

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
28. Dezember 2006 (28.12.2006)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2006/136892 A2

(51) Internationale Patentklassifikation:
C07K 7/00 (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/IB2006/001490

(22) Internationales Anmeldedatum:
7. Juni 2006 (07.06.2006)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
102005 028619.4 20. Juni 2005 (20.06.2005) DE
102005 028545.7 21. Juni 2005 (21.06.2005) DE

FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV,
LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI,
NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE,
SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,
GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG,
ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU,
TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC,
NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Anmelder und

(72) Erfinder: CHERKASKY, Alexander [DE/DE]; Prinz-
Georg Str. 5, 40477 Düsseldorf (DE).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu ver-
öffentlichen nach Erhalt des Berichts

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,
AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,
CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES,

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Ab-
kürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Co-
des and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der
PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: NOVEL CHERKASKY FUSION PROTEINS CONTAINING ANTIBODY BINDING PROTEINS OR THE REGIONS
THEREOF

(54) Bezeichnung: NEUARTIGE CHERLASKY - FUSIONSPROTEINE ENTHALTEN ANTIKORPERBINDEPROTEINE
ODER IHRE REGIONEN

(57) Abstract: Disclosed are novel fusion proteins containing antibody binding regions and certain other regions. Said fusion
proteins can form complexes with antibodies, which can thus be modified and be arranged three-dimensionally. Furthermore, the
effect thereof can be boosted.

(57) Zusammenfassung: Neuartige Fusionsproteine enthalten Antikörperbinderegionen und bestimmte andere Regionen und kön-
nen Komplexe mit Antikörpern bilden. Diese können somit modifiziert und in ihrer Wirkung verstärkt sowie räumlich angeordnet
werden.



WO 2006/136892 A2

Neuartige Cherkasky – Fusionsproteine enthaltend Antikörperbindeproteine oder ihre Regionen

Die Erfindung betrifft die Bereiche der Molekularbiologie, Immunologie und Biotechnologie.

Aus dem Stand der Technik sind Arbeiten und Veröffentlichungen (DE 102 02 191 A1, DE 103 501 31. A 1, und WO 2005 / 040382) bekannt, die Fusionsproteine enthaltend Fc – Region – Bindedomänen wie z. B. Staphylokokken Protein A (SPA) oder Fc Rezeptor Ekto bzw. Ligandbindedomäne und sequenz – spezifische Nukleinsäure – Bindedomänen sowie die Fusionsproteinen, enthaltend Antikörper Binderegionen wie vorzugsweise Staphylokokken – Protein A (SPA), extrazelluläre Region des Fc Rezeptors CD 64 oder ihre Regionen und Mikrotubuli Binderegionen, vorzugsweise Gephyrin, Tau, MAP oder ihre Regionen beschreiben. Diese Stoffe können nicht vielfältig eingesetzt werden.

Das breite Spektrum sowie Verwendungen der Fusionsproteinen enthaltend Antikörperbinderegionen sind noch nicht ausgearbeitet worden.

Die Aufgabe der Erfindung besteht in neuartigen Stoffen mit neuartigen Eigenschaften und Verwendungen, die Antikörper binden, anordnen, in ihrer Wirkung verstärken und deren Antigene binden können.

Die Aufgabe der Erfindung wird durch neuartige Fusionsproteine enthaltend Antikörperbinderegionen gemäß der Erfindung gelöst.

Fusionsproteine enthaltend Antikörperbinde Proteine oder ihre Regionen umfassen neuartige Klassen von Stoffen, Werkstoffen, Medikamenten, diagnostischen System, Klebstoffen, Farb und Markierungs Stoffen und vielen anderen Substanzen und Systemen. Anhand einiger Beispiele soll die Breite bzw. die Verwendungsbreite und Vorteile dieser Substanzen und derer Verwendung möglichkeiten dargestellt werden. Diese Breite bzw. zahlreiche Verwendungen und Vorteile sind bei Weitem nicht nur auf diese folgende Beispiele beschränkt.

Beispiel 1

Cherkasky – Fusionsproteine enthaltend IgE – Antikörperbinderegionen und hydrophile Regionen

Erhöhte Werte von IgE – Antikörpern kennzeichnen unter anderem Asthma, atopisches Ekzem, einige Allergien und Entzündungen. Die Zielsetzung bestimmter Therapien ist deswegen auf Verminderung der IgE – Werten gerichtet, d.h. Medikamente zu entwickeln, die IgE – Moleküle entfernen und dadurch ihre Konzentration senken.

Bekannt sind Anti – IgE – Antikörper von Genentech unter dem Handelsnamen Xolair. Da die Entfernung der IgE mittels Antikörper durch Makrophagen bzw. deren Aktivierung erfolgen sollte und diese selbst bei der Aktivierung Entzündungsfaktoren freisetzen, ist die Wirkung der Anti – IgE – Antikörper nicht so effektiv wie erwartet.

Cherkasky – Fusionsproteine enthaltend IgE – Antikörperbinderegionen und hydrophile Regionen können IgE – Antikörper binden und durch hydrophile Regionen mit dem Kreislauf aus einer Entzündungsherde entfernen und sind dabei nicht auf die Aktivierung von Makrophagen angewiesen. Dadurch kann die Behandlung effektiver und nebenwirkungsärmer durchgeführt werden.

Beispiel 2

Cherkasky – Fusionsproteine enthaltend IgE – Antikörperbinderegionen und Rezeptoren

Die Aufgabenstellung ist im Beispiel 1 erörtert worden.

Die Rezeptoren der Fusionsproteine binden vorzugsweise Entzündungsfaktoren wie TNF – Alpha, C 5a, C3a und C4a. Diese Fusionsproteine besitzen dadurch eine Doppelwirkung. Einerseits wird die Bindung der IgE Antikörper an ihre Rezeptoren durch Bindung an Fusionsproteinen gemäß der Erfindung bzw. dem Beispiel 2 blockiert, andererseits werden Entzündungsfaktoren wie TNF – Alpha, die freigesetzt sind, an die Rezeptorregionen der Fusionsproteinen gebunden. Die entzündungshemmende Doppelwirkung kann eine effektivere und nebenwirkungsärmere Behandlung ermöglichen.

Beispiel 3

Cherkasky – Fusionsproteine enthaltend IgE oder IgG – Antikörperbinderegionen und Enzyme.

Enzyme, die vorzugsweise, DNA sen, DNase 1, S 1 Endonuklease, Katlase oder Peroxidase sind, wirken ebenfalls entzündungshemmend sowie lindernd bei der Systemischen Lupus Erythemathosus (SLE).

Die entzündungshemmende Doppelwirkung der Fusionsproteinen nach diesem Beispiel ist also ähnlich wie die Doppelwirkung nach dem Beispiel 2.

Beispiel 4

Cherkasky – Fusionsproteine enthaltend IgE oder IgG – Antikörperbinderegionen, Rezeptoren und Enzyme

Diese Fusionsproteine besitzen eine dreifache entzündungshemmende Wirkung der Fusionsproteinen, die in den Beispielen 2 und 3 beschrieben sind, wenn Enzyme DNAse I, SI Endonuklease, Katalase, peroxidase oder andere entzündungshemmende Enzyme sind, und Rezeptoren, wie z.B. TNF Alpha Rezeptor, C5a, C 3a, C4a Rezeptoren oder andere Rezeptoren sind, die Entzündungsfaktoren binden.

Beispiel 5

Cherkasky – Fusionsproteine enthaltend Antikörperbinderegionen und fluoreszente Proteinen oder ihre Regionen

Mit Hilfe dieser Fusionsproteinen können Antikörper z.B. IgG oder IgE – Antikörper spezifisch markiert werden. Der Hauptvorteil der Markierung der Antikörper durch diese Fusionsproteinen ist die Genauigkeit. Ein Beispiel für ein fluoreszentes Protein ist z.B. GFP (Grünes fluoreszentes Protein) oder seine Region.

Beispiel 6

Cherkasky – Fusionsproteine enthaltend Antikörperbinderegionen und Metallbindeproteinen oder ihre Regionen

Diese Fusionsproteinen, komplexiert mit Metallatomen oder Ionen, können durch Magnetfelder gelenkt bzw. orientiert werden. Dadurch wird die Aufgabe der molekularen Orientierung gelöst. Metallbindeproteinen sind z.B. Astacin (von Astacus Fischen), Ferritin, Coeruloplasmin, eine Cystein – reiche Region u.v.a. Protein oder ihre Regionen.

Beispiel 7

Cherkasky – Fusionsproteine enthaltend Antikörperbinde, Metallbinde – und fluoreszente Regionen

Die Fusionsproteine können markieren und orientiert werden, welches z.B. bei der Isolierung und Reinigung der entsprechenden Antigenen der an Fusionsproteinen gebundenen Antikörper von Vorteil ist.

Beispiel 8

Cherkasky – Fusionsproteine enthaltend Antikörperbinde -, Polymerbinde – und Metallbinderegion

Diese Fusionsproteine können sich an ein Polymer, vorzugsweise Biopolymer wie z.B. eine DNA – Sequenz oder ein Polysaccharid wie Cellulose, Chitin, Pektin, Stärke, durch Polymerbinderegion binden, durch Antikörperbinderegion z.B. IgG bzw. monoklonale Antikörper binden und durch mit Metallionen und Atome komplexierte Metallbindedomäne gelenkt bzw. orientiert werden. Solche Komplexe aus Fusionsproteinen und Polysacchariden können z.B. zur Infiltration bestimmter Stoffe bzw. Substanzen, vorzugsweise Antigenen z.B. viralen Antigenen, verwendet werden.

Beispiel 9

Cherkasky – Fusionsproteine enthaltend Antikörperbinde-, Polymerbinde – und fluoreszente Proteine oder ihre Regionen

Die Vorteile und Verwendungen dieser Fusionsproteine sind ähnlich mit denen des Beispiel 8, wobei die fluoreszente Regionen ihre Farbe, Helligkeit oder Intensität in Abhängigkeit von Konzentrationen der gebundenen bzw. infiltrierten Antigenen ändern.

Beispiel 10

Cherkasky – Fusionsproteine enthaltend Antikörperbinde -, Metallbinde-, Polymerbinde und fluoreszente Proteine oder ihre Regionen

Die Verwendungen dieser Fusionsproteine sind ähnlich mit denen der Beispiele 8 und 9, wobei durch Metalle, die an Metallbinderegionen gebunden bzw. komplexiert sind, mittels Magnetfelder bessere molekulare Orientierung erreicht wird.

Beispiel 11

Cherkasky – Fusionsproteine enthaltend Antikörperbinderegion, und mindestens ein Rezeptor oder seine Region

Die Antikörperbinderegion ist vorzugsweise eine IgG Binderegion, wie z.B. SPA, wobei Rezeptor z.B. ein Entzündungsfaktor wie TNF Alpha, C5a, C4a oder C3a bindet.

Die Wirkung ist SLE – lindernd und ähnlich, wie in den Beispielen 2 –4 beschrieben ist.

Beispiel 12

Cherkasky – Fusionsproteine enthaltend Antikörperbinderegionen und Liganden oder ihre Regionen

Liganden sind z.B. C3b oder C4b Proteine des Immunsystems oder ihre Regionen, die an CR 1 – Rezeptoren der Erythrozyten binden, und an der Opsonierung und der Beseitigung der Immunkomplexe beteiligt sind. Durch solche Fusionsproteinen können Antikörper wie IgE bei Entzündungen oder IgG – Autoantikörper z.B. bei Epidermolysis bullosa acqesita (EBA) gebunden und auf alternativen Wege abgeführt und entsorgt werden, welches zur Linderung führt.

Beispiel 13

Cherkasky – Fusionsproteine enthaltend Antikörperbinderegionen, Rezeptoren und Liganden.

Rezeptoren sind z.B. Rezeptoren der Entzündungsfaktoren wie TNF Alpha, Liganden sind z.B. C3b und C4b oder ihre Regionen. Diese Fusionen haben die doppelte entzündungshemmende Wirkung wie die Proteine die in den Beispielen 2 – 4, 11 und 12 beschrieben sind.

Beispiel 14

Cherkasky – Fusionsproteine enthaltend Antikörperbinderegionen, Rezeptoren und Enzyme

Rezeptoren sind z.B. Entzündungsfaktor – Rezeptoren und Enzyme wie DNaseI, S1 Endonuklease, Kalalase oder Peroxidase und wirken entzündungshemmend. Die zusätzliche Bindung der Antikörper IgE oder IgG erhöht die entzündungshemmende Wirkung der Fusionsproteinen nach diesem Beispiel.

Beispiel 15

Cherkasky – Fusionsproteine enthaltend Antikörperbinderegionen oder ihre Regionen und Autoantigene oder ihre Regionen

Diese Fusionsproteine können zur Diagnose der Autoimmunerkrankungen verwendet werden. Die Fusionsproteine werden dabei in Serum hinzugeführt. Sollten sich im Serum Autoantikörper in geringen oder größeren Konzentrationen befinden, so binden sie sich an die Autoantigene oder autoantigene Regionen der Fusionsproteine. Die Fc Regionen werden aber Antikörper unspezifisch gebunden. Dadurch entsteht der multimolekulare Komplex, der niederschlägt.

Sollten sich keine oder nur wenige bzw. in geringer Konzentration, die Autoantikörper befinden, so werden die Autoantigene Regionen der Fusionsproteine entsprechend nicht gebunden und der multimolekulare Komplex entsteht demzufolge nicht. Der Niederschlag in dem Maße ist nicht zu beobachten.

Beispiel 16

Cherkasky – Fusionsproteine enthaltend Antikörperbinde-, autoantigene und fluoreszente Regionen

Die Verwendung dieser Fusionsproteine als diagnostische Tools bzw. Mittel ist ähnlich wie im Beispiel 15, wobei die Komplexbildung durch fluoreszente Proteine oder ihre Regionen verdeutlicht und besser visualisiert wird.

Beispiel 17

Cherkasky – Fusionsproteine enthaltend Antikörperbinde-, und T – Zell Reaktion auslösende Regionen

Die Modifikation monoklonaler IgG – Antikörper mit diesen Fusionsproteinen führt zur verbesserten Verwendung der Antikörper im Einsatz gegen virale, fungale bakterielle und Protozoenkrankheitserreger, weil diese durch T – Zellen angegriffen werden.

Beispiel 18

Cherkasky – Fusionsproteine enthaltend Antikörperbindeproteinen oder ihre Regionen und Speicherproteinen oder ihre Regionen

Als Speicherproteine können z.B. die tierischer Herkunft wie Kaseine oder die pflanzlicher Herkunft wie Viciline, Legumine, Gliadin, Glutenin, Lupine, Avenine, Secaline, Hordeine, Trifoliin verwendet werden. Die Verwendung dieser Fusionsproteine bzw. Fusionsprotein – Antikörper – Komplexe besteht in

neuartigen Stoffen, die amorph oder elastisch sind, und bestimmte Antigene vorzugsweise an der Oberfläche erkennen und binden können. Solche Stoffe können vorzugsweise als neuartige Antigen – spezifische Filter verwendet werden, oder als Sicherheitsmerkmale auf bestimmte Oberflächen aufgetragen werden.

Beispiel 19

Cherkasky – Fusionsproteine enthaltend Antikörperbindeproteinen oder ihre Regionen und Strukturproteinen oder ihre Regionen

Strukturproteine können vorzugsweise aus folgenden Proteinen ausgewählt werden: Lamprin, ein Zellprotein, Resilin, Abducin, Kristalline Alpha, Beta, Gamma, Kollagen oder Keratin.

Die Verwendungen sind ähnlich wie die im Beispiel 18, wobei der Stoff elastisch oder fest sein kann.

Beispiel 20

Cherkasky – Fusionsproteine enthaltend Antikörperbindeproteinen oder ihre Regionen, Speicherproteinen oder ihre Regionen und Strukturproteine oder ihre Regionen

Die Stoffe bestehend aus diesen Fusionsproteinen bzw. Fusionsprotein – Antikörperkomplexen haben ähnliche Anwendungen und Eigenschaften wie die, die in den Beispielen 18 und 19 beschrieben wurden.

Beispiel 21

Cherkasky – Fusionsproteine enthaltend Antikörperbindeproteinen oder ihre Regionen, Metallbinderegionen und Speicherproteinen oder ihre Regionen

Die Eigenschaften und Verwendungen sind ähnlich wie die die in den Beispielen 18 – 20 beschrieben sind.

Beispiel 22

Cherkasky – Fusionsproteine enthaltend Antikörperbindeproteinen oder ihre Regionen, Metallbinderegionen und Strukturproteinen oder ihre Regionen

Die Eigenschaften und Verwendungen sind ähnlich wie die die in den Beispielen 18 und 19 beschrieben sind.

Beispiel 23

Cherkasky – Fusionsproteine enthaltend Antikörperbindeproteinen oder ihre Regionen, Metallbindeproteinen oder ihre Regionen, Strukturproteinen oder ihre Regionen und Speicherproteine oder ihre Regionen

Die Eigenschaften und Verwendungen sind ähnlich wie die die in den Beispielen 18 und 19 beschrieben sind.

Weitere Beispiele umfassen Fusionsproteine enthaltend Antikörperbindeproteine oder ihre Regionen und pflanzliche Proteine wie z. B. Phloemprotein 1 (PP1) aus Cucurbitas, Fischproteine wie z.B. Astacin von Astacus, Neuronenproteine wie z.B. GFAP, MBP, (Myelin Basistes Protein), Polymerbindeprotein – Enzym – Fusion, wobei die Polymerbinderegion vorzugsweise eine Cellulosebinderegion wie z.B. Cip A ist; Rubredoxin; welches eine hitze stabiles Protein ist, antifreeze Protein oder Glykoprotein, eine Serin oder Serinreiche Region, ein Laminin, Aktin, Myosin, ein Cytokin, ein Interleukin, ein Blutprotein, wie z.B. Serumalbumine, ein Transprotein, ein basisches Protein oder seine Region, ein saures Protein oder seine Region, ein Spacer, ein hydrophobes Protein oder seine Region, ein hydrophiles Protein oder seine Region, ein Zellprotein, ein Zellkernprotein oder ihre Regionen, ein Neurofilament oder seine Region, ein virales Protein wie z.B. vom Phagen T4, Tobacco mosaic virus TMV, ein Opsonin, CRP oder C – Reaktive Protein, MBP (Mannose Bindeprotein), Nukleinsäurebindeproteine oder ihre Regionen, LH, FSH, Vicilin like Protein oder ein anderes Protein oder seine Regionen.

Die Fusionsproteine bzw. Fusionsprotein – Antikörper – Komplexe können als neuartige Stoffe für unterschiedliche Zwecke verwendet werden. Alle haben elastische, amorphe oder feste mechanische Eigenschaften und spezifische Bindungsfähigkeit der Antikörper.

An Oberflächen gebundene Antikörper können bestimmte Antigene erkennen und als Basis für Sensoren eingesetzt werden. Sobald diese Fusionsprotein – Antikörper – Komplexe elektrischen Strom leiten und dabei Antikörper ihre Antigene spezifisch erkennen, wird die Leitfähigkeit bzw. der Widerstand leicht geändert, und zwar so dass diese Änderung leicht registriert und gemessen werden kann. Dies ist die Basis für den Bau neuartiger diagnostischen, Test; Kontroll – Sensor - und Alarm bzw. Warnungssystemen, die sehr stark reduziert bzw. miniaturisiert werden können und viel effizienter arbeiten können als elektronische Systeme mit immobilisierten Antikörper, weil bei grossen

Konzentrationen der Fusionsproteinen bzw. Fusionsprotein – Antikörper – Komplexe schon wenige Antigene, wie z.B. gefährliche Toxine wie Anthrax, Botulinus, oder Tetanus – Toxine, Viren wie z.B. HIV oder Ebola – Virus, Bakterien wie Bacillus anthracis, für eine Registrierung bei der Interaktion mit den gebundenen Antikörpern und Messung aus bzw. hinreichen.

Die gebundene Antikörper bzw. die Fusionsprotein – Antikörper – Komplexe bilden eine amorphe oder elastische Masse, die auch Salze enthalten kann und den Sensorbestandteil der Registrierungsgeräte gemäß dieser Erfindung darstellt. Durch diese Masse wird elektrischer Strom geleitet und jede Interaktion der Antigenen mit den gebundenen Antikörpern der Fusionsprotein – Antikörper – Komplexe ändert die Stromstärke und den Widerstand.

Diese Änderungen werden registriert und ausgewertet, welches zu einem aussagekräftigem Ergebnis führt.

In der Fig. 1a ist ein System zur Durchführung von Diagnosen, Kontrollen und Tests zur Feststellung oder Registrierung bestimmter Antigene wie z.B. HIV – Viren, Bakterien, Proteine, Protozoen, oder andere Moleküle, Mikroorganismen, oder Zellen oder Substanzen, schematisch dargestellt.

Das System enthält den Registrierkörper 7, welches eine Masse bestehend aus Antikörper - Fusionsprotein – Komplexen, welche vorzugsweise auf einen Substrat aufgetragen sind, darstellt.

Der Registrierkörper 7 enthält Antikörper 1, die an die Fusionsproteine, bestehend aus Antikörperbindedomänen 14 und Speicherproteinen 10, oder Struktur oder andere Proteine gebunden sind. Der Registrierkörper 7 ist durch die Leitung 22 mit dem Stromverstärker 6 und dem Auswertungssystem bzw. mit dem Rechner 5 zur Auswertung der Änderungen elektrischer Signale verbunden.

In der Fig. 1b ist die Interaktion des Antigens 2 schematisch dargestellt, welches z.B. HIV Virus ist, mit den Antikörpern 1, die an die Fusionsproteine bestehend aus den Antikörperbinderegionen 14 und den Speicherproteinen 10 gebunden sind.

In der Fig. 2a ist das Fusionsprotein – Antikörper – Komplex, welcher sich an CR 1 Rezeptor 21, des Erythrozyts 19 bindet, dargestellt. Der Fusionsprotein – Antikörper – Komplex besteht aus dem Fusionsprotein enthaltend Antikörperbindedomäne 14 und dem spezifischen Ligand 23 C3b oder C4b, und Antikörper 1. Durch dieses Fusionsprotein kann ein Antigen auf alternativem Wege entzündungsfrei abgeführt und entsorgt werden.

Der Fusionsprotein – Antikörper 1 – Ligand 20 – Komplex, in der Fig. 2b welcher sich an den Erythrozyten 19 bindet, enthält zusätzliche mittlere Rezeptordomäne 13, welche z.B. Entzündungsfaktoren wie TNF – Alpha bindet

und mit abführt bzw. mitentsorgt. Dabei wird eine zusätzliche entzündungshemmende Wirkung erreicht.

In den Fig. 3 ist eine mögliche Ausführung des Test -, Diagnose oder Kontroll Systems gemäß der Erfindung, sowie der entsprechende molekularer Vorgang schematisch dargestellt.

Der Antikörper z.B. ein monoklonaler Antikörper in der Fig. 3a 1.1 ist durch das Fusionsprotein enthaltend eine Antikörperbinderegion und eine Polymerbinderegion, an ein Polymer wie z.B. eine Nukleinsäuresequenz oder ein Polysaccharid gebunden. Ein Antigen z.B. ein Virus wird von diesem Antikörper in der Fig. 3 b 1.1 gebunden. Die optische Visualisierung (Fig. 3c 1.1) erfolgt durch fluoreszenten Fusionsprotein enthaltend eine Antikörperbindedomäne – z.B. SPA und eine fluoreszente Domäne z.B. GFP. Die Fusionsproteine in den Fig. 3a 1.2, b 1.2 und c 1.2 enthalten längere Spacer – Regionen z.B. Polyglycin, um die Reichweite zu vergrößern.

In den Fig. 3a 2, b 2 und c 2 und der entsprechende Testvorgang manueller oder automatischer Ausführung dargestellt. Der Stift 25 mit dem Griff 24 enthält die molekulare Oberflächenstruktur, die den Figuren a 1.1 oder a 1.2 entspricht. Dieser Stift in der Fig. 3 a 3 wird in das Gefäß 26 mit einer Blutprobe oder Serum getan, einige Zeit z.B. 2 Minuten gehalten und rausgenommen. Danach wird dieser Stift (b2) in die Lösung enthaltend Fusionsprotein – Antikörper – Komplexe getan. Die Fusionsproteine bestehen aus Antikörperbinderegionen und fluoreszenten Regionen.

Sollten sich in der Blut – oder Serumprobe Antigenen z.B. Viren wie HIV, oder SARS oder Hepatitis enthalten, werden diese durch entsprechende Antikörper der Fusionsprotein – Antikörper – Komplexen erkannt und gebunden. Nachdem der Stift aus der Probe entfernt wird leuchtet dieser. Um nachzuweisen, ob es sich bei dieser Leuchtung entweder um hoch oder mittel – affinen spezifischen Antigen – Antikörper Interaktionen oder um unspezifische oder niederaffine Interaktionen handelt, wird der Stift ins Wasser oder in eine Pufferlösung getan und leicht gerührt, und danach von der Lösung genommen (c2). Bleibt die Leuchtung so wird die Intensität gemessen. Die Leuchtung wird folgenderweise interpretiert: Die Antigene haben sich spezifisch an die Antikörper der Fusionsproteinen gebunden, welche an Polymere gebunden sind und diese sind an die Mantelfläche des Stiftes gebunden. Die Fusionsprotein – Antikörper – Komplexe sind an diese Antigene auf der anderen freien Seiten der Antigens spezifisch gebunden.

Die Fusionsproteine sind mit den Antikörper Bindedomänen an Antikörper gebunden und leuchten durch fluoreszente Domänen. Also bedeutet die anhaltende Fluoreszenz die Tatsache, das sich in der Blutprobe oder Serumprobe Antigene enthaltend waren. Sollte die Leuchtung nach der Rührung

verschwinden, bedeutet das, dass im Serum oder in der Blutprobe keine Antigene waren.

Die Fusionsproteine in den Fig. 4 a, 4 b und 4c enthalten fluorestente Regionen und können als Bestandteile der Sensoren verwendet werden, weil durch Antigen – Antikörper – Interaktionen die Lichtintensität verändert wird. Diese Änderung wird registriert.

Das Fusionsprotein in der Fig. 4 a enthält eine fluoreszente Region 18, eine Polymerbinderegion 16, und die Antikörperbinderegion 14, die mit einem Antikörper verbunden ist.

Das Fusionsprotein ist durch die Polymerbinderegion 16 an ein Polymer 9 gebunden.

Das Fusionsprotein in der Fig. 4b enthält zusätzlich eine längere Spacerregion 8, wie z.B. eine Polyglycindomäne, die die Reichweite erhöht.

Das Fusionsprotein in der Fig. 4 c enthält zusätzlich eine Domäne eines Speicherproteins, Struktur oder Metallbindeproteins, um Stabilität zu erhöhen.

In den Figuren 5 sind einige mögliche Ausführungen der Fusionsprotein – Antikörper – Polymer – Komplexen schematisch dargestellt.

Das Fusionsprotein in der Fig. 5.1 enthält die Polymerbinderegion 16, und die Antikörperbinderegion 14, die mit dem Antikörper 1 verbunden ist.

Das Fusionsprotein in der Fig. 5.2 enthält zusätzlich eine Spacerregion 8.

Die Spacerregion des Fusionsproteins in der Fig. 5.3 enthält Knicks, die durch Proline in der Polyglycin – Region entstehen.

Die Spacerregion des Fusionsproteins in der Fig. 5.4 enthält eine Helix. Das Fusionsprotein in der Fig. 5.5 enthält zusätzlich eine Region eines Strukturproteins, Speicherproteins oder eines Metallbindeproteins um die Stabilität zu erhöhen.

Dieses Fusionsprotein kann entweder eine lineare (Fig. 5.6), geknickte (Fig. 5.7) oder helicale (Fig. 5.8) Spacerregion enthalten.

Das Fusionsprotein in der Fig. 5.9 enthält zusätzlich zwei Regionen z.B. eine von einem Struktur – und die andere von einem Speicherprotein oder einem Metallbindeprotein.

Dieses Fusionsprotein kann entweder eine lineare (Fig. 5.10), geknickte (Fig. 5.11) oder eine helikale (Fig. 5.12) Spacerregion enthalten.

Das Fusionsprotein in der Fig. 5.13 enthält eine terminale Domäne wie z.B. GFP oder eine Metallbindedomäne, wobei die mittlere Domäne, die Polymerbindedomäne ist.

Dieses Fusionsprotein kann entweder eine lineare (Fig. 5.14), geknickte (Fig. 5.15) oder helikale (Fig. 5.16) Spacerdomäne enthalten.

Das Fusionsprotein in der Fig. 5.17 enthält zwei terminale Domänen vor bzw. nach der Polymerbinde Domäne.

Dieses Fusionsprotein kann entweder eine lineare (Fig. 5.18), eine geknickte (Fig. 5.19) oder eine helikale (5.20) Spacerregion enthalten.

Das Fusionsprotein in der Fig. 5.21 enthält eine mittlere Polymerbinderegion (Ausdrücke „Region“ und „Domäne“ sind als Synonyme zu verstehen) und jeweils zwei seitliche Domänen, wobei die eine N – oder C – terminale Domäne, die Antikörperbindedomäne ist, welche mit einem Antikörper verbunden ist. Die benachbarte Domänen sind z.B. eine Metallbindedomäne, die Polymerbindedomäne, eine Strukturproteindomäne und eine fluoreszente Domäne und/oder Domäne eines Speicherproteins, um Stabilität, Fluoreszenz und molekulare Orientierung durch Lenkung der komplexierten Zonen zu erreichen, bzw. zu ermöglichen. Die geknickte Domäne kann z.B. folgende Formel $(\text{Pro (Gly)}_n)_m$ haben, wobei n und m beliebig sein können.

Dieses Fusionsprotein kann z.B. entweder eine lineare (Fig. 5.22), eine geknickte (Fig. 5.23) oder eine helikale (Fig. 5.24) Domäne enthalten.

Das Fusionsprotein in der Fig. 6 enthält Antikörperbindedomäne 14 und Metallbinderegionen 11, und ist mit dem Antikörper 1 verbunden. Der Antikörper kann in einer Lösung durch das Fusionsprotein und elektromagnetische Felder orientiert werden.

In der Fig. 7 ist der Komplex bestehend aus Antikörpern und Fusionsproteinen enthaltend Autoantigene oder Autoantigene Regionen 15 und Antikörper Binderegionen, schematisch dargestellt. Diese Fusionsproteine dienen der diagnostischen Feststellung des Vorhandenseins bestimmter Autoantikörper in Blut bzw. Serum. Sollten sich Autoantikörper befinden, so binden die Fab Fragmente die Autoantigene Domänen der Fusionsproteinen und der Komplex entsteht.

Wenn keine Antikörper vorhanden sind, binden diese sich nicht an die Autoantigene Domänen der Fusionsproteinen und die Komplexe entstehen nicht.

In der Fig. 8 ist ein Polymer – Antikörper · Fusionsprotein – Komplex schematisch dargestellt. Fusionsproteine enthalten Antikörperbindedomänen 14, Polymerbinderegionen 16, und Rezeptoren 17, und sind durch Polymerbinderegionen 16 an Polymer 9 und durch Antikörperbinderegionen 14 an Antikörper 1 gebunden.

Die Rezeptoren 17 binden Liganden 20. Die Rezeptoren binden z.B. Entzündungsfaktoren wie TNF – Alpha, diese entsprechen den Liganden.

In der Fig. 9 ist die Lenkung einer T – Zelle 4 gegen eine Zielzelle 3 durch Fusionsprotein – Antikörperkomplexen dargestellt. Antikörper 1 bindet sich spezifisch an ein Zielzell – spezifisches Antigen und die Liganddomäne 20 bindet sich an den Rezeptor 17 der T – Zelle. Die Liganddomäne ist z.B. eine Region von HLA – B7.1 oder B7.2 und ruft die T – Zell – Aktivierung hervor, welche zum Angriff gegen die Zielzelle führt.

Das Fusionsprotein in der Fig. 10 enthält eine terminale hydrophile Domäne, bestehend aus hydrophilen Aminosäuren wie z.B. Serin, um die Löslichkeit des Polymer – Fusionsprotein – Antikörper – Komplexen zu erhöhen.

Die Fusionsproteine in den Fig. 11a, b, c, d und e sind durch ein Enzym, z.B. Protease, Nuklease, Lipase, Katalase, Peroxidase oder ein anderes Enzym gekennzeichnet.

In der Fig. 12 ist der Teststift mit 10 Sektoren oder Segmenten sowie das Vorgehen der Vorbereitung und der Testdurchführung schematisch dargestellt (siehe Fig. 3). Durch Überschuss der Fusionsproteine in Lösung werden die an Polymere gebundene Fusionsproteine verdichtet.

Die Sequenzen für Proteine sind öffentlich zugänglich und im Internet z.B. beim National Center for Biotechnology Information, NIH, Bethesda MP, 20894, USA (NCBI [http:// www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) erhältlich.

Ausführungsbeispiel 1

Klonierung und Expression des Fusionskonstruktes N – Keratin – SPA – C
c DNA Sequenzen für Keratin und Staphylokokkenprotein A werden durch PCR oder RT – PCR kloniert. Das Fusionsprotein wird aus PCR – Produkten zusammengesetzt. Die PCR – Primern sind so konstruiert, dass sie Restriktionsstellen auf 5' und 3' Enden enthalten, um spätere Ligationsschritte durchzuführen. Die 5' und 3' Enden des Keratin – PCR Produktes enthalten Bam HI und Hind III Restriktions stellen.

Die 5' und 3' Enden des SPA – PCR Produkts enthalten EcoRI und KpnI Restriktionsstellen.

Durch Behandlung mit Bam HI und Hind III wird Keratin PCR Produkt in den entsprechend vorbereitenden Vektor hineinligiert. Der Vektor wird mit KpnI und Eco RI behandelt, um SPA – PCR Produkt hineinzuligieren. Das Ligationsprodukt wird in E.Coli transformiert, exprimiert und abschliessend gereinigt.

In der Seq. 1 ist die Aminosäuresequenz des Fusionsproteins enthaltend menschliches niedrig affinen Rezeptor für Fc Fragment des IgG und menschliches Keratin 7, dargestellt.

In der Seq. 2 ist die Aminosäuresequenz des Fusionsproteins, enthaltend menschliches niedrig affines Rezeptor für Fc Fragment des IgG und Vicilin – like Protein vom Lupinus albus dargestellt. Die Rezeptordomäne ist 290 Aminosäure lang und die Länge des Vicilin – ähnlichen Proteins beträgt 182 Aminosäuren, also ist die Länge des Fusionsproteins 472 Aminosäuren.

Neuartige Cherkasky – Fusionsproteine enthaltend Antikörperbindeproteine oder ihre Regionen

Patentansprüche

Beansprucht werden:

1. Neuartige Fusionsproteine, Cherkasky Fusionsproteine genannt, dadurch gekennzeichnet, dass sie mindestens ein Antikörperbindeprotein oder seine Region bzw. Domäne und mindestens eine Nicht – Antikörperbinderegion oder eine beliebige Region enthalten.
2. Fusionsproteine, Cherkasky Fusionsproteine genannt, dadurch gekennzeichnet, dass sie mindestens ein Antikörperbindeprotein oder seine Region vorzugsweise Staphylokokkenprotein (SPA), eine andere IgG oder eine IgE – Binderegion und mindestens eine Region enthalten, die teilweise oder ganz aus folgenden Proteinen, Fusionsproteinen oder ihren Regionen ausgewählt werden kann: HLA – B7.1, HLA – B7.2, eine ihre Region, eine T – Zell aktivierende Domäne, ein Enzym, DNase1, S1 Endonuklease, ein Rezeptor, vorzugsweise für Entzündungsfaktoren TNF – Alpha, C5a, C3a, C4a, ein fluoreszentes Protein vorzugsweise GFP, ein Ligand vorzugsweise C3b, C4b, ein Opsonin, CRP oder C – Reaktives Protein, MBP oder Mannose – Bindeprotein, und Myelin Basisches Protein, ein neurales Protein, ein saures, ein basisches, ein hydrophiles, ein hydrophobes Protein, eine Cystein – reiche Region, Antifreeze Protein oder Glykoprotein, Rubredoxin, ein Autoantigen oder seine Region, ein Strukturprotein vorzugsweise, Resilin, Abducin, Lamprin, Kollagen, Keratin, ein Speicherprotein, Casein ein Zellprotein, ein Neurofilament, ein Muskelprotein vorzugsweise Myosin oder seine Region, Aktiv, Laminin, ein Cytokin, ein interleukin, ein Blutprotein, vorzugsweise Serumalbumin, ein virales Protein, ein Metalloprotein oder Metallbindeprotein, ein Transportprotein, oder seine Region, ein Polysaccharid – Bindeprotein, (PBD), CipA Cellulose – Binderegion, ein Nukleinsäure – Bindeprotein oder seine Region, Crystallin oder Kristallin Alpha, Beta oder Gamma, ein Ichtyoprotein vorzugsweise Astacin, Phloemprotein 1 (PP1), Phloemprotein 2 (PP2) aus Cucurbitas, ein Spacer oder ein Linker, eine Serin oder Serinreiche region, Viciline, Legumine, Gliadin, Glutenin, Hordeine, Trifolin, Vicilin – like oder ähnliches Protein vom Lupinus albus, ein Hormon, LH, FSH oder PBD – Enzym Fusionsprotein.

3. Fusionsproteine nach einem der Ansprüche 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, dass sie mindestens ein His – tag oder einen anderen Tag zur Reinigung, ein Linker oder eine Gelenkregion oder mindestens eine andere Region enthalten.
4. Nukleinsäuren, Vektoren, Expressions und Transformationssysteme für die Fusionsproteinen nach den Ansprüche 1 – 3.
5. Verwendungen der Substanzen nach den Ansprüche 1 bis 4 vorzugsweise als Werkstoffe, Medikamente, Farb – und Markierungsstoffe, Klebemittel, und diagnostischen Systemen.
6. Linker oder Spacer, gekennzeichnet durch die Formel $(\text{Pro (Gly)}_n)_m$, wobei in Glycinen durch Proline Knicks gebildet werden.
7. Verwendung der Polymere für Verdichtung und Anordnung der Fusionsproteine insbesondere der nach den Ansprüche 1 – 5.

FIG. 1 a

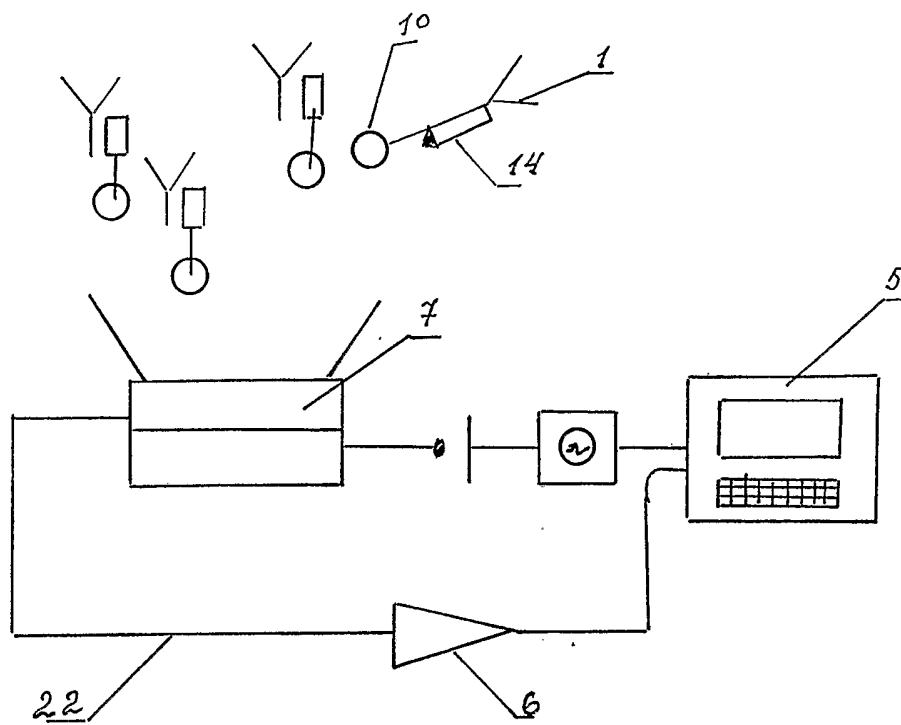


FIG. 1 b.

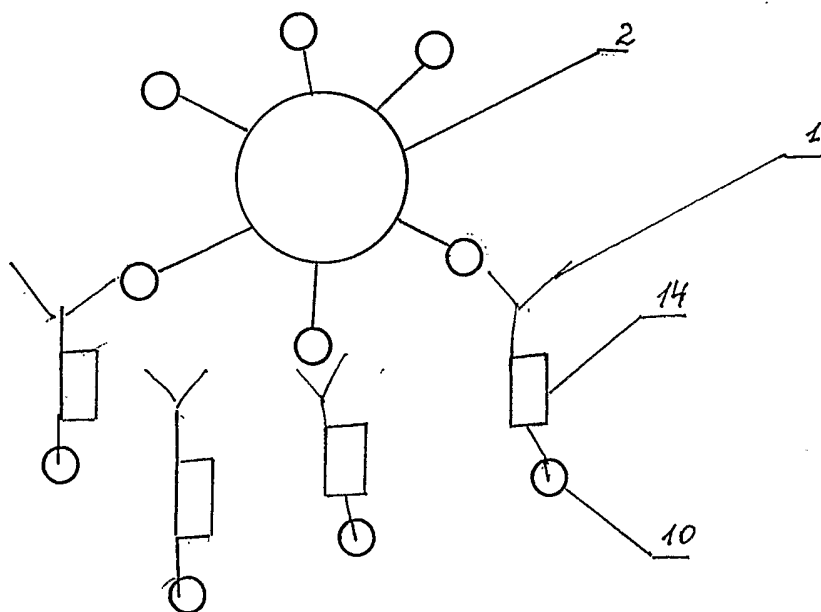


FIG. 2a

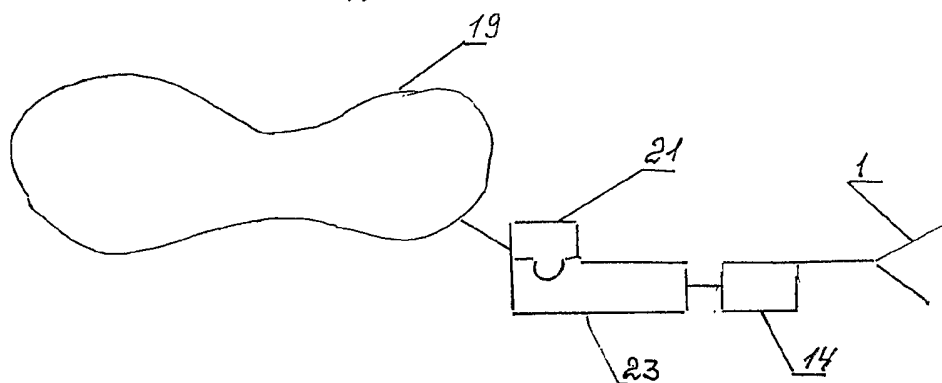


FIG. 2b

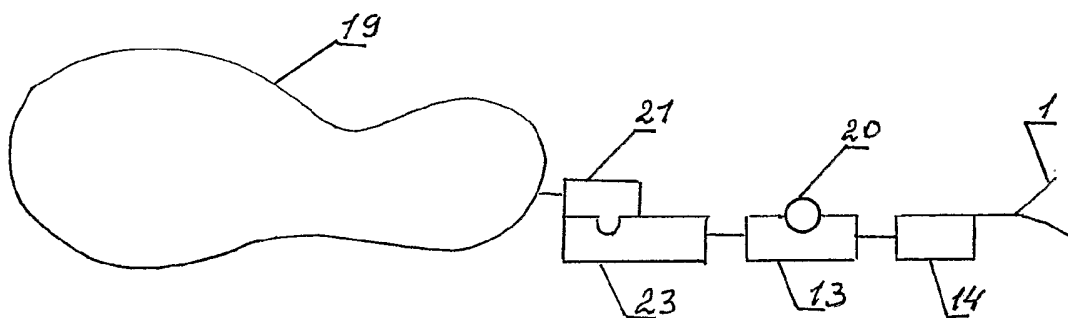


FIG. 3

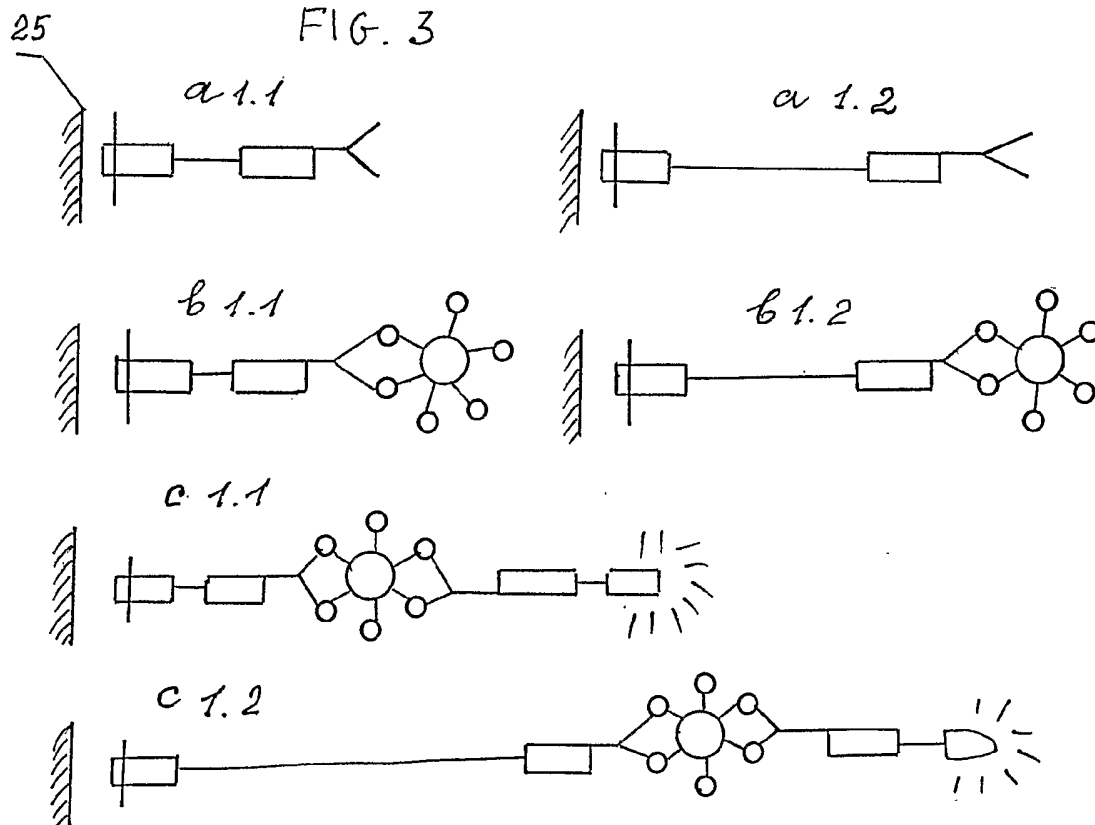


FIG. 3

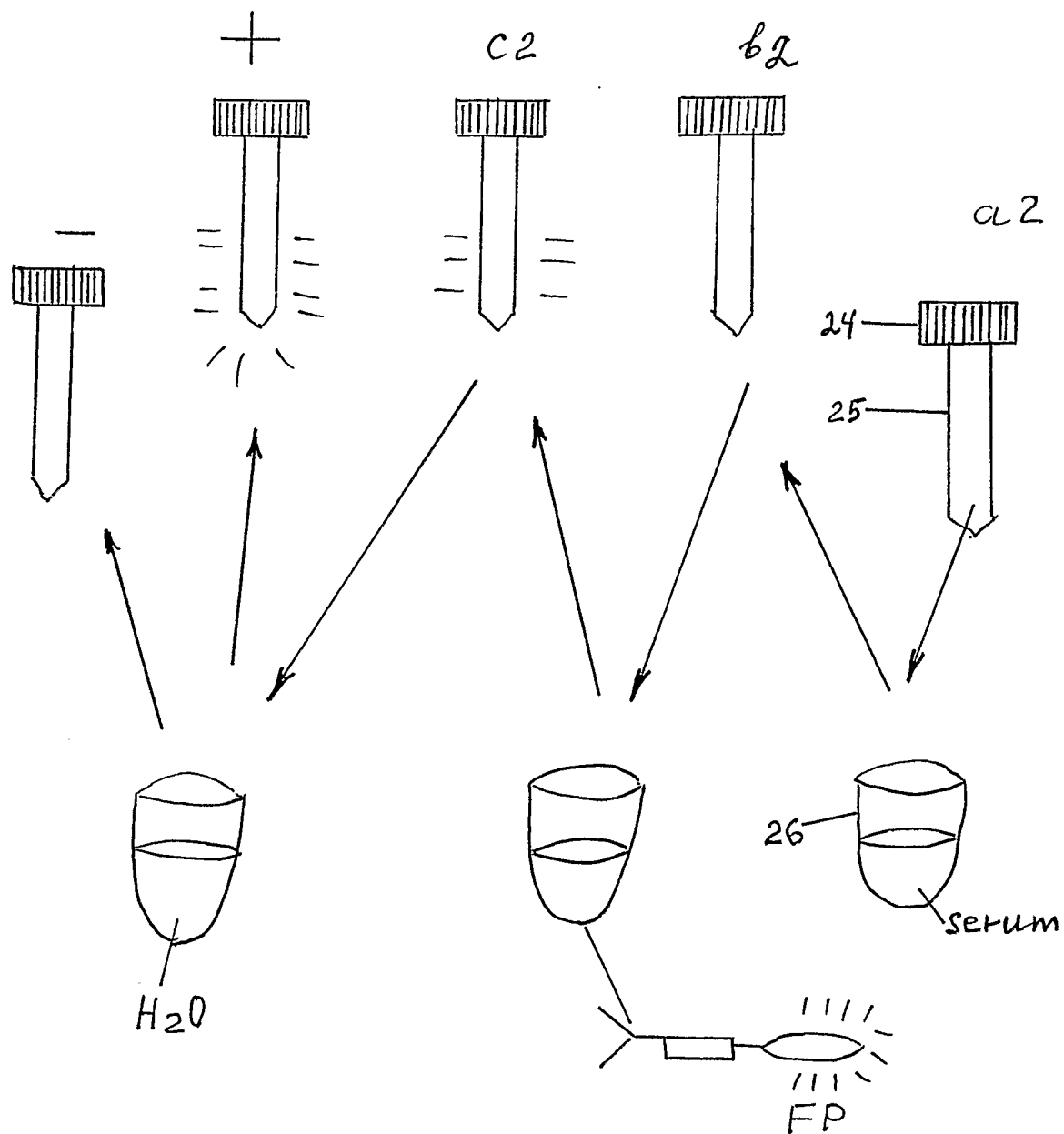


FIG. 4a

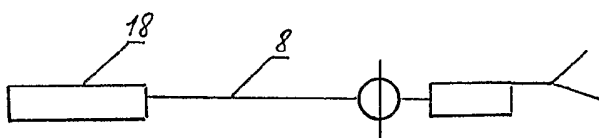
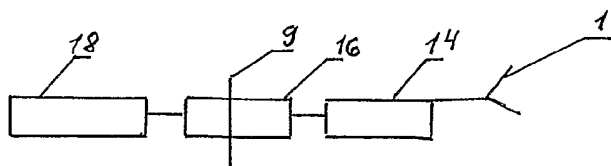


FIG. 4b

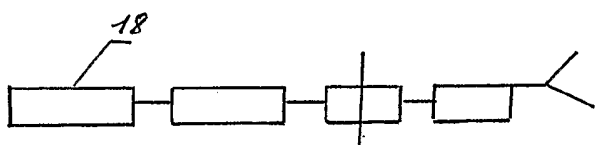
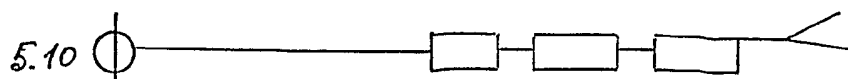
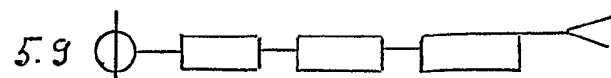
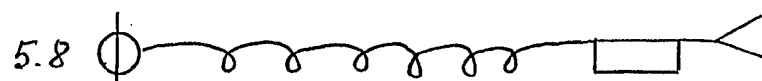
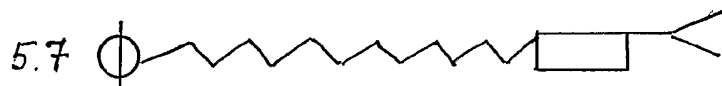
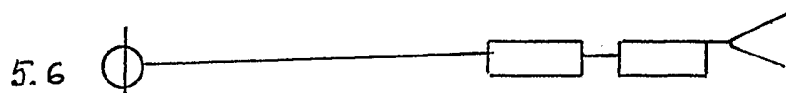
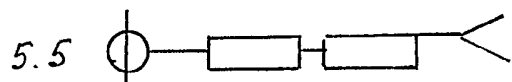
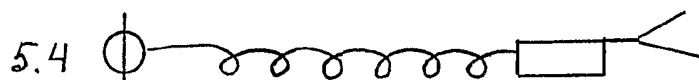
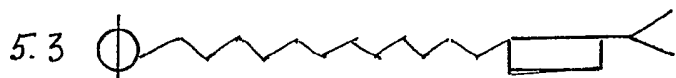
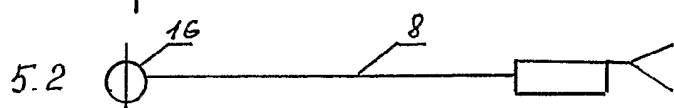
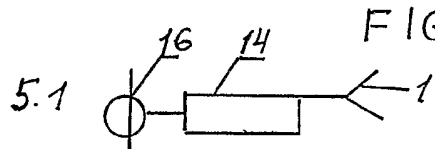
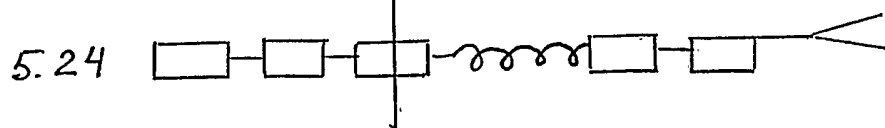
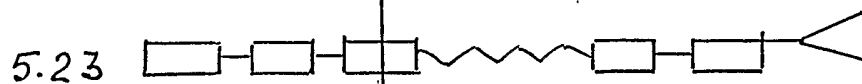
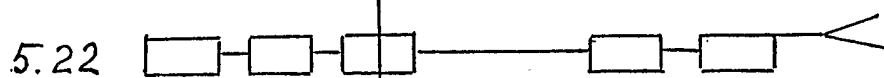
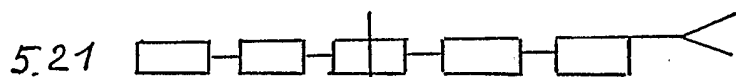
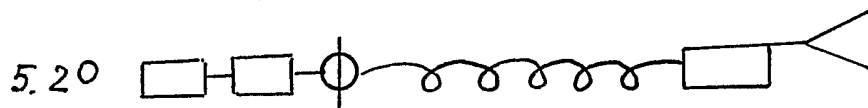
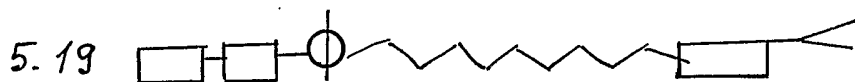
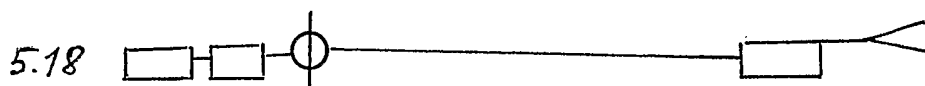
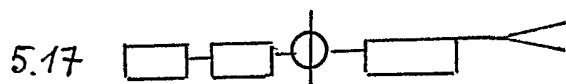
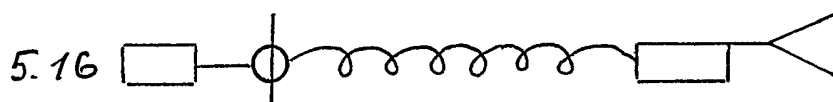
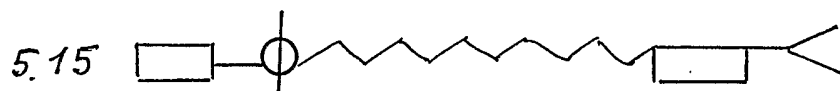
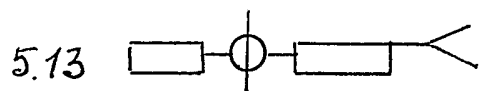
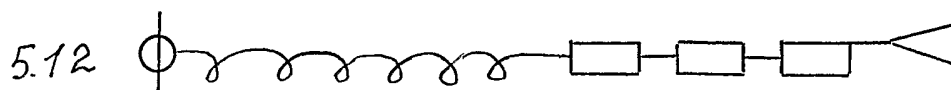
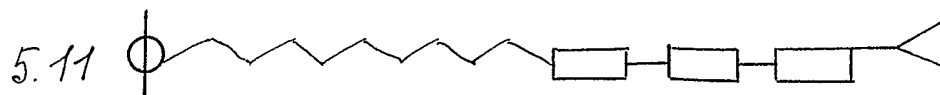


FIG 4c

FIG. 5





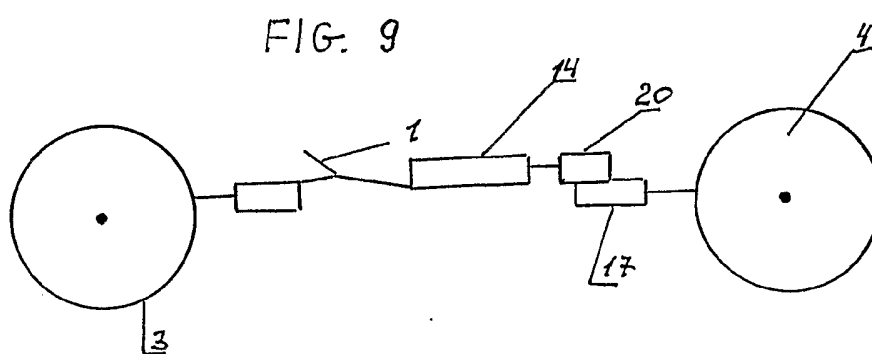
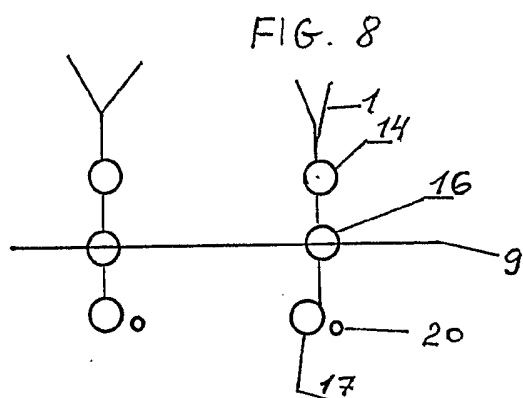
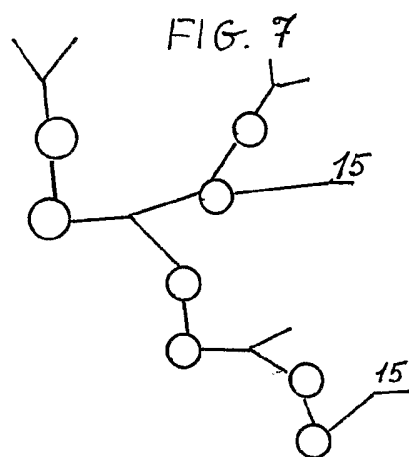
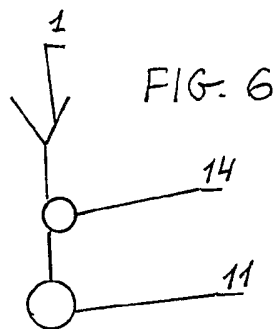


FIG. 10

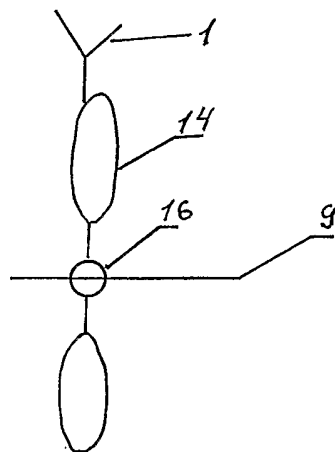


FIG. 11

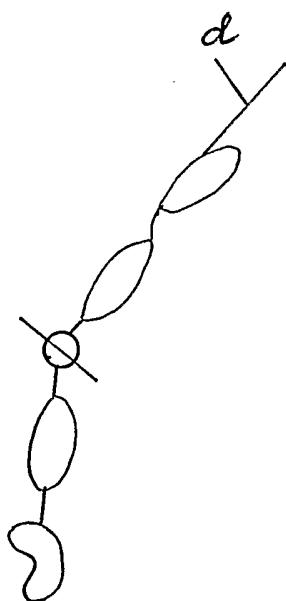
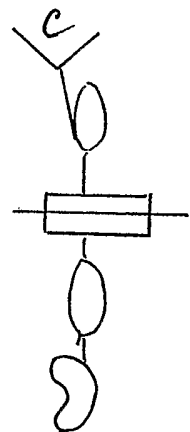
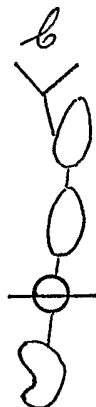
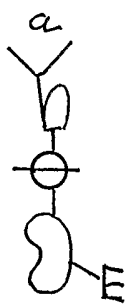
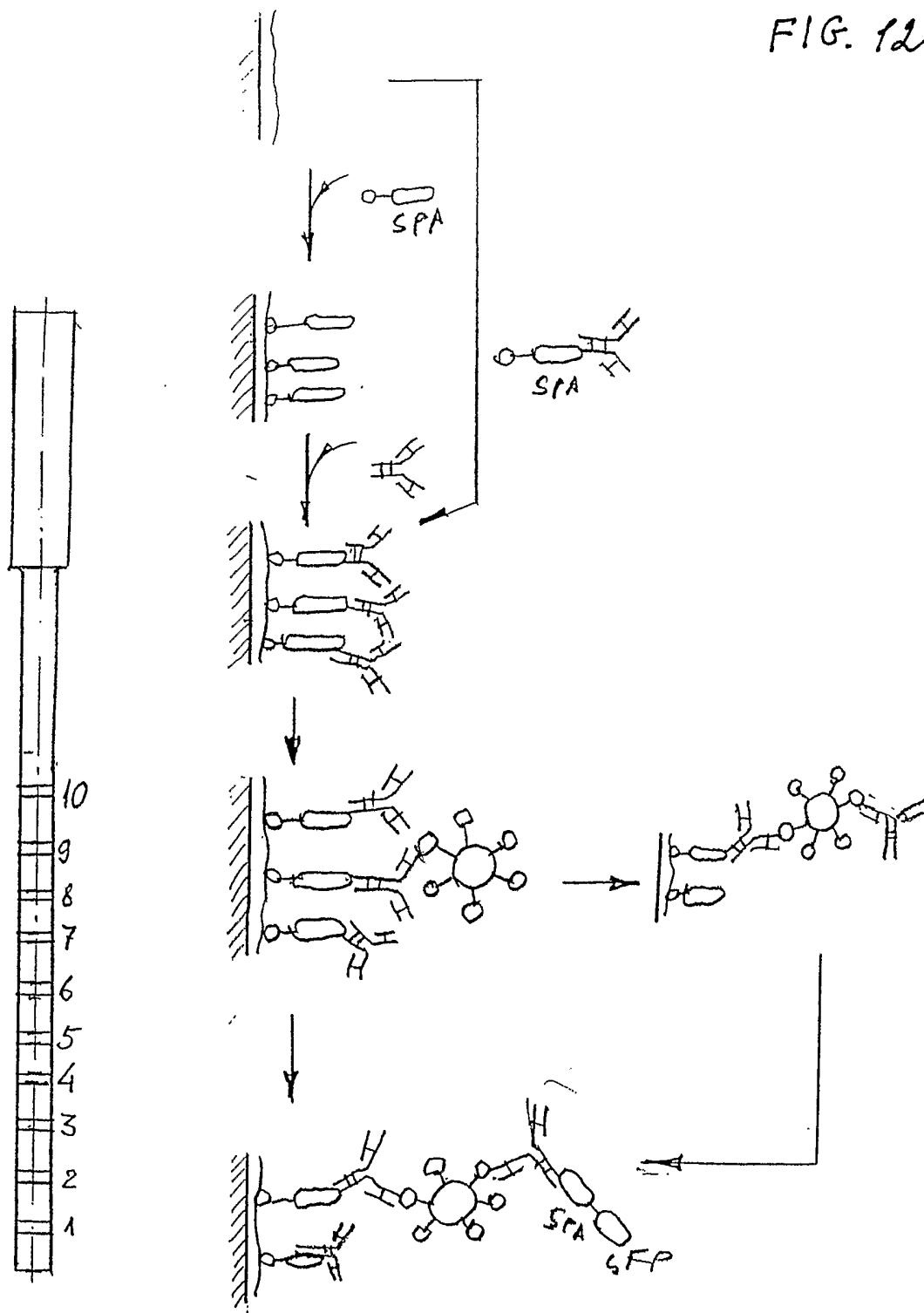


FIG. 12



Neuartige Cherkasky – Fusionsproteine enthaltend Antikörperbindeproteine oder ihre Regionen

Seq. 1

mgilsflpvl atesdwadck spqpwghmll wtavflapv agtpappkav lklepqwinv
lqedsvtltc rgthspesds iqwfhnngli pthtqpsyrf kannndsgey tcqtgqtsls
dpvhltvlse wlvltqphle fqegetivlr chswkdkplv kvttfngks kkfsrsdpnf
sipqanhshs gdyhctgnig ytlysskpvt itvqapsssp mgiivavvtg iavaaivaav
valiycrkk r isanptnpde adkvgaenti tysllmhpda leepddqnri
MSIHFSSPVFTSRSAAFSGRGAQVRLSSARPGGLGSSSLYGLGA
SRPRVAVRSAYGGPVGAGIREVTINQSLLAPLRDADPSLQVRQEESQIKTLNNKF
ASFIDKVRFLEQQNKLLETKWTLLEQKSAKSSRLPDIFEAQIAGLRGQLEALQVDGG
RLEAELRSMQDVVEDFKNKYEDEINHRTAAENEFVVLKKDVDAAVMKVELEAKVDAL
NDEINFLRTLNETELTELQSISDTSVVLMSDMSRSLDLGIIAEVKAQYEEMAKCSR
AEAEAWYQTKFETLQAQAGKHGDDLNRNTRNEISEMNRAIQRLQAEIDNIKNQRAKLEA
AIAEAEERGELALKDARAKQEELEAALQRGKQDMARQLREYQELMSVKLALDIEIATY
RKLEGEESRLAGDVGAVNISVMNSTGGSSSGGGIGLTLGGTMGSNALSFSSSAGPG
LLKAYSIRTASARRSARD

Seq. 2

mgilsflpvl atesdwadck spqpwghmll wtavflapv agtpappkav lklepqwinv
lqedsvtltc rgthspesds iqwfhnngli pthtqpsyrf kannndsgey tcqtgqtsls
dpvhltvlse wlvltqphle fqegetivlr chswkdkplv kvttfngks kkfsrsdpnf
sipqanhshs gdyhctgnig ytlysskpvt itvqapsssp mgiivavvtg iavaaivaav
valiycrkk r isanptnpde adkvgaenti tysllmhpda leepddqnri
ltrelcccht itqrpifivv vgegngkyel vgirdqqrqq deqeepeev rrysarlseg
difvipagyp isvnassnlr ligfginaye nqrnflagse dnvirldre vkeltfpgfa
edierliknq qqsyfanaqp qqqqqqqqqq qqqqqqqqqq qsekegrrrg rgpissilst
ly