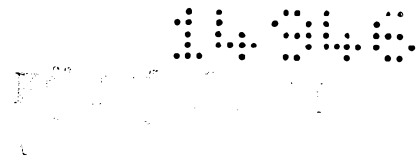


P0301780



73.895/SZE

A2

Rekombináns anti CD40 ellenanyagok és használatuk

KIVONAT

A találmány betegségek és kórok - beleértve a daganatos, gyulladásos megbetegedéseket vagy az immunrendszer megbetegedéseit - kezeléséhez eljárásokra és összetételekre vonatkozik. A találmány eljárásai a CD40 kötőfehérje beadását tartalmazzák, mely a CD40 ligand CD40-hez kötődését elősegíti.

2020627

Rekombináns anti CD40 ellenanyagok és használatuk

A jelen találmány betegségek és kórok - beleértve a dagantos, gyulladásos megbetegedéseket vagy az immunrendszer megbetegedéseit - kezeléséhez használható eljárásokra és összetételre vonatkozik, amelyek a CD40 kötőfehérje beadását tartalmazzák, mely elősegíti a CD40 ligand CD40-hez való kötődését. A CD40 kötőfehérje magában foglalja az S2C6 monoklonális ellenanyagot és annak származékait.

A CD40 a sejtfelszínen található foszforilezett fehérje, mely különböző sejttípusokban fejeződik ki, beleértve a B sejteket, a B-sejtes rosszindulatú daganatokat, a follikuláris dentritikus sejteket, a bazális epiteliális sejteket, és a karcinómákat. A CD40 a CD40 ligandhoz ("CD40L") kötődik. A CD40L a gyulladás és a rákbetegség alatt az aktivált T-sejteken fejeződik ki [Younes és mtsai: Br. J. Haematol., 100, 135-141 (1998); részletes összefoglaló: Grewal és Flavell: Annu. Rev. Immunol., 16, 111-135 (1998)]. A CD40 kapcsolata a CD40L-el B-sejt aktiváláshoz, valamint a normális B-sejtek proliferációjához vezet; viszont a B-sejtből származó tumoros vonalaknál a CD40 közvetített jelátvitel aktiválással előidézett sejthalálhoz vezethet. Az aktivációs jel erőssége az aktiválással beindított tumorsejtek pusztulásánál kulcsszerepet játszik [Grafton és mtsai: Cell. Immunol., 182, 45-56(1997)]. Ezért a receptor-ligand kölcsönhatás megerősítésénél



és a CD40 és CD40L közötti jelaktiváció erősség fokozásánál az összetételek és eljárások a betegségek kezelésében nagy jelentőségűek.

A CD40 és a CD40 ligand

A CD40 a TNF receptorcsalád egyik alcsoportjába tartozik. Ez a család a következő receptorokat tartalmazza: TNF α RII, CD40, CD30, LMP-1, LTBr, ATAR, OX-40 és 4-1BB. A CD40 a B-limfocitákon, a makrofágokon és a dendritikus sejteken folyamatosan kifejeződik, és citokin aktiválással a fibroblasztokon, az endoteliális sejteken és az epitheliális sejteken megjelenik [Van Kooten és Banchereau: Curr. Opin. Immunol., 9, 330-337 (1997)]. A CD40-ról azt is kimutatták, hogy számos humán karcinómán kifejeződik, mint például a tüdő, hólyag, gyomor, mell és ovarialis rákokon [Stamenkovic és mtsai: EMBO J., 8, 1403-1410 (1989)].

A CD40 ligandja az aktivált T-sejteken kifejeződő membránfehérje. A CD40L receptor kötődése a CD40 multimer formájának kialakulását, az aktivációs (az antigénbemutató sejteknél, mint például dendritikus sejtek, monociták és B-sejtek) valamint a növekedési és differenciálódási jelek (a citokinnel aktivált fibroblasztoknál és epitheliális sejteknél) kialakulását eredményezi. A CD40 jelek a multimerré alakított receptorokról TNF receptorral kapcsolt faktorok ("TRAF-k") felerősítésével tovább jutnak [Kehry: J. Immunol., 156, 2345-2348 (1996)]. A TRAF-ok alosztálya a TNF-ek családjával különböző módon kerül kölcsönhatásba, beleértve a CD40-et, ezzel a szabályzás széles választékát felölelő



"downstream" útjainál stimulációt biztosít. A TRAF1 és a TRAF2 az apoptózis módosításában játszik szerepet [Speiser és mtsai: J. Exp. Med. 185, 1777-1783 (1997); Yeh és mtsai: Immunity, 7, 715-725 (1997)]. A TRPF 2, 5, és 6 proliferációs és aktiválási eseményekben vesznek részt, beleértve az NF-kB és c-Jun N-terminális kináz aktiválást. Normális esetben a B-sejtek, a CD40, a TRAF2 és TRAF3 megerősítőket a receptorhoz kötik és a többi TRAF csökkentését indukálják [Kuhune és mtsai: J. Exp. Med., 186, 337-342 (1997)]. A CD40 kötés hatása a membrán sűrűségétől is függ [De Paoli és mtsai: Cytometry, 30, 33-38 (1997)]. Fontos, hogy a proliferációs válasz, nem úgy mint a normál elsődleges B-sejteknél, a neoplasztikus B-sejteken a CD40 kötődése a növekedés gátlását és a indukált sejthalál aktiválását eredményezheti [Funakoshi és mtsai: Blood, 83, 2787-2794 (1994)]. Így a különböző sejtípusok esetében a CD40 aktiválás, a transzformáció, a meglévő TRAF-ek és a kostimulálás az aktiválástól és a proliferációtól a növekedés gátlás és az apoptózis irányába különböző válaszokat indukálhat.

Anti-CD40 ellenanyagok

Legalább egy kivétellel a mai napig leírt anti-CD40 monoklonális ellenanyagok ("mAb-k") három általános csoportba sorolhatók: (1) melyek a CD40/CD40L kölcsönhatást legalább 90 %-ban blokkolják és antineoplasztikus tulajdonságokkal rendelkeznek [Armitage és mtsai: 5,674,492 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi bejelentés; Fanslow és mtsai:

Leukocyte Typing V, 1, 555-556 szerkesztők Schlossman és mtsai (1995)]; (2) melyek a CD40 jelátvitelt antagónizálják [deBoer és mtsai: 5,677,165 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi bejelentés]; és (3) melyek a jelet a CD40-en keresztül hordozzák, de a CD40 és a CD40L közötti kölcsönhatást nem növelik, mint például a G28-5 [Ledbetter és mtsai: 5,182,368 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi bejelentés; WO 96/18413 számú szabadalmi bejelentés].

Az egyik mAb, a CD40.4 (5C3)(PharMingen, San Diego, California), a CD40 és a CD40L közötti kölcsönhatást hozzávetőleg 30-40 %-kal növeli [Schlossman és mtsai: Leukocyte Typing V: White Cell Differentiation Antigens, 1, 547-556 (1995)].

A CD40-et kifejező neoplasztikus sejtek kialakulásának megakadályozására és az ezeket kifejező kóros sejtek kezelésére Armitage és munkatársai [5,674,492 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi bejelentés] a CD40 kötőfehérjék használatát leírták, beleértve az mAb HuCD40-M2-t, mely képes a CD40-hez kötődni, valamint a CD40 kötődését a CD40L-hez gátolja.

DeBoer és munkatársai [5,677,165 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi bejelentés] olyan anti-CD40 mAb-kat írtak le, melyek mentesek a jelentős agonista aktivitástól, a B-sejtek felszínén a CD40-hez kötődnek és a B-sejtek aktiválását blokkolják. Az egyik szabadalmi bejelentés alapvető megfigyelése [5,677,165 számú Amerikai Egyesült Államok-beli



szabadalmi bejelentés], hogy az anti-CD40 kötődése a normál humán B-sejtek felszínéhez gátolja a normál humán B-sejtek növekedését vagy differenciálódását.

Ledbetter és munkatársai [5,182,368 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi bejelentés] egy olyan ligandot írtak le (G28-5), mely a B-sejtek felszíni Bp50 antigénjéhez (amit már CD40-nek hívunk) kötődik és az aktivált B-sejteket arra ösztönzi, hogy a sejtcikluson átmenjenek, ami így a B-sejtek proliferációjának növekedését vonja maga után. Viszont a G28-5 CD40L jelenlétében a B-sejtek aktiválását nem fokozza, és a CD40/CD40L kölcsönhatást nem potenciálja.

Az S2C6 egy olyan anti-CD40 mAb, melyet humán hólyag karcinóma ellen alakították ki [Paulie és mtsai: Cancer Immunol. Immunother., 17, 165-179 1984)]. Az S2C6 a különböző sejttípusokon - beleértve a B-limfocitákat, endotheliális és epitheliális sejteket - kifejeződő CD40 receptorhoz kötődik. Az S2C6-ról kimutatták, hogy a neoplasztikus urothelium sejtekre és a malignus limfocitákból származó B-sejtekre specifikus. A HS prosztata karcinóma sejtvonallal mutatott reagáló képességét, és a melanómával szemben kifejtett gyenge reagáló képességét szintén kimutatták [Paulie és mtsai: Cancer Immunol. Immunother., 17, 165-179 (1984)]. A tanulmányok arra utalnak, hogy az S2C6 diagnosztikai markerként a B-sejtes malignus daganatoknál alkalmazható [Paulie és mtsai: Cancer Immunol. Immunother., 17, 165-179 (1984); Paulie és mtsai: Eur. J. Cancer. Clin. Oncol., 21, 701-710 (1985)]. Továbbá, a malignus



B-sejtes daganatok kimutatásakor a S2C6-ról kimutatták, hogy a B-limfociták részére erős növekedést elősegítő jeleket szállít [Paulie és mtsai: J. Immunol., 142, 590-595(1989)].

Az S2C6 a humán perifériás B-sejteken agonista hatást fejt ki, amit az elsődleges B-sejtek proliferációjára gyakorolt dóziszfüggő hatásán keresztül mutattak ki [Paulie és mtsai: J. Immunol., 142, 590-595(1989)].

Bár a vetélkedést vizsgáló tanulmányok az mutatták, hogy a G28-5 és a S2C6 ellenanyagok azonos vagy egymáshoz közel lévő epitópokhoz kapcsolódnak, mégis ezek a monoklonális ellenanyagok funkcionálisan eltérőek, mivel a mandula B-sejtjein mutatott stimuláló hatásuk mértéke más [Clark és Ledbetter: Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 83, 4494-4498(1986); Ledbetter és mtsai: 5,182,368 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi bejelentés]. A vizsgált specifikus körülmények között a mandula B-sejtek aktiválásához a G28-5-höz viszonyítva százszor több S2C6 szükséges [Ledbetter és mtsai: 5,182,368 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi bejelentés].

A szakirodalomban a rákbetegség megelőzéséhez vagy kezeléséhez, vagy az immunrendszer aktiválásához vagy fokozásához, vagy az immunhiány vagy betegség kezeléséhez vagy megelőzéséhez igény van olyan megnövelt hatékonyságú terápiás szerekre, melyeket a jelen találmány biztosít.



Az itt megadott bármely hivatkozásra vagy beazonosításra úgy tekintünk, hogy azok a jelen találmány előtt nem álltak rendelkezésre.

A találmány összegzése

A szabadalom benyújtói az anti-CD40 ellenanyagok új osztályának meglepő felfedezésére jutottak, melyek a stimuláló jel szállításán kívül, a CD40 és a CD40L közötti kölcsönhatást elősegítik, a CD40L közvetített stimulációt fokozzák és *in vivo* anti-neoplasztikus aktivitással bírnak. A szabadalom benyújtói az S2C6 mAb variábilis régiójának klónozásával és szekvenálásával, és a CDR, valamint ezek vázrégióinak azonosításával a fenti ellenanyagok termelését és használatát felgyorsították.

A jelen találmány olyan molekulákra vonatkozik, melyek az S2C6 mAb variábilis régióit vagy ezek egy vagy több komplementaritást meghatározó régióját (CDR-ek) tartalmazzák, melyek új szekvenciáit a következő számokon adtuk meg: 3, 4, 8, 9 vagy 10, mely molekulákra jellemző, hogy (a) a CD40-hez immunspecifikusan kötődnek, és (b) a natív S2C6 monoklonális ellenanyaghoz képest elsődleges aminosav szekvenciájukban egy vagy több helyettesítést vagy betoldást tartalmaznak, amit a letétbe helyezett ATCC PTA-110 hozzáférési számú hibridóma szekretál, vagy nem monoklonális S2C6 ellenanyag, amit a letétbe helyezett ATCC PTA-110 hozzáférési számú hibridóma szekretál, és nem az S2C6 papainnal vagy pepszinnel végzett emésztésének eredménye. Az egyik specifikus megvalósítási formában a



molekulák nem a natív S2C6 monoklonális ellenanyagot jelentik, és a szóban forgó S2C6 monoklonális ellenanyag natív nehéz- vagy könnyűláncait nem tartalmazzák. Egy másik specifikus megvalósítási formában a molekula ellenanyag. Egy másik megvalósítási formában az ellenanyag nem IgG1 izotípusú. Egy másik specifikus megvalósítási formában a molekula könnyűlánc variábilis domént tartalmaz, melynek aminosav szekvenciája 2, vagy nehézlánc variábilis domént foglal magában, melynek aminosav szekvenciája 7.

Továbbá a találmány kiméra/fúziós fehérjékre vonatkozik, melyeknél az S2C6 mAb fragmense egy második fehérje aminosav szekvenciájához kötött, valamint olyan molekulákra, melyekben az S2C6 fragmens kovalensen (például keresztkötést kialakító szerrel) egy másik kémiai struktúrához kötött. Az egyik specifikus megvalósítási formában olyan molekuláról gondoskodunk, mely a CD40-hez immunspezifikusan kapcsolt, ahol a molekula az S2C6 mAb nehéz- és/vagy könnyűláncának variábilis doménjait egy második aminosav szekvenciához kapcsoltnak tartalmazza, ahol az aminosav szekvencia a bryodin 1-et jelenti (BD1).

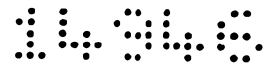
A találmány továbbá olyan fehérjékre vonatkozik, melyek a 2., 3., 4., 7., 8., 9. vagy a 10. szekvenciákkal legalább 95 %-ban azonosak, mely fehérjékre jellemző, hogy (a) a CD40-hez immunspezifikusan kötődnek, és (b) a natív S2C6 monoklonális ellenanyaghoz képest, amit a letétbe helyezett ATCC PTA-110 hozzáférési számú hibridóma szekretál, elsődleges aminosav szekvenciá-



jukban egy vagy több helyettesítést vagy betoldást tartalmaznak. Az egyik specifikus megvalósítási formában a fehérjék nem a natív S2C6 monoklonális ellenanyagot jelentik, és a szóban forgó S2C6 monoklonális ellenanyag natív nehéz- vagy könnyűláncait nem tartalmazzák.

A találmány továbbá tisztított fehérjékre vonatkozik, melyek (a) a CD40 kötődésért a letétbe helyezett ATCC PTA-110 hozzáférési számú hibridóma által szekretált S2C6-vel vetélkednek, (b) a CD40 ligand kötődését a CD40-hez legalább 45 %-kal növelik, és (c) a natív S2C6 monoklonális ellenanyaghoz képest, amit a letétbe helyezett ATCC PTA-110 hozzáférési számú hibridóma szekretál, elsődleges aminosav szekvenciájukban egy vagy több helyettesítést vagy betoldást tartalmaznak, vagy nem monoklonális S2C6 ellenanyag, amit a letétbe helyezett ATCC PTA-110 hozzáférési számú hibridóma szekretál, és nem az S2C6 papainos vagy pepszines emésztésének eredménye.

Az egyik specifikus megvalósítási formában a fehérjék nem a natív S2C6 monoklonális ellenanyagot jelentik, és a szóban forgó S2C6 monoklonális ellenanyag natív nehéz- vagy könnyűláncait nem tartalmazzák. A találmány továbbá nukleinsav molekulákra, melyek olyan molekulákat és fehérjéket kódolnak, vagy olyan DNS-hez hibridizálnak, melyek az ilyen fehérjéket kódoló nukleinsav szekvenciát tartalmazzák; az ilyen molekulákat és fehérjéket tartalmazó rekombináns sejtekre; és az ilyen fehérjék előállítási eljárásaira vonatkozik.



Az egyik megvalósítási formában az elkülönített nukleinsavak a következő fehérjéket kódoló nukleotid szekvenciákkal rendelkeznek: (a) az S2C6 monoklonális ellenanyag nehézláncának variábilis doménja, ahogy azt a letétbe helyezett ATCC PTA-110 hozzáférési számú hibridóma szekretálja, és (b) a humán állandó régió.

Az egyik megvalósítási formában az elkülönített nukleinsavak a következő fehérjéket kódoló nukleotid szekvenciákkal rendelkeznek: (a) az S2C6 monoklonális ellenanyag könnyűláncának variábilis doménja, ahogy azt a letétbe helyezett ATCC PTA-110 hozzáférési számú hibridóma szekretálja, és (b) a humán állandó régió.

A találmány továbbá a fehérjét kódoló nukleinsav szekvenciából álló rekombináns nukleinsav vektort tartalmazó rekombináns sejtekre vonatkozik, ahol a fehérje a CD40 kötődésért a letétbe helyezett ATCC PTA-110 hozzáférési számú hibridóma által szekretált S2C6 monoklonális ellenanyaggal vetélkedik, és ahol a fehérje a CD40 ligand kötődését a CD40-hez legalább 45 %-kal növeli. A találmány az ilyen fehérjéket termelő eljárásokat biztosít, olyan sejtekkel, melyekben a fehérje kifejeződik, és a találmány a kifejezett fehérje kinyerését is felöleli.

A találmány továbbá az 1., 6., 11., 12., 13., 14. vagy a 15. szekvenciákat felölelő rekombináns nukleinsav vektorokat tartalmazó rekombináns sejtekre, valamint a nukleinsav szekvenciák által meghatározott fehérjék sejtekkel történő kifejezésére és a kifejezett fehérjék kinyerésére vonatkozik.



A jelen találmány molekuláinak és ellenanyagainak gyógyszerészeti összetételeiről előnyösen tisztított formában gondoskodunk. A sajátos megvalósítási formákban a jelen találmány gyógyszerészeti összetételekre vonatkozik, melyek a 2., 3., 4., 7., 8., 9. vagy 10. szekvenciájú molekulákat tartalmazza, mely molekulákra jellemző, hogy (i) a CD40-hez immunspecifikusan kötődnek, (ii) a CD40 ligand CD40-hez kötődését növelik, és (iii) a natív S2C6 monoklonális ellenanyaghoz képest, amit a letétbe helyezett ATCC PTA-110 hozzáférési számú hibridóma szekretál, elsődleges aminosav szekvenciájukban egy vagy több helyettesítést vagy betoldást tartalmaznak, valamint az összetételek gyógyszerészetileg elfogadható hordozót tartalmaznak. Egy specifikus megvalósítási formában a molekula nem tartalmazza az S2C6 monoklonális ellenanyag és a szóban forgó S2C6 monoklonális ellenanyag natív nehéz-, vagy könnyűláncát.

A találmány továbbá tisztított fehérjét tartalmazó gyógyszerészeti összetételekre vonatkozik, mely fehérjére jellemző, hogy (i) a letétbe helyezett ATCC PTA-110 hozzáférési számú hibridóma által szekretált S2C6 és a CD40 kötődésben vetélkedik, (ii) a CD40 ligand kötődését a CD40-hez legalább 45 %-kal növeli, és (iii) a natív S2C6 monoklonális ellenanyaghoz képest, amit a letétbe helyezett ATCC PTA-110 hozzáférési számú hibridóma szekretál, elsődleges aminosav szekvenciájukban egy vagy több helyettesítést vagy betoldást tartalmaz, vagy nem monoklonális S2C6 ellenanyag, amit a letétbe helyezett ATCC PTA-110 hozzá-

férési számú hibridóma szekretál, és nem az S2C6 papainos vagy pepszines emésztésének eredménye, valamint az összetételek gyógyszerészetileg elfogadható hordozót tartalmaznak. Egy specifikus megvalósítási formában a fehérje nem a natív S2C6 monoklonális ellenanyag és a szóban forgó S2C6 monoklonális ellenanyag natív nehéz-, vagy könnyűláncát nem tartalmazza.

Egy specifikus megvalósítási formában a jelen találmány gyógyszerészeti összetételei a jelent találmány molekuláit vagy ellenanyagait tartalmazzák olyan mennyiségben, ami a rákbetegség kezelésére vagy megelőzésére elegendő, vagy olyan hatásos mennyiségben, ami az immunválasz aktiválásához vagy fokozásához megfelel, vagy olyan mennyiségben, amivel a szubjektum immunválasza aktiválódik vagy fokozódik.

A jelen találmány egyik specifikus megvalósítási formájában a gyógyszerészeti összetétel a CD40 ligandot is tartalmazza. Egy specifikus megvalósítási formában a gyógyszerészeti összetétel a rák- vagy az immunbetegségek kezelésére vagy megelőzésére, vagy az immunválasz aktiválására vagy fokozására hatásos mennyiségben a következőket tartalmazza: (a) a CD40-hez immunspecifikusan kötődő molekula, mely a CD40-nek a CD40 ligandhoz való kötődését növeli; (b) a CD40 ligand; és (c) gyógyszerészetileg elfogadható hordozó. Ebben a megvalósítási formában például a molekula lehet a natív S2C6 mAb vagy a natív 5C3 vagy egy itt leírt S2C6 származék. A találmány továbbá a szubjektumnál a rákbetegség gyógyítási vagy megelőzési, a szubjektumnál az immunválasz aktiválási és fokozási, vagy a



szubjektumnál az immunhiány vagy a betegség kezelési és megelőzési eljárásaira vonatkozik, melyek a szubjektumba a 2., 3., 4., 7., 8., 9. vagy 10. szekvenciájú molekulák beadását terápiásan hatásos mennyiségben tartalmazzák, mely molekulákra jellemző, hogy (i) a CD40-hez immunspecifikusan kötődnek, (ii) a CD40 ligand CD40-hez kötődését legalább 45 %-kal növelik, és a natív S2C6 monoklonális ellenanyaghoz képest, amit a letétbe helyezett ATCC PTA-110 hozzáférési számú hibridóma szekretál, elsődleges aminosav szekvenciájukban egy vagy több helyettesítést vagy betoldást tartalmaznak. Egy specifikus megvalósítási formában a molekula nem a natív S2C6 monoklonális ellenanyag és a szóban forgó S2C6 monoklonális ellenanyag natív nehéz-, vagy könnyűláncát nem tartalmazza.

A találmány továbbá a szubjektumnál a rákbetegség gyógyítási vagy megelőzései, a szubjektumnál az immunválasz aktiválási és fokozási, vagy a szubjektumnál az immunhiány vagy a betegség kezelési és megelőzési eljárásaira vonatkozik, melyek a szubjektumba tisztított peptid beadását tartalmazzák, mely peptidre jellemző, hogy (i) a letétbe helyezett ATCC PTA-110 hozzáférési számú hibridóma által szekretált S2C6 és a CD40 kötődésben vetélkednek, (ii) a CD40 ligand kötődését a CD40-hez legalább 45 %-kal növelik, és (iii) a natív S2C6 monoklonális ellenanyaghoz képest, amit a letétbe helyezett ATCC PTA-110 hozzáférési számú hibridóma szekretál, elsődleges aminosav szekvenciájukban egy vagy több helyettesítést vagy betoldást tartalmaznak, vagy nem monoklonális S2C6 ellenanyag, amit a letétbe he-



lyezett ATCC PTA-110 hozzáférési számú hibridóma szekretál, és nem az S2C6 papainos vagy pepszines emésztésének eredménye. Egy specifikus megvalósítási formában a fehérje nem a natív S2C6 monoklonális ellenanyag és a szóban forgó S2C6 monoklonális ellenanyag natív nehéz-, vagy könnyűláncát nem tartalmazza.

A jelen találmány egyik specifikus megvalósítási formájában a módszerek a CD40 ligand szubjektumba történő beadását tartalmazzák.

A találmány továbbá a szubjektumba a rákbetegség vagy az immunbetegség gyógyításához vagy megelőzéséhez a szóban forgó kezeléshez vagy megelőzéshez elegendő molekulák beadását tartalmazza, mely molekulák (a) a CD40-hez immunspecifikusan kötődnek, miközben ez a molekula a CD40 kötődését a CD40 ligandhoz növeli; és (b) a CD40 ligand; mely esetben a molekula lehet a natív S2C6 mAb vagy a natív 5C3 vagy egy itt leírt S2C6 származék.

Egy előnyben részesített megvalósítási formában a szubjektum ember.

A találmány továbbá transzgenikus nem-humán állatra, növényre vagy elkülönített sejtre vonatkozik, mely egy vagy több fehérjét kódoló transzgént tartalmaz, mely fehérje a CD40-hez történő kötődésben a letétbe helyezett ATCC PTA-110 hozzáférési számú hibridóma által szekretált S2C6 monoklonális ellenanyaggal vetélkedik, és amely fehérje a CD40 ligand CD40-hez kötődését legalább 45 %-kal növeli.



Az ábrák rövid ismertetése

Az 1. ábra az S2C6 könnyűlánc variábilis régiójának felépítését mutatja be. A könnyűlánc variábilis ("V_L") régiójának nukleotid (a szekvencia száma: 1) és aminosav (a szekvencia száma: 2) szekvenciáját megadtuk.

A 2. ábra az S2C6 nehézlánc variábilis régiójának felépítését mutatja be. A nehézlánc variábilis ("V_H") régiójának nukleotid (a szekvencia száma: 6) és aminosav (a szekvencia száma: 7) szekvenciáját megadtuk.

A 3A-B. ábrák az S2C6 variábilis régióinak struktúráját mutatják be. (A) Az S2C6 V_L aminosav szekvenciáját (a szekvencia száma: 2) megadtuk. (B) Az S2C6 V_H aminosav szekvenciáját (a szekvencia száma: 7) megadtuk. A komplementaritást meghatározó régiókat ("CDR") aláhúztuk. A négy vázrégió szekvenciáját, a CDR-ek szomszédságában bemutattuk. A V_L CDR-ek 1-3 részeinek aminosav szekvenciáit a 3., 4. illetve 5. szekvenciaszámon adtuk meg. A V_H CDR-ek 1-3 részeinek aminosav szekvenciái a 8., 9. illetve 10. szekvenciának felel meg.

A 4. ábra bemutatja, hogy az S2C6 mAb fokozza a CD40-Ig kötődését a CD40L-t kifejező Jurkat T-sejtekhez. A CD40-Ig (oldható fúziós fehérje, mely a CD40-ből és humán immunglobulinból áll) kötődését a felszíni CD40L-hez az anti-CD40 monoklonális ellenanyag ("mAb") folyamatosan növekvő koncentrációinál vizsgáltuk. Az mAb-kat egy óráig előinkubáltuk CD40-Ig-vel,

majd 1 óráig a CD40L-t kifejező célsejtekkel inkubáltuk. A CD40-Ig kötődését a célsejtekhez fluoreszcein-izotiocianáttal jelölt anti-humán Ig-vel ("FITC"-jelölt) áramlási citométerben mutattuk ki. A CD40/CD40L kötődés mértékét ezután logaritmikus beosztású skálán az átlag fluoreszcencia intenzitás ("MFI") alapján határoztuk meg. Az MFI-ből levont populációs háttérrel szintén feltüntettük.

Az 5. ábra azt mutatja be, hogy az S2C6 mAb az oldható CD40L és a B-sejtek felszíni CD40-ének kötődését fokozza. A Ramos B-sejteket, ami egy humán B-sejtes limfóma, a következő monoklonális anti-CD40 ellenanyagok növekvő koncentrációival kezeltük: S2C6, G28-5 vagy M3, vagy kontrollként EXA2-1H8 mAb-t alkalmaztunk. Az mAb-kat 1 óráig előinkubáltuk a CD40-et kifejező célsejtekkel. Ezután a FITC jelölt CD40L kötődését a B-sejtekhez közvetlenül áramlási citometriával mutattuk ki. A CD40/CD40L kötődés mértékét ezután logaritmikus beosztású skálán az átlag fluoreszcencia intenzitás ("MFI") alapján határoztuk meg. A populációs háttérrel korrigált MFI-eket szintén feltüntettük.

6. ábra: Az S2C6 a primer humán perifériás B-sejtek proliferációs válaszát CD40L stimulátor sejtek és anti-CD40 mAb jelenlétében fokozza. A perifériás B-sejteket (1×10^5 /lyuk) növekvő számban nem-proliferáló CD40L Jurkat T stimulátor sejtekkel és ezen kívül a következő anti-CD40 monoklonális ellenanyagokkal (30 ng/ml) kombináltuk: S2C6, G28-5 vagy M3, vagy kontroll-



ként EXA2-1H8 mAb. A B-sejtek proliferációját ^3H -TdR beépüléssel a stimulus alkalmazását követően a 72. órában vizsgáltuk.

7. ábra: Az elsődleges humán perifériás B-sejtek proliferációs válaszának egybevetése az anti-CD40 mAb-vel CD40L jelenlétében, vagy hiányában: A perifériás B-sejteket nem-proliferáló CD40L stimulátor sejtekkel meghatározott 4:1 arányban egyesítettük, és növekvő koncentrációban a következő anti-CD40 mAb-ekkel kezeltük: S2C6, G28-5 vagy kontrollként EXA2-1H8. A B-sejtek proliferációját ^3H -TdR beépüléssel a stimulus alkalmazását követően a 72. órában vizsgáltuk.

8A-C. ábrák: Az S2C6 mAb antitumor aktivitása *in vivo*:

Az S2C6 antitumor aktivitását (A) Ramos humán B sejteken, ez egy non-Hodgkin-féle limfóma, (B) HS Sultan többszörös mielómán, vagy (C) IM-9 többszörös mielómán vizsgáltuk. A SCID egereket (5/csoport) a természetes ölöaktivitás ("NK") gátlása érdekében anti-aszialo-GM1-gyel vagy előkezeltük, vagy nem, és az $1 \cdot 10^6$ - $2 \cdot 10^6$ tumorsejttel végzett inkubációt követően az első és az 5. napon mAb-val kezeltük. A folyamatos vonalak időben az egerek számbeli túlélését mutatják.

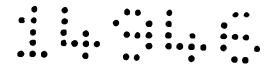
9. ábra: A BD1-S2C6 sFv ELISA-val vizsgálva a rögzített CD40-Ig-hez specifikusan kötődik: A BD1-S2C6 sFv-t (egyláncú anti-CD40 immuntóxin, melyben a bryodin 1 (BD1) az S2C6 monoklonális ellenanyag variábilis régiójához kötött) zárványtestként *E.coli*-ben expresszáltattuk, majd denaturáltuk és hagytuk ismételtelen feltekeredni. Az így feltekeredett fehérjét ezután Blue Sepharose-on elkülönítettük, majd CD40-Ig-vel töltött oszlopon



affinitás kromatográfiának vetettük alá. A tisztított fehérje kötődését ezután ELISA-val, kötött CD40-Ig-n vizsgáltuk. A mikrotiter lemezeket 0,5 $\mu\text{g/ml}$ CD40-Ig-vel fedtük, majd a tisztított BD1-S2C6 hígításait adtuk hozzá, a következő monoklonális ellenanyagok jelenlétében: 25 $\mu\text{g/ml}$ S2C6 mAb (Δ), 25 $\mu\text{g/ml}$ BR96 kontrol ellenanyag (o), vagy az ellenanyag feleslege nélkül ($\square$). A BD1-S2C6 sFv kötődését a rögzített receptorhoz BD1-specifikus nyúl antiszérum, majd tormaperoxidázzal konjugált kecske anti-nyúl Ig hozzáadásával vizsgáltuk. A BD1-S2C6 sFv kötődése a CD40-Ig-hez teljes mértékben gátolható az S2C6 mAb feleslegének hozzáadásával, de a kontroll mAb hozzáadásával nem.

A találmány részletes leírása

A jelen találmány az S2C6 gének által kódolt fehérjékre és azok nukleotid szekvenciáira vonatkozik. A találmány továbbá az S2C6 fehérjék és nukleinsavak fragmenseire és más származékaikra és analógjaira vonatkozik. Számos specifikus megvalósítási formában a találmány molekulái (például ellenanyagok) az S2C6 mAb egészét vagy részeit tartalmazzák (könnyűlánc és/vagy nehézlánc, vagy CDR 1 könnyűlánc (a szekvencia száma: 3), és/vagy 2 (a szekvencia száma: 4), és/vagy CDR 1 nehézlánc (a szekvencia száma: 8), 2 (a szekvencia száma: 9), és/vagy CDR 3 (a szekvencia száma: 10), vagy CDR3 könnyűlánc (a szekvencia száma: 5) kombinációban bármely más CDR-rel és/vagy a négy nehézlánc és a négy könnyűlánc egy vagy több vázrégiója, feltéve, hogy az ilyen molekulák nem a natív S2C6 mAb-t jelentik, ahogy



• azt a PTA-110 hozzáférési számon letétbe helyeztük, vagy ezek
nehéz- vagy könnyű láncai. Az ilyen molekulák az S2C6 szekven-
ciától különböznek és/vagy transzláció utáni módosításon estek
át (glikozilezés, amidálás, peptidkötés vagy keresztkötés nem-
S2C6 szekvenciával, stb.). A különböző specifikus megvalósítási
formákban a találmány szerinti molekula a CD40-hez immuns-
specifikusan kötődik (vagy, ha több egységből álló változatát
létrehozunk, akkor a CD40-hez immunspecifikusan kötődik), a
natív S2C6-tal a CD40 kötődésért vetélkedik, és/vagy a CD40L
kötődését a CD40-hez legalább 45 %-kal, 50 %-kal, 60 %-kal
vagy 65 %-kal növeli. Az ilyen molekulákat kódoló nukleinsavak,
például S2C6 fragmensek vagy származékok, szintén a jelen
találmány oltalmi körébe tartoznak, valamint azok a
nukleinsavak is, melyek a natív S2C6 mAb-t kódolják. A fenti
fehérjék termelését biztosítjuk, például rekombináns
eljárásokkal.

A találmány azokra az S2C6 fehérjékre és származékokra is
vonatkozik, beleértve, anélkül, hogy erre korlátoznánk
magunkat, a fúziós/kiméra fehérjéket, melyek a teljes
hosszúságú S2C6 mAb-vel társuló egy vagy több ismert
funkcionális aktivitást mutatják. Az ilyen funkcionális
aktivitások, anélkül, hogy erre korlátoznánk magunkat, a
következők: kötődési képesség a CD40-hez, a CD40 jelátviteli
útra stimuláló jel szállítása (például a B-sejtek proliferációjának
megindítása), a CD40L és a CD40 közötti kölcsönhatás fokozása,

- a tumoros növekedés gátlása, és az immunválasz indukálási képessége.

A CD40 ellenanyagokról a jelen találmány szintén gondoskodik, beleértve az S2C6-ot, származékait, és analógjait, melyek anélkül, hogy erre korlátoznánk magunkat, a következők: humanizált ellenanyagok, egyláncú ellenanyagok, bispecifikus ellenanyagok és kemoterápiás szerekhez vagy biológiai válaszokat módosító szerekhez konjugált ellenanyagok.

A találmány továbbá a rákbetegségek, a gyulladásos betegségek és immunrendszeri betegségek kezeléséhez vagy megelőzéséhez szükséges eljárásokra vonatkozik, melyek a találmány összetételének CD40L-el együtt, vagy anélkül történő beadását foglalják magukban.

A találmányt a 6-9. részben ismertetett példákon keresztül mutatjuk be, melyek *inter alia* a következőket teszik közzé: az S2C6 génklónozása és jellemzése; CD40/CD40L kölcsönhatás potenciozása; a tumoros növekedés gátlása; és az egyláncú anti-CD40 immunotoxin CD40-Ig-hez kötődése.

A közzététel világosabbá tételéhez, de anélkül, hogy azt korlátoznánk, a jelen találmány részletes leírása a következő alrészekre tagolódik.

Az S2C6 génklonálása

A találmány az S2C6 nukleinsav szekvenciáira vonatkozik. Az egyik specifikus megvalósítási formában az S2C6 nukleinsav az 1. és 6. cDNS szekvenciát, vagy az S2C6 fehérjét (például fe-



hérje, melynek szekvenciája 2. vagy 7.) kódoló nukleinsavat tartalmazza. A találmány tisztított nukleinsavakat biztosít, melyek legalább 8 nukleotidja (azaz hibridizálódó része) az S2C6 gén szekvenciája; egy másik megvalósítási formában a nukleinsav legalább 25 (folyamatos) nukleotidot, 50 nukleotidot, 100 vagy 200 nukleotidot tartalmaz az S2C6 génből, vagy a teljes hosszúságú S2C6 variábilis régióját kódoló szekvenciából. Azonos vagy másik megvalósítási formában a nukleinsav hosszban kisebb mint 50, 75, 100, vagy 200, vagy 5000 nukleotid. A nukleinsavak egyszálúak vagy kétszálúak lehetnek. A találmány az előző szekvenciákhoz vagy azok fordított komplementereihez hibridizálódni képes nukleinsavakra is vonatkozik, részletesebben az ilyen nukleinsavak azokat a fehérjéket kódolják, melyek a CD40-nel kapcsolódnak, az S2C6-tal a CD40 kötődésért vetélkednek, és/vagy a CD40 ligand kötődését a CD40-hez legalább 45 %-kal, 50 %-kal, 60 %-kal vagy 65 %-kal növelik. Specifikus nézőpontból azokról a nukleinsavakról gondoskodunk, melyek szekvenciája legalább 10, 25, 50, 100, vagy 200 nukleotid hosszban vagy az S2C6 variábilis régióját, vagy a kódoló gén teljes kódoló régiójában tartalmazzák.

Továbbá az S2C6 fehérjéket, származékait és analógjait kódoló nukleinsavakat is biztosítjuk. Ahogy az azonnal nyilvánvaló az itt használt "az S2C6 fehérje fragmensét vagy részét kódoló nukleinsav" szakkifejezés azokra a nukleinsavakra értelmezhető, melyekre itt mint az S2C6 fehérje folyamatos fragmenseit vagy



részeit kódoló fehérjékre hivatkozunk, és nem azokra vonatkozik, melyek az S2C6 fehérje további folyamatos részei.

Klónozási műveletek

A következőkben az S2C6 gén klónozásának specifikus megvalósítási formáival foglalkozunk. Az egyik specifikus megvalósítási formában az S2C6-ot termelő hibridómából a teljes RNS-t elkülönítettük és polimeráz láncreakcióval a kívánt variábilis régiók szekvenciáit megsokszoroztuk, felhasználva az itt közzétett szekvencián alapuló primereket. Bemutató jellegű példaként lásd a 6. részt. Egy másik példában az mRNS-t az S2C6 mAb-t termelő hibridómából izoláltuk, és egy olyan expressziós vektorba építettük be (például bakteriofág származék), mely a gazdasejtbe történő bejuttatás után képes azt kifejezni. Különböző szűrési vizsgálatokkal ezután a kifejezett terméket kiválaszthatjuk. Az egyik megvalósítási formában a kiválasztás a jelölt próbához történő hibridizálás alapján végezhető el, mely az S2C6 gén részét, RNS-ét vagy fragmensét képviseli [Benton és Davis: *Science*, 196, 180 (1977); Grunstein és Hogness: *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 72, 3961 (1975)]. Ezek a DNS fragmensek a próbával az alapvető homológia miatt hibridizálnak. Az is lehetséges, hogy restrikciós enzimes emésztésekkel a megfelelő fragmenseket azonosítsuk, és így a fragmensek méretét az ismert rendelkezésre álló restrikciós térképpel egybevetethetjük. A további izolálás a gén tulajdonságai alapján végezhető el.

Alternatívaként a kívánt gén jelenléte a kifejezett termékének fizikai, kémiai vagy immunológiai tulajdonságai alapján mutatható ki. Például a cDNS klónok, vagy a DNS klónok, melyeket a megfelelő mRNS-ekkel való hibridizációval választunk ki, izolálhatók és kifejezhetők olyan fehérjék termelése érdekében, amelyek az S2C6 fehérje ismert tulajdonságaihoz, például elektroforitikus vándorlásukban, izoelektromos fókuszálási viselkedésükben, proteolitikus hasítási térképükben vagy funkcionális aktivitásukban, hasonló, vagy azok tulajdonságaival megegyeznek. Például a CD40 kötőképessége ELISA (enzimmel kapcsolt immunszorbens vizsgálati módszer) típusú eljárással kimutatható.

Az S2C6 gén mRNS szelekcióval is azonosítható, felhasználva a nukleinsavak hibridizációját az *in vitro* átírást követően. Ebben a folyamatban a komplementer mRNS izolálásához a fragmenseket a hibridizálásnál használjuk fel. Az izolált mRNS-ek izolált termékeinek, *in vitro* transzlációs termékeinek funkcionális vizsgálati módszerei (például a CD40 kötődés, stb.) azonosítják az mRNS-t, és így azokat a komplementer DNS fragmenseket, melyek a kívánt szekvenciákat tartalmazzák.

Egy másik megvalósítási formában az S2C6 cDNS az itt közzétett szekvencia alapján kémiaailag szintetizálható. Az S2C6 gén izolálásának más eljárásai, melyek a szakirodalomban jártas szakemberek számára ismertek, szintén alkalmazhatók.

Az azonosított és elkülönített S2C6 gén/cDNS ezután a megfelelő klónozó vektorba beépíthető. A szakirodalomban ismert



számos vektor-gazda rendszer felhasználható. A lehetséges vektorok, anélkül, hogy erre korlátoznánk magunkat, a következők: plazmidok vagy módosított vírusok, azzal a feltétellel, hogy a vektorrendszernek az alkalmazott gazdasejttel összeférhetőnek kell lennie. Az ilyen vektorok közé, anélkül, hogy erre korlátoznánk magunkat a következők tartoznak: bakteriofágok, mint például lambda származékok, vagy plazmidok, mint például pBR322 vagy pUC plazmid származékok, vagy a Bluescript vektor (Stratagene). Az inszertálás a klónozó vektorba például a DNS fragmens klónozó vektorba ligálásával hajtható végre, mely folyamatnál mind a DNS fragmens, mind a klónozó vektor komplementer ragadós végekkel rendelkezik. Bár, ha a DNS fragmensekhez a komplementer restrikciós helyeket használjuk, akkor a DNS molekula végei enzimatikusan módosíthatók. Alternatívaként bármely kívánt hely a DNS végéhez történő kapcsoló nukleotid szekvenciák (linkerek) ligálásával állítható elő; ezek a ligált linkerek a restrikciós endonukleáz felismerő szekvenciáit kódoló kémiai szintetizált oligonukleotidok. Egy alternatív eljárásban a hasított vektor és az S2C6 gén homopolimer farokképzéssel, vagy a megfelelő szekvenciát tartalmazó primerekkel PCR-rel módosítható. A rekombináns molekulák a gazdasejtekbe transzformációval, transzekcióval, infekcióval, elektroporációval stb. úgy juttathatók be, hogy a gén szekvenciája sok kópiában kialakuljon.

Egy alternatív eljárásban a kívánt gén "shot gun" módszerrel azonosítható és izolálható, miután az alkalmas klónozó vektorba a DNS-eket beépítettük. Például a kívánt gén gazdagítása,

mielőtt a klónozó vektorba beépítenénk, méreten alapuló frakcionálással végezhető el.

A specifikus megvalósítási formákban a gazdasejtek rekombináns DNS-sel történő transzformálása, mely az elkülönített S2C6 gént, cDNS-t vagy szintetizált DNS szekvenciát foglalja magában, a gén számos kópiájának előállítását eredményezi. Így a transzformánsok növesztésével, a transzformánsokból a rekombináns DNS molekulák izolálásával, és ha szükséges, akkor az izolált rekombináns DNS-ből az inszertált gén kinyerésével a gén nagy mennyiségben megkapható.

A jelen találmány által biztosított S2C6 szekvenciák alapvetően ugyanazokat az aminosav szekvenciákat kódoló nukleotid szekvenciákat ölelik fel, melyek a natív S2C6 variábilis régiójának funkcionálisan egyenértékű aminosav szekvenciáit kódoló nukleotid szekvenciákban megtalálhatók, valamint az S2C6 azon származékainak vagy analógjainak szekvenciáit, melyeket az alábbiakban leírtunk.

Az S2C6 génnek kifejezése

Az S2C6 fehérjét vagy annak funkcionálisan egyenértékű fragmenseit vagy más származékait kódoló nukleinsav szekvenciák megfelelő expressziós vektorba építhetők, azaz olyan vektorokba, melyek a beépített gén kódoló szekvenciájának transzkripciójának és a transzlációjának szükséges szabályozó elemeit tartalmazzák. A szükséges transzkripció és transzláció

jelek a natív S2C6 génnel és/vagy az azt határoló régiókkal biztosíthatók.

A fehérjét kódoló szekvencia kifejezéséhez számos gazdavektor rendszer alkalmazható. Ezek közé, anélkül, hogy erre korlátoznánk magunkat a következők tartoznak: emlős sejt-rendszerek, melyeket vírussal fertőznek (például vakcinia vírus, adenovírus, stb.); vírussal fertőzött rovarsejt rendszerek (például bakteriovírus); mikroorganizmusok, mint például élesztő vektorokat tartalmazó élesztők, vagy bakteriofággal, DNS-sel, plazmid DNS-sel vagy kozmid DNS-sel transzformált baktériumok; transzgenikus növények vagy transzgenikus nem-humán állatok. A vektorok expressziós elemei erősségükben és specifitásukban változhatnak. Az alkalmazott gazdavektor rendszertől függően számos megfelelő transzkripciós vagy transzlációs elem alkalmazható.

A vektorba a DNS fragmensek beépítéséhez az előzőekben leírt eljárások bármelyike a kiméra gént tartalmazó expressziós vektor konstrukció kialakításához felhasználható, mely a megfelelő transzkripciós/transzlációs szabályozási jeleket és a fehérjét kódoló szekvenciát tartalmazza. Ezek az eljárások *in vitro* rekombináns DNS-t és szintetikus technikákat és *in vivo* rekombinánsokat (genetikai rekombináció) ölelhetnek fel. Az S2C6 fehérjét vagy peptidfragmenst kódoló nukleinsav szekvencia expressziója egy második nukleinsav szekvenciával úgy szabályozható, hogy az S2C6 fehérje vagy peptid a rekombináns DNS molekulával transzformált gazdában kifejeződjön. Például az S2C6 fehérje kifejezése a szakirodalomban ismert bármely promoter/enhancer



elemmel szabályozható. A nem natív S2C6 gén promoterek, melyekkel az S2C6 gén kifejeződése szabályozható, anélkül, hogy erre korlátoznánk magunkat, a következők: az SV40 korai promoter régió [Benoist és Chambon: *Nature*, 290, 304-310 (1981)], a Rous szarkóma vírus 3' hosszú terminális ismétlődésének promotere [Yamamoto és mtsai: *Cell*, 22, 787-797 (1980)], a herpesz timidinkináz promoter [Wagner és mtsai: *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 78, 1441-1445 (1981)], a melatonin gén szabályozó szekvenciái [Brinster és mtsai: *Nature*, 296, 39-42 (1982)]; prokarita expressziós vektorok, mint például a β -laktamáz promoter [Villa-Kamaroff és mtsai: *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 75, 3727-3731 (1978)], vagy a lac promoter [DeBoer és mtsai: *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 80, 21-25(1983); "Useful proteins from recombinant bacteria", *Scientific American*, 242,:74-94(1980)]; a nopalin szintetáz promoter régióját tartalmazó növényi expressziós vektorok [Herrera-Estrella és mtsai: *Nature*, 303, 209-213] vagy a kelvirág mozaik vírus 35S RNS promotere [Gardner és mtsai: *Nucleic Acids Research* 9, 2871 (1981)], és a fotoszintetikus enzim ribulóz-bifoszfát-karboxiláz promotere [Herrera-Estrella és mtsai: *Nature* 310, 115-120 (1984)]; az élesztő vagy más gomba promoter elemei, mint például a Gal 4 promoter, az ADC (alkoholdehidrogenáz) promoter, PGK (foszfoglicerol kináz) promoter, alkalikus foszfatáz promoter, és a következő állati eredetű transzkripciós szabályozási régiók, melyek



szövet-specifitást mutatnak és transzgenikus állatokban alkalmazhatók: elasztáz I gén szabályozó régiója, amely a hasnyálmirigy acináris sejtjeiben aktív [Swift és mtsai: *Cell*, 38, 639-646 (1984); Ornitz és mtsai: *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 50, 399-409 (1986); MacDonald: *Hepatology*, 7, 425-515 (1987)]; a hasnyálmirigy béta sejtjeiben aktív szabályozó régió [Hanahan: *Nature*, 315, 115-122 (1985)], a limfoid sejtekben aktív immunglobulin gént szabályozó régió [Grosschedl és mtsai: *Cell*, 38, 647-658 (1984); Adames és mtsai: *Nature*, 318, 533-538 (1985); Alexander és mtsai: *Molecular & Cellular Biology* 7, 1436-1444 (1987), a tesztikuláris, emlő, limfoid és hízósejtekben aktív emlős vírusok szabályozó régiói [Leder és mtsai: *Cell*, 45, 485-495 (1986)], a májban aktív albumin gén szabályozó régiója [Pinkert és mtsai: *Genes and Devel.*, 1, 268-276 (1987)], a májban aktív alfa-fetoprotein gén szabályozó régiója [Krumlauf és mtsai: *Molecular & Cellular Biology* 5, 1639-1648 (1985); Hammer és mtsai: *Science*, 235, 53-58 (1987)]; a májban aktív alfa 1-antitripszin gén szabályozó régiója [Kelsey és mtsai: *Genes and Devel.*, 1, 161-171 (1987)], béta-globin gén szabályozó régiója, mely a mieloid sejtekben aktív [Mogam és mtsai: *Nature*, 315, 338-340 (1985); Kollias és mtsai: *Cell*, 46, 89-94 (1986); az agy oligodendrocita sejtjeiben aktív bázikus fehérje génjének szabályozó régiója [Readhead és mtsai: *Cell*, 48, 703-712 (1987)]; a vázizmokban aktív miozin könnyűlánc gén szabályozó régiója [Sani: *Nature*, 314, 283-286 (1985)], a hipotalamuszban aktív



gonadotropin kibocsátó hormon szabályozó régiója [Mason és mtsai: Science, 234, 1372-1378 (1986)].

Egy specifikus megvalósítási formában az alkalmazott vektor az S2C6 gén nukleinsav szekvenciájához működésében kötötten promotert, egy vagy több replikációs kezdőpontot és szabadon megválaszthatóan egy vagy több szelekciós markert (például antibiotikum rezisztencia gént) tartalmaz.

Az S2C6 gént tartalmazó expressziós vektorok három általános eljárással azonosíthatók: (a) nukleinsav hibridizálás; (b) a "marker" gén funkciójának jelenléte vagy hiánya; és (c) a beépített szekvenciák kifejezése. Az első megközelítésben a beépített S2C6 gén jelenlétét egy expressziós vektorban nukleinsav hibridizációval lehet kimutatni, felhasználva olyan próbákat, melyek a beépített S2C6 génnel homológ szekvenciát tartalmaznak. A második megközelítésben a rekombináns vektor/gazda rendszert bizonyos "marker" gén funkciók jelenlétének vagy hiányának alapján lehet kimutatni (például timidinkináz aktivitás, antibiotikum rezisztencia, transzformációs fenotípus, a bakulovírusnál zárványtest képződés, stb.) amit az S2C6 gén vektorba építése okoz. Például, ha az S2C6 gént a vektor markergén szekvenciájába inszertáljuk, akkor az S2C6 inszertet tartalmazó rekombinánsok a markergén funkciójának megléte vagy hiánya alapján azonosíthatók. A harmadik megközelítésben a rekombináns expressziós vektorok a rekombinánsok által kifejezett S2C6 termék vizsgálatával azonosíthatók. Az ilyen vizsgálati eljárások például a következőkön ala-



pulnak: az *in vitro* vizsgálati rendszerben az S2C6 fehérje fizikai vagy funkcionális tulajdonságain, például a CD40L és a CD40 kötődés stimulálásán; a normális B-sejtek proliferációjának stimulálásán; a tumoros növekedés gátlásán.

Ha egyszer az adott rekombináns DNS molekulát azonosítottuk, akkor a szakirodalomban ismert számos eljárással megsokszorozható. Ha a megfelelő gazdarendszert és növesztési körülményeket kialakítottuk, akkor a rekombináns expressziós vektorok nagy mennyiségben felszaporíthatók és előállíthatók. Ahogy azt az előzőekben megmagyaráztuk, az alkalmazható rekombináns vektorok vagy származékaik, anélkül, hogy erre korlátoznánk magunkat, a következők: humán vagy állati vírusok, mint például vakcinia vírus vagy adenovírus; rovar vírusok, mint például bakulovírus; élesztő vektorok, bakteriofág vektorok (például lambda fág), és plazmid és kozmid DNS vektorok, hogy csak néhányat említsünk.

Továbbá olyan gazdasejt vonalakat választhatunk, melyek a kívánt speciális módon a beépített szekvenciák expresszióját módosítják, vagy a génterméket módosítják és alakítják. Bizonyos promoterekkel végzett kifejezés bizonyos indukáló anyagok jelenlétében fokozható; így a géntechnikai módszerekkel kialakított S2C6 fehérje kifejezése szabályozható. Továbbá a különböző gazdasejteknek a transzlációs és a transzláció utáni mechanizmusai és módosításai (például a fehérje glikozilezése, foszforilezése) jellegzetesek és specifikusak. A megfelelő sejtvonalak vagy gazdasejt rendszerek a kifejezendő idegen fehérje kívánt módosítása és



alakítása érdekében megválaszthatók. Például a bakteriális rendszerekben az expresszió nem-glikozilezett alapfehérje termék termeléséhez használható. Az élesztőkben végzett kifejezés glikozilezett terméket eredményez. Az emlős sejtekben az expresszió a heterológ fehérje "natív" glikozilezéséhez használható. Továbbá, a különböző vektor/gazda rendszerek az alakító folyamatokat különböző mértékben befolyásolják.

A specifikus megvalósítási formákban a kifejeztetett S2C6-vel rokon fehérjék ellenanyagok vagy azok fragmensei vagy származékai. A rekombináns ellenanyag rekombináns könnyűlánc variábilis domént, rekombináns nehézlánc variábilis domént vagy mindkettőt tartalmazhat. Az egyik specifikus megvalósítási formában mind a könnyű-, mind a nehézláncot vagy ezek származékait rekombináns sejtekkel fejeztetjük ki [Boss és mtsai: 4,816,397 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi bejelentés (1989)]. A fehérjét kódoló szekvencia kifejezéséhez számos gazda-vektor rendszer alkalmazható. Ezek közül, anélkül, hogy erre korlátoznánk magunkat, a következőket említjük: vírussal fertőzött emlős sejtszrendszerek (például vakcinia vírus, adenovírus, stb.); vírussal fertőzött rovarsejt rendszerek (például bakulovírus); mikroorganizmusok, mint például élesztő vektort tartalmazó élesztő, vagy bakteriofággal, DNS-sel, plazmid DNS-sel, vagy kozmid DNS-sel transzformált baktériumok; transzgenikus növények vagy transzgenikus nem-humán állatok.

A géntermékek azonosítása és tisztítása



Egy sajátos szempontból a találmány az S2C6 fehérjét vagy azok fragmenseit vagy származékait biztosítja, melyek a komplementaritást meghatározó régiót (CDR) tartalmazzák, amelyek máskülönben funkcionálisan aktívak, valamint a találmány az előzőeket kódoló nukleinsav szekvenciákat is felöleli. A "funkcionálisan aktív" S2C6 anyag, ahogy azt itt használtuk, olyan anyagra vonatkozik, mely a teljes hosszúságú (natív) S2C6 fehérje egy vagy több funkcionális aktivitását mutatja, például a CD40-hez kötődik; a normális B-sejtek proliferációját stimulálja; a tumoros növekedést gátolja; a CD40 ligand CD40-hez kötődését legalább 45 %-kal növeli.

A specifikus megvalósítási formákban a találmány az S2C6 fragmenseiről, melyek legalább 6 aminosav, 10 aminosav, 20 aminosav, 50 aminosav, 75 aminosav vagy legalább 100 aminosav hosszúságúak, és az ezeket kódoló nukleinsavakról gondoskodik.

Ha egyszer már az S2C6 gént kifejező rekombinánszt azonosítottuk, akkor a géntermék analizálható. Ez elérhető a termék fizikai vagy funkcionális tulajdonságain alapuló vizsgálati módszerrel, beleértve a radioaktív jelölést, melyet gélelektroforézises analízis követ, immunvizsgálati eljárást, a normális B-sejtek proliferációjának stimulálását, a CD40 ligand CD40-hez kötődésének elősegítését, a tumoros növekedés gátlását, stb.

Ha az S2C6 fehérjét azonosítottuk, akkor standard eljárásokkal elkülöníthető és tisztítható, beleértve a kromatográfiát



(például ioncserélő, affinitás, és méreten alapuló kromatográfiát) centrifugálást, az eltérő oldékonyságon alapuló eljárást, vagy bármely standard fehérjetisztítási technikát. A funkcionális tulajdonságok bármely megfelelő módszer segítségével.

Alternatívaként az S2C6 fehérje vagy annak származéka az itt közzétett szekvencia alapján a szakirodalomban ismert standard kémiai módszerrel szintetizálható [Hunkapiller és mtsai: Nature, 310, 105-111 (1984)].

A jelen találmány egyik specifikus megvalósítási formájában az ilyen S2C6 fehérjék, függetlenül attól, hogy rekombináns DNS technikákkal vagy kémiai szintetikus módszerekkel állították elő, vagy a natív fehérjét tisztították, anélkül, hogy erre korlátoznánk magunkat, a következők: melyek elsődleges aminosav szekvenciája részben vagy teljesen a 3A-B. ábrákon feltüntetett aminosav szekvenciákkal (a szekvenciák száma: 2 és 7), valamint ezek fragmenseivel, származékaival és analógjaival, beleértve az ezekkel homológ fehérjéket, alapvetően megegyezik.

Az S2C6 génnek és fehérjék felépítése

Az S2C6 génnek és a találmány szerinti fehérjék struktúrája a szakirodalomban ismert különböző eljárással analizálható. Ezen eljárások néhány példáját az alábbiakban ismertetjük.

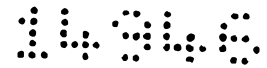
Genetikai analízis

A klónozott DNS vagy az S2C6 génnek megfelelő cDNS-e anélkül, hogy erre korlátoznánk magunkat a következő eljárások-

kal analizálható: Southern hibridizáció [Southern: Journal of Molecular Biology 98, 503-517(1975)], Northern hibridizáció [Freeman és mtsai: Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 80, 4094-4098 (1983)], restrikciós endonukleáz térképezés [Maniatis: Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1982)] és DNS szekvencia analízis. Ennek megfelelően a találmány az S2C6 gént felismerő nukleinsav próbát is biztosítja. Például a polimeráz láncreakcióval (PCR) [4,683,202, 4,683,195 és 4,889,818 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi bejelentések; Gyllenstein és mtsai: Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 85, 7652-7656 (1988); Ochman és mtsai: Genetics, 120, 621-623 (1988); Loh és mtsai: Science, 243, 217-220 (1989)], melyet egy S2C6 génre specifikus próbával végzett Southern hibridizáció követ a DNS-ben vagy a sejtekből származó DNS-ben (például hibridóma) az S2C6 gén kimutatása lehetővé válik. A PCR eljáráson kívül más általánosan ismert sokszorozási eljárás is alkalmazható. Mind a Southern, mind a Northern hibridizáció szigorú körülményei módosíthatók azon nukleinsavak kimutatásának biztosítása érdekében, melyek a specifikus S2C6 génpróbával kívánt fokú rokonságot mutatnak.

E módszerek módosításai és más, a szakirodalomban általánosan ismert módszerek alkalmazhatók.

A restrikciós endonukleáz térképezés felhasználható az S2C6 gén genetikai felépítésének durva meghatározásához. A restrikciós endonukleázos hasításokkal kapott restrikciós térké-



pek a DNS szekvencia analízissel megerősíthetők. A DNS szekvencia analízisek a szakirodalomban ismert bármelyik technikával végrehajthatók, beleértve, anélkül, hogy erre korlátoznánk magunkat, a következő eljárásokat: a Maxam és Gilbert eljárás [Maxam és Gilbert: Meth. Enzymol., 65, 499-560(1980)], a Sanger didezoxi eljárás [Sanger és mtsai: Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 74, 5463 (1977)], a T7 DNS polimeráz használata [Tabor és Richardson: 4,795,699 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi bejelentés], vagy az automatikus DNS szekvenátor alkalmazása (például Applied Biosystems, Foster City, California).

A fehérjék analízise

Az S2C6 fehérje aminosav szekvenciája a DNS szekvenciából levezethető, vagy alternatívaként közvetlenül a fehérje szekvenálásából, például automatikus aminosav szekvenátorral. Az S2C6 fehérje szekvenciája hidrofilitást vizsgáló eljárással tovább jellemezhető [Hopp és Woods: Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 78, 3824(1981)]. A hidrofilitási profil felhasználható az S2C6 hidrofób és a hidrofil (potenciálisan immunogén) régióinak meghatározásához, valamint az ezeket a régiókat kódoló megfelelő génszekvenciák kikövetkeztetéséhez. A másodlagos, strukturális analízis [Chou és Fasman, Biochemistry, 23, 222 (1974)] szintén elvégezhető, mellyel az S2C6 fehérje azon régióit azonosíthatjuk, melyek a másodlagos szerkezetre specifikusak. A szakirodalomban ismert komputer



programokkal manipulációk, transzlációs jóslás és a másodlagos struktúra, a nyitott olvasási keret kikövetkeztetése, feltérképezése, valamint a szekvencia homológiák meghatározása szintén elvégezhető.

Az S2C6 mAb származékai

Az itt leírt S2C6 ellenanyag származékok termelésére vonatkozó eljárások a CD40-hez immunspecifikus kötődést tesznek lehetővé.

Az ilyen ellenanyagok, anélkül, hogy erre korlátoznánk magunkat, lehetnek monoklonálisok, humanizáltak, kiméra, egyláncú, bispecifikusak, Fab fragmensek, $F(ab')_2$ fragmensek, az Fab expressziós könyvtár által létrehozott fragmensek, anti-idiotipusos (anti-Id) ellenanyagok és a fentiek bármely epitópkötő fragmensei. Az egyik megvalósítási formában az S2C6 származékok elsődleges aminosav szekvenciájukban egy vagy több hiányt, kiegészítést és/vagy helyettesítést tartalmazhatnak. Más megvalósítási formában az S2C6 származékok nem a papainos vagy a pepszines S2C6 emésztésből erednek. Még egy másik megvalósítási formában az S2C6 származékok elsődleges aminosav szekvenciájukban egy vagy több hiányt, kiegészítést és/vagy helyettesítést tartalmazhatnak és ezek nem a papainos vagy a pepszines S2C6 emésztésből erednek. A megfelelő hiányok, kiegészítések és/vagy helyettesítések irányelveit ebben és az előző a részben megadtuk.



A CD40 további monoklonális ellenanyaginak elkészítéséhez bármely olyan technika alkalmazható, mely folyamatos sejtvonalakkal az ellenanyag molekulák termelését biztosítja. Ezek közé, anélkül, hogy erre korlátoznánk magunkat, a következők tartoznak: hibridóma technika [Kohler és Milstein: *Nature*, 256, 495-497(1975); és 4,376,110 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi bejelentés], a humán B-sejtes hibridóma technika [Kozbor és mtsai: *Immunology Today*, 4, 72(1983); Cole és mtsai: *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 80, 2026-2030(1983)]; és az EBV-hibridóma technika, mely a humán monoklonális ellenanyagok termeléséhez felhasználható [Cole és mtsai: *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., 77-96(1985)]. Az ilyen ellenanyagok és más, a szakirodalomban rendelkezésre álló anti-CD40 ellenanyagok például annak alapján használhatók, hogy klónozás után komplementer könnyűláncot kapunk, ha az S2C6 nehézlánc rekombinánsan kifejezett (a két lánc azonos sejtben rekombinánsan kifejezhető, vagy miután külön-külön kifejezték és tisztították azokat, egyesíthetők); alternatívaként bármely specifikitású ellenanyagból a könnyűlánc felhasználható. A több részből álló fehérje kifejezéséhez az S2C6 nehézláncát (például plazmid), vagy az S2C6 nehézlánc variábilis doménját tartalmazó molekulákat kódoló nukleinsavak sejtekbe transzfektálhatók, melyek az eleve ellenanyagot, vagy az ellenanyag könnyűláncát tartalmazó molekulát kifejezik, ahol az ellenanyag könnyűlánc rekombináns vagy nem rekombináns lehet, és vagy rendelkezik



anti-CD40 specifitással, vagy nem. Alternatívaként az S2C6 nehézláncok vagy molekulák, melyek ezek variábilis régióját vagy CDR-jét tartalmazzák szabadon megválaszthatóan kifejeztethetők és a komplementer könnyűlánc vagy a könnyűlánc variábilis régiója nélkül használhatók. A különböző megvalósítási formákban a találmány biztosítja az S2C6 nehézlánc CD40 kötő affinitását, vagy alternatívaként olyan molekulát biztosít, mely egy vagy több nehézlánc CDR 8, 9 és/vagy 10 kópiát, vagy olyan fehérje (peptid vagy polipeptid) szekvenciát tartalmaz, mely a CDR 8, 9 vagy 10 egy vagy több kópiáját tartalmazza. Egy specifikus megvalósítási formában az ilyen fehérjék N- vagy C-terminálisan módosítottak lehetnek, például C-terminális amidálással vagy N-terminális acilezéssel.

Továbbá, a "kiméra ellenanyagok" előállításának eljárásai is alkalmazhatók [Morrison és mtsai: Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 81, 6851-6855(1984); Neuberger és mtsai: Nature, 312, 604-608 (1984); Takeda és mtsai: Nature, 314, 452-454(1985)], melyek a megfelelő antigén specifitású egér ellenanyag molekulák génjeinek illesztését foglalják magukban olyan génekkel, melyek a megfelelő biológiai aktivitású humán ellenanyag génekből származnak. A kiméra ellenanyag olyan molekula, melyben a különböző részek különböző állati fajokból származnak, így például a variábilis régió az egér mAb-ból, míg az állandó régió a humán immunglobulinból származik [Cabilly és mtsai: 4,816,567 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi bejelentés; és Boss és mtsai: 5,816,397 számú



Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi bejelentés]. Egy specifikus megvalósítási formában a kiméra ellenanyag az ATCC PTA-110 letéti számú hibridóma által szekretált S2C6 monoklonális ellenanyag variábilis doménjából és egy humán állandó régióból áll. A specifikus megvalósítási formákban a kiméra ellenanyag variábilis doménja a 3A. ábrán feltüntetett S2C6 VL-t (a szekvencia száma: 2.) és/vagy a 3B. ábrán feltüntetett S2C6 VH-t (a szekvencia száma: 7.) tartalmazza.

Továbbá, technikákat fejlesztettek ki a humanizált ellenanyagok termeléséhez [Queen: 5,585,089 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi bejelentés; és Winter: 5,225,539 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi bejelentés]. Egy immunglobulin könnyű- vagy nehézláncának variábilis régiója "váZRégiót" tartalmaz, melyet három hipervariábilis régió szakít meg, amelyeket komplementaritást meghatározó régióknak nevezünk (CDR-ek). A váZRégió és a CDR-ek kiterjedése pontosan meghatározott [Kabat és mtsai: "Sequences of Proteins of Immunological Interest", U.S. Department of Health and Human Services (1983)]. Röviden, a humanizált ellenanyagok nem-humán fajok ellenanyag molekuláiból származnak, melyek a nem-humán faj egy vagy több CDR-jét és a humán immunglobulin molekula váZRégióit tartalmazzák.

A találmány ellenanyag vagy származék nehéz- vagy könnyűlánc variábilis domént tartalmaz, ahol a szóban forgó variábilis domén a következőkből áll: (a) három komplementaritást meghatározó régió készlete (CDR-ek), melyekben a szóban

forgó CDR készlet az S2C6 monoklonális ellenanyagból van, és b) négy vázrégió készlete, melyben a szóban forgó vázrégió készlet az S2C6 monoklonális ellenanyagból ered, és amelyben a szóban forgó ellenanyag vagy származék a CD40-hez immunspecifikusan kötődik. Előnyösen a vázrégiók készlete egy humán monoklonális ellenanyagból származik, például humán monoklonális ellenanyagból, mely a CD40-hez nem kötődik.

Egy specifikus megvalósítási formában a találmány ellenanyag vagy ellenanyag származékkal foglalkozik, mely könnyűlánc variábilis domént tartalmaz, ahol a szóban forgó variábilis domén a következőkből áll: (a) három komplementaritást meghatározó régió készlete (CDR-ek), melyekben a szóban forgó CDR készlet a 3. vagy a 4. szekvenciát tartalmazza, és b) négy vázrégió készlete, melyben a szóban forgó vázrégió készlet az S2C6 monoklonális ellenanyagból könnyűláncából származik, és amelyben a szóban forgó ellenanyag vagy ellenanyag származék a CD40-hez immunspecifikusan kötődik.

A jelen találmány egyik specifikus megvalósítási formája ellenanyagokra vagy azok származékaira vonatkozik, melyek a nehézlánc variábilis domént tartalmazzák, ahol a szóban forgó variábilis domén a következőkből épül fel (a) három komplementaritást meghatározó régió készlete (CDR-ek), melyekben a szóban forgó CDR készlet a 8., 9. vagy a 10. szekvenciát foglalja magában, és b) négy vázrégió készlete, melyben a szóban forgó vázrégió készlet az S2C6 monoklonális ellenanyagból nehézlánc



vázrégiótól eltér, és amelyben a szóban forgó ellenanyag vagy származék a CD40-hez immunspecifikusan kötődik.

Alternatívaként az egyláncú ellenanyagok előállításai technikai [4,946,778 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi bejelentés; Bird: Science, 242, 423-426 (1988); Huston és mtsai: Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 85, 5879-5883 (1988); és Ward és mtsai: Nature, 334, 544-546 (1989)] az egyláncú S2C6 szekvenciák előállításához adaptálhatók. Az egyláncú ellenanyagok az Fv régió nehézlánc és a könnyűlánc fragmenseinek aminosav kapcsolásával alakíthatók ki, melynek eredményeként egyláncú polipeptidet kapunk. Az egyik specifikus megvalósítási formában az egyláncú ellenanyag a 3A-B. ábrán (a szekvencia száma: 2. illetőleg 7.) feltüntetett aminosav szekvenciát tartalmazza.

Egy specifikus megvalósítási formában a CD40 ellen kialakított polipeptidek, peptidek vagy más származékok, vagy ezek analógjai, bispecifikus ellenanyagok, melyek az 1. vagy a 6. szekvencia egészét vagy annak részét tartalmazzák [Fanger és Drakeman, Drug News and Perspectives, 8, 133-137 (1995)]. Az ilyen bispecifikus ellenanyagot genetikailag úgy alakítjuk át, hogy mind (1) az epitópot, mind (2) a "trigger" molekulák egyikét felismerje, például a mieloid sejteken az Fc receptorokat, és a T-sejteken a CD3-at és a CD2-t, melyekről megállapították, hogy az adott célpont lerombolásához a citotoxikus T-sejteket aktiválják. Az ilyen bispecifikus ellenanyagok mind kémiai konjugációval, hibridóma technikával, mind rekombináns molekuláris biológiai

technikákkal a szakemberek számára ismert módon előállíthatók. Egy specifikus megvalósítási formában a bispecifikus ellenanyag az S2C6 nehéz- vagy könnyűlánc variábilis domént vagy azok egyik CDR szekvenciáját tartalmazó molekula, mely a nehéz- vagy a könnyűlánc struktúrájával rendelkeznek, de a natív S2C6 nehéz- vagy a könnyűlánctól különbözik (például a vázrégióban vagy a humán állandó doménban aminosav helyettesítés(ek)e)t tartalmaz).

Az ellenanyag fragmensek, melyek a CD40 felismerési képességüket megtartják, ismert technikákkal állíthatók elő. Például az ilyen fragmensek közé, anélkül, hogy erre korlátoznánk magunkat, a következők tartoznak: Az $F(ab')_2$ fragmens, mely az ellenanyag molekula és az $F(ab')$ fragmensek pepszines emésztésével nyerhetők; melyek $F(ab')_2$ fragmensek diszulfidhíd kötéseinek redukálásával alakíthatók ki. Alternatívaként létrehozhatók az Fab expressziós könyvtárak, a kívánt specifitású monoklonális Fab fragmensek gyors és könnyű azonosításához [Huse és mtsai: Science, 246, 1275-1281(1989)].

S2C6 fehérjék származékok és analógok

A fenti részben leírt ellenanyag molekulákon/változatokon kívül a találmány továbbá az S2C6 fehérjékre, származékokra (beleértve, anélkül, hogy erre korlátoznánk magunkat, a fragmenseket), analógokra és S2C6 fehérje molekulákra vonatkozik. Az S2C6 fehérje származékokat és fehérje analógokat kódoló nukleinsavakról szintén gondoskodunk. Az egyik megvalósítási

formában az S2C6 fehérjét a fenti részben leírt nukleinsavak kódolják. A találmány egy különös nézőpontjában a fehérjék, származékok vagy analógok az 1. vagy a 6. szekvenciákkal kódoltak.

Az S2C6 fehérjével rokon származékok és analógok a jelen találmány oltalmi körébe tartoznak. Egy specifikus megvalósítási formában a származék vagy analóg funkcionálisan aktív, azaz a teljes hosszúságú S2C6 fehérjével társuló egy vagy több aktivásra képes. Az egyik ilyen példa azokra a származékokra vagy analógokra vonatkozik, melyek a kívánt kötési specifitással az immunológiai vizsgálati módszerben vagy a tumoros növekedés gátlásában, stb. felhasználhatók. Egy specifikus megvalósítási forma az S2C6 fehérje fragmensre vonatkozik, mely a CD40-hez kötődik és a CD40L kötődését a CD40-hez elősegíti. Az S2C6 fehérje származékok vagy analógok a kívánt aktivitásra a szakirodalomban ismert immunológiai vizsgálatokkal tesztelhetők, beleértve, anélkül, hogy erre korlátoznánk magunkat, a vetélkedési vagy a vetélkedés nélküli vizsgálati rendszereket, felhasználva a radioimmun vizsgálati módszereket, az enzimmel kapcsolt immunszorbens vizsgálatokat (ELISA), a "szendvics" technikákat, a Western lenyomatolást, az immunfluoreszcens vizsgálatokat, a protein A vizsgálatot, az immunelektroforézisen alapuló vizsgálati módszereket, stb.

Továbbá, a szakirodalomban ismert vizsgálati eljárások a sejtproliferáció gátlás (például a tumoros sejtek növekedésének gátlása) vagy a sejt proliferáció stimulálás (például a B-sejtek



proliferációja) *in vivo* vagy *in vitro* kimutatására vagy mérésére alkalmazhatók.

Részletesebben az S2C6 származékok az S2C6 szekvenciák megváltoztatásával, így helyettesítéssel, hozzáadással (például inszertálás) vagy elvétellel, funkcionális egyenértékűség biztosítása mellett készíthetők el. A nukleotid kódoló szekvencia degeneráltsága miatt az S2C6 aminosav szekvenciát lényegileg kódoló más DNS szekvenciák a jelen találmány gyakorlatában felhasználhatók. Ezek közé, anélkül, hogy erre korlátoznánk magunkat, azok a nukleotid szekvenciák tartoznak, melyek az S2C6 gén teljes egészét vagy annak egy részét tartalmazzák, melyeket az eltérő kodonok helyettesítése megváltoztatnak, melyek a szekvenciában a funkcionálisan egyenértékű aminosavakat kódolják, így ezek a változások nem nyilvánulnak meg. Hasonlóan a jelen találmány S2C6 származékai közé tartoznak, anélkül, hogy erre korlátoznánk magunkat, a következő szekvenciák: elsődleges aminosav szekvencia, mely az S2C6 fehérje aminosav szekvenciájának egészét vagy egy részét tartalmazzák, beleértve a szekvencia funkcionálisan egyenértékű aminosavainak helyettesítéseit, melyek nem nyilvánulnak meg. Például a szekvenciában egy vagy több aminosav helyettesíthető azonos polaritású más aminosavval, mely funkcionálisan egyenértékű, és így ezek a változások nem nyilvánulnak meg.

A szekvenciában az aminosavak helyettesítései más csoportból is elvégezhetők, mint amihez az aminosav tartozik. Például a nem poláros (hidrofób) aminosavak közé az alanin, leucin,

izoleucin, valin, prolin, fenilalanin, tiptofán és a metionin tartozik. A poláros semleges aminosavak közé a glicin, szerin, treonin, cisztein, tirozin, aszparagin és a glutamin tartozik. A pozitívan töltött (bázikus) aminosavak közé az arginin, lizin és a hisztidin tartozik. A negatívan töltött (savas) aminosavak közé az aszparaginsav és a glutaminsav tartozik. Az ilyen helyettesítéseket általánosan konzervatívnak nevezik.

A jelen találmány egy specifikus megvalósítási formájában az S2C6 fehérjét tartalmazó fragmensek, az itt biztosított S2C6 fehérje legalább 10 (folyamatos) aminosavból álló részét tartalmazzák. Más megvalósítási formákban a fragmens az S2C6 fehérje legalább 20, vagy legalább 50 aminosavát tartalmazza. A specifikus megvalósítási formákban az ilyen fragmensek hosszabbak, mint 50, 75, 100 vagy 200 aminosav. Az S2C6 fehérje származékai közé, anélkül, hogy erre korlátoznánk magunkat, a következők tartoznak: az S2C6 fehérje vagy annak fragmensének lényegileg homológ régiói, például, melyek a különböző megvalósítási formákban legalább 60 %-ban, vagy 70 %-ban, vagy 80 %-ban, vagy 90 %-ban, vagy 95 %-ban az inszerciót vagy deléciót nem tartalmazó azonos méretű aminosav szekvenciával megegyeznek (ahol az elrendezést a szakirodalomban ismert homológiát vizsgáló programmal végezték) vagy az S2C6 gén szekvenciáját kódoló nukleinsavval nagy, közepes vagy kis erősségű körülmények között hibridizálni képesek.



Részletesebben a homológiát vizsgáló programok példái, anélkül, hogy erre korlátoznánk magunkat, a következők: TBLASTN, BLASTP, FASTA, TEASTA és CLUSTALW [Pearson és Lipman: Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 85(8), 2444-2448 (1988); Altschul és mtsai: Journal of Molecular Biology 215(3), 403-410 (1990); Thompson és mtsai: Nucleic Acids Research 22(22), 4673-4680 (1994); Higgins és mtsai: Methods Enzymol, 266, 383-402 (1996); Altschul és mtsai: Journal of Molecular Biology 215(3), 403-410 (1990)]. Az alapbeállítási értékek mindegyik programnál ismertek és azok alkalmazhatók.

Részletesen, a Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (www.ncbi.nlm.nih.gov) [Altschul és mtsai: Journal of Molecular Biology 215, 403-410 (1990)], "The BLAST Algorithm" [Altschul és mtsai: Nucleic Acids Research 25, 3389-3402 (1997)] heurisztikus keresési algoritmus, melyet azoknak a szekvencia hasonlóságoknak a keresésére alakítottak ki, melyek jelentősnek tekinthetők, felhasználva Karlin és Altschul statisztikai módszerét [Karlin és Altschul: Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 87, 2264-2268 (1990); Karlin és Altschul: Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 90, 5873-5877 (1993)]. Az öt specifikus BLAST program a következő feladatokat hajtja végre: 1) A BLASTP program a kérdéses aminosav szekvenciát összehasonlítja a fehérje adatbázisban található szekvenciákkal; 2) A BLASTN program a kérdéses nukleinsav szekvenciát összehasonlítja a nukleotid szekvenciák adat-



bázisában található szekvenciákkal; 3) A BLASTX program a kérdéses nukleotid transzlációs termék hat keretét (mindkét szátra nézve) összehasonlítja a fehérje adatbázisban található szekvenciákkal; 4) A TBLASTN program a kérdéses fehérje szekvenciát mind a hat leolvasási keretben összehasonlítja a transzlációs adatbázisban található nukleotid szekvenciákkal (mindkét szátra nézve); 5) A TBLASTX program a kérdéses nukleotid szekvencia hat olvasási keretét a transzlált nukleotidok adatbázisával hasonlítja össze.

A Smith-Waterman (adatbázis: European Bioinformatics Institute www.ebi.ac.uk/bic_sw/) [Smith-Waterman: Journal of Molecular Biology 147, 195-197(1981)] algoritmussal a szekvencia elrendezések matematikailag igen pontosan vizsgálhatók.

A FASTA [Pearson és mtsai: Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 85, 2444-2448 (1988)] a Smith-Waterman algoritmus heurisztikus megközelítése. A BLAST eljárás és a Smith-Waterman, valamint a FASTA algoritmus általános megvitatásáról és előnyeiről a szakirodalomban olvashatunk [Nicholas és mtsai: "A Tutorial on Searching Sequence Databases and Sequence Scoring Methods" (www.psc.edu) (1998), valamint az itt található hivatkozások szintén forrásként szolgálhatnak].

A találmány S2C6 származékai és analógjai a szakirodalomban leírt különböző eljárásokkal előállíthatók. Termelésüket biztosító manipulálások mind gén, mind fehérje szinten történhetnek. Például a klónozott S2C6 gén szekvencia a



szakirodalomban ismert számos stratégia bármelyikével módosítható [Sambrook és mtsai: Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2. kiadás, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York(1989)]. A szekvenciát a megfelelő helyeken restrikciós endonukleázokkal hasíthatjuk, majd ezt követően, ha szükséges, enzimatikusan módosíthatjuk, és *in vitro* ligálhatjuk. Az S2C6 fehérje származékot vagy analógot kódoló módosított gén termelésében figyelemmel kell lennünk arra, hogy a módosított gén azonos transzlációs olvasási keretben maradjon, mint a natív fehérje és transzlációs stop-jel ne szakítsa meg azokban a génrégiókban, amelyek a kívánt S2C6 funkciót kódolja.

Továbbiakban az S2C6 nukleinsav szekvencia a transzlációs, iniciációs és/vagy terminációs szekvenciák létrehozásához és/vagy megszüntetéséhez, vagy a kódoló régiókban változatok kialakításához, és/vagy új restrikciós helyek kialakításához, vagy a már meglévők megszüntetéséhez, a további *in vitro* módosításokhoz *in vitro* vagy *in vivo* mutáltatható. A szakirodalomban ismert bármely mutagenézis technika alkalmazható, beleértve, anélkül, hogy erre korlátoznánk magunkat, a kémiai mutagenézist, az *in vitro* helyspecifikus mutagenézist [Hutchinson és mtsai: Journal of Biological Chemistry 253, 6551 (1978)], valamint PCR is alkalmazható, olyan primerekkel, melyek a mutációt tartalmazzák, stb. Az S2C6 fehérje szekvencia manipulálása fehérje szinten is történhet. A jelen találmány oltalmi körébe tartoznak azok az S2C6 fehérje fragmensek vagy

származékok, vagy analógok, melyeket a transzláció alatt vagy az után különböző módon módosítunk, például glikozilezéssel, acilezéssel, foszforilezéssel, amidálással, az ismert védő/blokkoló csoportot tartalmazó származékainak kialakításával, proteolitikus hasítással, ellenanyag vagy más celluláris ligand molekulához kötésével, stb.

A számos kémiai módosítás bármelyike ismert technikákkal végrehajtható, beleértve, anélkül, hogy erre korlátoznánk magunkat, a specifikus cián-bromiddal végzett kémiai hasítást, tripszines, kimotripszines, papainos és V8 proteázos emésztést, NaBH_4 kezelést, acetilezést, formilezést, oxidálást, redukálást, tunikamicin jelenlétében metabolikus szintézist, stb. Ezen kívül, az S2C6 fehérje analógjai és származékai kémiailag is szintetizálhatók. Például az S2C6 fehérje részének megfelelő kívánt domént tartalmazó peptid, vagy amely *in vitro* a kívánt aktivitást előidézi, peptidszintetizátorral előállítható. Továbbá, ha szükséges, akkor nem hagyományos aminosavak vagy kémiailag kialakított aminosav analógok az S2C6 szekvenciába helyettesítéssel vagy kiegészítéssel bejuttathatók. A nem hagyományos aminosavak közé, anélkül, hogy erre korlátoznánk magunkat a következők tartoznak: a természetes aminosavak D-izomerjei, α -amino-izovajsav, 4-aminovajsav, Abu, 2-amino-vajsav, γ -Abu, ϵ -Ahx, 6-amino-hexánsav, Aib, 2-amino izovajsav, 3-amino-propionsav, ornitin, norleucin, norvalin, hidroxiprolin, szarkozin, citrullin, ciszteinsav, t-butilglicin, t-butilalanin, fenilglicin, ciklohexilalanin, β -alanin, fluoraminosavak, tervezett

aminosavak, mint például β -metilaminosavak, Ca-metilaminosavak, Na-metilaminosavak, és általában aminosav analógok. Továbbá, az aminosavak D (jobbra forgatók) vagy L (balra forgatók) lehetnek.

Más specifikus megvalósítási formákban az S2C6 fehérje, fragmens, analóg, vagy származék fúziós vagy kiméra fehérje termékként fejeztethető ki (amelynél a fehérje fragmens, analóg vagy származék peptidkötésen keresztül különböző fehérjék heterológ szekvenciáihoz kapcsolt). A heterológ fehérjeszekvencia biológiai választ módosító anyag lehet, melyek közé, anélkül, hogy erre korlátoznánk magunkat, a következők tartoznak: interferon- α , interferon γ , interleukin-2, interleukin-4, interleukin-6, és tumornekrózis faktor, vagy ezek funkcionálisan aktív része. Alternatívaként a heterológ fehérje szekvenciák enzimeket tartalmazhatnak, mint például β -laktamáz vagy karboxilészterázokat; vagy toxinokat, mint például bryodin 1, *Pseudomonas* exotoxin A, vagy gelonin, vagy ezek funkcionálisan aktív részeit tartalmazzák. Továbbá, az S2C6 fehérje kemoterápiás szerhez kémiaiilag kapcsolható, ezek, anélkül, hogy erre korlátoznánk magunkat a következők lehetnek: alkilező szerek (például nitrogénmustárok, nitrozoureák, triazének); antimetabolitok (például folsav analógok, pirimidin analógok, purin analógok); természetes termékek (például antibiotikumok, enzimek, biológiai válaszokat módosító anyagok); vegyes szerek (például szubsztituált urea, platina koordinációs komplexek); és hormonok és antagonisták (például ösztrogének, androgének,

antiandrogén, gonadotropin kibocsátó hormon analóg); vagy ezek funkcionálisan aktív része [Goodman és Gilman: The Pharmacological Basis of Therapeutics, 9. kiadás, McGraw-Hill, 1225-1287(1996)]. Az ilyen kiméra termékek a megfelelő, a kívánt aminosav szekvenciát kódoló nukleinsav szekvenciákhoz ligálással, a szakirodalomban jól ismert eljárásokkal megfelelő olvasási keretben összekapcsolhatók, és a szakirodalomban általánosan ismert eljárásokkal a kiméra termék kifejezhető. Alternatívaként az ilyen kiméra termékek fehéré szintézis technikákkal előállíthatók, például peptidszintetizátor alkalmazásával. A különböző megvalósítási formákban a heterológ fehérjeszekvencia az S2C6 rokon szekvenciákkal kovalensen, de nem peptidkötéssel, összeköthető, például a szakirodalomban ismert kémiai keresztkötő szerekkel.

Egy specifikus megvalósítási formában az S2C6 fehérje származék olyan kiméra vagy fúziós fehérje, mely az S2C6 fehérje vagy fragmens (előnyösen az S2C6 fehérje egy doménját vagy motívumát, vagy az S2C6 fehérje legalább 10, 50 vagy 100 aminosavát tartalmazza) amino- vagy karboxil-terminálisán keresztül peptidkötéssel át egy másik fehérjéhez kapcsolt.

A specifikus megvalósítási formában a másik fehérje toxin, enzim vagy biológiai választ módosító anyag. A specifikus megvalósítási formákban a másik fehérje, vagy a másik fehérje funkcionálisan aktív rész aminosav szekvenciája a másik fehérje legalább 6, 10, 20 vagy folyamatos aminosavát tartalmazza. Az egyik megvalósítási formában az ilyen kiméra fehérjét a fehérjét

(az S2C6 kódoló szekvenciáját leolvasási keretben egy másik fehérje kódoló szekvenciájához kötötten tartalmazza) kódoló nukleinsav rekombináns kifejezésével állítjuk elő. Az ilyen kiméra termék a megfelelő, kívánt aminosav szekvenciát kódoló nukleinsav szekvencia szakirodalomban ismert ligálási eljárásával a megfelelő kódolási keretben összekapcsolással elkészíthető, és a kiméra termék a szakirodalomban általánosan ismert eljárásokkal kifejeztethető. Alternatívaként az ilyen kiméra termék fehérle-szintézis technikákkal előállítható, például peptidszintetizátor alkalmazásával. A kiméra gének előállíthatók, melyek az S2C6 gént bármely heterológ fehérjét kódoló szekvenciához kapcsolnak. Az egyik specifikus megvalósítási forma kiméra fehérjére vonatkozik, mely az S2C6 fehérje fragmensének legalább 6 vagy 15 vagy 50 aminosavát tartalmazza, vagy egy olyan fragmens, mely az S2C6 fehérje egy vagy több funkcionális aktivitását mutatja (például egy vagy több CDR-t foglal magában).

Egy specifikus megvalósítási formában az S2C6 fehérje vagy származék kemoterápiás szerhez kémiaiilag kapcsol, ez anélkül, hogy erre korlátoznánk magunkat, a következő lehet: doxorubicin, paclitaxel vagy docetaxel. Az ilyen S2C6-drog konjugátum a CD40-et kifejező sejtekbe bejuttatható. Az S2C6 fehérjéhez vagy származékhoz egy vagy több drog molekula kapcsolható. A kapcsolatok, anélkül, hogy erre korlátoznánk magunkat, a következők lehetnek: hidrazon, peptid, vagy szénhidrát kapcsoló.



Egy másik specifikus megvalósítási formában a származék az S2C6 fehérjével homológ régiót tartalmaz. Példaként a különböző megvalósítási formákban az első fehérje régió akkor tekinthető "homológnak" a második fehérje régióval, ha az első régió legalább 30 %-ban, 40 %-ban, 50 %-ban, 60 %-ban, 70 %-ban, 75 %-ban, 80 %-ban, 90 %-ban vagy 95 %-ban azonos, ha azt bármely második szekvenciában lévő egyenlő számú első régióban lévő aminosavval hasonlítjuk össze (inszerciók vagy deléciók nélkül), vagy amikor úgy hasonlítjuk össze, hogy a második szekvencia sorrendjét a szakirodalomban ismert komputer homológia programban megadott sorrendjével vetjük egybe.

A hibridizálás körülményei

Az egyik specifikus megvalósítási formában a nukleinsav hibridizációja, mely az S2C6 nukleinsavval (például a közzétett 1. vagy 6. szekvencia), vagy annak fordított komplementerével, vagy az S2C6 származékot kódoló nukleinsavval, vagy annak fordított komplementerével hibridizációra képes nukleinsav, alacsony szigorúságú körülmények között biztosított. Példaként, anélkül, hogy erre szorítkoznánk, az alacsony szigorúságú körülmények a következők [Shilo és Weinberg: Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 78, 6789-6792 (1981)]. A DNS-t tartalmazó szűrőket 6 óráig 40 °C-on a következő összetételű oldatban állítottuk elő: 35 % formamid, 5 X SSC, 50 mM trisz-HCl (pH = 7,5), 5 mM EDTA, 0,1 % PVP, 0,1 % Ficoll, 1 % BSA és 500 µg/ml lazac sperma denaturált DNS. A hibridizációkat

azonos oldatokban végeztük a következő eltérésekkel: 0,02 % PVP, 0,02 % Ficoll, 0,2% BSA, 100 µg/ml lazac sperma DNS, 10 vegyes% dextrán-szulfát, és 5-20 X 10⁶ cpm ³²P-jelölt próbát használtunk. A szűrőket a hibridizációs elegyben 15-20 óráig 40°C-on inkubáltuk, és ezután 1,5 óráig 55 °C-on a következő összetételű oldatban mostuk: 2 X SSC, 25 mM trisz-HCl (pH = 7,4), 5 mM EDTA és 0,1 % SDS. A mosóoldatot friss oldatra cseréltük, és további 1,5 óráig 60 °C-on inkubáltuk. A szűrőket lenyomatoltuk és autoradiográfiás felvételt készítettünk. Ha szükséges, a szűrőket harmadszor 65-68 °C-on inkubáltuk, és ismételten felvételt készítettünk. Az ettől eltérő alacsony szigorúságú körülmények a szakirodalomban ismertek (például, ahogy azt a fajok közötti hibridizációnál alkalmazzák).

Az egyik specifikus megvalósítási formában a nukleinsav hibridizációja, mely az S2C6 nukleinsavval (például a közzétett 1. vagy 6. szekvencia), vagy annak fordított komplementerével hibridizálnak, nagy szigorúságú körülmények között biztosított. Példaként, anélkül, hogy erre szorítkoznánk, a nagy szigorúságú körülmények a következők. A DNS-t tartalmazó előhibridizációs szűrőket 8 órától egy éjszakán át 65 °C-on a következő összetételű oldatban állítottuk elő: 6 X SSC, 50 mM trisz-HCl (pH = 7,5), 1 mM EDTA, 0,02 % PVP, 0,02 % Ficoll, 0,02 % BSA és 500 µg/ml lazac sperma denaturált DNS. A szűrőket 48 óráig 65 °C-on az előhibridizációs elegyben hibridizáltuk, melyhez 100 µg/ml lazac denaturált DNS-t és 5-20 X 10⁶ cpm ³²P-jelölt próbát használtunk. A szűrők mosását 37 °C-on 1 óráig a következő



összetételű oldatban végeztük: 2 X SSC, 0,01 % PVP, 0,01 % Ficoll és 0,01 % BSA. Ezt követte az 0,1 X SSC-ben 50 °C-on 45 percig végzett mosás, majd autoradiografáltuk. Az ettől eltérő nagy szigorúságú körülmények a szakirodalomban ismertek.

Az egyik specifikus megvalósítási formában a nukleinsav hibridizációja, mely az S2C6 nukleinsavval hibridizálódni képest (például a közzétett 1. vagy 6. szekvenciával rendelkezik), vagy annak fordított komplementje, vagy az S2C6 származékot kódoló nukleinsav, mérsékelt szigorúságú körülmények között biztosított. A megfelelő körülmények kiválasztása a szakirodalomban jól ismert [Sambrook és mtsai: Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2. kiadás, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989); Ausubel és mtsai: Current Protocols in Molecular Biology series of laboratory technique manuals, 1987-1997 Current Protocols, © 1994-1997 John Wiley and Sons, Inc.).

Terápiás alkalmazások

A találmány különböző betegségek és kórok kezeléséhez vagy megelőzéséhez terápiás vegyületet (amit itt terápiás szernek nevezünk) biztosít, amelyet a kezelendő személynek beadnak. Az ilyen terápiás szerek, anélkül, hogy erre korlátoznánk magunkat, a következők: S2C6 ellenanyagok és azok származékai (például azok, melyeket a fentiekben leírtunk); és az S2C6 ellenanyagok és azok származékait kódoló nukleinsavak (például azok, amelyeket a fentiekben ismertettünk). Ahogy itt azt használjuk a

"kezelés" szakkifejezés szándékunknak megfelelően bármely klinikailag szükséges vagy a betegségre vagy kórra jótékony hatású eljárás, mely anélkül, hogy erre korlátoznánk magunkat a következőket foglalja magában: egy vagy több szimptóma csökkentése, a betegség lefolyásának lassítása vagy annak megállítása, stb.

A találmány egy specifikus megvalósítási formájában a terápiás szert magában vagy a CD40L-lel kombinációban a malignus betegségek (beleértve, anélkül, hogy erre korlátoznánk magunkat, a karcinómát és a hematológia rosszindulatú daganatokat) a gyulladásos betegségek és az immunrendszer betegségeinek kezelésére vagy megelőzésére adjuk be. A terápiás szer és a CD40L nem szükségszerűen, de azonos kiszerezésben lehet, azaz a terápiás szer és a CD40 beadása egymástól függetlenül is történhet, de egymást követően vagy azonos kezelési folyamatban. A specifikus megvalósítási formában a malignus sejtek a CD40-et fejezik ki. Alternatívaként a malignus sejtek CD40-et nem fejeznek ki, mivel a rosszindulatú daganatokkal társuló érrendszeri endotheliális sejtek a CD40-et kifejezhetik, és így a találmány terápiás szere még akkor is hatékonyan használható a tumorok kezelésében, ha azok CD40-et nem fejeznek ki. Egy előnyben részesített megvalósítási formában a terápiás szer a CD40L kötődését a CD40-hez legalább 45 %-ban, 50 %-ban, 60 %-ban vagy 65 %-ban elősegíti.

A specifikus megvalósítási formákban a terápiás szert az immunológiailag szupresszált személyek immunválaszának nö-



velésre használjuk, olyan személyeknek adjuk be, akik szerzett immunhiányos szindrómában, daganatos megbetegedéstől szenvednek, legyenek azok akár fiatalok, akár idős személyek.

A találmány más megvalósítási formáiban a terápiás szerek kémiaailag úgy módosíthatók, hogy azok a sejtek, melyekhez kötődnek, azok el is pusztulnak. Az ilyen sejtek, anélkül, hogy erre korlátoznánk magunkat, a következők: többszörös mielóma sejtek, limfóma sejtek vagy karcinómák. Mivel az össze B-sejt a CD40-et kifejezi, ezért ez a megközelítés az immunválasz szuppresszióját eredményezi. Például az S2C6-hoz kötött citotoxikus drogok (például fúziós fehérjék) *in vivo* immunszuppresszió kiváltására használhatók, ezzel a transzplantációs betegek hisztokompatibilitási gátja legyőzhető; alternatívaként ezek a módosított ligandok az autoimmun betegségek szabályozására felhasználhatók.

Más megvalósítási formákban a terápiás szer a CD40-et hordozó sejtek, de melyek nem B-sejtek, például tüdőkarcinóma, proliferációjának és/vagy differenciálódásának elősegítésére mint a rosszindulatú megbetegedés közvetlen kezelési módszere, vagy mint a kemoterápia kiegészítője felhasználható. A találmány terápiás szereivel, anélkül, hogy erre korlátoznánk magunkat, a következő rosszindulatú daganatok kezelhetők, vagy megelőzhetők (1. táblázat).

1. Táblázat

Rosszindulatú megbetegedések és rokon betegségek:

Leukémia

akut leukémia

akut limfoid leukémia

akut mieloid leukémia

mioblasztos

promielocitás

mielomonocitás

monocitás

eritroleukémia

krónikus leukémia

krónikus mielocitás (granulocitás) leukémia

krónikus limfoid leukémia

policithemia vera

limfóma

Hodgkin-féle betegség

non-Hodgkin-féle betegség

többszörös mielóma

Waldenstrom-féle makroglobulinémia

nehézlánc betegség

szolid tumorok

szarkómák és karcinómák

fibroszarkóma

mixoszarkóma

liposzarkóma

kondroszarkóma

oszteogenikus szarkóma

oszteoszarcoma
kordóma
angioszarkóma
endothelioszarkóma
limphangioszarkóma
limphangioendothelioszarkóma
sinovióma
mesothelióma
Ewing-féle tumor
leiomioszarkóma
rhabdomioszarkóma
colon karcinóma
colorectális karcinóma
hasnyálmirigy rák
emlőrák
méhrák
dűlmirigy rák
szkvamozus sejt karcinóma
bazálsejtes karcinóma
adenokarcinóma
nyálmirigy karcinóma
faggyúmirigy karcinóma
papilláris karcinóma
papilláris adenokarcinómák
cisztadenokarcinóma
medulláris karcinóma

bronchogenikus karcinóma
vesesejt karcinóma
hepatóma
epevezeték karcinóma
choriokarcinóma
seminóma
embrionális karcinóma
Wilms-féle tumor
nyakrák
méhrák
heretumor
tüdő karcinóma
kissejtes tüdőkarcinóma
nem kissejtes tüdőkarcinóma
hólyag karcinóma
epitheliális karcinóma
glióma
asztrocitóma
medulloblasztóma
craniopharyngióma
ependimóma
pinealóma
hemangioblasztóma
akusztikus neuróma
oligodendroglióma
menangióma

- melanóma
- neuroblasztóma
- retinoblasztóma
- nazofaringeális karcinóma
- nyelvőcső karcinóma

A gyulladásos betegségek és az immunrendszer hiányai és betegségei, melyek a találmány terápiás szerével kezelhető vagy megelőzhető, anélkül, hogy erre korlátoznánk magunkat, a következők (2. táblázat).

2. Táblázat:

Gyulladásos megbetegedések és az immunrendszer betegségei:

- szisztémás lupus erythematosus (SLE)
- scleroderma (például CRST szindróma)
- gyulladásos myositis
- Sjögren-féle szindróma (SS)
- kevert kötőszöveti betegség (például MCTD, Sharp-féle szindróma)
- rheumatoid arthritis
- szklerózis multiplex
- bélgyulladás (például fekélyes colitis, Crohn-féle betegség)
- akut légzési nehézség szindróma
- tüdőgyulladás
- oszteoporózis
- késői típusú hiperszenzitivitás

asztma

elsődleges biliáris cirrhosis (PBC)

idiopátiás trombocitopéniás purpura (ITP)

A hatásos dózis

Az ilyen terápiás szerek toxicitása és terápiás hatékonysága standard gyógyszerészeti eljárásokkal sejtenyészetekben vagy kísérleti állatokban meghatározható például az LD₅₀ (a populációra nézve 50 %-ban halált okozó mennyiség) és az ED₅₀ (a populációban terápiásan 50 %-ban hatásos) érték meghatározásával. A toxikus és a terápiás hatás dózis aránya a terápiás index, amit az LD₅₀/ED₅₀ alapján határozhatunk meg. A nagy terápiás indexszel rendelkező szereket részesítjük előnyben. Amíg toxikus mellékhatású terápiás szert alkalmazunk, addig figyelemmel kell lennünk arra, hogy olyan szállítási rendszert alakítsunk ki, mely a hatóhelyen olyan vegyületeket céloz meg, mely a nem fertőzött sejt minimális károsodását okozza és ezzel a mellékhatást csökkenti.

A sejtenyészeti és az állati vizsgálatokból kapott adatok emberben a beadási dózistartomány kiszerelési mennyiségének megállapításához felhasználhatók. Példaként, anélkül, hogy erre korlátoznánk magunkat, ez lehet 1 ng/kg-tól 100 mg/kg. Az ilyen terápiás szerek dózisa előnyösen a keringésben lévő koncentráció tartományában van, aminél az ED₅₀ kevésbé vagy egyáltalán nem toxikus. A dozírozás az alkalmazott dózistól és a beadás útjától függően változhat. Kezeléshez a terápiásan

hatásos dózis kezdetben előnyösen a sejtenyészési vizsgálatok adatai alapján megbecsülhető. A dózisok a kiserelésekhez állati modellekben a keringésben lévő plazma koncentrációtartományához illetve meghatározhatók, mely tartomány magában foglalja a plazma IC_{50} koncentrációt (azaz a tesztvegyület koncentrációja a szimptomák fél-maximális gátlását eredményezi), ahogy azt a sejtenyészeteknél meghatároztuk. Az ilyen információk az embernél hasznos dózisok további, sokkal pontosabb meghatározásához felhasználhatók. A plazmában a szintek például HPLC-vel mérhetők.

Kiserelések

A jelen találmány szerinti gyógyszerészeti összetételek hagyományos módon kiserelhetők felhasználva egy vagy több fiziológiásan elfogadható hordozót vagy kötőanyagot.

Így a terápiás szerek és azok fiziológiásan elfogadható sói vagy szolvátjai inhalációs vagy befúvásos (akár a szájba, akár az orrba), vagy az orális, bukkális, parenterális vagy rektális beadáshoz kiserelhetők.

Az orális beadáshoz a gyógyszerészeti összetételek például tabletta vagy kapszula formában hagyományos eszközökkel elkészíthetők, ahol kötőágensként gyógyszerészetileg elfogadható kötőanyagokat (például előzselatinezett kukorica keményítő, poli(vinil-pirrolidon) vagy hidroxipropil-metilcellulóz); töltőanyagokat (például laktóz, mikrokristályos cellulóz vagy kalcium-hidrogén-foszfát), kenőanyagokat (például magnézium-sztearát, talkum



vagy szilika); dezintegráló szereket (például burgonya keményítő vagy nátrium-keményítő-glikolát); vagy nedvesítő szereket (például nátrium-lauril-szulfát) alkalmazunk. A tabletták a szakirodalomban jól ismert módon bevonhatók. Az orális beadáshoz a folyékony készítmények például oldatok, szirupok vagy szuszpenziók lehetnek, vagy száraz termékként adhatók, amit használat előtt vízzel vagy a megfelelő hordozóval helyreállítunk. Az ilyen folyékony készítmények hagyományos eszközökkel gyógyszerészetileg elfogadható adalékokkal, mint például szuszpendáló szerekkel (például szorbit szirup, cellulózszármazék vagy hidrogénezett ehető zsír); emulgeáló szerekkel (például lecitin vagy acacia); nem vizes hordozóval (például mandulaolaj, olajészterek, etil-alkohol vagy frakcionált növényi olajok); és konzerváló szerekkel (például metil- vagy propil-p-hidroxibenzoátok vagy szorbinsav) elkészíthetők. A készítmények pufferelő sókat, színyanyagokat és édesítő szereket tartalmazhatnak, ha arra igény mutatkozik.

Az orális beadás érdekében a készítmények az aktív vegyület szabályozott kibocsátásához megfelelően kisserelhetők.

A bukkális beadáshoz az összetételek hagyományos módon kisserelt tabletták vagy szögletes tabletták lehetnek.

Az inhalációs beadáshoz a jelen találmány szerinti használat terápiás szereit hagyományosan aeroszolban szállíthatók, ami nyomás alatt lévő tartályból vagy porlasztóból származhat, a megfelelő hajtógáz használat mellett, például diklór-difluor-metán, triklór-fluor-metán, diklór-tetrafluor-metán, szén-dioxid

vagy más alkalmas gáz. A nyomás alatt lévő aeroszolok esetében a dózisegységek, a mért mennyiségének szállítása, szeleppel szabályozottan meghatározhatók. Az inhalálókhoz és a befúvókhoz a kapszulák és a patronok, például zselatin, úgy szerelhetők ki, hogy azok a vegyület porkeverékét és egy megfelelő port, például laktózt vagy keményítőt, tartalmazzanak.

A terápiás szerek az injektálással végzett parenterális beadáshoz például bólusz injekcióban vagy folyamatos infúzióban szerelhetők ki. Az injekciós kiszerezések egységdózis formában lehetnek, például ampullában, vagy több dózist tartalmazó tártályban, konzerváló szerrel együtt, vagy anélkül. Az összetételek olajos vagy vizes hordozókban szuszpenziókat, oldatokat vagy emulziókat alakíthatnak ki, és a kiszerezést biztosító szereket tartalmazhatják, mint például szuszpendáló, stabilizáló és/vagy diszpergáló szereket. Alternatívaként az aktív alkotórész a megfelelő hordozóval végzett használat előtt helyreállításhoz por formában lehet például steril pirogénmentes vízben.

A terápiás szerek rektális összetételekben is kiszerezhetők, mint például kúpok, vagy retenciós beöntések, például hagyományos kúp alapanyagokkal együtt, mint például kakaóvaj vagy gliceridek.

Az előzőekben leírt kiszerezéseken kívül a terápiás szerek depó készítményekben is kiszerezhetők. Az ilyen hosszú ideig ható kiszerezések implantációval (például szubkután vagy intramuszkuláris) vagy intramuszkuláris injekcióval adhatók be. Így például a terápiás szerek az alkalmas polimerrel vagy hidrofób

anyaggal (például az elfogadható olajban emulzióként), vagy ion-cserélő gyantákkal, vagy gyengén oldható származékként, például gyengén oldódó sóban, kisserelhetők.

Az összetételek, ha szükséges, akkor csomagban vagy adagoló automatában biztosíthatók, melyek az aktív alkotórészt egy vagy több dózisegységben tartalmazzák. A csomag például fém vagy műanyag fólia, ilyen például a hólyag csomag. A csomaghoz vagy az adagoló automatához az előnyös beadás érdekében, az emberbe történő beadáshoz előírások csatolhatók.

A találmány specifikus megvalósítási formáiban gyógyszerészeti összetételt biztosít, mely a terápiás szer terápiásan hatásos mennyiségét a CD40 liganddal kombinációban tartalmazza.

A találmányt részletesebben a következő példákban írjuk le, melyek szándékunknak megfelelően a találmány oltalmi körét nem korlátozzák.

1. Példa

Az SC26 variábilis régióinak klónozása

1.1. Anyagok és módszerek

Az S2C6 könnyűlánc és nehézlánc variábilis régiókat a szakirodalomban leírtaknak megfelelően klónoztuk [Gilliland és mtsai: Tissue Antigens, 47, 1-20 (1996)]. A teljes RNS-t az S2C6 hibridómából izoláltuk. Az elsőszál komplementer DNS-t (cDNS) az egér kappa könnyűlánc és nehézlánc variábilis régiókból állítottuk elő, felhasználva reverz transzkriptázt és antiszensz primereket, melyek a hozzávetőleg 100 bázispáros 3' irányú GC



kapcsot alakítják ki. A poli-G farkat a cDNS szálakhoz hozzáadtuk, felhasználva terminális transzferázt, és a kettősszálú DNS-t polimeráz láncreakcióval (PCR) szintetizáltuk. A PCR primereket, melyek a poli-G farokra vagy a könnyűlánc, vagy a nehézlánc belsejében egy hozzávetőleg 50 bázisos szekvenciára specifikus, úgy terveztük meg, hogy azok egyedi restrikciós helyeket tartalmazzanak. Miután a PCR termékeket sokszoroztuk, EcoRI és HindIII enzimekkel hasítottuk, és az azonos restrikciós enzimekkel hasított pUC19-be klónoztuk. A fenti reakciókat ligáltuk, *Escherichia coli* DH5 α -ba transzformáltuk és az eredményül kapott klónokat restrikciós analízissel szűrtük. A restrikciós emésztéssel pozitívnak bizonyult klónokat DNS szekvenátorral szekvenáltuk (Li-Cor fluorescence sequencer). A könnyűlánc variábilis régió (V_L) nukleotid szekvenciáját (a szekvencia száma: 1) és aminosav szekvenciáját (a szekvencia száma: 2) az 1. ábrán mutatjuk be. A nehézlánc variábilis régió (V_H) nukleotid szekvenciáját (a szekvencia száma: 6) és aminosav szekvenciáját (a szekvencia száma: 7) az 2. ábrán mutatjuk be. A 3A-B. ábrák az S2C6 V_L és az S2C6 V_H aminosav szekvenciáit mutatják. A CDR-eket aláhúztuk. A V_L CDR 1-3 aminosav szekvenciák megfelelnek a 3-5. szekvenciáknak. A V_H CDR 1-3 aminosav szekvenciák megfelelnek a 8-10. szekvenciáknak.

Az eredményül kapott DNS szekvenciákat ezután az azonos izotípusú és leolvasási keretű, más egér ellenanyagok könnyűlánc és nehézlánc variábilis szekvenciákkal egybevetettük

és az S2C6-ból származó géneknek megfelelő aminosavszekvenciákat meghatároztuk. Az aminosavszekvenciák megerősítéséhez az S2C6 mAb könnyű- és nehézlánc variábilis régiókat N-terminális aminosav analízisnek vetettük alá.

Az S2C6 V_L, S2C6 V_H és a CDR-ek aminosav szekvenciáit BLASTP analízisnek vetettük alá, felhasználva az NR adatbázist (minden nem-redundáns GenBank CDS transzlációk + PDB + Swissprot + PIR + PRF) és a Kabat-féle adatbázist (ez az immunológiai kérdésemek szekvenciákra vonatkozik). Az NR adatbázist felhasználva a szekvenciák a <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> hozzáférési számán megtalálhatók. Míg a Kabat adatbázis az <http://immuno.bme.nwu.edu/database.html> és SEQHUNT II címen érhető el. Ezeket az eredményeket az alábbiakban mutatjuk be.

Az NR adatbázissal végzett BLASTP keresések:

Az NR adatbázisban az S2C6 VL-re (a szekvencia száma: 2) a BLASTP-vel 100 %-os azonosságot nem kaptunk, míg 94 %-os (106/112) azonosságot 6 esetben. Ezeket az alábbiakban mutatjuk be:

pir | pT0359 IgG kappa-lánc V régió (R4A.12) – egér (fragments)
gi | 196660 (M59949) immunoglobulin kappa-lánc VJ régió [*Mus musculus*]
gi | 196954 (M12183) kappa-lánc V-régió [*Mus musculus*] > gi | 2247
[*Mus musculus*]
pir | B34904 Ig kappa-lánc elő-V-régió (12-40 és 5-14)



emb|CAA80076| (Z22102) immunglobulin variábilis régió [*Mus musculus*]

dbj|BAA22172| (AB006833) anti-pszeudouridin monoklonális ellenanyag.

Az NR adatbázisban a VL CDR1-re (a szekvencia száma: 3) a BLASTP-vel 100 %-os azonosságot nem kaptunk, de számos 93 %-os (15/16) azonosságút találtunk. Ezek közül az első ötöt az alábbiakban mutatjuk be:

dbj|BAA03480| (D14627) immunglobulin gamma-3 kappa-lánc [*Mus musculus*]

dbj|BAA22172| (AB006833) anti-pszeudouridin monoklonális ellenanyag

gi|4101647 (AF005352) immunglobulin V-régió könnyűlánc [*Mus musculus*]

gi|3377681 (AF078800) egyláncú anti-HIV-1 Rev variábilis fragmens

gi|1870366 (U55625) anti-DNS IgM immunglobulin könnyűlánc [*Mus musculus*]

Az NR adatbázisban a VL CDR2-re (a szekvencia száma: 4) a BLASTP-vel találatot nem kaptunk.

Az NR adatbázisban a VL CDR3-ra (a szekvencia száma: 5) a BLASTP-vel találatot nem kaptunk.

Az NR adatbázisban az S2C6 VH-ra (a szekvencia száma: 7) a BLASTP-vel 100 %-os azonosságot nem kaptunk, de számos 88 %-os azonosságút találtunk. A 35 közül az első ötöt az alábbiakban mutatjuk be:



gi|3561044 (AF083186) anti-HIV-1 p24 ellenanyag D2 nehézlánc
[*Mus musculus*]

pdb|1A6T|B B-lánc, az Mab1-IA monoklonális ellenanyag Fab
fragmense

gi|2895955 (AF045895) [*Mus musculus*] IgG1 nehézlánc mABI-IA
[*Mus musculus*]

emb|CAA80023| (Z22049) [*Mus musculus*] immunglobulin
variábilis régió

gi|194510 (M91695) immunglobulin gamma-1 lánc [*Mus
musculus*]

Az NR adatbázisban a VH CDR1-re (a szekvencia száma: 8)
a BLASTP-vel találatot nem kaptunk.

Az NR adatbázisban a VH CDR2-re (a szekvencia száma: 9)
a BLASTP-vel 100 %-os azonosságot nem kaptunk, egy 94 %-os
(16/17) azonosságút találtunk, és számos 94 %-nál kisebb azo-
nosságút kaptunk a keresés eredményeként. Az 1 94 %-os azo-
nosságú a következő:

gi|3561044 (AF083186) anti-HIV-1 p24 ellenanyag D2 nehézlánc
[*Mus musculus*].

Az NR adatbázisban a VH CDR3-ra (a szekvencia száma: 5) a
BLASTP-vel találatot nem kaptunk.

Az Kabat-féle adatbázisban végzett BLASTP keresések:

A Kabat adatbázisban az S2C6 VL-re (a szekvencia száma:
2) a BLASTP-vel 100 %-os azonosságot nem kaptunk, de számos
89-91 %-os (106/112) azonosságú található. Ezek közül az első
ötöt az alábbiakban mutatjuk be:

KADBID 005591, egér Ig kappa könnyűlánc variábilis régió (5-14...),

KADBID 005594, egér Ig kappa könnyűlánc variábilis régió (10VA...),

KADBID 005593, egér Ig kappa könnyűlánc variábilis régió (12-4...),

KADBID 005603, egér Ig kappa könnyűlánc variábilis régió (17s....),

KADBID 005588, egér Ig kappa könnyűlánc variábilis régió (TEPC...).

A Kabat adatbázisban a VL CDR1-re (a szekvencia száma: 3) a BLASTP-vel 100 %-os azonosságot nem kaptunk, de számos 93 %-os azonosságot találtunk (15/16). Ezek közül az első ötöt az alábbiakban mutatjuk be:

KADBID 005720, egér Ig kappa könnyűlánc variábilis régió (BW24...),

KADBID 005614, egér Ig kappa könnyűlánc variábilis régió (PME7...),

KADBID 005624, egér Ig kappa könnyűlánc variábilis régió (C5-7...),

KADBID 005621, egér Ig kappa könnyűlánc variábilis régió (40-6...),

KADBID 005640, egér Ig kappa könnyűlánc variábilis régió (40-9...).

A Kabat adatbázisban a VL CDR2-re (a szekvencia száma: 4) a BLASTP-vel találatot nem kaptunk.

A Kabat adatbázisban a VL CDR3-ra (a szekvencia száma: 5) a BLASTP-vel 100 %-os azonosságot egy esetben kaptunk: KADBID 005681, egér Ig kappa könnyűlánc variábilis régió (NC10...).

A Kabat adatbázisban az S2C6 VH-ra (a szekvencia száma: 7) a BLASTP-vel 100 %-os azonosságot nem kaptunk, de számos 79-85 %-os azonosságot találtunk. Ezek közül az első ötöt az alábbiakban mutatjuk be:

KADBID 001498, egér Ig kappa nehézlánc variábilis régió (HDEX24),

KADBID 001494, egér Ig kappa nehézlánc variábilis régió (HDEX5),

KADBID 001529, egér Ig kappa nehézlánc variábilis régió (163.72'CL),

KADBID 001500, egér Ig kappa nehézlánc variábilis régió (HDEX3 7),

KADBID 001597, egér Ig kappa nehézlánc variábilis régió (BB128'CL),

A Kabat adatbázisban a VH CDR1-re (a szekvencia száma: 8) a BLASTP-vel találatot nem kaptunk.

A Kabat adatbázisban az VH CDR2-r3 (a szekvencia száma: 9) a BLASTP-vel 100 %-os azonosságot nem kaptunk, de számos 87-88 %-os azonosságot találtunk. Ezek közül az első ötöt az alábbiakban mutatjuk be:

KADBID 001535, egér Ig kappa nehézlánc variábilis régió (H10"CL),

- KADBID 001534, egér Ig kappa nehézlánc variábilis régió (H81'CL),

• KADBID 001533, egér Ig kappa nehézlánc variábilis régió (H50'CL),

KADBID 019741, egér Ig kappa nehézlánc variábilis régió (Clone F'CL),

KADBID 001529, egér Ig kappa nehézlánc variábilis régió (163.72'CL),

A Kabat adatbázisban a VH CDR3-ra (a szekvencia száma: 10) a BLASTP-vel találatot nem kaptunk.

2. Példa

Az S2C6 biológiai aktivitása

2.1 Anyagok és módszerek

2.1.1. Az anti-CD40 ellenanyag elkészítése:

Az S2C6 hibridómát 37 °C-on teljes IMDM-ben tenyésztettük (Gibco BRL, Grand Island, NY) mely kiegészítésként 10 % foetális borjú szérumot (FBS), 100 egység/ml penicillint és 100 mg/ml sztreptomicint tartalmazott. A tenyészeteket centrifugálással összegyűjtöttük és a felülúszót 0,2 mikronos szűrőn átengedtük. Ezek után a felülúszót foszfáttal pufferelt sóoldattal (PBS) mosott GammaBind™ Sepharose (Pierce) oszlopra töltöttük és 0,1 M glicinnel (pH = 2,5) eluáltuk. Közvetlenül az eluálás után az ellenanyagot 1 M trisszel (pH = 8,0) semlegesítettük, PBS-sel szemben dializáltuk és sterilre szűrtük. Az MAb készítményeket méretkizárásos kromatográfiával analizáltuk. Az



itt leírt vizsgálatokhoz csak azokat a mintákat használtuk fel, melyek több mint 99 % monomer fehérjét tartalmaztak.

2.1.2. A humán tumor xenograft modell:

Kilencven nőstény C.B.-17 SCID egeret vásároltunk (Taconic Labs, Germantown, NY), melyek 6-8 hetesek voltak, és az állatokat két hétig karanténban tartottuk. A kontroll csoport egereit intravénásan (iv.) humán B-sejtes tumor vonalakkal injektáltuk: - Ramos (non-Hodgkin-féle limfóma), HS Sultan (többszörös mielóma) vagy IM-9 (többszörös mielóma), ahol a sejtek száma 1×10^6 - 2×10^6 között mozgott. A fennmaradó egereket két csoportra osztottuk; az egyik felület 200 μ l 1:10 hígítású anti-aszialo-GM1-gyel (Wako Chemicals, Richmond, VA) iv. a tumorsejtek injektálása előtt egy nappal, a gazda természetes ölösejtjeinek eltávolítása érdekében kezeltük [Murphy és mtsai: Eur. J. Immunol., 22, 241 (1992)]. A két csoportban az egereket iv. Ramos, HS Sultan vagy IM-9 sejtekkel (1×10^6 - 2×10^6) injektáltuk. Az egereket a vizsgálati csoportokban ezután intraperitoneálisan (ip.) az itt leírtaknak megfelelően elkészített 1 mg/kg S2C6 IgG-vel injektáltuk. A 7.1.2. rész munkáit a tumor implantáció után 1 vagy 5 nappal a következő időrendi tábla alapján kezeltük, és a részleges bénulás vagy a betegség egyéb jelei alapján nyomon követtük.

A xenograft tumor-modell időrendi táblázata

Csoport	Tumoros	Ellenanyag (1	Anti-aszia-	mAb-vel való
---------	---------	---------------	-------------	--------------

	sejtvonal	mg/kg, ip.)	lo GM1	kezelés napja
1 Kontroll	Ramos	-	-	-
2	Ramos	S2C6	-	1,5,9,13,17
3	Ramos	S2C6	-	5,9,13,17,21
4	Ramos	S2C6	+	1,5,9,13,17
5	Ramos	S2C6	+	5,9,13,17,21
6 Kontroll	HS Sultan	-	-	-
7	HS Sultan	S52C6	-	1,5,9,13,17
8	HS Sultan	S2C6	-	5,9,13,17,21
9	HS Sultan	S2C6	+	1,5,9,13,17
10	HS Sultan	52C6	+	5,9,13,17,21
11 Kontroll	IM-9	-	-	-
12	IM-9	S2C6	-	1,5,9,13,17
13	IM-9	52C6	-	5,9,13,17,21
14	IM-9	52C6	+	1,5,9,13,17
15	IM-9	52C6	+	5,9,13,17,21

2.1.3. A perifériás vér B-sejtjeinek elkülönítése

A perifériás vér B-sejtjeit mind CD19, mind CD20 kötött ellenanyagok pozitív szelekciójával elkülönítettük. A végső izolált sejtpopuláció több mint 85 %-ban B-sejteket tartalmazott, amit áramlási citometriával igazoltunk. A tároláshoz a sejteket 4×10^7 sejt/ml-re borjúmagzat szérummal (FBS) hígítottuk, mely kiegészítésként dimetil-szulfoxidot tartalmazott, és a sejteket folyékony nitrogén fagyasztókban tároltuk.



2.1.4. A B-sejtek proliferációjának vizsgálati módszere

A humán perifériás vér B-sejtjeit felengedtük és 96-lyukú szövettenyésztő lemezekben 1×10^5 számban IMDM tápközegben inkubáltuk, mely kiegészítésként 10 % FBS-t, 5 ng/ml humán rekombináns IL-4-et (Biosource) és különböző hígítású anti-CD40 mAb-eket tartalmazott: S2C6, G28-5 (Bristol-Myers Squibb) vagy M3 (Genzyme #80-3702-04). Kontrollként a sejteket IL-4-gyel és irreleváns kontroll EXA2-1H8 (anti-Pseudomonas exotoxin) mAb-vel inkubáltuk. A lemezeket 37°C -on 3 napig inkubáltuk, és ezután 16 óráig lyukanként 0,5 mCi ^3H -timidinnel jelöltük. A sejteket a 96 lyukú lemezről üvegszűrőre gyűjtöttük felhasználva Filtermate 196 HarvesterTM-t (Packard Instruments), majd szcintillációs folyadékba helyeztük. A naszcensz DNS-be beépült ^3H -timidin mennyiségét folyadék szcintillációs számlálóval mértük (Topcount LSCTM, Packard Instruments).

A CD40L ("Jurkat/CD40L") nagy mennyiségének kifejezéséhez a szelektált Jurkat sejtvonalat CD40L stimulátor sejtként alkalmaztuk [Malik és mtsai: J. Immunol., 156, 3952-3960 (1996)]. A stimulátor sejtek proliferációjának megszüntetésére a sejteket PBS-ben lévő 50 mg/ml mitomicin C-vel 20 percig 37°C -on kezeltük, majd háromszor PBS-sel mostuk, mielőtt a B-sejtekhez hozzáadtuk volna. A B-sejteket (1×10^5 /lyuk) a Jurkat/CD40L sejtekkel egyesítettük és a fentiekben leírtaknak megfelelően vizsgáltuk. A B-sejteket és az IL-4-et a kísérlet kezdetén közvetlenül a stimulátor sejtekhez adtuk hozzá ($2,5 \times 10^4$ /lyuk)

majd ezt követően történt az anti-CD40 mAb-k hozzáadása. A monoklonális ellenanyagok titereit vagy a stimulátor sejtek rögzített koncentrációja mellett határoztuk meg, vagy meghatározott mAb koncentrációnál a stimulátor sejtekkel titráltuk.

A CD40/CD40L kötődés vizsgálata

Ebben a vizsgálatban célsejtként a Jurkat/CD40L sejtvonalat használtuk. A sejteket a mintában 2×10^7 /ml koncentrációra állítottuk be, mintánként 50 μ l-t használtunk fel. A kötést RPMI 1640 táptalaj (Gibco) + 10 % FBS összetételben vizsgáltuk. A receptor telítődés meghatározásához a Jurkat/CD40L sejteket növekvő koncentrációjú CD40-Ig-vel (ez egy olyan oldható fúziós fehérje, mely CD40-ből és humán immunglobulinból áll) inkubáltuk [Noelle és mtsai: Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 89, 6550-6554 (1992)], mostuk és fluoreszcein-izotiocianát konjugált anti-humán immunglobulinnal ("FITC-anti-human Ig") inkubáltuk. A kapott kötést FacScan™ áramlási citométerrel (Becton Dickinson) értékeltük ki. A rekombináns oldható CD40-Ig-t (25 μ g/ml) 1 óráig jégen növekvő koncentrációjú S2C6 mAb-vel inkubáltuk. Az anti-CD40 mAb G28-5-t; M3-at; és az anti-Pseudomonas exotoxint (izotípus kontroll) összehasonlításként használtuk. A rekombináns oldható humán CD40 ligandot (CD154-muCD8), amelyet az egér CD8-cal fúzióban alakítottak ki, és amit FITC jelöltek, a Research Diagnostics, Inc-től kaptuk (Flanders, NJ).



Az oldható CD40-Ig és az anti-CD40 mAb-k hígításait 4-szeres végkoncentrációkból készítettük, amit jégen 1 óráig előinkubáltuk, és ezután 1 órára a Jurkat sejtekhez adtuk. A sejteket mostuk és a FITC-kecske anti-humán F(ab')₂-vel jelöltük (Jackson Labs, Fc-specific #109-096-098). A CD40 kötődés mértékét áramlási citométerrel határoztuk meg.

2.2. Eredmények

2.2.1. Az *in vitro* vizsgálatok: az S52C6 mAb a CD40/CD40L kölcsönhatást elősegíti

Az anti-CD40 mAb-knek az T oldható CD40 és az aktivált T-sejtek felszínén kifejezett CD40L kötődésre gyakorolt hatásának kiértékeléséhez, különböző, növekvő koncentrációjú CD40 mAb-kat 25 µg/ml oldható CD40-Ig-vel előinkubáltunk, majd ezt követően a komplexeket Jurkat/CD40L sejtekkel inkubáltuk. A CD40L kifejeződésének bizonyítása a szelektált CD40L Jurkat T-sejteken kezdetben áramlási citometriával történt, amihez FITC-jelölt anti-CD40L-et alkalmaztunk (az adatokat nem mutattuk be). Ezeken a céltábla sejteken a CD40 kötődését a CD40L-hez a Jurkat/CD40 sejtek áramlási citometriájával határoztuk meg, felhasználva FITC-kecske anti-humán Ig-t a kötött CD40-Ig kimutatásához. A CD40-Ig titrálása azt mutatta, hogy a receptortelítődés hozzávetőleg 25 µg/ml CD40-Ig-nél található. Az oldható CD40 telítési koncentrációjának felhasználásával az S2C6 a CD40-nel 0,25-től 2:1 arányig (tömeg) komplexet képzett, ahol a CD40 kötődése a

CD40L-lel dóziszfüggően nő (hozzávetőleg 50 %, 100 %, 146 % és 220 % hozzávetőleg 6 µg/ml, 13 µg/ml, 25 µg/ml, 20 és 50 µg/ml koncentrációknál, 4. ábra). A gátló M3 ellenanyag hasonló titrálása a CD40/CD40L kötődést dóziszfüggően blokkolta. A G28-5 mAb a CD40/CD40L kötődésre 25 µg/ml koncentrációig nem hatott és a kontroll EXA2-1H8 Ig-hez képest a vizsgált legnagyobb koncentrációban (50 µg/ml) kissé stimulált.

Ezek az adatok tisztán tükrözik, hogy az S2C6 mAb az CD40/CD40L kölcsönhatást elősegíti. Továbbá az S2C6 a G28-5-től és az M3-tól a CD40/CD40L kölcsönhatást növelő képességére nézve eltér.

Egy fordított vizsgálati módszerben az anti-CD40 mAb-k hatását az oldható CD40L és a membránhoz kötött, B-sejteken kifejeződő CD40 kölcsönhatására nézve értékeltük ki. Az oldható CD40L titrálása az mutatta, hogy a Ramos B sejtek felszíni CD40 telítése hozzávetőleg 10 µg/ml. A különböző anti-CD40 mAb-k növekvő koncentrációit CD40-et kifejező B-sejtekkel előinkubáltuk, majd ezt követően a sejteket FITC jelölt oldható CD40L-lel inkubáltuk. A jelölt CD40L kötődését ezután a B-sejteken lévő CD40-hez a Ramos sejtek áramlási citometriájával határoztuk meg. Az oldható CD40L telítési koncentrációjának felhasználásával, az S2C6 mAb, a CD40-et kifejező sejtekkel komplexet képezve, a CD40L kötődést maximálisan hozzávetőleg 51 %-tól 68 %-ig 0,04-2 µg/ml koncentrációknál növelte (5. ábra).



Ezek az adatok azt mutatják, hogy nem úgy mint az M3 és a G28-5, az S2C6 meglepetésünkre a CD40L-lel szinergizál a B-sejtek CD40 proliferációjának érdekében.

E típus második vizsgálati módszerében a B-sejteket vagy anti-CD40 mAb-vel titráltuk, vagy a nem proliferáló CD40L stimulátor T-sejtekkel meghatározott 4:1 (B:T) aránynál egyesítettük és az anti-CD40 mAb-vel titráltuk (7. ábra).

Ezek az eredmények azt mutatják, hogy ilyen körülmények között a humán elsődleges perifériás vér B-sejtek aktiválását 10 µg/ml G28-5 mAb és ligand kétszeresére növelte szemben magával a G28-5-tel. Meglepő mértékben az S2C6 jelentősen aktívabb és a ligand jelenlétében a B-sejtek proliferációját 16,2-szeresére növelte 10 µg/ml koncentrációnál (a legmagasabb vizsgált dózisonál) magához a S2C6 képest.

Mindent egybevetve ezek az adatok azt mutatják, hogy az S2C6 a CD40-nel komplexet képezve a CD40L kötődést növeli. Bár az S2C6 maga a B-sejtek proliferációját hasonlóan stimulálja mint a G28-S, az S2C6-ot mégis megkülönböztethetjük a G28-5-től a CD40L kötődés növelése és az ezt követő CD40L közvetített aktivációs jel mértéke miatt.

3. Példa

Az S2C6 monoklonális ellenanyag a tumorok növekedését gátolja

A natív S2C6 mAb antitumor aktivitásának kiértékeléséhez nőstény C.B.-17 SCID egereket két csoportra osztottuk (csoportonként 20 egér). A csoportok felét a természetes ölősejtek aktivi-



tásának megszüntetésére anti-aszialo-GM1-gyel kezeltük [Murphy és mtsai: Eur. J. Immunol. 22, 241(1992)]. Az ezt követő napon az egereket iv. Ramos, HS Sultan vagy IM-9 sejtekkel (1×10^6 cells) kezeltük. Az egereket ez után ip. 1 mg/kg S2C6 IgG mAb-vel kezeltük, ahogy azt a 7. anyagok és módszerek részben leírtuk, és a részleges bénulást és a betegség első jeleit nyomon követtük.

A Ramos humán B-sejtes limfómát (8A. ábra), a HS Sultan többszörös mielómát (8B. ábra) vagy az IM-9 többszörös mielómát (8C. ábra) hordozó állatok S2C6 monoklonális ellenanyag kezelése a tumor tömegének, és az ezt követő tumorról kapcsolatos morbiditást és mortalitást, szignifikáns csökkenését eredményezte. Párhuzamos vizsgálatokban a hatékonyság anti-aszialo-GM1 jelenlétében fennmaradt, ami arra utal, hogy az S2C6 mAb jelenlétében a túlélés növekedése nem a nemspecifikus NK sejtek aktivitásának tulajdonítható. Az IM-9 sejtvonal abban tekinthető agresszív tumor modellnek, hogy humán Ig-t szekretál, a kór helyettes markereként.

Az IM-9 által beteg egerek S2C6 mAb-s kezelése az állatok túlélését jelentősen megnövelte. Ezek a tanulmányok világosan mutatják, hogy egerekbe ültetett humán tumoroknál az S2C6 erőteljes anti-tumor aktivitással bír.

4. Példa

Az egyláncú anti-CD40 immuntoxin fúziós fehérje a CD40-Ig-hez kötődik

A BD1-52C6 sFv-t (egyláncú anti-CD40 immuntoxin egy fúziós fehérje, mely a bryodin 1 (BD1) aminosav szekvenciájából [Francisco és mtsai: Journal of Biological Chemistry 272(39), 24165-24169(1997) és az S2C6 monoklonális ellenanyag variábilis régiójából áll) *Escherichia coli*-ban zárványtestként fejeztük ki, majd denaturáltuk és hagytuk ismételten feltekeredni.

Röviden, a teljes RNS-t az S2C6 hibridóma sejtekből TRIZOL reagenssel (Life Technologies) a gyártó utasításainak megfelelően elkülönítettük. A könnyű- és a nehézlánc variábilis régiójának elsőszál cDNS szintézise a szakirodalomban leírtaknak megfelelően történt [Gilliland és mtsai: Tissue Antigens, 47, 1-20 (1996)] olyan primereket használva, melyek a G-C kapocs 3' irányú részének hozzávetőleg 100 bázisos komplementer részeiből épültek fel. Az első szálát ezek után poli-G farokkal láttuk el és PCR-rel sokszoroztuk, felhasználva a poli-C lehorgonyzó primert, mely a poli-G farokkal komplementer, és egy olyan primert ágyasztunk be, mely hozzávetőleg 50 bázisát az elsőszál szintézis belsejéhez használtuk. A PCR primereket úgy terveztük, hogy a PCR termék 5' és 3' végein egyedi restriktációs hasítási helyeket hozzanak létre. A két PCR terméket, melyek a könnyű- és a nehézlánc variábilis régiókat kódoló szekvenciákat tartalmazzák, EcoRI és HindIII enzimekkel emésztettük, és azonos enzimekkel hasított pUC19 plazmidba ligáltuk. Az eredményül kapott plazmidok DNS-ei, a pSG5 és a p5G10, az S2C6 VL illetőleg az S2C6 VH kódoló régióit tartalmazzák. Mindkét plazmid DNS-ét szekvenáltuk, és így a szülői

monoklonális ellenanyag aminoterminális aminosav szekvenciáját igazoltuk.

Az S2C6 VH és VL fragmenseit "összevarrtuk" (a PCR végek átlapolása), ahogy az Gilliland és munkatársai leírták, és VH-VL irányban a klónozó vektorba építettük. Ezek után a BD1-G28-5 sFv sFv-fragmensét [Francisco és mtsai: J. Biol. Chem., 272, 24165-24169(1997) a pSE1S1-ből restrikciós emésztéssel eltávolítottuk és az S2C5 sFv-t helyére ligáltuk. Az eredményül kapott plazmid, a pSG40, a BD1-52C6 sFv-t kódoló gént tartalmazza, a T7 indukálható promoter szabályozása alatt.

A kifejezéshez a pSG40-et kompetens *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS törzs sejtjeibe transzformáltuk, és a sejteket T-táplevesben 37 °C-on tenyésztettük. Amikor a tenyészet OD₆₀₀ értéke elérte az 1,0 értéket a sejteket 1 mM izopropil-β-D-tiogalaktopiranoziddal (IPTG) 3 óráig inkubáltuk. Ezt követően a sejteket centrifugálással összegyűjtöttük és ultrahanggal lizáltuk, és a BD1-52C6 sFv fúziós terméket mint oldhatatlan zárványtest centrifugálással elkülönítettük, amit ezek után a következőképpen denaturáltuk. A zárványtesteket 5 mg/ml koncentrációban 7 M guanidinben oldatba vittük, és PBS-sel gyorsan hígítva (1:100) lehetővé tettük ismételt feltekeredését, ahol a PBS oldat kiegészítésként 0,3 M L-arginint és 2 mM DTT-t tartalmazott, ezek után a következő tisztításhoz 20 mM nátrium-foszfát pufferrel (pH = 7,4) szemben dializáltuk.

Az újjá tekeredett fehérjét Blue Sepharose-zal izoláltuk, majd affinitás kromatográfiával rögzített CD40-Ig-n tisztítottuk. A



tisztított fehérje kötődését ezután ELISA-val, kötött CD40-Ig-n vizsgáltuk. A mikrotiter lemezeket 0,5 µg/ml CD40-Ig-vel fedtük, majd 1 % borjú szérumalbumint és 0,05 % Tween 20-at tartalmazó PBS-ben (pH = 7,4) a tisztított BD1-S2C6 hígításait adtuk hozzá a következő monoklonális ellenanyagok jelenlétében: 25 µg/ml S2C6 mAb (Δ), 25 µg/ml BR96 kontrol ellenanyag (o), vagy az ellenanyag feleslege nélkül (□). A BD1-52C6 sFv kötődését a rögzített receptorhoz BD1-specifikus nyúl antiszérum, majd tormaperoxidázzal konjugált kecske anti-nyúl Ig hozzáadásával vizsgáltuk (Seattle Genetics, Inc., Bothell, Washington), ezt követően tormaperoxidázzal konjugált kecske anti-nyúl Ig-t adtunk hozzá.

A BD1-52C6 sFv kötődése a CD40-Ig-hez teljes mértékben gátolható az S2C6 mAb feleslegének hozzáadásával, de a kontroll mAb hozzáadásával nem (9. ábra).

5. Példa

A rekombináns S2C6 beadása a CD40 pozitív rosszindulatú daganatoknál

A CD40 pozitív malignus daganatos betegeket, mint például Non-Hodgkin-féle limfóma, többszörös mielóma és vastagbél vagy más karcinómák, rekombináns humanizált S2C6-anti-CD40 monoklonális ellenanyaggal injektáltuk (az egér CDR-ekkel és az emberi vázrégiókkal) vagy rekombináns kiméra ellenanyaggal, mely az S2C6 variábilis régióját és a humán ellenanyag állandó régióját foglalta magában. A rekombináns ellenanyagot *in vitro*



készítettük. A kezelés a betegség bármely időszakában elkezdhető, járulékos kemoterápiával vagy anélkül.

A kezelési tartomány a szer sóban vagy fiziológiásan elfogadható oldatban történő heti injektálását jelenti.

A rekombináns S2C6-nál a használt dózis 0,1 mg/m²-től (a beteg testfelszíne) 1000 mg/m²-ig terjed, előnyösen 100-500 mg/m².

Az injektálás intravénásan akár a perifériás, akár a centrális intravénás vonalon történt. A szert infúzióban és nem intravénás löketben adtuk be.

A rekombináns S2C6 terápiás hatékonyságát a következőképpen követtük: a) a perifériás vérben az össz limfocita, valamint T és B limfocita számok; b) a T limfociták aktivitása *in vitro* (segítő T4 limfociták és citotoxikus T8 limfociták); és/vagy c) a tumorok morfológiájának változásai, melyhez a következő módszereket alkalmaztunk: komputer tomográfia (CT), mágneses rezonancia képleképzés (MRI), x-radiografikus képleképzés, csontpásztázás és tumor biopszia, ahol a mintavételbe a csontvelő leszívás (BMA) is beletartozott.

A kapott eredménytől függően a CD40 pozitív malignus betegségek optimális kezelésében a terápiás tartomány fejlesztését értük el, miközben a tumor regresszió és a tumorsejtek teljes kiírtása érdekében az immunrendszerre a lehető legkisebb mérvű hatást gyakoroltunk.

A mikroorganizmusok letétbe helyezése:



Az S2C6 hibridómát, mely a natív monoklonális S2C6 ellenanyagot termeli, 1999. május 25-én az American Type Culture Collection (ATCC) gyűjteményébe (10801 University Boulevard, Manassass, Virginia 20110-2209), a Budapesti Szerződés a mikroorganizmusok nemzetközi letétbe helyezésének követelményei alapján, PTA-110 számon letétbe helyeztük.

Specifikus megvalósítási formák, hivatkozások:

A jelen találmány oltalmi köre nem korlátozódik az itt leírt specifikus megvalósítási formákra. Ténylegesen a találmány különböző módosításai, azt itt leírtakon kívül, a szakirodalomban jártas szakemberek számára az itt leírtak alapján és a kapcsolódó ábrák segítségével nyilvánvalók. Az ilyen módosítások szándékunknak megfelelően a csatolt igénypontok oltalmi körébe tartoznak.

Az itt idézett különböző hivatkozások, beleértve a szabadalmi bejelentéseket, szabadalmakat és tudományos közleményeket, melyeket itt hivatkozásként építettünk be, teljes terjedelmükre vonatkoznak.

Az alábbiakban részletesen ismertetjük a leírásban említett szekvenciákat.

A SZEKVENCIÁK JEGYZÉKE

<110> Seattle Genetics, Inc.

<120> Rekombináns anti CD40 ellenanyagok és használatuk

<130> 9632-009-228



<140>

<141>

<160> 15

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 336

<212> DNS

<213> *Mus musculus*

<220>

<221> CDS

<222> (1) . . (336)

<400> 1

```

gat gtt gtg gtg acc caa act cca ctc tcc ctg cct gtc agt ctt gga 48
Asp Val Val Val Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
  1             5             10             15
gct caa gcc tcc atc tct tgc aga tct agt cag agc ctt gta cac agt 96
Ala Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
      20             25             30
aat gga aac acc ttt tta cat tgg tac ctg cag aag cca ggc cag tct 144
Asn Gly Asn Thr Phe Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
      35             40             45
cca aaa ctc ctg atc tac aca gtt tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca 192
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
      50             55             60
gac agg ttc agt ggc agt gga tca ggg aca gat ttc aca ctc aag atc 240
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
      65             70             75             80
agc aga gtg gag gct gag gat ctg gga gtt tat ttc tgc tct caa act 288
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Thr
      85             90             95
aca cat gtt ccg tgg acg ttc ggt gga ggc acc aag ctg gaa atc caa 336
Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Gln
      100             105             110

```



<210> 2

<211> 112

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 2

```

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

```

<210> 3

<211> 16

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 3

```

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Phe Leu His
 1              5              10              15

```

<210> 4

<211> 7

<212> PRT

<213> *Mus musculus*



<400> 4

Thr Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 5

Ser Gln Thr Thr His Val Pro Trp Thr
1 5

<210> 6

<211> 342

<212> DNS

<213> *Mus musculus*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(342)

<400> 6

```
gag gtc cag ctg cag cag tct gga cct gac ctg gtg aag cct ggg gct 48
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Asp Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
tca gtg aag atc tcc tgc aag gct tct ggt tac tca ttc act ggc tac 96
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
20 25 30
tac ata cac tgg gtg aag cag agc cat gga aag agc ctt gag tgg att 144
Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45
gga cgt gtt att cct aac aat gga ggc act agt tac aac cag aag ttc 192
Gly Arg Val Ile Pro Asn Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60
```



```

aag ggc aag gcc ata tta act gta gac aag tca tcc agc aca gcc tac 240
Lys Gly Lys Ala Ile Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
  65                      70                      75                      80
atg gaa ctc cgc agc ctg aca tct gag gac tct gcg gtc tat tac tgt 288
Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
                      85                      90                      95
gca aga gaa ggg atc tac tgg tgg ggc cac ggc acc act ctc aca gtc 336
Ala Arg Glu Gly Ile Tyr Trp Trp Gly His Gly Thr Thr Leu Thr Val
                      100                      105                      110

tcc tca
Ser Ser

```

<210> 7

<211> 114

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 7

```

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

Ser Ser

```

<210> 8

<211> 6

<212> PRT



<213> *Mus musculus*

<400> 8

Thr Gly Tyr Tyr Ile His
1 5

<210> 9

<211> 17

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 9

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

<210> 10

<211> 4

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 10

Glu Gly Ile Tyr
1

<210> 11

<211> 48

<212> DNS

<213> *Mus musculus*

<400> 11

agatctagtc agagccttgt acacagtaat ggaaacacct ttttacat 48



<210> 12

<211> 21

<212> DNS

<213> *Mus musculus*

<400> 12

acagtttcca accgattttc t 21

<210> 13

<211> 18

<212> DNS

<213> *Mus musculus*

<400> 13

actggctact acatacac 18

<210> 14

<211> 51

<212> DNS

<213> *Mus musculus*

<400> 14

cgtgttattc ctaacaatgg aggcactagt tacaaccaga agttcaaggg c 51

<210> 15

<211> 12

<212> DNS

<213> *Mus musculus*

<400> 15

gaagggatct ac 12



SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. A 3., 4., 8., 9. vagy 10., szekvenciájú molekulák, melyekre jellemző, hogy (a) a CD40-hez immunspecifikusan kötődnek, és (b) a natív S2C6 monoklonális ellenanyaghoz képest, amit a letétbe helyezett ATCC PTA-110 hozzáférési számú hibridóma szekretál, elsődleges aminosav szekvenciájukban egy vagy több helyettesítést vagy betoldást tartalmaznak.

2. A 3., 4., 8., 9. vagy 10., szekvenciájú molekulák, melyekre jellemző, hogy (a) a CD40-hez immunspecifikusan kötődnek, és (b) nem az S2C6 monoklonális ellenanyag, amit a letétbe helyezett ATCC PTA-110 hozzáférési számú hibridóma szekretál, és nem az S2C6 papainnal vagy pepszinnel végzett emésztésének az eredménye.

3. Az 1. és a 2. igénypont szerinti molekula, mely a 2. aminosav szekvenciát vagy a 7. aminosav szekvenciát vagy mind a 2., mind a 7. aminosav szekvenciát tartalmazza.

4. Az 1. és a 2. igénypont szerinti molekula, mely ellenanyag.

5. Az 1. és a 2. igénypont szerinti molekula, mely fúziós fehérje, ami a második nem ellenanyag molekula aminosav szekvenciáját tartalmazza.

6. Az 5. igénypont szerinti molekula, mely a bryodin (BD1) aminosav szekvenciáját a 7. szekvenciához, a 2. szekvenciához kapcsoltn tartalmazza.

7. Az 1. és a 2. igénypont szerinti molekula, mely ellenanyag az S2C6 monoklonális ellenanyag variábilis régióját



úgy tartalmazza, ahogy azt a letétbe helyezett ATCC PTA-110 hozzáférési számú hibridóma szekretálja, valamint a humán állandó régiót is magában foglalja.

8. Az 1-4. igénypontok bármelyike szerinti molekula, mely tisztított.

9. Tisztított fehérje, mely a 2. vagy a 7. szekvenciával legalább 95 %-ban azonos, mely fehérjére jellemző, hogy (a) a CD40-hoz immunospecifikusan kötődik, és (b) a natív S2C6 monoklonális ellenanyaghoz képest, amit a letétbe helyezett ATCC PTA-110 hozzáférési számú hibridóma szekretál, elsődleges aminosav szekvenciájukban egy vagy több helyettesítést vagy betoldást tartalmaz.

10. Tisztított fehérje, mely (a) a CD40 kötődésért a letétbe helyezett ATCC PTA-110 hozzáférési számú hibridóma által szekretált S2C6-vel vetélkedik, (b) a CD40 ligand kötődését a CD40-hoz legalább 45 %-kal növeli, és (c) a natív S2C6 monoklonális ellenanyaghoz képest, amit a letétbe helyezett ATCC PTA-110 hozzáférési számú hibridóma szekretál, elsődleges aminosav szekvenciájában egy vagy több helyettesítést vagy betoldást tartalmaz.

11. Tisztított fehérje, mely (a) a CD40 kötődésért a letétbe helyezett ATCC PTA-110 hozzáférési számú hibridóma által szekretált S2C6-vel vetélkedik, (b) a CD40 ligand kötődését a CD40-hoz legalább 45 %-kal növeli, és (c) nem monoklonális S2C6 ellenanyag, amit a letétbe helyezett ATCC PTA-110 hozzáférési



számú hibridóma szekretál, és nem az S2C6 papainnal vagy pepszinnel végzett emésztésének az eredménye.

12. Izolált nukleinsav, mely az 1., 6., 11., 12., 13., 14., vagy 15. szekvenciát foglalja magában.

13. Izolált nukleinsav, mely a 3., 4., 8., 9. vagy 10. fehérjét kódoló nukleotid szekvenciát foglalja magában.

14. A 13. igénypont szerinti izolált nukleinsav, mely a következő fehérjéket kódoló nukleotid szekvenciával rendelkezik: (a) az S2C6 monoklonális ellenanyag nehézláncának variábilis doménja, ahogy azt a letétbe helyezett ATCC PTA-110 hozzáférési számú hibridóma szekretálja, és (b) a humán állandó régió.

15. Izolált nukleinsav, mely a 2. vagy a 7. szekvenciákkal legalább 95 %-ban azonos aminosav szekvenciájú fehérjét kódoló nukleinsav szekvenciát tartalmazza.

16. Izolált nukleinsav, mely fehérjét kódoló nukleinsav szekvenciát tartalmaz, mely fehérje a CD40 kötődésért a letétbe helyezett ATCC PTA-110 hozzáférési számú hibridóma által szekretált S2C6 monoklonális ellenanyaggal vetélkedik, és ahol a fehérje a CD40 ligand kötődését a CD40-hez legalább 45 %-kal növeli.

17. Izolált nukleinsav, mely fúziós fehérjét kódoló nukleinsav szekvenciát tartalmaz, ahol a szóban forgó fúziós fehérje a bryodin (BD1) aminosav szekvenciáját a 7. szekvenciához, a 2. szekvenciához kapcsoltn tartalmazza.

18. Izolált nukleinsav, mely a 2. és a 7. szekvenciát tartalmazó csoport fehérjéjét kódoló DNS szekvenciájával fordítottan



komplementer DNS-hez erősen szigorú körülmények között hibridizál, ahol az izolált nukleinsav a CD40-nel immunspecifikusan kötődni képes fehérjét kódol.

19. Rekombináns sejt, mely rekombináns nukleinsav vektort tartalmaz, mely nukleinsav szekvenciája olyan fehérjét kódol, mely a CD40 kötődésért a letétbe helyezett ATCC PTA-110 hozzáférési számú hibridóma által szekretált S2C6 monoklonális ellenanyaggal vetélkedik, és ahol a fehérje a CD40 ligand kötődését a CD40-hez legalább 45 %-kal növeli.

20. Rekombináns sejt, mely rekombináns nukleinsav vektort tartalmaz, ahol a vektor az 1., 6., 11., 12., 13., 14., vagy 15. szekvenciát foglalja magában.

21. Eljárás fehérje termelésére, azzal jellemezve, hogy a következőket foglalja magában:

- (a) a fehérjét kódoló nukleotid szekvenciát tartalmazó sejtek növesztése, mely fehérje a CD40 kötődésért a letétbe helyezett ATCC PTA-110 hozzáférési számú hibridóma által szekretált S2C6-vel vetélkedik, és mely fehérje a CD40 ligand kötődését a CD40-hez legalább 45 %-kal növeli, olyan körülmények között, hogy a fehérje a sejtekben kifejeződjön; és
- (b) a kifejezett fehérje kinyerése.

22. Eljárás fehérje termelésére, azzal jellemezve, hogy a következőket foglalja magában:

- (a) a 2., 3., 4., 7., 8., 9. vagy 10. szekvenciájú fehérjét kódoló rekombináns nukleinsavat tartalmazó sejtek növesztése



olyan körülmények között, hogy a szóban forgó nukleotid szekvencia a sejtben kifejeződjön; és

(b) a kifejezett fehérje kinyerése.

23. Gyógyszerészeti összetétel, mely a következőket foglalja magában:

- (a) a rákbetegség kezelésében vagy megelőzésében hatásos mennyiségű molekula, mely a 2., 3., 4., 7., 8., 9. vagy 10. szekvenciát tartalmazza, mely molekula (i) a CD40-hez immunspecifikusan kötődik (ii) a CD40 ligand kötődését a CD40-hez legalább 45 %-kal növeli, és (iii) a natív S2C6 monoklonális ellenanyaghoz képest, amit a letétbe helyezett ATCC PTA-110 hozzáférési számú hibridóma szekretál, elsődleges aminosav szekvenciájában egy vagy több helyettesítést vagy betoldást tartalmaz; és
- (b) gyógyszerészetileg elfogadható hordozó.

24. Gyógyszerészeti összetétel, mely a következőket foglalja magában:

- (a) a rákbetegség kezelésében vagy megelőzésében hatásos mennyiségű tisztított fehérje, mely (i) a letétbe helyezett ATCC PTA-110 hozzáférési számú hibridóma által szekretált S2C6 monoklonális ellenanyaggal a CD40 kötődésért vetélkedik, (ii) a CD40 ligand kötődését a CD40-hez legalább 45 %-kal növeli, és (iii) a natív S2C6 monoklonális ellenanyaghoz képest, amit a letétbe helyezett ATCC PTA-110 hozzáférési számú hibridóma



szekretál, elsődleges aminosav szekvenciájában egy vagy több helyettesítést vagy betoldást tartalmaz; és

(b) gyógyszerészetileg elfogadható hordozó.

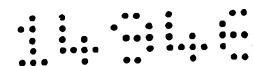
25. Gyógyszerészeti összetétel, mely a következőket foglalja magában:

(a) a rákbetegség kezelésében vagy megelőzésében hatásos mennyiségű tisztított fehérje, mely (i) a letétbe helyezett ATCC PTA-110 hozzáférési számú hibridóma által szekretált S2C6 monoklonális ellenanyaggal a CD40 kötődésért vetélkedik, (ii) a CD40 ligand kötődését a CD40-hez legalább 45 %-kal növeli, és (iii) nem monoklonális ellenanyag, amit a letétbe helyezett ATCC PTA-110 hozzáférési számú hibridóma szekretál, és nem az S2C6 papainnal vagy pepszinnel végzett emésztésének az eredménye; és

(b) gyógyszerészetileg elfogadható hordozó.

26. Gyógyszerészeti összetétel, mely a következőket foglalja magában:

(a) az immunválasz aktiválásában vagy növelésében hatásos mennyiségű molekula, mely a 2., 3., 4., 7., 8., 9. vagy 10. szekvenciát tartalmazza, mely molekula (i) a CD40-hez immunspecifikusan kötődik (ii) a CD40 ligand kötődését a CD40-hez legalább 45 %-kal növeli, és (iii) a natív S2C6 monoklonális ellenanyaghoz képest, amit a letétbe helyezett ATCC PTA-110 hozzáférési számú hibridóma



szekretál elsődleges aminosav szekvenciájában egy vagy több helyettesítést vagy betoldást tartalmaz; és

(b) gyógyszerészetileg elfogadható hordozó.

27. Gyógyszerészeti összetétel, mely a következőket foglalja magában:

(a) az immunválasz aktiválásában vagy növelésében hatásos mennyiségű tisztított fehérje, mely (i) a letétbe helyezett ATCC PTA-110 hozzáférési számú hibridóma által szekretált monoklonális ellenanyaggal a CD40 kötődésért vetélkedik, (ii) a CD40 ligand kötődését a CD40-hez legalább 45 %-kal növeli, és (iii) a natív S2C6 monoklonális ellenanyaghoz képest, amit a letétbe helyezett ATCC PTA-110 hozzáférési számú hibridóma szekretál, elsődleges aminosav szekvenciájában egy vagy több helyettesítést vagy betoldást tartalmaz; és

(b) gyógyszerészetileg elfogadható hordozó.

28. Gyógyszerészeti összetétel, mely a következőket foglalja magában:

(a) az immunválasz aktiválásában vagy növelésében hatásos mennyiségű tisztított fehérje, mely (i) a letétbe helyezett ATCC PTA-110 hozzáférési számú hibridóma által szekretált S2C6 monoklonális ellenanyaggal a CD40 kötődésért vetélkedik, (ii) a CD40 ligand kötődését a CD40-hez legalább 45 %-kal növeli, és (iii) nem monoklonális ellenanyag, amit a letétbe helyezett ATCC PTA-110 hozzáférési számú hibridóma szekretál, és nem



az S2C6 papainnal vagy pepszinnel végzett emésztésének az eredménye; és

(b) gyógyszerészetileg elfogadható hordozó.

29. A 23-28. igénypontok bármelyike szerinti gyógyszerészeti összetétel, mely a fentieken kívül CD40 ligandot is tartalmaz.

30. Eljárás rákbetegek kezelésére vagy betegségük megelőzésére, azzal jellemezve, hogy a szubjektumba a 2., 3., 4., 7., 8., 9. vagy 10. szekvenciát tartalmazó molekulának a rákbetegség kezeléséhez és megelőzéséhez hatásos mennyiségben történő beadását tartalmazza, mely molekulára jellemző, hogy (i) a CD40-hez immunspecifikusan kötődik, (ii) a CD40 ligand kötődését a CD40-hez legalább 45 %-kal növeli, és (iii) a natív S2C6 monoklonális ellenanyaghoz képest, amit a letétbe helyezett ATCC PTA-110 hozzáférési számú hibridóma szekretál, elsődleges aminosav szekvenciájukban egy vagy több helyettesítést vagy betoldást tartalmaznak.

31. Eljárás rákbetegek kezelésére vagy vagy betegségük megelőzésére, azzal jellemezve, hogy a szubjektumba a rákbetegség kezeléséhez és megelőzéséhez hatásos mennyiségben történő tisztított fehérje beadását tartalmazza, melyre jellemző, hogy (i) a letétbe helyezett ATCC PTA-110 hozzáférési számú hibridóma szekretált S2C6 monoklonális ellenanyag a CD40 kötődésért vetélkedik, (ii) a CD40 ligand kötődését a CD40-hez legalább 45 %-kal növeli, és (iii) a natív S2C6 monoklonális ellenanyaghoz képest, amit a letétbe helyezett ATCC PTA-110



hozzáféresi számú hibridóma szekretál elsődleges aminosav szekvenciájában egy vagy több helyettesítést vagy betoldást tartalmaz.

32. Eljárás rákbetegek kezelésére vagy vagy betegségük megelőzésére, azzal jellemezve, hogy a szubjektumba a rákbetegség kezeléséhez és megelőzéséhez hatásos mennyiségben történő tisztított fehérje beadását tartalmazza, mely tisztított fehérjére jellemző, hogy (i) a letétbe helyezett ATCC PTA-110 hozzáféresi számú hibridóma által szekretált S2C6 monoklonális ellenanyaggal a CD40 kötődésért vetélkedik, (ii) a CD40 ligand kötődését a CD40-hez legalább 45 %-kal növeli, és (iii) nem monoklonális ellenanyag, amit a letétbe helyezett ATCC PTA-110 hozzáféresi számú hibridóma szekretál, és nem az S2C6 papainnal vagy pepszinnel végzett emésztésének az eredménye.

33. Eljárás az immunválasz aktiválására és növelésére, azzal jellemezve, hogy a szubjektumba a 2., 3., 4., 7., 8., 9. vagy 10. szekvenciát tartalmazó molekulának az immunválasz aktiválásához és növeléséhez hatásos mennyiségben történő beadását tartalmazza, mely molekulára jellemző, hogy (i) a CD40-hez immunspecifikusan kötődik, (ii) a CD40 ligand kötődését a CD40-hez legalább 45 %-kal növeli, és (iii) a natív S2C6 monoklonális ellenanyaghoz képest, amit a letétbe helyezett ATCC PTA-110 hozzáféresi számú hibridóma szekretál elsődleges aminosav szekvenciájukban egy vagy több helyettesítést vagy betoldást tartalmaznak.



34. Eljárás az immunválasz aktiválására és növelésére, az-
zal jellemezve, hogy a szubjektumba az immunválasz aktiválásá-
hoz és növeléséhez a tisztított fehérje hatásos mennyiségben tör-
ténő beadását tartalmazza, mely tisztított fehérjére jellemző, hogy
(i) a letétbe helyezett ATCC PTA-110 hozzáférési számú
hibridóma által szekretált S2C6 monoklonális ellenanyaggal a
CD40 kötődésért vetélkedik, (ii) a CD40 ligand kötődését a CD40-
hez legalább 45 %-kal növeli, és (iii) a natív S2C6 monoklonális
ellenanyaghoz képest, amit a letétbe helyezett ATCC PTA-110
hozzáférési számú hibridóma szekretál, elsődleges aminosav
szekvenciájában egy vagy több helyettesítést vagy betoldást
tartalmaz.

35. Eljárás az immunválasz aktiválására és növelésére, az-
zal jellemezve, hogy a szubjektumba a tisztított fehérjének az im-
munválasz aktiválásához és növeléséhez hatásos mennyiségben
történő beadását tartalmazza, mely tisztított fehérjére jellemző,
hogy (i) a letétbe helyezett ATCC PTA-110 hozzáférési számú hib-
ridóma által szekretált S2C6 monoklonális ellenanyaggal a CD40
kötődésért vetélkedik, (ii) a CD40 ligand kötődését a CD40-hez
legalább 45 %-kal növeli, és (iii) nem monoklonális ellenanyag,
amit a letétbe helyezett ATCC PTA-110 hozzáférési számú hibri-
dóma szekretál, és nem az S2C6 papainnal vagy pepszinnel
végzett emésztésének az eredménye.

36. Eljárás az immunválasz aktiválására és növelésére,
azzal jellemezve, hogy a szubjektumba a 2., 3., 4., 7., 8., 9. vagy
10. szekvenciát tartalmazó molekulának az immunbetegség keze-



léséhez vagy növeléséhez hatásos mennyiségben történő beadását tartalmazza, mely molekulára jellemző, hogy (i) a CD40-hez immunspecifikusan kötődik, (ii) a CD40 ligand kötődését a CD40-hez legalább 45 %-kal növeli, és (iii) a natív S2C6 monoklonális ellenanyaghoz képest, amit a letétbe helyezett ATCC PTA-110 hozzáférési számú hibridóma szekretál elsődleges aminosav szekvenciájukban egy vagy több helyettesítést vagy betoldást tartalmaznak.

37. Eljárás immunbetegség kezelésére és megelőzésére, azzal jellemezve, hogy a szubjektumba az immunbetegség kezeléséhez vagy növeléséhez a tisztított fehérje hatásos mennyiségben történő beadását tartalmazza, mely tisztított fehérjére jellemző, hogy (i) a letétbe helyezett ATCC PTA-110 hozzáférési számú hibridóma által szekretált S2C6 monoklonális ellenanyaggal a CD40 kötődésért vetélkedik, (ii) a CD40 ligand kötődését a CD40-hez legalább 45 %-kal növeli, és (iii) a natív S2C6 monoklonális ellenanyaghoz képest, amit a letétbe helyezett ATCC PTA-110 hozzáférési számú hibridóma szekretál, elsődleges aminosav szekvenciájában egy vagy több helyettesítést vagy betoldást tartalmaz.

38. Eljárás immunbetegség kezelésére és megelőzésére, azzal jellemezve, hogy a szubjektumba a tisztított fehérjének az immunbetegség kezeléséhez vagy növeléséhez hatásos mennyiségben történő beadását tartalmazza, mely tisztított fehérjére jellemző, hogy (i) a letétbe helyezett ATCC PTA-110 hozzáférési számú hibridóma által szekretált S2C6 monoklonális ellenanyag-



gal a CD40 kötődésért vetélkedik, (ii) a CD40 ligand kötődését a CD40-hez legalább 45 %-kal növeli, és (iii) nem monoklonális ellenanyag, amit a letétbe helyezett ATCC PTA-110 hozzáférési számú hibridóma szekretál, és nem az S2C6 papainnal vagy pepszinnel végzett emésztésének az eredménye.

39. A 30-38. igénypontok bármelyike szerinti gyógyszerészeti összetétel, mely a fentieken kívül CD40 ligand beadását is tartalmazza.

40. A 30-38. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a szubjektum ember.

41. A 4. igénypont szerinti ellenanyag, melynek izotípusa nem IgG1.

42. Transzgenikus nem-humán állat, növény vagy elkülönített sejt, mely egy vagy több fehérjét kódoló transzgént tartalmaz, mely fehérje a CD40-hez történő kötődésben a letétbe helyezett ATCC PTA-110 hozzáférési számú hibridóma által szekretált S2C6 monoklonális ellenanyaggal vetélkedik, és amely fehérje a CD40 ligand CD40-hez kötődését legalább 45 %-kal növeli.

43. Gyógyszerészeti összetétel, mely a rákbetegség vagy az immunrendszer betegségeinek gyógyításához vagy megelőzéséhez vagy az immunválasz aktiválásához vagy növeléséhez a következőket tartalmazza: (a) molekula, mely a CD40-hez immunspecifikusan kötődik, miközben ez a molekula a CD40-nek a CD40 ligandhoz való kötődését növeli; (b) CD40 ligand; és (c) gyógyszerészetileg elfogadható hordozó.



44. Eljárás rákbetegség vagy az immunbetegség kezelésére vagy megelőzésére egy alanyban, azzal jellemezve, hogy az alanyba a szóban forgó kezeléshez vagy megelőzéshez elegendő mennyiségű molekulát juttat be, mely molekula (a) a CD40-hez immunspecifikusan kötődik, miközben a molekula a CD40-nek a CD40 ligandhoz való kötődését növeli; és (b) a CD40 ligand beadását tartalmazza.

45. A 44. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az eljárás a rákbetegség kezelése.

46. A 30-32. és a 45. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a rák szolid tumor.

47. A 36-38. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az immunbetegség a rheumatoid arthritis.

ifj. Szentpéteri Ádám
szabadalmi ügyvivő
az S.B.G. & K. Szabadalmi Ügyvivői Iroda
tagja
H-1062 Budapest, Andrássy út 113.
Telefon: 461-1000 Fax: 461-1099

106 + 10 = 116 28


202 06 27

PC 70-100

GATGTTGTGGTGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCACTCTTGGAGCTCAAAGCCTCCATCTCTTGCAGATCT
 CTACAACACCACTGGGTTTGAGGTGAGAGGGACGGACAGTCAGAACCTCGAGTTCGGAGGTAGAGAACGTCTAGA
 D V V V T Q T P L S L P V S L G A Q A S I S C R S
 AGTCAGAGCCTTGACACAGTAATGGAACACCTTTTTACATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCAAA
 TCAGTCTCGGAACATGTGTCAATTACCTTTGTGGAAAAATGTAACCATGGACGTTCTCGGTCCGGTCAGAGGTTTT
 S Q S L V H S H G H T F L H W Y L Q K P G Q S P K
 CTCTGATCTACACAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGTCCAGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGGACAGAT
 GAGGACTAGATGTGTCAAAGGTTGGCTAAAAGACCCACGGGTCTGTCCAAGTCACCGTCACCTAGTCCCTGTCTA
 L L I Y T Y S H R F S G V P D R F S G S G S G T O
 TTCACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTTCTGCTCTCAAAGTACACATGTTCCG
 AAGTGTGAGTTCTAGTCGTCTACCTCCGACTCCTAGACCTCAAATAAAGACGAGAGTTTGATGTGTACAAGCC
 F T L K I S R V E A E G L G V Y F C S Q T T H V P
 TGGACGTYCGGTGGAGGCCAAGCTGGAAATCCAA
 ACCTGCAAGCCACCTCCGTGGTTTCGACCTTAGGT
 W T F G G G T K L E I Q

2. ÁBRA

GAGGTCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGACCTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATCTCCTGCAAGGCTTCT 75
 CTCCAGGTCGACGTCGTGAGACCTGGACTGGACCACTTCGGACCCCGAAGTCACTTCTAGAGGACGTTCCGAAGA
 E Y Q L Q Q S G P D L V K P G A S V K I S C K A S
 GGTACTCATTCACTGGCTACTACATACACTGGGTGAAGCAGAGCCATGGAAAAGGCCTTGAGTGGATTGGACGT 150
 CCAATGAGTAAGTGAACGATGATGTATGTACCCCACTTCGTCTCGGTACCTTTCTCGGAACCTCACCTAACCTGCA
 G Y S F T G Y Y I H V V K Q S H G K S L E V I G R
 GTTATTCCTAACAATGGAGGCACTAGTTACAACCAGAAGTTCAGGGCAAGGCCATATTAACTGTAGACAAGTCA 225
 CAATAAGGATTGTTACCTCCGTGATCAATGTTGGTCTTCAAGTTCGGTTCGGGTATAATTGACATCTGTYCAGT
 V I P N N G G T S Y N Q K F K G K A I L Y V D K S
 TCCAGCACAGCCTACATGGAACCTCCGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGGGGTCTATTACTGTGCAAGAGAAGGG 300
 AGGTGCTGTCGGATGTACCTTGAGGGCTGGGACTGTAGACTCCTGAGACGCCAGATAATGACACGTTCTCTTCCC
 S S T A Y M E L R S L T S E O S A V Y Y C A R E G
 ATCTACTGGTGGGGCCACGGCACCCTCTCACAGTCTCTCA 342
 TAGATGACCACCCCGTCCCGTGGTGAGAGTGTACAGGAGT
 I Y V W G H G T T L T V S S

3A-B. ÁBRA

S2C6 VL

DVVVTQTPLSLPVSLGAQASISCRSSOSLVHSNGNTFLHWYLQKPGQSPKL
CDR1

LIYTVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQTHVPWT
CDR2 CDR3

FGGGTKLEIQ

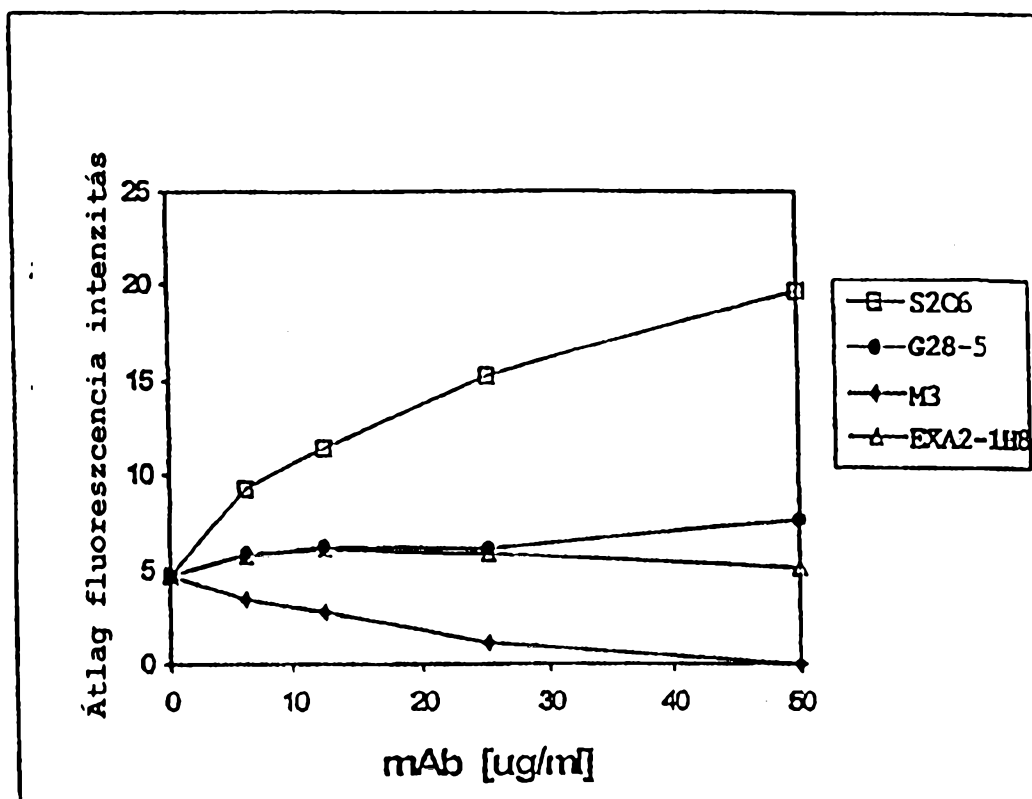
S2C6 VH

EVQLQQSGPDLVKPGASVKISCKASGYSFTGYIHWVKQSHGKSLEWIGRY
CDR1

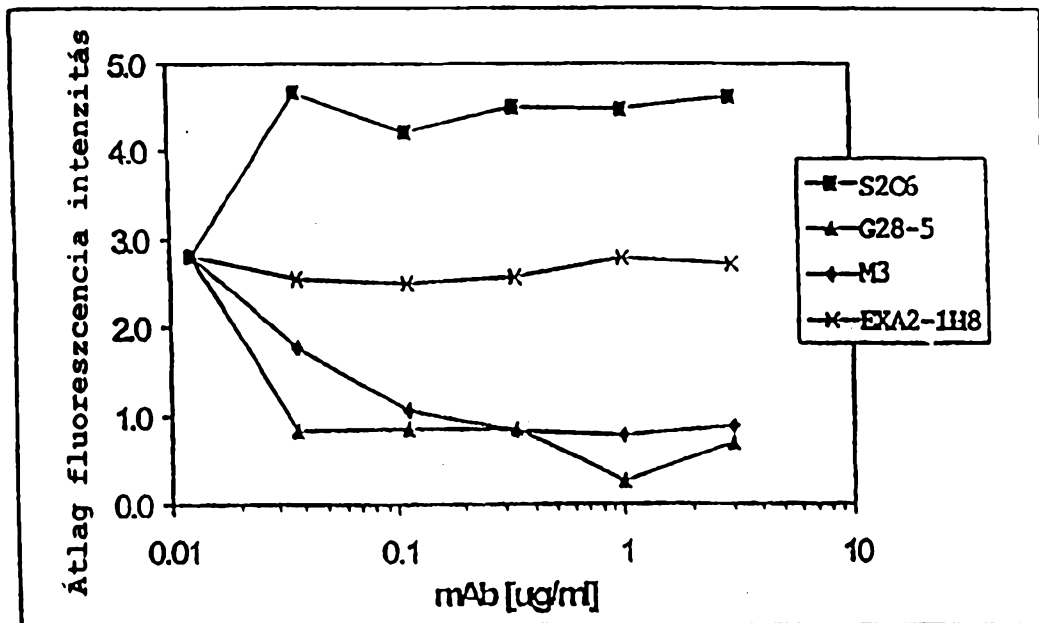
IPNNGGTSYNOKFKGKAILTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCAREGIY
CDR2 CDR3

WWGHGTTTLTVSS

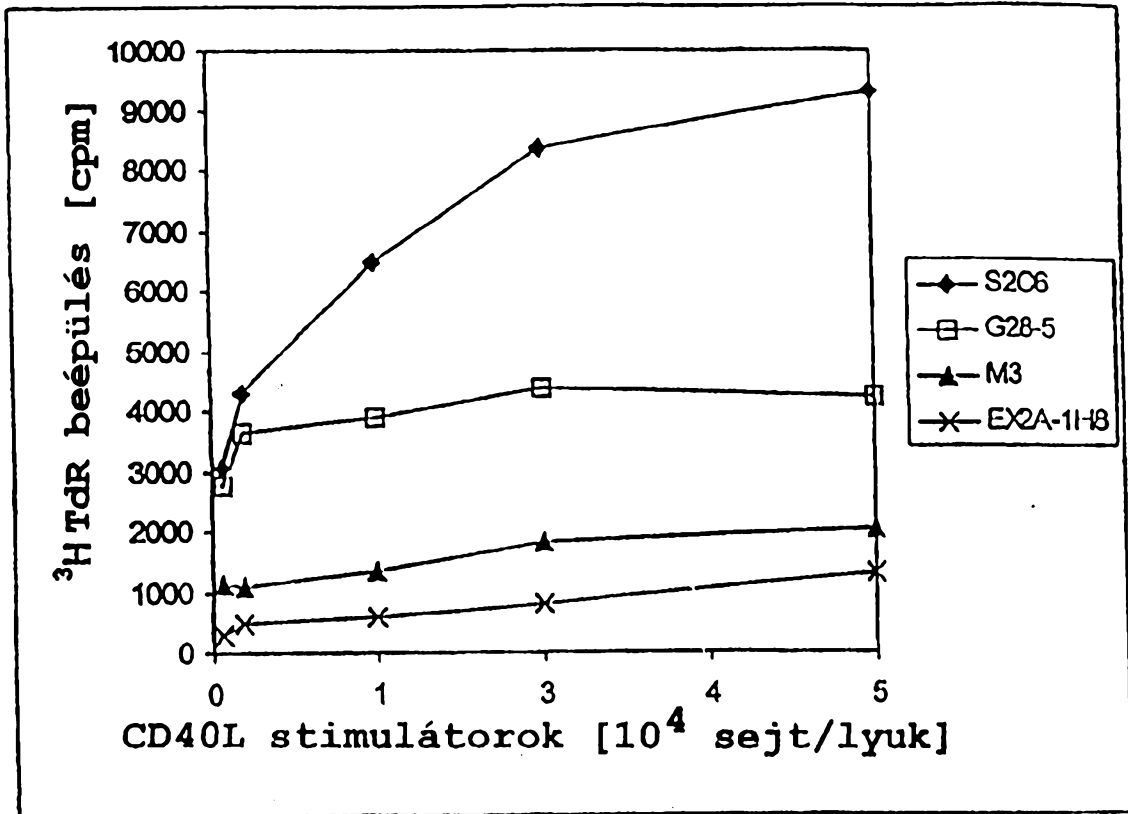
4. ÁBRA



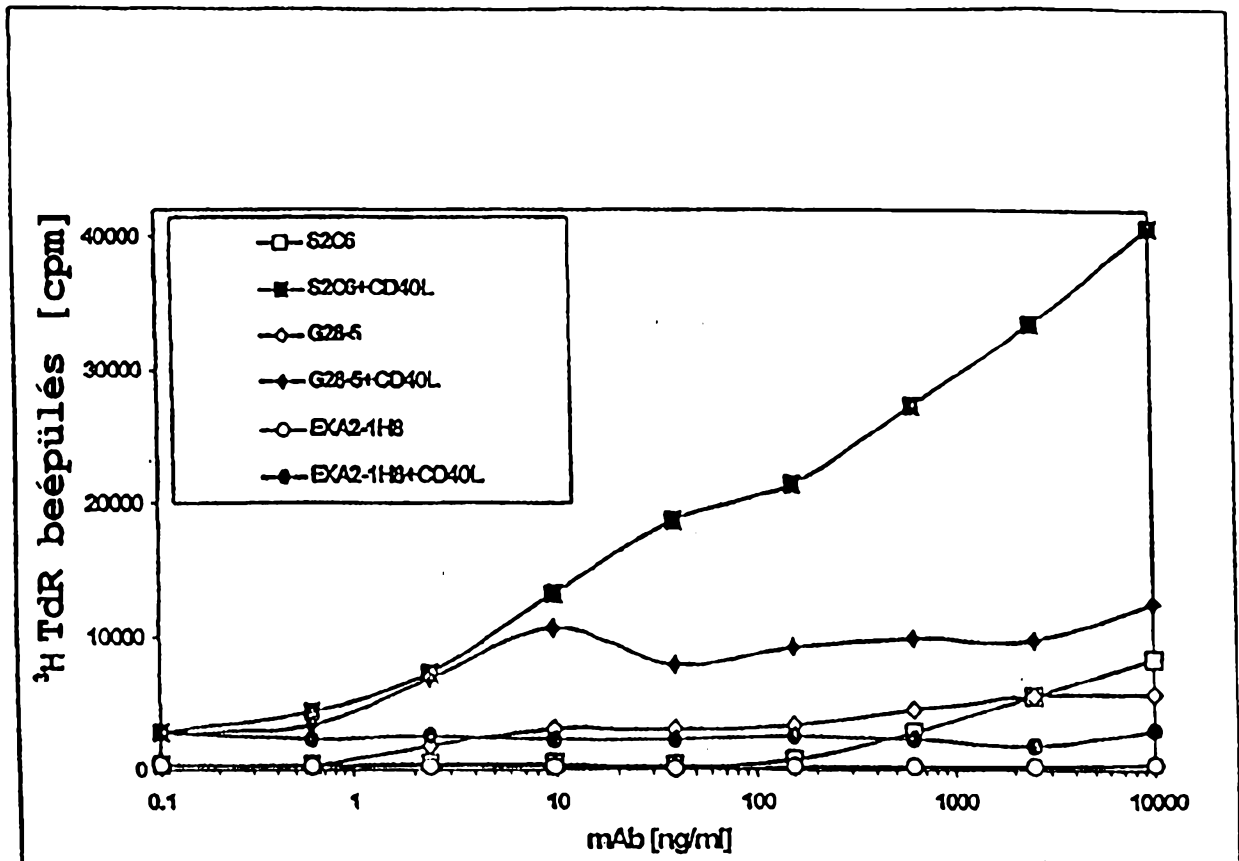
5. ÁBRA



6. ÁBRA

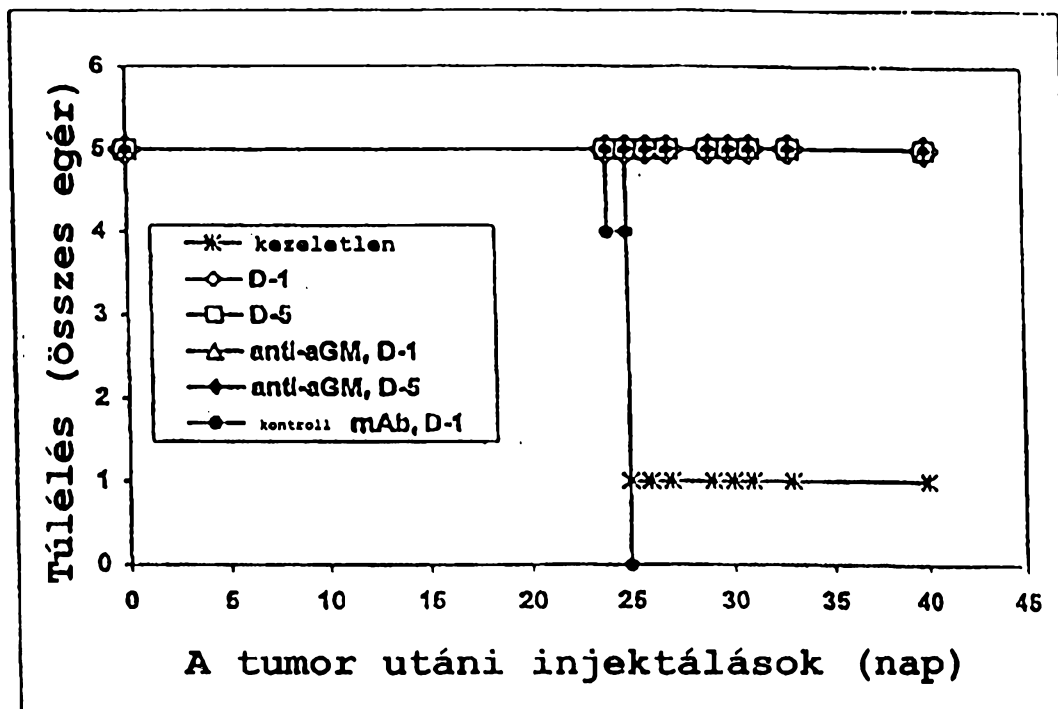


7. ÁBRA

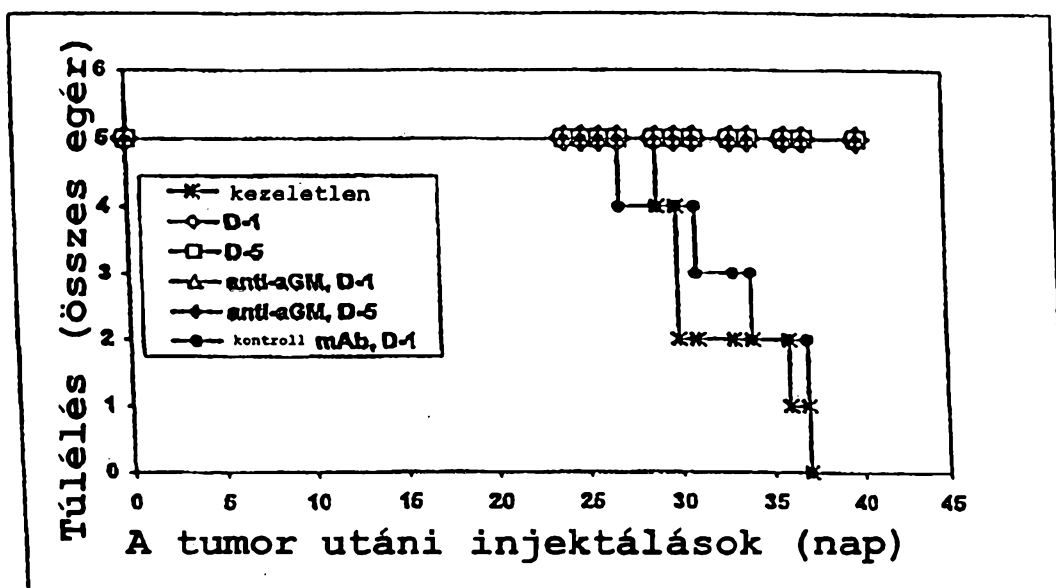


8A-B. ÁBRA

A.

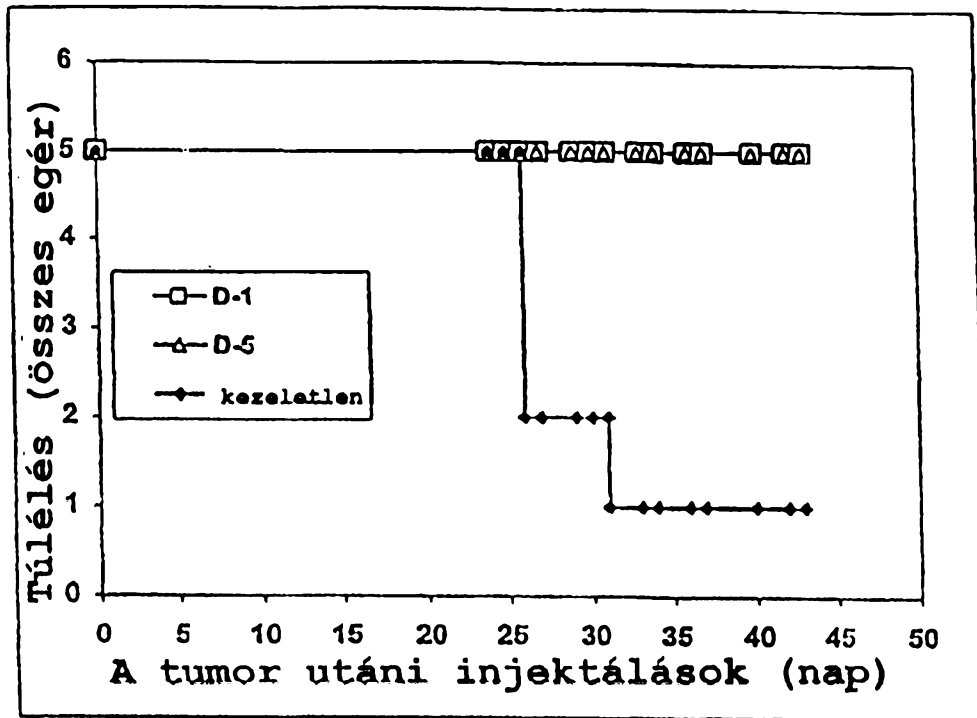


B.



8C. ÁBRA

C.



9. ÁBRA

