



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 699 19 515 T2 2005.04.07**

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 1 056 850 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **699 19 515.2**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/GB99/00546**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **99 906 341.5**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 99/042577**

(86) PCT-Anmeldetag: **23.02.1999**

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: **26.08.1999**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **06.12.2000**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **18.08.2004**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **07.04.2005**

(51) Int Cl.⁷: **C12N 15/12**

C12N 15/62, C12N 15/85, C12N 15/86

(30) Unionspriorität:

9803757 **23.02.1998** **GB**

9813653 **24.06.1998** **GB**

(73) Patentinhaber:

Ark Therapeutics Ltd., London, GB

(74) Vertreter:

Samson & Partner, Patentanwälte, 80538 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LI, LU, MC, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:

YLA-HERTTUALA, Seppo, FIN-70211 Kuopio, FI;

KULOMAA, Markku, FIN-Jyvaskyla 40351, FI;

LEHTOLAINEN, Pauliina, FIN-70211 Kuopio, FI;

MARJOMAKI, Varpu, FIN-40100 Jyväskylä, FI;

AIRENNE, Kari, FIN-Jyvaskyla 40351, FI

(54) Bezeichnung: **BIOTINBINDENDE REZEPTORMOLEKÜLE**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

Gebiet der Erfindung

[0001] Diese Erfindung betrifft membran-überspannende Proteine mit biotin-bindender Aktivität.

Hintergrund der Erfindung

[0002] Biotin (Vitamin H) ist eine leicht wasserlösliche Substanz, die in niedrigen Konzentrationen in Blut und Geweben gefunden wird. Die biologische Rolle von Biotin ist die als Träger von aktiviertem CO₂ und es erlaubt den Transfer von CO₂ zu Akzeptoren ohne den Bedarf zusätzlicher freier Energie. Das aktivierte Carboxybiotin ist gewöhnlich mit einem Enzym verknüpft, welches für die Bildung von Carboxybiotin erforderlich ist. Beispielsweise kann Biotin mit Pyruvatcarboxylase verknüpft sein, welche, in Gegenwart von Acetyl-CoA, die Bildung von Carboxybiotin katalysiert und den anschließenden Transfer der aktivierten Carboxylgruppe zu Pyruvat, um Oxalacetat zu bilden.

[0003] Biotin bindet auch mit einer der höchsten in der Natur bekannten Affinitäten an Avidin, ein 63-kD-Glycoprotein aus Hühnereiweiß, und an Streptavidin, ein nicht-glycosyliertes Protein aus dem Bakterium *Streptomyces avidinii*. Die Bindung hat einen fast irreversiblen Charakter ($K_a 10^{15} \text{ mol}^{-1}$). Die Affinität zwischen Avidin und Biotin erwies sich als sehr nützlich bei einer großen Vielfalt bioanalytischer Anwendungen. Beispielsweise wurde der Avidin-Biotin-Komplex erfolgreich in einer großen Vielfalt von Nachweissystemen eingesetzt, wo Zielmoleküle mit Biotin über dessen Carboxyterminus kombiniert werden, um biotinylierte Moleküle zu bilden, welche leicht nachgewiesen oder aus einer Lösung abgetrennt werden können. Eine Biotinylierung kann ohne Veränderung der biologischen oder physiochemischen Eigenschaften der verschiedenen Moleküle und ohne Beeinflussung des Vermögens der Bindung der prosthetischen Gruppe von Biotin an Avidin geschehen.

[0004] WO-A-87/05026 offenbart die Isolierung einer DNA-Sequenz, die für Streptavidin kodiert, und eine Fusion des Streptavidin-Gens und eines Gens, welches für den Human-LDL-Rezeptor kodiert. Das fusionierte Gen exprimiert ein Protein, welches aus Streptavidin am N-terminalen Bereich des fusionierten Proteins und dem LDL-Rezeptorprotein am C-terminalen Bereich des fusionierten Proteins besteht. Das fusionierte Gen kann in einen Expressionsvektor inseriert und zur Transformation einer Wirtszelle eingesetzt werden. Die Anwesenheit des Streptavidin-LDL-Rezeptor-Fusionsproteins auf einer Zelloberfläche kann durch Zugabe von Blutzellen, welche an biotinyliertes Rinderserumalbumin gekoppelt sind, festgestellt werden.

[0005] Kulomaa et al., FASEB J. 9(6): A1395 (1995), offenbaren die Konstruktion mehrerer Avidin-Fusionsprotein-Vektoren, einschließlich eines Fusionsproteins, das aus dem Avidin-Protein fusioniert mit dem Hühner-Progesteronrezeptor B besteht, welches in *Escherichia coli* exprimiert wurde.

[0006] Marjomaki et al., "Molecular Biology of the Cell" (Dezember 1996), Bd. 7, Supp. 5, S. 2631, Ver. Am. Chem. Soc. Cell Bio., offenbaren die Verwendung eines Semliki-Forest-Virus-Expressionssystems, um die transiente Expression eines chimären Proteins, enthaltend die Transmembrandomäne und einen Teil der cytoplasmatischen Domäne des kationen-unabhängigen Mannose 6-Phosphat-Rezeptors, fusioniert mit einem rekombinanten Avidin, in BHK-Zellen zu erhalten.

Zusammenfassung der Erfindung

[0007] Gemäß einem ersten Aspekt der vorliegenden Erfindung umfasst ein Protein eine membran-überspannende Domäne eines endocytotischen Rezeptors und eine extrazelluläre Domäne, welche biotin-bindende Aktivität umfasst, zur therapeutischen Anwendung.

[0008] Gemäß einem zweiten Aspekt der Erfindung kodiert eine Nukleinsäure zur therapeutischen Anwendung für ein Protein wie oben definiert.

[0009] Gemäß einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung umfasst ein neues Protein eine membran-überspannende Domäne eines Abfangrezeptors der Klasse A und eine extrazelluläre Domäne, welche biotin-bindende Aktivität umfasst.

[0010] Proteine der vorliegenden Erfindung können eine cytoplasmatische Domäne, eine membran-überspannende Domäne und eine extrazelluläre Domäne umfassen, wobei die extrazelluläre Domäne biotin-bindende Aktivität umfasst. Die extrazelluläre Domäne kann funktionelle Avidin- oder Streptavidin-Aktivität umfas-

sen.

[0011] Unter Verwendung von Proteinen oder Nukleinsäuremolekülen dieser Erfindung ist es möglich, gezielt biotinylierte Moleküle zu spezifischen Stellen in Geweben zu leiten. Moleküle, die auf diese Weise zielgerichtet sind, können von den Geweben oder Zellen durch Endocytose aufgenommen werden, was den Molekülen die Ausübung ihrer Wirkungen innerhalb oder auf der Zelle ermöglicht.

Beschreibung der Zeichnungen

[0012] Fig. 1 ist eine schematische Darstellung eines Fusionsproteins der vorliegenden Erfindung, wobei A Avidin darstellt und B die membran-überspannende Domäne eines endocytotischen Rezeptors repräsentiert (und C Biotin darstellt);

[0013] Fig. 2 ist eine schematische Darstellung einer Klonierungsstrategie unter Verwendung eines Shuttlevektors; und

[0014] Fig. 3 ist eine schematische Darstellung einer Klonierungsstrategie unter Verwendung eines Retrovirus-Vektors.

Beschreibung der Erfindung

[0015] Proteine der vorliegenden Erfindung können mit Hilfe herkömmlicher rekombinanter DNA-Technologie hergestellt werden. Typischerweise wird eine DNA-Sequenz, die für die funktionelle Domäne eines biotin-bindenden Proteins, wie z. B. Avidin, Streptavidin oder ein verwandtes Protein, kodiert, in ein genetisches Konstrukt eingebaut, welches eine DNA-Sequenz umfasst, die für ein Protein mit membran-überspannenden Eigenschaften kodiert. Beispiele von avidin- und streptavidin-verwandten Proteinen umfassen AVR-1-AVR-5, AVR-X-AVR-V, Stv1 und Stv2.

[0016] Die individuellen Domänen des Fusionsproteins können durch Polymerasekettenreaktion amplifiziert werden oder aus der Ausgangs-cDNA unter Anwendung von Restriktionsenzymverdauung, Isolierung und Reinigung, z. B. unter Anwendung von Gelelektrophorese, und anschließender Ligierung, z. B. unter Verwendung von DNA-Ligase, isoliert werden. Das Fusionsproteinkonstrukt kann dann in irgendeine geeignete Wirtszelle transfiziert, kultiviert und unter Anwendung von Standardverfahren zur Proteinreinigung isoliert werden.

[0017] Das Konstrukt kann auch als nackte DNA oder als Plasmid/Liposom-, Plasmid/Polyethylenimin-, Plasmid/Dendrimer- oder Plasmid/Peptid-Komplex eingesetzt werden.

[0018] Alternativ kann das Konstrukt in einen replikations-defizienten Virus eingeführt werden, welcher zur gezielten Leitung des Konstrukts an spezifische Stellen in vivo eingesetzt werden kann. Beispielsweise kann das Konstrukt ein retroviraler Vektor sein, welcher die geeignete cDNA für das Fusionsprotein umfasst. Ein replikations-defizienter Retrovirus, z. B. Moloney-Maus-Retrovirus, kann dann zur stabilen Transfektion von Zielzellen und -geweben eingesetzt werden. Andere Viren, welche eingesetzt werden können, umfassen replikations-defiziente Adenoviren, adeno-assoziierte Viren, Herpesviren, Papillomaviren und Sinibisviren. Weitere Viren werden für Fachleute ersichtlich sein.

[0019] Zusätzlich zu den funktionellen Domänen von Avidin, Streptavidin oder einem verwandten Protein wird das Fusionsprotein typischerweise die membran-überspannenden Domänen von endocytotischen Rezeptoren umfassen. Die Verwendung dieser Rezeptoren ermöglicht die Aufnahme von biotinylierten Molekülen in eine Zielzelle. Geeignete Rezeptoren, welche in dieser Erfindung eingesetzt werden können, umfassen den Abfangrezeptor der Klasse A, "Low density lipoprotein"-Rezeptor, "Very low density lipoprotein"-Rezeptor, Transferin-Rezeptor und den LOX-1-Rezeptor. Das Fusionsprotein kann auch einen Linker zwischen dem Rezeptorprotein und den Avidin-Peptidsequenzen umfassen. Der Linker kann jede Länge aufweisen, vorausgesetzt, dass die funktionelle Aktivität der verschiedenen Komponenten des Fusionsproteins erhalten bleibt.

[0020] Im Allgemeinen befindet sich die Fusion zwischen Avidin- oder Streptavidin-Peptidsequenzen und den Rezeptor-Peptidsequenzen zwischen der extrazellulären Domäne des Rezeptorproteins und irgendeiner Stelle außerhalb der Biotin-Bindungsstelle von Avidin oder Streptavidin.

[0021] Das folgende Beispiel erläutert die Erfindung.

Beispiel

[0022] Ein DNA-Konstrukt wurde zwischen dem Rinder-Abfangrezeptor der Klasse A (ScR) (Kodama et al. (1990), *Nature* 343: 531–535) und Avidin (Green (1975), *Adv. Prot. Chem.* 29: 85–133) geschaffen, welches für ein Protein mit einer cytoplasmatischen ScR-Domäne, einer membran-überspannenden Domäne und einer α -helikal gewickelten Domäne, ligiert an eine biotin-bindende Domäne, kodiert. Die vollständige Aminosäuresequenz des Fusionsproteins ist in SEQ-ID-Nr. 2 gezeigt, wobei die Aminosäuren 1–53 die cytoplasmatische Domäne repräsentieren, die Aminosäuren 55–79 die Transmembrandomäne repräsentieren, die Aminosäuren 81–111 eine Spacer-Domäne repräsentieren und die Aminosäuren 113–272 die α -helikal gewickelte Domäne repräsentieren. Die Aminosäuren 273–400 repräsentieren die reife Avidin-Peptidsequenz, abgeleitet von Avidin-cDNA (Gope et al. (1987), *Nucleic Acid Res.* 15: 3595–3606), der ein Sekretionssignal fehlt.

[0023] In Kürze, die cDNA für ScR wurde aus kultivierten Zellen erhalten, die zuvor mit einem Plasmid (pLScRNL) transfiziert worden waren, welches die ScR-cDNA mit einem internen Rous-Sarkom-Virus-Promotor und HindIII-Restriktionsstellen enthält. Die isolierte cDNA wurde dann in eine HindIII-Stelle des Retrovirus-Vektors pLS1ARNL inseriert. Die Avidin-cDNA wurde mittels der Polymerasekettenreaktion gebildet und dann in den Retrovirus-Vektor an einer Sty 1-Restriktionsstelle auf der ScR-cDNA inseriert. Die cDNA, welche die Erfindung verkörpert, ist als SEQ-ID-Nr. 1 gezeigt, wobei die Nukleotide 1–989 einen langen terminalen Repeat aus Mo-MuSV repräsentieren, die Nukleotide 1071–2270 die kodierende Region für das Fusionsprotein repräsentieren, die Nukleotide 2376–3101 einen untranslatierten Bereich aus Rinder-Abfangrezeptor I-cDNA repräsentieren, die Nukleotide 3107–3376 einen RSV-Promotor-Bereich repräsentieren, die Nukleotide 3727–4522 ein neo-R-Gen repräsentieren und die Nukleotide 4540–5177 einen langen terminalen Repeat aus Mo-MuLV repräsentieren.

[0024] Die **Fig. 2** und **3** beziehen sich auf in diesem Beispiel angewandte Verfahren. Konkreter zeigt **Fig. 2** wie die ScR-cDNA mit einem internen RSV-Promotor aus dem Plasmid pLScRNL mittels HindIII ausgeschnitten und in eine HindIII-Stelle eines Shuttle-Vektors kloniert wurde.

[0025] **Fig. 3** zeigt wie die ScR-Avidin-RSV-cDNA in eine HindIII-Stelle des Retrovirus-Vektors pLRNL kloniert wurde.

[0026] Die Expression des Fusionsproteins in Zellen, die mit dem Vektor transfiziert wurden, kann durch Northernblots und immunocytochemische Anfärbung mit einem gegen Avidin gebildeten Antikörper bestätigt werden.

[0027] Die Experimente offenbarten, dass das vollständige mRNA-Transkript in 55-kD-Monomere translatiert wurde, welche zur Bildung sekundärer Strukturen von 110-kD-Dimeren, verknüpft durch S-S-Bindungen, unter nicht-reduzierenden Bedingungen in der Lage waren. Etwa 110 kD große dimere und 55 kD große monomere Peptide wurden bei Anwendung denaturierender Bedingungen nachgewiesen. Das Ergebnis ist vergleichbar mit der Computerberechnung für das monomere Fusionsprotein, 45 kD. Unter nicht-denaturierenden Bedingungen (z. B. Vornahme von Acetylierung vor dem Westernblot) war das stärkste Signal etwa 220 kD, welches zu einem etwa 110-kD-Dimer und einem 55-kD-Monomer denaturiert wurde, was die Bildung von Tetrameren nahe legt. Die Anwesenheit des 220-kD-Proteins wurde auch durch Verwendung chemischer Vernetzungsmittel, z. B. NHS-Ester, verifiziert. Die Ergebnisse zeigen, dass Avidin löslich bleibt und zur Bildung von Tetrameren in der Lage ist, selbst wenn es mit den membran-überspannenden Domänen von endocytischen Rezeptoren verknüpft ist.

[0028] Bei Analyse durch konfokale Mikroskopie und Atomkraftmikroskopie wurde gezeigt, dass das Fusionsprotein ein funktionelles Protein ist, welches zur Bindung von FITC-Biotin in der Lage ist. Nicht-transduzierte Zellen und Zellen, die mit einem Retrovirus-Vektor, enthaltend das LacZ-Gen, transfiziert waren, wurden als Kontrollen verwendet. Es wurde keine unspezifische Bindung von Biotin-Sonden an LacZ-transduzierte Kontrollzellen durch Atomkraftmikroskopie nachgewiesen. Wie erwartet, zeigten die transfizierten Zellen eine spezifische Bindung, welche in unfixierten Proben reproduzierbar messbar war. Die gemessenen Bindungskräfte waren Mehrfache des Mittelwerts 149 ± 19 pN (Mittelwert \pm Standardabweichung), welcher, wie ebenfalls erwartet, innerhalb des Bereichs der früher berichteten Biotin-Streptavidin-Bindungskraft von 160 pN (Florin et al. (1994), *Science* 264: 415–417) liegt.

[0029] Die Funktionalität des Konstrukts kann auch in vivo durch Demonstration der Bindung Fluoreszenz-markierter Biotinmoleküle an Zellen, welche das Fusionsproteinkonstrukt aufweisen, mittels FACS-Analyse bestätigt werden.

[0030] Die funktionelle Aktivität des Fusionsproteins in vivo wurde in einem Ratten-Glioblastom-Modell analysiert. BT4C-Wildtyp-Gliomzellen wurden intrakranial in den rechten Corpus callosum in einer Tiefe von 2,5 mm im Gehirn von weiblichen Inzucht-BDIX-Ratten implantiert. Das Wachstum von Tumoren wurde häufig mit hochauflösender MRI (Magnetresonanztomographie) überprüft. Drei Wochen nach den Tumorzellbeimpfungen wurde Pseudotyp-Retrovirus, cDNA für das Fusionsprotein oder LacZ-Gen tragend, in Titern von 2×10^6 cfu/ml bzw. $1,3 \times 10^6$ cfu/ml in den Tumor transferiert, zuerst in einer Tiefe von 2,5 mm und dann in einer Tiefe von 1,5 mm, mit einem Intervall von 10 Minuten. Der Gentransfer wurde nach zwei Tagen Wachstum wiederholt. Die Tiere wurden getötet und mit 4%igem PFA 3 Tage nach der letzten Injektion perfusionsfixiert. Die Gehirne wurden entfernt und an der Injektionsstelle in zwei koronale Stücke geteilt, auf Eis sezerniert und mittels Immunreaktivität gegenüber Anti-Avidin-Antikörper analysiert. Die Ergebnisse zeigten, dass das Fusionsprotein in vivo im Ratten-Glioblastom exprimiert wurde. Das Protein wurde in Gliomzellen nachgewiesen und in ringähnlichen Strukturen, die Gefäßendothelzellen in Tumorblutgefäßen ähneln.

SEQUENZVERZEICHNIS

(1) ALLGEMEINE INFORMATION:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: Eurogene Limited
- (B) STRASSE: Marquis House, 67/68 Jermyn Street
- (C) STADT: London
- (E) LAND: Vereinigtes Königreich
- (F) POSTLEITZAHL (PLZ): SW1Y 6NY

(ii) TITEL DER ERFINDUNG: BIOTIN-BINDENDE REZEPTORMOLEKÜLE

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 2

(iv) COMPUTER-LESBARE FORM:

- (A) MEDIUMTYP: Diskette
- (B) COMPUTER: IBM-PC-kompatibel
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

(2) INFORMATION FÜR SEQ-ID-NR. 1:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 5177 Basenpaare
- (B) TYP: Nukleinsäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: einzelsträngig
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE: 1071..2270

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ-ID-NR. 1:

TTTGAAAGAC CCCACCCGTA GGTGGCAAGC TAGCTTAAGT AACGCCACTT TGCAAGGCAT	60
GGAAAATAC ATAACTGAGA ATAGAAAAGT TCAGATCAAG GTCAGGAACA AAGAAACAGC	120
TGAATACCAA ACAGGATATC TGTGGTAAGC GGTTCCCTGCC CCGGCTCAGG GCCAAGAACA	180
GATGAGACAG CTGAGTGATG GGCCAAACAG GATATCTGTG GTAAGCAGTT CCTGCCCCGG	240
CTCGGGGCCA AGAACAGATG GTCCCCAGAT GCGGTCCAGC CCTCAGCAGT TTCTAGTGAA	300
TCATCAGATG TTTCCAGGGT GCCCCAAGGA CCTGAAAATG ACCCTGTACC TTATTTGAAC	360
TAACCAATCA GTTCGCTTCT CGCTTCTGTT CGCGCGCTTC CGCTCTCCGA GCTCAATAAA	420
AGAGCCCACA ACCCCTCACT CGGCGCGCCA GTCTTCCGAT AGACTGCGTC GCCCGGGTAC	480
CCGTATTCCC AATAAAGCCT CTTGCTGTTT GCATCCGAAT CGTGGTCTCG CTGTTCTTG	540
GGAGGGTCTC CTCTGAGTGA TTGACTACCC ACGACGGGGG TCTTTCATTT GGGGGCTCGT	600
CCGGGATTTG GAGACCCCTG CCCAGGGACC ACCGACCCAC CACCGGGAGG TAAGCTGGCC	660
AGCAACTTAT CTGTGTCTGT CCGATTGTCT AGTGTCTATG TTTGATGTTA TGCGCCTGCG	720
TCTGTACTAG TTAGCTAACT AGCTCTGTAT CTGGCGGACC CGTGGTGGAA CTGACGAGTT	780
CTGAACACCC GGCCGCAACC CTGGGAGACG TCCCAGGGAC TTTGGGGGCC GTTTTTGTGG	840
CCCGACCTGA GGAAGGGAGT CGATGTGGAA TCCGACCCCG TCAGGATATG TGGTTCTGGT	900
AGGAGACGAG AACCTAAAAC AGTTCCCGCC TCCGTCTGAA TTTTGTCTTT CGGTTTGGAA	960
CCGAAGCCGC GCGTCTTGTC TGCTGCAGCC AAGCTTGGGC TGCAGGTCGA CTCTAGAGGA	1020

TCAATTCGGC ACGAGTAAAT CGGTGCTGCC GTCTTTAGGA CATATGAAGT ATG GCA	1076
Met Ala	
1	
CAG TGG GAT GAC TTT CCT GAT CAG CAA GAG GAC ACT GAC AGC TGT ACA	1124
Gln Trp Asp Asp Phe Pro Asp Gln Gln Glu Asp Thr Asp Ser Cys Thr	
5 10 15	
GAG TCT GTG AAG TTC GAT GCT CGC TCA GTG ACA GCT TTG CTT CCT CCC	1172
Glu Ser Val Lys Phe Asp Ala Arg Ser Val Thr Ala Leu Leu Pro Pro	
20 25 30	
CAT CCT AAA AAT GGC CCA ACT CTT CAA GAG AGG ATG AAG TCT TAT AAA	1220
His Pro Lys Asn Gly Pro Thr Leu Gln Glu Arg Met Lys Ser Tyr Lys	
35 40 45 50	
ACT GCA CTG ATC ACC CTT TAT CTC ATT GTG TTT GTA GTT CTC GTG CCC	1268
Thr Ala Leu Ile Thr Leu Tyr Leu Ile Val Phe Val Val Leu Val Pro	
55 60 65	
ATC ATT GGC ATA GTG GCA GCT CAG CTC CTG AAA TGG GAA ACG AAG AAT	1316
Ile Ile Gly Ile Val Ala Ala Gln Leu Leu Lys Trp Glu Thr Lys Asn	
70 75 80	
TGC ACG GTT GGC TCA GTT AAT GCA GAT ATA TCT CCA AGT CCG GAA GGC	1364
Cys Thr Val Gly Ser Val Asn Ala Asp Ile Ser Pro Ser Pro Glu Gly	
85 90 95	
AAA GGA AAT GGC AGT GAA GAT GAA ATG AGA TTT CGA GAA GCT GTG ATG	1412
Lys Gly Asn Gly Ser Glu Asp Glu Met Arg Phe Arg Glu Ala Val Met	
100 105 110	
GAA CGC ATG AGC AAC ATG GAA AGC AGA ATC CAG TAT CTT TCA GAT AAT	1460
Glu Arg Met Ser Asn Met Glu Ser Arg Ile Gln Tyr Leu Ser Asp Asn	
115 120 125 130	

GAA GCC AAT CTC CTA GAT GCT AAG AAT TTC CAA AAT TTC AGC ATA ACA	1508
Glu Ala Asn Leu Leu Asp Ala Lys Asn Phe Gln Asn Phe Ser Ile Thr	
135 140 145	
ACT GAT CAA AGA TTT AAT GAT GTT CTT TTC CAG CTA AAT TCC TTA CTT	1556
Thr Asp Gln Arg Phe Asn Asp Val Leu Phe Gln Leu Asn Ser Leu Leu	
150 155 160	
TCC TCC ATC CAG GAA CAT GAG AAT ATC ATA GGG GAT ATC TCC AAG TCA	1604
Ser Ser Ile Gln Glu His Glu Asn Ile Ile Gly Asp Ile Ser Lys Ser	
165 170 175	
TTA GTA GGT CTG AAC ACC ACA GTA CTT GAT TTG CAG TTC AGT ATT GAA	1652
Leu Val Gly Leu Asn Thr Thr Val Leu Asp Leu Gln Phe Ser Ile Glu	
180 185 190	
ACA CTG AAT GGC AGA GTC CAA GAG AAT GCA TTT AAA CAA CAA GAG GAG	1700
Thr Leu Asn Gly Arg Val Gln Glu Asn Ala Phe Lys Gln Gln Glu Glu	
195 200 205 210	
ATG CGT AAA TTA GAG GAG CGT ATA TAC AAT GCA TCA GCA GAA ATT AAG	1748
Met Arg Lys Leu Glu Glu Arg Ile Tyr Asn Ala Ser Ala Glu Ile Lys	
215 220 225	
TCT CTA GAT GAA AAA CAA GTA TAT TTG GAA CAG GAA ATA AAA GGG GAA	1796
Ser Leu Asp Glu Lys Gln Val Tyr Leu Glu Gln Glu Ile Lys Gly Glu	
230 235 240	
ATG AAA CTG TTG AAT AAT ATC ACT AAT GAT CTG AGG CTG AAG GAT TGG	1844
Met Lys Leu Leu Asn Asn Ile Thr Asn Asp Leu Arg Leu Lys Asp Trp	
245 250 255	
GAA CAT TCT CAG ACA TTG AAA AAT ATC ACT TTA CTC CAA GGT GCC AGA	1892
Glu His Ser Gln Thr Leu Lys Asn Ile Thr Leu Leu Gln Gly Ala Arg	
260 265 270	

AAGCCAGGAC TTAATGGACA AAAAGGCCAG AAGGGAGAAA AAGGGAGTGG AAGCATGCAA	2510
AGACAATCTA ATACAGTCCG ACTGGTGGGT GGCAGCGGCC CTCACGAAGG CAGAGTGGAG	2570
ATTTTTCACG AAGGCCAGTG GGGTACGGTG TGTGACGACC GCTGGGAACT GCGTGGAGGA	2630
CTGGTCGTCT GCAGGAGCTT GGGATACAAA GGTGTTCAAA GTGTGCATAA GCGAGCTTAT	2690
TTTGAAAAG GTACGGGTCC AATATGGCTG AATGAAGTAT TTTGTTTCGG GAAAGAGTCA	2750
TCCATTGAAG AGTGCAGAAT TAGACAGTGG GGTGTGAGAG CCTGTTCGCA CGACGAAGAT	2810
GCTGGGGGTC ACTTTGCACC TACATAATGC ATCATATTTT CATTACATT TTTTAAACTG	2870
TTATAAAGTG ATTTTTTTC TTTGCTTCAC TAAAATCAGC TTAATTAATA TTTAAGAABC	2930
TAAGAATTTT ATCCACAGAA AAGGAATATT TAAAATCAC TGGATAAACA TATAAATAG	2990
CTTCATATTT GCTTCAAATA CCAGAACCAT TTCAACTTCT CTAGGTTTTT AAGTGGCTCG	3050
TGCCGAATTG ATCCCCTCAG GATATAGTAG TTTCGCTTTT GCATAGGGAG GGGGAAATGT	3110
AGTCTTATGC AATACTCTTG TAGTCTTGCA ACATGGTAAC GATGAGTTAG CAACATGCCT	3170
TACAAGGAGA GAAAAGCAC CGTGCATGCC GATTGGTGGA AGTAAGGTGG TACGATCGTG	3230
CCTTATTAGG AAGGCAACAG ACGGGTCTGA CATGGATTGG ACGAACCCT GAATTCCGCA	3290
TTGCAGAGAT ATTGTATTTA AGTGCCTAGC TCGATACAGC AAACGCCATT TGACCATTCA	3350
CCACATTGGT GTGCACCTCC AAGCTTCACG CTGCCGCAAG CACTCAGGGC GCAAGGGCTG	3410
CTAAAGGAAG CGGAACACGT AGAAAGCCAG TCCGCAGAAA CCGTGCTGAC CCCGGATGAA	3470
TGTCAGCTAC TGGGCTATCT GGACAAGGGA AAACGCAAGC GCAAAGAGAA AGCAGGTAGC	3530
TTGCAGTGGG CTTACATGGC GATAGCTAGA CTGGGCGGTT TTATGGACAG CAAGCGAACC	3590

GGAATTGCCA GCTGGGGCGC CCTCTGGTAA GGTGGGAAG CCCTGCAAAG TAAACTGGAT	3650
GGCTTTCTTG CCGCCAAGGA TCTGATGGCG CAGGGGATCA AGATCTGATC AAGAGACAGG	3710
ATGAGGATCG TTTCGCATGA TTGAACAAGA TGGATTGCAC GCAGGTTCTC CGGCCGCTTG	3770
GGTGGAGAGG CTATTCGGCT ATGACTGGGC ACAACAGACA ATCGGCTGCT CTGATGCCGC	3830
CGTGTTCCGG CTGTCAGCGC AGGGGCGCCC GGTTCTTTTT GTCAAGACCG ACCTGTCCGG	3890
TGCCCTGAAT GAACTGCAGG ACGAGGCAGC GCGGCTATCG TGGCTGGCCA CGACGGGCGT	3950
TCCTTGCGCA GCTGTGCTCG ACGTTGTCAC TGAAGCGGGA AGGGACTGGC TGCTATTGGG	4010
CGAAGTGCCG GGGCAGGATC TCCTGTCATC TCACCTTGCT CCTGCCGAGA AAGTATCCAT	4070
CATGGCTGAT GCAATGCGGC GGCTGCATAC GCTTGATCCG GCTACCTGCC CATTCGACCA	4130
CCAAGCGAAA CATCGCATCG AGCGAGCAGC TACTCGGATG GAAGCCGGTC TTGTCGATCA	4190
GGATGATCTG GACGAAGAGC ATCAGGGGCT CGCGCCAGCC GAACTGTTCG CCAGGCTCAA	4250
GGCGCGCATG CCCGACGGCG AGGATCTCGT CGTGACCCAT GGCGATGCCT GCTTGCCGAA	4310
TATCATGGTG GAAAATGGCC GCTTTTCTGG ATTCATCGAC TGTGGCCGGC TGGGTGTGGC	4370
GGACCGCTAT CAGGACATAG CGTTGGCTAC CCGTGATATT GCTGAAGAGC TTGGCGGCGA	4430
ATGGGCTGAC CGCTTCCTCG TGCTTTACGG TATCGCCGCT CCCGATTCGC AGCGCATCGC	4490
CTTCTATCGC CTTCTTGACG AGTTCTTCTG AGCGGGACTC TGGGGTTCGA TAAAATAAAA	4550
GATTTTATTT AGTCTCCAGA AAAAGGGGGG AATGAAAGAC CCCACCTGTA GGTTCGGCAA	4610
GCTAGCTTAA GTAACGCCAT TTTGCAAGGC ATGGAAAAT ACATAACTGA GAATAGAGAA	4670
G TTCAGATCA AGGTCAGGAA CAGATGGAAC AGCTGAATAT GGGCCAAACA GGATATCTGT	4730

GGTAAGCAGT TCCTGCCCCG GCTCAGGGCC AAGAACAGAT GGAACAGCTG AATATGGGCC 4790
AAACAGGATA TCTGTGGTAA GCAGTTCCTG CCCC GGCTCA GGGCCAAGAA CAGATGGTCC 4850
CCAGATGCGG TCCAGCCCTC AGCAGTTTCT AGAGAACCAT CAGATGTTTC CAGGGTGCCC 4910
CAAGGACCTG AAATGACCCT GTGCCTTATT TGAACTAACC AATCAGTTCG CTTCTCGCTT 4970
CTGTTGCGCG GCTTCTGCTC CCCGAGCTCA ATAAAAGAGC CCACAACCCC TCACTCGGGG 5030
CGCCAGTCCT CCGATTGACT GAGTCGCCCC GGTACCCGTG TATCCAATAA ACCCTCTTGC 5090
AGTTGCATCC GACTTGTGGT CTCGCTGTTT CTTGGGAGGG TCTCCTCTGA GTGATTGACT 5150
ACCCGTCAGC GGGGGTCTTT CATTGG 5177

(2) INFORMATION FÜR SEQ-ID-NR. 2:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 400 Aminosäuren
- (B) TYP: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ-ID-NR. 2:

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

Val Pro Ile Ile Gly Ile Val Ala Ala Gln Leu Leu Lys Trp Glu Thr
 65 70 75 80

Lys Asn Cys Thr Val Gly Ser Val Asn Ala Asp Ile Ser Pro Ser Pro
 85 90 95

Glu Gly Lys Gly Asn Gly Ser Glu Asp Glu Met Arg Phe Arg Glu Ala
 100 105 110

Val Met Glu Arg Met Ser Asn Met Glu Ser Arg Ile Gln Tyr Leu Ser
 115 120 125

Asp Asn Glu Ala Asn Leu Leu Asp Ala Lys Asn Phe Gln Asn Phe Ser
 130 135 140

Ile Thr Thr Asp Gln Arg Phe Asn Asp Val Leu Phe Gln Leu Asn Ser
 145 150 155 160

Leu Leu Ser Ser Ile Gln Glu His Glu Asn Ile Ile Gly Asp Ile Ser
 165 170 175

Lys Ser Leu Val Gly Leu Asn Thr Thr Val Leu Asp Leu Gln Phe Ser
 180 185 190

Ile Glu Thr Leu Asn Gly Arg Val Gln Glu Asn Ala Phe Lys Gln Gln
 195 200 205

Glu Glu Met Arg Lys Leu Glu Glu Arg Ile Tyr Asn Ala Ser Ala Glu
 210 215 220

Ile Lys Ser Leu Asp Glu Lys Gln Val Tyr Leu Glu Gln Glu Ile Lys
 225 230 235 240

Gly Glu Met Lys Leu Leu Asn Asn Ile Thr Asn Asp Leu Arg Leu Lys
 245 250 255

Asp Trp Glu His Ser Gln Thr Leu Lys Asn Ile Thr Leu Leu Gln Gly
 260 265 270

Ala Arg Lys Cys Ser Leu Thr Gly Lys Trp Thr Asn Asp Leu Gly Ser
275 280 285

Asn Met Thr Ile Gly Ala Val Asn Ser Arg Gly Glu Phe Thr Gly Thr
290 295 300

Tyr Ile Thr Ala Val Thr Ala Thr Ser Asn Glu Ile Lys Glu Ser Pro
305 310 315 320

Leu His Gly Thr Gln Asn Thr Ile Asn Lys Arg Thr Gln Pro Thr Phe
325 330 335

Gly Phe Thr Val Asn Trp Lys Phe Ser Glu Ser Thr Thr Val Phe Thr
340 345 350

Gly Gln Cys Phe Ile Asp Arg Asn Gly Lys Glu Val Leu Lys Thr Met
355 360 365

Trp Leu Leu Arg Ser Ser Val Asn Asp Ile Gly Asp Asp Trp Lys Ala
370 375 380

Thr Arg Val Gly Ile Asn Ile Phe Thr Arg Leu Arg Thr Gln Lys Glu
385 390 395 400

Patentansprüche

1. Protein, umfassend eine membran-überspannende Domäne eines endozytotischen Rezeptors und eine extrazelluläre Domäne, die biotin-bindende Aktivität umfaßt, zur therapeutischen Verwendung.
2. Protein nach Anspruch 1, welches ferner eine zytoplasmatische Domäne umfaßt.
3. Protein nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, wobei die extrazelluläre Domäne eine biotin-bindende Domäne von Avidin oder Streptavidin umfaßt.
4. Protein nach irgendeinem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Rezeptor ein Abfangrezeptor der Klasse A ist.
5. Protein nach Anspruch 1, welches die SEQ-ID-Nr. 2 umfaßt.
6. Nukleinsäuremolekül, kodierend für ein Protein nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 5, zur therapeutischen Verwendung.
7. Protein, umfassend eine membran-überspannende Domäne eines Abfangrezeptors der Klasse A und eine extrazelluläre Domäne, die biotin-bindende Aktivität umfaßt.
8. Protein, welches die SEQ-ID-Nr. 2 umfaßt.
9. Nukleinsäuremolekül, kodierend für ein Protein nach Anspruch 7 oder Anspruch 8.

10. Rekombinanter Expressionsvektor, umfassend ein Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 9.

Es folgen 3 Blatt Zeichnungen

FIG. 1

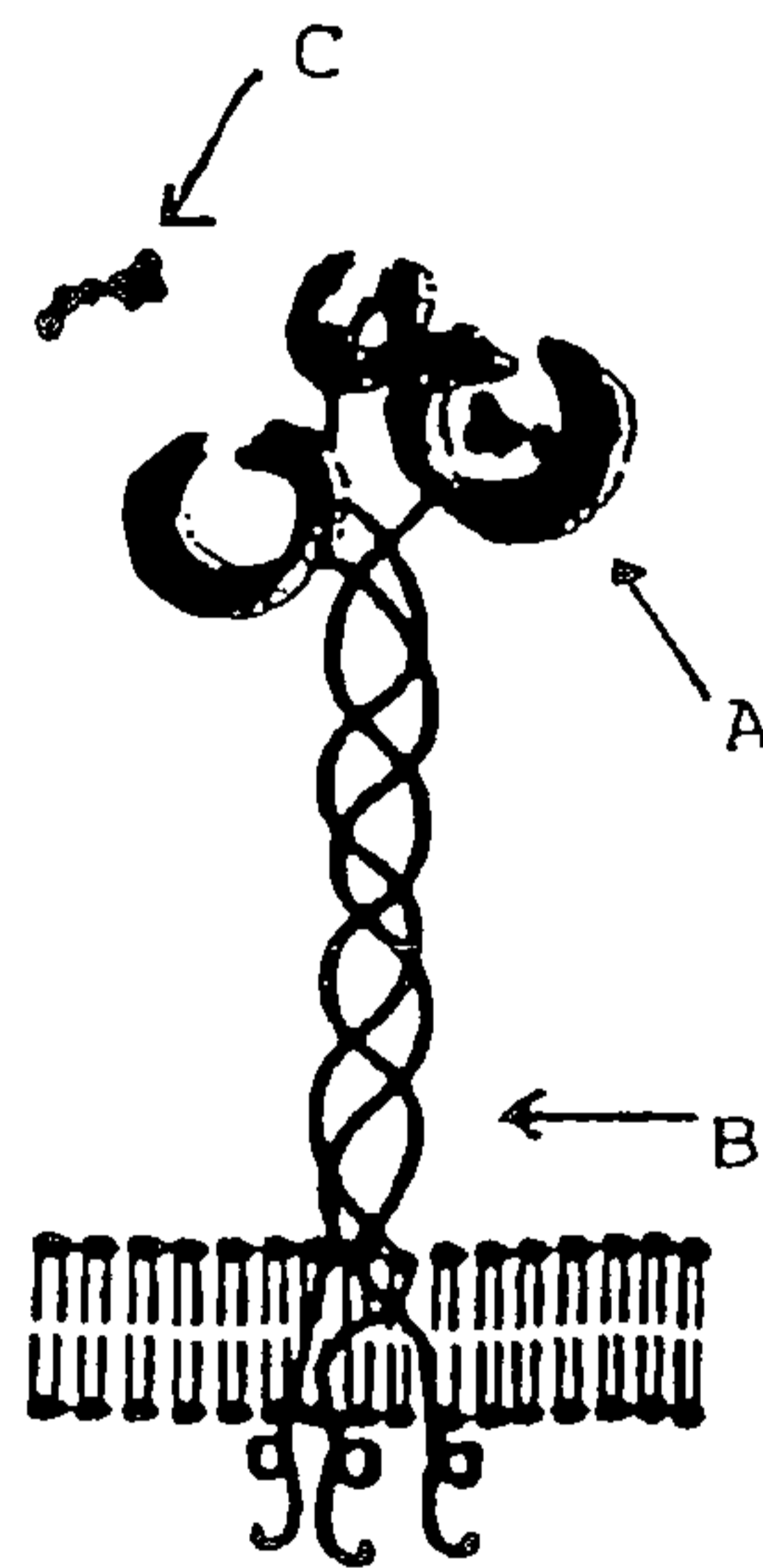


FIG. 2

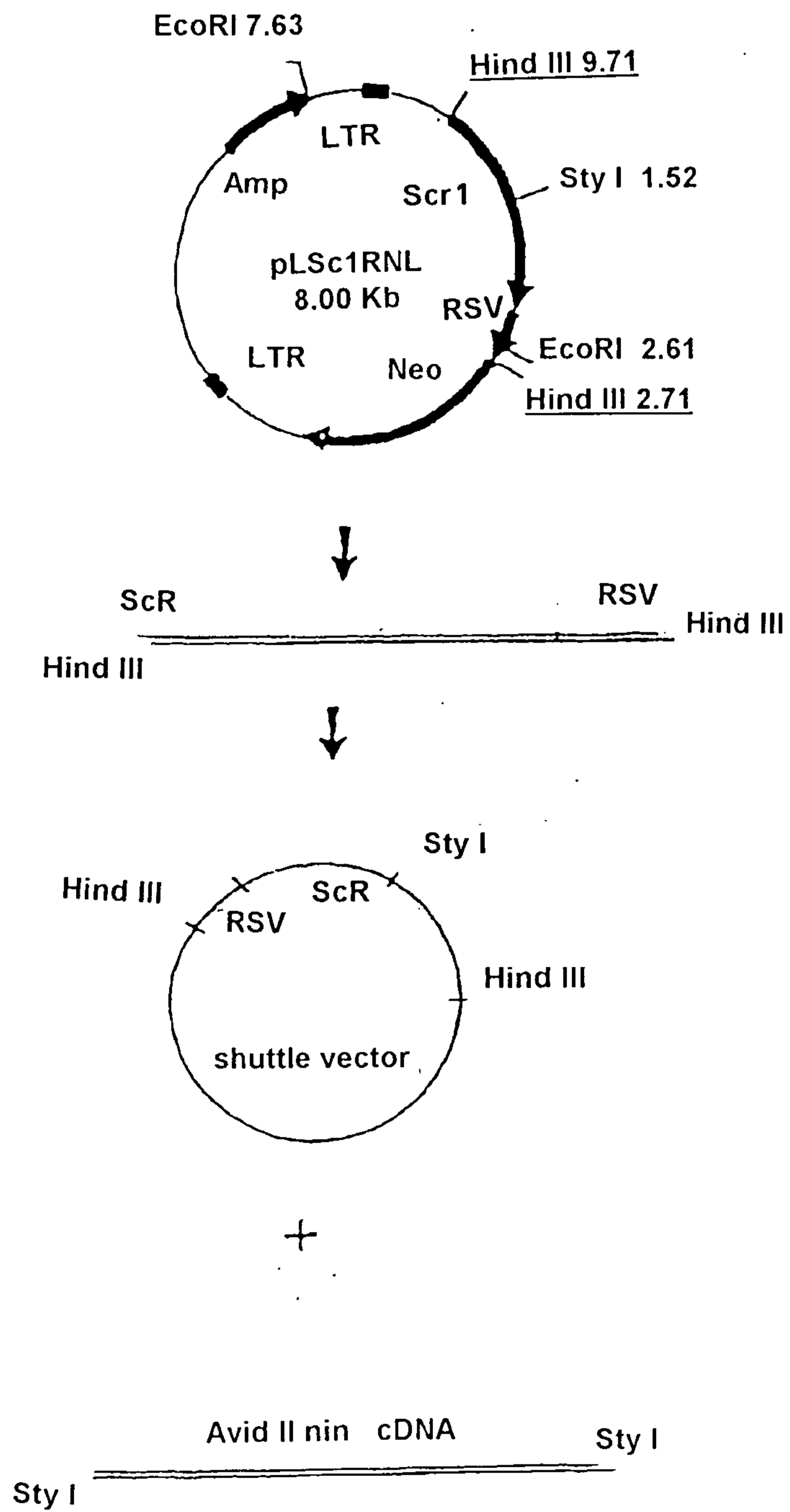


FIG. 3

