



Egy láncú, több antigénkötő hely kialakítására képes molekulák, előállításuk és alkalmazásuk

## KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

1  
A

## K I V O N A T

A találmány tárgyát egy láncú, több antigénkötő hely kialakítására képes molekulák képezik, melyek immunglobulinok nehéz és könnyű láncainak eltérő specifitású variábilis doménjait tartalmazzák VH-VL-konstrukció formájában összekapcsolva, mely konstrukciók egy peptiden keresztül kapcsolódnak egymással. A találmány tárgyát képezik a találmány szerinti molekulákat kódoló nukleinsavak, a nukleinsavakat tartalmazó vektorok, valamint a vektorokat tartalmazó sejtek is. A találmány tárgyát képezik továbbá eljárások a találmány szerinti egy láncú, több antigénkötő hely kialakítására képes molekulák előállítására.

A találmány tárgyát képezi a találmány szerinti molekulák, nukleinsavak, vektorok és sejtek alkalmazása is különböző rendellenességek és betegségek, például rákos elváltozások, autoimmun- és gyulladásos megbetegedések, ér- és idegrendszeri elváltozások, valamint fertőző betegségek terápiájára, megelőzésére és/vagy diagnózisára.

B. (dán)

E9900956



**KÖZZÉTÉTELI  
PÉLDÁNY**

Képviselő:

Danubia

Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.

B u d a p e s t

A2

**Egy láncú, több antigénkötő hely kialakítására képes molekulák, előállításuk és alkalmazásuk**

A találmány tárgyát egy láncú, több antigénkötő hely kialakítására képes molekulák képezik, melyek immunglobulinok nehéz és könnyű láncainak eltérő specifitású variábilis doménjait tartalmazzák VH-VL-konstrukció formájában összekapcsolva, mely konstrukciók egy peptiden keresztül kapcsolódnak egymással. A találmány tárgyát képezik a találmány szerinti molekulákat kódoló nukleinsavak, a nukleinsavakat tartalmazó vektorok, valamint a vektorokat tartalmazó sejtek is. A találmány tárgyát képezik továbbá eljárások a találmány szerinti egy láncú, több antigénkötő hely kialakítására képes molekulák előállítására.

A találmány tárgyát képezi a találmány szerinti molekulák, nukleinsavak, vektorok és sejtek alkalmazása is különböző rendellenességek és betegségek, például rákos elváltozások, autoimmun- és gyulladásos megbetegedések, ér- és idegrendszeri elváltozások, valamint fertőző betegségek terápiájára, megelőzésére és/vagy diagnózisára.

Aktaszámunk: 89509-9449/PÁ



Két különböző antigén - például tumor sejtfelszíni antigén és effektor-molekula - felismerésére képes bispecifikus ellenanyagok széles körben használatosak a kísérletes immunterápiában [Fanger és mtsai.: Crit. Rev. Immunol. 12, 101 (1992); van de Winkel és mtsai.: Immunol. Today 18, 562 (1997)]. Bispecifikus ellenanyagok alkalmazásával lokálisan fokozhatunk a testben természetesen végbemenő effektor-funkciókat, úgy, hogy a kívánt helyre citotoxikus és fagocita sejteket, komplement-komponenseket, citokineket, valamint trombolitikus és fibrinolitikus enzimeket toborzunk; vagy előidézhetjük exogén effektor-molekulák, például toxinok, prodorog-átalakító enzimek és radionuklidok lokális felhalmozódását. Például, Hodgkin-tumor asszociált CD30-antigénnel, valamint a CD3- és CD28-jelzésű T-sejt-antigének ellen irányuló bispecifikus ellenanyagok injektálása xenotranszplantált tumorokba, citotoxikus T-sejtek toborzásához és stimulációjához vezet, és végső soron, tumorpusztító hatást vált ki [Renner és mtsai.: Science 264, 833 (1994)] Mások, CD30-antigén és alkalikus foszfatáz elleni bispecifikus ellenanyagokat alkalmaztak az enzimnek a tumor helyén történő lokális felhalmozására, ezáltal, valamely hatóanyag (drog) nem-toxikus prekursorának toxikus hatóanyaggá (droggá) történő átalakítására [Sahin és mtsai.: Cancer Res. 50, 6944 (1990)].

A tisztított bispecifikus ellenanyag injektálása helyett, eljárhatunk úgy, hogy ezeket a bispecifikus ellenanyagokat *in vitro* vagy *in vivo* transzfektált sejtekben expresszáltatjuk, és az említett sejtekkel szekretáltatjuk.



A fenti megközelítési mód előnye, hogy a bispecifikus ellenanyagokat a transzdukált sejtek *in vivo* termelik, és nincs szükség a bispecifikus ellenanyagok körülményes előállítására és tisztítására azok injektálását megelőzően. Továbbá, megfelelő expressziós rendszer megválasztásával a bispecifikus ellenanyagok expresszióját lokálisan, például szervekben, tumorban, vagy egyéb rendszer szerint szabályozhatjuk.

Bispecifikus ellenanyagokat előállíthatunk például kémiai keresztkötések létrehozásával [Nisonoff és mtsai.: *Nature* 194, 355 (1962)]. Állati eredetű monoklonális vagy poliklonális ellenanyag-molekulák közti kémiai keresztkötések létrehozásakor, nem kis részben számolnunk kell azok inaktiválódásával. Ezen felül, ilyen eljárás során mind hetero-, mind homodimerek létrejönnek. A homodimereket bonyolult eljárásokkal szét kell választanunk a kívánt heterodimerektől. Bispecifikus ellenanyagokat termelő "hibrid hibridómáknak" nevezett hibridómasejteket viszonylag bonyolult módon állíthatunk elő, mivel létrehozásukhoz két különböző hibridómát kell fuzionáltatnunk [Milstein és mtsai.: *Nature* 305, 537 (1983)]. A keletkező funkcionális heterodimerek aránya viszonylag alacsony - elméletileg csupán 10 % -, mivel a két ellenanyag-molekula nehéz és könnyű láncai gyakorlatilag bármely módon kapcsolódhatnak egymással. Továbbá, a fenti eljárás alkalmazásakor elsősorban egér monoklonális ellenanyagokból indulunk ki, amelyek viszont immunogén hatásúak emberben.



Különböző bivalens vagy bispecifikus ellenanyag-molekulákat előállíthatunk továbbá rekombináns úton, és azokat expresszáltathatjuk baktériumsejtekben vagy eukariota sejtekben (WO 93/06217 számú nemzetközi közzétételi irat). Valamennyi rekombináns ellenanyag-molekulára jellemző, hogy azok előállításához mind egér, mind humán kiindulási molekulákat alkalmazhatunk. Számos különböző eljárást fejlesztettek ki bispecifikus rekombináns ellenanyag-molekulák minél hatékonyabb előállítására. Ezekkel a módszerekkel különböző típusú molekulákat nyerhetünk.

Az egyik ilyen molekulatípust oly módon állítjuk elő, hogy az ellenanyagok variábilis részét konstans immunglobulin doménokkal (Fc, CH3, CL) fuzionáltatjuk, miáltal dime-rizálódó molekulákat kapunk [Hu és mtsai.: *Cancer Res.* 56, 3055 (1994); Hayden és mtsai.: *Ther. Immunol.* 1, 3 (1994)]. Ebben az esetben azonban, nincs semmiféle szelekció heterodimer molekulák képződésére, így elsősorban bivalens homodimerek jönnek létre. Ezen felül, ezen molekulák csak eukariota sejtekben expresszáltathatók funkcionális formában.

Más típusú molekulákban, az ellenanyagok variábilis részeit más proteinek peptid- vagy protein-doménjaival fuzionáltatjuk, miáltal bivalens vagy bispecifikus molekulákat kapunk [Plückthun és Pack: *Immunotechnol.* 3, 83 (1997)]. Ebben az esetben is egyaránt képződnek homo- és heterodimerek, mivel az egyes komponensek véletlenszerűen kapcsolódnak egymással. Továbbá, ezek a molekulák jelentős arányban tartalmaznak olyan részeket, amelyek - egyes ese-



tekben - idegen szekvenciáknak tekinthetők, miáltal jelentős mértékű immunogén hatással kell számolnunk.

Az említett molekulák harmadik csoportjában, kis mértékben módosított rekombináns Fv-fragmentumokat - általában egy láncú Fv-fragmentumokat ("single-chain Fv"; scFV) - alkalmazunk bivalens vagy bispecifikus molekulák előállítására [Holliger és Winter: Curr. Opin. Biotechnol. 4, 446 (1993)]. Ilyen molekulákat létrehozhatunk például úgy, hogy az scFv-láncok C-terminusához ciszteineket adunk hozzá, miáltal dimerizálódó molekulákat kapunk [MacCartney és mtsai.: Protein Engin. 8, 301 (1994)]. Ezzel az eljárással azonban egyaránt kapunk homo- és heterodimereket, és bakteriális sejtekben expresszáltatva funkcióképtelen aggregátumok keletkeznek. "scFV(A) - kapcsoló szekvencia (linker) - scFV(B)" struktúrájú tandem scFV-molekulák mind baktérium, mind eukariota sejtekben expresszáltathatók [Mallender és Voss: J. Biol. Chem. 269, 199 (1994)]. Egyes esetekben azonban, funkcióképtelen aggregátumok is létrejöhetnek a négy variábilis domén nem megfelelő kapcsolódása révén.

Az elmúlt években a rekombináns ellenanyag-technológia új, kis méretű, bivalens és/vagy bispecifikus ellenanyag-fragmentumok kifejlesztéséhez vezetett. Ilyen típusú molekulák például az úgy nevezett "dimerizálódó bispecifikus antitest-fragmentumok" ("diabodies") [Hollinger és mtsai.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 6444 (1993)]. Ezek immunoglobulinok variábilis VH- és VL-doménjait tartalmazzák, igen rövid kapcsoló szekvencián ("linkeren") keresztül összekapcsolva. Ez a kapcsoló szekvencia túl rövid ahhoz,



hogy egy-egy láncon belül lehetővé tegye a VH- és VL-doménok összekapcsolódását, szemben az egy lánccú Fv-fragmentumok esetében megfigyeltekhez. Ez azt jelenti, hogy két láncc VH- és VL-doménjai dimerré kapcsolódnak össze, miáltal két kötőhelyet tartalmazó molekulák jönnek létre [Perisic és mtsai.: Structure 2, 1217 (1994)]. "Dimerizálódó bispecifikus ellenanyag-fragmentumokat" úgy állíthatunk elő, hogy két, VH(A)-VL(B) és VH(B)-VL(A) struktúrájú lánccot expresszáltatunk egyazon sejtben. Ebben az esetben, VL rövidítés immunglobulin könnyű láncc (L) variábilis (V) doménját, a VH immunglobulin nehéz láncc (H) variábilis (V) doménját jelenti, amely variábilis doménok egyike (A)-, másika (B)-antigént képes felismerni. A VH-részek összekapcsolódása a VL-részekkel, funkcionálisan aktív kötőhelyeket tartalmazó heterodimer-fragmentumok keletkezését eredményezi. Baktériumokban expresszáltatott "dimerizálódó bispecifikus ellenanyag-fragmentumokat" sikeresen alkalmaztak már különböző effektor-molekulák - például immunglobulinok, C1q vagy enzimek -, vagy effektorsejtek - például citotoxikus T-limfociták - célzott helyre történő toborzására [Kontermann és mtsai.: Nature Biotechnol. 15, 629 (1997); Holliger és mtsai.: Protein Engin. 9, 299 (1996); Nature Biotechnol. 15, 632 (1997); Zhu és mtsai.: BioTechnol. 14, 192 (1996); FitzGerald és mtsai.: Protein Engin. 10, 1221 (1997); Krebs és mtsai.: J. Biol. Chem. 273, 2858 (1998)].

A "dimerizálódó bispecifikus antitest-fragmentumok" alkalmazása azonban a következő hátrányokkal jár. Mivel a



két, VH(A)-VL(B) és VH(B)-VL(A) struktúrájú lánc fizikai módon nincs többé összekapcsolva egymással, homo- és heterodimerek egyenlő arányban képződhetnek; ez igen bonyolult tisztítási eljárás alkalmazását teszi szükségessé a heterodimerek kinyerésére. Továbbá, a dimerek disszociálódhatnak, amint azt az scFV-fragmentumok esetében már láttuk [Glockshuber és mtsai.: Biochem 29, 1362 (1990)]. Ezen problémák megoldására, diszulfid-stabilizált "dimerizálódó bispecifikus antitest-fragmentumokat" [FitzGerald és mtsai.: Protein Engin. 10, 1221 (1997)] vagy úgy nevezett "gomb a gomblyukba" ("knob into hole") típusú "dimerizálódó bispecifikus antitest-fragmentumokat" fejlesztettek ki [Zhu és mtsai.: Protein Sci. 6, 781 (1997)]. Azok előállítása azonban igen körülményes. Továbbá, "dimerizálódó bispecifikus antitest-fragmentumok" géntechnológiai úton történő expresszáltatásához mindegyik lánc kódoló szekvenciájába szignálszekvenciát és riboszóma-kötőhelyet ("ribosome binding site"; RBS) kell beépítenünk, ami igen bonyolult eljárás alkalmazását teszi szükségessé. Előfordulhat továbbá, hogy az egyes variábilis doménok nem expresszálódnak ekvimoláris mennyiségben, ami a funkcióképtelen homodimerek arányának növekedéséhez vezet.

Célul tűztük ki olyan, több antigénkötő hely kialakítására képes molekulák kifejlesztését, amelyekre az úgy nevezett "dimerizálódó bispecifikus antitest-fragmentumok" említett hátrányai nem jellemzők, és amelyek egyszerűen előállíthatók, túlnyomórészt homogén formában.



A találmány tárgyát képezik tehát egyrészt, egy láncú, több antigénkötő hely kialakítására képes molekulák, amelyek a következő komponenseket tartalmazzák:

a) immunglobulin nehéz lánc variábilis domént (VH), amelyet egy első, (A)-specifitás jellemez, vagy annak funkcionális részeit;

b) immunglobulin könnyű lánc variábilis domént (VL), amelyet egy második, (B)-specifitás jellemez, vagy annak funkcionális részeit;

c) immunglobulin nehéz lánc variábilis domént (VH), amelyet a (B)-specifitás jellemez, vagy annak funkcionális részeit; valamint

d) immunglobulin könnyű lánc variábilis domént (VL), amelyet az (A)-specifitás jellemez, vagy annak funkcionális részeit;

ahol a VH és VL-doménok VH-VL- vagy VL-VH-konstrukció formájában vannak összekapcsolva, és a két VH-VL-konstrukció egy peptiden (P) keresztül van összekötve egymással.

A találmány egy további előnyös megvalósítási módja szerint, a találmány szerinti molekula kettőnél több ilyen VH-VL-konstrukciót tartalmaz [például "VH(B) - peptid - VL(B)"]. Ez lehetővé teszi, hogy több - például (A)-, (B)-, (C)- stb. - specifitással bíró molekulákat nyerjünk.

A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, az egyes VH-VL-konstrukciók azonos specifitású variábilis doménjaikon keresztül kapcsolódnak egymással. A találmány



egy különösen előnyös megvalósítási módja szerint, a találmány szerinti molekula az 1. ábrán bemutatott struktúrájú.

A találmány egy további előnyös megvalósítási módja szerint, az egyes specifitások "lényegében azonosak". Akkor mondjuk, hogy specifitások "lényegében azonosak", ha a doménok molekuláris struktúrája különbözik ugyan, de azok specifitása, azaz, azok specifikus antigénkötő funkciója megtartott. Ebből következik, hogy a találmány szerinti molekula immunglobulin nehéz vagy könnyű láncának nem csak teljes variábilis doménját tartalmazhatja, hanem azok funkcionális részeit is, azaz, azok specifikus antigénkötő képességet megtartott részeit is. Ugyancsak a találmány tárgyát képezik tehát például olyan mesterséges konstrukciók, amelyek immunglobulin variábilis doménjainak egyes CDR-részeiből ("complementary determining regions"; "komplementaritást meghatározó régióiból") épülnek fel [Jones P.T. és mtsai.: Nature 321, 522 (1986); Riechmann L. és mtsai.: Nature 332, 323 (1988); Verhoeyen M. és mtsai.: Science 239, 1534 (1988)].

A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, a VH- és VL-doménok peptid kapcsoló szekvencián ("peptidlinkeren") (L) keresztül kapcsolódnak egymással, VH-L-VL vagy VL-L-VH konstrukció formájában. Ebben az esetben, a peptidlinkernek a lehető legrövidebbnek kell lennie; az előnyösen, körülbelül 1-20 aminosav hosszúságú, előnyösebben, körülbelül 1-5 aminosav hosszúságú. Különösen előnyösen, a peptidlinker GGGGS-szekvenciájú.



A peptidlinkerrel (L) szemben, a kapcsoló peptid (P) bármilyen hosszúságú lehet. Előnyösen azonban, mintegy 12-40 aminosavból álló peptidet (P) alkalmazunk; előnyösebben, mintegy 12-20 aminosavból álló peptidet; és különösen előnyösen, mintegy 14 aminosavból álló peptidet alkalmazunk. Különösen előnyösen, GGGGSGGRASGGGS vagy GGGGSGGRASGGGGS aminosav-szekvenciát tartalmazó kapcsoló peptidet (P) alkalmazunk, még előnyösebben pedig a fenti aminosav-szekvenciájú peptidek (P) valamelyikét alkalmazzuk.

A találmány egy további előnyös megvalósítási módja szerint, a találmány szerinti molekula további összetevőként effektort (E) is tartalmaz. Ez az effektor kapcsolódhat a találmány szerinti molekulával közvetlenül, vagy adott esetben, összekötő szekvencián ("connector"; B) keresztül. Az összekötő szekvencia (B) előnyösen, proteáz hasítási szekvenciát, előnyösebben, PSA ("prostate-specific antigen"; prosztata-specifikus antigén), katepszin, plazminogén és/vagy plazminogén aktivátor által felismert hasítási szekvenciát tartalmaz.

A proteáz hasítási szekvencia jelenléte azért előnyös, mert az a proteázok közreműködése által lehetővé teszi az effektor leválását a találmány szerinti molekuláról. A szétválás különösen előnyös akkor, ha az effektor aktivitását, annak a találmány szerinti molekulához történő közvetlen, vagy összekötő szekvencián keresztül történő közvetett kötődése gátolja.

Mivel proteázok gyulladáshoz vezető régiókban vagy tumorokban különösen nagy mennyiségben fordulnak elő, az effektorok -



amelyek előnyösen, a találmány szerinti molekulához proteáz hasítási szekvencián keresztül kötődve inaktivált állapotban vannak -, nagy mennyiségben szabadulnak fel a fenti helyeken. Ezen felül, a találmány szerinti molekulákat megtervezhetjük úgy, hogy azok megfelelő célstruktúrákkal szemben irányuljanak, például úgy, hogy tumorsejteken található antigénekre, tumor-asszociált endothelsejteken található antigénekre, vagy gyulladásos sejtek - például limfociták vagy makrofágok - felszínén található antigénekre specifikus doménokat tartalmazzanak, miáltal elérhetjük, hogy az effektor hordozó találmány szerinti molekulák például a gyulladás vagy a tumor helyén halmozódjanak fel.

Eljárhatunk továbbá úgy, hogy a találmány szerinti molekulához több effektor kapcsolunk, közvetlenül vagy közvetett módon.

Megfelelő hasítási szekvenciákat tartalmazó proteázok részletes ismertetését találjuk például a DE 1970430.1 számú német szabadalmi leírásban.

A 2. ábrán látható diagramon olyan előnyös találmány szerinti molekulát szemléltetünk, amely effektor is tartalmaz, összekötő szekvencián ("connector sequence"; B) keresztül a molekulához kapcsoltn.

A találmány szerinti molekula egyes összetevőit általánosságban a kívánt alkalmazási területtől függően választjuk meg.

Amennyiben a találmány szerinti molekulát diagnosztikus eszközként kívánjuk alkalmazni, a találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, az első specifitás (A) anali-



zálándó molekulával szemben, a második specificitás (B) - közvetlenül vagy közvetett módon - valamely analittal szemben irányul. Analitként alkalmazhatunk például radioaktív molekulát, fluoreszcens molekulát vagy enzimet, amely enzimatis aktivitása révén, valamely analit prekursorát aktív analittá alakítja.

A találmány egy további előnyös megvalósítási módja szerint, az első specificitás (A) egy analizálandó molekulával szemben irányul, a második specificitás (B) egy másik analizálandó molekulával szemben irányul, és az effektor (E) egy analit, például radioaktív molekula, fluoreszcens molekula vagy enzim, amint azt a fentiekben már részletesebben ismertettük.

A találmány szerinti molekula alkalmazható azonban ligandumként is, virális vagy nem-virális vektor sejt-specifikus kötődésének elérésére. A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, a találmány szerinti molekulát úgy nevezett több-funkciós ligandumként alkalmazzuk. Ebben a vonatkozásban előnyös, ha a peptid (P) és/vagy az effektor (E) fuziogén (fúziót előidéző) peptidet tartalmaz. A több-funkciós ligandum alkalmazásával nukleotid-szekvenciák sejt-specifikus transzfere valósítható meg, és az általában protein, amely célsejt-specifikus ligandumot, génkonstrukció-specifikus ligandumot, és fuziogén peptidet tartalmaz. Ilyen típusú több-funkciós ligandumok alkalmazásával génkonstrukciók - azaz nukleinsav-konstrukciók - specifikus módon megköthetők célsejteken, a fuziogén peptid pedig lehetővé teszi a nukleinsav-konstrukció átjutását a sejtmem-



ráanon keresztül a sejt magjába, valamint annak felszabadulását az endoszómából.

A találmány szerinti molekula vektor-ligandumként vagy több-funkciós ligandumként történő alkalmazásakor előnyösen, az első specifitás (A) célsejttel szemben, a második specifitás (B) pedig vektorral szemben irányul. Vektorként általánosságban nukleinsavat, kationos peptidet vagy proteint, kationos lipidet, kationos peptidet vagy kationos porfirint alkalmazunk. A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, a vektor vírusvektor, például adenovírus (AdV), adeno-asszociált vírus (AAV), vacciniavírus, RSV, HSV, influenzavírus vagy lentivírus eredetű vektor.

Célsejt-specifikus ligandumok, a célsejtek felszínén található membránstruktúrák, immunglobulin eredetű célsejt-specifikus ligandumok és génkonstrukció-specifikus ligandumok, például VH- és VL-doménokat tartalmazó ligandumok, valamint fuziogén sajátosságú peptidek példáinak részletes leírását találjuk a DE 19649645.4 számú német szabadalmi leírásban.

A találmány szerinti molekulák ugyancsak alkalmazhatók megelőzésre és/vagy terápiás hatóanyagokként.

Amennyiben a találmány szerinti molekulákat a fent említett célokra kívánjuk alkalmazni, az első specifitás (A) irányulhat például sejtmembránnal szemben, például limfocitákkal, makrofágokkal, monocitákkal, granulocitákkal, vérképzőrendszeri sejtekkel, endothelsejtekkel, simaizom-sejtekkel, harántcsíktizom-sejtekkel, hámsejtekkel, májsejtekkel, vesesejtekkel, gliasejtekkel, a támasztószövetek



sejtjeivel, tumorsejtekkel vagy leukémiasejtekkel szemben; vagy az extracelluláris mátrix, a komplement-rendszer, a véralvadási rendszer, a kininrendszer, a vérplazma vagy a támasztószövet proteinjeivel szemben; vagy citokinekkal vagy kemokinekkal szemben; vagy endogén vagy exogén toxinokkal szemben; vagy gyógyászati hatóanyagokkal, például digitálisszal szemben; és/vagy kórokozókkal, például bakteriális, virális és/vagy parazita kórokozókkal szemben.

A második specifitás (B) irányulhat például sejtmembránnal szemben, például limfociták, makrofágok, monociták vagy granulociták membránjával szemben, úgy, hogy az utóbbiak és a célstruktúrák közti keresztkötések létrejötte citotoxikus, immunmoduláló vagy gyulladásos folyamatokat indítson el az adott helyen.

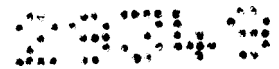
Az irányulhat továbbá citokinekkal, kemokinekkal vagy növekedési faktorokkal szemben, úgy, hogy az utóbbiak és a célstruktúrák közti keresztkötések létrejötte lokális immunmoduláló vagy proliferatív folyamatokat indítson el. Ezen felül, a második specifitás (B) irányulhat a komplement-rendszer proteinjeivel szemben, ami eredményezheti azok aktivációját, vagy aktivitásuk fokozódását vagy gátlódását. A fenti típusú protein és a célstruktúra közti keresztkötés létrejötte - az adott proteintől függően - lokálisan kiválthat gyulladásos és citolitikus, vagy gyulladás-gátló és citoprotektív reakciókat. A B-specifitás irányulhat továbbá az alvadási rendszer proteinjeivel szemben, miáltal az aktiválódhat, vagy annak aktivitása fokozódhat vagy gátlódhat. A fenti típusú protein és a célstruktúra



közti keresztkötés létrejötte - az adott proteintól függően - kiválthat trombózist vagy megelőzheti azt. A fenti specificitás irányulhat továbbá fibrinolitikus proteinekkal szemben, amelyek a fibrinalvadék feloldódását eredményezik a célstruktúrán; enzimekkel szemben, amelyek gyógyászati hatóanyag (drog) inaktív prekursorát aktív - például citotoxikus hatású - hatóanyaggá (droggá) átalakítják át a célstruktúrán; peptidhormonokkal vagy szteroid-hormonokkal szemben; immunglobulin konstans részével szemben; mediátorokkal (átvívő anyagokkal), például hisztaminnal, szerotoninnal, leukotriénnel, prosztaciklinnel vagy kininnel szemben; kórokozókkal, például bakteriális, virális és/vagy parazita kórokozókkal szemben; vagy tumorsejtekkel szemben.

A találmány szerinti molekulákon keresztül keresztkötések hozhatók létre citokin célstruktúrák, vagy monocita, makrofág és/vagy limfocita célstruktúrák, valamint fertőző ágens antigének vagy tumorantigének közt, ezáltal *in vivo* fokozott immunválasz váltható ki az antigénnel szemben. Ebben a vonatkozásban előnyösen úgy járunk el, hogy az adott kórokozó-antigént vagy tumorantigént és - adott esetben - a citokint a találmány szerinti molekulához adjuk, majd a keresztkötések már tartalmazó komplexeket adagoljuk vagy lokálisan injektáljuk.

Az említetteken felül, a második (B) specificitás irányulhat endogén vagy exogén toxinokkal szemben, miáltal elérhetjük, hogy a toxin neutralizálódjon és fagocitálódjon, vagy a célstruktúrán toxikus reakció váltódjon ki. Az irányulhat továbbá gyógyászati hatóanyagokkal, például digitá-



lisszal szemben, ezáltal a gyógyászati hatóanyag komplexszé alakítható, és a szervezetből eltávolítható.

A találmány egy további előnyös megvalósítási módja szerint, a találmány szerinti, effektort is magában foglaló molekula lehetővé teszi keresztkötések kialakítását két azonos vagy eltérő célstruktúra és egy vagy több effektor közt.

Effektorokként alkalmazhatjuk például az alább felsoroltakat: transzmembrán-domént, glikofoszfolipid-horgonyt, receptor ligandumkötő részét, receptor ligandumát vagy a ligandum receptorkötő szekvenciárészletét, peptidhormont, citokint, növekedési faktort, növekedési faktor inhibitort, kemokint, interferont, mediátort, keringésre ható peptidet, gyógyászati hatóanyag inaktív prekursorát aktív hatóanyaggá átalakító enzimet, alvadási folyamatot aktiváló vagy gátló proteint, fibrinolízist aktiváló vagy gátló proteint, a komplement-rendszert aktiváló vagy gátló proteint, immunoglobulin egy vagy több konstans doménját, citotoxikus peptidet; más egy láncú, egy vagy több - előnyösen, két - antigén megkötésére képes antigénkötő molekulát; tumorantigént vagy kórokozó-antigént, például bakteriális antigént vagy virális antigént; cisztein-tartalmú peptidet, miáltal a találmány szerinti molekulákból dimerek képződhetnek; és/vagy dimer- vagy multimer-képző peptideket [Plückthun és Pack: Immunotechnol. 3, 83 (1997)].

A találmány tárgyát képezik továbbá, a találmány szerinti molekulákat kódoló nukleinsavak. A nukleinsav általánosságban, DNS vagy RNS, előnyösen, kettős szálú DNS.



Amennyiben a találmány szerinti expressziós terméket szekretáltatni kívánjuk, a találmány szerinti nukleinsavat úgy állítjuk elő, hogy az 5'-végén szignál- vagy transzmembrán- szekvenciát kódoló nukleotid-szekvenciát tartalmazzon (lásd például DE 19639103.4 vagy DE 19651443.6 számú német szabadalmi leírásokat). Szignál- vagy transzmembrán-szekvenciaként alkalmazhatunk például immunglobulin szignálszekvenciát (a 63-107. DNS-pozíciókat magában foglaló szekvenciát), a CEA szignálszekvenciáját (a 33-134. DNS-pozíciókat magában foglaló szekvenciát), vagy a humán légzőszervi szinciciális vírus glikoprotein szignálszekvenciáját (a 38-50. vagy 48-65. aminosav-szekvencia pozíciókat magában foglaló szekvenciának megfelelő cDNS-t).

A találmány egy további előnyös megvalósítási módja szerint, a találmány szerinti nukleinsav, annak 5'-végén, promótert és/vagy aktivátort tartalmaz. Az aktivátor előnyösen sejttípus-specifikus módon, sejtciklus-specifikus módon, anyagcseretermék-specifikus módon, és/vagy valamely hatóanyag (drog) által kerül aktivált vagy gátolt állapotba. Ilyen típusú aktivátor-szekvenciák, valamint azok kombinációinak leírását találjuk például az alábbi szabadalmi leírásokban: EP 97101507.8 számú európai szabadalmi leírás; DE 19617851.7, DE 19639103.2, DE 19651443.6, DE 19704301.1 számú német szabadalmi leírások; EP 97102547.3 számú európai szabadalmi leírás; és DE 19710643.9 számú német szabadalmi leírás. Különösen előnyösen, a találmány szerinti nukleinsav-konstrukciók a 3. és 4. ábrákon bemutatott struktúrával rendelkeznek.



A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, a találmány szerinti nukleinsav a startkódon 5'-végén GCCACC- vagy GCCGCC- szekvenciát tartalmaz, a transzláció hatékonyságának növelésére.

A találmány tárgyát képezi továbbá, a találmány szerinti nukleinsavat tartalmazó vektor. Ebben a vonatkozásban, vektorként alkalmazhatunk virális vagy nem-virális vektort; előnyösen, nem-virális vektort alkalmazunk, például kationos lipidet, kationos polimert, kationos peptidet vagy kationos porfirint.

A találmány szerinti molekulák előállításához, az említett nukleinsavakat expressziós vektorba - például megfelelő plazmidba - klónozzuk, és alkalmas sejtekbe - például bakteriális, élesztő-, rovar- vagy emlős sejtekbe - juttatjuk; az ily módon transzformált vagy transzfektált sejteket tenyésztjük; és az expressziós terméket izoláljuk. Az ehhez szükséges eljárások szakember számára ismertek, és azok részletes leírását megtaláljuk például Sambrook J. és mtsai. kézikönyvében [Sambrook és mtsai.: "Molecular Cloning: A Laboratory Handbook", 2. kiadás, "Cold Spring Harbor Laboratory Press" (1989)].

A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, ezek a sejtek effektort is tartalmazó találmány szerinti molekulákat expresszálnak, amely effektor előnyösen transzmembrán-domén.

Például, a humán makrofág kolónia-stimuláló faktor transzmembrán-szekvenciáját kódoló DNS-szekvenciát (az 1485-1554. DNS-pozíciókat magában foglaló szekvenciát) vagy



a humán légzőszervi szinciciális vírus (RSV) G-glikoprotein szignál- és transzmembrán-régióját kódoló DNS-szekvenciát (az 1-63. aminosavakat kódoló szekvenciát, vagy annak 38-63. aminosavakat tartalmazó részét kódoló szekvenciát) vagy az influenzavírus neuraminidáz szignál- és transzmembrán-régióját kódoló DNS-szekvenciát (a 7-35. aminosavakat kódoló szekvenciát, vagy annak 7-27. aminosavakat tartalmazó részét kódoló szekvenciát) inszertálhatjuk a promóter-szekvencia és a találmány szerinti molekula DNS-szekvenciája közé, vagy a gén 3'-végére.

Amennyiben a gyógyászati hatóanyagot a találmány szerinti molekulát expresszáló sejtek sejtmembránjába kívánjuk lehorgonyozni, a nukleinsav-konstrukcióba glikofoszfolid-horgonyt kódoló szekvenciát is inszertálhatunk.

Glikofoszfolid-horgonyt rendszerint a találmány szerinti molekulát kódoló nukleotid-szekvencia 3'-végére inszertálunk, és azt a szignálszekvencián felül is inszertálhatjuk a nukleotid-szekvenciába .

Glikofoszfolid-horgonyokat leírtak például a CEA, az N-CAM és más membránproteinek esetében, például a Thy-1-protein esetében.

A fenti transzmembrán-régióknak köszönhetően, az adott sejt a találmány szerinti molekulát a sejtmembránhoz lehorgonyozva expresszálja, miáltal a sejt a találmány szerinti molekula antigénkötő része által felismert célstruktúrákra vagy effektor-struktúrákra specifikus "receptorra" tesz szert.



További előnyösen alkalmazható receptor valamely receptor - például a T-sejt-receptor vagy az M-CSF-receptor - transzmembrán-doménja vagy jelátvivő (szignál-transzdukciós) doménja. Ilyen doménok jelenléte lehetővé teszi, hogy a találmány szerinti molekulát a sejtmembránon expresszáló sejt a célstruktúrákhoz kötődve aktiválódjon, és ezáltal, specifikus funkciókat lásson el. Ilyen típusú specifikus funkciók lehetnek például T-sejtek citotoxikus reakciói, makrofágok és granulociták fagocitózisa, vagy granulociták, monociták és makrofágok exocitózisa.

A már említetteken felül, a találmány tárgyát képezik a találmány szerinti nukleinsavat vagy vektort tartalmazó sejtek, közelebbről, bakteriális, rovar-, élesztő- vagy emlős sejtek. Emlős sejtekként alkalmazhatunk - nukleinsavak expresszáltatására általánosan alkalmazott ismert sejteken felül - például CHO- vagy BHK-sejteket, limfocitákat, makrofágokat, gliasejteket, hámsejteket, májsejteket, vese-sejteket, csontvelősejteket, endothelsejteket, simaizom- vagy harántcsíktizom-sejteket vagy fibroblasztokat.

Génterápiás alkalmazásra az utóbbi sejtek a különösen alkalmasak, mivel ilyen, a találmány szerinti nukleinsav-konstrukciót tartalmazó sejtek betegbe injektálhatók lokálisan vagy parenterálisan, például intravénásan, intraartériásan, valamely testüregbe, szervbe vagy a bőr alá, megelőző vagy terápiás célzattal.

Rendellenességek génterápiás eljárással történő kezelésére azonban a találmány szerinti nukleinsav-konstrukciót közvetlenül is adagolhatjuk a betegnek, lokálisan, valamely



testüregbe, szervbe, a keringési rendszerbe, bőr alá vagy izomba.

Ugyancsak a találmány tárgyát képezik tehát gyógyászati készítmények, amelyek találmány szerinti molekulát, találmány szerinti nukleinsavat, találmány szerinti vektort vagy találmány szerinti sejtet tartalmaznak; valamint diagnosztikus segédeszközök, amely analittal szemben irányuló találmány szerinti molekulát tartalmaznak, a fentiekben részletesen ismertetettek szerint.

A találmány szerinti molekula, találmány szerinti nukleinsav, találmány szerinti vektor vagy találmány szerinti sejt alkalmazható onkológiai kórképek, autoimmun betegségek, gyulladással járó kórképek, vér-rendellenességek - például véralvadási és/vagy keringési rendellenességek -, idegrendszeri rendellenességek és/vagy fertőző betegségek terápiájára, megelőzésére vagy diagnózisára.

Ebben a vonatkozásban, az egyes komponensek megválasztása általánosságban az alkalmazás céljától függ. Az egyes komponenseket az alábbiakban részletesen ismertetjük, és azok alkalmazását konkrét megvalósítási példákon keresztül szemléltetjük.

Találmány szerinti molekulákat előállíthatunk úgy, hogy a találmány szerinti nukleinsav-konstrukció 5'-végét szignálszekvenciát kódoló nukleinsav 3'-végéhez, az utóbbi 5'-végét pedig promóter-szekvencia 3'-végéhez kapcsoljuk.

Promóter-szekvenciaként alkalmazhatunk például olyan promóter- és aktivátor-szekvenciákat, amelyek aktiváló képessége nem korlátozott, például az RNS-polimeráz-III vagy



RNS-polimeráz-II promóterét, a CMV-promótert és/vagy - enhanszert, az SV40-promótert; vagy vírus-promótereket és aktivátor-szekvenciákat, például HBV, HCV, HSV, HPV, EBV, HTLV vagy HIV eredetű ilyen szekvenciákat.

HIV-promóter alkalmazásakor, előnyösen, a teljes, a TAR-szekvenciát is magában foglaló LTR-szekvenciát [a (-453)-(-80.) pozícióknak megfelelő szekvenciát magában foglaló szekvenciát; Rosen és mtsai.: Cell 41, 813 (1985)] alkalmazzuk vírus-specifikus promóterként.

Promóter-szekvenciaként választhatunk olyan promóter- és enhanszer-szekvenciát is, amelyek például anyagcsere-termék-specifikus úton kerülnek aktivált állapotba, például hipoxia hatására aktiválódó enhanszert; vagy alkalmazhatunk olyan promótereket, amelyek sejttípus-specifikus módon aktiválódnak, például a cdc25C-gén promóterét, a cdc25B-gén promóterét, a ciklin-A-gén promóterét, a cdc2-gén promóterét, a B-myb-gén promóterét, a DHFR-gén promóterét vagy az E2F-1-gén promóterét; vagy alkalmazhatjuk sejttípus-specifikus módon előforduló vagy úgy aktiválódó transzkripciósfaktorok kötőszekvenciáit. Ilyen kötőszekvenciák például a c-myc-proteinek kötőszekvenciái. Ezek a kötőszekvenciák az úgy nevezett "Myc E-Box" nukleotid-szekvencia [5'-GGAAGCAGACCACGTGGTCTGCTTCC-3'] monomer vagy multimer formáit tartalmazzák.

A fentiekén felül, promóter-szekvenciaként alkalmazhatunk például tetraciklin jelenlétében aktiválódó promótereket, például a tetraciklin-operátort a megfelelő represzorral kombinálva, vagy választhatunk kiméra promótereket.



Az úgy nevezett "kiméra promóterek" 5'-irányban található sejtspecifikus, anyagcseretermék-specifikus vagy vírus-specifikus módon aktiválódni képes aktivátor-szekvencia, és 3'-irányban található, szupresszor-proteinek számára kötőhelyet tartalmazó CDE-CHR- vagy E2FBS-CHR-nukleotid-szekvenciát hordozó, ezáltal, a sejtciklus G<sub>0</sub>- és G<sub>1</sub>-fázisában az 5'-irányú aktivátor-szekvencia aktiválódását gátolni képes promóteregység kombinációjából állnak [WO 96/06943 számú nemzetközi közzétételi irat; EMBO J. 14, 132 (1995)].

Promóter-szekvenciaként alkalmazhatunk továbbá, sejtspecifikus módon aktiválható promótereket, például, elsősorban meghatározott sejtekben termelődő proteineket kódoló gének promóter- vagy enhanszer-szekvenciáit.

A találmány előnyös megvalósítási módjai szerint, például a következő proteinek promótereit alkalmazhatjuk a felsorolt sejtekben:

Endothelsejtekben aktiválódó promóter- és aktivátor-szekvenciákként alkalmazhatjuk például a felsorolt proteineket kódoló gének génszabályozó szekvenciáit: agyspecifikus endothel glükóz-1-transzporter, endoglin, VEGF-receptor-1 (flt-1), VEGF-receptor-2 (flk-1; KDR), til-1 vagy til-2, B61-receptor (Eck-receptor), B61, endothelin, közelebbről, endothelin-B vagy endothelin-1; endothelin-receptorok; von Willebrand faktor, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1-receptor; vaszkuláris sejt adhéziós molekula (VCAM-1), vagy alkalmazhatunk elsősorban vagy kizárólag endothelsejtekben aktív transzkripciós faktorok megkötésére képes oligomerizálódott kötőhelyekből felépülő szintetikus aktivátor szekvenciákat.



Ilyen transzkripciófaktor a GATA-2, amelynek kötőhelye az endothelin-1-génben az 5'-TTATCT-3' -szekvencia.

Aktivált endothelsejtek szomszédságában található sejtekben aktiválódó promóterek vagy aktivátor-szekvenciák például a következő proteinek kódoló gének génszabályozó szekvenciái: VEGF, amely esetben, a VEGF-gén génszabályozó szekvenciáiként alkalmazhatjuk az 5'-végi határoló régiót, a 3'-végi határoló régiót, a c-Src-gént vagy a v-Src-gént, szteroidhormon-receptorok szekvenciáit és azok promóter-elemeit; és különösen, az egér emlőtumorvírus promótert.

Izomsejtekben, különösen simaizom-sejtekben aktiválódó promóterek vagy aktivátor-szekvenciák például a következő proteinek kódoló gének génszabályozó szekvenciái: tropomiozin,  $\alpha$ -aktin,  $\alpha$ -miozin, PDGF-receptor, FGF-receptor, MRF-4, foszfofruktokináz-A, foszfoglicerát mutáz, troponin-C, miogeninek, endothelin-A-receptor, dezmin, VEGF (lásd fent), "mesterséges" promóterek, vagy izomspecifikus transzkripciófaktorok promóterei, például a "hélix-loop-hélix" (HLH) családba tartozó faktorok (MyoD, Myf-5, miogeninek, MRF4) promóterei vagy a GATA-4 cinkujj-protein promótere.

A HLH-proteinek és a GATA-4 nem csak izomspecifikus gének promóterei esetében eredményez izomspecifikus transzkripciót, hanem heterológ környezetben is, és mesterséges promóterek esetében is. Ilyen típusú mesterséges promóterek például, az izomspecifikus HLH-proteinek DNS-kötőhelyének több kópiájából, például az "E box" -elemből (MyoD) (például 4x AGCAGGTGTTGGGAGGC -szekvenciából) felépülő promóte-



rek; vagy az  $\alpha$ -miozin nehéz lánc gén GATA-4 DNS-kötőhelyének több kópiájából felépülő promóterek (például 5'-GGCCGATGGGCAGATAGAGGGGGCCGATGGGCAGATAGAGG-3').

Gliasejtekben aktiválódó promóterekként és aktivátor szekvenciákként, például a következő proteinek kódoló gének génszabályozó szekvenciái alkalmazhatjuk: a Schwann-sejt-specifikus periaxin-protein; glutamin szintetáz; a gliasejt-specifikus protein (glia fibrilláris savas protein, "glial fibrillary acid protein"; GFAP); az S100b-jelzésű gliasejt-protein; IL-6, CNTF; 5-HT-receptorok; TNF $\alpha$ ; IL-10; 1. és 2. inzulinszerű növekedési faktor receptorok; vagy VEGF (lásd fent).

Vérképzőrendszeri sejtekben aktiválódó promóterekként és aktivátor szekvenciákként, például vérképzőrendszeri sejtekben vagy azokkal szomszédos sejtekben - például sztrómasejtekben - expresszálandó citokineket vagy azok receptorait kódoló gének ilyen szekvenciáit alkalmazzuk.

Ilyen szekvenciák például a következő citokineket és azok receptorait kódoló gének promóter-szekvenciái: törzssejt-faktor-receptor; törzssejt-faktor; IL-1 $\alpha$ ; IL-1-receptor; IL-3; IL-3-receptor ( $\alpha$ -alegység); IL-3-receptor ( $\beta$ -alegység); IL-6; IL-6-receptor; GM-CSF; GM-CSF-receptor ( $\alpha$ -lánc); 1. interferon szabályozó faktor ("interferon regulatory factor 1"; IRF-1), ahol az IRF-1-promótere ugyanolyan mértékben aktiválódik IL-6 által, mint IFN $\gamma$  vagy IFN $\beta$  által; eritropoetin; valamint eritropoetin-receptor.

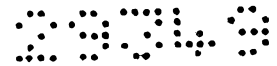
Limfocitákban és/vagy makrofágokban aktiválódó promóterekként és aktivátor-szekvenciákként, például citokine-



ket, citokin-receptorokat, adhéziós molekulákat és ellenanyagok Fc-fragmentumának receptorait kódoló gének promótereit és aktivátor-szekvenciáit alkalmazzuk, például a felsorolt proteinekét: IL1-receptor; IL-1 $\alpha$ ; IL-1 $\beta$ ; IL-2; IL-2-receptor; IL-3; IL-3-receptor ( $\alpha$ -alegység); IL-3-receptor ( $\beta$ -alegység); IL-4; IL-4-receptor; IL-5, IL-6; IL-6-receptor; 1. interferon szabályozó faktor (IRF-1), ahol az IRF-1-promótere ugyanolyan mértékben aktiválódik IL-6 által; IFN- $\gamma$ -érzékeny promóter; IL-7; IL-8; IL-10; IL-11; IFN $\gamma$ ; GM-CSF; GM-CSF-receptor ( $\alpha$ -lánc); IL-13; LIF; makrofág kolónia stimuláló faktor (M-CSF) receptor; makrofágok 1. és 2. típusú "scavenger" (eltakarító funkciójú) receptorai; MAC-1 (leukocita funkció asszociált antigén); LFA-1 $\alpha$  (leukocita funkció-asszociált antigén); vagy p150,95 (leukocita funkció asszociált antigén).

Szinoviális sejtekben aktiválódó promóterekként és aktivátor-szekvenciákként alkalmazhatjuk például a következő proteineket kódoló gének promóter-szekvenciáit: mátrix-metalloproteinázok (MMP), például MMP-1 (intersticiális kollagenáz); MMP-3 (stromelizin/tranzin); metalloproteinázok szöveti inhibitorai ("tissue inhibitors of metalloproteinases", TIMP) például TIMP-1, TIMP-2 és TIMP-3.

Leukémiasejtekben aktiválódó promóterekként és aktivátor-szekvenciákként alkalmazhatjuk például a felsorolt proteineket kódoló gének promótereit: HPS-70; bcl-1/ciklin-D-1; bcl-2; IL-6; IL-10; TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ ; HOX-11; BCR-Abl; E2A-PBX-1; PML-RAR (promielocitás leukémia retinolsav-receptor) vagy a c-myc-et, ahol a c-myc-proteinek a "Myc-E-box" elne-



vezésű nukleotid-szekvencia [5'-GGAAGCAGACCAGCTGGTCTGCTTCC-3'] multimer formáihoz kötődnek, és ott fejtik ki aktiváló hatásukat.

Tumorsejtekben aktiválódó promóterekként vagy aktivátor-szekvenciákként alkalmazhatunk például tumorsejtekben képződő vagy ott aktivitást kifejtő transzkripciós faktorokkal kölcsönhatásba lépő génszabályozó nukleotid-szekvenciákat.

A találmány szerinti megoldással összhangban, a fenti vonatkozásban, promóterekként vagy aktivátor-szekvenciákként előnyösen, olyan génszabályozó szekvenciákat vagy gényelemeket alkalmazunk, amelyek elsősorban karcinóma-sejtekben vagy szarkóma-sejtekben termelődő proteineket kódoló génekből származnak. Például, kis sejtes hörgőkarcinómák esetében előnyösen, az N-CAM-protein promóterét, petefészek-karcinómák esetében a hepatitisz növekedési faktor receptor vagy az L-plasztin promóterét, hasnyálmirigy-karcinómák esetében az L-plasztin vagy a polimorf epithelialis mucin (PEM) promóterét alkalmazzuk.

A találmány szerinti megoldás figyelemre méltó előnye, hogy az egyes összetevők kapcsolódásának módja a heterodimer-asszociációnak kedvez, úgy, hogy túlnyomórészt egy láncú, több antigénkötő helyet tartalmazó molekulák jönnek létre. Továbbá, a dimerek disszociációjával is kisebb mértékben kell számolnunk, amint azt az scFv-fragmentumok esetében láttuk [lásd például Glockshuber és mtsai.: *Biochem.* 29, 1362 (1990)]. A találmány szerinti molekulákat tehát egyszerűbben, és homogénebb formában állít-



hatjuk elő, mint az úgy nevezett "dimerizálódó bispecifikus antitest-fragmentumokat" ("diabodies"), még akkor is, ha az utóbbiak diszulfid-hidakkal vannak stabilizálva, vagy úgy nevezett "gomb a gomlyukba" ("knob into hole") típusú bispecifikus antitest-fragmentumok.

Ezen felül, a találmány szerinti molekulák előállításához csak egyetlen szignálszekvenciát és egy riboszómakötőhelyet (RBS) kell alkalmaznunk. Ezzel szemben, a "dimerizálódó bispecifikus antitest-fragmentumok" esetében mindegyik lánc kódoló szekvenciájához egy-egy szignálszekvenciát és riboszómakötőhelyet kell kapcsolnunk. A találmány szerinti megoldás további előnye, hogy a találmány szerinti molekulák expresszáltatása esetében, ekvimoláris arányban termelődnek az egyes variábilis doménok, míg a "dimerizálódó bispecifikus antitest-fragmentumok" két láncának expresszáltatásakor előfordulhat, hogy a két lánc nem ekvimoláris mennyiségben termelődik, ami ahhoz vezet, hogy megnövekszik a funkcióképtelen homodimerek aránya.

A találmány szerinti molekulák további előnye, hogy azok egyszerűen és funkcionális formában expresszáltathatók baktériumokban, élesztőkben, baculovírusokkal és eukarióta sejtekben egyaránt. Továbbá, azok szekretáltatásán felül, azok sejtekben, vagy membránokkal asszociálódva is expresszáltathatók [lásd például Biocca & Cattaneo: Trends Cell Biol. 5, 248 (1995)].

A találmány szerinti molekulák további előnyös sajátága, hogy azok hasonlóképp a "dimerizálódó bispecifikus antitest-fragmentumokhoz", széles körben alkalmazhatók di-



agnosztikus célra, valamint gyógyászati hatóanyagokként, különböző rendellenességek megelőzésére és/vagy terápiájára.

Az effektor géneket és promóter-szekvenciákat a kívánt alkalmazásnak megfelelően, és a transzdukálható célsejt figyelembe vételével választjuk meg. Különböző rendellenességekben alkalmazható promóter-szekvenciák és effektor gének lehetséges kombinációit ismertetjük az alábbiakban.

#### Tumorterápia

Tumorterápia célsejtjeit képezhetik proliferálódó endothelsejtek, vagy az endothelsejtek szomszédságában található sztrómasejtek és izomsejtek, vagy tumorsejtek vagy leukémia-sejtek; a fenti vonatkozásban, promóterként alkalmazhatunk endothelsejt-specifikus és sejtciklus-specifikus, vagy sejtspecifitást nem mutató, vagy izomsejt-specifikus és sejtciklus-specifikus, vagy tumorsejt-specifikus (szolid tumor vagy leukémia specifikus) és sejtciklus-specifikus promótereket; effektorokként pedig, például a felsorolt gének valamelyikét: sejtproliferáció-gátlókat kódoló géneket, például a retinoblasztóma proteint (pRb=p110) vagy az azzal rokon p107- és p130- proteineket kódoló géneket. A retinoblasztóma-protein (pRb=p110) és az azzal rokon p107- és p130- proteinek foszforlieződés révén inaktiválódnak. Előnyösen, a fenti sejtciklus-gátlók olyan génváltozatait alkalmazzuk, amelyek az expresszált protein inaktivációs helyének megfelelően mutációt hordoznak, anélkül, hogy a változtatás az említett inhibitorok működését hátrányosan érintené. Ilyen mutációkat a p110-protein esetében már le-



írtak. A p107- vagy p130-protein DNS-szekvenciájában hasonló módon hozhatunk létre mutációkat. Alkalmazhatjuk továbbá a p53-protein génjét is. A p53-protein a sejtben specifikus proteinekhez, például MDM2-proteinhez történő kötődés révén inaktiválódik, vagy úgy, hogy a p53-protein a defoszforilezett C-terminális szerinen keresztül oligomerizálódik. Előnyösen tehát, a p53-protein olyan kódoló DNS-szekvenciáját alkalmazzuk, amely a C-terminusnál, a 392. pozícióban található szerinnél csonkított. Az említetteken felül, alkalmazhatjuk még a p21- (WAF-1-) proteint, a p16-proteint, más *cdk*-gátlókat, a GADD45-proteint vagy a *bak*-proteint kódoló géneket.

Véralvadást (koagulációt) kiváltó faktorok és/vagy angiogenezis-gátlók génjeiként alkalmazhatjuk például az plazminogén aktivátor inhibitor 1 ("*plasminogen activator inhibitor 1*", PAI-1), PAI-2, PAI-3, angiosztatin, interferonok (például IFN $\alpha$ , IFN $\beta$  vagy IFN $\gamma$ ), vérlemezke faktor 4, IL-12, TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3, leukémia gátló faktor ("*leukemia inhibitory factor*", LIF) vagy szöveti faktor ("*tissue factor*", TF) génjeit; valamint azok aktív, koagulációt kiváltó fragmentumait kódoló szekvenciákat.

Alkalmazhatunk továbbá citosztatikus vagy citotoxikus proteineket, például perforint; granzimot (fragmentint); IL-2-, IL-4- vagy IL-12-interleukint; interferonokat, például IFN $\alpha$ -, IFN $\beta$ -, IFN $\gamma$ -interferont; TNF-faktort, például TNF $\alpha$ - vagy TNF $\beta$ -faktorokat; onkosztatin-M-t szfingomileináz, magainint vagy magainin-származékokat kódoló géneket.



Gyulladás-keltőket kódoló génekként alkalmazhatjuk például a felsorolt proteineket kódoló géneket: IL-1, IL-2, RANTES (MCP-2), monocita kemotaktikus és aktiváló faktor ("monocyte chemotactic and activating factor"; MCAF), IL-8, makrofág gyulladásos protein 1. ("macrophage inflammatory protein 1"; MIP-1 $\alpha$ , - $\beta$ ), neutrofil aktiváló protein 2. ("neutrophil activating protein-2"; NAP-2), IL-3, IL-5, humán leukémia gátló faktor ("leukemia inhibitory factor"; LIF), L-7, IL-11, IL-13, GM-CSF, G-CSF, M-CSF, kobraméreg faktor ("cobra venom factor"; CVF) vagy a CVF C3b-faktornak funkcionálisan megfelelő szekvenciái, azaz, annak olyan szekvenciái, amelyek képesek B-komplementfaktorhoz kötődni, és D-faktor által történő hasítást követően C3-konvertáz-ként funkcionálni; humán C3-komplementfaktor vagy annak C3b-szekvenciárésze; humán C3-komplementfaktor CVF-faktorhoz funkcionálisan és strukturálisan hasonló hasítási termékei; vagy komplement-aktiváló vagy gyulladás-keltő bakteriális proteinek, például *Salmonella typhimurium* porinjai, *Staphylococcus aureus* plazmaagglutinációs ("clumping") faktorok, Gram-negatív baktériumokból származó modulinok, legionellák, B-típusú *Haemophilus influenzae* vagy klebsiellák fő külső membrán-proteinjei vagy G-csoportú *Streptococcus* M-molekulái.

Alkalmazhatjuk továbbá, citosztatikumok prekursorait aktiváló enzimek génjeit, például inaktív prekursorokat ("prodrugokat") aktív citosztatikus hatóanyagokká (drugokká) hasító enzimek génjeit. Ilyen típusú vegyületek, és azoknak megfelelő prodrugok és drugok átfogó ismertetését



megtaláljuk például az alábbi szakirodalmi helyeken: Deonarain és mtsai.: Br. J. Cancer 70, 786 (1994); Mullen: Pharmac. Ther. 63, 199 (1994); valamint Harris és mtsai.: Gene Ther. 1, 170 (1994). Alkalmazhatjuk például a következő enzimek valamelyikét kódoló DNS-szekvenciát: *Herpes simplex* vírus timidin kináz; *varicella zoster* vírus timidin kináz; bakteriális nitroreduktáz; bakteriális  $\beta$ -glukuronidáz; *Secale cereale* növényből származó  $\beta$ -glukuronidáz; humán  $\beta$ -glukuronidáz; humán karboxipeptidáz (CB), például hízósejt-CB-A, hasnyálmirigy eredetű CB-B vagy bakteriális karboxipeptidáz; bakteriális  $\beta$ -laktamáz; bakteriális citozin dezamináz; humán kataláz vagy peroxidáz; foszfatázok, például humán alkalikus foszfatáz, humán prosztata savas foszfatáz, vagy 5. típusú savas foszfatáz; oxidázok, például humán lizil oxidáz vagy humán D-aminosav oxidáz, előnyösen, humán glutation peroxidáz, humán eozinofil peroxidáz vagy humán thyroid peroxidáz;  $\beta$ -galaktozidáz vagy  $\alpha$ -galaktozidáz. Különösen jelentőséggel bír a  $\beta$ -galaktozidáz génje, mivel az általa kódolt enzim a daunomycin  $\beta$ -D-galaktopiranozid drogot citosztatikus hatású daunomycinné képes átalakítani.

#### Autoimmun betegségek és gyulladások terápiája

Autoimmun betegségek és gyulladások kezelésének célsejtjeit képezhetik például proliferálódó endothelsejtek makrofágok, és/vagy limfociták vagy szinoviális sejtek; a fenti vonatkozásban, promóterként alkalmazhatunk például endothelsejt-specifikus és sejtciklus-specifikus, vagy makrofág- és/vagy limfocita-specifikus és/vagy sejtciklus-



specifikus; vagy szinoviális sejt specifikus és/vagy sejt-ciklus-specifikus promótereket; effektorokként pedig, például az alábbi gének valamelyikét.

Allergiás betegségek terápiájára alkalmazhatjuk például a felsorolt proteinek génjeit: IFN- $\beta$ ; IFN- $\gamma$ ; IL-10; IL-4-faktorral szembeni ellenanyagok és ellenanyag-fragmentumok; szolúbilis IL-4-receptorok; IL-12; vagy TGF $\beta$ .

Transzplantált szervek kilökődésének megakadályozására alkalmazhatjuk például az alább felsorolt proteinek valamelyikét kódoló géneket: IL-10; TGF $\beta$ ; szolúbilis IL-1-receptorok; szolúbilis IL-2-receptorok; IL-1-receptor-antagonisták; vagy szolúbilis IL-6-receptorok.

Ellenanyag által közvetített autoimmun betegségek kezelésére, strukturális génekként alkalmazhatók például a következő proteinek génjei: TGF $\beta$ ; IFN $\alpha$ ; IFN $\beta$ ; IFN $\gamma$ ; IL-12; szolúbilis IL-4-receptorok; szolúbilis IL-6-receptorok; immunszupresszív ellenanyagok vagy azok V<sub>H</sub>- és V<sub>L</sub>- domén tartalmú fragmentumai.

Sejt által közvetített autoimmun betegségek kezelésére alkalmazhatjuk például az alábbi proteinek génjeit: IL-6; IL-9; IL-10; IL-13; TNF $\alpha$  vagy TNF $\beta$ ; IL-13; immunszupresszív ellenanyagok vagy azok V<sub>H</sub>- és V<sub>L</sub>-domént tartalmazó fragmentumai.

Sejtproliferáció-gátlókat, citosztatikus vagy citotoxikus proteineket, valamint citosztatikus hatóanyagok prekursorait citosztatikumokká aktiváló enzimeket a fentiekben már részletesen ismertettünk.



Artritisz kezelésére, strukturális génekként olyan géneket alkalmazunk, amely alapján expresszálandó protein, közvetlenül vagy közvetett módon, gátolja a gyulladást, például az ízületekben; és/vagy elősegíti az extracelluláris mátrix (porc, kötőszövet) helyreállítását az ízületekben.

Ilyen proteinek például a következők: IL-1-receptor-antagonista (IL-1-RA), mivel az IL-1-RA gátolja az IL-1 $\alpha$  és - $\beta$  képződését; szolúbilis IL-1-receptor, mivel az IL-1-hez kötődik és inaktiválja azt; IL-6, mivel az fokozza a TIMP és a szuperoxidok szekrécióját, emellett, a szinoviális sejtekben és porcsejtekben csökkenti az IL-1 és TNF $\alpha$  szekrécióját; szolúbilis TNF-receptor, mivel az TNF-hez kötődik és inaktiválja azt; IL-4, mivel az gátolja az IL-1, TNF $\alpha$  és MMP képződését és szekrécióját, viszont növeli a TIMP szekrécióját; inzulin-szerű növekedési faktor ("insulin-like growth factor"; IGF-1), mivel az IGF-1 stimulálja az extracelluláris mátrix szintézisét; TGF $\beta$ , elsősorban TGF1 és TGF $\beta$ 2, mivel a TGF $\beta$  stimulálja az extracelluláris mátrix szintézisét, szuperoxid diszmutáz vagy TIMP-proteinek, például TIMP-1, TIMP-2 vagy TIMP-3.

#### Vérképzőrendszeri rendellenességek terápiája

Rendellenes vérsejt-képződés terápiájának célsejtjeit képezhetik például, proliferálódó éretlen vérképzőrendszeri sejtek vagy a vérképzőrendszeri sejtekkel szomszédos sztrómasejtek; promóterként alkalmazhatunk például vérképzőrendszeri sejtekre specifikus és/vagy sejtspecifikus promótereket; vagy sejtspecifitást nem mutató és sejtciklus-



specifikus promótereket; effektorokként pedig alkalmazhatjuk például a következő gének promótereit: anémia terápiájára alkalmazhatjuk például az eritropoetin génjét.

Leukopénia terápiájára effektorgénként alkalmazhatjuk a G-CSF, GM-CSF vagy M-CSF génjét.

Trombocitopénia terápiája esetén alkalmazható gének például az IL-3, leukémia gátló faktor (LIF), IL-11 vagy trombopoetin génjei.

#### Idegrendszeri rendellenességek terápiája

Idegrendszeri károsodások terápiájának célsejtjei lehetnek például gliasejtek vagy proliferálódó endothelsejtek; promóterként alkalmazhatunk például gliasejt-specifikus és sejt-specifikus, vagy endothelsejt-specifikus és sejtciklus-specifikus; vagy sejt-specifitást nem mutató és sejtciklus-specifikus promótereket; effektorként pedig a következő géneket.

Alkalmazhatjuk neuronális növekedési faktorok génjeit, például a következő proteinek génjeit: FGF; ideg növekedési faktor ("nerve growth factor", NGF); agy eredetű neurotróf faktor ("brain-derived neurotrophic factor", BDNF); neurotrofin-3 ("NT-3"); neurotrofin-4 (NT-4); vagy ciliáris neurotróf faktor ("ciliary neurotrophic factor", CNTF).

Enzimeket kódoló génekként alkalmazhatjuk például a tirozin hidroxiláz vagy dopa dekarboxiláz génjét.

Citokineket és azok olyan gátlószereit kódoló génekként, amelyek gátolják vagy neutralizálják a TNF $\alpha$  neurotoxikus hatását, alkalmazhatjuk például az alábbi proteinek



génjeit: TGF $\beta$ , szolúbilis TNF-receptorok, mivel a TNF-receptorok neutralizálják a TNF $\alpha$ -faktort; IL-10, mivel az gátolja az IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-2 és IL-4 képződését; szolúbilis IL-1-receptorok, például az I. IL-1-receptor vagy II. IL-1-receptor, mivel a szolúbilis IL-1-receptorok neutralizálják az IL-1 aktivitását; IL-1-receptor-antagonisták; vagy szolúbilis IL-6-receptorok.

#### A véralvadási rendszer vagy keringési rendszer ellenességeinek terápiája

A véralvadási rendszert vagy keringési rendszert érintő rendellenességek terápiájának célsejtjeit képezhetik például endothelsejtek, proliferálódó endothelsejtek, az endothelsejtek szomszédságában található szomatikus sejtek, valamint simaizomsejtek vagy makrofágok; promóterként alkalmazhatunk például sejtspecifitást nem mutató és sejtciklus-specifikus, vagy endothelsejt-specifikus, simaizomsejt-specifikus vagy makrofág-specifikus promótereket; effektorokként pedig a következő géneket:

Véralvadást gátló vagy fibrinolízist elősegítő géneként alkalmazhatjuk például a felsorolt proteineket kódoló géneket: szöveti plazminogén-aktivátor ("tissue plasminogen activator", tPA); urokináz-típusú PA ("urokinase-type plasminogen activator", uPA); vagy a tPA és uPA hibridjei; protein-C; hirudin, szerin proteínáz gátlók (szerpinek); például C-1S-inhibitor;  $\alpha$ 1-antitripszin vagy antitrombin-III; vagy szöveti faktor reakcióút inhibitor ("tissue factor pathway inhibitor", TFPI).



Alkalmazhatjuk véralvadást elősegítő proteinek génjeit, például az alábbi faktorok génjeit: VIII- és IX- faktorok; "von Willebrand"-faktor; XIII-faktor; PAI-1; PAI-2; vagy szöveti faktor; valamint a fentiek fragmentumait kódoló szekvenciákat.

Angiogenesis-faktorok génjeiként alkalmazhatjuk például a VEGF vagy FGF-géneket.

Alkalmazhatjuk továbbá vérnyomás-csökkentő peptidek génjeit, például kallikrein vagy az endothelsejtekben termelődő "nitrogén-oxid szintetáz" génjét.

Az endothelréteg károsodását követően bekövetkező simaizomsejt-proliferációt gátolni képes proteinek génjeiként alkalmazhatjuk például antiproliferatív proteinek génjeit; citosztatikus vagy citotoxikus protein génjeit; vagy - a fent leírtak szerint -, valamely citosztatikum prekursorát citosztatikummá hasító enzim génjét; vagy a fenti gyógyászati hatóanyagok valamelyike és valamely ligandum - például simaizomsejtekre specifikus ellenanyag fragmentum - alkotta fúziós protein génjét.

Alkalmazhatjuk továbbá egyéb vérplazma-proteinek génjeit, például albumint, C1-inaktivátort, szérum-kolineszterázt, transferrint vagy  $\alpha$ 1-antitripszin kódoló géneket.

#### Fertőző betegségek megelőzése és/vagy terápiája

Amennyiben fertőzések megelőzése vagy kezelése a cél, a célsejtek lehetnek izomsejtek vagy makrofágok és/vagy limfociták; promóterként alkalmazhatunk például sejtspecifitással nem rendelkező és sejtciklus-specifikus, vagy célsejt-specifikus és sejtciklus-specifikus promótereket;



effektorként pedig fertőző betegségek megelőzésére alkalmazott proteinek génjeit.

Aktív összetevőként, valamely fertőző kórokozó által termelt proteint kódoló DNS-t választunk, amely immunreakció kiváltásán keresztül - azaz ellenanyag-kötődés és/vagy citotoxikus T-limfociták reakciójának kiváltásán keresztül - a kórokozó neutralizálását és/vagy elpusztítását eredményezi. Ilyen típusú, úgy nevezett neutralizáló antigéneket már alkalmaznak vakcina-antigénekként [lásd például, Ellis: Adv. Exp. Med. Biol. 327, 263 (1992)].

A találmány szerinti megoldással összhangban, aktív összetevőként előnyösen, például a következő kórokozókból származó neutralizáló antigéneket kódoló nukleinsavakat alkalmazunk: influenza-A-vírus, HIV, veszettségvírus, HSV (*Herpes simplex virus*), RSV ("respiratory syncytial virus"), parainfluenza vírus, rotavírus, VZV (*varicella zoster virus*), CMV (citomegalovírus-), kanyaróvírus, HPV (humán papillómavírus), HBV (hepatitisz-B-vírus), HCV (hepatitisz-C-vírus), HDV (hepatitisz-D-vírus), HEV (hepatitisz-E-vírus), HAV (hepatitisz-A-vírus), *Vibrio cholerae*, *Borrelia burgendorfi*, *Helicobacter pylori*, vagy malária antigént.

A fenti vonatkozásban, ilyen típusú aktív összetevőként ugyancsak alkalmazhatók anti-idiotípus ellenanyagokat vagy azok ellenanyagkötő fragmentumait kódoló DNS-ek, amely ellenanyagok antigénkötő struktúrái (azaz, komplementeritást meghatározó régiói) a fertőző organizmus neutralizáló



antigénje protein- vagy szénhidrát-struktúráinak kópiáit képviselik (lásd fent).

Ilyen típusú anti-idiotípus ellenanyagok és azok hasítási termékei elsősorban bakteriális kórokozók szénhidrát-antigénjeit helyettesíthetik, azokra vonatkozó összefoglalót találunk például az alábbi szakirodalmi helyeken: Hawkins és mtsai.: *J. Immunother.* 14, 273 (1993); valamint Westerink és Apicella: *Springer Seminars in Immunopathol.* 15, 227 (1993).

Effektorokként alkalmazhatjuk továbbá "tumorvakcinák" génjeit. Ezek, tumorsejteken található antigéneket kódolnak; azok átfogó ismertetését megtaláljuk például a következő szakirodalmi helyeken: Sedlacek és mtsai.: *Contrib. to Oncol.* 32, Karger Verlag, München (1988); valamint *Contrib. to Oncol.* 43, Karger Verlag, München (1992).

Ezen felül, effektorokként alkalmazhatjuk az alábbi antigének vagy anti-idiotípus ellenanyagok génjeit: szialil-Lewis-antigén; tumorsejteken található, T-limfociták által felismert peptidek; onkogének által expresszált proteinek, vércsoport-antigének és azok prekursorai, polimorf epitheliális mucin antigénjei, vagy hősokkproteinek antigénjei.

Krónikus fertőző betegségek terápiájának célsejtjeit képezhetik például májsejtek, limfociták és/vagy makrofágok, epithelsejtek vagy endothelsejtek; promóterként alkalmazhatunk például vírus-specifikus vagy sejtspecifikus és sejtciklus-specifikus promótereket; effektorokként pedig a következő géneket:



Alkalmazhatunk például citosztatikus, apoptotikus vagy citotoxikus hatású proteineket kódoló géneket; vagy antivirális vagy citotoxikus hatóanyag prekursorát aktív hatóanyaggá hasítani képes enzimeket kódoló géneket.

Antivirális proteineket, például antivirális hatású citokineket kódoló génekként alkalmazhatjuk például a felsorolt proteineket kódoló géneket: IFN- $\alpha$ ; IFN- $\beta$ ; IFN- $\gamma$ ; TNF $\beta$ ; TNF $\alpha$ ; IL-1 vagy TGF $\beta$ ; vagy alkalmazhatjuk az adott vírust inaktiváló specifitású ellenanyagok génjeit, vagy azok V<sub>H</sub>- és V<sub>L</sub>-domént tartalmazó fragmentumait kódoló, vagy a fent ismertetettek szerint, azok linkerrel összekapcsolt V<sub>H</sub>- és V<sub>L</sub>-fragmentumait kódoló géneket. Vírusantigénekkal szemben irányuló ellenanyagokként alkalmazhatunk például anti-HBV; anti-HCV; anti-HSV; anti-HPV; anti-HIV; anti-EBV; anti-HTLV; anti-Coxsackievírus; vagy anti-hantavírus ellenanyagokat.

További vírusellenes hatású proteinek rev-kötőproteinek. Ezek a proteinek a rev-RNS-hez kötődnek, és gátolják a retrovírus génexpresszió rev-függő poszt-transzkripció fázisait. Rev-kötő proteinek például a következők: RBP9-27; RBP1-8U; RBP1-8D; valamint az RPB1-8 pszeudogénjei.

A már említetteken felül, alkalmazhatunk antibakteriális proteineket kódoló géneket, például bakteriális toxinokat neutralizáló vagy baktériumokat opszonizáló ellenanyagokat kódoló géneket. Ilyen ellenanyagokat kódoló gének például a következő kórokozókkal szemben irányuló ellenanyagok génjei: C- és B- csoportú meningococcusok; *E. coli*;



*Borrelia; Pseudomonas; Helicobacter pylori;* vagy *Staphylococcus aureus.*

A találmány szerinti megoldást a továbbiakban a csatolt ábrákon és konkrét megvalósítási példákon keresztül kívánjuk szemléltetni, anélkül azonban, hogy igényünket az ismertettekre korlátoznánk.

Az alábbiakban röviden ismertetjük a leírásokhoz csatolt ábrákat.

Az 1. ábrán egy láncú, két antigénkötő hely kialakítására képes molekula struktúráját ábrázoltuk vázlatosan.

A 2. ábrán bemutatott diagramon egy láncú, két antigénkötő hely kialakítására képes, effektort is tartalmazó molekula struktúráját ábrázoltuk vázlatosan.

A 3. és 5. ábrákon látható diagramokon egy láncú, két antigénkötő hely kialakítására képes molekulát kódoló nukleinsav-konstrukciókat ábrázoltunk.

A 4. ábrán látható diagramon egy láncú, két antigénkötő hely kialakítására képes, effektort is tartalmazó molekulát kódoló nukleinsav-konstrukciót ábrázoltunk.

Az 6. ábrán látható grafikonon, találmány szerinti egy láncú, két antigénkötő hely kialakítására képes protein (csDb-CEAGal), valamint CEA és *E. coli*  $\beta$ -galaktozidáz elleni "dimerizálódó bispecifikus antitest-fragmentumok" ("diabodies"; CEAGal)  $\beta$ -galaktozidáz-koncentráló képességét hasonlítottuk össze, műanyagfelszínhez kötött CEA-antigén alkalmazásával. Negatív kontrollként, BSA-val bevont mikro-titráló lemezeket alkalmaztunk.



A 7. ábrán látható grafikonon, emlős sejtekkel szekretáltatott scDb-CEAGal-molekulák által CEA-antigénnel bevont mikrotitráló lemezekon koncentrált  $\beta$ -galaktozidáz mennyiségét ábrázoltuk, különböző mennyiségű scDb-CEAGal és  $\beta$ -galaktozidáz alkalmazása mellett. Szubsztrátként o-nitro-fenil- $\beta$ -D-galaktopiranozidot alkalmaztunk. Negatív kontrollként, BSA-val bevont mikrotitráló lemezek szolgáltak.

A 8.A ábrán LoVo-sejtek pusztulását ábrázoltuk, a táplálék szerinti egy láncú, két antigénkötő hely kialakítására képes protein (scDb),  $\beta$ -galaktozidáz ( $\beta$ -Gal), daunomycin  $\beta$ -D-galaktopiranozid (prodrug) és/vagy daunomycin (drog) jelenlétében.

A 8.B ábrán CEA-negatív sejtvonal (A549) alkalmazásával végzett kontroll kísérlet eredményeit szemléltettük.

### 1. példa

Egy láncú, két antigénkötő hely kialakítására képes protein előállítás, és expresszáltatása baktériumokban

Az egy láncú, két antigénkötő hely kialakítására képes protein előállítását a karcinoembrionális antigén (CEA) és *E. coli*  $\beta$ -galaktozidázt felismerő protein előállításán keresztül szemléltetjük.

A következő DNS-szekvenciákat kapcsoltuk össze, 5'-3'-irányba haladva:

LacZ-promóter;

bakteriális riboszómakötő struktúra (AAGGAG);

bakteriális peIB-szignálszekvencia [Power és mtsai.: Gene 113, 95 (1992)];



anti-CEA-ellenanyag VH-doménja [Kontermann és mtsai.: Immunotechnol. 3, 137 (1997)];

linker: GGGS [Kontermann és mtsai.: (1997)];

anti- $\beta$ -galaktozidáz ellenanyag VL-doménja [Kontermann és mtsai.: (1997)];

kapcsoló peptid (P): GGGSGGRASGGGGS;

anti- $\beta$ -galaktozidáz ellenanyag VH-doménja [Kontermann és mtsai.: (1997)];

linker: GGGGS;

anti-CEA-ellenanyag VL-doménja [Kontermann és mtsai.: (1997)];

9E10-ellenanyag Myc-epitópja: EQKLISEEDLN [Munro & Pelham: Cell 46, 291 (1986)];

polihisztidin: HHHHHH, az IMAC-eljárással (immobilizált fém-affinitásos kromatográfiával; "immobilized metal affinity chromatography") történő tisztításhoz [Kontermann és mtsai.: (1997)].

A konstrukció egyes összetevőit megfelelő restriktációs helyek alkalmazásával végeztük, amelyeket PCR-amplifikációval hoztunk létre a különböző DNS-szekvenciák végein [Kontermann és mtsai.: Immunotechnol 3, 137 (1997)].

Az összekapcsolást az egyes restriktációs helyekre specifikus, szakember számára ismert enzimek, és DNS-ligázok alkalmazásával végeztük. Ezek az enzimek a kereskedelemben hozzáférhetők. A konstrukciót pAB1-jelzésű bakteriális expressziós vektorba klónoztuk [Kontermann és mtsai.: (1997)].



A klónozást a LMB2- és LMB3- [Kontermann R.E.: (1997) (lásd fent)], valamint az alábbi láncindító oligonukleotidok alkalmazásával végeztük:

VK-NotFor: 5'- TTG TTC TGC GGC CGC CCG TTT CAG CTC  
CAG CTT GGT GCC AGC ACC -3';

csDB-AscBack: 5'- TGC ATG CTA GGG CGC GCC TCG GGC GGA  
GGT GGC TCA CAG GTG CAG CTG GTG CAA TCT GG -3';

scDB-AscForK: GCT CGG TAA GGC GCG CCC ACC GCT GCC ACC  
GCC TCC ACC TAG GAC GGT CAG CTT GGT CCC -3'; és

peIB-Metminus: 5'- TTA CTC GCG GCC CAG CCG GCC ACG  
GCC CAG GT -3'.

Ebből a célból, a VHB-VLA- (1. fragmentum) és VHA-VLB- (2. fragmentum) fragmentumokat a CEAGal "dimerizálódó bispecifikus antitest-fragmentum" alapján [Kontermann R.E.: (1997)], az LMB2- és LMB3-jelzésű láncindító oligonukleotidok alkalmazásával amplifikáltuk, és gélen tisztítottuk. Ezután, az 1. fragmentumot a VK-NotFor és scDb-AscBack láncindító oligonukleotidok alkalmazásával amplifikáltuk, miáltal ahhoz AscI-helyet és a linker 7 aminosavát adtuk hozzá. A 2. fragmentumot az LMB3 és scDb-AscForλ láncindító oligonukleotidok alkalmazásával amplifikáltuk, miáltal ahhoz AscI-helyet és a linker 8 aminosavból álló részét adtuk hozzá. A fragmentumokat AscI- és NotI-enzimekkel (az 1. fragmentum esetében) és SfiI- és AscI-enzimekkel (a 2. fragmentum esetében) emésztettük, és a pAB1-jelzésű bakteriális expressziós vektorba klónoztuk [Kontermann R.E.: (1997)]. Az így kapott inszert egy láncú polipeptidet kódol, amelyben a VHA-VLB-fragmentum egy 15 aminosavból ál-



ló, GGGGSGGRASGGGS-szekvenciájú linkeren keresztül, VHB-VLA-fragmentummal kapcsolódik.

Ezután, a plazmidot TG1-baktériumokba juttattuk, és azokat szakember számára jól ismert módszerek szerint tenyésztettük [Konterman: (1997)].

A baktériumokat roncsoltuk, és az egy láncú, két antigénkötő hely kialakítására képes proteinek immobilizált fém-affinitásos kromatográfiával (IMAC-eljárással) a periplazmatikus térből tisztítottuk [Hochuli és mtsai.: Bio/Techn. 6, 1321 (1988)]. Az eljárás részleteit Kontermann és mtsai. ismertetik (1997).

A tisztított protein molekulatömege SDS-poliakrilamid-gélelektroforézis és gélszűrés szerint, 60 kDa -nak bizonyult: Egy-egy liter baktérium-tenyészetből 200-300 µg proteinmolekulát nyertünk. A baktériumokban expresszáltott, egy láncú, két antigénkötő hely kialakítására képes protein ELISA-vizsgálatban reagált a CEA- és β-galaktozidáz-antigénekkkel, és az o-nitrofenil β-D-galaktopiranozid szubsztrát átalakulása azt jelezte, hogy az képes az enzim műanyagfelszínhez kötött CEA-antigénezen történő lokális felhalmozódását előidézni (6. ábra). Továbbá, az egy láncú, két antigénkötő hely kialakítására képes protein képesnek bizonyult élő és fixált CEA-expresszázó LoVo-sejteket megfesteni, oly módon, hogy az a β-galaktozidáz enzim sejteken történő koncentrációját, és ezáltal, az 5-bromo-4-klór-3-indolil β-galaktopiranozid (X-Gal) szubsztrát átalakítását eredményezte. Ebben a kísérletben, LoVo-sejteket inkubáltunk a megfelelő antigénkötő protein 10 µg/ml koncentráció-



jú oldatával, 10 µg/ml β-galaktozidáz és X-Gal jelenlétében [0,8 mg/ml szubsztrát, PBS-ben; valamint 3 mmól/l kálium-Fe(III)-cianid; 3 mmól/l kálium-Fe(II)-cianid]. A különböző kontrollsejtek (A549, HEK293) vagy tyúktojás-lizozim és β-galaktozidáz elleni bispecifikus antitest-fragmentumok [HELGal; Kontermann és mtsai.: (1997)] esetében festődés nem volt észlelhető.

## 2. példa

### Egy láncú, két antigénkötő hely kialakítására képes protein expresszáltatása eukariota sejtekben

Eukariota sejtekben történő expresszáltatásra, az egy láncú, két antigénkötő hely kialakítására képes protein kódoló régióját eukariota expressziós vektorba (pSecTagA; Invitrogen) klónoztuk, úgy, hogy a bakteriális szignálszekvenciát a vektorban már jelen lévő Ig-κ -szignálszekvencia helyettesítse.

Ehhez, az egy láncú konstrukciót az LMB2 és peIB-Metminus láncindító oligonukleotidok alkalmazásával amplifikáltuk, miáltal a peIB-vezető-szekvenciában (a 21. pozícióban) található metionint treoninnal helyettesítettük. Ezután, a nukleinsav-szekvenciát SfiI- és EcoRI-enzimekkel emésztettük, és pSecTagA-vektorba klónoztuk. Az érett, egy láncú antigénkötő protein 7 további aminosavat tartalmaz (AAQPATA) a VHA-domén N-terminális végén.

A plazmiddal tranziens módon eukariota HEK 293-sejteket transzfektáltunk, Lipofectamin alkalmazásával (Gibco). Stabil sejteket szelektáltunk zeocin jelenlétében.



Az így kapott sejtek alkalmazásával, immunfluoreszcens eljárással kimutatható volt az endoplazmatikus retikulum (ER) és a Golgi-apparátus festődése. Továbbá, kimutatható volt az egy láncú, két antigénkötő hely kialakítására képes proteín szekréciója, amely immunprecipitációs eljárással,  $^{35}\text{S}$ -Met-jelölt sejtek felülúszójából 60 kDa proteinként precipitálódott, valamint immobilizált fém-affinitásos kromatográfiával (IMAP-eljárással) abból tisztítható volt. A tisztított proteín funkcionálisan aktívnek bizonyult  $\beta$ -galaktozidázzal és CEA-antigénnel bevont mikrotitráló lemezek alkalmazásával végzett kötődésvizsgálatban, és képesnek bizonyult  $\beta$ -galaktozidáz műanyagfelszínhez kötött CEA-antigénen történő lokális felhalmozódását előidézni (7. ábra).

### 3. példa

Lokális enzimfelhalmozó képesség *in vitro* vizsgálata, egy láncú, két antigénkötő hely kialakítására képes proteint szekretáló sejtekkel történő együtt tenyésztéssel

A lokális enzimfelhalmozó képesség *in vitro* vizsgálatát oly módon végeztük, hogy az egy láncú, két antigénkötő hely kialakítására képes proteint termelő HEK293-sejteket és CEA-pozitív LoVo-sejteket együtt tenyésztettünk. Ehhez, először a találmány szerinti proteint termelő sejteket LoVo-sejtekkel tenyésztettük Transwell sejttenyésztő edényekben (Costar), amelynek mélyületei úgy vannak kialakítva, hogy azokban a két sejtvonalat egy membrán válassza el egymástól. Két nap elteltével,  $\beta$ -galaktozidázt adtunk a



sejtekhez (10 µg/ml koncentrációban), és az enzim lokális koncentrációját az X-Gal-szubsztrát hozzáadásával kimutattuk. Az egy láncú, két antigénköti hely kialakítására képes proteint termelő sejtekkel történő együtt tenyésztéskor specifikus festődés volt megfigyelhető, míg nem-transzfectált HEK293-sejtek alkalmazásával végzett kontrollkísérletekben nem volt festődés kimutatható.

Ugyancsak negatívnak bizonyultak azok a kísérletek, amelyekben a LoVo-sejteket A549-sejtekkel (CEA-negatív sejtekkel) helyettesítettük, vagy amelyekben az egy láncú, két antigénköti hely kialakítására képes proteint termelő sejteket enzimmel és szubsztráttal inkubáltuk. Az utóbbi kísérletek azt bizonyítják, hogy az egy láncú, két antigénköti hely kialakítására képes proteint termelő sejtek önmagukban nem képesek az enzim megkötésére.

További kísérletekben, az egy láncú, két antigénköti hely kialakítására képes proteint szekretáló HEK293-sejteket és LoVo-sejteket tenyésztettünk együtt közvetlenül, a kioltásnál 1:4-1:24 arány alkalmazása mellett. Hogy a HEK293-sejteket a LoVo-sejektől meg tudjuk különböztetni, az előbbieket a LoVo-sejtek hozzáadását megelőzően CM-Dil-festékkel (vörös fluoreszcenciát eredményező festékkel) megfestettük (Molecular Probes). Két nap múlva, a sejtekhez β-galaktozidázt adtunk (10 µg/ml), majd a sejtekhez történő kötiődést X-Gal-szubsztrát (10 µg/ml) hozzáadásával, valamint direkt immunfluoreszcens eljárással, anti-β-galaktozidáz ellenanyag (Biotrend) alkalmazásával kimutattuk. Ezek a kísérletek szintén azt igazolták, hogy az enzim specifikus



módon a LoVo-sejteken halmozódott fel, míg a HEK293-sejtek nem festődtek. Nem-transzfektált HEK293-sejtekkel végzett kontrollkísérletek ugyancsak negatívnak bizonyultak. A fenti kísérletek azt bizonyítják, hogy az egy láncú, két antigénkötő hely kialakítására képes protein specifikus és szelektív módon képes tumorsejtek felismerésére.

További kísérletekben, a nem-toxikus daunomycin  $\beta$ -D-galaktopiranozid citotoxikus daunomycinné történő átalakítását vizsgáltuk. Ezt oly módon végeztük, hogy LoVo-sejteket egy órán át, tisztított egy láncú, két antigénkötő hely kialakítására képes proteinnel inkubáltunk (10  $\mu$ g/ml), majd további egy órán át, 37 °C-on,  $\beta$ -galaktozidázzal (1  $\mu$ g/ml) és daunomycin  $\beta$ -D-galaktopiranoziddal (2  $\mu$ mól/l) inkubáltunk, és az anyag autofluoreszcenciája alapján kimutattuk a keletkező daunomycint, amely specifikus módon a magokban lokalizálódik; eredményeinket összehasonlítottuk daunomycinnel végzett közvetlen inkubálással kapott festődéssel. Egy láncú, két antigénkötő hely kialakítására képes protein vagy  $\beta$ -galaktozidáz hiányában, valamint kontrollsejtek (HEK293; egy láncú, két antigénkötő hely kialakítására képes proteint termelő HEK-sejtek) alkalmazásával magfestődés nem volt észlelhető. Ezen kísérletek szerint, az egy láncú, két antigénkötő hely kialakítására képes protein képes enzim lokális felhalmozódását előidézni a tumorsejteken, és az enzim alkalmazásával valamely nem-toxikus prekursor toxikus hatóanyaggá alakítható.

További kísérletekben azt szemléltettük, hogy ez a hatás kihasználható tumorsejtek specifikus elpusztítására.



Ehhez, LoVo-sejteket inkubáltunk 96-mélyületű lemezen egy láncú, két antigénkötő hely kialakítására képes protein (10 µg/ml) jelenlétében, majd dunomycin β-D-galaktopiranoziddal (5 µmól/l), 1 órán át, 37 °C-on. A sejtek pusztulását 2 nap elteltével vizsgáltuk, WST-teszt alkalmazásával (Boehringer Mannheim) (8. ábra). Azt találtuk, hogy a prodrog (a toxikus hatóanyag prekurzorának) droggá (toxikus hatóanyaggá) történő átalakítása körülbelül ugyanolyan mértékű sejtpusztulást eredményezett, mint magának a drognak az alkalmazása. Valamelyik komponens hiányában, vagy CEA-negatív A549-sejtek alkalmazásakor lényegében semmilyen hatás nem volt észlelhető (8.B ábra).

#### 4. példa

Konstrukciók előállítása egy láncú, két antigénkötő hely kialakítására képes protein intracelluláris expresszáltatására

Az egy láncú, két antigénkötő hely kialakítására képes protein intracelluláris expresszáltatására, az egy láncú, két antigénkötő hely kialakítására képes protein génjének megfelelő DNS-t különböző láncindító oligonukleotidok alkalmazásával amplifikáltuk:

Transzmembrán-domént hordozó egy láncú, két antigénkötő hely kialakítására képes proteint (TM-scDAP) kódoló DNS előállítása

Transzmembrán-domént hordozó egy láncú, két antigénkötő hely kialakítására képes proteint kódoló DNS-t olyan láncindító oligonukleotid alkalmazásával hoztunk létre,



amely a PDGFR transzmembrán-domén (LPFKVVVISAIIALVVLTIISLIILIMLWQKKPRYES) inszertálódását eredményezi a gén 3'-végén.

Az endoplazmatikus retikulumban lokalizálódó egy láncú, két antigénkötő hely kialakítására képes proteint (ER-scDAP) kódoló DNS-szekvencia előállítás

A fenti szekvenciát olyan láncindító oligonukleotid alkalmazásával állíthatunk elő, amely ER-retenciós szignál (SEKDEL) inszertálódását eredményezi a gén 3'-végére.

A citoplazmában lokalizálódó egy láncú, két antigénkötő hely kialakítására képes proteint (cyto-scDAP) kódoló DNS-szekvencia előállítás

Erre a célra olyan láncindító oligonukleotidot alkalmazunk, amely a gén 5'-végén található szignálszekvencia metioninnal, és a transzláció optimális megindítását lehetővé tevő Kozak-szekvenciával történő helyettesítését eredményezi.

A magban lokalizálódó egy láncú, két antigénkötő hely kialakítására képes proteint (nuc-scDb) kódoló DNS-szekvencia előállítás

Ehhez olyan láncindító oligonukleotidokat alkalmazunk, amely a gén 5'-végén található szignálszekvencia metioninnal, és a transzláció optimális megindítását lehetővé tevő Kozak-szekvenciával történő helyettesítését, továbbá, a gén 3'-végén nukleáris lokalizációs szekvencia (PKKKRKVGGGT; a nukleáris lokalizációs szekvenciát aláhúzással jelöltük) inszertálódását eredményezi.



Ezeket a fragmentumokat megfelelő eukariota expressziós vektorokba klónozzuk (pSECTagA, pcDNA3; Invitrogen). Ezután, a kapott konstrukciókkal [TM-scDAP, ER-scDAP, cyto-scDAP, nuc-scDAP és sec-scDAP (szekretált protein; lásd 2. példa)] tranziens módon eukariota sejteket (3T3) transzfektáltunk, és az expresszálandó protein lokalizációját immunfluoreszcens eljárással, anti-Myc-epitóp ellenanyagok alkalmazásával vizsgáltuk. A sec-scDAP-, ER-scDAP- és TM-scDAP-konstrukciók esetében a szekretoros útra tipikus festődés volt kimutatható, míg a cyto-scDAP-konstrukció esetében diffúz lokalizáció volt megfigyelhető a citoplazmában, míg a nuc-scDAP esetében a magban volt festődés észlelhető.



## SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Egy láncú, több antigénkötő hely kialakítására képes molekula, amely tartalmazza a következő komponenseket:

a) egy első (A) specifitású immunglobulin nehéz lánc variábilis doménját (VH), vagy annak funkcionális részeit;

b) egy második (B) specifitású immunglobulin könnyű lánc variábilis doménját (VL), vagy annak funkcionális részeit;

c) a (B)-specifitású immunglobulin nehéz lánc variábilis doménját (VH), vagy annak funkcionális részeit; valamint

d) az (A)-specifitású immunglobulin könnyű lánc variábilis doménját (VL), vagy annak funkcionális részeit;

amelyben a VH- és VL-doménok VH-VL- vagy VL-VH-konstrukció formájában vannak összekapcsolva, és a két VH-VL-konstrukció egy peptiden (P) keresztül van összekötve egymással.

2. Az 1. igénypont szerinti egy láncú, több antigénkötő hely kialakítására képes molekula, amely kettőnél több VH-VL-konstrukciót tartalmaz.

3. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti egy láncú, több antigénkötő hely kialakítására képes molekula, amelyben a VH-VL-konstrukciók az azonos specifitású doménokon keresztül vannak összekapcsolva egymással.

4. Az 1-3. igénypontok bármelyike szerinti egy láncú, több antigénkötő hely kialakítására képes molekula, amelyben a az (A) és (B) specifitások lényegében azonosak.



5. Az 1-4. igénypontok bármelyike szerinti egy láncú, több antigénkötő hely kialakítására képes molekula, amelyben a VH- és VL-doménok peptid kapcsoló szekvencián (peptidlinkeren; L) keresztül vannak összekapcsolva VH-L-VL- vagy VL-L-VH-konstrukció formájában.

6. Az 5. igénypont szerinti egy láncú, több antigénkötő hely kialakítására képes molekula, amely linkerként (L) mintegy 1-20 aminosav hosszúságú, előnyösen, 1-5 aminosav hosszúságú szekvenciát tartalmaz.

7. Az 5. igénypont szerinti egy láncú, több antigénkötő hely kialakítására képes molekula, amely linkerként (L) GGGGS aminosav-szekvenciát tartalmaz.

8. Az 1-7. igénypontok bármelyike szerinti egy láncú, több antigénkötő hely kialakítására képes molekula, amely peptidként (P) mintegy 12-40 aminosav hosszúságú, előnyösen, mintegy 12-20 aminosav hosszúságú, még előnyösebben, mintegy 14 aminosav hosszúságú szekvenciát tartalmaz.

9. A 8. igénypont szerinti egy láncú, több antigénkötő hely kialakítására képes molekula, amely peptidként (P) GGGGSGGRASGGGS vagy GGGGSGGRASGGGS aminosav-szekvenciát tartalmaz.

10. Az 1-9. igénypontok bármelyike szerinti egy láncú, több antigénkötő hely kialakítására képes molekula, amely további komponensként egy vagy több effektort (E) is tartalmaz.

11. A 10. igénypont szerinti egy láncú, több antigénkötő hely kialakítására képes molekula, amelyben az



effektor összekötő szekvencián (B) keresztül van a molekulához kapcsolva.

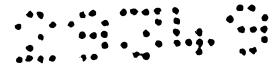
12. A 11. igénypont szerinti egy láncú, több antigénkötő hely kialakítására képes molekula, amely összekötő szekvenciaként (B) proteáz hasítási helyet magában foglaló szekvenciát, előnyösen, PSA (prosztata-specifikus antigén), katepszin, plazminogén és/vagy plazminogén aktivátor által felismert hasítási szekvenciát tartalmaz.

13. Az 1-12. igénypontok bármelyike szerinti egy láncú, több antigénkötő hely kialakítására képes molekula, amelyben az első (A) specifitás egy analizálandó molekulával szemben, a második (B) specifitás valamely analittal szemben irányul.

14. A 13. igénypont szerinti egy láncú, több antigénkötő hely kialakítására képes molekula, amelyben a (B) specifitás radioaktív molekulával, fluoreszcens molekulával és/vagy enzimmal szemben irányul.

15. A 10-12. igénypontok bármelyike szerinti egy láncú, több antigénkötő hely kialakítására képes molekula, amelyben az első (A) specifitás egy analizálandó molekulával szemben, a második (B) specifitás egy további analizálandó molekulával szemben irányul, és az effektor (E) analit.

16. A 15. igénypont szerinti egy láncú, több antigénkötő hely kialakítására képes molekula, amelyben a (B) specifitás radioaktív molekula, fluoreszcens molekula és/vagy enzim természetű analittal szemben irányul.



17. Az 1-12. igénypontok bármelyike szerinti egy láncú, több antigénkötő hely kialakítására képes molekula, amelyben a peptid (P) és/vagy effektor (E) fuziogén peptidet tartalmaz.

18. Az 1-17. igénypontok bármelyike szerinti egy láncú, több antigénkötő hely kialakítására képes molekula, amelyben az első (A) specifitás célsejttel szemben, a második (B) specifitás valamely vektorral szemben irányul.

19. A 18. igénypont szerinti egy láncú, több antigénkötő hely kialakítására képes molekula, amelyben a második specifitás (B) nukleinsav, kationos peptid vagy protein, kationos lipid, kationos polimer, kationos porfirin vagy vírusvektor - például adenovírus (AdV), adeno-asszociált vírus (AAV), vacciniavírus, RSV, HSV, influenzavírus vagy lentivírus vektorral szemben irányul.

20. Az 1-12. igénypontok bármelyike szerinti egy láncú, több antigénkötő hely kialakítására képes molekula, amelyben az első (A) specifitás sejtmembránnal szemben, közelebből, limfociták, makrofágok, monociták, granulociták, vérképzőrendszeri sejtek, endothelsejtek, simaizom-sejtek, harántcsíkoltizom-sejtek, hámsejtek, májsejtek, vesesejtek, gliasejtek, a támasztószövetek sejtjei, tumorsejtek vagy leukémiasejtek membránjával szemben; vagy az extracelluláris mátrix, a komplement-rendszer, a véralvadási rendszer, a kininrendszer, a vérplazma vagy a támasztószövet proteinjével szemben; vagy citokinekkal vagy kemokinekkal szemben; vagy endogén vagy exogén toxinokkal szemben; vagy gyógyászati hatóanyagokkal, például digitális eredetű ható-



anyaggal szemben; és/vagy kórokozókkal, például bakteriális, virális és/vagy parazita kórokozókkal szemben irányul.

21. Az 1-12. és 20. igénypontok bármelyike szerinti egy láncú, több antigénkötő hely kialakítására képes molekula, amelyben a második (B) specifitás sejtmembránnal szemben, közelebbről, limfociták, makrofágok, monociták, granulociták membránjával szemben; citokinekkal, kemokinekkal vagy növekedési faktorokkal szemben; a komplementrendszer proteinjével szemben; a véralvadási rendszer proteinjével szemben; fibrinolitikus proteinekkal szemben; enzimekkel szemben, amelyek gyógyászati hatóanyag (drog) inaktív prekursorát aktív - például citotoxikus hatású - hatóanyaggá (droggá) képesek átalakítani a célstruktúrán; peptidhormonokkal vagy szteroidhormonokkal szemben; immunoglobulin konstans doménjával szemben; mediátorokkal, például hisztaminnal, szerotoninnal, leukotriénnel, prosztaciklinnel vagy kininnel szemben; kórokozókkal szemben; tumorsejtekkel szemben; endogén vagy exogén toxinokkal szemben; vagy gyógyászati hatóanyagokkal, például digitális eredetű hatóanyaggal szemben irányul.

22. Az 1-12., 20. és 21. igénypontok bármelyike szerinti egy láncú, több antigénkötő hely kialakítására képes molekula, amely effektorként (E) transzmembrán-domént, glikofoszfolipid-horgonyt, receptor ligandumkötő részét, receptor ligandumát vagy a ligandum receptorkötő szekvenciájának részletét, peptidhormont, citokint, növekedési faktort, növekedési faktor inhibitorát, kemokint, interferont, mediátort, keringésre ható peptidet, gyógyászati hatóanyag



(drog) inaktív prekurzorát aktív hatóanyaggá (droggá) átalakító enzimet, alvadási folyamatot aktiváló vagy gátló proteint, fibrinolízist aktiváló vagy gátló proteint, a komplement-rendszert aktiváló vagy gátló proteint, immunoglobulin egy vagy több konstans doménját, citotoxikus peptidet; más egy láncú, egy vagy több - előnyösen, két - antigén megkötésére képes antigénkötő molekulát; tumor-antigént vagy kórokozó antigénjét, például bakteriális antigént vagy virális antigént; cisztein-tartalmú peptidet; és/vagy dimer- vagy multimer-képző peptidet tartalmaz.

23. Nukleinsav, amely az 1-22. igénypontok bármelyike szerinti egy láncú, több antigénkötő hely kialakítására képes molekulát kódol.

24. A 23. igénypont szerinti nukleinsav, amely 5'-végén szignál- vagy transzmembrán-szekvenciát kódoló nukleotid-szekvenciát tartalmaz.

25. A 23. vagy 24. igénypont szerinti nukleinsav, amely 5'-végén promótert és/vagy aktivátort tartalmaz.

26. A 25. igénypont szerinti nukleinsav, amely sejtspecifikus, sejtciklus-specifikus, anyagcseretermék-specifikus és/vagy drog-specifikus módon aktiválható vagy szupreszálható aktivátort tartalmaz.

27. A 23-26. igénypontok bármelyike szerinti nukleinsav, amely a startkódon 5'-végén GCCACC vagy GCCGCC szekvenciát tartalmaz.

28. Vektor, amely a 23-27. igénypontok bármelyike szerinti nukleinsavat tartalmaz.



29. A 28. igénypont szerinti vektor, amely virális vagy nem-virális vektor.

30. A 29. igénypont szerinti vektor, amely kationos lipid, kationos polimer, kationos peptid vagy kationos porfirin természetű nem-virális vektor.

31. Sejt, amely a 23-27. igénypontok bármelyike szerinti nukleinsavat vagy a 28. vagy 29. igénypontok szerinti vektort tartalmaz.

32. A 31. igénypont szerinti sejt, amely bakteriális, élesztő-, rovar- vagy emlős sejt.

33. A 32. igénypont szerinti emlős sejt, amely limfocita, makrofág, gliasejt, hámsejt, májsejt vesesejt, csontvelősejt, endothelsejt, simaizomsejt vagy harántcsíktizom-sejt vagy fibroblaszt.

34. Eljárás egy láncú, több antigénkötő hely kialakítására képes molekula előállítására, azzal jellemezve, hogy a 31. vagy 32. igénypont szerinti sejtet tenyésztjük, és az expresszáldott terméket kívánt esetben izoláljuk.

35. Gyógyászati készítmény, amely 1-12. és 17-22. igénypontok bármelyike szerinti egy láncú, több antigénkötő hely kialakítására képes molekulát; 23-27. igénypontok bármelyike szerinti nukleinsavat; 28-30. igénypontok bármelyike szerinti vektort; vagy 31-33. igénypontok bármelyike szerinti sejtet tartalmaz.

36. Diagnosztikai segédanyag, amely 13-16. igénypontok bármelyike szerinti egy láncú, több antigénkötő hely kialakítására képes molekulát tartalmaz.



37. Az 1-22. igénypontok bármelyike szerinti egy lán-  
cú, több antigénkötő hely kialakítására képes molekula, a  
23-27. igénypontok bármelyike szerinti nukleinsav, a 28-30.  
igénypontok bármelyike szerinti vektor vagy a 31-33. igény-  
pontok bármelyike szerinti sejt alkalmazása onkológiai kór-  
képek, autoimmun betegségek, gyulladással járó kórképek,  
vér-rendellenességek - például véralvadási és/vagy keringé-  
si rendellenességek -, idegrendszeri rendellenességek és/  
vagy fertőző betegségek terápiájára, megelőzésére vagy di-  
agnózisára.

A meghatalmazott:

DANUBIA

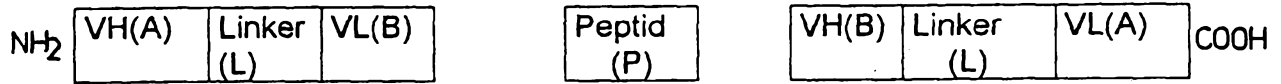
Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.

dr. Pethő Árpád

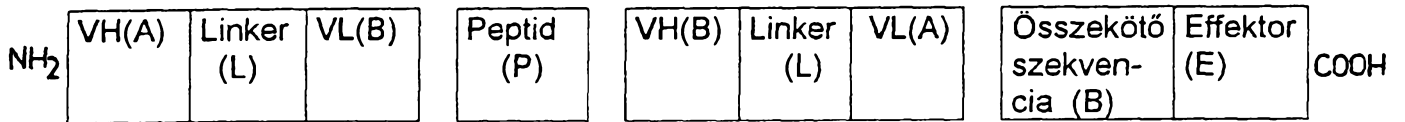
Földvár

P99 00956

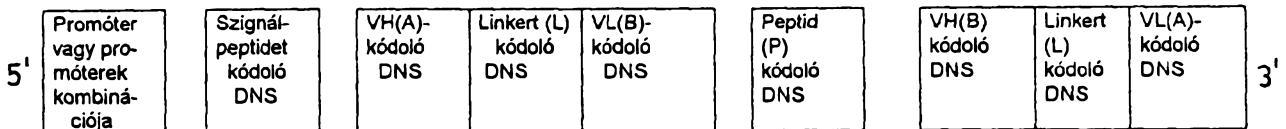
# KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY



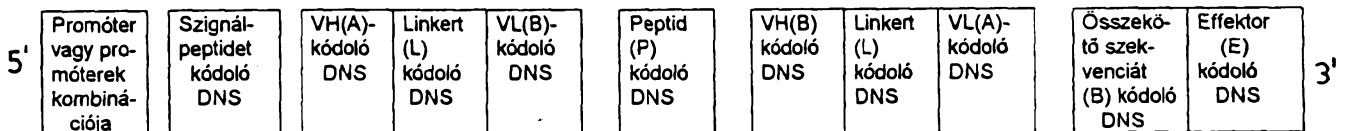
1. ábra



2. ábra

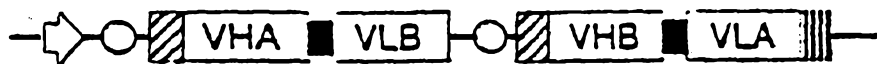


3. ábra



4. ábra

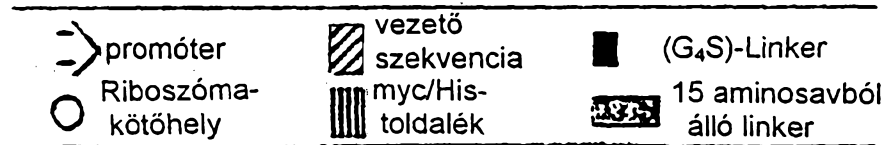
Dimerizálódó, két antigénkötő hely kialakítására képes molekula (Db)



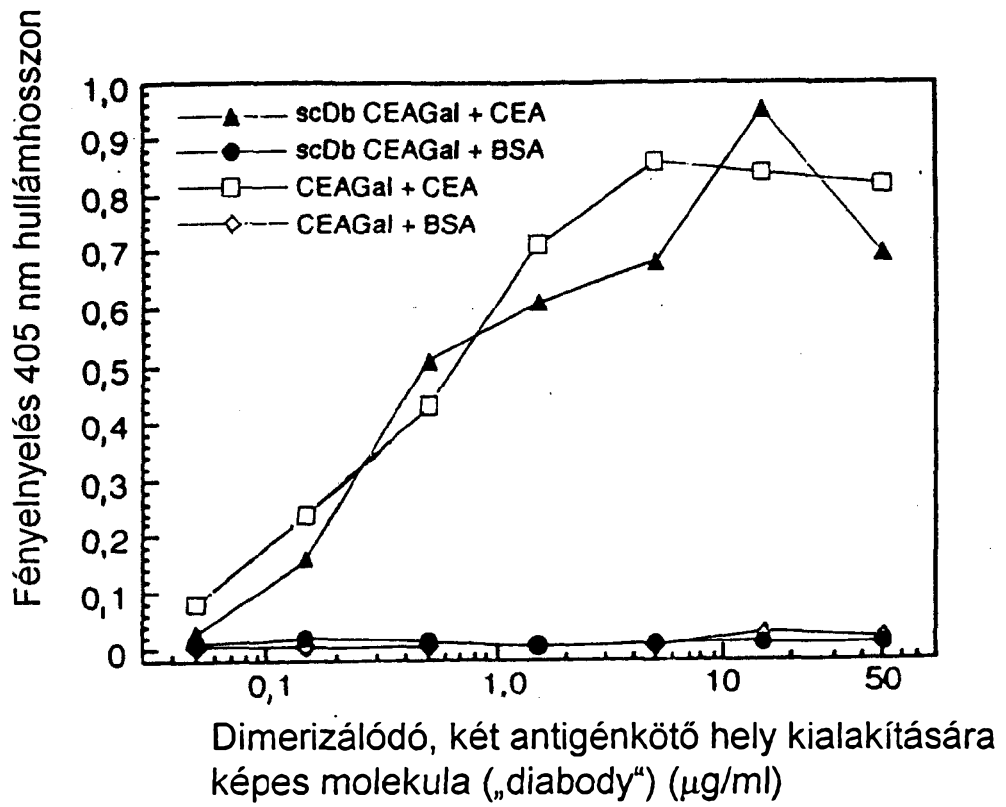
Egyláncú, két antigénkötő hely kialakítására képes molekula (scDb)



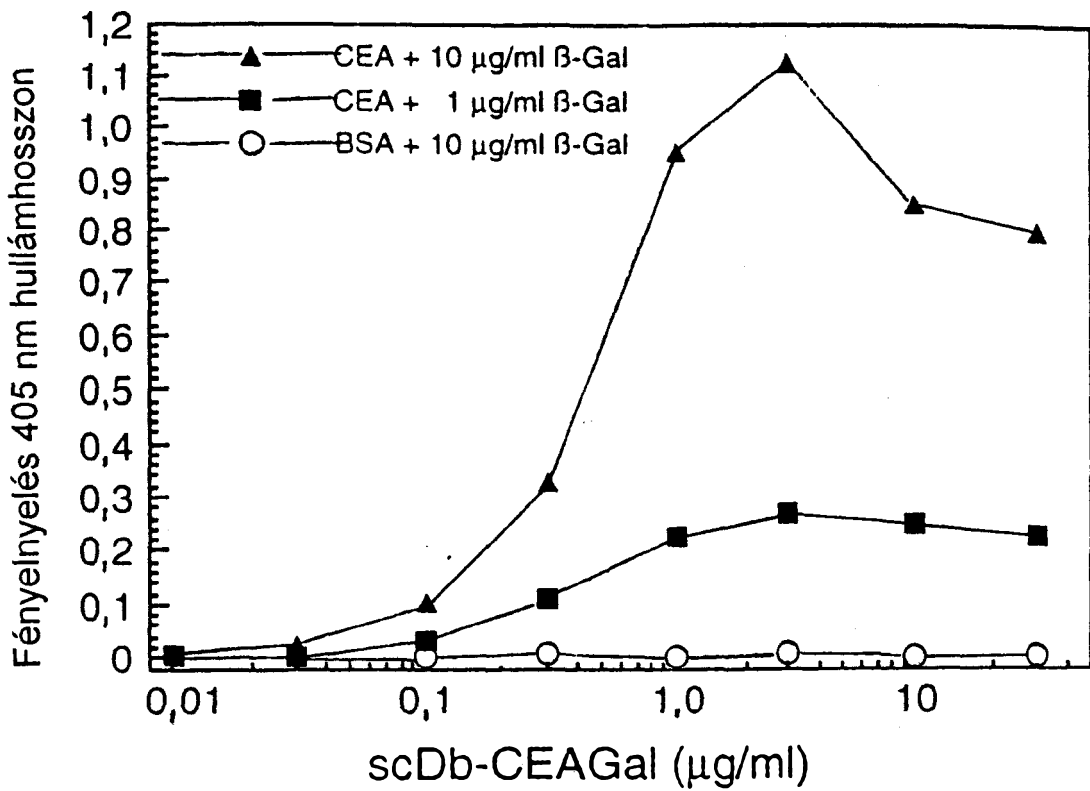
VLB-GGGGSGGRASGGGS-VHB



5.ábra

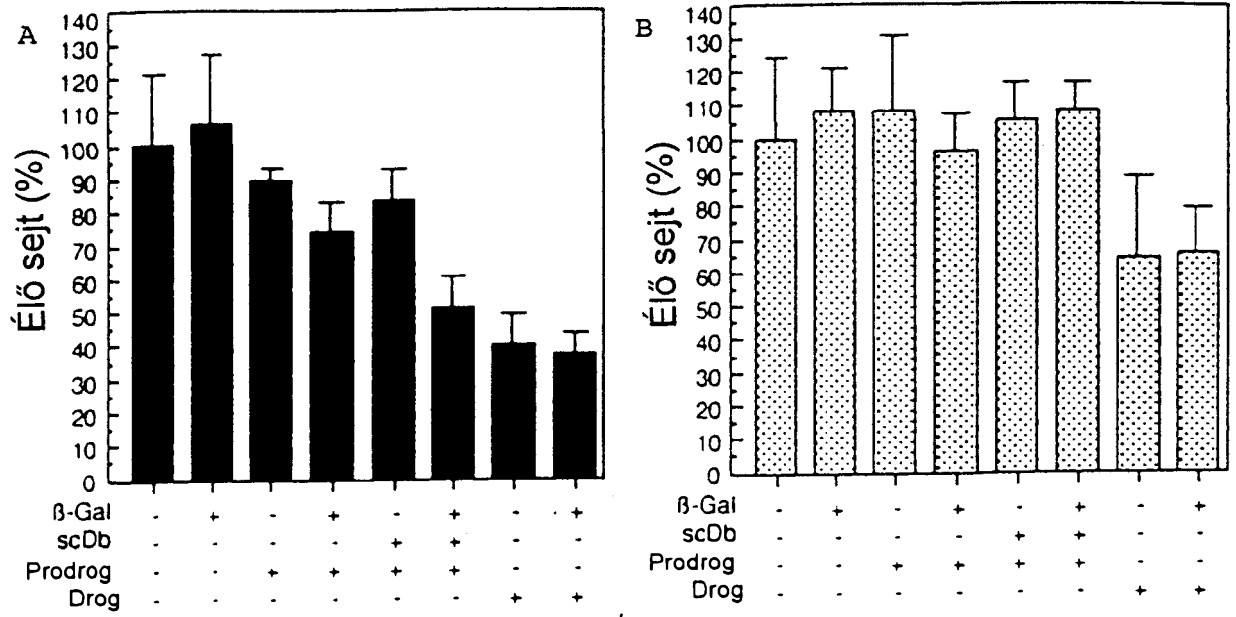


6. ábra



7. ábra

P99 00956



8. ábra