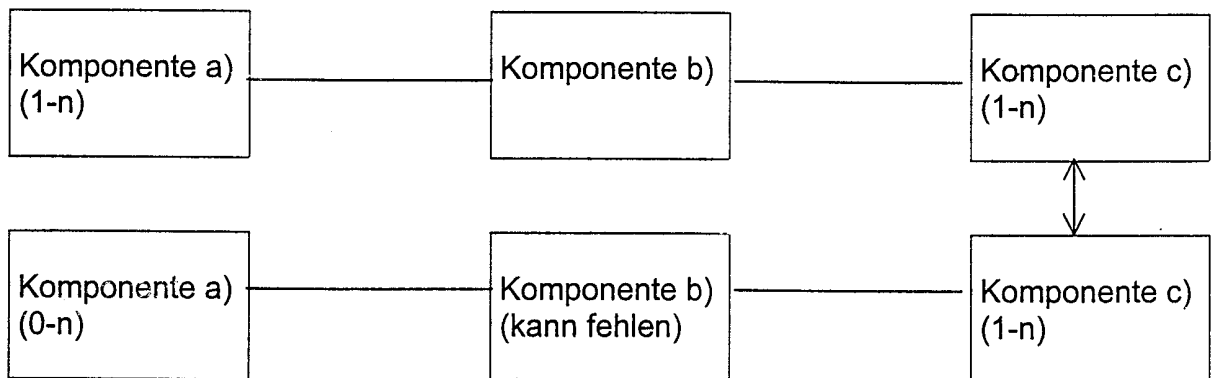
15

B



5

10 C



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter. Application No

PCT/EP 00/01612

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/87 C12N15/12 C07K14/47 C12N15/62 A61K38/12
A61K39/00 C07K16/00 C07K16/46

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

BIOSIS, EP0-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 846 772 A (HOECHST AG) 10 June 1998 (1998-06-10) cited in the application	17, 18
Y	the whole document ---	1-7
X	WO 94 04696 A (MILES INC) 3 March 1994 (1994-03-03)	17, 18
Y	the whole document ---	1-7
Y	WO 91 19739 A (CELLTECH LTD) 26 December 1991 (1991-12-26) the whole document ---	1-7
P, Y	EP 0 952 218 A (HOECHST MARION ROUSSEL DE GMBH) 27 October 1999 (1999-10-27) the whole document -----	1-7

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 June 2000

Date of mailing of the international search report

05/07/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Espen, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/01612

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0846772 A	10-06-1998	DE 19649645 A	04-06-1998
		AU 4540797 A	04-06-1998
		BR 9706032 A	27-04-1999
		CA 2217159 A	29-05-1998
		CZ 9703776 A	17-06-1998
		HU 9702251 A	28-06-1999
		JP 11000169 A	06-01-1999
		PL 323434 A	08-06-1998
WO 9404696 A	03-03-1994	AU 674026 B	05-12-1996
		AU 5088593 A	15-03-1994
		CA 2143308 A	03-03-1994
		EP 0658210 A	21-06-1995
		FI 950866 A	24-04-1995
		JP 8504565 T	21-05-1996
		NO 950726 A	18-04-1995
		NZ 255870 A	25-09-1996
		ZA 9306189 A	10-01-1995
WO 9119739 A	26-12-1991	AU 654134 B	27-10-1994
		AU 7983191 A	07-01-1992
		CA 2064829 A	12-12-1991
		EP 0486652 A	27-05-1992
		GB 2250995 A, B	24-06-1992
		JP 5502039 T	15-04-1993
		US 5864019 A	26-01-1999
EP 0952218 A	27-10-1999	DE 19816141 A	14-10-1999
		DE 19827239 A	23-12-1999
		AU 2365699 A	28-10-1999
		CN 1234406 A	10-11-1999
		CZ 9901215 A	13-10-1999

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/01612

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N15/87 C12N15/12 C07K14/47 C12N15/62 A61K38/12
A61K39/00 C07K16/00 C07K16/46

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N C07K A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

BIOSIS, EP0-Internal

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EP 0 846 772 A (HOECHST AG) 10. Juni 1998 (1998-06-10) in der Anmeldung erwähnt	17,18
Y	das ganze Dokument	1-7
X	WO 94 04696 A (MILES INC) 3. März 1994 (1994-03-03)	17,18
Y	das ganze Dokument	1-7
Y	WO 91 19739 A (CELLTECH LTD) 26. Dezember 1991 (1991-12-26) das ganze Dokument	1-7
P, Y	EP 0 952 218 A (HOECHST MARION ROUSSEL DE GMBH) 27. Oktober 1999 (1999-10-27) das ganze Dokument	1-7



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

28. Juni 2000

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

05/07/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo.nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Espen, J

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/01612

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0846772 A	10-06-1998	DE 19649645 A	04-06-1998
		AU 4540797 A	04-06-1998
		BR 9706032 A	27-04-1999
		CA 2217159 A	29-05-1998
		CZ 9703776 A	17-06-1998
		HU 9702251 A	28-06-1999
		JP 11000169 A	06-01-1999
		PL 323434 A	08-06-1998
WO 9404696 A	03-03-1994	AU 674026 B	05-12-1996
		AU 5088593 A	15-03-1994
		CA 2143308 A	03-03-1994
		EP 0658210 A	21-06-1995
		FI 950866 A	24-04-1995
		JP 8504565 T	21-05-1996
		NO 950726 A	18-04-1995
		NZ 255870 A	25-09-1996
		ZA 9306189 A	10-01-1995
WO 9119739 A	26-12-1991	AU 654134 B	27-10-1994
		AU 7983191 A	07-01-1992
		CA 2064829 A	12-12-1991
		EP 0486652 A	27-05-1992
		GB 2250995 A, B	24-06-1992
		JP 5502039 T	15-04-1993
		US 5864019 A	26-01-1999
EP 0952218 A	27-10-1999	DE 19816141 A	14-10-1999
		DE 19827239 A	23-12-1999
		AU 2365699 A	28-10-1999
		CN 1234406 A	10-11-1999
		CZ 9901215 A	13-10-1999