

**KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY**
Kivonat**SPECIFIKUS HUMÁN ANTITESTEK SZELEKTÍV RÁKTERÁPIÁRA**

Jelen találmány tárgya egy peptid vagy polipeptid, amely tartalmaz egy Fv molekulát, vagy annak egy konstrukcióját, vagy ezek bármelyikének egy fragmentjét, vagy egy fragment konstrukcióját, amelynek felerősített kötési tulajdonságai vannak, és így szelektíven és/vagy specifikusan kötődik egy célsejt, a többi sejt ellenében, és amelyben a kötési szelektivitást vagy specifitást elsődlegesen egy első hipervariábilis régió határozza meg, és amelyben az Fv molekula egy scFv, vagy dsFv, és Fv adott esetben tartalmazhat egy vagy több tag-et is. A felerősített kötés egy lényegében hozzáférhetővé tett és/vagy túlexpresszált kötőhelyre irányul egy célsejten, a többi sejt ellenében, amelyeken ez a kötőhely lényegében nem elérhető és/vagy nem expresszált. A találmány tárgya továbbá egy olyan módszer, amely lehetővé teszi ilyen peptidok és polipeptidok izolálását egy phage display libraryból, valamint a találmány tárgyát képezik a peptidok és polipeptidok kódoló nukleinsavak is. A találmány szolgáltat egy gyógyszerkészítményt, amely a peptidet vagy a polipeptidet tartalmazza, valamint kiteket, amelyek betegségek diagnosztizálására és kezelésére használhatók, elsősorban rákos megbetegedések, azon belül is az akut myeloid leukémia esetében.

Jellemezés alapján
Zoltán Ádám

250



A2

P 0 4 0 0 7 7 5

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

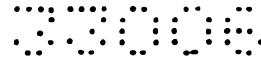
SPECIFIKUS HUMÁN ANTITESTEK SZELEKTÍV RÁKTERÁPIÁRA

A TALÁLMÁNY ALKALMAZÁSI TERÜLETE

[1.] Jelen találmány a szövetekhez való célba találás (targetálás) és azok azonosításának területére vonatkozik, fág bemutatási technológia, valamint olyan peptidok és polipeptidok felhasználásával, amelyek specifikusan kötődnek adott célsejtekhez. Ilyen peptidok és polipeptidok az Fv molekulák, azok konstrukciói, ezek bármelyikének egy fragmentjei, vagy egy fragment konstrukciói. Kiváltképpen, hogy ezeknek a peptidoknak, polipeptidoknak rákellenes hatása is lehet, és/vagy rákellenes ágensekhez kötődhetnek vagy asszociálódhatnak, különösen a vérhez köthető rákos megbetegedések esetében.

A TALÁLMÁNY HÁTTERE

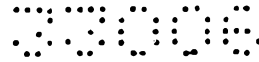
[2.] A terápiás hatóanyagok szövet-szelektív targetálása a gyógyszeripar egyik újonnan felmerülő tudományága. Új, targetáláson alapuló rákellenes terápiákat fejlesztettek ki, növelendő a terápia specificitását és hatásosságát, és csökkentendő a toxicitását, vagyis növelendő az általános hatékonyságot. Tumor-asszociált antigének elleni egér monoklonális antitesteket (MAb-ok) használtak, hogy megkíséreljenek toxinokkal, radioaktív



nukleotidokkal és kemoterápiás anyagokkal tumorokat megcélozni. Továbbá, differenciálódási antigéneket, mint például a CD19-et, CD20-at, CD22-t és CD25-öt használták a vérképzéshez köthető rosszindulatú megbetegedések gyógyításakor, mint rákspecifikus célelemeket. Bár alaposan tanulmányozták, ez a megközelítés, mégis eléggé behatárolt. Egyik határa a megfelelő, szelektív kötődést mutató monoklonális antitestek izolálásának nehézsége. Egy második nehézség az, hogy az antitestnek magas immunogenitással kell rendelkeznie a sikeres antitest izoláláshoz. Egy harmadik határoló tényező a páciensben kialakuló rágszáló antitest elleni immunválasz (human anti-mouse antibody-HAMA válasz), amely igen gyakran a szérum féléletidejének rövidülését eredményezi, és megakadályozza az ismétlődő kezeléseket, ezzel csökkentve az antitest terápiás hatékonyságát. Ez utóbbi határoló tényező serkentette mind a kiméra vagy humanizált rágszáló eredetű monoklonális antitestek előállítására, mind az új humán antitestek felfedezésére irányuló érdeklődést.

[3.] Sok olyan faktor van, amelyek befolyásolják a monoklonális antitestek (MAb-ok) rák kezelésében elért terápiás hatékonyságát. Ezek közé tartoznak az antigén expresszió specificitása a tumor sejteken, az expresszió szintje, az antigének heterogenitása, és a tumorhoz való hozzáférhetőség. A leukaemiák és lymphomák általában jobban reagálnak a az antitesteket alkalmazó terápiákra, mint a szilárd tumorok, például a karcinómák. A MAb-ok gyorsan hozzákötnek a leukaemiás és lymphomás sejtekhez a véráramban, és könnyen behatolnak a rosszindulatú sejtekig a limfatikus szövetben, ennél fogva ezek a a limfoid tumorok kiváló jelöltek a MAb-alapú terápiákra. Az ideális az lenne, ha olyan MAb-t tudnánk azonosítani, amely a rosszindulatú progenitor sejteket termelő őssejt valamelyik sejtfelszíni markerét ismerné fel.

[4.] Segítendő a MAb-ok felfedezését/termelését phage display libraryakat alkalmaznak, hogy abból véletlenszerűen válasszanak ki egyláncú Fv molekulákat (single chain Fv, scFv), amely kötődik az izolált, előre determinált célfehérjéhez, mint például antitestekhez, hormonokhoz és receptorokhoz. Ezen felül, az antitesteket tartalmazó könyvtárak használata, azon belül is a fág scFv könyvtáraké, igen megkönnyíti azon egyedülálló molekulák felfedezését, amelyekkel specifikus, eddig még fel nem ismert és meg nem határozott sejtfelszíni molekulákat lehet esetleg megcélozni.



[5.] A leukaemiák, lymphomák és myelomák olyan rákos megbetegedések, amelyek a csontvelőből, valamint a limfatikus szövetekből erednek, és a sejtek nem ellenőrzött növekedésével járnak. Az akut limfoblasztómás leukémia (“ALL”) egy olyan heterogén betegségcsoport, amelyet specifikus klinikai és immunológiai tulajdonságokkal jellemeznek. Akárcsak az ALL más formáinál, a döntő ok a legtöbb B-sejtes ALL (“B-ALL”) esetben nem ismert, annak ellenére, hogy sok esetben a betegség egyetlen sejt DNS-ében történt szerzett genetikai módosulásokból ered, amely miatt az abnormálissá lesz, és folytonosan osztódni kezd.

[6.] AML a neoplazmák egy heterogén csoportja, amelyben egy progenitor sejt, rendes körülmények között a mieloid vonal végdifferenciált sejtjeit adja (eritrociták, granulociták, monociták és vérlemezkék). Mint a neoplázia más formáiban, az AML is szerzett genetikai módosulásokhoz köthető, amely során a normálisan differenciálódott mieloid sejtek helyett kevésbé differenciálódott blasztok képződnek, amelyek a korai mieloid differenciáció egy vagy több típusát képviselik. Az AML általában a csontvelőben fejlődik ki, valamint, kisebb mértékben, a másodlagos vérképző szervekben. Az AML elsősorban felnőtteket érint, az incidencia 15 és 40 év között a legmagasabb, de előfordul az is, hogy gyerekeket és idősebb felnőtteket érint. Minden AML-ben megbetegedett páciensnek a diagnózist követően azonnali terápiára van szüksége ahhoz, hogy klinikai gyógyulást lehessen elérni, vagyis olyan állapotot, ahol a nem differenciált blaszt sejtek jelenléte a véráramban nem mutatható ki.

[7.] Napjainkra már több olyan monoklonális antitestet fejlesztettek ki, amelyeknek tumor sejtek elleni citolitikus hatása van. A P185 – növekedési faktor receptor (HER2) - elleni MuMAb4D5 monoklonális antitest humanizált típusát, amelyet az FDA is jóváhagyott, és már használják humán emlőrák kezelésére (5,821,337 és 5,720,954 számú USA-beli szabadalmak). A kötődést követően az antitest képes a gátolni a HER2 növekedési faktor receptor-dependens tumorsejtnövekedést. Ezen felül egy CD20 elleni kiméra antitestet fogadott el az FDA (5,843,439 számú USA—beli szabadalom), amely perifériás B-sejtek gyors ürítését okozza, ide értve a lymphomához asszociáltakat is. Ezen antitest kötődése a célsejthez egy komplement-dependens lizist okoz. Ezt a terméket is jelenleg hagyják jóvá, és már a klinikumban is használják az alacsony fokozatú B-sejtes non-Hodgkin lymphomák kezelésére.



[8.] Néhány más humanizált vagy kiméra antitestek állnak jelenleg fejlesztés vagy klinikai tesztelés alatt. Ezenkívül egy humanizált Ig-t, amely specifikusan reagál a CD33 antigénnel, és amely hozzáférhető mind a normál mieloid sejteken, mind a legtöbb mieloid leukaemiás sejten, hozzákötötték a rákellenes gyógyszer calicheamicinhez CMA-676 (Sievers *et al.*, *Blood Supplement*, 308, 504a (1997)). Ezt a konjugátumot, amely MYLOTARG[®] néven ismert, szintén napjainkban fogadta el az FDA (Caron *et al.*, *Cancer Supplement*, 73, 1049-1056 (1994)). A citolitikus aktivitásának fényében, egy további anti-CD33 antitestet (HumM195), jelenleg klinikai tesztelés alatt, konjugáltak különböző citotoxikus ágensekhez, többek között a gelonin toxinhoz (McGraw *et al.*, *Cancer Immunol. Immunother.*, 39, 367-374 (1994)) és radioaktív izotópokhoz ¹³¹I (Caron *et al.*, *Blood* 83, 1760-1768 (1994)), ⁹⁰Y (Jurcic *et al.*, *Blood Supplement*, 92, 613a (1998)) és ²¹³Bi (Humm *et al.*, *Blood Supplement*, 38:231P (1997)).

[9.] Egy, a leukocita antigén CD-45 (cHuLym3) elleni kiméra antitest a humán leukémiák és lymphomák kezelésére indított preklinikai fázisban van, (Sun *et al.*, *Cancer Immunol. Immunother.*, 48, 595-602 (2000)), csontvelőátültetés szabályozására használható. In vitro vizsgálatokban specifikus sejtlízist figyeltek meg az ADCC assayben (antibody dependent cell-mediated cytotoxicity, antitest-dependens sejt-mediált citotoxicitás, Henkart, *Immunity*, 1, 343-346 (1994); Squier and Cohen, *Current Opin. Immunol.*, 6, 447-452 (1994))

[10.] Habár ezek az előzetes eredmények ígéretesek, a következő limitáló tényezőkkel kell szembenéznünk. A végső termékben nem humán szekvenciák vannak, amely egy nem humán anyagok elleni immunválaszt válthat ki, mint amilyen például a HAMA. Ez a HAMA-válasz megakadályozza az ismételt kezeléseket, és a termék rövidebb szérum-féléletidejét idézi elő. Ezenkívül a fent említett módszerek kizárólag egyetlen faj antitestjeinek, valamint kizárólag ismert és tisztított antigének elleni antitestek izolálását teszik lehetővé. Továbbá, ezek a módszerek nem szelektívek, amennyiben nem teszik lehetővé olyan sejtfelszíni molekulák elleni antitestek izolálását, amelyek jelen vannak mind a normál, mind a malignus sejtek felszínén.

[11.] Tehát, egy módszer, amely megoldja a fent említett limitáló tényezőket, igen hasznos volna. Továbbá, egy ilyen módszer ideális módon lehetővé tenné a rákos sejtek cél ligandumjainak és markereinek az azonosítását, vagy olyan sejteket, amelyek a rákos



metasztázisban vesznek részt. Ezen felül, egy ilyen módszer az ilyen célelemek elleni antitestek termelését is lehetővé tenné. A fág bemutatási technológia mindezeket az előnyöket mutatja.

[12.] A fág bemutatási technológia lehetővé tette, olyan scFv-k izolálását, amelyek kizárólag humán szekvenciákat tartalmaznak. Például, a kizárólag humán, humán TGFb2 receptor elleni antitest, amely egy fág bemutatási technológiával előállított scFv klónból származik, napjaink terméke. Ez az scFv, amelyet kizárólag humán IgG4 molekulává konvertáltak, és a TGFb2 kompetitora a receptorhoz való kötésben (Thompson *et al.*, *J. Immunol Methods*, 227, 17-29 (1999)), igen erős antiproliferatív hatással rendelkezik. Ez a technológia jóval specifikusabban le van írva a következő publikációkban: Smith, *Science*, 228, 1315 (1985); Scott *et al.*, *Science*, 249, 386-390 (1990); Cwirla *et al.*, *PNAS*, 87, 6378-6382 (1990); Devlin *et al.*, *Science*, 249, 404-406 (1990); Griffiths *et al.*, *EMBO J.*, 13(14), 3245-3260 (1994); Bass *et al.*, *Proteins*, 8, 309-314 (1990); McCafferty *et al.*, *Nature*, 348, 552-554(1990); Nissim *et al.*, *EMBO J.*, 13, 692 -698 (1994); US szabadalmi számok: 5,427,908, 5,432,018, 5,223,409 és 5,403,484, *lib.*

[13.] A fág bemutatási technológiát használva, jelen találmány szerzői olyan sejt markereket azonosítottak, amelyek kóros sejteken, vagy rosszindulatú tumorok esetén vannak jelen. Ennek következtében jelen találmány célja, olyan peptidek és polipeptidek azonosítása, amelyek felismerik a sejt markereket, lényegében hozzáférhető, vagy túlexpresszált, különösen kóros, vagy rosszindulatú tumor sejteken vagy sejtekben.

[14.] Jelen találmány további célja, hogy használja és kiterjessze a fág bemutatási technológiát, mint az ilyen peptidek és polipeptidek azonosításának egyik lehetséges segédeszközét.

[15.] Ezen kívül jelen találmány célja az is, hogy ilyen peptideket és polipeptideket azonosítson immun-keresztreakcióval.

[16.] Még további célja jelen találmánynak a humán eredetű peptidek és polipeptidek azonosítása.



- [17.] Jelen találmány még további célja az ilyen peptidek és polipeptidek izolálása is, amelyek elleni antigének nem szükségszerűen immunogének.
- [18.] Szintén további célja jelen találmánynak, hogy olyan peptideket és polipeptideket szolgáltatson, amelyek lassítják, vagy gyógyítják a rákos megbetegedéseket, elsősorban a vérhez köthető rák fajtákat, ide értve a leukémiákat és lymphomákat.
- [19.] Valamint további célja jelen találmánynak az is, hogy a rákos sejtek helyi targetálására peptideket és polipeptideket szolgáltatson, egyedül, vagy asszociálva vagy kötve egy rákellenes ágenshez és/vagy egy diagnosztikus jelhez vagy markerhez.
- [20.] További célja jelen találmánynak, hogy módszert szolgáltatson a kívánt ligandumokkal szemben egy targetáló ágens előállítására.
- [21.] Még további célja jelen találmánynak, hogy azonosítson olyan specifikus motívumokat, amelyek túl-expresszált sejt markerek felismerésére szolgálnak a rosszindulatú fázisban és amelyek felhasználhatók egy targetáló vagy diagnosztizáló jel konstrukciójában egy rákellenes ágens számára.
- [22.] Jelen találmány még további célja egy készítmény szolgáltatása, amely hatékony mennyiségét tartalmazza olyan peptideknek, polipeptideknek vagy motívumoknak, amelyek asszociálva, vagy kapcsolva vannak egy rákellenes ágenshez, vagy diagnosztikus jelhez vagy markerhez.
- [23.] Kimutatták, hogy az scFv molekulák bejutnak a szövetekbe, és gyorsabban kiürülnek a vérből, mint a teljes méretű antitestek, mert kisebb méretűek. Adams, G.P., et al., Br. J. Cancer 77, 1405-1412 (1988); Hudson, P.J., Curr. Opin. Immunol. 11(5), 548-557 (1999); Wu, A.M., et al., Tumor Targeting 4, 47 (1999). Ezért az scFv-ket gyakran használják radioaktív jelölést és képalkotó eljárásokat alkalmazó tumor diagnosztikus célokra, hogy elérjék a radioaktív jel testből való gyorsabb kiürülését. Néhány rákot célzó scFv multimerek napjainkban jutottak túl a preklinikai in vivo stabilitási és hatékonysági teszteken. Adams, G.P., et al., Br. J. Cancer 77, 1405-1412 (1988); Wu, A.M., et al., Tumor Targeting 4, 47 (1999).
- [24.] Az egyláncú Fv fragmensek (scFv) egy polipeptid kötőmolekulához mereven kötött antitest nehéz láncának (V_H) és könnyű láncának (V_L) variabilis doménjét



tartalmazzák. A kötőmolekula elég hosszú ahhoz, hogy a (V_H) és (V_L) domének egy funkcionális Fv doménné hajtogatódjanak, így lehetővé téve azt, hogy az scFv felismerje és kösse a célelemét, az eredeti antitesthez hasonló, vagy megnőtt affinitással. A leggyakrabban használt kötőmolekulák általában glicin és szerin részeket tartalmaznak, amely biztosítja a flexibilitásukat és proteázok elleni rezisztenciájukat.

[25.] Tipikusan, az scFv monomereket úgy tervezik, hogy a V_H domén C-terminálisát köti a polipeptid kötőmolekula a V_L domén N-terminális maradékához. Emellett egy inverz orientációjú konstrukció is használatos: a V_L domén C-terminálisát kötik a V_H domén N-terminálisához a kötőmolekulán keresztül. Power, B., et al., *J. Immun. Meth.* 242, 193-204 (2000). A polipeptid kötőmolekula többnyire 12 aminosav hosszúságú. Ha a kötőmolekula hosszát lecsökkentjük 3-12 aminosavra, akkor az scFv-k nem képesek egy funkcionális Fv doménné behajtogatódni, hanem ehelyett inkább egy másik scFv-hez asszociálódnak, dimert alkotva. Ha a kötőmolekula hosszát tovább rövidítjük 3 aminosavnál kevesebbre, akkor a az scFv molekulák trimerré vagy tetramerré állnak össze, a kötőmolekula hosszától, az Fv domének összetételétől, valamint orientációjától függően. B.E. Powers, P.J. Hudson, *J. Immun. Meth.* 242 (2000) 193-194.

[26.] Napjainkban fedezték fel, hogy a multivalens antitest fragmentumok, mint az scFv dimerek, trimerek és tetramerek gyakran magasabb látszólagos affinitást mutatnak a célelemekhez, mint az eredeti antitest. Ez a magasabb affinitás sok előnnyel jár, ide értve a tumorokat célzó alkalmazások ideális farmakokinetikáját.

[27.] E multivalens formák nagyobb kötési affinitása ezért igen kívánatos a diagnosztika és terápia során. Például, az scFv-t használni lehet, mint egy blokkoló ágens, amely a célzott receptorhoz köt, és így blokkolja a "természetes" ligand kötődését. Ilyen esetekben igen előnyös, ha van egy nagy affinitású asszociáció az scFv és a receptor közt, amely csökkenti a disszociáció esélyeit, amely megengedné a természetes ligandum a targethez való nemkívánatos kötődését. Továbbá, ez a nagy affinitás különösen kritikus, amikor a target receptorok részt vesznek az adhézióban és a vándorlásban, vagy amikor a target receptorok olyan sejteken találhatóak, amelyek erős áramlást mutató területeken vannak, mint például a vérlemezkék.

[28.] Ezért a találmány célja az Y1 és Y17 scFv multivalens formái. E multivalens formák közé tartoznak, de nem csak ezek, a dimerek, trimerek és tetramerek, melyekre diatestek-, triatestek- és tetratestekként is hivatkozunk, ebben a sorrendben.

A TALÁL MÁNY ÖSSZEFOGLALÁSA

[29.] Jelen találmány olyan peptidek és polipeptidek azonosítására szolgál, amik szelektíven és/vagy specifikusan kötődnek target sejtekhez, különösképpen a vérhez kötött rákos sejtekhez, valamint ezek konstrukcióját, felhasználásukat önmagukban, vagy asszociációban vagy kombinálva, konjugálva vagy fúzionálva egy vagy több gyógyszerhatóanyaghoz, ismerteti.

[30.] Jelen találmány egyik megvalósítási módjában egy peptidet vagy polipeptidet ad, amely tartalmaz egy Fv molekulát, ennek konstrukcióját, vagy ezek bármelyikének egy fragmentjét, vagy egy fragment konstrukcióját, amelyek felerősített kötődési tulajdonságokkal rendelkeznek, és így szelektíven és/vagy specifikusan kötődnek egy célsejtnek a többi sejt ellenében, és amelyekben a kötődési szelektivitást vagy specificitást elsődlegesen egy első hypervariábilis régió határozza meg, és amelyekben az Fv molekula egy egyláncú Fv ("scFv"), vagy egy diszulfid Fv ("dsFv"), vagy adott esetben van egy vagy több tag-je.

[31.] Jelen találmány további megvalósítási módjában egy peptidet vagy polipeptidet ad, amely tartalmaz egy Fv molekulát, ennek konstrukcióját, vagy ezek bármelyikének egy fragmentjét, vagy egy fragment konstrukcióját, amelyek felerősített kötődési tulajdonságokkal rendelkeznek, és így szelektíven és/vagy specifikusan kötődnek egy célsejtnek a többi sejt ellenében, és amelyekben az Fv molekula tartalmaz egy első láncota kötődési szelektivitást vagy specificitást elsődlegesen egy első hypervariábilis régió határozza meg, és amelyekben az Fv molekula egy egyláncú Fv ("scFv"), vagy egy diszulfid Fv ("dsFv"), vagy adott esetben van egy vagy több tag-je.

[32.] Jelen találmány egy további megvalósítási módja szerint egy peptidet vagy polipeptidet ad, amely tartalmaz egy Fv molekulát, ennek konstrukcióját, vagy ezek bármelyikének egy fragmentjét, vagy egy fragment konstrukcióját, amelyek felerősített

kötődési tulajdonságokkal rendelkeznek, és így szelektíven és/vagy specifikusan kötődnek egy célsejthez a többi sejt ellenében, és amelyekben az Fv molekula tartalmaz egy első láncot, amelynek van egy első, második és harmadik hipervariábilis régiója és egy második láncot, amelynek van egy első, második és eharmadik hipervariábilis régiója, és ahol az első lánc egyik hipervariábilis régiójának szekvenciáját az SEQ ID NO:8-24-t tartalmazó csoportból választjuk ki, és amelyben a második lánc egyik hipervariábilis régiójának szekvenciáját a SEQ ID NO:1-6 és 125-202-t tartalmazó csoportból választjuk ki, és amelyekben az első, második és harmadik hipervariábilis régiók egy CDR3, CDR2 és CDR1 régió, ebben a sorrendben, és amelyben az Fv molekula egy scFv vagy dsFv, és adott esetben tartalmazhat egy vagy több tag-et.

[33.] A találmány egy további megvalósítási módjában,

- (a) mind az első és mind a második lánc első hipervariábilis régióját az SEQ ID NO:8-24-t tartalmazó csoportból választjuk ki,
- (b) az első és a második lánc első hipervariábilis régiói azonosak, és a SEQ ID NO:8-24)-t tartalmazó csoportból választjuk ki,
- (c) az első lánc első hipervariábilis régióját a SEQ ID NO:8-24-t tartalmazó csoportból választjuk ki, és a második lánc első hipervariábilis régiója az SEQ ID NO:1-6 és 125-202-t tartalmazó csoportból választjuk ki, vagy
- (d) az első lánc első hipervariábilis régióját az SEQ ID NO:1-6 és 125-202-t tartalmazó csoportból választjuk ki, és a második lánc első hipervariábilis régióját a SEQ ID NO:8-24-t tartalmazó csoportból választjuk ki.

[34.] A találmány egy még további megvalósítási módja szerint egy peptidet vagy polipeptidet ad, amely tartalmaz egy Fv molekulát, ennek konstrukcióját, vagy ezek bármelyikének egy fragmentjét, vagy egy fragment konstrukcióját, ami egy, az első vagy második fázisában levő első sejten található ismeretlen ligandhoz kötődik, és amelynél a kötődés hatékony a második fázisban, de nem feltétlenül az az első fázisban, és immunkereszt-kötés folytán specifikusan vagy szelektíven kötődik egy második sejten lévő ligandumhoz, és amelyben az Fv molekula scFv vagy dsFv, és adott esetben tartalmazhat egy vagy több tag-et is.



[35.] A találmány egy még további megvalósítási módja szerint egy módszert ad egy célzó (targetáló) molekula azonosítására, amely első vagy második sejteken levő ismeretlen immun-kereszt kötő helyekhez kötődik, és amely tartalmaz:

- (a) egy vagy több biopanning lépést tartalmaz, amelyet az első célsejten valósítunk meg, egy második, de nem az első fázisban, amely lényegében hozzáférhetővé tesz vagy felfed egy kötőhelyet, amely tartalmaz egy ismeretlen ligandumot, és így létrehozuk a felismerő molekulák egy első populációját;
- (b) további biopanning és/vagy szelekciós lépéseket, amelyek az (a) lépésből származó felismerő molekulakészletből indulnak, és amelyeket egy második sejten valósítunk meg, amik felfednek egy kötőhelyet, amely tartalmaz egy ismeretlen ligandumot, ami immun-kereszt kötő reaktivitást mutat az első sejt ismeretlen ligandumjához, és így létrehozuk a felismerő molekulák egy második populációját;
- (c) a (b) lépésből származó felismerő molekulák második populációjának amplifikálása és tisztítása; és
- (d) konstrukció a (c) lépés peptidjeinek és polipeptidjeinek tisztított felismerő molekuláinak felismerő helyeiből, amely tartalmaz egy targetáló molekulát, ami szelektív és/vagy specifikus a második sejten lévő ismeretlen ligandumokra.

[36.] A találmány egy még további megvalósítási módja szolgáltat egy kötő motívumot, amely tartalmazza az R_1 -X Phe Pro- R_2 aminosav szekvenciát, ahol R_1 és R_2 mindegyike 0-15 aminosavmaradékot tartalmaz, és ahol X Arg, vagy Gly vagy Lys.

[37.] Jelen találmány egy még további megvalósítási módja szerint egy módszert ad a targetáló ágens előállítására, amely a következő lépéseket tartalmazza:

- a) egy vagy több targetáló molekula izolálása és szelektálása, amelyek tartalmazznak primer felismerőhelyet, egy célsejtre közvetlenül irányuló biopanning procedura, vagy egy első célsejtre közvetve irányuló biopanning procedura, a második, de nem első fázisban, és ezt követően egy második célsejtre közvetlenül irányuló biopanning procedura révén, egy vagy több úgynevezett targetáló molekula előállítása céljából;
- b) az egy vagy több targetáló molekula amplifikálása, tisztítása és azonosítása;



c) targetáló ágens konstrukciója egy vagy több targetáló molekulából, vagy azok felismerőhelyei alapján;

ahol a targetáló ágens lehet egy peptid, polipeptid, antitest, antitest fragment, vagy ezek multimerje.

[38.] Jelen találmány további megvalósítási módja szerint ad egy peptidet vagy polipeptidet, amelyn a következő a szerkezetet, vagy formulát tartalmazza:

A - X - B

ahol X egy 3-30 aminosavat tartalmazó hipervariábilis CDR3 régió; A és B egymástól függetlenül lehetnek 1-1000 aminosav hosszúságú aminosavláncok, ahol A az amino vég, és B a karboxi vég.

A RAJZOK RÖVID LEÍRÁSA

[39.] A találmány részletesebben példákon keresztül ismertetjük, de természetesen korlátozás nélkül, hivatkozva a lentebb leírt kísérő rajzokra, ahol:

[40.] **1. ábra** fixált vérlemezkékhez kötött fág klónokat ábrázol, EIA assay alapján. Az adatokat 405 nm-nél történő abszorbancia függvényében ábrázoltuk.

[41.] **2a, 2b és 2c ábrák** mutatják az egymagvú sejt minták kötődését scFv molekulákhoz, FACS analízis alapján, a minták három AML páciensből származnak. A sejtek fluoreszcenciáját mutatjuk, amelyekhez a FITC- jelölt tesztelt minták kötődnek (kontroll scFv és scFv Y1 klónok).

[42.] **3. ábra** mutatja az Y-I kötődését vérlemezkékhez (3a) és monocitákhoz (3b), amelyeken Ficoll-panningt alkalmaztunk, FACS analízis alapján. A sejtek fluoreszcenciáját mutatjuk, amelyekhez a FITC- jelölt tesztelt minták kötődnek (kontroll scFv és scFv Y1 klónok).

[43.] **4. ábra** mutatja a FITC-jelölt scFv Y1 klón kötődését a magzatszínórból származó vér CD34+ őssejtjeihez. FL3-H csatornába zárt CD34+ sejteket FL1-H csatornában analizáltuk arra nézve, hogy hogyan kötődnek FITC-jelölt negatív kontroll scFv (4a ábra) vagy FITC-jelölt scFv Y1 klónokhoz (4b ábra). A 4c ábra a 4b ábrán látható



FITC-jelölt scFv Y1 klón FSC és SSC dot plot analízisét mutatja. A 4b és 4c ábrák bekarikázott területe jelöli ki a CD34+ sejtek azon alpopuációját, amelyek kötődnek az scFv Y1 klónhoz

[44.] **5. ábra:** FACS analízisei két pre-B-ALL sejtjes betegségben szenvedő két páciens mintáiból: az egyik egy gyerekből származik (5a, c, e), a másik felnőttből (5b, d, f). Egy dupla festési eljárást alkalmaztunk, felhasználva vagy kereskedelmi forgalomban kapható PE-jelölt CD19-et (normál perifériás B-sejtek markere, 5a, 5c ábrák), vagy PE-jelölt CD34-et (őssejtek markere, 5d ábra), együtt egy FITC-jelölt negatív kontroll scFv (5a, 5b), vagy egy FITC-jelölt Y-I scFv molekulát (5c, 5d). Az 5b ábra egy dupla negatív kontrollt mutat. A FITC-jelölt mintákhoz (scFv Y1 klón) kötött sejtek fluoreszcenciáját (x tengely) ábrázoltuk a negatív kontroll festés mintázatához viszonyítva (5e, 5f).

[45.] **6. ábra:** Ezen az ábrán láthatók egy kötődést összehasonlító tanulmány eredményei, amelyben Jurkat sejteket használtunk. A Jurkat sejtek FITC-jelölt Y-I scFv monomerekhez, dimerekhez, trimerekhez való kötődésének FACS analízise, együtt a negatív kontrollal.

[46.] **7. ábra:** Ez az ábra mutatja az IgG- Y-I és scFv-Y1 kötődését összehasonlító tanulmány eredményeit. Egy dupla festési eljárást alkalmaztunk a teljes méretű IgG-YI a teljes méretű scFv-Y1-hez való kötődésének összehasonlítására. Öt nanogramm IgG-YI-t használtunk az FACS analízishez, RAJI-sejteken (YI-negatív sejtek; 7a ábra) és Jurkat-sejteken (Y1-pozitív sejtek, 7b ábra). A kimutatáshoz PE-jelölt kecske anti-humán IgG-t használtunk. Az scFv-YI -I kötődéséhez ~1µg-ot (200x) használtunk, melyet egy PE-jelölt nyúl antiscFv antitesttel elvégzett festés és egy FACS analízis követett (7c ábra).

[47.] **8. ábra:** Ez az ábra mutatja az YI dimer, az Y1 scFv (CONY1) és az Y1 IgG kötődésének összehasonlítását.

[48.] **9. ábra:** Ezen az ábrán látható a kötődés összehasonlítása az Y1 szulfid hiddal összekötött dimerje és az Y1 scFv (CONY1) között.

[49.] **10. ábra:** Az Y1-cys-kak molekula Superdex 75 profiljának grafikonja.



[50.] **11. ábra:** Ez az ábra mutatja a dimerek méretét a monomerekhez hasonlítva redukáló és nem redukáló környezetben.

[51.] **12. ábra:** Egy ELISA assay eredményeit mutatja.

[52.] **13. ábra:** Az anti-GPIIb α antitestek epitópjainak ábrája.

[53.] **14. ábra:** Az SEQ ID NO: aminosav ábrája.

A TALÁLMÁNY RÉSZLETES LEÍRÁSA

[54.] A specificitást itt olyan felismerésként határoztuk meg, amely szerint a találmány szerinti peptid vagy polipeptid egy vagy több doménje mutat a target ligand irányába, és ahogyan ezt követően hozzá kötődik.

[55.] A szelektivitás alatt azt értjük, amikor a targetáló molekula képes kiválasztani és kötni egy adott sejtípust, vagy adott fázisú sejtet egy kevert sejtípusokból vagy különböző fázisú sejtekből álló keverékből, ahol minden sejt és minden fázisú sejt specifikus lehet a targetáló molekulára.

[56.] Konzervatív aminosav helyettesítés alatt azt értjük, amikor egy peptid, polipeptid vagy fehérje, vagy ezek fragmentjeinek aminosav-összetételén egy vagy két aminosavat cserélünk ki. Többnyire hasonló általános tulajdonságokkal rendelkező aminosavakkal helyettesítünk (pl. savas, bázikus, aromás, hasonló méret, pozitív vagy negatív töltésű, poláris, apoláris) úgy, hogy a szubsztitúció a peptid, polipeptid, vagy fehérje tulajdonságait, vagy aktivitását lényegesen nem változtatja meg (mint pl. a töltése, izoelektromos pontja, affinitása, kötési képességei, konformációja, oldhatósága). Ilyen konzervatív aminosavcserek lehetségesek a következő aminosavcsoportok között:

- (i) glicin (G), alanin (A), valin (V), leucin (L) és izoleucin (I)
- (ii) aszparaginsav (D) és glutaminsav (E)
- (iii) alanin (A), szerin (S) és threonin (T)
- (iv) hisztidin (H), lizin (K) és arginin (R)
- (v) aszparagin (N) és glutamin (Q)



(vi) fenilalanin (F), tirozin (Y) és triptofán (W)

[57.] Konzervatív aminosavcseréket lehet végezni a molekula specifikus és/vagy szelektív kötési tulajdonságaiért elsődlegesen felelős hipervariábilis régióban, vagy mellette, valamint a molekula más részein, mint például a variábilis nehéz lánc kazetta. Ezen felül, vagy ehelyett, a módosításokat úgy is létre lehet hozni, hogy egy teljes méretű antitestet, dimert, trimert, tertamert, ún. minitesteket vagy mikrotesteket alkotó molekulákat rekonstruálunk.

[58.] A specifikációban és az igénypontokban használt Fv molekulát úgy definiáltuk, mint egy humán antitest nehéz láncának variábilis régiójából és egy humán antitest könnyű láncának variábilis régiójából felépülő molekulát, amely lehet ugyanaz, vagy különböző, és amelyben a nehéz lánc variábilis régiója a könnyű lánc variábilis régiójával kapcsolásban van, hozzá van kötődve, kovalensen kapcsolva, fuzionálva, vagy asszociálva.

[59.] Az Fv molekula fragmentjét az eredeti Fv molekulánál kisebb molekulaként határoztuk meg, amely azonban megtartja a szelektív és/vagy specifikus kötési tulajdonságait, amelyekkel az eredeti Fv molekula rendelkezik. Néhány példa, a lista teljességi igény nélkül: (1) egy minitest, amely az Fv molekulának, csak a nehéz láncának egy fragmentjét tartalmazza, (2) egy mikrotest, amely az antitest nehéz lánc variábilis régiójának egy kis egységből álló töredékét tartalmazza (PCT/IL99/00581 számú nemzetközi szabadalmi bejelentés), (3) hasonló testek, , amelyek a könnyű lánc fragmentjét tartalmazzák, és (4) hasonló testek, amelyek az antitest könnyű lánc variábilis régiójának egy funkcionális egységét tartalmazzák.

[60.] A rákellenes ágens egy olyan ágens, amelynek rákellenes aktivitása van, vagyis olyan aktivitása, amely gátolja a rákos sejtek vagy éretlen rák-előalakok növekedését vagy differenciációját. Jelen találmányban a rákellenes ágens egy olyan ágenst is jelent, amelynek anti-angiogenetikus aktivitása megelőzi, gátolja, késlelteti, vagy megállítja a rákos sejtek és a rák-előalakok adhézióját vagy áttételeződését.

[61.] A rákos sejt növekedésének gátlását itt úgy definiáltuk, mint (i) rákos vagy metasztatikus növekedés megelőzése, (ii) a rákos vagy metasztatikus növekedés lassulása, (iii) a rákos sejt illetve a metasztázis folyamatának teljes kivédése, ahol a sejt életben is



marad, vagy (iv) a rákos sejtek elpusztítása. Specifikusabban, a rákos növekedés gátlása különösen jól használható a vérhez kötött rákos megbetegedések esetén, mint pl. az AML, többszörös myeloma, vagy krónikus limfatikus leukémia.

[62.] A fagemid egy olyan fág részecske, amely DNS plazmidot szállít. Mivel plazmid DNS-t szállít, a fagemid részecskének nincs elég helye, hogy a fág teljes genomját tartalmazza. A fág genomból hiányzó komponens a fág részecskék csomagolásához szükséges információt tartalmazza. A fág terjesztéséhez tehát nélkülözhetetlen a kívánt fág részecskék egy segítő (helper) fág törzssel való közös kultúrában való növesztése, amely pótolni tudja a hiányzó csomagolási információt.

[63.] A polipeptideknél használt, és jelen találmányban is hasonlóképpen definiált kazetta egy adott, egymást követő aminosav szekvenciára utal, amely keretként szolgál, egy egységnek tekintendő, és mint ilyen, így sokszorozható. Az aminosavakat lehet helyettesíteni, be lehet juttatni újakat, illetve ki lehet venni belőlük, vagy hozzá lehet kapcsolni az egyik, vagy mindkét véghez. Hasonló módon, az aminosav darabokat is lehet helyettesíteni, be lehet juttatni újakat, illetve ki lehet vágni belőlük, vagy hozzá lehet kapcsolni az egyik, vagy mindkét véghez.

[64.] Az immunglobulin (Ig) molekula az öt osztály bármelyikét jelentheti, vagyis lehet IgG, IgA, IgD, IgE, vagy IgM. Az IgG osztályban, a teljesség igénye nélkül, több alosztályt különböztetünk meg, mint pl. IgG1, IgG2, IgG3 és IgG4.

[65.] A gyógyszerészeti összetétel olyan formulálásra utal, amely tartalmazza a jelen találmány egyik peptidjét vagy polipeptidjét, és egy gyógyszerészetileg elfogadható hordozót, vivőt, vagy hígító anyagot.

[66.] A gyógyszerhatóanyag, egy olyan ágens, amely hatékony a profilaktikus kezelésben vagy adott emlősállatok diagnózisakor, ide értve, de nem kizárólag, az embert, szarvasmarhát, lovakat, sertésféléket, rágcsálókat, macskaféléket, kutyaféléket, vagy bármely már melegvérű állatot. A gyógyszerhatóanyagot egy olyan csoportból választjuk ki, amelybe beletartoznak a radioizotópok, toxinok, oligonukleotidok, rekombináns fehérjék, antitest fragmentek és rákelleni ágensek. Ilyen gyógyszerhatóanyagok például, de nem kizárólag, a vírusellenes hatóanyagok, mint például a acyclovir, ganciclovir és zidovudine; a trombózis/érszűkület elleni ágensek, mint például a cilostazol, nátrium-



dalteparin, nátrium-reviparin, és aszpirin; a gyulladásgátló ágensek, mint például a zaltoprofen, pranoprofen, droxicam, acetil-szalicil 17, diclofenac, ibuprofen, dexibuprofen, sulindac, naproxen, amtolmetin, celecoxib, indomethacin, rofecoxib, és nimesulid; az autoimmun betegségek elleni hatóanyagok, mint például a leflunomide, denileukin difitox, subreum, WinRho SDF, defibrotide, és ciklofoszfamid; valamint az adhézió/aggregáció-gátló ágensek, mint például a limaprost, clorcromene, és hyaluronsav.

[67.] A leukémia elleni hatóanyag olyan ágens, amelynek leukémia ellenes aktivitása van. Például olyan ágensek tartoznak ide, amelyek gátolják vagy megállítják a leukaemiás sejtek, vagy a leukaemiás elő-alakok növekedését, ágensek, amelyek elpusztítják a leukaemiás sejteket és elő-alakokat, ágensek, amelyek növelik a leukaemiás sejtek és elő-alakok érzékenységet más leukémia elleni ágensekkel szemben, és olyan ágensek, amelyek gátolják a leukaemiás sejtek metasztázisát. Jelen találmányban leukémia elleni ágensnek tekintjük azokat a ágenseket is, amelyeknek antiangiogenetikus aktivitása van, amely megelőzi, gátolja, késlelteti vagy megállítja a tumorok vaszkularizációját.

[68.] Az "affinitás" kifejezést egy receptor (vagyis egy antitesten levő kötőhely) és egy ligand (vagyis antigén determináns) közötti kötési erősség (asszociációs konstans) értelemben használjuk jelen találmány leírásakor. Az összes nem kovalens kötés együttes erőssége egy antitesten levő antigén kötőhely és egy epitóp között jelenti az antitest affinitását az adott epitóphoz. Az alacsony affinitású antitestek az antigént gyengén kötik, és könnyen disszociálnak, míg a magas affinitású antitestek erősebben kötik az antigént, és tovább maradnak kötve. Az "aviditás" kifejezés (avidity) különbözik az affinitástól, mivel ez utóbbi az antigén-antitest interakció valenciáját tükrözi.

[69.] Az antitest-antigén interakció specificitása: Ugyan az antigén-antitest reakció specifikus, mégis, egyes esetekben egy antigén által kötött antitest keresztreakálhat egy még nem kötött antigénnel. Az ilyen keresztreakciók akkor fordulnak elő, amikor két különböző antigénnek hasonló vagy homológ epitópja, vagy hurkoló régiója van, vagy ha egy adott epitópra specifikus antitest egy másik, nem rokon epitóphoz köt, mely hasonló kémiai tulajdonságokkal bír.

[70.] Blaszt sejtek azok a sejt fejlődésének éretlen állapotában levő sejtek, amelyeknek magasabb a citoplazma/sejtmag aránya, amint egy nyugalomban levő sejtnek.



[71.] A vérlemezkék a megakariociták lemezszerű citoplazma fragmentumai, amelyek a csontvelő szinuszaiiban képződnek, és a perifériás véráramban keringenek. A vérlemezkéknek több fiziológiai funkciója is van, mint például a véralvadásban játszott elsődleges szerepe. A vérlemezkének a közepén granulumok vannak, a szélén pedig világos színű citoplazma, de nincs körülhatárolható sejtmagja.

[72.] Az “epitóp” kifejezést itt olyan antigén determinánsként, vagy antigén helyként használjuk, amely interakcióba lép az antitesttel, az antitest fragmentummal, antitest komplex-szel, vagy az olyan komplexekkel, amelyben ezek egy kötő fragmentje van, illetve T-sejtekkel is interakcióba lép. Az epitóp kifejezés itt a ligandum, domén és kötő régió kifejezések szinonimájaként is használható.

[73.] Egy adott sejt expresszálhat a felszínén olyan fehérjét, amelynek van egy kötőhelye (vagy epitópja) egy adott antitesthez, de ez a kötőhely rejtett formában is létezhet (vagyis sztérikusan elzárt helyen, vagy blokkolva, vagy úgy, hogy hiányoznak az antigént kötő tulajdonságai) a sejt egyes fázisaiban, amelyet első fázisnak nevezünk (stage I). Az első fázis lehet például normál, egészséges, nem kóros állapot. Amikor az epitóp rejtett formában létezik, az antitest nem ismeri fel, vagyis az antitest nem kötődik ehhez az epitóphoz, vagy ehhez az első fázisú sejthez. Ugyanakkor, az epitóp később feltáródhat például úgy, hogy saját maga módosul, vagy nem lesz már blokkolva, mert a mellette levő, vagy asszociált molekulák megváltoznak, vagy mert maga a régió megy át egy konformációs változáson. Ilyen változások lehetnek a hajtogatódás, poszt-transzlációs módosulások, a foszfolipidek hozzákötésében, szulfidálásban, glikozilációban való változások, és ehhez hasonlóak. Ilyen módosulások akkor történhetnek, amikor a sejt egy másik fázisba lép, amelyet második fázisnak nevezhetünk (stage II). Ilyen második fázisok közé tartoznak az aktiváció, proliferáció, transzformáció, vagy malignus állapot. A módosulást követően az epitóp szabaddá válhat, és az antitest kötheti.

[74.] Az “Fab fragment” kifejezést egy monovalens antigénkötő fragment- vagy immunglobulinként használjuk. Az Fab fragment egy könnyű láncból, és a nehéz lánc egy darabjából áll.

[75.] A poliklonális antitestek egy immunválasz termékei, és különböző B-limfociták termelik őket. A monoklonális antitestek egyetlen sejttől származnak.



[76.] Az agglutináció alatt azt a folyamatot értjük, amely során szuszpendált baktériumok, sejtek, lemezkék, vagy más, hasonló méretű részecskék összetapadnak, és egy csomót alkotnak. Ez a folyamat hasonló a precipitáció (kicsapódás) folyamatához, de a részecskék nagyobbak, és inkább szuszpenzióban vannak, mintsem oldatban.

[77.] Az aggregáció kifejezés a vérlemezkék, thrombin és kollagén in vitro indukált kicsapódását jelenti, mint része annak a folyamatnak, amely a thrombus vagy hemosztatikus dugó kialakulásához vezet.

[78.] A génexpressziós mintázat vizsgálható úgy, hogy a különböző körülmények között, adott időben és különböző szövetekben, stb. termelt géntermékek mennyiségét analizáljuk. Egy gén akkor túltermeltetett, amikor a géntermék mennyisége nagyobb a normál kontrollénál, vagyis a nem kóros kontrollénál.

[79.] A promoter a DNS azon régiója, ahova az RNS polimeráz köt és ahol elkezdi a transzkripciót.

[80.] Az antitestek, vagy immunglobulinok olyan fehérjék, amelyek kötnek az antigénhez. Négy polipeptid lánc egységből állnak (két nehéz és két könnyű lánc), amelyeket diszulfid hidak kötnek össze. Minden láncnak van egy konstans és egy variábilis régiója. Öt osztályba sorolhatók, IgG, IgM, IgA, IgD, és IgE, a nehéz láncuktól függően. B-limfociták termelik őket, és adott idegen antigén determinánsokat ismernek fel, és elősegítik annak az antigénnek az eltávolítását a szervezetből.

[81.] Antitesteket sokféle formában lehet használni, mint például antitest-komplex formában. Az "antitest-komplex", vagy "antitest-komplexek" kifejezések alatt olyan komplexet értünk, amelyben egy vagy több antitest egy másik antitesttel, vagy antitest fragmentummal, vagy fragmentumokkal, vagy kettő vagy több antitest fragmentumból álló komplex-szel kapcsolódik.

[82.] Az F(ab')₂ fragment egy bivalens antigénkötő fragmentje egy pepszines emésztés során kapott immunglobulinnak. Mind a két könnyű láncot, és mind a két nehéz lánc egy darabját tartalmazza.

[83.] Az Fc fragment egy antigént nem kötő része az immunglobulinoknak. A nehéz láncok karboxi-végét, valamint az Fc receptor kötőhelyét tartalmazza.



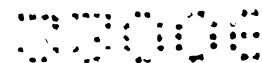
- [84.] Az Fd fragment az immunglobulin nehéz láncának a variábilis és az első konstans régióját tartalmazza.
- [85.] Szennyező fehérjék azok a fehérjék, amelyek nem specifikusan szelektáltak erre, és amelyek jelen lehetnek egy mintában.
- [86.] Peptid-utánzók (peptide-mimetics) azok a kis molekulák, peptidek, polipeptidek, lipidek, poliszacharidok, vagy ezek konjugátumai, amelyeknek ugyanaz a funkcionális hatásuk vagy aktivitásuk, vagy bármely más entitásuk, mint egy antitestnek.
- [87.] Fagemidok (phagemids) azok a plazmid vektorok, amelyeket úgy terveztek, hogy legyen bennük fonalas fágból származó (pl M13 vagy fd) replikációs kezdőpont.
- [88.] A betegségek széles spektruma létezik, amelyben részt vesznek kóros, módosult, vagy más módon megváltozott sejtek, amelyek sejtspecifikus és/vagy betegség-specifikus ligandumokat expresszálnak a felszínükön. Ezeket a ligandumokat fel lehet használni egyes specifikus betegségek felismerésére, szelektálására, diagnózisára és kezelésére az egyes sejtek felismerésén, szelektálásán, diagnózisán, kezelésén keresztül. Jelen találmány olyan peptideket vagy polipeptideket szolgáltat, amelyek tartalmaznak egy Fv molekulát, annak konstrukcióját, egy fragmenjét, a fragment konstrukcióját, vagy egy konstrukció fragmentjét, melyek mind felerősített kötési tulajdonságokkal bírnak. Ezek a kötési tulajdonságok segítik elő, hogy a peptid, vagy polipeptid molekula szelektíven és/vagy specifikusan kötődjön egy target sejthez, a többi set ellenében, a kötési specificitást és/vagy szelektivitást elsődlegesen az első hipervariábilis régió határozza meg. Az Fv molekula lehet scFv vagy dsFv.
- [89.] A fentebb leírt Fv molekula felhasználható arra, hogy egy kóros sejtet célozzon. Kóros sejt lehet, például, egy rákos sejt. Néhány példa, de nem kizárólag, a specifikus targetáló kezeléssel és/vagy diagnózissal megközelíthető rákfajtákra: carcinoma, sarcoma, leukémia, adenoma, lymphoma, myeloma, blastoma, seminoma, és melanoma. Leukémia, lymphoma és myeloma, olyan rákos megbetegedések, amelyek csontvelő és limfatikus szövet eredetűek, és egy nem kontrollált sejtnövekedéssel járnak.
- [90.] A betegségek, elsősorban a rák diagnosztikájában és kezelésében új megközelítéseket fejlesztettek ki az elmúlt években. Ezek közé tartozik a tumor targetáló



megközelítés, amely olyan targetáló molekulákat alkalmaz, amelyeket különféle módokon lehet szelektálni és termelni. A lehetséges targetáló molekulák azonosításának egyik megközelítése a fág display. A fág display egy olyan technika, mely során peptideket, polipeptideket, antitesteket vagy fehérjéket generálnak és szelektálnak az alapján, hogy milyen az expressziójuk és a display a fonalas bakterifágok felszínén egy fág köpenyfehérjével való fúzió során megjelennek, a DNS-sel együtt, amely a felszínen megfigyelhető fehérjét kódolja, és amely egy fág virionban található meg. Az scFv, amelyet a phage display technikával lehet előállítani, az antitest könnyű és nehéz láncának variábilis doménjét is tartalmazza, amelyeket egy hajlékony aminosav polipeptid spacer köt össze (Nissim *et al.*, *EMBO J*, 13, 692-698 (1994)).

[91.] A phage display library (fág peptid/antitest library-rnak, phage library-nak vagy peptid/antitest library-nak is nevezik) a fágok nagy populációját tartalmazza (általában $10^8 - 10^9$), minden fág részecske displaying egy különböző peptid vagy polipeptid szekvenciát. Ezek a peptid vagy polipeptid fragmentumok különböző hosszúságúak lehetnek. Az itt található peptidek vagy polipeptidek származhatnak, de nem feltétlenül, humán antitestek nehéz vagy könnyű láncából.

[92.] Jelen találmányban a fág bemutatási technika segítségével előállított scFv könyvtárát használtunk a targetáló molekulák megszerzéséhez és előállításához. Flow citometriát, elsősorban fluoreszcencia-aktivált sejt kiválasztást (fluorescence-activated cell sorting, "FACS") használtunk a specifikus fág klónok azonosításához és izolálásához, a peptidhez, vagy polipeptidhez, amely felismeri a target sejtet. Fágok által expresszált scFv antitest fragmentumok jól használhatók a magas affinitású klónok *in vitro* keresésére, dúsitására és szelektálására (5,821,337 számú és 5,720,954 számú USAA-beli szabadalmak). Így tehát, egy ilyen könyvtár igen hathatós eszközt szolgáltat új kutatási és klinikai alkalmazásokhoz, és rengeteg előnyük van a hagyományos megközelítésekkel szemben (Caron *et al.*, *Cancer Supplement*, 73, 1049-1056 (1994)). A könyvtár tartalmazza az antitest molekulák magas diverzitásának lehetőségét (Nissim *et al.*, *EMBO J.*, 692-698 (1994)). Jelen pillanatban stabil humán cDNS már állandó forrásként használható az antitest gyártáshoz (U.S. szabadalom 5,843,439). A molekulafelismerést és –szelekciót nem befolyásolja a kiszemelt target fehérjék *in vivo* immunogenitása.



[93.] Bár a fág-termelte antitestek affinitás-szelekciója igen hasznos módszer az antigén-reagens scFv molekulák nagy könyvtárakból való dúsitására, mégis, több lépést igényel az egyedi klónok izolálása, és a szolubilis scFv molekulák karakterizálása. Az affinitás és/vagy aviditás növelésének érdekében az scFv-k változtathatók, konzervatív aminosav szubsztitúciók megvalósításával, vagy scFv fragmentek vagy az említett fragment konstrukcióinak előállításával.

[94.] Jelen találmány tárgya szerinti scFv, amely specifikus különböző humán sejtekre és szövetekre, asszociálható, fuzionálható, kombinálható, vagy hozzáköthető különböző gyógyszerhatóanyagokhoz és/vagy radioaktív izotópokhoz, oly módon, hogy egy gyógyászatilag hatékony mennyiséget, adott esetben egy gyógyszerészetileg hatékony hordozó molekulával, gyógyszer-peptid készítményeket, fúziókat, vagy konjugátumokat hozunk létre, amelyeknek betegség ellenes és/vagy rák ellenes hatása van, és/vagy e betegségek diagnosztizálására használható.

[95.] A fág klónok izolálhatók és szelektálhatók egy többlépéses procedura során amely biopanning néven ismert. A biopanning során a ligandum variánsokat tartalmazó fágokat (phage display library) együtt inkubáljuk a targettal, eltávolítjuk a nem kötött fágokat egy mosási technikával, és specifikusan eluáljuk a kötött fágokat. Az eluált fágok tetszés szerint amplifikálhatók, mielőtt további kötési ciklusokon visszük keresztül őket, és ez a tetszés szerinti amplifikáció feldúsítja a specifikus szekvenciákat előnyben részesítve azokat a fág klónokat, amelyek antitest fragmentje a lehető legjobban kötik a targetet. Néhány ciklus után az egyes fág klónokat karakterizáljuk, és a fágok által termeltetett peptidok szekvenciáját meghatározzuk úgy, hogy a fág virion megfelelő DNS-ét szekvenáljuk.

[96.] Az ilyen módon kapott scFv-t vezető vegyületnek is nevezik. A vezető vegyületet olyan vegyületként definiáljuk, amelynek a végleges formája tartalmaz egy alap peptidet vagy polipeptidet. A vezető vegyületet lehet módosítani, és/vagy kiterjeszteni, de meg kell tartani az alap peptidet vagy polipeptidet, vagy annak konzervatív módon módosított formáját. Az aminosav-szubsztitúcióval végzett módosításokat például az Fv molekula N-terminusán, vagy a C-terminusán, vagy bármelyik CDR régiójában, vagy azoktól upstream vagy downstream lehet elvégezni. Másfajta módosítások még, de nem kizárólag, a fuzionált fehérjék létrehozása, a gyógyszerekhez vagy toxinokhoz való kötése,

vagy multimerek létrehozása, vagy teljes antitest molekulákká való kiterjesztése is. Az elsődleges komponensek egyik kedvelt kategóriája, akárcsak jelen szabadalomban, egy olyan scFv, amely egy biopanning procedúra végterméke.

[97.] A találmány egyik megvalósítási módja a találmány szerinti peptid vagy polipeptid legalább egy nem természetes módosítására szolgál. A nem természetes módosítás immunogénebbé vagy stabilabbá teheti a peptidet vagy polipeptidet. A nem természetes módosítások közé tartoznak, de nem kizárólag, a peptoid módosítás, semipeptoid módosítás, ciklikus peptid módosítás, az N-, vagy C-terminus módosítása, peptidkötés módosítás, a peptid gerincének módosítása, illetve a maradvány módosítása.

[98.] Az antigén-specifikus fág antitestek szelektálása egy egyedi immobilizált antigén elleni biopanning eljárásan alapszik. Van limitált szelekció, amely egész sejteket használ targetként. Jelen találmányban egész sejteket specifikus antitestek szelektálására használtunk, amelyek a leukaemiás sejtek felszíni determinánsait ismerik fel, ahol a specifikus receptor nem ismert, vagy nem karakterizált. Ez a módszer nem könnyíti meg az antigén koncentráció beállítását vagy a nem kívánt domináns antitest reakcióképesség eltávolítását. Továbbá, előfordulhat, hogy a több scFv kópiát tartalmazó fágok dúsulnak fel, ellentétben a magas affinitású klónokkal. Mindazonáltal, ennek a megközelítésnek az előnyei mégis felbecsülhetetlen eszközt adnak a kezünkbe új humán antitestek izolálására.

[99.] A találmány egyik megvalósítási módja ad egy olyan peptidet vagy polipeptidet, amely tartalmaz egy Fv molekulát, vagy annak egy konstrukcióját, vagy ezek bármelyikének fragmentjét, vagy egy fragment konstrukcióját, ami egy első és második fázisú sejt egy ismeretlen ligandumjához kötődik, ahol a kötődés hatékony a második fázisban, de lényegében nem hatékony az elsőben, és a kereszt-immunreaktivitás folytán specifikusan vagy szelektíven köt a második sejten levő ligandumhoz, és ahol az Fv lehet scFv vagy dsFv és adott esetben tartalmazhat egy vagy több tag-et.

[100.] A találmány egy további megvalósítási módja a találmány szerinti peptidet vagy polipeptidet adja, ahol a peptid vagy polipeptid szelektív és/vagy specifikus kötődését a második sejt ligandumjához, elsődlegesen egy első hipervariábilis régió határozza meg.

[101.] A találmány egy még további megvalósítási módja a találmányszerinti peptidet vagy polipeptidet szolgáltatja, ahol az első hipervariábilis régió egy CDR3 régió,

amelynek aminosav szekvenciáját a SEQ ID Nos:8-24-t tartalmazó csoportból választunk ki.

[102.] A találmány még további megvalósítási módja a találmány szerinti peptidet vagy polipeptidet szolgáltatja, ahol az első hipervariábilis régió egy CDR3 régió, amelynek aminosav szekvenciáját a SEQ ID NOs:8-24-t tartalmazó csoportból választjuk ki, és ahol a kötési specificitást vagy szelektivitást másodlagosan egy második, és/vagy harmadik hipervariábilis régió és/vagy a második és a harmadik hipervariábilis régióhoz viszonyítva upstream és/vagy downstream elhelyezkedő régió befolyásolja, ebben a sorrendben.

[103.] A találmány egy további megvalósítási módja szolgáltatja a második sejt ligandumját, amelyet a találmány peptidje vagy polipeptidje köt. Egy ilyen két-sejt szelekciós protokoll a következőkön alapszik: A megakariociták nagy, többmagvú sejtek, amelyek hematopoietikus csontvelői őssejtekből származnak. A megakariociták citoplazmájából leváló darabok a vérlemezkék, ezek kikerülnek a perifériás véráramba. In vitro, igen sokféle citokin hat közvetlenül az őssejtekre. Például, thrombopoietin megnöveli a vérlemezkék számát azzal, hogy közvetlenül elősegíti az őssejtek megakariocitákká való differenciálódását. Így tehát, ezek a sejtek többféle sejtfelszíni markert expresszálnak, amelyek megtalálhatók az éretlen előalakokon is.

[104.] Malignus vérsejteket (leukémia és lymphoma) úgy jellemezzük, mint éretlen sejteket, amelyek expresszálnak olyan sejtfelszíni fehérjéket, amelyeket normálisan részlegesen differenciált hematopoietikus progenitorokban találtak. Tehát, a vérlemezkék igen vonzó forrásai a kóros vagy malignus vérsejtek által termelt éretlen sejtfelszíni markerek azonosítására. A lentebb részletezett protokollban specifikus sejteket használtunk a biopanning eljárás kezdő lépéseihez, mint amilyenek, de nem kizárólag, az ismeretlen ligandot hordozó vérlemezkék. Ezt követő klónszelekciót hajtottunk végre a kívánt target sejten, amelynek a sejtfelszíni markerei nem ismertek, mint például, de nem kizárólag, az AML sejtek. E módszer szerint, a vérlemezkék biotisztításakor kapott fág klónok jó eszközt adnak az érdekelt kóros vagy malignus vérsejtek ligandjainak felismerésére és kötésére.

[105.] Mint ahogy fentebb is említettük, a target egy izolált szövetből származó sejteket tartalmaz. Az izolált szövet lehet kóros szövet, és még specifikusabban rákos szövet. A rákos szövet származhat bármilyen rosszindulatú formából, mint amilyenek, de

nem kizárólag, a carcinoma, sarcoma, leukemia, adenoma, lymphoma, myeloma, blastoma, seminoma, és melanoma.

[106.] Továbbá, a fent leírt biopanning módszer egy másfajta megközelítési mód, amely egy sejt ligandumját kötő peptid vagy polipeptid izolálásán alapszik, mint az meg van határozva direkt panninggal az adott ligandumon.

[107.] Jelen találmány szolgáltat egy olyan peptidet vagy polipeptidet, amely tartalmaz egy Fv molekulát, vagy annak egy konstrukcióját, vagy ezek bármelyikének egy fragmentjét, vagy egy fragment konstrukcióját. A konstrukció lehet egy multimer (vagyis dimer, trimer, tetramer), vagy egy teljes méretű Ig molekula, a fragment lehet egy minitest, vagy egy mikrotest. Minden konstrukció és fragment felerősített kötési tulajdonságokat mutat, és így szelektíven és/vagy specifikusan köt a target sejthez, a többi sejt ellenében. A kötési szelektivitás és/vagy specificitást elsődlegesen az első hipervariábilis régió határozza meg, és az Fv molekula lehet scFv vagy dsFv, és adott esetben tartalmazhat egy vagy több tag-et.

[108.] A találmány egyik megvalósítási módjában egy tag-et inszertáltunk vagy kapcsoltunk az Fv peptidhez vagy polipeptidhez, hogy elősegítsük azok előállítását és azonosítását és a diagnosztikában való használhatóságát. A tag később eltávolítható a molekuláról. A tag lehet, de nem kizárólag: AU1, AU5, BTag, c-myc, FLAG, Glu-Glu, HA, His6, HSV, HTTPHH, IRS, KT3, Protein C, S-TAG[®], T7, V5, VSV-G (Jarvik and Telmer, *Ann. Rev. Gen.*, 32, 601-618 (1998)), és KAK (lizin-alanin-lizin). A tag legtöbbször c-myc vagy KAK.

[109.] A jelen találmány szerinti Fv molekula két variábilis láncát össze lehet kötni vagy kapcsolni egy 0-20 aminosav hosszú spacer maradékkal. A spacer lehet elágazó, vagy egyenes. Előnyös, ha a kötő molekula 0-15 aminosavmaradék hosszú, a legelőnyösebb, ha a kötő molekula (Gly₄Ser)₃, ahhoz, hogy egy egyláncú Fv molekulát (single chain Fv, "scFv") hozzunk létre. Az scFv megtalálható a fág display könyvtárban.

[110.] Maga az Fv molekula egy első és egy második láncból áll, minden láncon van egy első, egy második és egy harmadik hipervariábilis régió. A könnyű l és nehéz lánccal variábilis régiói közti hipervariábilis hurkokat CDR-nek (Complementary Determining Regions) nevezik. Mind a nehéz, mind a könnyű láncban megkülönböztetünk CDR1, CDR2



és CDR3 régiókat. Ezekről a régiókról gondolják, hogy ezek alkotják az antigénkötő helyet, és specifikusan módosíthatók a felerősített kötési aktivitás elérésének céljából. A leginkább variábilis régió ezek közül a nehéz lánc CDR3 régiója. A CDR3 régió az, amely leginkább hozzáférhető régió az Ig molekula számára, és ahogy itt is mutatjuk, ez az a hely, amely elsődlegesen felelős az észlelt szelektív és/vagy specifikus kötési tulajdonságokért.

[111.] A találmány egyik megvalósítási módja egy olyan peptidet vagy polipeptidet ad, amely tartalmaz egy Fv molekulát, vagy annak egy konstrukcióját, vagy ezek bármelyikének egy fragmentjét, vagy egy fragment konstrukcióját, amely felerősített kötési tulajdonságokkal bír, és így szelektíven és/vagy specifikusan kötődik egy lényegében hozzáférhető és/vagy túlexpresszált kötőhelyhez egy target sejten vagy sejten a többi sejt ellenében, amelyen vagy amelyben a kötőhely lényegében nem elérhető és/vagy expresszált, és ahol a kötési szelektivitást vagy specifitást elsődlegesen egy első hipervariábilis régió határozza meg, és ahol az Fv lehet scFv vagy dsFv és adott esetben tartalmazhat egy vagy több tag-et.

[112.] A találmány egy további megvalósítási módja szolgáltat peptidet vagy polipeptidet, ahol az első hipervariábilis régió egy CDR3 régió, amelynek aminosav szekvenciáját az SEQ ID NOs:8-24-t tartalmazó csoportból választjuk ki.

[113.] A találmány egy még további megvalósítási módja a találmány szerinti peptidet vagy polipeptidet biztosítja, ahol az első hipervariábilis régió egy CDR3 régió, amelynek aminosav szekvenciáját az SEQ ID NOs:8-24-t tartalmazó csoportból választjuk ki, és ahol a kötési specifitást vagy szelektivitást másodlagosan egy második, és/vagy harmadik hipervariábilis régió és/vagy egy vagy több, az első, második és harmadik hipervariábilis régióhoz upstream és/vagy downstream régió elhelyezkedő régiók befolyásolják, ebben a sorrendben, ahol a második és harmadik hipervariábilis régiók CDR2 és CDR1 régiók, ebben a sorrendben.

[114.] A találmány egyik megvalósítási módja szolgáltat egy peptidet vagy polipeptidet, amely köt egy target sejthez, amely egy aktivált, serkentett, módosult, megváltozott, megzavart vagy kóros sejt. A találmány egy további megvalósítási módja szolgáltat egy target sejtet, amely rákos sejt. A target sejtet a következő csoportból, de nem kizárólag, választjuk ki: carcinoma, sarcoma, leukemia, adenoma, lymphoma, myeloma,



blastoma, seminoma, és melanoma. Egy előnyös megvalósítási mód szerint a rákos sejt leukémia sejt. A legelőnyösebb megvalósítási mód szerint a leukémia sejt egy AML sejt.

[115.] A jelen találmány szerinti peptid vagy polipeptid lehet az Fv molekula bármely konstrukciója vagy módosított konstrukciój is, amely megtartja a nehéz és /vagy a könnyű lánc egy vagy több hipervariábilis régióját, és amelynek szelektív és/vagy specifikus kötési tulajdonságai vannak. A konstrukció vagy módosított konstrukció magába foglalja, anélkül hogy ezokar korlátozódna, az scFv-t, dsFv-t, és az scFv multimerjeit, mint a dimerek, trimerek, tetramerek, és az ehhez hasonlók, (amelyekre diabody, triabody tetrabody néven is hivatkoznak), valamint a teljes antitest, és minden egyéb multimer, amelyet ezekből létre lehet hozni, és amely magába foglalja az antitest doménjének egy vagy több hipervariábilis régióját. A jelen találmány szerinti peptid vagy polipeptid bármely konstrukció, vagy módosított konstrukció fragmentje is lehet, amely az eredeti konstrukció néhány néhány vagy az összes kötési tulajdonságával rendelkezik.

[116.] A jelen találmány szerinti peptid vagy polipeptid egy fragment konstrukciója is lehet, amely az eredeti származék konstrukció néhány vagy az összes szelektív és/vagy specifikus kötési tulajdonságával rendelkezik. Az itt leírt Fvs szelektíven és/vagy specifikusan köt a target sejtekhez és asszociálható vagy hozzáköthető a rák-, vagy betegség ellenes ágensekhez.

[117.] A találmány szerinti Fv molekulák peptidjei, polipeptidjei, fragmentjei és ezek konstrukciói, valamint a konstrukciók fragmentjei előállíthatók mind prokarióta mind eukarióta rendszerben is. A találmány egyik megvalósítási módja szerint, az eukarióta expressziós rendszer, egy emlős expressziós rendszer, és az ebben előállított peptid vagy polipeptid a panning után lényegében mentes az emlős szennyező anyagtól. Egy eukarióta sejt rendszer, mint ahogy definiáltuk a jelen találmányban, egy peptideket és polipeptideket génebeszeti módszerekkel előállító expressziós rendszerre utal, ahol a gazdasejt eukarióta. A találmány egy másik megvalósítási módjában, egy prokarióta rendszer a találmány szerinti peptid vagy polipeptid előállítására E. coli baktériumot használ, mint gazda sejtet az expresszióhoz. Az E. coli rendszerben előállított találmány szerinti peptid vagy polipeptid, panning után gyakorlatilag mentes minden E. coli szennyező fehérjétől. Prokarióta expressziós rendszer használata ezenkívül a jelen találmány által szolgáltatott néhány vagy összes szekvencia N-terminusához egy metionin maradékot is eredményezhet.



Az N-terminál metionin maradék eltávolítása a peptid vagy polipeptid előállítása után a teljes expresszió elérésre, széleskörűen használt módszerek, mint például, de nem kizárólag, az *Aeromonas* aminopeptidáz (5,763,215 számú USAA-beli szabadalom) megfelelő körülmények közötti alkalmazásával valósítható meg.

[118.] A találmány tárgya biztosítja az scFv molekula előállítását, amely a találmány szerinti Fv peptiden alapszik. Széles választéka létezik azoknak a promotereknek, amelyeket a prokarióta sejtekben klónozendó és amplifikálandó scFv-t kódoló vektorokba lehet juttatni. A promoter egy olyan DNS szakasz, amely upstream helyezkedik el a strukturális génektől, és képes a génexpresszió szabályozására. Promoterek a kromoszómák természetes állapotában is megtalálhatók, és bejuttathatók mind prokarióta, mind eukarióta expressziós vektorokba. A kívánt DNS fragmentum specifikus helyére bejuttatott promoterek, a kívánt gén expressziójának igen finoman hangolt és precíz szabályozását teszik lehetővé. Jelen találmányban több promotert használtunk olyan konstrukciókban, amelyben megtalálható volt a választott Fv-t kódoló gén. Ilyen promoterek például, de nem kizárólag, a következők: deo, P1-P2, osmB, λ P_L, β -lac-U5, SR α 5, és CMV korai promoter. Deo egy dupla szálú DNS-plazmid, amely, miután bejuttatták a megfelelő *E. coli* gazdába, képessé teszi a sejtet arra, hogy a kívánt, természetben is előforduló polipeptidet, vagy polipeptid analógot kódoló DNS expressziója a konstitutív *E. coli*ből származó deoxiribonukleotid promoter segítségével létrejöjjön. Egy részletesebb leírás található az 5,795,776 számú (Fischer, August 18, 1998) és az 5,945,304 számú (Fischer, August 31, 1999) USA-beli szabadalmakban.

[119.] Az *E. coli* osmB promoter expresszióját az ozmotikus nyomás szabályozza. Azok a vektorok, amelyek ezt a promotert hordozzák, jól alkalmazhatók rekombináns eukarióta és prokarióta polipeptidek széles választékának és nagy mennyiségben való előállítására, úgy, hogy az expressziót az osmB promoter szabályozza az *E. coli*ban. Részletesebb leírás található az 5,795,776 számú (Fischer, August 18, 1998) és az 5,945,304 számú (Fischer, August 31, 1999) USA-beli szabadalmakban.

[120.] 8P_L egy hő által indukálható 8 bakteriofág promoter, amelyet a hőre bomló represszor cI⁸⁵⁷ szabályoz. A teljes leírást lásd Hendrix *et al. Lambda II*, Cold Spring Harbor Laboratory (1983).



- [121.] λ -lac-U5 egy lacZ promoter (Gilbert and Muller-Hill, *PNAS (US)*, 58, 2415 (1967)).
- [122.] SR5 egy emlős cDNS expressziós rendszer, amely a simian vírus 40 (SV40) korai promoteréből és a humán T-sejt leukémia vírus 1. típus hosszú terminális ismétlődő R-U5 szakaszából áll. Ez az expressziós rendszer 1 vagy 2 nagyságrenddel aktívabb, mint az SV40 korai promoter sok más egyéb sejttypusban. (Takebe *et al.*, *Molecular and Cellular Biology*, 8, 466-472 (1988)).
- [123.] A humán cytomegalovírus promoter, amelyet CMV közvetítő/korai enhancer/promoterként (CMV intermediate/early enhancer/promoter) is ismernek, a leggyakrabban használt jelen találmányban az emlős sejtekbe inszertált DNS klón konstitutív expressziójának előidézésére. A CMV promoter leírása: Schmidt, E.V. et al., (1990) *Mol. Cell. Biol.*, 10, 4406, és U.S. szabadalmak: 5,168,062 és 5,385,839.
- [124.] A találmány egy előnyös megvalósítási módjában leggyakrabban a *deo*, *osmB*, $8P_L$, λ -lac-U5, és CMV promoterek közül választottunk a fagemid rendszer prokariótákban történő indukciójára. A találmány egy még előnyösebb megvalósítási módjában a λ -lac-U5 promotert használtuk a fagemid rendszer indukálására *E. coli*-ban. A legelőnyösebb megvalósítási módban a CMV promotert használjuk.
- [125.] A találmány egy megvalósítási módjában a találmány tárgyas szerinti peptid vagy polipeptid tartalmazza: (a) egy vezérszekvenciát, amely kizárólag a kódoló szekvenciában található meg, de hiányzik az érett fehérjéből; (b) a 135-145 aminosav rendű nehéz lánc egy variábilis régióját, amely magában foglal egy 4-12 aminosavból álló első hipervariábilis régiót, ami tárgya a módosításoknak; (c) egy spacer régiót, amely ≤ 20 aminosav, amelyet lehet rövidíteni vagy el lehet távolítani; (d) egy könnyű lánc variábilis régiója, amely szintén tárgya olyan specifikus módosításoknak, melyeket lentebb írunk le részletesebben; (e) egy tag szekvenciát, a könnyebb követés érdekében, amely nem feltétlenül van jelen az injektálható végtermékben. A spacer, amely általában körülbelül 15 aminosavmaradék hosszú az scFv-ben, elősegíti, hogy két variábilis lánc (könnyű és nehéz) funkcionális Fv doménné hajtogatódjanak össze. A funkcionális Fv domén megtartja a szelektív és/vagy specifikus felerősített kötési aktivitást.



[126.] A találmány egy másik megvalósítási módjában, a fent említett (d)-t egy tag szekvencia követi, vagy egy jelzés (label), amelyet fel lehet használni konjugációs, diagnosztikai és/vagy azonosítási célokra. Ebben a megvalósítási módban a tag-et úgy jelöltük meg, hogy kapcsolatot teremtsen a találmány szerinti peptid vagy polipeptid és egy a target sejt diagnoszisa vagy kezelésére használatos ágenssel.

[127.] Az scFv spacer régiója lehet egyenes vagy elágazó, általában glicin és szerin maradékokat tartalmaz, a $(\text{Gly}_4\text{Ser})_n$ formula többszörösében, és általában összesen 0-20 aminosav hosszú, előnyösen 0-15 aminosav hosszú, és egyenes. A kötő molekula hosszúságát megfelelő módon változtatva különböző multimereket kaphatunk. A találmány egy megvalósítási módjában a spacer 0-5 aminosav hosszú. Egy másik megvalósítási módban < 3 aminosav hosszú (részletes leírás lejjebb).

[128.] Példa a találmány egy scFv molekulájának aminosav sorrendjére:

```

1      ATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGATTGTTACTCGCGGCCAGCCGGCC
      _M_K_Y_L_L_P_T_A_A_A_G_L_L_L_L_A_A_Q_P_A_
61     ATGGCCGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGTGTGGTACGGCCTGGGGGGTCCCTG
21     _M_A_E_V_Q_L_V_E_S_G_G_G_V_V_R_P_G_G_S_L
121    AGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTGATGATTATGGCATGAGCTGGGTCCGC
41     R_L_S_C_A_A_S_G_F_T_F_D_D_Y_G_M_S_W_V_R
181    CAAGCTCCAGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCTGGTATTAATTGGAATGGTGGTAGCACA
61     Q_A_P_G_K_G_L_E_W_V_S_G_I_N_W_N_G_G_S_T
241    GGTATGCAGACTCTGTGAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACCCAAGAACTCC
81     G_Y_A_D_S_V_K_G_R_F_T_I_S_R_D_N_A_K_N_S
301    CTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCCGAGGACCGCCGGTGTATTACGTGGCAAGA
101    L_Y_L_Q_M_N_S_L_R_A_E_D_T_A_V_Y_Y_C_A_R
361    ATGAGGGCTCCTGTGATTTGGGCCAAGTAACCCTGGTCACCCTGTGAGAGTGGGAGGC
121    M R A P V I W_G_Q_G_T_L_V_T_V_S_R_G_G_G
421    GGTTCAGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCGTCTGAGCTGACACAGGACCCTGCT
141    G_S_G_G_G_S_G_G_G_G_S_S_E_L_T_Q_D_P_A
481    GTGTCTGTGGCCTTGGGACAGACAGTCAGGATCACATGCCAAGGAGACAGCCTCAGAAGC
161    V_S_V_A_L_G_Q_T_V_R_I_T_C_Q_G_D_S_L_R_S
541    TATTATGCAAGCTGGTACCAGCAGAAGCAGGACCAGGCCCTTGTCTTGTTCATCATGGGT
181    Y_Y_A_S_W_Y_Q_Q_K_P_G_Q_A_P_V_L_V_I_Y_G
601    AAAACAACCGGCCCTCAGGGATCCCAGACCGATTCTCTGGCTCCAGCTCAGGAAACACA
201    K_N_N_R_P_S_G_I_P_D_R_F_S_G_S_S_S_G_N_T

```



```

661 GCTTCCTTGACCATCACTGGGGCTCAGGCGGAAGATGAGGCTGACTATTACTGTA ACTCC
221 A S L T I T G A Q A E D E A D Y Y C N S
721 CGGGACAGCAGTGGTAACCATGTGGTATTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAGGT
241 R D S S G N H V V F G G G T K L T V L G
781 GCGGCCG CAGAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGAATGGGGCCGCATAG
261 A A A E Q K L I S E E D L N G A A *

```

[129.] A vezérszekvencia szaggatott vonallal van aláhúzva. A $0V_H$ régiót a vastagított aminosav szekvencia mutatja. Ez a specifikus klón a V_H3 -DP32 csírvonalból származik, habár minden klón csírvonala az eredeti származásától függ (lásd lejjebb). A bekeretezett aminosav szekvencia kódolja a V_H -CDR3 szekvenciát, azt a hipervariábilis régiót, amelyből e könyvtár minden klónja származik. A V_H és a V_L régiókat összekötő spacer régió egy flexibilis polipeptid, amelyet a dőlt betűs aminosavak jeleznek. Végül a V_L régió található. A fuzionált V_L fragment minden klónban az IGLV3SI csírvonal egyetlen, nem mutált V génjéből származik, ezt követi a c-myc tag, hullámos vonallal aláhúzva. A teljes aminosav sorrend megfelel az SEQ ID NO:25 szekvenciának.

[130.] A V_H fragmentek repertoárját (49 csírvonalból) először PCR segítségével hozták létre, nem immunizált humán perifériás vében található limfociták átrendeződött V-génjeiből (amelyre úgy is hivatkoznak, mint naív repertoár, "naive repertoire") a library szolgáltató segítségével. A V_H -szekvencia eredetije (csírvonal) homológia teszttel azonosítható (blaszt keresés), a következő weboldalakat használva:

[131.] Egy antitest kötési tulajdonságai többféle módon optimalizálhatók. Ahhoz, hogy magasabb kötési affinitást érjünk el, az eredeti fő komponenshez viszonyítva, optimalizálhatjuk úgy az antitestet, hogy kicserélünk aminosavmaradékokat a fő vegyületben, magasabb variabilitást vezetünk be, vagy kiterjesztjük a szekvenciát. Például, az egész eredeti V_L régiót ki lehet cserélni egy másik antitest altípus V_L régiójával.

[132.] Egy további lehetőség a magasabb kötési affinitásra való optimalizálásra egy phagemid display mutagenesis library létrehozása. A phagemid display library szerint, úgy szintetizálunk oligonukleotidokat, hogy a CDR3 V_H és V_L közti fő szekvencia minden egyes aminosavát egymástól függetlenül helyettesítjük egy másik aminosavra, előnyösen a szakirodalomból ismert konzervatív módon. A találmány tárgya szolgáltat egy fagon



felfedett specifikus antitest scFv szettet, ahol a felfedett antitest fragmenteknek és az szolubilis antitest fragmenteknek, amelyek a fág virionból vonhatók ki, azonos biológiai aktivitása van.

[133.] Az itt használt phage display library perifériás, nem immunizált humán vérben található limfocitákból készült, és az Fv peptidet a target sejt felszínén levő, előzőleg nem karakterizált és tisztítatlan antigének ellen szelektáltuk. Ahogy itt is használtuk korábban, nem karakterizált és tisztítatlan antigének nem azonosított sejt felszíni ligandumokra utalnak, amelyek a sejtek felületén vannak, amiket ezideig nem azonosítottak, karakterizáltak, izoláltak, vagy tisztítottak biokémiai vagy molekuláris módszerekkel, és amelyeket azonban a jelen munkában megfigyeltünk, vagy előre jeleztünk az izolált antitest fragment szelektív és/vagy specifikus kötésének megfigyelése alapján.

[134.] A találmány szerinti scFv molekula felősiített kötődést mutat a target sejt irányába. A felerősiített kötés egy specifikus sejt felszíni marker felé irányul. Specifikus sejt felszíni markerek azok a molekulák, amelyek a sejt plazmamembránjába vannak ágyazva, és elérhetők a cirkuláló felismerő molekulák számára. A sejt felszíni markerek jelenléte tette lehetővé a phage display technológia kifejlesztését a biopanning technológián keresztül, mint ahogyan itt leírtuk. Jelen találmányban a specifikus sejt felszíni markereket különböző sejt típusok karakterizálására és elkülönítésére használjuk, valamint különböző formákban kötőhelyként szolgálnak az Fv molekulák számára. A hematopoietikus sejt típusok széles választékát lehet elkülöníteni a jellemző sejt felszíni markereik alapján, és ehhez hasonlóan kóros vagy rákos sejtek felfednek sejt felszíni markereket, amik szintén jellegzetesek a típusukra és a fázisukra.

[135.] Az scFv klón kiválasztása két különböző biopanning stratégiával történhet:

1. közvetlen szelekció, a kóros vagy rákos sejtet, mint target sejtet használva, és
2. lépésenkénti szelekció, először egy első, vagyis normál sejtet egy második, vagyis aktivált, serkentett, módosított, megváltozott, vagy megzavart fázisban, ami által az első sejt kötőhelye a második fázisban tartalmaz egy lényegében felszínre tett és felfedett ismeretlen ligandumot. A kereszt-immunreaktivitás folytán az eredményezett klón szelektíven és/vagy specifikusan odakötődhet, a biopanning vagy szelekciós lépések után, a második sejtten egy új és ismeretlen ligandumhoz. További esetleges amplifikáció és ezt



követő panning után, targetáló molekulák hozhatók létre a második sejten egy ismeretlen ligandumra szelektív és/vagy specifikus tisztított felismerő molekulák felismerőhelye alapján.

[136.] A találmány egy megvalósítási módja szerint, az első sejt lehet egy normál sejt, az első fázis egy nem aktivált fázis, a második fázis pedig egy aktivált, serkentett, módosított, megváltozott, vagy megzavart állapot. A lépésenkénti szelekción átesett második sejt lehet humán sejt. A találmány egy másik megvalósítási módjában a lépésenkénti szelekción átesett második sejt lehet egy kóros sejt. A találmány egy előnyösebb megvalósítási módjában a lépésenkénti szelekción átesett második sejt rákos sejt, mint például, de nem kizárólag, carcinoma, sarcoma, leukemia, adenoma, lymphoma, myeloma, blastoma, seminoma, és melanoma. Még előnyösebb esetben a második sejt leukaemiás sejt. A legelőnyösebb megvalósítási mód szerint a második sejt AML sejt.

[137.] A találmány egy előnyös megvalósítási módja biztosít egy peptidet vagy polipeptidet, amely szelektíven és/vagy specifikusan kötődik a második sejt ligandumjához, és amelyben a szelektív és/vagy specifikus kötődést elsődlegesen az első hipervariábilis régió határozza meg. Egy még előnyösebb megvalósítási módban, az első hipervariábilis régió egy CDR3 régió, amelynek aminosav szekvenciáját a következő csoportból választjuk ki: SEQ ID NOs:8-24.

[138.] A találmány egy másik megvalósítási módja a második sejt egy olyan ligandját szolgáltatja, amelyet a találmány szerinti peptid vagy polipeptid köt. Egy további eredmény olyan egyéb molekulákról gondoskodik, amelyek felismerik és kötik a találmány peptidje vagy polipeptidje által kötött ligandot.

[139.] A rákos sejthez felerősített kötődés minden valószínűség szerint a ligandum túlzott expressziójának köszönhető, és/vagy annak, hogy a rákos sejten a kötőhely hozzáférhetősége relative nagyobb, a normál sejt expressziójához képest. A ligand túlzott expresszióját olyan értelemben használjuk, amikor a gén nem expresszálódik, vagy a terméke nincs jelen abban a bizonyos sejt típusban, és/vagy a sejt ciklusának abban a bizonyos fázisában, vagy a megnövekedett expressziója egy olyan génnek, amely alapszinten expresszálódik normál, nem malignus körülmények között abban a bizonyos sejt típusban.



[140.] A találmány egyik előnyös megvalósítási módjában a biopanning folyamat target sejtje egy sejtszuszpenzióban van. Hematopietikus sejtek nyerhetők szuszpenzióban, és a biopanning elvégezhető úgy, hogy összekeverünk egy phage display library-t egy vér szuszpenzióval, majd néhányszor pufferrel mossuk. A fagot kivonjuk a humán sejtekből, amplifikáljuk, és meghatározzuk a felfedett antitest fragment szekvenciáját.

[141.] A találmány egy még előnyösebb megvalósítási módjában a vér sejt-szuszpenzió leukaemiás sejteket tartalmaz. Egy legelőnyösebb megvalósítási mód szerint a vér szuszpenzióban AML sejtek vannak. Egy másik megvalósítási módban pedig a target sejt egy izolált szervből, vagy annak egy részéből származik.

[142.] A találmány egy másik megvalósítási módja szerint egyes esetekben a target sejt, vagy a második sejt egy sejtvonalból származik. A sejtvonalakat lehet úgy kultúrában tartani és kezelni, hogy az Fv klónok kötési tulajdonságainak meghatározásában segítségünkre legyenek. Valamint, a sejtvonalak egy esetleges jövőbeli diagnosztikai kit kifejlesztésében is hasznosak lehetnek.

[143.] Egy előnyös megvalósítási mód szerint a sejtvonal egy hematopietikus sejtvonal, mint pl a következők, de nem ezekre korlátozva: Jurkat, MOLT-4, HS-602, U937, TF-1, THP-1, KG-1, ML-2, és HUT-78 sejtvonalak.

[144.] A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint a CDR3 régió be van építve, inszertálva, kapcsolva, vagy fuzionálva 84 kazetta (SEQ ID NOs:30-113) bármelyikébe vagy bármelyikére. Egy még előnyösebb megvalósítási mód szerint a CDR3 régió be van építve, inszertálva, kapcsolva, vagy fuzionálva 49 kazetta (SEQ ID NOs:30-32, 35, 37-39, 41, 43, 45, 46, 48, 51, 54, 57, 59-68, 70, 71, 76-85, 87, 89-92, 94, 97, 99, 103, 106, 112, és 113) bármelyikébe vagy bármelyikére. A legelőnyösebb megvalósítási mód szerint CDR3 régió be van építve, inszertálva, kapcsolva, vagy fuzionálva a SEQ ID NO:61 kazetta C terminusához, vagy bármelyikhez a fent említett szekvenciák közül, amelynek szekvenciája legalább 90%-os hasonlóságot mutat azokkal.

[145.] Az egyik megvalósítási módban a kazetta aminosav szekvenciája egyes esetekben látszólag állandó, míg a kicserélt, inszertált, vagy kapcsolt szekvenciák igen variábilisak lehetnek. Egy kazetta több doménből is felépülhet, melyek mindegyikének lehet kritikus szerepe a végső konstrukcióban. A jelen találmány egy bizonyos



megvalósítási módja szerinti kazetta doménjei az N-terminustól: framework region 1 (FR1), CDRI, framework region 2 (FR2), CDR2, és framework region 3 (FR3).

[146.] A találmány egy megvalósítási módja szerint ki lehet cserélni kazettán belül meghatározott régiókat. Például, a kazetta CDR2 és CDR1 hipervariábilis régióit ki lehet cserélni, vagy módosítani lehet, nem konzervatív, vagy előnyösen konzervatív aminosav szubsztitúciókkal. Még specifikusabban, a kazetta CDR2 és CDR1 régióinak meghatározott egymás után következő szekvenciáit, melyeket a SEQ ID NOs:30-113-t tartalmazó csoportból választunk, ki lehet cserélni az SEQ ID NOs:115 és 114 szekvenciákra, ebben a sorrendben. Még ennél is pontosabban, a kazetta CDR2 és CDR1 régióinak meghatározott egymás után következő szekvenciáit, amelyeket a következő csoportból választunk: SEQ ID NOs:30-32, 35, 37-39, 41, 43, 45, 46, 48, 51, 54, 57, 59-68, 70, 71, 76-85, 87, 89-92, 94, 97, 99, 103, 106, 112, és 113, vagy ezek fragmentjeit, ki lehet cserélni a SEQ ID NOs:115 és 114 szekvenciákra, ebben a sorrendben.

[147.] A találmány egy előnyös megvalósítási módjában a peptid vagy polipeptid tartalmaz egy nehéz és egy könnyű láncot, melyekben található egy első, egy második és egy harmadik hipervariábilis régió, melyek a CDR3, CDR2 és CDR1 régiók, ebben a sorrendben. A kötés szelektivitását és specificitását elsődlegesen egy lánc CDR3 régiója határozza meg, valószínűleg a könnyű lánc CDR3 régiója, és előnyösen a nehéz lánc CDR3 régiója, és másodlagosan a könnyű lánc CDR2 és CDR1 régiói, előnyösen a nehéz lánc CDR2 és CDR1 régiói. A kötés szelektivitását és specificitását másodlagosan még az első, második, vagy harmadik hipervariábilis régiótól upstream vagy downstream elhelyezkedő határoló régiók is befolyásolhatják.

[148.] A találmány egy előnyös megvalósítási módjában a peptid vagy polipeptid CDR3 régiójának aminosav sorrendjét a SEQ ID NOs:8-24-t tartalmazó csoportból választjuk ki.

[149.] Egy előnyösebb megvalósítási mód szerint a nehéz lánc CDR3 régiójának aminosav sorrendjét a SEQ ID NOs:8-24-t tartalmazó csoportból választjuk ki, a CDR2 régió aminosav sorrendje azonos a SEQ ID NO:115-vel, és a CDR1 régió aminosav sorrendje azonos a SEQ ID NO: 114-vel.



- [150.] A találmány legelőnyösebb megvalósítási módja szerint a CDR régió aminosav sorrendje azonos a SEQ ID NO:8-al.
- [151.] Ezen túlmenően a nehéz és a könnyű láncok mellett az Fv molekulának van egy flexibilis kötőmolekulája is, amely többnyire 0-20 aminosavmaradék hosszúságú. A kötőmolekula lehet egyenes, vagy elágazó láncú. A spacer két lehetséges aminosav szekvenciája a SEQ ID NOs:123 és 124.
- [152.] A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint egy scFv molekula CDR3 szekvenciája azonos a SEQ ID NO: 8-al, és a teljes scFv szekvencia aminosav sorrendje azonos a SEQ ID NO: 25-tel.
- [153.] A találmány ez másik megvalósítási módja szerint egy scFv molekula CDR3 szekvenciája azonos a SEQ ID NO: 20-al, és a teljes scFv szekvencia aminosav sorrendje azonos a SEQ ID NO: 203-al.
- [154.] A találmány egyik legelőnyösebb megvalósítási módja szerint a CDR3, CDR2 és CDR1 régiók szekvenciája SEQ ID NOs:8, 115 és 114, ebben a sorrendben.
- [155.] A találmány egyik megvalósítási módjában az Fv peptid tartalmaz egy CDR1 és egy CDR2 régiójú variábilis nehéz láncot, melyek maguk tartalmazznak egy kazettát, amelynek sorrendjét a következő csoportból választottuk: SEQ ID NOs:30-113; tartalmaz továbbá egy CDR3 régiót, előnyösen a variábilis nehéz láncon, melynek aminosav sorrendjét SEQ ID NO: 8-24-t tartalmazó csoportból választunk ki; egy upstream elhelyezkedésű, a CDR3 régiót határoló régiót, melynek aminosav sorrendje SEQ ID NO: 117; egy downstream elhelyezkedésű, a CDR3 régiót határoló régiót, melynek aminosav sorrendje SEQ ID NO: 116; egy 0-20 aminosavmaradék hosszú kötőmolekulát (spacer), melynek aminosav sorrendje a SEQ ID NO:123 vagy 124 szekvenciákéval egyezik meg; egy variábilis könnyű lánc régiót, melynek aminosav sorrendje a SEQ ID NO:7.
- [156.] Hasonlóan, egy másik megvalósítási módban az upstream elhelyezkedésű, a CDR2 régiót határoló régió aminosav sorrendje SEQ ID NO: 119, a downstream elhelyezkedésű, a CDR2 régiót határoló régió aminosav sorrendje SEQ ID NO: 118, az upstream elhelyezkedésű, a CDR1 régiót határoló régió aminosav sorrendje SEQ ID NO:



121, és a downstream elhelyezkedésű, a CDR1 régiót határoló régió aminosav sorrendje SEQ ID NO: 120 szekvencia.

[157.] A találmány egy előnyös megvalósítási módja egy olyan peptidet vagy polipeptidet ad, amelyben a második és harmadik hipervariábilis régiók a CDR2 és CDR1 hipervariábilis régiók, ebben a sorrendben, és ahol a CDR3 aminosav sorrendje a SEQ ID NO:8 szekvencia, amelyben a CDR2 aminosav sorrendje a SEQ ID NO:115 szekvencia, amelyben a CDR1 aminosav sorrendje a SEQ ID NO:114 szekvencia, amelyben az upstream CDR3 régiót határoló régió aminosav sorrendje a SEQ ID NO:117, amelyben a downstream CDR3 régiót határoló régió aminosav sorrendje a SEQ ID NO:116, amelyben az upstream CDR2 régiót határoló régió aminosav sorrendje a SEQ ID NO:119, amelyben a downstream CDR2 régiót határoló régió aminosav sorrendje a SEQ ID NO:118, amelyben az upstream CDR1 régiót határoló régió aminosav sorrendje a SEQ ID NO:121, és amelyben a downstream CDR1 régiót határoló régió aminosav sorrendje a SEQ ID NO:120 szekvencia.

[158.] A találmány egy másik előnyös megvalósítási módja szolgáltat egy Fv molekulát, amelynek első lánc tartalmaz egy első, egy második és egy harmadik hipervariábilis régiót, és a második lánc tartalmaz egy első, egy második és egy harmadik hipervariábilis régiót, ahol az első lánc egyik hipervariábilis régiójának szekvenciáját a SEQ ID NOs:8-24-t tartalmazó csoportból választjuk ki, és amelyben a második lánc egyik hipervariábilis régióját a SEQ ID NOs:1-6 és 125-202-t tartalmazó csoportból választjuk ki, és amelyben az első, második és harmadik hipervariábilis régiók CDR3, CDR2 és CDR1 régió, ebben a sorrendben, és ahol a az Fv molekula lehet egy scFv vagy dsFv, és adott esetben tartalmazhat egy vagy több tag-et.

[159.] A találmány egy másik megvalósítási módj egy olyan peptidet vagy polipeptidet is szolgáltat, (i) amelyben az első és a második lánc is tartalmaz egy első hipervariábilis régiót, amelyet a következő csoportból választunk: SEQ ID NOs:8-24; vagy (ii) ahol az első és a második lánc első hipervariábilis régiója azonos, és a SEQ ID NOs:8-24-t tartalmazó csoportból választjuk ki; vagy (iii) amelyben az első lánc első hipervariábilis régióját a SEQ ID NOs:8-24-t, és a második lánc első hipervariábilis régióját a SEQ ID NOs:1-6 és 125-202-t tartalmazó csoportból választunk ki; vagy (iv) amelyben az



első lánc első hipervariábilis régióját a SEQ ID NOs: 1-6 és 125-202-t, és a második lánc első hipervariábilis régióját a SEQ ID NOs: :8-24-t tartalmazó csoportból választjuk ki.

[160.] Egy további megvalósítási mód a találmány szerinti olyan peptidet, vagy polipeptidet szolgáltat, amely első láncának második és harmadik hipervariábilis régiói a SEQ ID NOs:114 és 115, ebben a sorrendben.

[161.] Minden 25 aminosavmaradék hosszú, vagy annál rövidebb (≤ 25) itt leírt és részletezett szekvencia (vagyis a CDR régiók, illetve a CDR régiókat határoló régiók) esetében azt kell megérteni és megfontolni, a találmány egy további megvalósítási módjaként, hogy ezek az aminosav szekvenciák egy vagy két aminosav szubsztitúciót tartalmaznak a szkópjaikon belül, és hogy a szubsztitúciók konzervatív aminosav szubsztitúciók. Minden 25 aminosavmaradék hosszú, vagy annál rövidebb (≤ 25) itt leírt és részletezett szekvencia (vagyis a CDR régiók, illetve a CDR régiókat határoló régiók) esetében azt kell megérteni és megfontolni, a találmány egy megvalósítási módjaként, hogy ezek az aminosav szekvenciák a szkópjaikon belül, olyan aminosav szekvenciát tartalmaznak, amelyekben 90%, vagy több szekvencia hasonlóság van az eredeti szekvenciához képest (Altschul *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 25, 3389-3402 (1997)). Hasonló, vagy homológ aminosavak azok a nem azonos aminosavak, amelyek azonban hasonló tulajdonságokat mutatnak, pl. savas, bázikus, aromás, méretű, pozitív vagy negatív töltésű, poláris, apoláris.

[162.] Az aminosav hasonlóság vagy homológia, valamint a szekvencia hasonlóság százalékát két különböző peptid vagy polipeptid aminosav szekvenciáinak összehasonlításával kapunk meg. A két szekvenciát sorba állítjuk, többnyire az erre a célra kifejlesztett számítógépes programok egyikével, és az aminosavmaradékokat minden egyes pozícióban összehasonlítjuk. Meghatározzuk az aminosav azonosságot és homológiát. Ez után alkalmazzuk egy algoritmust, amely megadja az aminosav hasonlóság százalékát. Általában előnyös aminosav szekvenciákat összehasonlítani, köszönhetően annak a nagyban megnőtt érzékenységnek, mellyel detektálni vagyunk képesek a peptid, polipeptid és fehérje molekulák közti igen finom kapcsolatokat. A fehérje összehasonlítás figyelembe veheti a konzervatív aminosav szubsztitúciókat, ahol hibás illeszkedés esetén is pozitív eredményt kaphatunk, ha a nem azonos aminosavaknak hasonló fizikai és/vagy kémiai tulajdonságai vannak (Altschul *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 25, 3389-3402 (1997)).

[163.] A találmány egy megvalósítási módjában a könnyű és a nehéz láncok mindhárom hipervariábilis régiója kicserélhető a két lánc között, és a három hipervariábilis régiók egymással és/vagy a láncokban és a láncok között.

[164.] A szakiradolomban jártas szakember be fogja látni, hogy a találmány szerinti peptid vagy polipeptid szelektív és/vagy specifikus kötésének a bizonyítása megfelelő negatív kontrollt is igényel. A megfelelő negatív kontroll lehet egy olyan peptid, polipeptid vagy aminosav szekvencia, amely majdnem azonos a találmány szerinti peptiddel vagy polipeptiddel, az egyetlen különbséggel a hipervariábilis CDR3 régióban. Másik megfelelő negatív kontroll lehet egy ugyanolyan méretű és/vagy általában három dimenziós struktúrájú peptid, vagy polipeptid, mint a találmány szerinti peptid vagy polipeptid, amelynek azonban semmi hasonlósága nincs az aminosav sorrenddel. Még egy másik megfelelő negatív kontroll lehet egy olyan peptid vagy polipeptid, amely teljesen különböző fizikai és/vagy kémiai tulajdonságú, összehasonlítva a találmány szerinti peptiddel, vagy polipeptiddel. Jelen találmány kidolgozásakor használt negatív kontrollt N14 számmal jeleztük, amelynek CDR3 szekvenciája azonos a SEQ ID NO:28 szekvenciával és C181 számmal jeleztük, melynek CDR3 szekvenciája azonos a SEQ ID NO:29 szekvenciával. Más egyéb negatív kontrollok hasonlóképpen megfelelőek lehetnek.

[165.] Egy másik megvalósítási mód szolgáltat egy nukleinsav molekulát, előnyösen DNS molekulát, amely a találmány szerinti Fv peptidet vagy polipeptidet kódolja.

[166.] A találmány egyik előnyös megvalósítási módjában, hogy optimalizáljuk az Fv molekula szelektív kötődését, a CDR3 szekvenciát, mely az Fv elsődleges kötési szelektivitásáért és/vagy specifitásáért felelős, átvihetjük bármely másik nehéz lánc csírvonalba. Pontosabban, a 84 lehetséges nehéz lánc csírvonal egyikébe vihetjük át. Ez a 84 csírvonal (SEQ ID NOs:30-113) tartalmazza (a) azt a csírvonalat, amelyből az igényelt fág klónt eredetileg izolálták, (b) 48 további csírvonalat, amelyek a phage display libraryban elérhetők, (c) 35 alternatív csírvonalat, melyeket itt igényeltünk (Tomlinson *et al*, *J. Mol. Biol.*, 227(3):776-798 (1992)). A CDR3 régió lokális lineáris, vagy 3 dimenziós környezete, összhangban magával a CDR3 régióval, fontos szerepet játszhat az alkalmas CDR3 kötés vezérlésében vagy kialakításában. Például, azok a peptidek, amelyeknek CDR3 szekvenciáit itt írtuk le: SEQ ID NOs:8-24, 125, és amelyek a 49 csírvonal

szekvencia bármelyikéből származnak (SEQ ID NOs:30-32, 35, 37-39, 41, 43, 45, 46, 48, 51, 54, 57, 59-68, 70, 71, 76-85, 87, 89-92, 94, 97, 99, 103, 106, 112, és 113), szintén a találmány tárgyát képezik.

[167.] A DP-32 csírvonal a jelen találmány szerinti néhány klón kazettája. Ennek a csírvonalnak a C-terminusát kicseréltük egy konszenzus szekvenciával, hogy elősegítsük a phage display library létrehozását. A SEQ ED NO: 61 aminosav szekvencia karboxi-vegen levő hét aminosavját kicseréltük a SEQ ID NO: 122 szekvencia hét aminosavjával.

[168.] A jelen találmány szerinti Fv molekulák CDR3 régiója tartalmazhatja a **Arg_{Gly/Lys}Phe Pro** vezérszekvenciát, amely specifikusan köt az AML sejtekhez. Az ilyen CDR3 régiók közül 8-at mutat a 2. táblázat. Ugyan a 3 N-terminálison lévő aminosav-motívum egybeesik mindegyik CDR3 esetében, ezek bárhol elhelyezkedhetnek a CDR3 molekulán belül. Választhatóan a motívum olyan kötő motívum, amit egy nagyobb kötő vagy targetáló vagy felismerő molekula rész hurkoló vagy kötő régiójának felépítésére vagy konstruálására használunk, vagy önmagában, target hordozóként használjuk.

[169.] Jelen találmányban egy további megvalósítási módjában szolgáltatunk egy kötő motívumot, mely tartalmazza az R₁-X Phe Pro-R₂ aminosav szekvenciát, ahol R₁ és R₂ mindkettő 0-15, előnyösen 0-9 aminosavmaradékok, és ahol X lehet vagy Arg vagy Gly vagy Lys. Még előnyösebben, a CDR3 tartalmazza az R₁-X Phe Pro-R₂ aminosav szekvenciát, ahol R₁ és R₂ mindkettő 0-15 aminosav amradékok, és ahol X lehet vagy Arg vagy Gly vagy Lys.

[170.] A találmány tárgya szerinti peptid vagy polipeptid egy másik előnyös megvalósítási módjában 1-1000 aminosav adható, vagy a peptid C-terminusához, vagy az N-terminusához úgy, hogy a peptid megtartja biológiai aktivitását. A találmány egy előnyös megvalósítási módjában 100-150 aminosavat adhatunk a peptid, vagy polipeptid C-, vagy N-terminusához, mialatt a peptid, vagy polipeptid megőrzi a biológiai aktivitását. A találmány egy másik előnyös megvalósítási módjában, 800-1000 aminosavat adhatunk a peptid, vagy polipeptid C-, vagy N-terminusához, mialatt a peptid, vagy polipeptid megőrzi a biológiai aktivitását.

[171.] Egy példa arra, hogy hogyan lehet kiterjeszteni az alap aminosav szekvenciát egy teljes méretű immunglobulin Ig molekula építésével úgy, hogy egy vezető



vegyületet használunk az Ig alap szekvenciájaként. A teljes méretű Ig tartozhat pl. olyan immunglobulin osztályba, amely az endogén citolitikus aktivitást képes indukálni a komplement rendszer, vagy a sejt citolitikus aktivitás aktiválásán keresztül (pl. IgG1, IgG2, vagy IgG3). A teljes méretű Ig olyan immunglobulin osztályhoz is tartozhat, amely szorosán köti az antitesteket (pl. IgG4). A kötéskor, a teljes méretű Ig egy vagy több féle módon képes hatni, pl. mint egy zászló a szervezet védelmi mechanizmusának, az immunválasz indukálására, azzal, hogy átviszi az intracelluláris sejt szignalizációt, vagy pedig a target sejt károsításával.

[172.] Jelen találmány egyik előnyös megvalósítási módja szolgáltat egy kiemelt Ig molekulát, amelyet egy eukarióta sejt rendszer termel rekombináns polipeptidként. A találmány egy előnyös megvalósítási módjában ez az Ig egy IgG polipeptid, és emlős sejt rendszer termeli. Egy még előnyösebb megvalósítási módban az emlős sejt rendszer a CMV promotert tartalmazza.

[173.] A találmány egy előnyös megvalósítási módjában az IgG molekula tartalmazza a CDR3, CDR2 és CDR1 hipervariábilis régiókat, mind a könnyű, mind a nehéz láncon. A találmány egy előnyösebb megvalósítási módjában az Fv molekula tartalmazza a CDR3, CDR2 és CDR1 régiókat, melyeknek a szekvenciája: SEQ ID NOs: 8, 115 és 114, ebben a sorrendben. A CDR3, CDR2 és CDR1 régiók lehetnek a könnyű vagy a nehéz láncon.

[174.] A találmány egy további előnyös megvalósítási módja szolgáltat egy IgG molekulát, amely könnyű láncának szekvenciája azonos a SEQ ID NO: 27 szekvenciával, és a nehéz lánca szekvenciája azonos a SEQ ID NO: 26 szekvenciával, vagy olyan nehéz és könnyű láncot tartalmaz, amelyek ez utóbbiakkal legalább 90%-os szekvencia azonosságot mutatnak. A találmány egy legelőnyösebb megvalósítási módjában az IgG két nehéz lánca azonos, és az IgG két könnyű lánca is azonos.

[175.] Egy másik megvalósítási módban a találmány szerinti peptid úgy van konstruálva, hogy egy multivalens Fv formává hajtogatódik.

[176.] Jelen találmány szolgáltat egy Y1 és Y17 peptidet, vagy polipeptidet, mely tartalmaz egy scFv molekulát. Ahogy itt is említettük, az scFv egy olyan molekula, amely egy humán antitest nehéz és könnyű láncának variábilis régióiból áll, amely antitestek

lehetnek ugyanazok, vagy különbözőek, és amelyben a nehéz lánc variábilis régiói lehetnek kapcsolva, kötve, fuzionálva, vagy kovalensen kapcsolva a könnyű lánc variábilis régiójához, vagy asszociálva vele.

[177.] Az Y1 és Y17 scFv konstrukció lehet az scFv molekula multimerje (pl. dimer, trimer, tetramer, és hasonlók), ami magába foglalja az Y1 vagy Y17 antites egy vagy több hipervariábilis doménjét. Minden scFv-ből származó konstrukció és fragment megtartja a felerősített kötési tulajdonságait, vagyis hogy szelektíven és/vagy specifikusan köt a target sejthez a többi sejt ellenében. A kötési szelektivitást és/vagy specificitást elsődlegesen a hipervariábilis régiók határozzák meg.

[178.] A könnyű és nehéz láncok variábilis doménjén belüli hipervariábilis hurkokat CDR-nek (Complementary Determining Regions) hívják. Minden nehéz és könnyű láncban van CDR1, CDR2 és CDR3 régió. Ezek közül a legvariábilisabb régió a nehéz lánc CDR3 régiója. Belátható, hogy a CDR3 régió az a rész, amely leginkább hozzáférhető az Ig molekula számára, és ahogy itt biztosítottuk, ez a szakasz felelős elsősorban a megfigyelt szelektív és/vagy specifikus kötési tulajdonságokért.

[179.] A találmány tárgya szerinti Y1 és Y17 peptidet úgy van konstruálva, hogy egy multivalens Fv formává hajtogatódik. Az Y1 és Y17 multimer formákat úgy konstruáltuk, hogy javítsák a kötési affinitást és specificitást, és növeljék a vérben a féléletidőt.

[180.] Multivalens scFv formákat mások is előállítottak. Az egyik megközelítés szerint két scFv-t kapcsolunk össze kötő molekulákkal (linkerekkel). Egy másik megközelítés a diszulfid hidakat alkalmazza a két scFv összekapcsolásához. A legegyszerűbb megközelítést dimer és trimer Fv előállítására, Holliger et al., *PNAS*, 90, 6444-6448 (1993) és A. Kortt, et al., *Protein Eng.*, 10, 423-433 (1997) javasolták. Ahhoz, hogy dimereket állítsanak elő, a FOS és JUN fehérje régióinak szekvenciáját adták hozzá az scFv molekulákhoz, így egy leucin cippzart hoztak létre a két scFv C-terminusa között (Kostelny SA et al., *J Immunol.* 1992 Mar 1;148(5):1547-53; De Kruif J et al., *J Biol Chem.* 1996 Mar 29;271(13):7630-4). Egy másik módszert dolgoztak ki tetramerek előállítására streptavidint kódoló szekvencia hozzáadásával az scFv C-terminusához. A streptavidin 4 alegységből álló molekula, így amikor az scFv-streptavidin hajtogatódik, a 4 alegység úgy alkalmazkodik, hogy tetramert hozzanak létre (Kipriyanov SM et al., *Hum Antibodies*



Hybridomas, 1995;6(3):93-101). Még egy másik módszerben dimerek, trimerek és tetramerek előállításár szabad ciszteint illesztnek az adott fehérjébe. Egy peptid alapú keresztkötő molekulát, variábilis (2-4) maleimid csoportokkal, alkalmaztak, hogy keresztkössék az adott fehérjét a szabad ciszteinekhez (Cochran JR et al., *Immunity*, 2000 Mar;12(3):241-50).

[181.] Ebben a rendszerben, a phage display libraryat (ahogy fentebb leírtuk) scFv-k tárolására tervezték, amelyek képesek behajtogatódni egy antitest Fv régiójának monovalens formájába. Továbbá fentebb arról is szó esik, hogy a származékok alkalmasak bakteriális expresszióra. A génebézésati úton létrehozott scFv-k tartalmazzák a nehéz és könnyű láncok variábilis régióit, melyekhez csatlakozik a velük határos 15 aminosavas flexibilis peptid spacer. Az előnyös spacer a (Gly₄Ser)₃. Ennek a spacernek a hossza, az aminosav alkotórészekkel együtt egy nem túl terjedelmes spacert adnak, amely lehetővé teszi, hogy a VH és VL régiók egy funkcionális Fv doménné álljanak össze, amely hatékonyan tud kötni a targetjéhez.

[182.] Jelen találmány tárgya az Y1 és Y17 multimerek is, amelyek a szakirodalomból ismert bármely módon előállíthatók. A multimerek, és különösen a dimerek képzésének egy előnyös módszere cisztein amradékokat használ, a diszulfid hidak létrehozásához a két monomer között. Ebben a megvalósítási módban, úgy állítottuk elő a dimereket, hogy ciszteint adtunk az scFv karboxi-végéhez (ezeket nevezzük Y1-cys scFv-nek, vagy Y1 dimernek). Azután, hogy a DNS konstrukció elkészült (lásd 2D és 6D Példák), és fel lett használtva transzfekcióra, az Y1 dimereket egy gyártó vektorban voltak expresszáva és in vitro hajtogatva. A fehérjét SDS-PAGE, HPLC és FACS technikákkal analizáltuk. Az antitesteket kétliteres tételekben fermentáltuk. Az Y1-cys-t *E. coli* BL21 törzsben való expresszálása után, a hajtogatás argininben történt. A hajtogatást követően, a fehérjét dializáltuk, majd Q-sepharose és gélszűrés (sephadex 75) segítségével tisztítottuk. SDS-PAGE-ben (nem redukált), és gélszűréssel két csúcsot találtunk. A két csúcsot külön gyűjtöttük, és FACS segítségével analizáltuk. A Jurkat sejtekhez való monomer és dimer kötődést FACS technikával ellenőriztük. A dimer kötődéséhez a monomer antitest mennyiségének az 1/100-a kellett ahhoz, hogy ugyanolyan erősségű festést kapjunk, ez jelzi, hogy a dimerek aviditása magasabb. Meghatároztuk dimerek hajtogatódásának körülményeit, és a 90%-nál több dimert tartalmazó (mg mennyiségek) anyagot állítottunk elő egymást követő dialízis, kromatográfia és gélszűrésekkel. A tisztított dimert



gelszűrőssel, és oxidáló SDS-PAGE segítségével karakterizáltuk. A dimer kötődési kapacitását radioreceptor assay, ELISA és FACS segítségével analizáltuk.

[183.] A CONY1 scF antitest fragment a Y1 scFV-ből származik. Az Y1 scFv myc tagját kódoló DNS szekvenciát eltávolítottuk és kicseréltük egy szintetikus oligonukleotid DNS szekvenciára, amely a lizin- alanin-lizin aminosavakat kódolja (KAK)

[184.] Hogy összehasonlítsuk az scFv monomer (amelyet CONY1-nek is nevezünk) kötődését az Y1 dimerrel, kötődési kompetíciós kísérleteket végeztünk in vitro, KG-1 sejteken. Továbbá, ezekkel a kísérletekkel a teljes Y1 IgG, scFv Y1 monomerekhez való kötődésének összehasonlítását is elvégeztük. A vizsgálat megvalósításához az Y1 IgG-t megjelöltük biotinnal. A kísérlet eredménye szerint az Y1 IgG kompetált az IgG Y1-Biotinnal. Nem releváns humán IgG nem kompetált a megjelölt Y1 IgG-vel. Y1 scFv (5 µg és 10 µg) részlegesen kompetált az Y1 IgG-Biotinnal (50 ng). A kísérletek azt is bizonyították, hogy 1 ng IgG Y1-FITC kötődött KG-1 sejtekhez (szérum nélkül) ugyanolyan arányban, mint az 1 µg scFv-FITC, de szérum jelenlétében, az Y1 IgG kötődés nagyrészt gátolt. Ezek a kísérletek azt is mutatják, hogy az Y1 dimerek kötődése legalább 20x akkora, mint az scFv monomerek kötődése, mint ahogyan ezt radioreceptor assay, ELISA, vagy FACS segítségével ellenőriztük.

[185.] A találmány még egy másik megvalósítási módjában, a ciszteinen túl lizin-alanin-lizint adtunk a karboxi-véghez (erre úgy hivatkozunk, mint Y1-cys-KAK scFv). Ennek az scFv molekulának az aminosav sorrendje a következő:

```

1 MEVQLVESGG GVVRPGGSLR LSCAASGFTF DDYGMSWVRQ
APGKGLEWVS GINWNGGSTG 60
61 YADSVKGRFT ISRDNKNSL YLQMNSLRAE DTAVYYCARM
RAPVIWGQGT LTVSRGGGG 120
121 SGGGSGGGG SSELTQDPAV SVALGQTVRI TCQGDSLRSY
YASWYQQKPG QAPVLVIYGK 180
181 NNRPSGIPDR FSGSSSGNTA SLTITGAQAE DEADYYCNSR
DSSGNHVVFG GGTKLTVLGG 240
241 GGCKAK

```

[186.] Az Y1-cys-KAK molekulát baktériumban, egy λ-pL vektorban termeltük. A λ-pL vektor általi expressziót úgy indukáltuk, hogy a hőmérsékletet megemeltük 42°C-ra. Az indukált kultúrákból inklúziós testeket kaptunk, és vizes oldatokkal félig tisztítottunk, hogy eltávolítsuk a nem kívánt fehérjéket. Az inklúziós testeket guanidinben



szolubilizáltuk, DTT-vel redukáltuk és in vitro hajtogattuk egy arginin/oxidált glutation alapú oldatban. Az hajtogatás után a fehérjét dializáltuk és bekonzentráltuk tangenciális átáramlásos szűréssel, karbamidt/foszfát pufferbe. A fehérjét ismét tisztítottuk és egy SP-oszlopon ioncsrelő-kromatográfiával koncentráltuk.

[187.] Hogy a CONY1 scFv, valamint az Y1-cys-KAK scFv magasabb expressziós szintjét kapjuk E. coliban, az scFv molekula N-terminálisától számított 2. pozícióba egy alanin aminosavat jutattunk be. Ezzel az új módosított konstrukcióval négyszeres expressziós szintet értünk el.

[188.] Egy ELISA assay-t alkalmaztunk, hogy megbizonyosodjunk a monomer (CONY1 scFv vagy Y1-KAK) és a dimer Y1-cys KAK (a cisztein dimer), és a dimernek a vérlemezkékből származó GPIb (glycocalicin) antigén közötti kötésről. Egy poliklonális anti-egyláncú antitest (single chain antibody) elleni és/vagy egy új poliklonális (nyúlból származó) anti-V_L és anti-nyúl HRP-t használtunk a GPIb kötődésének a detektálásához. A dimer megközelítőleg 20-100x aktívabb volt, mint a monomer. Például, 12,8 mg/ml monomert használtunk 0,8 OD egység eléréséhez, míg 0,1 mg/ml dimert kellett ugyanehhez az eredményhez használni. Lásd 12. ábra.

[189.] A dimert SDS-PAGE elektroforézis, gélszűrési kromatográfia, ELISA, radioreceptor kötés és FACS segítségével karakterizáltuk. A dimer látszólagos kötése magasabb volt a monomerénél, az aviditás hatása miatt. Ezt a hatást glykocalicin-hez való kötéssel is ellenőriztük, ELISÁ-val, KG-1-hez FACS segítségével, és kompetíciós radioreceptor assay-vel.

[190.] HPLC technikát alkalmaztunk, a dimer profiljához, az áthajtogatódás és a Superdex 75 géloszlopon való panning után. A 10. ábrán, a Y1-cys-kak (dimer) az első csúcs balról (~10.8 perc), és az ezt követő csúcs a monomer (~12 perc). A dimer megközelítőleg 52 kDa, a monomer pedig 26 kDa, a protein méretű markerek ugyanazon az oszlopon történő futásával összhangban. A dimer és a monomer közti egyensúly változtatható a hajtogatás körülményeinek változtatásával (a hajtogató oldatban levő oxidáló ágens és a fehérje koncentrációjával a hajtogató pufferen). A dimert és a monomert superdex 75 kromatográfias oszlopon választottuk szét.



[191.] A 11. ábrán egy gél látható kevert dimer és monomer populációval. A redukált formában a monomerek láthatók, a két monomer közti redukciónak köszönhetően, és a nem redukált formában mindkét populáció látszik (mint a gélszűrési kísérletben), egy monomer frakció kb. 30 kDa-nál, és egy dimer frakció kb. 60 kDa-nál.

[192.] Ezen felül, a KG-1 sejtekhez való kötődés FACS-analízise azt mutatta, hogy a dimer érzékenyebb, mint a monomer, amikor két- vagy háromlépéses kötődési vizsgálatot végzünk. A közvetlenül FITC segítségével jelölt dimerek enyhe előnyt mutattak (10x kevesebb anyagot kellett használni), mint a monomer. A radioreceptor assay próba KG-1 sejteken, ahol a dimert, mint kompetitort használtuk, azt mutatta, hogy a dimer 30x hatékonyabb, mint a monomer.

[193.] A spacerok hosszának változtatása is egy előnyös módszere a dimerek, trimerek és tetramerek (melyeket diatesteknek, triatesteknek, és tetratesteknek is neveznek, ebben a sorrendben) létrehozásának. Dimerek általában olyan körülmények között jönnek létre, amikor a spacer, amely az scFv két variábilis láncát köti össze, lerövidítjük. Ez a rövidített spacer gátolja ugyanannak a molekulának a két variábilis láncát egy funkcionális Fv doménné behajtogatódni. Ehelyett, a domének arra kényszerülnek, hogy párt alkossanak egy másik molekula komplementer doménjével, így két kötő domént hoznak létre. Egy előnyös módszer szerint, egy csak 5 aminosavból álló spacer (Gly₄Ser) használunk dimerek konstrukciójára. Ez a dimer két egyforma scFv-ből képződhet, vagy két különböző scFv populációból, és megtartja az eredeti scFv szelektív és/vagy specifikus erősebb kötési tulajdonságát, és/vagy megnövekedett kötési erősséget vagy affinitást mutat.

[194.] Hasonló módon, trimereket általában olyan körülmények között képezünk, amikor a két variábilis láncot összekötő spacer általában 5 aminosavnál rövidebbre rövidítjük le, így meggátolva hogy ugyanannak a molekulának a két variábilis lánc funkcionális Fv doménné hajtogatódjon. Ehelyett 3 különböző scFv molekula asszociálódik, hogy egy trimert alkosson. Egy előnyös módszer szerint trimerek kinyerésére ezen flexibilis spacer teljesen eltávolítottuk. Trimerek létrejöhetnek 3 egyforma scFv-ből, vagy két, vagy három különböző scFv populációból, és megtartják az eredeti scFv szelektív és/vagy specifikus erősebb kötési tulajdonságát, és/vagy megnövekedett kötési erősséget vagy affinitást mutatnak.



[195.] Tetramerek hasonló módon általában úgy képződnek, hogy a két variábilis láncot összekötő spacer általában 5 aminosavnál rövidebbre rövidítjük le, meggátolva, hogy ugyanannak a molekulának a két variábilis lánc funkcionális Fv doméné hajtogatódjon. Ehelyett, 4 különálló scFv molekula asszociálódik, hogy tetramert alkosson. A tetramer állhat 4 egyforma scFv-ből, vagy 1-4 egyedi egységből, amelyek különböző scFv populációkból származnak, és meg kell, hogy tartsák az eredeti scFv szelektív és/vagy specifikus erősebb kötési tulajdonságát, és/vagy megnövekedett kötési erősséget vagy affinitást kell mutatniuk.

[196.] Akár trimerek, akár tetramerek képződnek az adott körülmények között, ahol a spacer általában rövidebb, mint 5 aminosavmaradék, a keverékben résztvevő scFv molekula aminosav szekvenciájától, valamint a reakció körülményeitől függ.

[197.] Egy előnyös módszer szerint a tetramerek létrehozhatók biotin/streptavidin asszociációval. Egy új fermentációs konstrukciót dolgoztunk ki, ami biotinnal enzimatikusan jelölhető (itt Y1-biotag, vagy Y1-B néven hivatkozunk). Egy olyan szekvenciát adtunk az Y1 C-terminusához, amely a BirA enzim egy szubsztrátja. A BirA enzim egy biotint ad a szekvenciában levő lizin maradvékhoz. Az Y1-biotagot klónoztuk és E. coliban expresszáltuk. Az inklúziós test anyagát izoláltuk és újrahajtogattuk. A hajtogatott fehérje tisztasága több, mint 95%, és több, és több mint 100 mg-ot kaptunk egy 1 L kultúrából (kis-léptékű, nem optimalizált körülmények). Ennek a formának a molekulatömegét hasonlónak találtuk az scFv-hez, HPLC, SDS-PAGE és tömegspektroszkópia szerint. Az Y1-biotagot találtuk a legkonzisztensebb reagensnek az FACS analízishez. Azonban, amikor az Y1-biotag KG-1 sejtekhez való kötődését vizsgáltuk szérumban jelenlétében, magas koncentrációkat (10x annyit) kellett alkalmaznunk hasonló kötés eléréséhez, mint szérumban nélkül. Mindazonáltal, ez a konstrukció megkívánja a specifikus biotinizálást előnyét, amelyben a molekula kötőhelye intakt marad. Továbbá, minden molekulát csupán egy biotin jelöl – minden molekula karboxi-végéhez egy biotin kötődik.

[198.] Egy biotin/molekulára korlátozva a jelölés egy kívánt helyen, lehetővé teszi a tetramerek létrehozását streptavidin segítségével. Y1-B-t inkubáltunk streptavidin-PE-vel, így kaptunk tetramereket.



[199.] A FACS-analízis szerint a streptavidin-PE és Y1 biotag segítségével létrehozott tetramerek 100-1000x olyan érzékenyek, mint az Y1 scFv monomerek, szérumban. Az Y1-biotag streptavidin-PE tetramerek úgy tűnik, specifikusan kötődnek az egyik Y1-pozitív sejtvonalhoz (KG-1). Ennek a reakciónak a háttérkötéshez viszonyított különbsége igen magas volt, és nagy érzékenységet kívánt meg alacsony receptormennyiségek detektálásához. Y1BSAV tetramereket tartalmazó normál vér FACS-analízise azt mutatta, hogy nincs jelen nagy reaktivitású populáció. Monociták és granulociták csak kis mértékben voltak pozitívak. Azokban a sejtvonalakban, ahol pozitív eredményt kaptunk, mint például a KG-1 sejtvonal, a tetramerek legalább 100x reaktívabbak voltak.

[200.] Ezt követően a tetramereket sejtes mintákkal inkubáltuk. Az Y1 tetramer kis dózisa (5 ng) jól kötődik a sejtvonalhoz (KG-1), és 10-20x magasabb választ ad, mint előzőleg más Y1 antitestekkel megfigyeltük. Igen gyenge reakciót kaptunk, amikor negatív sejtvonalat vizsgáltunk különböző tetramer dózissal.

[201.] A találmány egy megvalósítási módja egy olyan módszert is szolgáltat, amely lehetővé teszi az ismeretlen kötőhelyekhez keresztreakcióval kötődő targetáló molekula azonosítását, mely kötőhelyek az első vagy második sejten vannak, és tartalmaznak (a) egy vagy több biopanning lépést, amelyeket a második, de nem az első fázisban levő első target sejten valósítunk meg, mely lényegében hozzáférhetővé tesz vagy felfed egy ismeretlen ligandumot tartalmazó kötőhelyet, és így a felismerő molekulák első populációját hozza létre; (b) egymást követő biopanning és/vagy szelekciós lépéseket, amelyek az (a) lépés felismerő molekuláinak készletével kezdődnek, amely lépéseket egy második sejten valósítunk meg, ami felfed egy ismeretlen ligandumot tartalmazó kötőhelyet, mely keresztreakcióba lép az első sejt ismeretlen ligandjával, és így hozzák létre a felismerő molekulák második populációját; (c) a (b) lépésből kapott felismerő molekulák második populációjának amplifikációja és tisztítása; és (d) a (c) lépés tisztított felismerő molekuláinak felismerőhelye alapján peptidek és polipeptidek konstrukciója, melyek tartalmazzák a targetáló molekulákat, és amik szelektívek és/ vagy specifikusak a második sejt ismeretlen ligandjára.

[202.] Egy előnyös megvalósítási mód biztosítja az első sejtet, ami egy normál sejt, az első fázist, ami egy nem aktivált fázis, a második fázist, ami egy aktivált, serkentett,



módosult, megváltozott, vagy megzavart fázis. Egy előnyösebb megvalósítási módban a második sejt kóros sejt. Egy még előnyösebb megvalósítási módban a kóros sejt rákos sejt. A rákos sejt lehet, de nem kizárólag, carcinoma, sarcoma, leukemia, adenoma, lymphoma, myeloma, blastoma, seminoma, és melanoma. Egy még előnyösebb megvalósítási módban a rákos sejt leukémia sejt. Egy legegélyösebb megvalósítási módban a leukémia sejt AML sejt.

[203.] A jelen találmány egy megvalósítási módja módszert szolgáltat arra, hogy hogyan lehet peptideket vagy polipeptideket, adott esetben asszociában, hozzákapcsolva, párosítva, kombinálva, kötve vagy fuzionálva egy gyógyszerhatóanyaghoz, felhasználni a gyógyszeriparban. Egy előnyös megvalósítási módban a gyógyszernek kóros sejt elleni hatása van. Egy még előnyösebb megvalósítási módban rákos sejt elleni hatása van. A rákos sejt lehet, de nem kizárólag, carcinoma, sarcoma, leukemia, adenoma, lymphoma, myeloma, blastoma, seminoma, és melanoma. Egy még előnyösebb megvalósítási módban a rákos sejt leukémia sejt. A legegélyösebb megvalósítási módban a leukémia sejt AML sejt.

[204.] A találmány egy megvalósítási módja olyan gyógyszerkészítményt is szolgáltat, amely különböző scFv monomerek keverékét és/vagy különböző scFv-kből készített dimerek, trimerek vagy tetramerek keverékét tartalmazza.

[205.] Egy további megvalósítási mód a találmány szerinti peptid vagy polipeptid alkalmazását szolgáltatja, asszociációban, hozzákapcsolva, párosítva, kombinálva, kötve vagy fuzionálva egy gyógyszerhatóanyaghoz, egy gyógyszer előállítására. A gyógyszernek a kóros sejt elleni hatása lehet, ezen belül rákos sejtek elleni hatása lehet. A rákos sejt lehet, de nem kizárólag, carcinoma, sarcoma, leukemia, adenoma, lymphoma, myeloma, blastoma, seminoma, és melanoma. Egy előnyösebb megvalósítási módban a gyógyszer leukaemiás sejtek ellen fejt ki hatását. A legegélyösebb megvalósítási módban a gyógyszer aktív AML-sejtekkel szemben. A gyógyszernek az említett sejtekkel szembeni hatása okozhatja a rákos növekedés késleltetését, bármilyen növekedés teljes prevencióját, vagy a rákos sejtek elpusztítását.

[206.] A találmány egyik megvalósítási módjában a gyógyszernek vagy a gyógyszerkészítménynek sejtnövekedést gátló hatása van.



[207.] A találmány szerinti peptid vagy polipeptid felhasználható olyan készítmény, előnyösen olyan gyógyszerkészítmény előállítására, amely felhasználható a rákos sejtek növekedésének gátlására, előnyösen a leukaemiás sejtek, és legelőnyösebben az AML-sejtek gátlására. A találmány egy megvalósítási módjában a peptid vagy polipeptid felhasználható olyan készítmény, előnyösen gyógyszerkészítmény előállítására, amelyet alkalmazni lehet a rákos sejtek növekedésének gátlására, amely említett készítmény tartalmaz legalább egy vegyületet, amelynek van egy rákos sejtre szelektív és/vagy specifikus gyógyszerészeti ligandumja.

[208.] A találmány tárgya szerinti peptid vagy polipeptid önmagában is adagolható a páciensnek, vagy tartalmazva egy gyógyszert, vagy gyógyszerkészítményt, asszociációban, konjugálva, kötve vagy fuzionálva egy gyógyszerészetileg hatékony mennyiségű gyógyszerhatóanyaghoz, egy gyógyszerészetileg hatásos hordozót, és, adott esetben egy adjuvánt. Az ilyen gyógyszerkészítmények tartalmazhatnak fehérjéket, higitókat, tartósítókat és antioxidánsokat (lásd Osol *et al.* (eds.), *Remington's Pharmaceutical Sciences* (16th ed), Mack Publishing Company, (1980)).

[209.] Egy másik megvalósítási módban a gyógyszerhatóanyag egy antitest, vagy annak fragmentje, amely peptidkötéssel hozzá van kötve a találmány szerinti peptidhez vagy polipeptidhez.

[210.] Egy előnyös megvalósítási módban a toxin lehet például gelonin, Pseudomonas exotoxin (PE), PE40, PE38, diphtheria toxin, ricin toxin, vagy ezek módosításai vagy származékai.

[211.] Egy előnyös megvalósítási módban a radioaktív izotópok lehetnek gamma sugárzást, pozitront, és Röntgen-sugárzást kibocsátók, amelyeket lokalizációra és/vagy terápiára lehet felhasználni, és béta és alfa sugárzást kibocsátók, amik terápiára használhatók.

[212.] A találmány tárgyának egy specifikus megvalósítási módjában a terápiás radioaktív izotópok a következő csoportból választhatók: ¹¹¹indium, ¹¹³indium, ^{99m}rénium, ¹⁰⁵rénium, ¹⁰¹rénium, ^{99m}technécium, ^{121m}tellúr, ^{122m}tellúr, ^{125m}tellúr, ¹⁶⁵túlium, ¹⁶⁷túlium, ¹⁶⁸túlium, ¹²³jód, ¹²⁶jód, ¹³¹jód, ¹³³jód, ^{81m}kripton, ³³xenon, ⁹⁰yttrium, ²¹³bizmut, ⁷⁷bróm,



¹⁸fluor, ⁹⁵ruténium, ⁹⁷ruténium, ¹⁰³ruténium, ¹⁰⁵ruténium, ¹⁰⁷higany, ²⁰³higany, ⁶⁷gallium és ⁶⁸gallium, valamint az ehhez hasonlóak.

[213.] A találmány tárgyának egy másik specifikus megvalósítási módjában a rák elleni ágens a következő csoportból választjuk ki: doxorubicin (adriamycin), morpholinodoxorubicin, methoxy-morpholinyl-doxorubicin, cis-platinum, taxol, calicheamicin, vincristine, cytarabine (Ara-C), cyclophosphamide, prednisone, daunorubicin, morpholino-daunorubicin, methoxy-morpholinyl-daunorubicin, idarubicin, chlorambucil, interferon alpha, hidroxikarbamid, temozolomide, thalidomide és bleomycin, valamint a származékaik.

[214.] A találmány egy megvalósítási módja a rákos sejtek növekedését gátló módszert is szolgáltat, amely magában foglalja a rákos sejt érintkezését a találmány szerinti peptid vagy polipeptid adott mennyiségével. A rákos sejtek lehetnek, de nem kizárólag, carcinoma, sarcoma, leukemia, adenoma, lymphoma, myeloma, blastoma, seminoma, és melanoma. Egy előnyösebb megvalósítási módban a rákos sejt leukaemiás sejt. Egy legelőnyösebb megvalósítási módban a leukémia sejt AML-sejt. A találmány egy megvalósítási módja alkalmazható a páciensek in vivo vagy ex vivo kezelésére. A találmány egy specifikusabb megvalósítási módja lehetőséget ad az autológ csontvelő ex vivo kipanningára, az abnormális sejteinek eltávolítására.

[215.] A találmány egyik még specifikusabb megvalósítási módjában lehetőség van arra, hogy egy leukaemiás páciens vérének ex vivo cirkuláltassuk egy olyan rendszeren keresztül, amely tartalmaz egy, a találmány szerinti peptidet vagy polipeptidet egy rákellenes ágenshez kapcsolva. A kötött sejtek és a nem kötött rák elleni ágens kiszűrése után a vér visszajuttatható a páciens testébe. Vagy egy alternatív módon, a leukaemiás páciens vére cirkuláltatható ex vivo egy olyan rendszeren keresztül, amelyben a találmány peptidje vagy polipeptidje egy szilárd fázishoz van kötve. A sejtek, amelyek keresztül mennek a rendszeren, és nem kötődnek a szilárd fázishoz kötött peptidhez vagy polipeptidhez, visszajuttathatók a páciens testébe.

[216.] A találmány egy másik előnyös megvalósítási módjában a peptid vagy polipeptid használható arra, hogy az autológ, szuszpenzióban levő csontvelőből, ex vivo eltávolítsuk az abnormális őssejteket, implantáció céljaira. Az abnormális őssejtektől való megpanning történhet úgy, hogy a szuszpenziót szilárd tölteten futtatjuk (ilyenek, de nem



kizárólag, a mágneses gyöngyök és affinitás oszlopok), amelyekhez a találmány szerinti peptid vagy polipeptid (vagyis a targetáló molekula), ezek konstrukciói, fragmentjei, a konstrukciók fragmentjei, vagy a fragmentek konstrukciói kötve vannak. Az így, ex vivo megtisztított csontvelő alkalmas a későbbiekben autológ csontvelő-transzplantációra. Ez a módszer azon alapszik, hogy jelen találmányban azonosított fagemid klón (Y1) kötődik a leukaemiás páciensek csontvelőjéből származó őssejtekhez, de nem kötődik az egészséges alanyok csontvelőjéből származó őssejtekhez. Hasonlóképpen, az Y1 fagemid klón kötődik a FACS segítségével abnormálisként meghatározott blaszt sejtekhez, valamint leukaemiás sejtekhez.

[217.] A blaszt sejteket itt úgy definiáltuk, mint azon elsődleges sejtek, amelyek prekurzorként szolgálnak minden emlős szervezetben keringő sejthez. A progenitor sajátságaiuknak köszönhetően, nem találunk szignifikáns mennyiségű keringő blaszt sejtet a felnőtt szervezetben. Külső stimuláció nélkül a keringésben levő blaszt sejtek jelenléte kóros elváltozásra utal, például a vérképző rendszerére, és a blaszt sejtek ezt követő eltűnése a malignus kór remisszióját jelentheti.

[218.] A találmány egy másik megvalósítási módjában a gyógyszerkészítmény profilaxisra használható.

[219.] Egy előnyös megvalósítási módban a találmány szerinti két, vagy több peptidet vagy polipeptidet kombináltuk, hogy létrehozzunk egy keveréket.

[220.] Ahogy itt használjuk, a keverék azt jelenti, hogy kettő, vagy több különböző típusú molekula vagy részecske található meg egyetlen keverékben. A különböző típusú molekulák vagy részecskék sem kovalens sem nem kovalens kötéssel nem kötnek egymáshoz.

[221.] A találmány egyik megvalósítási módjában a találmány szerinti peptid vagy polipeptid egy gyógyszerhatóanyaghoz van kötve, fuzionálva, vagy konjugálva.

[222.] A találmány egy másik megvalósítási módjában a találmány szerinti peptid és a gyógyszerhatóanyag közti kötés közvetlen kötés. Közvetlen kötés alatt azt értjük, amikor két vagy több szomszédos molekula között a kötés a molekulák elemei vagy csoportjai közötti kémiai kötés. Kémiai kötés lehet például, ionos kötés, kovalens kötés,



hidrofób kötés, hidrofil kötés, elektrosztatikus kötés, vagy hidrogénkötés. A kötések a következőket, de nem kizárólag, tartalmazó csoportból választjuk ki: amino-, karboxi-, amid-, hidroxil- peptid- és diszulfid-csoport. A közvetlen kötés előnyösen proteázrezisztens kötés lehetne.

[223.] Még egy másik megvalósítási módban a peptid és a gyógyszerhatóanyag közti kötés milyenségét meghatározza a kötő vegyület. Ahogy a specifikációban és az igénypontban is használjuk, a kötő vegyületet egy olyan vegyületként definiáljuk, amely két vagy több egységet összekapcsol egymással. A kötő vegyület lehet egyenes láncú, vagy elágazó. Az elágazó láncú kötő vegyület lehet dupla-, tripla-, négy-, vagy többszörösen elágazó vegyület. A kötő vegyület lehet, de nem kizárólag, dikarbonsav, maleimido-hidrazid, PDPH, karboxilsav-hidrazid, vagy egy kis peptid. Példák egyéb kötő komponensekre: dikarboxilsavak, mint borostyánkősav, glutársav, adipinsav; Maleimido hidrazidok, mint N-[γ -maleimido-kapronsav]-hidrazid, 4-[N-maleimido-metil]-ciclohexán-1-karboxil-hidrazid, és N-[6-maleimido-undekánsav]-hidrazid]; PDPH kötő molekulák, mint (3-[2-piridil-dithio]-propionil-hidrazid) szulfhidril-reaktív fehérjével konjugálva; Karboxilsav-hidrazidok, melyek 2-5 szénatomot tartalmaznak; és közvetlen kötések, kis peptid linkereket használva, például a rákellenes doxorubicin szabad cukor részei és egy scFv között. Kis peptidok lehetnek, de nem kizárólag: AU1, AU5, BTag, c-myc, FLAG, Glu-Glu, HA, His6, HSV, HTTPHH, IRS, KT3, Protein C, S-TAG[®], T7, V5, VSV-G, és KAK Tag.

[224.] A találmány szerinti peptid vagy polipeptid adagolható bármely ismert módszerrel, mint: intravénás, intramuszkuláris, szubkután, topikal, intratracheális, intraperitoneális, intralimfatikus, nazális, nyelv alatti, orális, rektális, vaginális, légzőszervi, bukkális, intradermális, transzdermális vagy intrapleurális.

[225.] Intravénás adagolásnál, a formulálást előnyösen úgy lehet elvégezni, hogy a páciensnek adagolt mennyiség egy kb. 0,1 – kb. 1000 mg közötti hatékony mennyiség lesz a kívánt készítményben. Még előnyösebb, ha az adagolt mennyiség kb. 1 – kb. 500 mg közé esik a kívánt készítményben. A találmány szerinti készítmények egy széles dózissávon belül hatékonyak, és olyan faktoroktól függenek, mint például, mi a betegség, amelyet kezelni szeretnénk vele, mi a peptid, vagy polipeptid alapú gyógyszerhatóanyag féléletideje a páciens szervezetében, mik a gyógyszerhatóanyag és a gyógyszerkészítmény fizikai és



kémiai tulajdonságai, mi a gyógyszerkészítmény adagolásának módja, mik a kezelendő vagy diagnosztizálandó páciens sajátosságai, valamint olyan paraméterek, amelyeket a kezelést végző orvos fontosnak ítél.

[226.] Orális adagolásra alkalmas gyógyszerkészítmény lehet tablettá, folyadék, emulzió, szuszpenzió, szirup, pirula, vagy kapszula formában. A gyógyszerkészítményt egy eszköz segítségével is lehet adagolni.

[227.] Topikális adagolásra alkalmas gyógyszerkészítmény lehet krém, kenőcs, rázókeverék, balzsam, tapasz, oldat, szuszpenzió, vagy gél.

[228.] Továbbá, a gyógyszerkészítmény előállítható szilárd, folyékony, vagy hosszantartó felszabadulású formában is.

[229.] A találmánynak megfelelően előállított antitest fragmenteket tartalmazó készítmények tartalmazhatnak hagyományos gyógyszerészetileg elfogadott hígítokat, vagy hordozókat. A tabletták, pirulák, és kapszulák tartalmazhatnak konvencionális adalékanyagokat (excipients), mint laktóz, keményítő, és magnézium-sztearát. A kúpok tartalmazhatnak adalékanyagokat, mint például viaszok és glicerin. Az injekciós oldatok tartalmazhatnak steril pirogén-mentes közeget, mint fiziológiás sóoldat, és lehetnek bennük pufferoló, stabilizáló anyagok, vagy tartósítók. Hagományos bélbvonók is alkalmazhatók.

[230.] Jelen találmány szintén magában foglal egy már a szakirodalomból ismert szintetikus módszert az antitest fragment előállítására.

[231.] A találmányban egy megvalósítási módja magában foglal egy olyan gyógyszerkészítményt, amely legalább egyet tartalmaz a találmány szerinti peptidből, vagy polipeptidből, kapcsolva, párosítva, kombinálva, kötve vagy fuzionálva egy diagnosztikus lokalizációhoz és/vagy tumor megjelenítéséhez használatos képalkotó ágenshez.

[232.] A találmány egy további megvalósítási módja szolgáltat egy diagnosztikai kit-et, a kezelés hatékonyságának in vitro analiziséhez, a kezelés előtt, alatt, vagy után, amely tartalmaz egy képalkotó ágenst, amely a találmány szerinti peptidet, egy indikatív marker molekulához kötve tartalmazza. A találmány továbbá szolgáltat egy módszert is, a képalkotó ágens felhasználására a diagnosztikus lokalizációhoz és/vagy a rák, elsősorban a tumor megjelenítéséhez, és amely a következő lépésekből áll:

- a) a sejtek kapcsolatba hozása a készítménnyel,
- b) a sejtekhez kötött radioaktivitás mérése, és
- c) a tumor megjelenítése.

[233.] A találmány egy előnyös megvalósítási módjában a kit képkalkotó ágense egy fluoreszcens festék, és a kit lehetővé teszi a rákos megbetegedések kezelési hatékonyságának analizisét, elsősorban a vérhez kötött rákos megbetegedéseket, mint például a leukémia, lymphoma és myeloma. FACS-analizist használtunk a képkalkotó ágenssel megfestett sejtek százalékanak megállapítására, valamint a festés intenzitásának megállapítására a betegség minden fázisában, tehát a diagnóziskor, a kezelés során, a remisszió és a visszaesés során.

[234.] A találmány továbbá biztosít egy készítményt, amely hatékony mennyiségű képkalkotó ágenszt, a találmány szerinti peptidet és egy fiziológiailag elfogadható hordozót tartalmaz.

[235.] A találmány egy előnyös megvalósítási módjában az indikatív marker molekula lehet bármely a szakirodalomból már ismert marker, amelyek közé tartoznak, de nem kizárólag, a radioaktív izotóp, olyan elem, amely nem áttetsző a Röntgen-sugarak számára, paramagnetikus ion, vagy fluoreszcens molekula, és ehhez hasonlók.

[236.] A találmány egy specifikus megvalósítási módjában az indikatív radioaktív izotóp lehet, de nem kizárólag a következő: $^{111}\text{indium}$, $^{113}\text{indium}$, $^{99\text{m}}\text{rénium}$, $^{105}\text{rénium}$, $^{101}\text{rénium}$, $^{99\text{m}}\text{technécium}$, $^{121\text{m}}\text{tellúr}$, $^{122\text{m}}\text{tellúr}$, $^{125\text{m}}\text{tellúr}$, $^{165}\text{túlium}$, $^{167}\text{túlium}$, $^{168}\text{túlium}$, $^{123}\text{jód}$, $^{126}\text{jód}$, $^{131}\text{jód}$, $^{133}\text{jód}$, $^{81\text{m}}\text{kripton}$, $^{33}\text{xenon}$, $^{90}\text{yttrium}$, $^{213}\text{bizmut}$, $^{77}\text{bróm}$, $^{18}\text{fluor}$, $^{95}\text{ruténium}$, $^{97}\text{ruténium}$, $^{103}\text{ruténium}$, $^{105}\text{ruténium}$, $^{107}\text{higany}$, $^{203}\text{higany}$, $^{67}\text{gallium}$ és $^{68}\text{gallium}$.

[237.] A találmány egy másik előnyös megvalósítási módjában az indikatív marker molekula egy fluoreszcens marker molekula. Egy előnyösebb megvalósítási mód szerint a fluoreszcens marker molekula fluorescein, phycoerythrin, vagy rhodamin, vagy ezek módosított változatai, illetve konjugátumai.



[238.] A találmány tárgya egy olyan készítményt is, amely a találmány szerinti képkalkotó ágens hatékony mennyiségét, egy ehhez kapcsolt gyógyszerhatóanyagot és egy fiziológiailag elfogadott hordozót tartalmaz.

[239.] A találmány szolgáltat egy módszert is egy szerv vagy sejtek megjelenítésére, amelyben a szervet vagy a sejteket olyan körülmények között jelenítjük meg, hogy a találmány szerinti képkalkotó ágense hozzáköt a szervhez vagy a sejtekhez, megjelenítve a kötött képkalkotó ágenszt, és ezzel láthatóvá téve a szervet vagy a sejteket.

[240.] A találmány tárgya továbbá egy módszer egy szerv in vivo kezelésére úgy, hogy a kezelendő szervet kapcsolatba hozzuk a találmány szerinti készítménnyel olyan körülmények között, hogy a készítmény hozzáköt a szervhez, ezáltal kezelve azt.

[241.] A találmány egy előnyös megvalósítási módjában a peptid vagy polipeptid használható arra, hogy malignus sejteket targetáljon, még specifikusabban leukaemiás sejteket a vérben, és azok így monitorozhatóvá és láthatóvá tehetők, például FACS-analízissel. A normál sejtekhez képest a magas értékeket kapó (például négyszer magasabb) tumor sejt vizsgálati minták kezelendők.

[242.] A találmány biztosítja a rákos megbetegedésben szenvedő páciens kezelését, amely amgában foglalja a találmány szerinti peptid vagy polipeptid adagolását a betegnek a rák kezeléséhez hatékony emnnyiségben. Egy előnyös megvalósítási módban a rákos megbetegedést a következőket tartalmazó csoportból választjuk ki: carcinoma, sarcoma, leukemia, adenoma, lymphoma, myeloma, blastoma, seminoma, és melanoma. Egy előnyösebb megvalósítási mód ban a rák leukaemia és egy legspecifikusabb megvalósítási módban a leukémia AML.

[243.] A találmány egy legelőnyösebb megvalósítási módjában a találmány szerinti peptid vagy polipeptid specifikusan vagy szelektíven köt az AML-sejtekhez. A találmány leír egy az AML-sejteken prezentált ligandot, amelyhez a találmány szerinti peptid vagy polipeptid kötődik, és szolgáltat továbbá egy peptidet vagy polipeptidet, amely kötődik az említett ligandhoz.



[244.] A találmány szerinti új antitest fragmentek, vagy azok peptid-utánzói használhatók gyógyszerek vagy készítmények gyártására, melyekkel különböző betegségeket különböző körülmények között kezelni lehet.

[245.] Jelen találmány szolgáltat egy módszert egy targetáló ágens előállítására, amely a következő lépéseket tartalmazza:

- a) egy elsődleges felismerőhelyet tartalmazó egy vagy több targetáló molekula izolálása és szelektálása egy biopanning eljárással közvetlenül a target sejten, vagy egy biopanning eljárással indirekt a második, de nem az első fázisban levő első sejten, és ezt követően egy biopanning eljárással közvetlenül a második target sejten, egy vagy több úgynevezett targetáló molekula előállítása cljából;
- b) az egy vagy több targetáló molekula amplifikációja, tisztítása és azonosítása; és
- c) egy vagy több targetáló molekula, vagy a felismerőhelyeik alapján targetáló ágens létrehozása, ahol a targetáló ágens lehet peptid, polipeptid, antitest, vagy antitest fragment, vagy ezek egy multimerje.

[246.] A targetáló ágens előállítható úgy is, hogy egy gyógyszerhatóanyaghoz kapcsoljuk, párosítjuk, kombináljuk, kötjük, fuzionáljuk vagy asszociáljuk.

[247.] A találmány egy előnyös megvalósítási módjában a targetáló ágens egy betegség elleni, vagy rák elleni ágens.

[248.] A találmány egy másik előnyös megvalósítási módjában a gyógyszerhatóanyag lehet radioaktív izotóp, toxin, oligonukleotid, rekombináns fehérje, antitest fragment, és rákelleni ágens. A radioaktív izotópot a következő csoportból választjuk ki: ¹¹¹indium, ¹¹³indium, ^{99m}rénium, ¹⁰⁵rénium, ¹⁰¹rénium, ^{99m}technécium, ^{121m}tellúr, ^{122m}tellúr, ^{125m}tellúr, ¹⁶⁵túlium, ¹⁶⁷túlium, ¹⁶⁸túlium, ¹²³jód, ¹²⁶jód, ¹³¹jód, ¹³³jód, ^{81m}kripton, ³³xenon, ⁹⁰yttrium, ²¹³bizmut, ⁷⁷bróm, ¹⁸fluor, ⁹⁵ruténium, ⁹⁷ruténium, ¹⁰³ruténium, ¹⁰⁵ruténium, ¹⁰⁷higany, ²⁰³higany, ⁶⁷gallium és ⁶⁸gallium.

[249.] Egy másik megvalósítási módban a toxint a következő csoportból választhatjuk ki: gelonin, Pseudomonas exotoxin (PE), PE40, PE38, diphtheria toxin, ricin toxin, illetve ezek módosított változatai vagy származékai.



[250.] A találmány még egy másik megvalósítási módjában a rák elleni ágenszt a következő csoportból választhatjuk ki: doxorubicin (adriamycin), morpholino-doxorubicin, methoxy-morpholinyl-doxorubicin, cis-platinum, taxol, calicheamicin, vincristine, cytarabine (Ara-C), ciklo-foszfamid, prednisone, daunorubicin, morpholino-daunorubicin, methoxy-morpholinyl-daunorubicin, idarubicin, fludarabine, chlorambucil, interferon alpha, hidroxi-karbamid, temozolomide, thalidomide és bleomycin, valamint származékaik.

[251.] A találmány szolgáltat egy módszert az antitest fragmentek azonosítására: (a) biopanning, ami magában foglalja egy phage display library inkubálását vérből származó sejtekkel; (b) mosás a nem kötött fágok eltávolítására; (c) a kötött fágok eluálása a vérsejtekről; (d) a kapott kötött fágok amplifikálása; és (e) a kötött fág felfedett peptid szekvenciájának meghatározása, vagyis a peptid azonosítása.

[252.] A találmány szolgáltat egy peptidet vagy polipeptidet, amelynek a következő a szerkezete:

A - X - B

ahol X egy 3-30 aminosav hosszú CDR3 hipervariábilis régió; A és B bármelyike lehet 1-1000 aminosav hosszú aminosav lánc, ahol A az amino-vég, és B a karboxi-vég.

[253.] A találmány egy előnyös megvalósítási módjában A 150-250 aminosavmaradék hosszú, és B 350-500 aminosavmaradék hosszú.

[254.] Egy másik előnyös megvalósítási módban a peptid CDR3 régiója 5-13 aminosav amradék hosszú.

[255.] Egy másik előnyös megvalósítási módban a fenti formulában található X egy aminosav szekvencia, melyet a következőket tartalmazó csoportból választottunk: SEQ ID NOs:8-24.

[256.] A találmány egy másik megvalósítási módjában a peptid vagy polipeptid egy nagyobb vagy teljes antitest, vagy egy multimer része.

[257.] A találmány még egy másik megvalósítási módjában egy dimer molekula két peptidet vagy polipeptidet tartalmaz, amelyek közül egy, vagy mind a kettő a találmány

szerinti. A dimer molekula tartalmazhat két azonos, a találmány szerinti peptidet, vagy polipeptidet.

[258.] A találmány egy előnyös megvalósítási módjában X egy olyan aminosav szekvencia, amelyet a következőket tartalmazó csoportból választotunk ki: SEQ ID NOs:8-24, egy úgynevezett dimer molekulában.

[259.] Egy másik megvalósítási mód a találmány szerinti peptidet vagy polipeptidet vagy dimerjét kódoló nukleinsav molekulát szolgáltatja.

[260.] A találmány biztosítja a peptid vagy polipeptid alkalmazását a gyógyszeriparban, adott esetben asszociálva, kapcsolva, kötve, fuzionálva, vagy kombinálva van egy gyógyszerhatóanyaggal.

[261.] A találmány továbbá biztosítja a peptid vagy olyan polipeptid alkalmazását a gyógyszeriparban, amelyeknek kóros, elsősorban rákos sejtek elleni hatása van. A rákos sejt lehet: sarcoma, leukemia, adenoma, lymphoma, myeloma, blastoma, seminoma, és melanoma. Még specifikusabban a rákos sejt lehet leukaemia sejt, és legspecifikusabban aleukémia sejt lehet AML-sejt.

[262.] Egy cserélhető rendszer, ahogy jelen találmányban definiáltuk, és ahogy lejjebb tárgyaljuk a példákon keresztül, egy olyan nukleinsav konstrukció, melyet arra terveztünk, hogy egy újra definiált variábilis régió kicserélhető vagy helyettesíthető legyen a konstrukción belül, a molekula újbóli felépítése, vagy további manipulálása nélkül. Egy ilyen rendszer lehetővé teszi a kívánt nukleinsav molekula gyors és kényelmes előállítását.

PÉLDÁK

[263.] A találmányt a következő példákban részletezzük, anélkül, hogy oltalmi igényünket bármi módon azokra korlátoznánk. Bár specifikus reagenseket és reakció-körülményeket írtunk le, olyan módosítások tehetők, amelyeket a találmány alkalmazási területe megenged. A következő példák ezért azt a célt szolgálják, hogy a találmány további illusztrációját adják.

1. PÉLDA:



[264.] **1.** Sejtek preparálása, bakteriális törzsek, scFv phage display library, sejtmembránok és fehérjepanning a biopanning eljáráshoz.

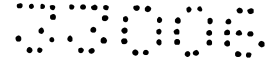
[265.] **1.1 Leukaemiás sejtek preparálása.** Leukaemiás páciensekből vérmintát veszünk. Az egymagvú sejteket (primer sejtek) elválasztjuk a többi vérszettől Ficoll módszerrel (Iso-prep, Robbins Scientific Corp., Sunnyvale, CA, USA). A centrifugálás 110 x g-vel, 25 percig történt. A határfelületen levő sejteket összegyűjtjük, és kétszer mossuk PBS-ben. A sejteket ezután szuszpendáljuk RPMI + 10% főtális szarvasmarha szérumban (fetal calf serum FCS), és megszámloljuk. Hosszú távú tárolásra 10% FCS-t és 10% DMSO-t adunk a limfocitákhoz, melyeket megfagyasztunk -70°C -on.

[266.] **1.2 Fixált vérlemezkék preparálása.** Alvadt vérből kapott vérlemezke koncentrátumot 1 órán át inkubálunk 37°C -on. 0,2 tf% paraformaldehidet adunk hozzá egyenlő térfogatban, és a vérlemezkéket 18 órán át, 40°C -on fixáljuk. A vérlemezkéket kétszer mossuk hideg fiziológiás sóoldatban (centrifugálás 10 percig, 2500 x g-n), majd újra szuszpendáljuk 0,01% HEPES fiziológiás sóoldatban, és megszámloljuk mikroszkóp alatt.

[267.] A vérlemezkék plazma von Willebrand faktorára és ristocetinre való érzékenységet ellenőriztük. A plazma von Willebrand faktort (vWF; 18 mg/ml) és ristocetint (0,6 mg/ml) adtunk a fixált vérlemezkékhez, vérlemezke-aggregációt idéztünk elő, és monitoroztuk egy kronológ lumi-aggregométerrel.

[268.] **1.3 Bakteriális törzsek - TG-1 és HB2151:** Friss bakteriális kultúrákat készítünk az infekcióhoz úgy, hogy a sejteket 0,5-0,9 A_{600} -ig növesztjük (exponenciálisan növekvő sejtek). E. coli TG-1 sejteket használunk a fág szélesztéshez, és E. coli HB2151 sejteket az scFv fehérjék előállításához.

[269.] **1.4 scFv phage display library forrás.** Az scFv library-t (Nissim *et al.*, *EMBO J.*, 13, 692-698 (1994)) Dr. A. Nissim adta, az MRC beleegyezésével. A library eredetileg, mint fagemid library-t hozták létre, amely tartalmazza az scFv fragmenteket, amelyekben a V_H és a V_L doméneket egy flexibilis polipeptid köti össze. A fagemid library-ban megtalálható scFv-eket fuzionáltuk a fág pIII kis burokfehérjéjének N-terminusához, melyt aztán beklónoztunk a pHEN1 vektorba (Nissim *et al.*, *EMBO J.*, 13, 692-698 (1994)). Az antitest fragmentek repertoárjait először PCR segítségével hoztuk létre, nem immunizált



humán perifériás vérben található limfociták átrendezett V-génjeiből (úgynevezett “naív repertoárok”). Hogy a repertoár diverzitását növeljük, a nehéz lánc 4-12 aminosavmaradék hosszú CDR3 régióját kódoló, random nukleinsav szekvenciákat juttattunk be 49 klónozott humán V_H gén szegmensekből álló bankba. Minden klón fuzionált V_L fragmentje egy az IGLV3S1 csírvonalból származó, egyetlen nem mutált V génből származik, így megközelítőleg 10⁸ klónból álló single pot library-t kaptunk.

[270.] 1.5 AML-sejtekből membrán preparálása. A 10⁸ mosott sejtet tartalmazó pallethez 1 ml hideg lizáló oldatot adtunk (0,3M szukróz, 5mM EDTA, 1mM PMSF), majd 20 percig 11 000 x g-n 4°C-on centrifugáltuk. A felülúszó folyadékot leöntöttük, a pelletet újra szuszpendáltuk TE-ben (10mM Tris, 1mM EDTA, 1mM PMSF), és újra centrifugáltuk, mint az előbb. A végső pelletet újra szuszpendáltuk 6 ml PBS-ben, 0,4 A₂₈₀-nál, és 3 MaxiSorp immun-csővet (immuno-tubes, NUNC) vontunk be vele, 37°C-on, 2 órán át. A bevonat elkészítése után a csöveket 3x ráztuk PBS-sel, majd blokkoltuk MPBS-ben (2%-os sovány tejpor PBS-ben), szobahőmérsékleten, 2 órán át. A biopanning előtt a csöveket újra ráztuk 3x, PBS-sel.

2. PÉLDA:

[271.] 2. Fagemid részecskék kezelése: biopanning eljárás

[272.] 2.1 Fagemid kiválasztás és amplifikáció: az érdeklődésre számot tartó epitópotok kifejező fagemidokat kiválasztottuk a library-ból egy négylépéses biopanning eljárás segítségével.

- a) A fagemid részecskék kötése egy targethez, specifikusabban a fagemid részecskék kötése a mosott target sejtekhez vagy sejt membránokhoz
- b) A nem kötött fagemid részecskék eltávolítása, pontosabban az eltávolításuk alapos mosással
- c) A kötött fagemid részecskék eluálása
- d) Az eluált fagemid részecskék szélesztése és amplifikációja, még közelebről szélesztés és amplifikáció E. coliban.



[273.] **2.2 Klón azonosítás:** A négylépéses biopanning eljárást általában 3-5x ismételtük meg. A kiválasztott fagemid klónokat egyedenként szélesztettük és tovább karakterizáltuk:

- a) DNS szekvenálással
- b) A különböző sejttypusokhoz való fág kötés ex vivo összehasonlításával
- c) E. coli HB2151 infekciója, szolubilis scFv létrehozására.

[274.] **2.3 Szekvencia analíziis:** A ~800bp hosszú kódolt scFv DNS amelyben a fagemid részecskét PCR segítségével amplifikáltuk úgy, hogy használtunk egy upstream primert #203743 (5'-GAAATACCTATTGCCTACGG) és egy downstream primert #181390 (5'-TGAATTTTCTGTATGAGG). A teljes DNS fragmenseket szekvenáltuk, mindkét végétől, az automata ABI PRISM DNS-szekvenátorral (310 Genetic Analyzer, Perkin Elmer) úgy, hogy ABI PRISM Big Dye terminációs ciklus szekvenáló felszerelést használtunk, és a fenti primereket. Két további primert, primer #191181 (5'-CGATCCGCCACCGCCAGAG) és a komplementer primert # 191344 (5'-CTCTGGCGGTGGCGGATCG) használtunk a szekvenálásra, melyek a flexibilis polipeptid kötő régióban helyezkednek el, a könnyű és a nehéz láncok között.

EXAMPLE 3:

[275.] **3. Biopanning protokollok**

[276.] **3.1 Alap biopanning protokollok:** A biopanning eljárás lényeges része a fent leírt phage display technológiának. Három biopanning protokollt dolgoztunk ki és használtunk jelen munkában.

- a) **AM Protokoll** (AML sejtek membránjának tisztítása/bakteriális eluálása, melyet egy teljes AML-sejt panning/tripszines eluálás követ)
- b) **YPR Protokoll** (fixált humán vérlemezkék tisztítása/savas eluálása)
- c) **YPNR Protokoll** (fixált humán vérlemezkék tisztítása/savas eluálása)

[277.] E protokollok részletes leírását lásd lejjebb:



[278.] **3.1.1 AM Protokoll**

[279.] **3.1.1.1 Előmosás:** 1 ml aliquot mennyiség hőmérsékletét, amely páciensekből származó, 2×10^7 fagyasztott AML-sejtet tartalmaz, -70°C -on tárolva, gyorsolvasztással 37°C -ra emeljük, és azonnal 10 ml hideg, 2% PBS-tejpor (MPBS) oldattal hígítjuk. A sejteket 5 percig $120 \times g$ -n centrifugáljuk szobahőmérsékleten (RT), kétszer mossuk, újraszuszpendáljuk MPBS-ben, és hemocitóméter segítségével megszámloljuk. A sejtek membránját ugyanúgy preparáljuk, mint az 1.5 pontban leírtuk.

[280.] **3.1.1.2 Szelekció:** Immobilizált AML-sejtek membránján történik, az eredeti Nissim library-ból származó 10^{12} fagemidet tartalmazó 2 ml MPBS hozzáadásával. A csövet lassan rázatjuk 30 percig, majd újabb 90 percig inkubáljuk keverés nélkül, mindkét lépést szobahőmérsékleten. Három AML sejtek membránján végzett panning ciklus után egy teljes panning ciklust hajtunk végre az összes AML-sejten.

[281.] **3.1.1.3 Mosás:** Ahhoz, hogy eltávolítsuk a felesleges nem kötött fagemideket, a cső tartalmát dekantáljuk, majd a csövet 10x kimossuk 0,1% Tween tartalmazó PBS-sel, majd újra 10x kimossuk csak PBS-sel.

[282.] **3.1.1.4 Eluálás:** Exponenciálisan növekvő E. coli TG-1 sejteket (2 ml) adunk közvetlenül a csőbe, és így inkubáljuk lassú keveréssel 30 percig, 37°C -on. Mint feljebb, egy aliquotot mennyiséget tálcára teszünk titrálás céljából, a maradék térfogatot pedig amplifikálásra.

[283.] **3.1.1.5 Amplifikálás:** A nagy tálcáról származó kolóniákat lekapartuk, és egyberaktuk. Egy aliquotnyi ($\sim 10^7$) ampicillin-rezisztens E. coli TG-1 sejtet növesztettünk folyadék kultúrában ~ 0.5 , A_{600} -ra, majd infektáltuk helper faggal (VSC-M13, Stratagene), hogy nagy, amplifikált fagemid készletet kapjunk. A fagemideket PEG kicsapási eljárásnak vetettük alá (18a). A fenti amplifikált T1 6MI készletet ($\sim 10^{11}$ fagemid/ml) használtuk további panning ciklusokra. A szelekciós eljárást még kétszer ismételtük meg, 10^{11} fagemiddel a korábbi amplifikált fagemid készletből. A harmadik panning eljárás után kapott immobilizált membránon levő amplifikált készletet jelöltük T16M3 jelöléssel.

[284.] **3.1.1.6 Re-panning teljes sejteken:** A harmadik membrán panning után kapott amplifikált készletet, a T16M3-at használtuk az intakt AML-sejtek panningára. A



szelekciót 0.5 ml MPBS-ben végeztük, amely 2×10^7 sejtet és 10^{10} fagemid (Nissim könyvtár) kolónia formáló egységet (Colony Forming Units, CFU) és 10^{13} vad típusú M13 bakterifágot tartalmaz, 2 órán át, lassú keveréssel 4°C -on. A kötött fagemideket eluáltuk a mosott sejteket tartalmazó pellettről 50 ml Trypsin.EDTA (0,25%:0,05%) keverékkel, majd neutralizáltuk 50 ml FCS-sel. A titrálásra és amplifikálásra 1 ml E. coli TG-1 kultúrát használtunk ($A_{600} = 0.5$). A végső, amplifikált készletet T16M3.1-nek neveztük.

[285.] **3.1.2 YPR Protokoll**

[286.] **3.1.2.1 Szelekció:** Klónszelekciót alkalmaztunk 10^8 fixált humán vérlemezke panningával, 10^{11} fagemiddel (Nissim könyvtár) 1 ml PBS/HEPES/1%BSA pufferban. A kötődést a minták 1 órán, szobahőmérsékleten való keverésével értük el.

[287.] **3.1.2.2 Sejt mosás:** A vérlemezkéket $5 \times$ mostuk alacsony sebességű centrifugálással ($3500 \times g$), és újra szuszpendálással, mint fent.

[288.] **3.1.2.3 Eluálás:** Az első ciklusban kötődött fagemideket eluáltuk a fixált vérlemezkékről, savas eluciós technikával:

[289.] A vérlemezkéket 10 percig szobahőn inkubáltuk 200 ml 0,1 M glicin (pH 2,2) oldattal. 0,5 M Tris-HCl, pH 8,0 oldattal való neutralizálás és centrifugálás után a megmaradt vérlemezkékhez kötött fagemideket eluáltuk 200ml trypsin-EDTA (0,25%/0,05) oldattal és neutralizáltuk 50 ml FCS oldat hozzáadásával. A sejteket centrifugálással távolítottuk el, és az eluált fágokat tartalmazó felülúszót összegyűjtöttük, mind a savas, mind a tripszines kezelési protokolból, és YPR(a)-l és YPR(t)-l készleteknek neveztük, ebben a sorrendben. Ezeket a készleteket amplifikáltuk 1 ml exponenciálisan növekvő TG-1 sejtek hozzáadásával 30 percen át, 37°C -on. Egy aliqot mennyiséget titráláshoz tálcára tettünk, a maradék infektált E. coli sejteket $2 \times$ TV/AMP 15 cm lemezekre plated. A lemezeket egy éjszakán át inkubáltuk 30°C -on. Minden panning ciklus után az outputot meghatároztuk a titrálásra félretett lemezen levő kolóniák megszámlálásával.

[290.] **3.1.2.4 Amplifikálás:** A klónokat oly módon amplifikáltuk, ahogy az le van írva a 3.1.1.5. pontban. A $\sim 10^{12}$ fagemid/ml-t tartalmazó, savas és tripszines eluálási protokollal kapott amplifikált készleteket, melyeket R1(a) és R1(t) készlet néven neveztünk, ebben a sorrendben, kombináltuk, és felhasználtuk a további panning ciklushoz.



[291.] **3.1.2.5 Második és harmadik panning ciklusok:** Ezeket a ciklusokat ugyanúgy végeztük, ahogy az YPR protokoll első panning ciklusát, a következő módosításokkal: (i) 10^{12} R1(a), és 10^{12} R1(t) készleteket kombinálva használtunk a második panning ciklushoz, és (ii) az eluálást kizárólag glicinnel (pH 2,2) végeztük. A második panning ciklus eredményeképp kapott amplifikált eluátumot R2-nek neveztük. (iii) A harmadik panning ciklushoz 10^{12} R2 készletet használtunk, az eluálást úgy végeztük, mint a második ciklusban. A harmadik ciklus amplifikált készletét R3-nak neveztük.

[292.] **3.1.3 YPNR protokoll**

[293.] **3.1.3.1 Biopanning és mosás:** Ezeket a folyamatokat lényegében ugyanúgy végeztük, mint az YPR protokollban. Ebben a protokollban azonban, (i) mindhárom glicinnel (pH 2,2) végzett panning ciklus után eluáltunk, és (ii) az első eluálás és amplifikálás után két egymást követő panning ciklus következett, amplifikálás nélkül. Az első, második és harmadik ciklusokat YPNR1, YPNR2, és YPNR3 néven neveztük, ebben a sorrendben.

[294.] **3.2 Negatív kontroll scFv klónok szelekciója**

[295.] **3.2.1 N14 CDR3 szekvencia:** Minden kötési kísérletnél egyetlen klónt választottunk ki a naív library-ból (a szelekció előtt). Egy fág készletet és egy szolubilis scFv-t, melyet N14-nek neveztünk, perparáltunk ebből a klónból. A szekvencia analízis azt mutatta, hogy ez a klón a V_H4 -DP65 gén családba tartozik. E klón által kódolt 11-szeres V_H -CDR3 szekvenciáját N14 CDR3-nak neveztük, amely a következő (SEQ ID NO:28):

Phe Leu Thr Tyr Asn Ser Tyr Glu Val Pro Thr

[296.] **3.2.2 C181 CDR3 szekvencia:** Egy másik negatív klónt, C181-et is használtunk a kötési analízis kísérletekhez. A C181 klón (amely reaktív a rekombináns hepatitis B vírus [HBV] részecskéire) a V_H3 -DP35 családba tartozik, és az e klón által kódolt 9-szeres V_H -CDR3, melyet C181 CDR3-nak neveztünk, a következő (SEQ ID NO:29):

Thr Asn Trp Tyr Leu Arg Pro Leu Asn

EXAMPLE 4:



[297.] **4. scFv klónok előállítása, tisztítása, megjelölése és karakterizálása**

[298.] **4.1 Szolubilis scFv-k előállítása:** pHEN1-et, egy az eredeti fagemid library létrehozásában használt vektort megjelöltünk egy sárga stop kodonnal, amely az scFv gén és a pIII gén összeillesztésénél kódolódik. Így tehát, amikor a szelektált klónok vektorait fagemid fertőzéssel bejuttatjuk E. coli HB215 1 sejtekbe, amely egy nem szuppresszor törzs, ez a rendszer lehetővé teszi az szolubilis scFv-k termelését és szekrécióját a bakteriális periplazmába (Harrison *et al.*, *Methods in Enzymology*, 267, 83-109 (1996)). Az scFv így készen áll a kivonásra a fermentációs folyadékából. Az szolubilis scFv-k előállíthatók a lacZ promotor kontrollja alatt (Gilbert and Muller-Hill, *PNAS (US)*, 58, 2415 (1967)), melyet IPTG-vel indukálunk.

[299.] A c-myc tag-et kódoló szekvencia (10 aminosav - **Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu**; SEQ ID NO: 123.) is benne van a vektorban, upstream irányban a sárga mutációtól. Az expresszált scFv C-terminusának hordoznia kell a c-myc tag-et is, amelyet detektálhatunk egér anti c-myc antitesttel (Sejtkultúrák Európai Kollektója, European Collection of Cell Culture (ECACC) 9E10-hybridoma).

[300.] **4.2 scFv tisztítása Protein-A gyöngyös affinitás oszlopon (Protein-A beads affinity column):** A választott klónok és a kontroll C181 klón scFvs molekulája mind a V_{H3} családba tartozik, amely lehetővé teszi az Protein-A panningát gyöngyös affinitás oszlopon. Minden egyes klón indukált kultúrájából periplazma frakciókat készítettünk (100-250 ml), és Protein-A Sepharose gyöngyökkel inkubáltuk. A megkötött scFv molekulákat az oszlopról savas eluálással nyertük vissza (0,1 M glicin, pH 3,0), melyet egy Tris-szel (pH 8,0) történő neutralizáló eluálás követett. Az így visszanyert fehérje koncentrációját A₂₈₀ méréssel határoztuk meg, melyet egy PBS puffercsere követett vagy dialízissel, vagy egy G-25 Sepharose oszlopon.

[301.] **4.3 N14 scFv tisztítása Sephacryl S-200 oszlopon:** A negatív N14 klón scFv molekulája a V_{H4} géncsaládba tartozik, így nem tisztítható Protein-A affinitás oszlopon. Az scFv-N14 panninghoz 200 ml indukált kultúra periplazma frakciójában a teljes fehérjét 60%-os ammónium szulfáttal kicsaptuk. A pelletet reszuszpendáltuk 2 ml 0,1xPBS, 5mM EDTA, 5mM PMSF oldatban, majd egy Sephacryl S-200 oszlopra vittük (1.5 x 90cm), melyet előtte folyó pufferral (0.1 xPBS, 5mM EDTA) előkezeltünk. A fehérjéket frakcionáltuk, és az N14-scFv-t tartalmazó frakciókat (melyet SDS-PAGE és



Western blot segítségével határoztunk meg) összeöntöttük, liofilizáltuk és 1/10 térfogat H₂O-ban szuszpendáltuk. A (jelöletlen és FITC-jelölt) N14-scFv-t negatív kontrollként használtuk a FACS analízis kísérletekben.

[302.] **4.4. A tisztított scFv-k megjelölése FITC molekulával:**

Megközelítőleg minden készítményből 1 mg tisztított scFv-t reszuszpendáltunk PBS-ben és FITC-hez kapcsoltunk egy Fluoro-Tag FITC konjugáló, kereskedekemben kapható kit segítségével (Sigma cat. #FITC-1), a gyártó instrukciói alapján.

[303.] **4.5 A tisztított és jelölt scFv minőségi analízise**

[304.] **4.5.1 A panning és FITC-jelölés után:** Minden készítmény (jelölt és nem jelölt) tulajdonságait analizáltuk SDS-PAGE, Western blot, Superdex-75 oszlopot (A280 és A495) használó HPLC és fluorometria segítségével. Az analízis eredménye szerint az N14-scFv klónok 80%-os, a V_H3 klónok 90%-os tisztaságot mutattak, minden scFv molekulához megközelítőleg 2 molekula FITC kötődött (F/P arány 2:1)

[305.] **4.5.2 FITC jelölés utáni kötési aktivitás** Ellenőriztük a FITC kötés után az scFv specificitását (lásd 5. példa).

[306.] **4.6 Fagemid klónok biokémiai karakterizálása:** Több típusú analízist, használtunk, hogy megtudjuk a különböző scFv készítmények (lásd 8. példa) szerkezetét és ellenőrizzük a tisztaságukat, beleértve a SDS-PAGE-t, tömegspektroszkópiát (kizárólag az Y1 és Y17 scFv-kre) és a HPLC-t. Az scFv azonosításához Western analízist és EIA-t használtunk; valamint FACS- analízist használtunk az scFv kötésének karakterizálásához.

5. PÉLDA:

[307.] **5. Kötési assay-k**

[308.] A kiválasztott klónok sejtekhez kötődését két szinten értékeltük ki, a fagemid szintjén és a szolubilis scFv szintjén.

[309.] **5.1 A fagemid szintjén való kötődés**

[310.] Eddig, egy fagemid preparáltunk, egyedenként, minden egyes kiválasztott klónból.



[311.] **5.1.1 Kolónia-teszt:** Egy kísérletsorozatban 10^9 specifikus fagemid keveréket, amelyek a biopanning protocooll-ból származnak, és amelyek az *E. coli* baktériumokat ampicillin rezisztenssé fertőzték, és 10^{11} vad típusú M13 fágot, melyek nem hordozzák az ampicillin rezisztenciát, és amely “blokkolóként” szolgált, inkubáltunk 10^5 sejttel, melyeket egy panel sejttypusból választottunk ki. Az inkubálást és mosást követően a kötött fágot tripszinnel eluáltuk, és egy aliquot mennyiséget használtunk a TG-1 *E. coli* fertőzésére. Ezután az *E. coli* baktériumokat 2xTY/AMP tálcaeken szélesztettük, és egy éjszakán át inkubáltuk 30°C -on. Minden egyes klónból kapott kolónia számát meghatároztuk és összehasonlítottuk. Az eredmények megadják a kötési affinitás és a fagemidok specificitásának mértékét.

[312.] **5.1.2 Fehér/Kék kolónia teszt:** Ebben a tesztben, ahol minden kísérletnek van egy belső kontrollja, a specifikus fagemidet összekevertük 1/100 arányban (ugyanabban az arányban, mint az 5.1.1. pontban feljebb) egy másik kontroll fagemiddel, amelyet pGEM7 (Promega Corp., Madison, Wisconsin, USA) néven ismernek. Ez a pGEM7 fagemid ampicillin rezisztenciát hordoz, azonban expresszál semmilyen rekombináns polipeptidet a pIII génjének N-terminusán. TG-1 infekciót, és ampicillin tálcaeken, melyek 1mM X-gal-t is tartalmaznak, való inkubálást követően a kolóniákat megszámloltuk. A pGEM7-et tartalmazó kolóniák kékek, míg a specifikus fagemidból származó kolóniák fehérek. Minden tesztre kiszámoltuk a dúsulási faktort, amely (ugyanazon a tálcaen nőtt) kék/fehér kolóniák input/output arányából származik.

[313.] **5.1.3 Fagemidok EIA-tesztje**

[314.] **5.1.3.1 Fagemid kötődés választott sejtekhez:** Megközelítőleg 5×10^5 szelektált sejtet fixáltunk aceton:metanol (1:1) eleggyel, 24 lyukú tálca felületén. A kötési teszt 10^9 fagemidet igényelt. A kötődést 37°C -on, 1 óráig tartó inkubálással hoztuk létre, amelyet egy alapos mosás követett PBS/Tween (0,05%) oldattal. Az alapos PBS mosás utána tálcákat nyúl anti-M13 antitesttel, anti-nyúl IgG-HRP-vel és szubsztráttal inkubáltuk. A kapott színek intenzitása, amit egy ELISA tálca olvasóval mértük, A_{405} -nél, arányos volt a kötött fagemidek szintjével.

[315.] **5.1.3.2 Fagemid kötés fixált vérlemezkékhez:** Polisztirol mikrotiter tálcákat vontunk be 10^8 fixált vérlemezkékkel, és inkubáltuk őket egy éjszakán át, 4°C -on.



Megközelítőleg 10^{10} fagemidet használtunk a kötés kialakításához. A tálcaek inkubálása és mosása, valamint a kötődési szint meghatározása a fent leírtaknak (5.1.3.1) megfelelően történt.

[316.] **5.1.4** Specifikus fehérjékhez való kötési assay-eket is végeztünk, melyekhez a fehérjéket a következő csoportból választottuk: humán növekedési hormon (hGH), fibrinogén, fibronectin, BSA, SM (zsírszegény tej, (skim milk)) és glycolicin (a GPIb proteolitikus fragmentje). A kötési assay-t a következő módon végeztük. Polisztirol mikrotiter tálcaek lyukait bevontuk a tesztelendő fehérjék egyikével, $2 \mu\text{g/lyuk}$. A bevonat egy éjszakán át tartó inkubálás során alakult ki, 4°C -on. Körülbelül 10^{10} fagemidet használtunk a kötési teszthez. PBS-sel való alapos mosás után a tálcákat nyúl anti-M13 antitesttel, anti-nyúl BRP-vel és szubsztráttal inkubáltuk. A kötődés szintjét a képződött szín intenzitásával mértük. Az optikai denzitást A_{405} -nél mértük. Minden mintát két példányban mértünk, és átlagokat számoltunk belőle.

[317.] **5.2 Kötési teszt az scFv szintjén:** A HB2151 periplazmájában termelt scFv kötődését összehasonlítottuk különböző sejtípusokban, két különböző assay segítségével, EIA- és FACS-analízissel.

[318.] **5.2.1 Szolubilis scFv EIA-tesztje:** Megközelítőleg 5×10^5 AML sejtet inkubáltunk 5-10 mg teljes fehérjével. A kötetést 4°C -on hoztuk létre, 1 óra alatt, amelyet egy EIA teszt követett, amely során egér anti-myc antitestet, anti-egér HRP-t és szubsztrátot használtunk. A felesleges nem kötött antitesteket eltávolítottuk minden lépést követően úgy, hogy a sejteket 3x mostuk PBS-sel. A kapott szín intenzitását egy ELISA tálca olvasóval mértük ($O.D_{405}$). Mint ahogy fentebb is, a szín intenzitása arányos a kötődés szintjével.

[319.] **5.2.2 Sejtek FACS-analízise**

[320.] **5.2.2.1 "Három lépéses festési" eljárással festett sejtek analízise:** FACS-analízist végeztünk, hogy teszteljük és megerősítsük a kiválasztott klónok specificitását. Elsőként, egy "három lépéses festési" eljárást dolgoztunk ki, amely nyers kivonatokat vagy tisztított, de jelöletlen scFv-eket használ, melyet egér anti-myc antitestek és, végezetül, FITC- vagy PE-konjugált anti-egér antitest követ.



[321.] Az FACS-analízishez $5-8 \times 10^5$ sejt szükséges, melyeket a Ficoll-módszerrel tisztítottunk, és amelyeket reszuszpendáltunk PBS+1%-os BSA oldatban. A kötést 4°C -on, 1 óra alatt hoztuk létre. Minden lépés után, a sejteket mostuk és reszuszpendáltuk PBS+1%-os BSA oldatban. Az utolsó lépést követően, a sejteket fixáltuk úgy, hogy reszuszpendáltuk őket PBS, 1%-os BSA, 2%-os formaldehid oldatban, majd leolvastuk a FACS-en. (Becton-Dickinson).

[322.] **5.2.2.2 Sejtek festése FITC-jelölt scFv-vel, egy lépésben:** FITC-jelölt scFv-t inkubáltunk $5-8 \times 10^5$ Ficoll módszerrel tisztított sejtekkel PBS+1%-os BSA oldatban. A kötést 4°C -on, 1 óra alatt hoztuk létre. A sejteket ezután mostuk és fixáltuk, az 5.2.2.1 pontban leírtak szerint, majd leolvastuk FACS-en.

6. PÉLDA: Panning és szekvenálási eredmények

[323.] **6.1 Az AM Protokoll eredményei**

[324.] **6.1.1 Az AM Protokoll panning eredményei:** A panninghoz használt fagemidok becsült számát (input) és az AM protokoll során eluált fagemidok becsült számát (output) összegeztük a következő táblázatban (1. táblázat):

1. táblázat AM protokollból származó panning eredmények

Inputi készlet	Sejtek forrása	Eluálás	Output	Amplifikált készlet
Nissim library 2×10^{11}	AML sejtek membránja	Bakteriális TG-1	3×10^4	T16M1
T16M1 - 10^{11}	AML sejtek membránja	Bakteriális TG-1	6.4×10^5	T16M2
T16M2 - 10^{11}	AML sejtek membránja	Bakteriális TG-1	10^6	T16M3
T16M3 - 10^{10}	AML sejtek	Tripszin	2×10^6	T16M3.1

[325.] Érdemes megjegyezni minden sikeres panningnál az outputnál jól látszódó dúsulást. Ezen túl, nem volt csökkenés az outputban, amikor T16M3-at használtunk teljes AML sejtek panningjára, ami azt sugallja, hogy a kötött fagemidok valószínűleg

specifikusak a sejt külső felszínén levő komponensekre, vagy hogy ez a specifikus rendszer egy relatíve magas számú nem specifikusan kötött fagemidet tartalmazhat.

[326.] **6.1.2 Az AM protokoll klón szekvencia eredményei:** Bár a klónokat a T16M1, T16M2 és T16M3 outputi készletből választottuk, a lejjebb bemutatott eredmények mégis főleg a **T16M3.1** outputi készletből (AML intakt sejt panning) származnak. Az AM10, AM11 és AM12 klónokat azonosítottuk a T16M3 készletben, de nem az azt követő outputben.

[327.] A V_H-CDR3-ban felfedett aminosav szekvenciákat, és azok gyakoriságát a tesztelt klón outputében a 2. táblázatban összegeztük.

2. táblázat. T16M3 és T16M3.1 outputokból választott klónok AM biopanning protokollt követően.

Klón #	V _H -CDR3 méret	V _H -CDR3 szekvencia					Csira-vonal	Gyakoriság a T16M3 outputban	Gyakoriság a T16M3.1 outputban	
AM1	8	Pro	Trp Thr 1 5	Asp Pro 2 6	Asp Pro 3 7	Val 4 8	V _H 3- DP47	5/31	8/51	
AM2	12		Gly Thr Ala 1 6 11	<u>Phe</u> Pro Glu 2 7 12	Pro Pro Ile 3 8	Arg Ser 4 9	Ile 5 10	V _H 3- DP46	11/31	20/51
AM3	5		Gly Pro 1	<u>Phe</u> 2	Pro 3	Met 4	5	V _H 3- DP46	1/31	2/51
AM6	10		Gly Ser Ser 1 6	<u>Phe</u> Ser Arg 2 7	Pro Ser 3 8	His Val 4 9	5 10	V _H 3- DP46	4/31	6/51
AM7	11		Arg Arg Thr 1 6 11	<u>Phe</u> His Asn 2 7	Pro Glu Tyr 3 8	Met Lys 4 9	5 10	V _H 3- DP46	3/31	4/51

AMS	8	Arg Thr 1 6	<u>Phe</u> Ala 2 7	<u>Pro</u> Thr 3 8	Pro lie 4 5	V _H 3- DP46	6/31	8/51
AM9	7	Thr Asp 1 6	Gln Leu 2 7	Arg Gly 3	Arg 4 5	V _H 3- DP87	0/31	2/51
AM1 0	11	Lys Gly Gly 1 6 11	<u>Phe</u> Thr Leu 2 7	<u>Pro</u> Val Lys 3 8	Gly Arg 4 5 9 10	V _H 3- DP46	0/31	1/31
AM1 1	12	Gly Val Gln 1 6 11	<u>Phe</u> Glu Ser 2 7 12	<u>Pro</u> Gln Thr 3 8	Val Arg 4 5 9 10	V _H 3- DP49	0/31	1/31
AM1 2	10	Arg Arg Arg 1 6	<u>Phe</u> Val Val 2 7	<u>Pro</u> Asp 3 8	<u>Gln</u> <u>Asn</u> 4 5 9 10	V _H 3- DP46	0/31	1/31

[328.] A ^{Arg}/_{Gly}**PhePro** aminosav szekvencia jelen van hét izolált klónban a 2. táblázatban bemutatott tízből, és azok egyik motívumát reprezentálja. Ezen túl, érdemes megfigyelni, hogy az azonosított motívum jelzi a CDR3 régió N-terminális három aminosavát minden esetben. Ennek megfelelően, ez a motívum hatékony horgony, vagy kötőhely lehet, önmagán, vagy más aminosavmaradékokkal kombinációban, amelyek akár a CDR3 régió egyik, vagy másik végén túl található, vagy mint része egy nagyobb peptidnek vagy polipeptidnek, vagy scFv molekulának.

[329.] Más CDR3 régiók, amelyek AML-sejtekhez nagy affinitású kötődést mutatnak ^{Arg}/_{Gly}**PhePro** alapszekvencia alapján konstruálhatók. Azok konstruálhatók bármelyik, a fenti 5-12 részből állók variálásával, ezenkívül addíciókkal, deléciókkal vagy mutációkkal, miközben megtartjuk a ^{Arg}/_{Gly}**PhePro** alapszekvenciát.

[330.] A találmány szerinti CDR3 régiók aminosav szekvenciája: **R1-Arg**/_{Gly}**PhePro-R2**, ahol **R1** 0-15 aminosavat tartalmaz, előnyösen 0-9, legelőnyösebben 0-1 aminosavat, és **R2** egy 1-15 aminosavból álló szekvencia, legelőnyösebben 1-9



aminosavból. **R1** és **R2** olyan aminosav szekvenciák, amelyek nem befolyásolják kedvezőtlenül az **Arg/GlyPhePro** szekvencia AML sejtekhez való specifikus kötődését.

[331.] A fenti klónok könnyű láncának CDR3 régiója azonos és itt az SEQ ID NO: 125-ben van újra citálva.

[332.] **6.2 YPR és YPNR Protokollok eredményei**

[333.] **6.2.1 YPR és YPNR Protokollok panning eredményei:** A panninghoz használt fagemidok becsült számát (input) és az AM protokoll során eluált fagemidek becsült számát (output) összegeztük a következő táblázatokban (3, 4. táblázat):

3. táblázat. Az YPR protokollból származó panning eredmények

Inputi készlet	Eluálás	Output	Amplifikált készlet
Nissim library 10^{11}	Sav	10^7	R1(a)
	Tripszin	4×10^7	R1(t)
Kombinált [R1(a) $\cdot 10^{12}$, + R1(t) $\cdot 10^{12}$]	Sav	5×10^5	R2
R2 $\cdot 10^{12}$	Sav	3×10^8	R3

[334.] A 3. táblázatban látható, hogy a tripszines eluáláskor 4x magasabb outputot (outputot) kapunk, összehasonlítva az első ciklus savas eluálásával.

[335.] Az YPNR protokollnak megfelelő amplifikálás nélküli repanning lépés minimalizálta a könnyebben amplifikálódó fagemidek infekciójának, vagy a bakteriális infekciónak a lehetőségét. Az így kapott outputot töntettük fel a 4. táblázatban.

4. táblázat. Az YPNR protokollból származó panning eredményei

Inputi készlet	Eluálás	Output	Elúciós készlet
Nissim library 10^{11}	Sav	3×10^7	YPNR1
YPNR1 $\cdot 3 \times 10^7$	Sav	4×10^5	YPNR2
YPNR2 $\cdot 4 \times 10^5$	Sav	10^3	YPNR3

[336.] Mint várható volt, a 4. táblázatban bemutatott eredmények csökkenést mutatnak a fág kitermelésben (output), minden egyes panning ciklus után. Ezt a protokollt a

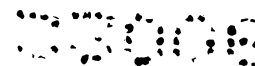
nem specifikus fágok esetleges amplifikációja miatti nem véletlenszerű mintavétel elkerülésére használtuk.

[337.] **6.2.2 Az YPR és YPNR protokollok klón szekvencia eredményei:**

Mindkét protokollnál a harmadik panningból származó néhány klónt választottunk ki a szekvenálásra. Az aminosav szekvenciák, melyeket az 5. táblázat mutat, a nehéz lánc CDR3 régiójából származnak (V_H -CDR3). Az R3 outputnál a szekvenciákkal megjelenő csírvonal és a gyakoriságok szintén be vannak mutatva ebben a táblázatban.

5. táblázat: Kiválasztott Y-széria klónok, YPR biopanning protocooll után, az R3 outputtal.

Klón #	V_H -CDR3 Méret	V_H -CDR3 szekvencia					Csírvonal	Gyakoriság
Y1	6	Met Val 1 5	Arg Ile 2 6	Ala 3	Pro 4	VM-DP32	14/30	
Y16	6	Thr Ile 1 5	Gly Lys 2 6	Gln Arg 3 7	Ser Ser 4 8	V_H3 -DP26	1/30	
Y17	6	Leu Tyr 1 5	Thr Phe 2 6	His 3	Pro 4	V_H3 -DP32	7/30	
Y-27	6	Leu Glu 1 5	Arg Ser 2 6	Pro 3	Pro 4	V_H3 -DPS2	3/30	
Y-44	11	Thr Ser Ser Arg 1 5 9	Ser Ser His 2 6 10	Lys Ser Asn 3 7 11	Asn Ser Lys 4 8	V_H3 -DP32	2/30	
Y-45	12	Arg Tyr Ser Thr 1 5 9	Tyr Ser Val 2 6 10	Tyr Ser Cys 3 7 11	Cys Asp Ser 4 8 12	V_H3 -DP49	1/30	



Y-52	10	Phe	Arg	Arg	Met	V _H 3-DP49	1/30
		Gln	Thr	Val	Pro		
		Ala	Pro				
		1	2	3	4		
		5	6	7	8		
		9	10				

[338.] Az YPNR protokollból izolált klónok nagy része Y1 is volt.

[339.] A fenti klónok könnyű láncának CDR3 régiója azonos és a SEQ ID NO: 125-ben van ismét citálva.

7. PÉLDA:

[340.] **7. Kötési kiértékelés eredményei**

[341.] **7.1 Kiválasztott fagemid klónok AML- sejtekhez való kötődése (AM klón szériák):** A Kék/Fehér kolónia tesztet (lásd 5. példa) alkalmaztunk, mint kötődési assay-t, AM klónokkal, hogy megbecsüljük a fagemidek sejtekhez való kötődését. Az AM7 klón kivételével a tesztelt sejteknél nem figyeltünk meg kedvezményezett kötést. Szignifikáns, de nem szelektív kötést figyeltünk meg az AM7 klón esetében, minden target sejthez, vagy mint fagemid, vagy mint tisztított scFv. Az eredmények azt mutatják, hogy nincs dúsulás az AM klón sorozat esetében.

[342.] **7.2 Y klón sorozat kötődése**

[343.] **7.2.1 Fagemid kötődés – EIA-teszt fixált vérlemezkékkel:** Három ciklus két különböző protokoll szerinti panning után a fág klónok fixált vérlemezkékhez való kötődését vizsgáltuk EIA teszttel. Fagemid készletet készítettünk minden kiválasztott klónból, és ezeket a klónokat két sorozat EIA teszttel teszteltük. Minden mintát két példányban mértünk, és az átlagukat vettük. Az eredmények összefoglalása látható az 1. ábrán, amely azt mutatja, hogy a 9 Y sorozat klónból 6 mutat pozitív EIA reakciót. A legmagasabb fokú kötést az Y1, Y16, Y17 és Y27 klónok esetében tapasztaltuk. M13 (vad típusú bakterifág) és E6 (CLL-leukémia sejteken szelektált) fág készleteket használtunk negatív kontrollnak. A domináns klón, Y1 fág mutatta a legmagasabb kötődést a fixált vérlemezkékhez, és az Y17-tel együtt szignifikánsan magasabb kötődést mutatott, mint az M13 vagy az E6 fág klónok.



8. PÉLDA:

[344.] 8. scFv-k és klón kötődés részletes karakterizálása

[345.] 8.1 scFv szerkezete és azonosítása: Az Y1 natív szerkezetét Superdex 75 oszlopon történő HPLC és tömegspektrometria segítségével állapítottuk meg. Az első módszer eredményei monomerek, dimerek, trimerek, és tetramerek jelenlétét jelzi a preparátumban. A tömegspektrometria elég érzékeny módszernek bizonyult a várt molekulatömeg megállapításához, amely 26,5 kDa, és azokban az esetekben, amikor a c-myc tag-et levágtuk, 24 kDa -os molekulatömeget kaptunk.

[346.] Az SDS-PAGE eredményei azonban azt jelzik, hogy az intakt, nem hasított molekula egy látszólagos 30 kDa-os molekulatömeggel bír, annak ellenére, hogy a várt molekulatömeg 26,5 kDa, a nukleinsav szekvenciának, és a fent említett tömegspektroszkópiai eredményeknek megfelelően. c-myc-specifikus antitestet alkalmazó Western analízis megerősítette az SDS-PAGE 30 kDa-os eredményét, és igazolta azt a feltevést, hogy a c-myc tag rajta van az intakt molekulán. A két különböző mérési módszerrel kapott eredmények közötti ellentmondás a kétféle módszer különböző érzékenységi szintjéből eredhet, valamint az SDS-PAGE során használt kísérleti körülményektől, amelyek megváltoztathatják a tesztelt fehérje látszólagos tömegét.

[347.] 8.2 Vérlemezke-szelektált klónok kötődése leukémia sejtekhez:

Amint azt a bevezetésben említettük, a vérlemezkék sejt felszíni markerei expresszálódhatnak éretlen hematopoietikus sejteken. Vérlemezke-szelektált klónok kötődését teszteltük FACS analízissel. FACS analízist végeztünk teljes vér festése után, melyet RBC lízis követett, vagy Iso-prep- (Ficoll-féle) tisztított egymagvú sejteken. ScFv-eket készítettünk minden klónból, A-fehérjén tisztítottuk, és FITC molekulával jelöltük (lásd 4.1-4.4 pontok). Hogy lehetővé tegyük az intakt scFv termelését a nem szuppresszor E. coli HB2151 törzsben, az Y-27 klón V_H-CDR3 régiójában talált amber kodont (TAG) mutáltattuk DNS helyhez irányított mutagenézissel (DNA site-directed mutagenesis) úgy, hogy az a glutaminsavat kódolja (GAG). Az ilyen kísérletekhez különböző leukaemiás páciensek friss vérmintáiból izolált sejteket használtunk target sejteknek. A mintákat három izraeli Orvosi Centrumtól kaptuk.



[348.] Az Y1 és Y17 klónok kedvező kötődést mutattak a leukémia sejtekhez, míg az összes többi Y-sorozatbeli klón csak háttér szintű kötést mutattak. A 6. táblázat mutatja a FITC-jelölt Y1 és Y17 klónok kötődését különböző leukémia sejtekhez.

6. táblázat. Y1 kötődési specifitása leukémia sejtek irányába

B-sejt vonal

B-sejt vonal							
ScFv	AML	CML	B-CLL	B-ALL	Myeloma multiple	T vonal leukémia	Normál limfociták
N14/C 181	0/68	0/6	0/6	0/6	0/5	0/3	0/18
Y1	54/68	2/6	1/6	3/6	4/5	2/3	0/15
Y17	3/3	N.D.*	1/1	2/2	N.D.*	N.D.*	11/11

*Nem meghatározott (Not determined)

[349.] A 6. táblázatban tört számokkal bemutatott eredmények a páciensekre vonatkozó tört számokat reprezentálják, akiknek a sejtjeit FACS analízissel azonosítottunk, amint pozitívan reagáltak minden tesztelt antitesttel. A számláló mutatja a pozitív páciensek számát, a nevező pedig a kísérletben részt vevő páciensek teljes számát, akiket egy adott scFv/sejttípus kombinációra teszteltünk. Y17 erősen kötődött minden tesztelt sejthez; így ezt a kötődést nem tekintettük sejtszelektívnek. Ugyanakkor úgy találtuk, hogy az Y1 kötődése erősen szelektívnek bizonyult több leukémia sejt esetében, főleg azoknál, amelyek az akut fázisban vannak. Az Y1 scFv kötődést tovább elemeztük, amit lejjebb kifejtünk.

[350.] Az Y1 három AML mintához való kötődésének jellegzetes eredményei láthatók a 3. ábrán. Minden egyes esetben, a sejtpopuláció nagy része a háttér fluoreszcenciánál (melyet a negatív kontroll scFv festésénél kaptunk) szignifikánsan magasabb szinten fluoreszkál. Ezek az eredmények azt jelzik, hogy minden páciensnél, az Y1 a teljes sejtpopuláció különböző frakciójához köt. A jobboldali Y1 csúcs minden grafikonon úgy válik, hogy az Y1-kötő sejtek minimum számát mutatja a populációban, az



e csúcs alatt található összes sejtek arányával együtt, amely valószínűleg az Y1-kötő sejtek minimum arányát jelzi minden egyes mintában.

[351.] **8.3 Y1 kötődése normál vérsejtekhez:** Az Y1 kötődését vizsgáltuk Ficoll-tisztított normál vérsejtekhez, különböző sejtípusokra lebontva. Normál limfocitáknál nem kaptunk kötődést, Ficoll-tisztított monocitákhoz 9/28 esetben kaptunk Y1 kötődést, vérlemezkéknél 5/8 esetben és vörösvértestnél (VVT) 1/4 esetben. Mindazonáltal, a CD14-specifikus antitestek minden monocita preparációban kötődtek a sejtekhez, és sok neutrofil granulocita preparátumban szintén. Az analízis eredményeit a 7. táblázatban mutatjuk be.

7. táblázat. scFv, Y1 Ficoll-tisztított normál vérsejtekhez kötődésének FACS-analízise.

Antitest	Limfociták	Monociták	Neutrofilok	Vérlemezkék	VVT
N14	0/18	0/4	0/4	0/3	0/4
Y1	0/28	9/28	0/4	5/8	1/4
CD14	0/15	14/14	8/14	0/5	0/4

[352.] Ezek a kötési eredmények a normál vér minták azon frakcióit reprezentálják, amelyeket FACS-analízissel pozitív reakciót mutatóknak találtunk minden tesztelt antitesttel. Érdeemes megfigyelni, hogy ugyan fixált vérlemezkéken szelektáltuk, a FITC-scFv relative alacsony kötési affinitást mutat a vérlemezkék irányába.

[353.] A 4. ábra az Y1 Ficoll-tisztított vérlemezkékhez (4a) és monocita-kötött sejtekhez (4b) való kötődését mutatja. A monocita sejtpopulációnál megfigyelt eltolódás nagyobb, mint ami a vérlemezkéknél megfigyelhető, 30-5x magasabb a negatív kontrollhoz képest, ebben a sorrendben, ha fluoreszcencia átlaggal számolunk. Ez a megfigyelés legvalószínűbben annak köszönhető, hogy a vérlemezkék jellemzője, hogy multipletekben tapadnak a Ficoll-tisztított monocitákhoz. Ezt követő kísérletekben kiderült, hogy amikor teljes vér mintákat mértünk, nem találtunk Y1 kötődést sem normál monocitákhoz, sem granulocitákhoz, sem vérlemezkékhez, sem pedig VVT-ekhez. Hasonlóképpen, nem figyeltünk meg Y1 kötődést vérlemezkékhez, amikor vérlemezkében dúsított plazmából származtak (platelet-rich plasma, PRP). Ugyanezek között a kötési körülmények között (teljes vérben, FACS lizáló [Becton Dickenson] oldattal létrehozott



VVT-lízist követően), az Y1 hasonlóan kötődött a leukémia sejtekhez, mint a Ficoll-féle tisztítás után. Ezért levonhatjuk azt a következtetést, hogy természetes körülmények között az Y1 epitóp rejtett a vérlemezkéken vagy monocitákon. A Ficoll-tisztítási eljárás során azonban az epitóp hozzáférhetővé válik, lehetővé téve azt, hogy az Y1 felismerje, míg a leukémia sejteken az epitóp mind tisztítatlan, mind tisztított körülmények között hozzáférhető, felismerhető.

[354.] A normál limfatikus és mieloid vonal hematopoietikus progenitorain túl az Y1 a vérképző őssejtekhez (CD34+ sejtek) való kötődését is teszteltük gerinccsatorna vérben. Az 5. ábra mutatja a FITC-jelölt scFv klónok kötődésének eredményeit gerinccsatorna-vér CD34+ őssejtekhez. Az 5a. ábra mutatja a CD34+ sejtek és FITC-jelölt negatív kontroll scFv kötődését, és az 5b. ábra mutatja, a CD34+ sejtek kötődésének ugyanazt az analízisét FITC-jelölt Y1 scFv klónokhoz. Az 5c ábra ugyanazon a FITC-jelölt Y1 scFv klón Y-I FSC és SSC dot plot analízisét mutatja, mint ami az 5b ábrán is szerepel. Az eredmények azt mutatják, hogy két CD34+ őssejt alpopuláció létezik, amelyek a gerinccsatorna vérből származnak, amelyek közti sejt méret különbségek FSC analízissel mutathatók ki. Az Y1 a két populációból a kisebb méretű sejtekhez köt. Az 5b és 5c ábrákon bekarikázott rész mutatja a CD34+ sejteknek azon populációját, amelyekkötik az Y1 scFv klónt. A további analízis azt mutatja, hogy a kisebb méretű sejtek elpusztult sejtek, amelyek jelen vannak a populációban, és az Y1 kötés jelezheti az Y1 által felismert intracelluláris ligandum jelenlétét.

[355.] A kísérletet perifériás vérsejteken végeztük, amelyeket GM-CSF-előkezelt egészséges alanyokból is nyertünk (a GM-CSF kezelés mobilizálja az őssejteket, és azok bekerülnek a véráramba). Az 5. ábrán ábrázolt eredményekhez hasonlókat kaptunk.

[356.] **8.4 Y1 scFv kötési szelektivitása különböző AML-sejteken levő sejtmarkerekkel összehasonlítva:** AML-páciensekből származó Ficoll-tisztított perifériás vérsejtek és csontvelői sejtek Y1-festését hasonlítottuk olyan sejtek festéséhez, amelyek más antitestek paneljével voltak festve. Az ilyen FACS-analízisek eredményeit amik 14 páciensből kapott mintákra vonatkoznak, a 8. táblázatban összegeztük. Érdemes megfigyelni, hogy szignifikáns a variabilitás a festett sejtek gyakoriságában, azokban a preparációkban, amelyeket különböző páciensektől kaptunk, minden testelt marker esetében, beleértve az Y1-et is. Az Y1 és a különböző markerek kötődése közti korreláció

hiánya arra utal, hogy az Y1 nem kötődik egyetlen olyan ligandumhoz sem, amelyeket a többi tesztelt antitest köt, és hogy az Y-I ligand nem képezi egyik tesztelt sejtfelszíni marker részét sem.

8. táblázat. Y1 scFv kötődés összehasonlítása antitestek kötődésével különböző sejt markerekhez

AML páciens	Y1	CD13	CD14	CD33	CD34	BN/PB**
1	0	ND	2.5	47	4	PB
2	34	88	0	80	83	PB
3	66	100	20	87	9	BM
4	86	83	2	73	3	BM
5	100	100	0	100	0	BM
6	0	72	0	49	1	BM
7	59	20	93	100	0	BM
8	40	86	40	48	6.5	BM
9	70	75	67	75	1	PB
10	25	24	55	82	5	PB
11	26	76	17	83	52	PB
12	60	40	60	94	ND	PB
13	17	ND	13	75	15	PB
14	0	24	27	70	0	BM

**BM/PB- csontvelő (bone marrow)/perifériás vér (peripheral blood)

[357.] Az eredmények egy adott páciens Ficoll-tisztított sejteinek százalékában vannak kifejezve, akiket FACS analízissel azonosítottunk, mint akik minden egyes egyedi antitesttel pozitívan reagálnak.

[358.] A kötődés detektálásához szükséges Y1 koncentráció ($\sim 1\mu\text{g}/5 \times 10^5$) fényében az eredmények azt jelzik, hogy az Y1 scFv relatíve magas kötési affinitást mutat az AML-sejtek specifikus ligandumjához.

[359.] A 8. táblázatban, bemutatott eredmények mellett, amely az Y1 kötődését mutatja AML-sejtekhez, fentebb (6. táblázat) mutattuk azt is, hogy az Y1 a legtöbb egyéb típusú tesztelt leukémia-sejthez is kötődhet, ide értve a B-ALL sejteket, bár meg kell jegyezni, hogy a más leukaemiás minták mérete igen behatárolt volt. A 6. ábra az Y1 pre-B-ALL sejtekhez való kötődésének FACS-analízisét mutatja, amelyeket két páciensből kaptunk. Kettős festést alkalmaztunk, vagy egy kereskedelmi forgalomban is kapható PE-



jelölt CD 19 (normál perifériás B-sejtek markere, 6a, 6c ábrák), vagy egy PE-jelölt CD34 (össejtek markere, 6d ábra) antitestet használtunk, egy FITC-jelölt negatív kontroll scFv-vel vagy egy FITC-jelölt Y1 scFv-vel együtt. A 6b ábra egy dupla negatív kontroll. A FITC-jelölt minta (Y1 scFv) által kötött sejtek fluoreszcencia intenzitását (x tengely) viszonyítjuk a negatív kontroll festési mintázathoz viszonyítva (6e és 6f ábrák). A 6. ábra eredményei azt mutatják, hogy a legtöbb leukaemiás sejt, a pre-B-ALL sejtek, amelyeket a két mintán belül mértünk, pozitívak az Y1 festésre, az Y-I kötésnek köszönhetően.

[360.] **8.5 Az Y1-scFv kötődése sejtvonalakhoz:** Malignus hematopoietikus sejtvonalak közül is vizsgáltunk néhányat, hogy az Y1 felismeri-e őket. A FACS-analízis azt jelzi, hogy az Y1 sok vizsgált sejthez kötődik (9. táblázat). Megjegyezzük, hogy egyetlen humán B-sejt vonalat, és egy egér mieloid sejt vonalat teszteltünk. Fontos, hogy a kötődés az exponenciálisan növekvő sejtekre korlátozódott. A stacionárius fázisban levő sejtek általában nem kötődtek az Y1-hez, ami arra utal, hogy az Y1 ligandum expressziója a sejtek élelciklusa során szabályozott. Ezen túl, a kötés erőssége is változik a különböző reagáló sejtek között. Ez a megfigyelés arra utal, hogy különbségek vannak az expressziós szintekben, vagy a különböző sejtek ligandumjainak affinitásában.

9. táblázat. Az Y1 kötődése hematopoietikus sejtvonalakhoz

Típus	Erősen reaktív	Közepesen reaktív	Kevésbé reaktív
Humán Mieloid	KG-1; THP-1; U937; Tf-1; MEG	HL-60; HEL; K-562; MC1010	NB-4
Humán B-sejt			Namalwa; Daudi; UMUC3,RAJI
Humán T-sejt	Jurkat; Hs-602	CCRF-CEM; Molt-4; Hut-78;	
Egér Mieloid			M1; P388D1; PUS-1.8; WEHI-274.1

[361.] **8.6 DTT jelenlétében tisztított Y1 kötődése:** Miután egy Y1 klónt szelektáltunk, egy további eljárást is kidolgoztunk scFv molekula előállítására. Az Y1 populációk FTLC-analízisének eredményei azt mutatják, hogy a fehérje multimerizálódhat úgy, hogy főleg monomerek és tetramerek képződnek, és a kettő aránya egyik preparátumtól a másikig változik. Hogy homogén anyagot kapjunk, 5mM DTT-t adtunk hozzá az Protein-A sepharose affinitás oszlopon való tisztítás során, amit követett egy

eltávolítás PBS puffer csere segítségével. Valóban, a DTT kezelés után, az anyag nagy része (>90%) a monomer frakcióban volt. Nem találtunk szignifikáns különbséget az Y1 monomer formájának kötődése (melyet DTT jelenlétében tisztítottunk és HPLC-vel analizáltunk), és az Y1 formákat tartalmazó keverék kötődése között.

[362.] **8.7 Az Y1 egy leukémia sejtekre specifikus klón:** Az Y1 kazetta a V_H-DP32 csírvonalhoz tartozik. Néhány egyéb klónt izoláltunk és részleteztünk a 6. példában, melyek ugyanabból a csírvonalból származnak. Ezen klónok közé tartozik az Y17, Y-27 és Y-44. E klónok elsődleges szekvenciái (vagyis a csírvonal kazetták) kizárólag a CDR3 régióikban különböznek. Mindazonáltal, egyedül az Y1 mutat szelektivitást a leukémia sejtekre. E klónok CDR3 szekvenciáit foglaltuk össze a 10. táblázatban, valamint e klónok kötési sajátosságait a 11. táblázatban.

10. táblázat: A V_H3-DP32 izolált klónok CDR3 szekvenciái

Klón #	V _H -CDR3 szekvencia						Csírvonal
Y1	Met	Arg	Ala	Pro	Val	Ile	V _H 3-DP32
	1	2	3	4	5	6	
Y17	Leu	Thr	His	Pro	Tyr	Phe	V _H 3-DP32
	1	2	3	4	5	6	
Y-27	Leu	Arg	Pro	Pro	Glu	Ser	V _H 3-DP32
	1	2	3	4	5	6	
Y-44	Thr	Ser	Lys	Asn	Thr	Ser	V _H 3-DP32
	1	2	3	4	5	6	
	6	7	8	9	10	11	

11. táblázat: A V_H3-DP32 izolált klónok kötési sajátosságai

Klón #	Kötési specificitás
Y1	Nagyszámú leukémia sejthez kötődik
Y17	Minden vizsgált hematopoietikus sejthez kötődik, ide értve a normál limfocitákat is.
Y-27	Egyetlen vizsgált hematopoietikus sejthez sem kötődik.
Y-44	Egyetlen vizsgált hematopoietikus sejthez sem



kötődik.

[363.] A 10. és 11. táblázatok azt mutatják, hogy ugyan az elsődleges szekvenciák azonosak a 4 klónban, leszámítva a V_H -CDR3 régiót, a klónok kötési sajátságai mégis szignifikánsan különböznek egymástól. Ez a megfigyelés alátámasztja azt a koncepciót, hogy a V_H -CDR3 régió szekvenciája fontos szerepet játszik az antigén kötőhelyének specifikálásában. Megjegyezzük, hogy sem a CDR3 szekvencia hosszának, sem a specifikus csírvonal kazettának, amelyben van, úgy tűnik nincs elsődlegesen meghatározó szerepe a kötési specifikálásban. Mind az Y17 és mind az Y-27 egy hatékony CDR3 régiót tartalmaz, mint az Y1, és mindhárom klón nehéz láncá ugyanabból a csírvonalból származik. Az Y17 és az Y-27 esetében nem mutattunk ki szelektív kötődést hematopoietikus sejtekhez.

9. PÉLDA

[364.] **9.1 Trimerek konstrukciója:** A pHEN-Y1 vektort, amely eredetileg kódolja az Y1-et, amplifikáltuk PCR segítségével, egyenként a V_L és a V_H régiókra is. Az 5'-AACTCGAGTGAGCTGACACAGGACCCT sense oligonukleotidot, és az 5'-TTTGTCGACTCATTCTTTTTTTCGGCCGCACC antisense oligonukleotidot használtuk a V_L PCR reakcióhoz. A várható ~350 bp méretű cDNS terméket tisztítottuk, szekvenáltuk és XhoI és NotI restrikciós enzimekkel emésztettük.

[365.] Ugyanezt az eljárást alkalmaztuk a V_H régió amplifikálására (az 5'-ATGAAATACCTATTGCCTACGG sense oligonukleotid és az 5'-AACTCGAGACGGTGACCAGGGTACC antisense oligonukleotid használatával). A V_H PCR terméket NcoI and XhoI restrikciós enzimekkel emésztettük. Egy NcoI-NotI előemésztett hármas ligálási eljárással jutattuk be a pHEN vektorba. A végleges vektort pTria-Y1-nek neveztük.

[366.] E. coli transzformációt követően néhány klónt kiválasztottunk a további analízishez, amelyek DNS szekvenálást, fehérje expressziót, és a baktériumok periplazmájából való extrakciót foglaltak magukba. Redukáló SDS-PAGE és Wester blot analízist végeztünk, hogy megállapítsuk az Y1 trimerek méretét.

[367.] **9.2 Dimerek konstrukciója**



[368.] A fent említett pTria-Y1 vektort linearizáltuk XhoI restrikciós enzimmal, és szintetikus komplementer duplaszálú oligonukleotidokat (5'-TCGAGAGGTGGAGGCGGT és 5'-TCGAACCGCCTCCACCTC) előmelegítettünk (hőkezeltünk), majd ligáltunk az XhoI hasítási helyhez, az Y1-nehéz és Y1-könnyű láncok közé. Az új vektort pDia-Y1-nek neveztük. A DNS-szekvenciát és fehérje expressziót megerősítettük, úgy, mint a trimereknél.

[369.] **9.3 Dimerek és trimerek expressziója és tisztítása**

[370.] Az E. coliban való expresszió lényegében ugyanolyan volt, mint az Y1-scFv-knél leírt. Azonban az Y1 dimerek és trimerek tisztítása, amelyek a transzformált E. coli periplazmájából származnak, különbözött. Az Y1 scFv monomer forma tisztítható Protein-A Sepharose gyöngyöket tartalmazó affinitás oszlopon. Az Y1 multimer formáit azonban nem lehet hatékonyan tisztítani e módszerrel. Ezért a bakteriális periplazmából extrahált fehérjéket át 60%-os ammónium szulfáttal kicsaptuk és egy éjszakán át állni hagytuk, majd feloldottuk vízben és egy Sephacryl-200 (Pharmacia) méretszelektív oszlopra tettük, melyet előzőleg 0,1 xPBS oldattal kezeltünk. A frakciókat összegyűjtöttük és HPLC segítségével analizáltuk, és a dimereket vagy trimereket tartalmazó frakciókat különválasztottuk FITC-jelölésre és FACS analízisre.

[371.] **9.4 Y1 dimerek és trimerek kötődése sejtekhez**

[372.] FACS-analízist végeztünk Jurkat-sejteken, egy "háromlépéses festési eljárással". Először, a nyers kivonatokat, vagy a tisztított, nem jelölt scFv-t festettük meg, majd egér anti-myc antitesteket és végül, FITC-, vagy PE-konjugált anti-egér antitesteket. A FACS-analízis $5-8 \times 10^5$ sejtet kíván meg, amelyet Ficoll-módszerrel tisztítottunk, majd reszuszpendáltunk PBS+1 %-os BSA oldatban. A kötődést 1 óra alatt, 4°C-on hoztuk létre. Minden lépés után a sejteket mostuk, és reszuszpendáltuk PBS+1 %-os BSA oldatban. Az utolsó festési lépés után a sejteket fixáltuk 1% BSA-t és 2% formaldehidet tartalmazó PBS-oldatban, majd FACS analízisnek (Becton-Dickinson) vetettük alá.

[373.] A kötődés of Y1-scFv összehasonlítottuk a dimerek és a triemrek kötődésével. Ebben az analízisben (7. ábra), mindhárom forma kötési sajátságai nagyon hasonlóak, ami azt mutatja, hogy a fenti módosítások a molekulában nem változtatják meg, nem fedik el vagy rontják el az Y1 látszólagos kötési affinitását a ligandumjához.



[374.] **9.5 Y1-cys-KAK (cisztein dimer) előállítása**

[375.] Egy liter λ pL-y1-cys-KAK bakteriális kultúrát indukáltunk 42°C-on 2-3 órán át. Ezt a kultúrát 30 percig centrifugáltuk 5000 RPM-en. A pelletet reszuszpendáltuk 180 ml TE oldatban (50mM Tris-HCl pH 7.4, 20mM EDTA). 8 ml lizozim oldatot (5 mg/ml) adtunk hozzá, majd 1 órán át inkubáltuk. 20 ml 5M NaCl és 25 ml 25%-os Tritont adtunk hozzá, és még egy órán át inkubáltuk. Ezt a keveréket 60 percig 4° C-on centrifugáltuk 13000 RPM-en. A felülúszót leöntöttük. A pelletet reszuszpendáltuk TE-ben, egy homogenizátor segítségével. Ezt a folyamatot 3-4x megismételtük, amíg az inklúziós testek (a pellet) szürke/világosbarna nem lett. Az inklúziós testeket ezután feloldottuk 6M guanidin-HCl, 0.1M Tris pH 7,4, 2 mM EDTA oldatban (1.5 g inklúziós test 10 ml szolubilizáló oldatot igényelt, így kaptunk ~10 mg/ml oldott fehérjét). Ezt inkubáltuk legalább 4 órán át. A fehérjekoncentrációt megmértük és 10 mg/ml-re állítottuk be. DTT-t adtunk az oldathoz úgy, hogy annak végső koncentrációja 65 mM legyen, és szobahőmérsékleten inkubáltuk egy éjszakán át. Az áthajtogatódást úgy indukáltuk, hogy a 10 ml fehérje oldathoz cseppenként egy 0,5 M arginint, 0,1 M Tris-t pH 8,2 mM EDTÁ-t, 0,9 mM GSSG-t tartalmazó oldatot adtunk. Az újrashajtogató oldatot 48 órán át inkubáltuk ~10° C-on. A fehérjét tartalmazó újrashajtogató oldatot ezután dializáltuk egy 25 mM foszfát puffert, pH 6, és 100 mM karbamidot tartalmazó pufferban, és 500 ml-re koncentráltuk be. A koncentrált/dializált oldatot egy SP-sepharose oszlopon kötöttük meg és a fehérjét eluáltuk NaCl gradienssel (1 M-ig).

[376.] **9.6 Az S-S Y1-dimer affinitásának hasonlítása CONY1 és Y1-IgG-hez, Radioaktív kötési assay-vel (Radioreceptor Binding Assay, RRA), KG-1 sejtek használatával**

[377.] Ez az assay radiaktív ligandumokat használ, amelyeket 125 I-izotóppal történő jódozással készítettünk úgy, hogy klóramin T-t használtunk Y1-IgG konstrukción, vagy Bolton-Hunter reagenst CONY1 (Y1-scFv) molekulán. Az assay csövek 5×10^6 KG-1 sejteket tartalmaztak 0,2 ml-enként, és egy jelzett nyomkövető anyagot, amelyet nem jelölt kompetítorral variáltunk, pH 7,4 PBS + 0.1%-os BSA oldatban. 1 órás keveréssel 4°-on történő inkubálás után a sejteket alaposan mostuk hideg pufferral, és mértük a radioaktivitást.



[378.] A jelölt Y1-IgG-t használó RRA-kísérletekben 2 ng/cső ^{125}I -Y1-IgG-t használtunk, és mindhárom molekulával véghezvittük a kompetíciót. Az eredmények a 8. ábrán láthatók. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a S-S Y1 dimer affinitása 30x magasabb volt, mint a CONY1-eké. Egy megközelítő becslés az Y1-IgG affinitására ebben a kísérletben: 2×10^{-8} M. A dimer ennek megfelelő affinitása ezért 4×10^{-8} M.

[379.] Egy második jelölt CONY1-et használó RRA kísérletben, 100 ng/cső ^{125}I -Y1-IgG-t használtunk, és mindhárom molekulával véghezvittük a kompetíciót. Az eredmények a 9. ábrán láthatók. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a S-S Y1 dimer affinitása 20x magasabb volt, mint a CONY1-eké. Egy megközelítő becslés az Y1-IgG affinitására ebben a kísérletben: 10^{-6} M. A dimer ennek megfelelő affinitása ezért 5×10^{-8} M.

[380.] 9.7 GC (glycocalicin)-ELISA

[381.] 100 μl tisztított glycocalicint inkubáltunk egy 96 lapos aljú, maxisorp tálcákon, egy éjszakán át, 4°C -on. A tálcát ezután PBST (PBS+0,05% tween) oldattal mostuk 3x, majd 200 ml PBST-tej (PBST + 2% zsírmentes tej) oldatot adtunk hozzá, és monomert vagy dimert (100 μl) adtunk a PBST-tej oldathoz különböző koncentrációkban, és 1 óráig inkubáltuk szobahőmérsékleten. Aztán a tálcát mostuk, majd anti- V_L poliklonális antitestet (amelyeket V_L Y1 molekulával immunizált nyulakból kaptunk) (1:100-ban hígítottuk PBST-tejben) adtunk hozzá 1 órán át. A tálcát újra mostuk, majd anti-nyúl HPR-t adtunk újabb 1 órán át. A tálcát 5x mostuk, és 100 μl TMB szubsztrátot adtunk hozzá körülbelül 15 percen át, majd 100 μl 0,5 H_2SO_4 oldattal állítottuk le a reakciót. A tálcák optikai denzitását 450 nm-nél mértük egy ELISA-olvasóval.

[382.] 9.8 Y1 tetramerek előállítása

[383.] Egy konstrukciót, amelynek a szekvenciája LNDIFEAQKIEWHE, adtunk az Y1 C-terminusához PCR segítségével, és bejuttattuk egy IPTG-indukálható expressziós vektor kazettába. A klónt Y1-biotagnak neveztük. Ez a szekvencia a BirA enzim szubsztrátja, és biotin jelenlétében az enzim képes a biotint kovalens módon a lizinhez (K) kötni (Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. Science. 1996 Oct 4;274(5284):94-6, Altman JD et al). Ezt a konstrukciót BL21 baktérium sejtek termelték, inklúziós testek formájában. Az újrarahajtogatást ugyanúgy végeztük, mint ahogy fentebb



leírtuk. Az inklúziós testeket guanidin-DTT-ben szolubilizáltuk. Az újrachajtogatáshoz egy arginin-Tris-EDTA pufferban oldottuk fel. Dializáltuk és bekoncentráltuk egy HiTrapQ ioncserés tisztítás után.

[384.] A tisztított Y1-biotag scFv-t BirA (Avidity) enzimmel és biotinnal inkubáltuk, a gyártó utasításai szerint. A biotinizált Y1-biotag molekulát HABA teszttel analizáltuk (amely megbecsüli a molekulánkénti biotinok számát), és kimutattuk, hogy >0.8 biotin maradék/molekula körüli eredményt értünk el.

[385.] A biotinizált Y1-biotag-ot Streptavidin-PE-vel (Phycoerytrin) inkubáltuk, a komplexképződés céljából, és KG-1 sejteket (Y1-re pozitív) használó FACS analízisnek vetettük alá. A streptavidin akár 4 biotinizált Y1-biotag molekulát is képes kötni. A kötés érzékenysége 100-szorosára nőtt az aviditás növekedésének köszönhetően.

[386.] Az Y1-biotag szekvenciája a következő:

```

1    MEVQLVESGG GVVVRPGGSLR LSCAASGFTF DDYGMSWVRQ
41   APGKGLEWVS GINWNGGSTG YADSVKGRFT ISRDNAKNSL
81   YLQMNSLRAE DTAVYYCARM RAPVIWGQGT LVTVSRGGGG
121  SGGGGSGGGG SSELTQDPAV SVALGQTVRI TCQGDSLRSY
161  YASWYQQKPG QAPVLVIYGK NNRPSGIPDR FSGSSSGNTA
201  SLTITGAQAE DEADYYCNSR DSSGNNVVFV GGTKLTVLGG
241  GGLNDIFEAQ KIEWHE

```

[387.] **10. PÉLDA: Teljes méretű Y1-IgGI konstrukció**

[388.] A teljes IgG molekuláknak van néhány előnye az Fv formákkal szemben, például hosszabb a féléletidejük in vivo, és nagyobb hatásfokkal váltanak ki in vivo sejtes immunválaszt, mint amilyenek az ADCC vagy CDC (complement dependent cytotoxicity; Tomlinson, *Current Opinions of Immunology*, 5, 83-89(1993)). Egy molekuláris klónozási megközelítéssel, amelyet lejjebb fejtünk ki, az Y1 Fv régiókat teljes méretű IgGI molekulákká konvertáltuk. Az Y1-IgG1 konstrukciót a cDNS fragmentek egymáshoz kötésével értük el a következő módon:

[389.] **10.1 Egy vezérszekvencia, amely kompatibilis az emlős expressziós rendszerrel:** Egy cserélhető rendszert terveztünk, hogy lehetővé tegyük a teljes IgG molekulához szükséges elemek egyszerű inszercióját. A következő komplementer duplaszálú oligonukleotidokat, amelyek a leendő vezérszekvenciát kódolják, szintetizáltuk, hőkezeltük, és egy (SR α 5 promotor szabályozása alatt álló) emlős expressziós vektor XhoI hasítási helyére ligáltuk.

5'-TCGACCTCATCACCATGGCCTGGGCTCTGCTGCTCCTCACCTCCTCACTCA
GGACACAGGGTCCTGGGCCGAT

és

5'-GATCGATTGCACCAGCTGGATATCGGCCAGGACCCTGTGTCCTGAGTGAG
GAGGGTGAGGAGCAGCAGCCCAGGCCATGGTGATGAGG. A kezdő ATG kodontól upstream, két Kozak-elemet tettünk be. Ezen felül, egy belső EcoRV helyet is betettünk a vezérszekvencia és az XhoI hely közötti feltételezett hasítási helyre, hogy lehetővé tegyük a variábilis régiók további klónozását. Ezt a módosított vektort pBJ-3-nak neveztük.

[390.] **10.2 A V_L-t kódoló szekvenciát, amely az Y1 scFv cDNS-ből származik,** beinszertáltuk a vezérszekvencia és a könnyű lánc konstans régióját kódoló szekvencia közé. Hasonlóképpen, a V_H-t kódoló szekvenciát, amely az Y1 scFv cDNS-ből származik, inszertáltuk be a vezérszekvencia és a nehéz lánc konstans régióját kódoló szekvencia közé. Ezt a pHEN-Y1 vektor PCR amplifikációjával végeztük el, amely vektor az eredeti Y1-et kódolja, hogy megkapjuk a V_L és V_H régiókat, egyenként.

[391.] **10.3 Az oligonukleotidok**

5'-TTTGATATCCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGA (sense) és

5'-GCTGACCTAGGACGGTCAGCTTGGT (anti-sense) oligonukleotidokat használtuk a V_L PCR reakcióhoz. A ~350 bp várható méretű cDNS-terméket tisztítottuk, szekvenáltuk és EcoRV és AvrII restriktív enzimekkel emésztettük. Ugyanezt az eljárást alkalmaztuk a V_H cDNS amplifikálásához és tisztításához, a következő átíródó és nem-átíródó oligonukleotidok alkalmazásával:

5'-GGGATATCCAGCTG(C/G)(A/T)GGAGTCGGGC

és

5'-GGACTCGAGACGGTGACCAGGGTACCTTG, ebben a sorrendben.



[392.] **10.4 Konstans régiók:** A konstans $\lambda 3$ (CL- $\lambda 3$) régiót, és a nehéz lánc konstans CH1-CH3 régióit, melyek az IgG1 cDNS-ből származnak, egyenként szintetizáltuk a következő módon:

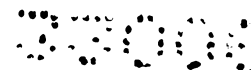
[393.] **10.4.1 A CL- $\lambda 3$ konstans régióhoz** RT-PCR-t alkalmaztunk mRNS-extrakton, melyet egy normál perifériás B-sejteket (CD 19+ sejtek) tartalmazó készletből vettünk, a következő sense és antisense oligonukleotidokkal kombinálva: sense 5'-CCGTCCTAGGTCAGCCCAAGGCTGC és anti-sense 5'-TTTGCGCCGCTCATGAACATTCTGTAGGGGCCACTGT oligonukleotidok. A várható méretű (~400 bp) PCR terméket tisztítottuk, szekvenáltuk és AvrII és NotI restrikciós enzimekkel emésztettük.

[394.] **10.4.2 A konstans IgGI régiókhöz** (γ lánc), egy humán BTG-nál immortalizált B-sejt klónt (CMV - klón #40) választottunk a PCR-amplifikációhoz. Erről a klónról kimutattuk, hogy humán CMV elleni IgG1-et szekretál, és azt is kimutattuk, hogy in vitro assy-kben ADCC-választ indukál. A CH1-CH3 cDNS-hez a következő oligonukleotidokat szintetizáltuk:

5'-CCGCTCGAGTGC(T/C)TCCACCAAGGGCCCATC(G/C)GTCTTC (sense) és 5'-TTTGCGCCGCTCATTTACCC(A/G)GAGACAGGGAGAGGCT (anti-sense), és felhasználtuk a PCR-amplifikációhoz. Ahogy a CL cDNS kódoló szekvenciánál leírtuk, a várható méretű (~1500 bp) PCR terméket tisztítottuk, szekvenáltuk és AvrII és NotI restrikciós enzimekkel emésztettük.

[395.] **10.5 A végső expressziós vektorokhoz,** egy tripla ligálási folyamatot végeztünk, amelyhez az EcoRV-NotI előemésztett vektort, EcoRV-AvrII variábilis cDNS-eket és AvrII-NotI konstans régiókat használtunk. A végső nehéz és könnyű láncot expresszáló vektorokat Y1-HC illetve Y1-LC néven említjük.

[396.] **10.6 Egy további vektort: pBJ-Y1-LP-t,** állítottunk elő az Y1-LC alapján, hogy lehetővé tegyük a puromycin rezisztens génen (PAC) alapuló dupla szelekciót. Ebben a vektorban az Y1-LC plazmid neomycin rezisztens génjét helyettesítettük egy ~1600bp hosszú fragmenttel, amely a PAC gént kódolja (a pMCC-ZP vektorból).



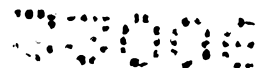
[397.] **10.7 Az open reading frame (ORF), amely mind az Y-I-IgG-HC és az Y1-IgG-LC molekulákra vonatkozik, valamint az általuk kódolt aminosav szekvenciák láthatók a következőkben:**

[398.] **10.7.1 Az Y1-IgG-HC (V_H C_{H1} C_{H2} C_{H3}) ORF-je**

```

1      ATGGCCTGGGCTCTGCTGCTCCTOACCCTCCTCACTCAGGACACAGGGTCTGGGCCGAT
1      M A W A L L L L T L L T Q D T G S W A D
61     ATCCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGTGTGGTACGGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCC
21     I Q L V E S G G G V V R P G G S L R L S
121    TGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTGATGATTATGGCATGAGCTGGGTCCGCCAAGCTCCA
41     C A A S G F T F D D Y G M S W V R Q A P
181    GGG AAGGGGCTGGAGTGGGTCTCTGGTATTAATTGGAATGGTGGTAGCACAGGTTATGCA
61     G K G L E W V S G I N W N G G S T G Y A
241    GACTCTGTGAAGGGCCGATTACCCATCTCTAGAGACAACGCCAAGAAGTCCCTGTATCTG
81     D S V K G R F T I S R D N A K N S L Y L
301    CAAATGAACAGTCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCAAGAATGAGGGCT
101    Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R M R A
361    CCTGTGATTTGGGGCCAAGGTACCCTGGTCACCGTCTCGAGTGCTTCCACCAAGGGCCCA
121    P V I W G Q G T L V T V S S A S T K G P
421    TCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGC
141    S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G
481    TGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTTCGTGGAAGTCAAGGCGCCCTG
161    C L V K D Y F P E P V T V S W N S G A L
541    ACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGC
181    T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S
601    AGCGTGGTGACCGTGCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAAT
201    S V V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N
661    CACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAAGT
221    H K P S N T K V D K R V E P K S C D K T
721    CACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACTGTCAAGTCTTCTCCTTC
241    H T C P P C P A P E L L G G P S V F L F
781    CCCCCAAAACCCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTG
261    P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V
841    GTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAG
281    V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E
901    GTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCCTGTGGTC
301    V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V
961    AGCGTCTCACCGTCTGACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTC
321    S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V
1021  TCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCC
341    S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P
1081  OGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTC
361    R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N Q V
1141  AGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGC

```



381 S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S
 1201 AATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGTCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCC
 401 N G Q P E N N Y K T T S P V L D S D G S
 1261 TTCTTCCTCTATAGCAAGCTCACCGTGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTC
 421 F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F
 1321 TCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTG
 441 S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L
 1381 TCTCTGGGTAAATGA
 461 S L G K *

[399.] 10.7.2 Az Y1-IgG-LC (V_L C_L) ORF-je

1 ATGGCCTGGGCTCTGCTGCTCCTCACCTCCTCACTCAGGACACAGGGTCTGGGCCGAT
 1 M A W A L L L L T L L T Q D T G S W A D
 61 GCAGAGCTGACTCAGGACCCTGCTGTGTCTGTGGCCTGGGACAGACAGTCAGGATCACA
 21 **A E L T Q D P A V S V A L G Q T V R I T**
 1212 TGCCAAGGAGACAGCCTCAGAAGCTATTATGCAAGCTGGTACCAGCAGAAGCCAGGACAG
 41 **C Q G D S L R S Y Y A S W Y Q Q K P G Q**
 181 GCCCCTGTACTTGTCTATGGTAAAAACAACCGGCCCTCAGGGATCCCAGACCGATTC
 161 **A P V L V I Y G K N N R P S G I P D R F**
 241 TCTGGCTCCAGCTCAGGAAACACAGCTTCCTTGACCATCACTGGGGCTCAGGCGGAAGAT
 81 **S G S S S G N T A S L T I T G A Q A E D**
 301 GAGGCTGACTATTACTGTAACCTCCCGGACAGCAGTGGTAACCATGTGGTATTCGGCGGA
 101 **E A D Y Y C N S R D S S G N H V V F G G**
 361 GGGACCAAGCTGACCGTCTAGGTGAGCCCAAGGCTGCCCCCTCGGTCACTCTGTTCCCG
 121 **G T K L T V L G Q P K A A P S V T L F P**
 421 CCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCCACTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTC
 141 **P S S E E L Q A N K A T L V C L I S D F**
 481 TACCCGGGAGCCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTG
 161 **Y P G A V T V A W K A D S S P V K A G V**
 541 GAGACCACACCCCTCCAAACAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTACCTGAGC
 181 **E T T T P S K Q S N N K Y A A S S Y L S**
 601 CTGACGCCTGAGCAGTGGAAAGTCCCACAAAAGCTACAGCTGCCAGGTACGCATGAAGGG
 201 **L T P E Q W K S H K S Y S C Q V T H E G**
 661 AGCACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCCCTACAGAATGTTTCATGA
 221 **S T V E K T V A P T E C S ***

[400.] A vezérszekvenciák alá vannak húzva. A V_H és V_L régiókat azok az aminosav szekvenciák kódolják, amelyek vastag betűvel vannak szedve, ezeket követi vagy az IgG1 (a nehéz lánc esetében), vagy a λ3 (a könnyű lánc esetében) konstans régió szekvencia.



[401.] **10.8 A nehéz és könnyű lánc Y1 expressziója CHO sejtekben.**

Y1-HC és Y1-LC vektorokat használtunk külön-külön a nehéz és könnyű láncokat expresszáló stabil sejtek transzfekciójára és szelekciójára. A G418 szelekciót és sejtnövekedést követően, a felülúszóba szekretált fehérjét analizáltuk IgG expresszióra befogásos EIA assay (capture EIA assay) és Western blot segítségével.

[402.] **10.8.1 Befogásos EIA assay:** Egy 96 lyukú tálca lyukait előzőleg bevontuk egér anti-humán igG Fc-vel (Sigma). Az előb említett felülúszót hozzáadtuk lyukakhoz, és nehéz lánc jelenlétét IgG1-et mutattuk ki biotinizált kecske anti- γ lánc specifikus antitesttel (Sigma), streptavidin HRP-vel és szubsztráttal. ELISA tálca olvasóval követtük az előhívott szint A_{405} -nél.

[403.] **10.8.2 Western blot analízis:** Fent említett sejtek felülúszóját átfuttattuk egy 12,5%-os SDS-PAGE-en. A láncok expresszióját (a) a nehéz láncok esetében kecske anti-humán IgG-HRP-vel (H+L; Sigma Cat #A8667) és (b) a könnyű láncok esetében kecske anti-humán $\lambda 3$ lánc antitesttel (Southern Biotechnology Association, Cat #2070-08) mutattuk ki.

Mindkét lánc expresszióját alátámasztották a fenti assay-k, és kotranszfekciót hajtottunk végre, hogy teljes méretű Y1-IgG1-et kapjunk.

[404.] **10.9 Y1-IgG expressziója és tisztítása**

[405.] **10.9.1 Sejtkultúra és transzfekció:** CHO sejteket tartottunk kultúrában F-12 médium és 10% főtális szarvasmarha szérum és 40 $\mu\text{g/ml}$ gentamicin segítségével 37°C-on, 5%-os CO_2 atmoszférában. A transzfekció előtt egy nappal $0,8 \times 10^6$ sejtet ültettünk ki 90 mm-es edényekbe. A kultúrákat 10 μg nehéz és könnyű lánc DNS-sel kotranszfectáltuk, a FuGene (Roche) transzfekció reagens technikával. Nem szelektív médiumban való 2 napos növesztés után a sejteket 10-12 napig tartottuk F-12 médiumban, amely 550 $\mu\text{g/ml}$ neomycint és 3 $\mu\text{g/ml}$ puromycint tartalmazott. A sejteket tripszinnel kezeltük és klónoztuk limitáló hígítással, 0,5 sejt/lyuk Costar 96-lyukú tálcákon. A különálló kolóniákat kiszedtük, és 6-lyukú edényekben növesztettük és üvegekbe raktuk át.

[406.] **10.9.2 A nehéz és könnyű láncok szekréciójának meghatározása:** Egy szendvics ELISA assay-t végeztünk a transzfectált CHO sejtek felülúszójába szekretált



antitest koncentrációjának meghatározására. Az antitest koncentráció meghatározására a következő antitesteket használtuk: monoklonális anti-humán IgG1 (Fc) (Sigma), mint bevont antitest, kecske anti-humán IgG (γ -lánc specifikus) biotin konjugátumot, mint detektort (Sigma) és tiszta humán IgG1, lambda (Sigma), standardként. Az ELISA assay alapján a kitermelés 3-4 $\mu\text{g/ml}$ között változott.

[407.] **10.9.3 Sejtekből Mab-k előállítása és tisztítása:** Sejteket növesztettünk forgó üvegekben addig, amíg el nem érték az $1-2 \times 10^8$ sejt/üveg koncentrációt, F-12 médiumban 10% főtális szarvasmarha szérummal, melyet neomycinnel és puromycinnel egészítettünk ki. Az előállításhoz a sejteket hasonló médiumban inkubáltuk, de 2% főtális szarvasmarha szérummal, két további napig. A szekretált antitestet Protein-G Sepharose oszlopon (Pharmacia) tisztítottuk. A kötést 20 mM Na-foszfát pufferben, pH 7,0, az eluálást 0.1 M glicin pufferben, pH 2,5-3,0, végeztük. A tisztított antitest mennyiségét UV-abszorbanciával határoztuk meg; a tisztaságot SDS-PAGE segítségével analizáltuk. Nem denaturáló körülmények közt a teljes IgG antitestre a várt molekulatömeget, 160 kDa-t kaptuk. Denaturáló gélekben mind a nehéz, mind a könnyű lánc a várt 55 és 28 kDa-nak bizonyult, ebben a sorrendben.

[408.] **10.9.4 A teljes méretű Y1-IgG molekula kötődése:** Kötődési kísérleteket végeztünk az Y1-IgG molekula kötésének meghatározására, az scFv-Y1 molekulához hasonlítva. Egy kétlépéses módszert alkalmaztunk, ahol 5 ng Y1-IgG-t reagáltattunk mind RAJI sejtekkel (negatív kontroll, 7a. ábra), mind Jurkat sejtekkel (Y1-pozitív sejtek, 7b. ábra). A kimutatáshoz PE-jelölt kecske anti-humán IgG-t használtunk. Hasonlóképpen 1 μg scFv-Y1-t reagáltattunk Jurkat sejtekkel (7c. ábra), és PE-jelölt nyúl anti-scFv antitestet használtunk a kimutatásra. Az eredmények azt mutatják, hogy mind az Y1-IgG, mind az scFv-Y1 kötődik a Jurkat sejtekhez, körülbelül 1000x annyi scFv molekula volt szükséges az Y1-IgG kimutatási szintjéhez hasonló eredményhez.

A táblázatok rövid leírása

[409.] **1. táblázat:** Az AM protokollból származó panning eredmények. A panninghoz használt fagemidek becsült számát (input) és az eluált kötött fagemidek becsült számát (output) tartalmazza ez a táblázat 4 egymást követő AM biopanning lépés során. A



sejt forrát és az eluáló közeget is a listába tettük minden egyes output esetén, valamint a különböző molekulakészletek megkülönböztetésére használt jelzéseket.

[410.] **2. táblázat: Az AM biopanning protokollt követő szelektált klónok.** A különböző izolált klóntípusok CDR3 régiójában az aminosavmaradékok számát (V_H -CDR3 méretét) és a CDR3 aminosav szekvenciáját összegzi ez a táblázat. Ezen felül, a két AM biopanning outputjaiban, a T16M3 és a T16M3.1 outputokban található mindegyik klón típus gyakorisága is a táblázat része.

[411.] **3. táblázat: Az YPR protokoll panning eredményei.** A panninghoz használt fagemidek becsült számát (input) és az eluált kötött fagemidek becsült számát (output) tartalmazza ez a táblázat. A eluáló közeget is a listába tettük minden egyes output esetén, valamint a különböző molekulakészletek megkülönböztetésére használt jelzéseket.

[412.] **4. táblázat: Az YPNR protokoll panning eredményei.** A panninghoz használt fagemidek becsült számát (input) és az eluált kötött fagemidek becsült számát (output) tartalmazza ez a táblázat az YPNR biopanning protokoll három egymást követő lépése során. Az eluáló közeget is a listába tettük minden egyes output esetén, valamint a különböző molekulakészletek megkülönböztetésére használt jelzéseket.

[413.] **5. táblázat: YPR biopanning eljárást követő szelektált Y-sorozat klónok, R3 outputtal.** Néhány különböző klónt azonosítottunk az R3 output készletben. Az azonosított klónok V_H -CDR3 régiói, az aminosav maradékok száma és az aminosav szekvenciák, valamint a csírvonal jelzéseket részletezi ez a táblázat.

[414.] **6. táblázat: Y1 kötési specificitása leukémia sejtekhez.** Három különböző scF klón kötési kísérleteiből származó eredményeket mutatja ez a táblázat, mindegyiket reagáltattuk olyan sejtkeverékekkel, amelyek elsődlegesen 7 különböző leukémia sejt típust tartalmaznak, amint azt FACS-analízissel megállapítottuk. Az eredmények azon páciensek arányát mutatják, akiknek sejtjei minden tesztelt antitesttel pozitív reakciót mutattak, a FACS-analízis alapján. A számlálóban van a pozitív páciensek száma, a nevezőben pedig az összes páciens, akiknek a mintáit a tesztben felhasználtuk az adott scFv/leukémia sejt típus kombinációnál.



[415.] **7. táblázat: scFv kötődése Ficoll-tisztított normál vérsejtekhez, FACS analízis.** Három scFv klón kötődését vizsgáltuk öt különböző Ficoll-tisztított normál vérsejttípusokhoz. Ezek a kötési kísérletek a normál vérminták azon frakcióját reprezentálják, amelyeket az FACS-analízis pozitívnak talált minden tesztelt antitesttel való reakcióban.

[416.] **8. táblázat: Y1 scFv kötődés összehasonlítása antitestek kötődésével különböző sejtmakerekhez.** Az Y1 és egy sorozat más antitesttel való festés FACS-analízisét mutatja ez a táblázat. Ficoll-tisztított perifériás és csontvelő sejteket preparáltunk AML-páciensekből, és az Y1 scFv kötési specificitását néztük különböző AML-sejt markereivel összehasonlítva. Az eredményeket az adott páciens Ficoll-tisztított sejteinek százalékában adtuk meg, amelyeket FACS-analízissel pozitívnak találtunk minden egyes Fv molekulával való reakcióban. Négy másik antitestet futtattunk az összehasonlítás végett: (1) CD13 - granulociták és monociták markere; (2) CD14 - a monociták és neutrofil granulociták markere; (3) CD33 - a normál mieloid sejtek és a leukaemiás mieloid sejtek markere; és (4) CD34 - őssejtek markere.

[417.] **9. táblázat: Y1 kötődése hematopoietikus sejtvonalakhoz.** FACS analízis végeztünk az Y1 scFv kötődésének megállapítására három különböző humán leukémia sejtvonalakhoz és egy egér sejtvonalhoz. Fel vannak sorolva azok a sejtvonalak amelyhez az Y1 pozitívan kötöttek (reaktív), vagy nem kötöttek (nem-reaktív).

[418.] **10. táblázat: V_H3-DP32 izolált klónok CDR3 szekvenciái.** Különböző biopanning és szelekciós eljárásokat követően Dp32 csíravonal alapján néhány klónt izoláltunk. Az Y1, Y17, Y-27 és Y-44 klónokat azonosítottuk a biopanning-szelekciós eljárás során, vérlemezkéken (YPR és YPNR protokollok). E klónok V_H-CDR3 régiójának szekvenciáit tartalmazza ez a táblázat.

[419.] **11. táblázat: V_H3-DP32 izolált klónok kötési sajátosságai.** A DP32-ből származó klónok kötési specificitását különböző hematopoietikus sejtekhez FACS-analízissel vizsgáltuk.

[420.] A találmányt specifikus példákra, anyagokra, adatokra való utalással írtuk le. Egy szakember számára belátható, hogy a találmány különböző aspektusai, megközelítései, és alternatív módosításai is rendelkezésre állhatnak az alkalmazásra és az előállításra. Ilyen



alternatív módok, a jelen találmány szándékait és szellemét fegyelembe véve
konstruálhatók, mint ahogyan a következő igénypontokkal definiáljuk:



Szabadalmi igénypontok

1. Peptid vagy polipeptid, amely egy Fv molekulát tartalmaz, vagy annak konstrukcióját, vagy ezek bármelyikének egy fragmentjét, vagy egy fragment konstrukcióját, és amelynek felerősített kötési tulajdonságai vannak, és így szelektíven és/vagy specifikusan kötődik egy célsejthez a többi sejt ellenében, azzal jellemezve, hogy a kötési szelektivitást vagy specificitást elsődlegesen az első hipervariábilis régió határozza meg, és ahol az Fv molekula scFv vagy dsFv, és adott esetben tartalmazhat egy vagy több tag-et is.
2. Az 1. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid, azzal jellemezve, hogy az első hipervariábilis régió egy CDR3 régió, amelynek az aminosav szekvenciája az SEQ ID NOs:8-24-t tartalmazó csoportból van kiválasztva.
3. Az 1. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid, azzal jellemezve, hogy az első hipervariábilis régió egy CDR3 régió, amelynek az aminosav szekvenciája a SEQ ID NOs:8-24-t tartalmazó csoportból van kiválasztva, és ahol a kötési specificitást vagy szelektivitást másodlagosan befolyásolja egy második hipervariábilis régió, egy harmadik hipervariábilis régió, és/vagy egy vagy több az első, a második és/vagy a harmadik hipervariábilis régiótól upstream vagy downstream elhelyezkedő határoló régió.
4. A 2. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid, azzal jellemezve, hogy a peptid vagy polipeptid egy scFv molekula, melynek szekvenciája: SEQ ID NO: 25, amelyben az első hipervariábilis régió egy CDR3 régió, amely azonos a SEQ ID NO: 8 szekvenciával.
5. Az 1. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid, azzal jellemezve, hogy az scFv molekulának egy egyenes vagy elágazó láncú, 20 vagy kevesebb aminosavmaradékú kötő molekulája (spacer) van.
6. Az 5. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid, azzal jellemezve, hogy a kötő molekula SEQ ID NO: 123 vagy SEQ ID NO: 124 szekvenciát tartalmaz.



7. Az 1. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid, azzal jellemezve, hogy a target sejt aktivált, serkentett, módosult, megváltozott, megzavart, abnormális vagy kóros sejt.
8. A 7. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid, azzal jellemezve, hogy a kóros sejt rákos sejt.
9. A 7. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid, azzal jellemezve, hogy a sejtet a következő csoportból választottuk: carcinoma, sarcoma, leukemia, adenoma, lymphoma, myeloma, blastoma, seminoma, és melanoma sejtek.
10. A 9. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid, azzal jellemezve, hogy a sejt leukémia vagy myeloma sejt.
11. A 9. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid, azzal jellemezve, hogy a leukémia vagy myeloma sejt egy malignus B-sejt.
12. A 10. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid, azzal jellemezve, hogy a leukémia sejt egy akut myeloid leukémia sejt vagy egy malignus B-sejt.
13. A 2. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid, amely továbbá tartalmaz egy egymást követő aminosavakat tartalmazó kazettát, amelynek aminosav szekvenciáját a SEQ ID NOs:30-113-t tartalmazó csoportból választjuk ki, vagy azokból, amelyek ezekkel legalább 90%-os hasonlóságot mutatnak, vagy a fragmentjét, azzal jellemezve, hogy a kazetta vagy a fragment szolgáltat egy olyan keretet, amelybe egy CDR3 régió van beépítve, inszertálva, hozzákötve, kombinálva vagy fuzionálva, amelynek az aminosav szekvenciáját a SEQ ID NOs:8-24-t tartalmazó csoportból választjuk ki.
14. A 13. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid, azzal jellemezve, hogy a kazetta aminosav szekvenciáját a következő csoportból választjuk ki: SEQ ID NOs:30-32,33, 37-39,41, 43, 45, 46, 48, 51, 54, 57, 59-68, 70, 71, 76-85, 87, 89-92, 94, 97, 99, 103, 106, 112, és 113, vagy egy ezekkel legalább 90%-os aminosav hasonlóságot mutató szekvencia.



15. A 13. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid, azzal jellemezve, hogy a kazetta aminosav szekvenciája SEQ ID NO: 61, vagy ezekkel legalább 90%-os aminosav hasonlóságot mutat.
16. A 15. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid, azzal jellemezve, hogy a kazetta aminosav szekvenciája SEQ ID NO: 61, vagy legalább 90%-os aminosav hasonlóságot mutat vele.
17. A 15. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid, azzal jellemezve, hogy a SEQ ID NO: 61 szekvencia hét karboxi-végen levő aminosavmaradékát helyettesítjük a SEQ ID NO: 122 szekvencia hét aminosavmaradékával.
18. A 3. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid, azzal jellemezve, hogy a második és a harmadik hipervariábilis régió CDR2 illetve CDR1 hipervariábilis régiók, ebben a sorrendben.
19. A 2. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid, azzal jellemezve, hogy a CDR3 régió aminosav szekvenciája a SEQ ID NO: 8 szekvencia.
20. A 18. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid, azzal jellemezve, hogy a CDR2 és CDR1 régiók aminosav szekvenciái a SEQ ID NO: 115 illetve SEQ ID NO: 114 szekvenciák, ebben a sorrendben.
21. A 3. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid, azzal jellemezve, hogy a második és harmadik hipervariábilis régiók CDR2 és CDR1 hipervariábilis régiók, ebben a sorrendben, és ahol a CDR3, CDR2 és CDR1 régiók aminosav szekvenciái a SEQ ID NOs:8, 115 illetve 114 szekvenciák, ebben a sorrendben.
22. A 3. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid, azzal jellemezve, hogy a CDR3 upstream elhelyezkedő határoló régiójának aminosav szekvenciája a SEQ ID NO: 117, és amelyben a CDR3 downstream elhelyezkedő határoló régió aminosav szekvenciája a SEQ ID NO: 116.
23. A 3. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid, azzal jellemezve, hogy a második hipervariábilis régió egy CDR2 hipervariábilis régió, és ahol a CDR2 upstream elhelyezkedő határoló régiójának aminosav szekvenciája a SEQ ID NO: 119



szekvencia, és ahol a CDR2 downstream elhelyezkedő határoló régiójának aminosav szekvenciája a SEQ ID NO: 118 szekvencia.

24. A 3. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid, azzal jellemezve, hogy a harmadik hipervariábilis régió egy CDR1 hipervariábilis régió, és ahol a CDR1 régiótól upstream elhelyezkedő határoló régiójának az aminosav szekvenciája a SEQ ID NO: 121, és ahol a CDR1 downstream elhelyezkedő határoló régiójának aminosav szekvenciája a SEQ ID NO: 120 szekvencia.
25. A 18. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid, azzal jellemezve, hogy az egymást követő aminosavakból álló kazetta, amiket az SEQ ID Nos:30-113, vagy ezej fragmentjét tartalmazó csoportból választunk ki, CDR2 és CDR3 régióit helyettesítjük a SEQ ID NOs:115 illetve a 114 szekvenciákkal.
26. A 18. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid, azzal jellemezve, hogy az egymást követő aminosavakból álló kazetta, amiket a SEQ ID NOs:30-32, 35, 37-39, 41, 43, 45, 46, 48, 51, 54, 57, 59-68, 70, 71, 76-85, 87, 89-92, 94, 97, 99, 103, 106, 112, és 113, vagy ezek fragmentjét tartalmazó csoportból választunk ki, CDR2 és CDR3 régióit helyettesítjük a SEQ ID NOs:115 illetve 114 szekvenciákkal.
27. A 3. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid, azzal jellemezve, hogy
 - (a) a második és harmadik hipervariábilis régiók CDR2 illetve CDR1 hipervariábilis régiók,
 - (b) a CDR3 aminosav szekvencia a SEQ ID NO: 8,
 - (c) a CDR2 aminosav szekvencia a SEQ ID NO: 115,
 - (d) a CDR1 aminosav szekvencia a SEQ ID NO: 114,
 - (e) a CDR3 upstream elhelyezkedő határoló régió aminosav szekvenciája a SEQ ID NO: 117,
 - (f) a CDR3 downstream elhelyezkedő határoló régió aminosav szekvenciája a SEQ ID NO: 116,



- (g) a CDR2 upstream elhelyezkedő határoló régió aminosav szekvenciája a SEQ ID NO: 119,
 - (h) a CDR2 downstream elhelyezkedő határoló régió aminosav szekvenciája a SEQ ID NO: 118,
 - (i) a CDR1 upstream elhelyezkedő határoló régió aminosav szekvenciája a SEQ ID NO: 121, és
 - (j) a CDR1 downstream elhelyezkedő határoló régió aminosav szekvenciája a SEQ ID NO: 120.
28. Az 1. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid, azzal jellemezve, hogy az Fv egy phage display libraryból kapható scFv.
29. A 28. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid, azzal jellemezve, hogy a phage display library-t nem immunizált humán perifériás vér limfocitákból hozzuk létre, és ahol az scFv peptidet korábban nem karakterizált és nem tisztított a target sejt felszínén levő antigénekre szelektáltjuk.
30. Módszer a 28. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid azonosítására vagy szelektálására, amely egy biopanning eljárást tartalmaz, azzal jellemezve, hogy a biopanning eljárás magában foglalja a fág egy célsejthez kötését, a nem kötött fágok eltávolítását, a kötött fágok eluálását, és az eluált fágok fenntartását és amplifikálását.
31. Peptid, vagy polipeptid, amely tartalmaz egy Fv molekulát, vagy annak egy konstrukcióját vagy ezek bármelyikének egy fragmentjét, vagy egy fragment konstrukcióját, és amelynek felerősített kötési tulajdonságai vannak, és így szelektíven és/vagy specifikusan köt egy lényegében hozzáférhető és/vagy túlexpresszált kötőhelyhez egy célsejten vagy sejtben, ahol a célsejthez való kötődés a többi sejt ellenében történik, amely sejtben vagy a sejtben a kötőhely lényegében nem elérhető, és/vagy expresszált, azzal jellemezve, hogy a kötési szelektivitást vagy specificitást elsődlegesen egy első hipervariábilis régió határozza meg, és ahol az Fv molekul scFv vagy dsFv, és ahol az Fv adott esetben tartalmazhat egy vagy több tag-et is.



32. A 31. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid, azzal jellemezve, hogy az első hipervariábilis régió egy CDR3 régió, amelynek aminosav szekvenciáját az SEQ ID NOs:8-24-t tartalmazó csoportból választjuk ki.
33. A 31. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid, azzal jellemezve, hogy az első hipervariábilis régió egy CDR3 régió, amelynek aminosav szekvenciáját az SEQ ID NOs:8-24-t tartalmazó csoportból választjuk ki, és amelyben a kötési szelektivitást vagy specificitást másodlagosan befolyásolja egy második hipervariábilis régió, egy harmadik hipervariábilis régió, és/vagy egy az első, második és/vagy a harmadik hipervariábilis régiótól upstream vagy downstream elhelyezkedő határoló régió, és ahol a második és harmadik hipervariábilis régiók CDR2 illetve CDR1 régiók, ebben a sorrendben.
34. Peptid vagy polipeptid, amely tartalmaz egy Fv molekulát, vagy annak egy konstrukcióját vagy ezek bármelyikének egy fragmentjét, vagy egy fragment konstrukcióját, és amelynek felerősített kötési tulajdonságai vannak, és így szelektíven és/vagy specifikusan köt egy célsejthez, a többi sejt ellenében, azzal jellemezve, hogy az Fv molekula tartalmaz egy első láncot, amelynek első, második és harmadik hipervariábilis régiója van, valamint egy második láncot, amelynek első, második és harmadik hipervariábilis régiója van, és ahol az első lánc egyik hipervariábilis régiójának szekvenciáját a SEQ ID NOs:8-24-t tartalmazó csoportból választjuk ki, és ahol a második lánc egyik hipervariábilis régiójának szekvenciáját a SEQ ID NOs:1-6-t és 125-202-t tartalmazó csoportból választjuk ki, és az első, második és harmadik hipervariábilis régiók CDR3, CDR2 illetve CDR1 régiók, ebben a sorrendben, és ahol az Fv molekul scFv vagy dsFv, és ahol az Fv molekula adott esetben tartalmazhat egy vagy több tag-et is.
35. A 34. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid, azzal jellemezve, hogy
- (a) az első lánc és a második lánc is tartalmaz egy első hipervariábilis régiót, amit a SEQ ID NOs:8-24-t tartalmazó csoportból választunk ki; vagy
- (b) az első lánc hipervariábilis régiója és a második lánc hipervariábilis régiója azonos és a SEQ ID NOs:8-24-t tartalmazó csoportból választjuk ki; vagy



- (c) az első lánc első hipervariábilis régióját az SEQ ID NOs:8-24, és a második lánc első hipervariábilis régióját a SEQ ID NOs:1-6-t és 125-202-t tartalmazó csoportból választjuk ki; vagy
- (d) az az első lánc első hipervariábilis régióját a SEQ ID NOs: 1-6-t és 125-202-t tartalmazó csoportból választjuk ki, és a második lánc első hipervariábilis régióját a SEQ ID NOs: 8-24-t tartalmazó csoportból választjuk ki.
36. A 34. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid, azzal jellemezve, hogy az első lánc második és harmadik hipervariábilis régiói a SEQ ID NOs:114 és 115 szekvenciák, ebben a sorrendben.
37. Peptid vagy polipeptid, mely tartalmaz egy Fv molekulát, vagy annak egy konstrukcióját, vagy ezek bármelyikének egy fragmentjét, vagy egy fragment konstrukcióját, és
- (a) egy olyan első sejten levő ismeretlen ligandumhoz kötődik, amely sejtnek van első és második fázisa, és ahol a kötés hatékony a második fázisban, de lényegében nem hatékony az első fázisban, és
- (b) az immun-keresztreaktivitás miatt, specifikusan vagy szelektíven kötődik egy a második sejten levő ligandumhoz, és amelyben az Fv molekula scFv vagy dsFv, és ahol az Fv adott esetben tartalmazhat egy vagy több tag-et is.
38. A 37. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid, azzal jellemezve, hogy az első sejt normál sejt.
39. A 37. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid, azzal jellemezve, hogy az első fázis egy nem aktivált fázis, és a második fázis egy aktivált, serkentett, módosult, megváltozott vagy megzavart fázis.
40. A 37. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid, azzal jellemezve, hogy a második sejt kóros sejt.
41. A 40. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid, azzal jellemezve, hogy a kóros sejt rákos sejt.



42. A 40. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid, azzal jellemezve, hogy a kóros sejt lehet carcinoma, sarcoma, leukemia, adenoma, lymphoma, myeloma, blastoma, seminoma, és melanoma sejt.
43. A 42. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid, azzal jellemezve, hogy a kóros sejt leukémia sejt.
44. A 43. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid, azzal jellemezve, hogy a leukémia sejt akut myeloid leukémia sejt.
45. A 37. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid, azzal jellemezve, hogy a peptid vagy polipeptid szelektív és/vagy specifikus kötődését a második sejt ligandumjához elsősorban az első hipervariábilis régió határozza meg.
46. A 45. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid, azzal jellemezve, hogy az első hipervariábilis régió egy CDR3 régió, melynek aminosav szekvenciáját a SEQ ID NOs: 8-24-t tartalmazó csoportból választjuk ki.
47. A 46. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid, azzal jellemezve, hogy az első hipervariábilis régió egy CDR3 régió, melynek szekvenciáját a SEQ ID NOs: 8-24-t tartalmazó csoportból választjuk ki, és ahol a kötési szelektivitást vagy specificitást másodlagosan befolyásolja egy második hipervariábilis régió, egy harmadik hipervariábilis régió, és/vagy egy vagy több, az első, második, harmadik hipervariábilis régiótól upstream vagy downstream elhelyezkedő határoló régió, ebben a sorrendben.
48. Ligandum, amelyet a második sejt expresszál, és amely képes kötődni a 37. igénypont peptidjével vagy polipeptidjével.
49. Molekula, amely felismeri és köti a 48. igénypont szerinti ligandumot.
50. Nukleinsav molekula, amely az 1., 31., 34., vagy 37. igénypontok bármelyike szerinti peptidet vagy polipeptidet kódolja.
51. Az 50. igénypont szerinti nukleinsav molekula, azzal jellemezve, hogy a nukleinsav DNS.



52. A 37. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid, azzal jellemezve, hogy az első sejt első és második fázisai ugyanazok, és ahol az első sejt egy sejtvonalból származik.
53. Az 52. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid, azzal jellemezve, hogy a sejtvonalat a következő csoportból választjuk ki: Jurkat, MOLT-4, HS-602, U937, TF-1, THP-1, KG-1, ML-2, és HUT-78.
54. Módszer, egy célmolekula azonosítására, amely ismeretlen immun-keresztkötő reaktivást mutató kötőhelyekhez kötődik első és második sejteken, és amely módszer tartalmazza
- (a) egy vagy több biopanning megvalósítását az első célsejten, egy második fázisban, de nem első fázisban, ami lényegében hozzáférhetővé tesz vagy felfed egy kötőhelyet, amelynek legalább egy ismeretlen liganduma van, ezáltal létrehozva a felismerő molekulák első populációját;
 - (b) egymást követő biopanning és/vagy szelekciós lépések megvalósítását, kiindulva az (a) lépés felismerő molekuláinak első populációjából, amelyeket egy második sejten végzünk, ami displays egy kötőhelyet, amely tartalmaz legalább egy ismeretlen ligandumot, amely immun-keresztkötő reaktivitást mutat az első sejt ismeretlen ligandumjával, és így létrehozuk a felismerő molekulák második populációját;
 - (c) a (b) lépés felismerő molekulái második populációjának amplifikálását és tisztítását; és
 - (d) a (c) lépés tisztított felismerő molekulái felismerő helyei alapján peptidek vagy polipeptidek létrehozását, amelyek targetáló molekulákat tartalmaznak, amik szelektívek és/vagy specifikusak a második sejt ismeretlen ligandumjaira.
55. Az 54. igénypont szerinti módszer, azzal jellemezve, hogy az első sejt egy normál sejt, és ahol az első fázis egy nem aktivált fázis, és a második fázis egy aktivált, serkentett, módosult, változott, vagy megzavart állapot.
56. Az 54. igénypont szerinti módszer, azzal jellemezve, hogy a második sejt kóros sejt.
57. Az 56. igénypont szerinti módszer, azzal jellemezve, hogy a kóros sejt rákos sejt.



58. Az 56. igénypont szerinti módszer, azzal jellemezve, hogy a sejtet a következő csoportból választjuk ki: carcinoma, sarcoma, leukémia, adenoma, lymphoma, myeloma, blastoma, seminoma, és melanoma sejtek.
59. Az 58. igénypont szerinti módszer, azzal jellemezve, hogy a sejt leukémia sejt.
60. Az 59. igénypont szerinti módszer, azzal jellemezve, hogy a leukémia sejt akut myeloid leukémia sejt.
61. Az 1. igénypont vagy a 37. igénypont peptidjének vagy polipeptidjének alkalmazása a gyógyszeriparban, előnyösen asszociációban, vagy hozzácsatlakoztatva, kapcsolva, kombinálva kötve vagy fuzionálva egy gyógyszerhatóanyaghoz.
62. A 61. igénypont szerinti alkalmazás, azzal jellemezve, hogy a gyógyszernek kóros sejtek elleni aktivitása van.
63. A 62. igénypont szerinti alkalmazás, azzal jellemezve, hogy a kóros sejt rákos sejt.
64. A 62. igénypont szerinti alkalmazás, azzal jellemezve, hogy a sejtet a következő csoportból választjuk ki: carcinoma, sarcoma, leukémia, adenoma, lymphoma, myeloma, blastoma, seminoma, és melanoma sejtek.
65. A 64. igénypont szerinti alkalmazás, azzal jellemezve, hogy a rákos sejt leukémia sejt.
66. A 65. igénypont szerinti alkalmazás, azzal jellemezve, hogy a leukémia sejt akut myeloid leukémia sejt.
67. Az 1. igénypont vagy a 37. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid, előnyösen asszociációban, vagy hozzácsatlakoztatva, kapcsolva, kombinálva, kötve vagy fuzionálva egy gyógyszerhatóanyaghoz, gyógyszerként való alkalmazás céljából.
68. A 67. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid, azzal jellemezve, hogy a gyógyszernek kóros sejt elleni aktivitása van.
69. A 68. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid, azzal jellemezve, hogy a kóros sejt rákos sejt.



70. A 68. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid, azzal jellemezve, hogy a sejtet a következő csoportból választjuk ki: carcinoma, sarcoma, leukémia, adenoma, lymphoma, myeloma, blastoma, seminoma, és melanoma sejtek.
71. A 70. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid, azzal jellemezve, hogy a sejt leukémia sejt.
72. A 71. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid, azzal jellemezve, hogy a leukémia sejt akut myeloid leukémia sejt.
73. Az 1. igénypont vagy a 37. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid alkalmazása, olyan készítmény előállítására, amely felhasználható a kóros vagy rákos sejtek növekedésének gátlására.
74. A 73. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid alkalmazása, azzal jellemezve, hogy a sejt egy leukémia sejt.
75. A 74. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid alkalmazása, azzal jellemezve, hogy a leukémia sejt akut myeloid leukémia sejt.
76. Az 1. igénypont vagy a 37. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid alkalmazása, olyan készítmény előállítására, amely felhasználható a rákos sejtek növekedésének gátlására, és amely említett készítmény legalább egy olyan vegyületet tartalmaz, amelynek a rákos sejtre szelektív és/vagy specifikus gyógyászati liganduma van.
77. Készítmény, amely legalább egy, az 1. igénypont vagy a 37. igénypont szerinti peptidet vagy polipeptidet tartalmaz, asszociációban, vagy hozzácsatlakoztatva, kapcsolva, kombinálva, kötve vagy fuzionálva egy gyógyszerhatóanyaghoz, gyógyászatilag hatékony mennyiségben, adott esetben egy gyógyszerészeti hordozóval együtt.
78. A 77. igénypont szerinti készítmény, azzal jellemezve, hogy a peptid vagy polipeptid és a gyógyszerhatóanyag egy kötő vegyület (linker) segítségével van összekötve.



79. A 78. igénypont szerinti készítmény, azzal jellemezve, hogy a kötő vegyületet a következő csoportból választjuk ki: dikarboxilsav, maleimido-hidrazid, PDPH, karboxilsav-hidrazid és kis peptid.
80. A 79. igénypont szerinti készítmény, azzal jellemezve, hogy a peptidet a következő csoportból választjuk ki: AU1, AU5, BTag, c-myc, FLAG, Glu-Glu, HA, His6, HSV, HTTPHH, IRS, KT3, Protein C, S-TAG[®], T7, V5, VSV-G, és KAK-tag (tag).
81. Az 1., 31., 34. és 37. igénypontok bármelyike szerinti peptid vagy polipeptid, azzal jellemezve, hogy a tag-et a következő csoportból választjuk ki: AU1, AU5, BTag, c-myc, FLAG, Glu-Glu, HA, His6, HSV, HTTPHH, IRS, KT3, Protein C, S-TAG[®], T7, V5, VSV-G, és KAK-tag.
82. A 77. igénypont szerinti készítmény, azzal jellemezve, hogy a gyógyszerhatóanyagot a következő csoportból választjuk ki: radioaktív izotóp, toxin, oligonukleotid, rekombináns fehérje, antitest fragment, és rákellenes hatóanyag.
83. A 82. igénypont szerinti készítmény, azzal jellemezve, hogy a radioaktív izotópot a következő csoportból választjuk ki: ¹¹¹indium, ¹¹³indium, ^{99m}rénium, ¹⁰⁵rénium, ¹⁰¹rénium, ^{99m}technécium, ^{121m}tellúr, ^{122m}tellúr, ^{125m}tellúr, ¹⁶⁵túlium, ¹⁶⁷túlium, ¹⁶⁸túlium, ¹²³jód, ¹²⁶jód, ¹³¹jód, ¹³³jód, ^{81m}kripton, ³³xenon, ⁹⁰yttrium, ²¹³bizmut, ⁷⁷bróm, ¹⁸fluor, ⁹⁵ruténium, ⁹⁷ruténium, ¹⁰³ruténium, ¹⁰⁵ruténium, ¹⁰⁷higany, ²⁰³higany, ⁶⁷gallium és ⁶⁸gallium.
84. A 82. igénypont szerinti készítmény, azzal jellemezve, hogy a toxint a következő csoportból választjuk ki: gelonin, Pseudomonas exotoxin (PE), PE40, PE38, diphtheria toxin, ricin, és ezek származékai, illetve módosításai.
85. A 82. igénypont szerinti készítmény, azzal jellemezve, hogy a rákellenes hatóanyagot a következő csoportból választjuk ki: doxorubicin (adriamycin), morpholino-doxorubicin, methoxy-morpholinyl-doxorubicin, cis-platinum, taxol, calicheamicin, vincristine, cytarabine (Ara-C), cyclophosphazdde, prednisone, daunorubicin, morpholino-daunorubicin, methoxy-morpholinyl-daunorubicin,



idarubicin, fludarabine, chlorambucil, interferon alpha, hydroxy-karbamid, temozolomide, thalidomide, bleomycin, és ezek származékai.

86. Módszer a sejtek növekedésének gátlására, amely magában foglalja a sejt érintkezését az 1. vagy a 37. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid adott mennyiségével.
87. A 86 igénypont szerinti módszer, azzal jellemezve, hogy a sejtet a következő csoportból választjuk ki: carcinoma, sarcoma, leukémia, adenoma, lymphoma, myeloma, blastoma, seminoma, és melanoma.
88. A 87. igénypont szerinti módszer, azzal jellemezve, hogy a sejt leukémia sejt.
89. A 88. igénypont szerinti módszer, azzal jellemezve, hogy a leukémia sejt akut myeloid leukémia sejt.
90. Gyógyszerkompozíció, amely legalább egy, az 1. vagy a 37. igénypont szerinti peptidet vagy polipeptidet tartalmaz, amely hozzá van csatlakoztatva, kapcsolva, kombinálva, kötve vagy fuzionálva, egy tumor diagnosztikai lokalizációjára vagy képének megjelenítésére használatos képalkotó ágenshez.
91. Módszer egy betegségben vagy rákos megbetegedésben szenvedő páciens kezelésére, amely magában foglalja az 1. vagy a 37. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid adagolását a páciensnek egy adott mennyiségben, amely hatékony a betegség vagy a rákos megbetegedés kezelésére.
92. A 91. igénypont szerinti módszer, azzal jellemezve, hogy a rákos sejtet a következő csoportból választjuk ki: carcinoma, sarcoma, leukémia, adenoma, lymphoma, myeloma, blastoma, seminoma, és melanoma sejtek.
93. A 92. igénypont szerinti módszer, azzal jellemezve, hogy a kóros sejt leukémia sejt.
94. A 93. igénypont szerinti módszer, azzal jellemezve, hogy a leukémia sejt akut myeloid leukémia sejt.



95. Az 1. igénypont vagy a 37. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid, azzal jellemezve, hogy az Fv specifikusan vagy szelektíven köt az akut myeloid leukémia (AML)-sejtekhez.
96. Ligandum az AML-sejteken, amely a 95. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid által van kötve.
97. Peptid vagy polipeptid, amely köti a 96. igénypont szerinti ligandumot.
98. Diagnosztikai kit, a kezelés hatékonyságának in vitro analiziséhez, a kezelés előtt, alatt és után, és amely tartalmazza az 1. vagy 37. igénypont szerinti peptidet vagy polipeptidet, hozzácsatlakoztatva, kapcsolva, kombinálva, kötve vagy fuzionálva egy indikátor marker molekulához.
99. A 98. igénypont szerinti kit, azzal jellemezve, hogy az indikátor molekula fluoreszcens marker.
100. A 99. igénypont szerinti kit, azzal jellemezve, hogy a fluoreszcens markert a következő csoportból választjuk ki: fluorescein, rhodamine, phycoerythrin, és módosított változataik és származékaik.
101. A 98. igénypont szerinti kit, azzal jellemezve, hogy a kit betegség vagy rák diagnosztizálására használható.
102. Az 1. igénypont vagy a 37. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid, azzal jellemezve, hogy a konstrukció Ig polipeptid.
103. Módszer a 102. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid előállítására, azzal jellemezve, hogy az Ig polipeptid, mint rekombináns polipeptid van expresszáva, és egy eukarióta sejtrendszerben állítjuk elő.
104. A 103. igénypont szerinti módszer, azzal jellemezve, hogy az eukarióta rendszer egy emlős sejtrendszer.
105. A 102. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid, azzal jellemezve, hogy az Ig polipeptid IgG polipeptid.



106. A 105. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid, azzal jellemezve, hogy az IgG polipeptidnek van egy CDR3, CDR2 és CDR1 régiója, melyeknek szekvenciája: SEQ ID NOs:8, 115 és 114 szekvenciák, ebben a sorrendben.
107. A 106. igénypont szerinti IgG polipeptid, azzal jellemezve, hogy a CDR3, CDR2 és CDR1 régiók a nehéz láncban vannak.
108. A 106. igénypont szerinti IgG polipeptid, azzal jellemezve, hogy a CDR3, CDR2 és CDR1 régiók a könnyű láncban vannak.
109. A 102. igénypont szerinti IgG polipeptid, azzal jellemezve, hogy a nehéz lánc szekvenciája SEQ ID NO:26, és a könnyű lánc szekvenciája SEQ ID NO:27, vagy olyan láncok, melyek ezekkel legalább 90%-os aminosav hasonlóságot mutatnak.
110. Módszer az 1. igénypont vagy a 37. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid előállítására, azzal jellemezve, hogy a peptidet vagy polipeptidet egy prokarióta vagy egy eukarióta sejtrendszerben állítjuk elő.
111. A 110. igénypont szerinti módszer, azzal jellemezve, hogy a prokarióta sejt rendszer *E. coli* baktériumokat tartalmaz, ahol az említett *E. coli* baktériumoknak van egy expressziós vektoruk, és az eukarióta rendszer egy emlős sejt rendszer.
112. A 111. igénypont szerinti módszer, azzal jellemezve, hogy a prokarióta rendszer expressziós vektora tartalmaz egy promotert, amelyet a következő csoportból választunk ki: *osmB*, *deo*, β -*lac-U5*, λP_L , *SR α 5*, és *CMV*.
113. Peptid vagy polipeptid, amelynek van egy kötő motívuma, melynek aminosav szekvenciája R_1 -X Phe Pro- R_2 ahol R_1 és R_2 , mindegyik szekvencia 0-15 aminosavmaradékot tartalmaz, és ahol X vagy Arg, vagy Gly vagy Lys.
114. A 2., 34., vagy 46. igénypontok bármelyike szerinti peptid vagy polipeptid, azzal jellemezve, hogy a CDR3 aminosav szekvenciája R_1 -X Phe Pro- R_2 ahol R_1 és R_2 , mindkettő 0-15 aminosavmaradékot tartalmaz, és ahol X vagy Arg, vagy Gly vagy Lys.



115. Az 1. igénypont vagy a 37. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid, azzal jellemezve, hogy az említett peptidben vagy polipeptidben legalább egy nem természetes úton létrehozott módosítás van.
116. A 115. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid, azzal jellemezve, hogy az említett nem természetes módosítások a peptidet vagy polipeptidet még immunogénebbé, vagy stabilabbá teszik.
117. A 116. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid, azzal jellemezve, hogy az említett legalább egy módosítást a következő csoportból választjuk ki: peptoid módosítás, semipeptoid módosítás, ciklikus peptid módosítás, N-terminus módosítás, C-terminus módosítás, peptidkötés módosítás, peptid gerinc módosítás, és maradék módosítás.
118. Az 1., 31., 34., 37. vagy 67. igénypontok bármelyike szerinti peptid vagy polipeptid az autológ csontvelő *ex vivo* tisztítására az abnormális sejtek eltávolítására.
119. Módszer targetáló ágens előállítására, amely a következő lépéseket tartalmazza:
- a) egy elsődleges felismerőhelyet tartalmazó egy vagy több targetáló molekula izolálása és szelektálása egy direkt biopanning eljárással a célsejten, vagy egy indirekt biopanning eljárással egy első célsejten, a második, de nem az első fázisban, és egy ezt követő direkt biopanning eljárással, egy második célsejten, egy vagy több említett targetáló molekulák előállítása céljából;
 - b) az egy vagy több targetáló molekula amplifikációja, tisztítása és azonosítása; és
 - c) az egy vagy több targetáló molekulából targetáló ágens létrehozása, ahol a targetáló ágens lehet peptid, polipeptid, antitest, antitest fragment, vagy ezek multimerje.
120. A 119. igénypont szerinti módszer, azzal jellemezve, hogy a targetáló ágens hozzá van kapcsolva, csatlakoztatva, kombinálva, kötve, fuzionálva, vagy asszociálva egy gyógyszerhatóanyaghoz.
121. A 119. és 120. igénypont szerinti módszer, azzal jellemezve, hogy a targetáló ágens egy betegség ellenes, vagy rákellenes ágens.



122. A 120. igénypont szerinti módszer, azzal jellemezve, hogy a gyógyszerhatóanyag a következő csoportból választjuk ki: radiaktív izotóp, toxin, oligonukleotid, rekombináns fehérje, antitest fragment és rákellenes ágens.
123. A 122. igénypont szerinti módszer, azzal jellemezve, hogy a radioaktív izotópot a következő csoportból választjuk ki: $^{111}\text{indium}$, $^{113}\text{indium}$, $^{99\text{m}}\text{rénium}$, $^{105}\text{rénium}$, $^{101}\text{rénium}$, $^{99\text{m}}\text{technécium}$, $^{121\text{m}}\text{tellúr}$, $^{122\text{m}}\text{tellúr}$, $^{125\text{m}}\text{tellúr}$, $^{165}\text{túlium}$, $^{167}\text{túlium}$, $^{168}\text{túlium}$, $^{123}\text{jód}$, $^{126}\text{jód}$, $^{131}\text{jód}$, $^{133}\text{jód}$, $^{81\text{m}}\text{kripton}$, $^{33}\text{xenon}$, $^{90}\text{yttrium}$, $^{213}\text{bizmut}$, $^{77}\text{bróm}$, $^{18}\text{fluor}$, $^{95}\text{ruténium}$, $^{97}\text{ruténium}$, $^{103}\text{ruténium}$, $^{105}\text{ruténium}$, $^{107}\text{higany}$, $^{203}\text{higany}$, $^{67}\text{gallium}$ és $^{68}\text{gallium}$.
124. A 122. igénypont szerinti módszer, azzal jellemezve, hogy a toxint a következő csoportból választjuk ki: gelonin, *Pseudomonas exotoxin* (PE), PE40, PE38, Diphtheria toxin, ricin, és ezek származékai és módosításai.
125. A 122. igénypont szerinti módszer, azzal jellemezve, hogy a rákellenes ágens a következő csoportból választjuk ki: doxorubicin (adriamycin), morpholino-doxorubicin, methoxy-morpholinyl-doxorubicin, vincristine, cytarabine, (Ara-C), ciklofoszfamid, prednisone, daunorubicin, morpholino-daunorubicin, methoxy-morpholinyl-daunorubicin, idarubicin, fludarabine, chlorambucil, interferon alpha, hidroxi-karbamid, temozolomide, thalidomide, bleomycin, és ezek származékai.
126. Peptid vagy polipeptid, melynek a következő a szerkezete:
- $$\text{A} - \text{X} - \text{B}$$
- ahol X egy 3-30 aminosavból álló hipervariábilis CDR3 régió; A és B 1-1000 aminosavból álló láncok lehetnek, ahol A az amino-vég, és B a karboxi-vég.
127. A 126. igénypont szerinti peptid, azzal jellemezve, hogy A 150-250 aminosavmaradékból áll, és ahol B 350-500 aminosavmaradékból áll.
128. A 126. igénypont szerinti peptid, azzal jellemezve, hogy a CDR3 régió 5-13 aminosavmaradékból áll.



129. A 126. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid, azzal jellemezve, hogy X egy aminosav szekvencia, amit a következő csoportból választunk ki: SEQ ID NOs:8-24.
130. A 127. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid, amely egy nagyobb, vagy teljes antitest vagy egy multimer része.
131. Dimer molekula, amely két peptidből vagy polipeptidből áll, melyből az egyik a 126. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid.
132. Dimer molekula, amely két azonos, a 126. igénypont szerinti peptidből vagy polipeptidből áll.
133. A 131. vagy a 132. igénypont szerinti dimer molekula, azzal jellemezve, hogy X egy aminosav szekvencia, amit a következő csoportból választunk ki: SEQ ID NOs:8-24.
134. Nukleinsav molekula, amely a 126. igénypont szerinti peptidet vagy polipeptidet, vagy a 130. igénypont szerinti dimer molekulát kódolja.
135. A 104. igénypont szerinti módszer, azzal jellemezve, hogy az emlős sejtes rendszer az SR α 5 promotert tartalmazza.
136. A 104. igénypont szerinti módszer, azzal jellemezve, hogy az emlős sejtes rendszer CMV promotert tartalmaz.
137. Peptid vagy polipeptid, amelyet lényegében itt írtunk le.
138. Peptid vagy polipeptid, amely tartalmaz egy Fv molekulát, annak konstrukcióját, ezek bármelyikének egy fragmentjét, vagy egy fragment konstrukcióját, amelynek felerősített kötési tulajdonságai vannak, és így szelektíven és/vagy specifikusan köt egy célsejthez, a többi sejt ellenében, azzal jellemezve, hogy a kötési szelektivitást elsődlegesen egy első hipervariábilis régió határozza meg, ahol az első hipervariábilis régió egy CDR3 régió, melynek aminosav szekvenciáját a SEQ ID Nos 8-t vagy 20-t tartalmazó csoportból választjuk ki, és ahol az Fv molekula scFv, vagy dsFv, és előnyösen tartalmazhat egy vagy több tag-et is.



139. A 138. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid, azzal jellemezve, hogy a szelektivitást vagy specificitást másodlagosan befolyásolja egy második hipervariábilis régió, harmadik hipervariábilis régió, és/vagy egy vagy több, az első, második, harmadik hipervariábilis régiótól upstream vagy downstream elhelyezkedő határoló régió.
140. A 138. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid, azzal jellemezve, hogy a peptid vagy polipeptid egy scFv molekula, melynek aminosav szekvenciája a SEQ ID NO: 25, és amelyben az első hipervariábilis régió egy CDR3 régió, amelynek szekvenciája a SEQ ID NO: 8 szekvenciával azonos.
141. A 138. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid, azzal jellemezve, hogy a peptid vagy polipeptid egy scFv molekula, melynek aminosav szekvenciája a SEQ ID NO: 203, és amelyben az első hipervariábilis régió egy CDR3 régió, amelynek szekvenciája a SEQ ID NO: 20 szekvenciával azonos.
142. A 138. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid, azzal jellemezve, hogy az scFv molekulának van egy egyenes vagy elágazó láncú kötő molekulája, amely 20 vagy annál kevesebb aminosavmaradékból áll.
143. A 142. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid, azzal jellemezve, hogy a kötő molekula szekvenciája a SEQ ID NO: 123 vagy a SEQ ID NO: 124 szekvencia.
144. A 138. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid, azzal jellemezve, hogy a target sejt egy aktivált, serkentett, módosult, megváltozott, megzavart, abnormális, vagy kóros sejt.
145. A 144. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid, azzal jellemezve, hogy a kóros sejt rákos sejt.
146. A 138. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid, azzal jellemezve, hogy a sejtet a következő csoportból választjuk ki: carcinoma, sarcoma, leukémia, adenoma, lymphoma, myeloma, blastoma, seminoma, és melanoma sejtek.
147. A 146. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid, azzal jellemezve, hogy a sejt leukémia vagy myeloma sejt.



148. A 146. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid, azzal jellemezve, hogy a leukémia sejt vagy myeloma sejt malignus B-sejt.
149. A 147. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid, azzal jellemezve, hogy a leukémia sejt akut myeloid leukémia sejt, vagy malignus B-sejt.
150. A 138. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid, amely továbbá tartalmaz egy egymást követő aminosavakból álló kazettát, amelynek szekvenciáját a következő csoportból választjuk ki: SEQ ID NOs:30-113, vagy amelyek ezzel legalább 90%-os aminosav hasonlóságot mutatnak, vagy egy fragmentjét, azzal jellemezve, hogy a kazetta vagy fragment szolgáltat egy keretet, amelybe be van építve, inszertálva, kombinálva, csatlakoztatva, kapcsolva vagy fuzionálva egy CDR3 régió, amelynek az aminosav szekvenciáját a következő csoportból választjuk ki: SEQ ID NO:8 vagy 20.
151. A 150. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid, azzal jellemezve, hogy a kazetta aminosav szekvenciáját a következő csoportból választjuk ki: SEQ ID NOs:30-32,33, 37-39,41, 43, 45, 46, 48, 51, 54, 57, 59-68, 70, 71, 76-85, 87, 89-92, 94, 97, 99, 103, 106, 112, és 113, vagy ezekkel legalább 90%-os aminosav hasonlóságot mutat.
152. A 150. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid, azzal jellemezve, hogy a kazetta aminosav szekvenciája a SEQ ID NO: 61, vagy ezzel legalább 90%-os aminosav hasonlóságot mutat.
153. A 152. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid, azzal jellemezve, hogy a kazetta aminosav szekvenciája a SEQ ID NO: 61, vagy ezzel legalább 90%-os aminosav hasonlóságot mutat.
154. A 152. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid, azzal jellemezve, hogy a SEQ ID NO: 61 szekvencia hét karboxi végen elhelyezkedő aminosavmaradékokat helyettesítjük a SEQ ID NO: 122 szekvencia hét aminosavmaradékával.
155. A 139. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid, azzal jellemezve, hogy a második és harmadik hipervariábilis régiók CDR2 és CDR1 hipervariábilis régiók, ebben a sorrendben.



156. A 138. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid, azzal jellemezve, hogy a CDR3 régió szekvenciája a SEQ ID NO: 8 szekvencia.
157. A 138. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid, azzal jellemezve, hogy a CDR3 régió aminosav szekvenciája a SEQ ID NO: 20 szekvencia.
158. A 155. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid, azzal jellemezve, hogy a CDR2 és CDR1 régiók aminosav szekvenciái a SEQ ID NO: 115 és SEQ ID NO: 114, ebben a sorrendben.
159. A 140. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid, azzal jellemezve, hogy a második és harmadik hipervariábilis régiók CDR2 és CDR1 hipervariábilis régiók, ebben a sorrendben, és ahol a CDR3, CDR2 és CDR1 régiók aminosav szekvenciája a SEQ ID NOs: 8, 115 és 114 szekvenciák, ebben a sorrendben.
160. A 140. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid, azzal jellemezve, hogy a második és harmadik hipervariábilis régiók CDR2 és CDR1 hipervariábilis régiók, ebben a sorrendben, és ahol a CDR3, CDR2 és CDR1 régiók aminosav szekvenciája a SEQ ID NOs: 20, 115 és 114 szekvenciák, ebben a sorrendben.
161. A 139. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid, azzal jellemezve, hogy a CDR3 régiótól upstream elhelyezkedő határoló régió aminosav szekvenciája a SEQ ID NO: 117 szekvencia, és ahol a CDR3 régiótól downstream elhelyezkedő határoló régió aminosav szekvenciája a SEQ ID NO: 116 szekvencia.
162. A 139. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid, azzal jellemezve, hogy a második hipervariábilis régiója egy CDR2 régió, és ahol a CDR2 régiótól upstream elhelyezkedő határoló régió aminosav szekvenciája a SEQ ID NO: 119 szekvencia, és ahol a CDR3 régiótól downstream elhelyezkedő határoló régió aminosav szekvenciája a SEQ ID NO: 118 szekvencia.
163. A 139. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid, azzal jellemezve, hogy a harmadik hipervariábilis régiója egy CDR1 hipervariábilis régió, és ahol a CDR1 régiótól upstream elhelyezkedő határoló régió aminosav szekvenciája a SEQ ID NO: 121 szekvencia, és ahol a CDR3 régiótól downstream elhelyezkedő határoló régió aminosav szekvenciája a SEQ ID NO: 120 szekvencia.



164. A 155. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid, azzal jellemezve, hogy az egymást követő aminosavakból álló kazetta CDR2 és CDR1 régiói, amelyeket a következő csoportból választunk ki: SEQ ID NOs:30-113 vagy ezek egy fragmentje, helyettesítjük a SEQ ID NOs:115 és 114 szekvenciákkal, ebben a sorrendben.
165. A 155. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid, azzal jellemezve, hogy az egymást követő aminosavakból álló kazetta CDR2 és CDR1 régióit, amelyeket a következő csoportból választunk ki: SEQ ID NOs:30-32, 35, 37-39, 41, 43, 45, 46, 48, 51, 54, 57, 59-68, 70, 71, 76-85, 87, 89-92, 94, 97, 99, 103, 106, 112, és 113 vagy ezek egy fragmentje, helyettesítünk a SEQ ID NOs:115 és 114 szekvenciákkal, ebben a sorrendben.
166. A 139. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid, azzal jellemezve, hogy
- (a) a második és harmadik hipervariábilis régiók CDR2 és CDR1 hipervariábilis régiók, ebben a sorrendben,
 - (b) a CDR3 aminosav szekvenciája a SEQ ID NO: 8,
 - (c) a CDR2 aminosav szekvenciája a SEQ ID NO: 115,
 - (d) a CDR1 aminosav szekvenciája a SEQ ID NO: 114,
 - (e) a CDR3 régiótól upstream elhelyezkedő határoló régió aminosav szekvenciája a SEQ ID NO: 117,
 - (f) a CDR3 régiótól downstream elhelyezkedő határoló régió aminosav szekvenciája a SEQ ID NO: 116,
 - (g) a CDR2 régiótól upstream elhelyezkedő határoló régió aminosav szekvenciája a SEQ ID NO: 119,
 - (h) a CDR2 régiótól downstream elhelyezkedő határoló régió aminosav szekvenciája a SEQ ID NO: 118,
 - (i) a CDR1 régiótól upstream elhelyezkedő határoló régió aminosav szekvenciája a SEQ ID NO: 121, és



- (j) a CDR1 régiótól downstream elhelyezkedő határoló régió aminosav szekvenciája a SEQ ID NO: 120.
167. A 139. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid, azzal jellemezve, hogy
- (a) a második és harmadik hipervariábilis régiók CDR2 és CDR1 hipervariábilis régiók, ebben a sorrendben,
 - (b) a CDR3 aminosav szekvenciája a SEQ ID NO: 20,
 - (c) a CDR2 aminosav szekvenciája a SEQ ID NO: 115,
 - (d) a CDR1 aminosav szekvenciája a SEQ ID NO: 114,
 - (e) a CDR3 régiótól upstream elhelyezkedő határoló régió aminosav szekvenciája a SEQ ID NO: 117,
 - (f) a CDR3 régiótól downstream elhelyezkedő határoló régió aminosav szekvenciája a SEQ ID NO: 116,
 - (g) a CDR2 régiótól upstream elhelyezkedő határoló régió aminosav szekvenciája a SEQ ID NO: 119,
 - (h) a CDR2 régiótól downstream elhelyezkedő határoló régió aminosav szekvenciája a SEQ ID NO: 118,
 - (i) a CDR1 régiótól upstream elhelyezkedő határoló régió aminosav szekvenciája a SEQ ID NO: 121, és
 - (j) a CDR1 régiótól downstream elhelyezkedő határoló régió aminosav szekvenciája a SEQ ID NO: 120.
168. A 138. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid, azzal jellemezve, hogy az Fv molekula egy scFv, amely egy phage display library-ból nyerhető.
169. A 165. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid, azzal jellemezve, hogy a phage display library nem immunizált humán perifériás vér limfocitáiból készült, és ahol



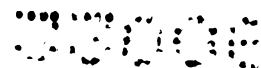
az scFv peptidet egy korábban nem karakterizált és nem tisztított, a target sejt felszínén levő antigénre választunk ki.

170. Módszer a 165. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid szelektálására vagy azonosítására, amely tartalmaz egy biopanning lépést, azzal jellemezve, hogy a biopanning magában foglalja a fág kötését a targethez, a nem kötött fágok eltávolítását, a kötött fágok eluálását, és az eluált fág fenntartását és amplifikálását.
171. Peptid vagy polipeptid, amely tartalmaz egy Fv molekulát, annak egy konstrukcióját, ezek bármelyikének egy fragmentjét, vagy egy fragment konstrukcióját, amelynek felerősített kötési tulajdonságai vannak, és így szelektíven és/vagy specifikusan köt egy lényegében hozzáférhető, és/vagy túlexpresszált kötőhelyhez, a célsejten vagy sejten, ahol a kötés a célsejthez a többi sejt ellenében történik, amely sejten vagy sejten a kötőhely lényegében nem elérhető és/vagy nem expresszált, azzal jellemezve, hogy a kötési szelektivitást és specifitást elsődlegesen egy első hipervariábilis régió határozza meg, ahol az első hipervariábilis régió egy CDR3 régió, melynek aminosav szekvenciája a SEQ ID Nos 8 vagy 20, és ahol az Fv molekula lehet scFv, vagy dsFv, és Fv adott esetben tartalmazhat egy vagy több tag-et is.
172. A 171. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid, azzal jellemezve, hogy a kötési szelektivitást vagy specifitást másodlagosan befolyásolja egy második hipervariábilis régió, egy harmadik hipervariábilis régió, és/vagy egy vagy több, az első, második, harmadik hipervariábilis régióktól upstream vagy downstream elhelyezkedő határoló régió, és amelyben a második és harmadik hipervariábilis régiók CDR2 és CDR1 régiók, ebben a sorrendben.
173. Peptid vagy polipeptid, amely tartalmaz egy Fv molekulát, annak egy konstrukcióját, ezek bármelyikének egy fragmentjét, vagy egy fragment konstrukcióját, amelynek felerősített kötési tulajdonságai vannak, és így szelektíven és/vagy specifikusan köt egy célsejthez, a többi sejt ellenében, azzal jellemezve, hogy az Fv molekula tartalmaz egy első láncot, amelynek van egy első, második és harmadik hipervariábilis régiója, és egy második láncot, melynek van egy első, második és harmadik hipervariábilis régiója, és amelyben az első lánc egyik hipervariábilis régiójának az aminosav szekvenciája a SEQ ID NOs:8 vagy 20

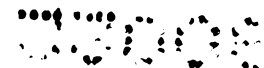


szekvenciák, és ahol a második lánc egyik hipervariábilis régiójának aminosav szekvenciáját a következő csoportból választjuk ki: SEQ ID NOs:1-6 és 125-202, és amelyben az első, második és harmadik hipervariábilis régiók CDR3, CDR2 és CDR1 régiók, ebben a sorrendben, és ahol az Fv molekula lehet scFv, vagy dsFv, és Fv adott esetben tartalmazhat egy vagy több tag-et is.

174. A 173. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid, azzal jellemezve, hogy
- (a) az első lánc első hipervariábilis régiója és a második lánc első hipervariábilis régiója azonos és a következő csoportból választjuk ki: SEQ ID NOs:8 vagy 20; vagy
 - (b) az első lánc első hipervariábilis régióját a következő csoportból választjuk ki: SEQ ID NOs:8 vagy 20, és a második lánc első hipervariábilis régióját a következő csoportból választjuk ki: SEQ ID NOs:1-6 és 125-202; vagy
 - (d) az első lánc első hipervariábilis régióját a következő csoportból választjuk ki: SEQ ID NOs:1-6 és 125-202, és a második lánc első hipervariábilis régióját a következő csoportból választjuk ki: SEQ ID NOs:8 vagy 20.
175. A 173. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid, azzal jellemezve, hogy az első lánc második és harmadik hipervariábilis régióinak szekvenciái a SEQ ID NOs:114 és 115 szekvenciák, ebben a sorrendben.
176. Fv molekulát tartalmazó peptid vagy polipeptid, annak konstrukciója, ezek bármelyikének egy fragmentje, vagy egy fragment konstrukciója, ami
- (a) egy első sejten levő ismeretlen ligandumhoz kötődik, amely sejt az első és második fázisban van, és ahol a kötődés hatékony a második fázisban, de lényegében nem hatékony az első fázisban, és,
 - (b) az immun-kereszt-kötő reaktivitás miatt, specifikusan vagy szelektíven kötődik egy a második sejten levő ligandumhoz, és amelyben az Fv molekula egy scFv vagy dsFv, és ahol Fv adott esetben tartalmazhat egy vagy több tag-et is, és amelyben az első hipervariábilis régió egy CDR3 régió, amelynek aminosav szekvenciáját a SEQ ID NOs 8 vagy 20-t tartalmazó csoportból választjuk ki.



177. A 176. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid, azzal jellemezve, hogy az első sejt normál sejt.
178. A 176. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid, azzal jellemezve, hogy az első fázis nem aktivált fázis, a második fázis aktivált, serkentett, módosított, megváltozott, vagy megzavart állapot.
179. A 176. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid, azzal jellemezve, hogy a második sejt kóros sejt.
180. A 176. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid, azzal jellemezve, hogy a kóros sejt rákos sejt.
181. A 179. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid, azzal jellemezve, hogy a kóros sejtet a következő csoportból választjuk ki: carcinoma, sarcoma, leukémia, adenoma, lymphoma, myeloma, blastoma, seminoma, és melanoma sejtek.
182. A 181. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid, azzal jellemezve, hogy a kóros sejt leukémia sejt.
183. A 182. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid, azzal jellemezve, hogy a leukémia sejt akut myeloid leukémia sejt.
184. A 176. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid, azzal jellemezve, hogy a peptid vagy polipeptid a második sejt ligandumjához való szelektív és/vagy specifikus kötődését elsősorban egy első hipervariábilis régió határozza meg.
185. A 176. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid, azzal jellemezve, hogy a kötési szelektivitást vagy specificitást másodlagosan befolyásolja egy második hipervariábilis régió, egy harmadik hipervariábilis régió, és/vagy egy vagy több, az első, második és harmadik hipervariábilis régióktól upstream vagy downstream elhelyezkedő határoló régiók, ebben a sorrendben.
186. Ligandum, amelyet a második sejt expresszál, és amelyet kötni képes a 176. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid.
187. Molekula, amely felismeri és megköti a 186. igénypont szerinti ligandumot.



188. Nukleinsav molekula, amely kódolja a 138., 171., 173. vagy 176. igénypontok bármelyike szerinti peptidet vagy polipeptidet.
189. A 188. igénypont nukleinsav, azzal jellemezve, hogy a nukleinsav DNS.
190. A 176. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid, azzal jellemezve, hogy az első sejt első és második fázisa ugyanaz, és ahol az első sejt egy sejtvonalból származik.
191. A 190. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid, azzal jellemezve, hogy a sejtvonalat a következő csoportból választjuk ki: Jurkat, MOLT-4, HS-602, U937, TF-1, THP-1, KG-1, és HUT-78.
192. A 138. vagy a 176. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid alkalmazása a gyógyszergyártásban, előnyösen asszociációban, hozzácsatlakoztatva, kapcsolva, kötve, kombinálva, vagy fuzionálva egy gyógyszerhatóanyaghoz.
193. A 192. igénypont szerinti alkalmazás, azzal jellemezve, hogy a gyógyszernek a kóros sejtek elleni aktivitása van.
194. A 193. igénypont szerinti alkalmazás, azzal jellemezve, hogy a kóros sejt rákos sejt.
195. A 193. igénypont szerinti alkalmazás, azzal jellemezve, hogy, a sejtet a következő csoportból választjuk ki: carcinoma, sarcoma, leukémia, adenoma, lymphoma, myeloma, blastoma, seminoma, és melanoma sejtek.
196. A 195. igénypont szerinti alkalmazás, azzal jellemezve, hogy a sejt leukémia sejt.
197. A 196. igénypont szerinti alkalmazás, azzal jellemezve, hogy a leukémia sejt akut myeloid leukémia sejt.
198. A 138. vagy a 176. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid gyógyszerként való alkalmazása, előnyösen asszociációban, vagy hozzácsatlakoztatva, kapcsolva, kombinálva, kötve vagy fuzionálva egy gyógyszerhatóanyaghoz.
199. A 198. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid, azzal jellemezve, hogy a gyógyszernek kóros sejtek elleni aktivitása van.

200. A 199. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid , azzal jellemezve, hogy a kóros sejt rákos sejt.
201. A 199. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid , azzal jellemezve, hogy a sejtet a következő csoportból választjuk ki: carcinoma, sarcoma, leukémia, adenoma, lymphoma, myeloma, blastoma, seminoma, és melanoma sejtek.
202. A 201. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid , azzal jellemezve, hogy a sejt leukémia sejt.
203. A 202. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid , azzal jellemezve, hogy a leukémia sejt akut myeloid leukémia sejt.
204. A 138. vagy 176. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid alkalmazása kóros sejtek növekedésének gátlására felhasználható készítmény előállítására.
205. A 204. igénypont szerinti peptidjének vagy polipeptidjének használata, azzal jellemezve, hogy a sejt leukémia sejt.
206. A 205. igénypont peptidj vagy polipeptid alkalmazása, azzal jellemezve, hogy a leukémia sejt akut myeloid leukémia sejt.
207. A 138. vagy 176. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid alkalmazása, rákos sejtek növekedésének gátlására felhasználható készítmény előállítására, és amely említett készítmény legalább egy vegyületet tartalmaz, amelynek egy gyógyászati ligandumja szelektív és/vagy specifikus rákos sejtekre.
208. Készítmény, amely legalább egy, a 138. vagy 176. igénypontok szerinti peptidet tartalmaz, asszociációban, vagy hozzácsatlakoztatva, kapcsolva, kötve, kombinálva vagy fuzionálva egy gyógyszerhatóanyaghoz, gyógyászatilag hatékony mennyiségben, és előnyösen egy gyógyszerészetileg hatékony hordozót.
209. A 208. igénypont szerinti készítmény, azzal jellemezve, hogy a peptid vagy polipeptid és a gyógyszerhatóanyag egy kötő molekulán keresztül kapcsolódnak.

210. A 209. igénypont szerinti készítmény, azzal jellemezve, hogy a kötő molekulát a következő csoportból választjuk ki: dikarbonsav, maleimido-hidrazid, PDPH, karboxilsav-hidrazid, és egy kis peptid.
211. A 209. igénypont szerinti készítmény, azzal jellemezve, hogy a kis peptidet a következő csoportból választjuk ki: AU1, AU5, BTag, c-myc, FLAG, Glu-Glu, HA, His6, HSV, HTTPHH, IRS, KT3, Protein C, S-TAG[®], T7, V5, és VSV-G.
212. A 137., 170., 172. és 175. igénypontok bármelyike szerinti peptid vagy polipeptid, azzal jellemezve, hogy a tag-et a következő csoportból választjuk ki: AU1, AU5, BTag, c-myc, FLAG, Glu-Glu, HA, His6, HSV, HTTPHH, IRS, KT3, Protein C, S-TAG[®], T7, V5, és VSV-G.
213. A 208. igénypont szerinti készítmény, azzal jellemezve, hogy a gyógyszerhatóanyagot a következő csoportból választjuk ki: radioaktív izotóp, toxin, oligonukleotid, rekombináns fehérje, antitest fragment, és rákellenes ágens.
214. A 213. igénypont szerinti készítmény, azzal jellemezve, hogy a radioaktív izotópot a következő csoportból választjuk ki: ¹¹¹indium, ¹¹³indium, ^{99m}rénium, ¹⁰⁵rénium, ¹⁰¹rénium, ^{99m}technécium, ^{121m}tellúr, ^{122m}tellúr, ^{125m}tellúr, ¹⁶⁵túlium, ¹⁶⁷túlium, ¹⁶⁸túlium, ¹²³jód, ¹²⁶jód, ¹³¹jód, ¹³³jód, ^{81m}kripton, ³³xenon, ⁹⁰yttrium, ²¹³bizmut, ⁷⁷bróm, ¹⁸fluor, ⁹⁵ruténium, ⁹⁷ruténium, ¹⁰³ruténium, ¹⁰⁵ruténium, ¹⁰⁷higany, ²⁰³higany, ⁶⁷gallium és ⁶⁸gallium.
215. A 213. igénypont szerinti készítmény, azzal jellemezve, hogy a toxint a következő csoportból választjuk ki: gelonin, Pseudomonas exotoxin (PE), PE40, PE38, ricin, és ezek módosításai és származékai.
216. A 212. igénypont szerinti készítmény, azzal jellemezve, hogy a rákellenes ágenszt a következő csoportból választjuk ki: doxorubicin (adriamycin), morpholino-doxorubicin, methoxy-morpholinyl-doxorubicin, cis-platinum, taxol, calicheamicin, vincristine, cytarabine (Ara-C), cyclophosphazdde, prednisone, daunorubicin, morpholino-daunorubicin, methoxy-morpholinyl-daunorubicin, idarubicin, fludarabine, chlorambucil, interferon alpha, hidroxikarbamid, temozolomide, thalidomide, bleomycin, és ezek származékai.



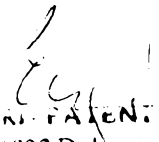
217. Módszer a sejtnövekedés gátlására, amely magában foglalja a sejttel való érintkezést a 138. vagy 176. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid egy adott mennyiségével.
218. A 217. igénypont szerinti módszer, azzal jellemezve, hogy a sejtet a következő csoportból választjuk ki: carcinoma, sarcoma, leukemia, adenoma, lymphoma, myeloma, blastoma, seminoma, és melanoma.
219. A 218. igénypont szerinti módszer, azzal jellemezve, hogy a sejt leukémia sejt.
220. A 219. igénypont szerinti módszer, azzal jellemezve, hogy a leukémia sejt akut myeloid leukémia sejt.
221. Gyógyszerkompozíció, amely legalább egy, a 138. vagy 176. igénypont szerinti peptidet vagy polipeptidet tartalmaz, hozzácsatlakoztatva, kapcsolva, kötve, kombinálva vagy fuzionálva egy diagnosztikai lokalizációban, vagy tumor vizualizációban használatos képalkotó ágenshez.
222. Kezelési módszer beteg páciens kezelésére, amely magában foglalja a 138. vagy a 176. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid egy adott mennyiségének adagolását a betegnek, amely hatásos a betegség kezelésére.
223. A 222. igénypont szerinti módszer, azzal jellemezve, hogy a betegséget a következő csoportból választjuk ki: carcinoma, sarcoma, leukémia, adenoma, lymphoma, myeloma, blastoma, seminoma, és melanoma.
224. A 223. igénypont szerinti módszer, azzal jellemezve, hogy a betegség leukémia.
225. A 224. igénypont szerinti módszer, azzal jellemezve, hogy a leukémia akut myeloid leukémia.
226. A 138. vagy a 176. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid , azzal jellemezve, hogy az Fv molekula specifikusan vagy szelektíven köt akut myeloid leukémia (AML) sejtekhez.
227. Ligandum, az AML-sejteken prezentálva, amelyet a 226. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid köt.
228. Peptid, vagy polipeptid, mely kötődik a 227. igénypont szerinti ligandumhoz.

229. Diagnosztikai kit, a kezelés hatékonyságának in vitro analizéséhez, a kezelés előtt, során és után, amely tartalmazza a 138. vagy 176. igénypont szerinti peptidet vagy polipeptidet, hozzácsatlakoztatva, kapcsolva, kombinálva, kötve, vagy fuzionálva egy indikátor marker molekulához.
230. A 229. igénypont szerinti kit, azzal jellemezve, hogy az indikátor marker molekula fluoreszcens molekula.
231. A 230. igénypont szerinti kit, azzal jellemezve, hogy a fluoreszcens markert a következő csoportból választjuk ki: fluorescein, rhodamine, phycoerythrin, és ezek módosításai és származékai.
232. A 229. igénypont szerinti kit, azzal jellemezve, hogy a kitet rákos megbetegedések diagnosztizálására használják.
233. A 139. vagy 176. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid , azzal jellemezve, hogy a konstrukció Ig polipeptid.
234. Módszer a 233. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid előállítására, azzal jellemezve, hogy az Ig polipeptid hozzáférhetővé van téve, mint rekombináns fehérje és egy eukarióta sejtes rendszerben állítjuk elő.
235. A 234. igénypont szerinti módszer, azzal jellemezve, hogy az eukarióts sejtes rendszer emlős sejtes rendszer.
236. A 233. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid , azzal jellemezve, hogy az Ig polipeptid IgG polipeptid.
237. A 236. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid , azzal jellemezve, hogy az IgG polipeptid CDR3, CDR2 és CDR1 régiókat tartalmaz, melyeknek szekvenciái a SEQ ID NOs:8, 115 és 114, ebben a sorrendben.
238. A 236. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid , azzal jellemezve, hogy az IgG polipeptid CDR3, CDR2 és CDR1 régiókat tartalmaz, melyeknek szekvenciái a SEQ ID NOs:20, 115 és 114, ebben a sorrendben.

239. A 237. igénypont szerinti IgG polipeptid , azzal jellemezve, hogy CDR3, a CDR2 és a CDR1 régiók nehéz láncúak.
240. A 238. igénypont szerinti IgG polipeptid , azzal jellemezve, hogy CDR3, a CDR2 és a CDR1 régiók nehéz láncúak.
241. A 237. igénypont szerinti IgG polipeptid , azzal jellemezve, hogy CDR3, a CDR2 és a CDR1 régiók könnyű láncúak.
242. A 238. igénypont szerinti IgG polipeptid , azzal jellemezve, hogy CDR3, a CDR2 és a CDR1 régiók könnyű láncúak.
243. A 233. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid , azzal jellemezve, hogy az IgG molekula tartalmaz egy nehéz láncot, amelynek szekvenciája a SEQ ID NO:26 és egy könnyű láncot, amelynek szekvenciája a SEQ ID NO:27, vagy ezekkel 90%-os aminosav hasonlóságot mutatnak.
244. Módszer a 139. vagy 176. igénypontok szerinti peptid vagy polipeptid előállítására, azzal jellemezve, hogy a peptidet vagy polipeptidet egy prokarióta vagy egy eukarióta sejtes rendszerben állítjuk elő.
245. A 244. igénypont szerinti módszer, azzal jellemezve, hogy a prokarióta rendszer *E. coli* baktériumokat tartalmaz, amely említett *E. coli* baktériumok tartalmazznak egy expressziós vektort, és az eukarióta rendszer emlős sejtes rendszer.
246. A 245. igénypont szerinti módszer, azzal jellemezve, hogy a prokarióta rendszer expressziós vektora tartalmaz egy promotert, amit a következő csoportból választunk ki: *osmB*, *deo*, β -lac-U5, λP_1 és CMV.
247. A 138. vagy 176. igénypontok szerinti peptid vagy polipeptid, azzal jellemezve, hogy CDR3 régió aminosav szekvenciája R_1 -X Phe Pro- R_2 , ahol R_1 és R_2 mindkettő 0- 15 aminosavmaradékot tartalmaznak, és ahol X lehet Arg, vagy Gly vagy Lys.
248. A 138. vagy 176. igénypontok szerinti peptid vagy polipeptid, azzal jellemezve, hogy az említett peptid vagy polipeptid tartalmaz legalább egy nem természetesen előforduló módosítást.

249. A 248. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid , azzal jellemezve, hogy a nem természetesen előforduló módosítás a peptidet vagy polipeptidet immunogénebbé vagy stabilabbá teszik.
250. A 249. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid , azzal jellemezve, hogy az elmített legalább egy nem természetesen előforduló módosítást a következő csoportból választjuk ki: peptoid módosítás, semipeptoid módosítás, ciklikus peptid módosítás, N-terminus, C-terminus módosítás, peptidkötés módosítás, peptidlánc módosítás és aminosav módosítás.
251. A 138., 171., 173., 176. vagy 198. igénypontok bármelyike szerinti peptid vagy polipeptid alkalmazása az autológ csontvelő *ex vivo* panningára, az abnormalis sejtek eltávolítására.
252. Peptid vagy polipeptid, melynek a következő a szerkezete:
- A – X - B
- ahol X egy hipervariábilis CDR3 régió, melynek szekvenciája a SEQ ID NO. 8 vagy 20; és A és B aminosav láncok lehetnek, 1-1000 aminosav hosszúságban és ahol A az amino-vég, és B a karboxi-vég.
253. A 252. igénypont szerinti peptid, azzal jellemezve, hogy A 150-250 aminosavmaradék hosszú, és ahol B 350-500 aminosavmaradék hosszú.
254. A 253. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid , amely egy nagyobb, vagy teljes antitest vagy egy multimer része.
255. Két peptidet vagy polipeptidet tartalmazó dimer molekula, amelyek közül egyik a 252. igénypont szerinti peptid vagy polipeptid .
256. A 252. igénypont szerinti, két peptidet vagy polipeptidet tartalmazó dimer molekula, azzal jellemezve, hogy a két alkotórész azonos.
257. Nukleinsav molekula, amely a 252. igénypont szerinti peptidet vagy polipeptidet, vagy a 254. igénypont szerinti dimer molekulát kódolja.

- 258. A 235. igénypont szerinti módszer, azzal jellemezve, hogy az emlős sejtes rendszer SR α 5 promotert tartalmaz.
- 259. A 235. igénypont szerinti módszer, azzal jellemezve, hogy az emlős sejtes rendszer CMV promotert tartalmaz.


 DR. MÁR FAJENI ISTVÁN
 4032 Debrecen,
 Kartács u. 35.

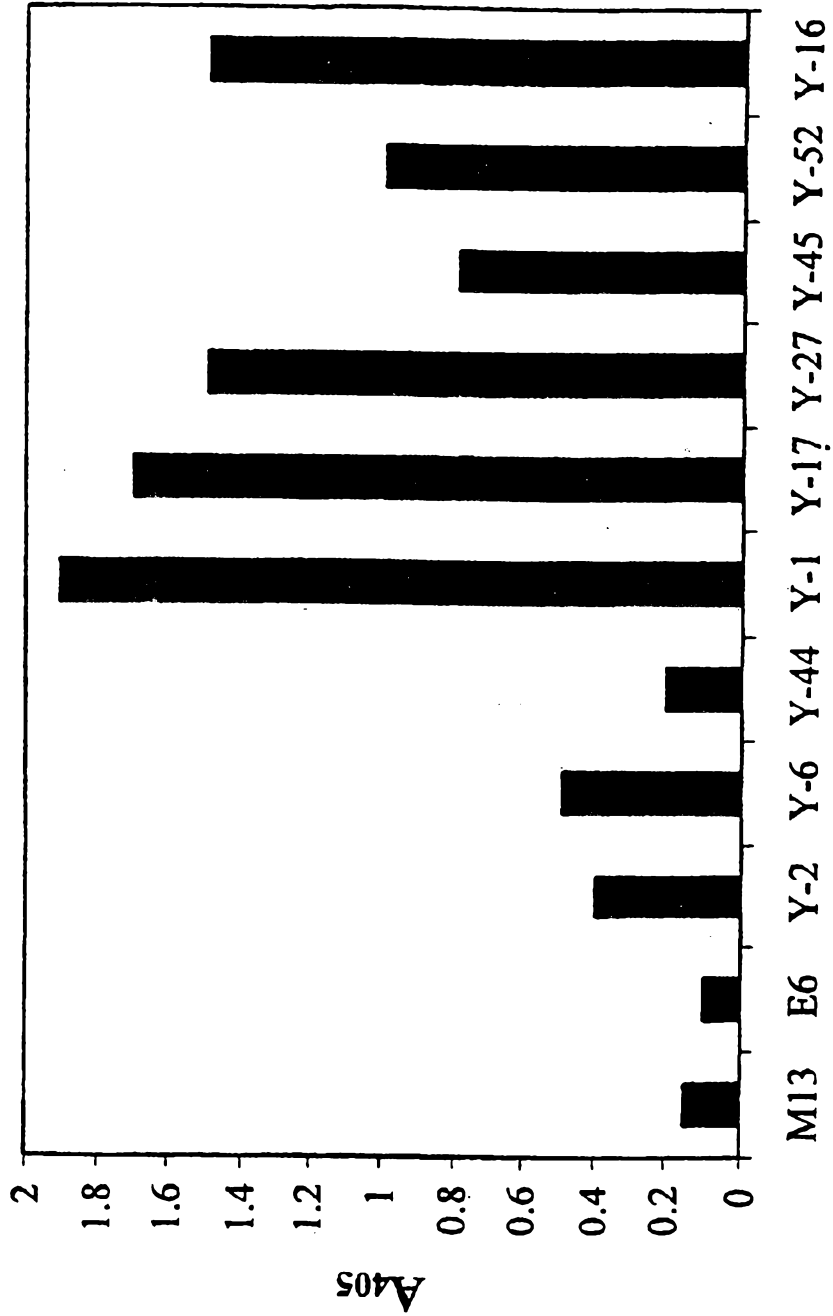
129 oldal kézikönyv
 19 oldal rajz
 76 oldal referencia

 219 oldal
 Zoltán J.



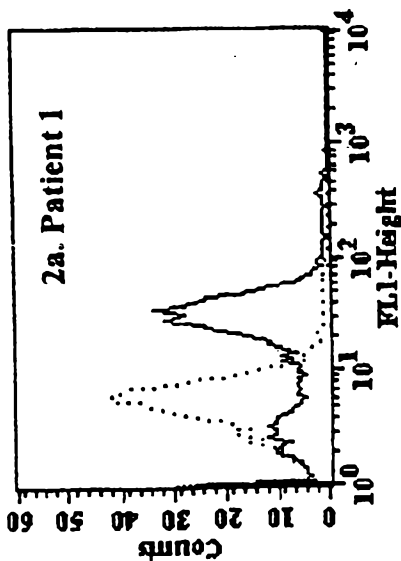
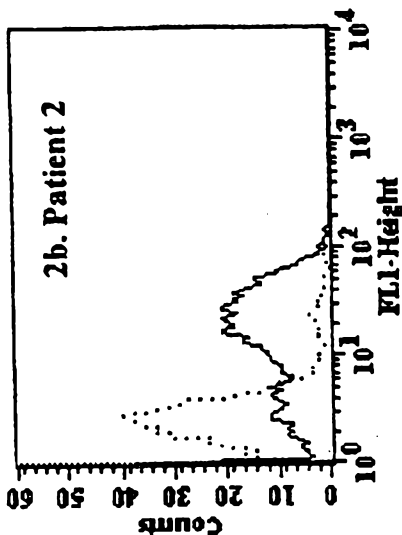
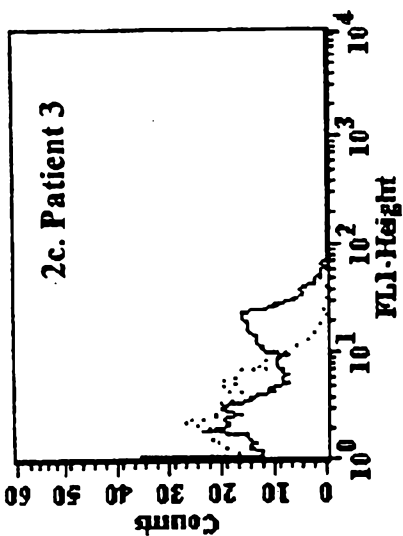
AR

P0400775



klón #

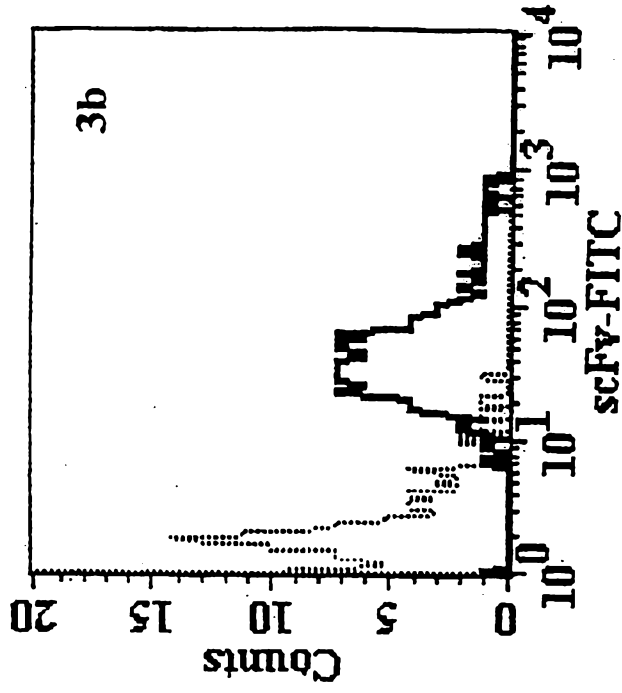
1. ábra



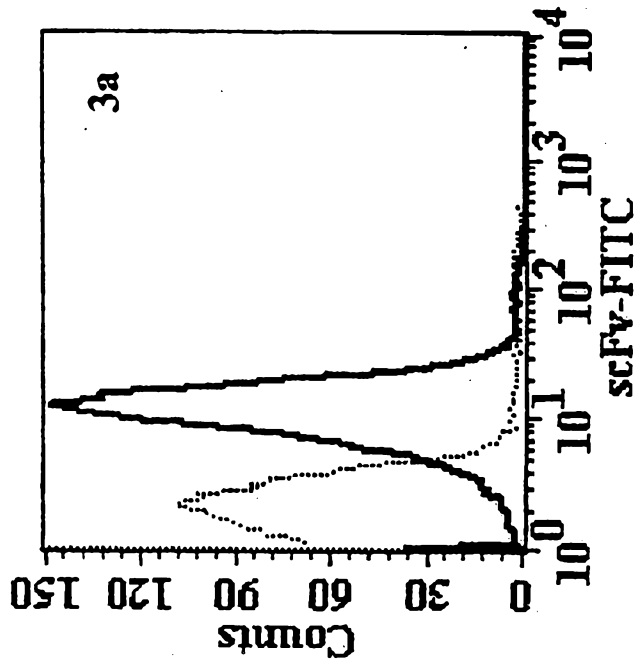
..... kontroll scFv — Y-1 scFv

2. ábra

monociták



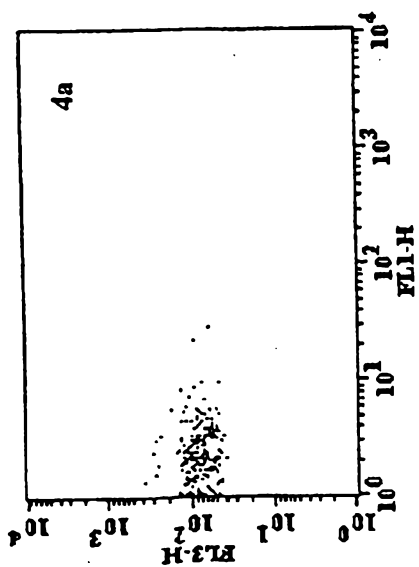
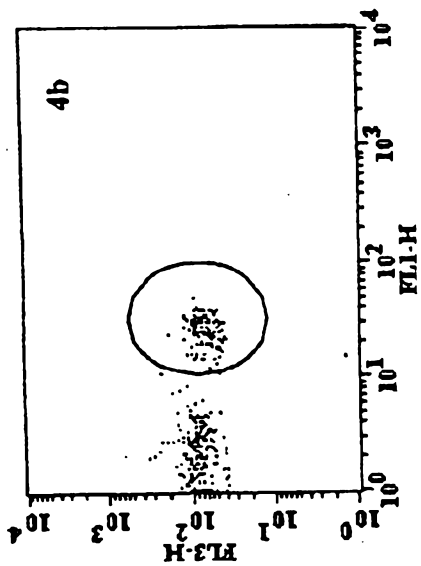
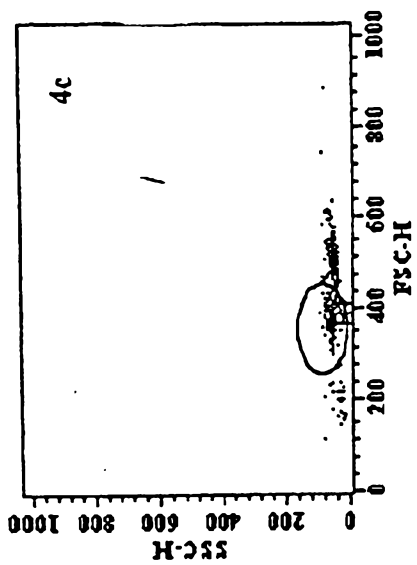
vérlemezekék



Y-1 scFv

kontroll scFv

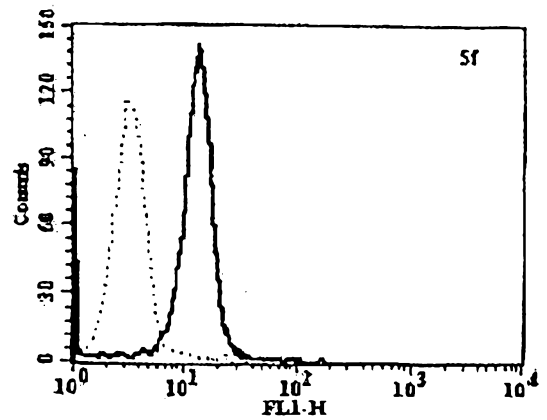
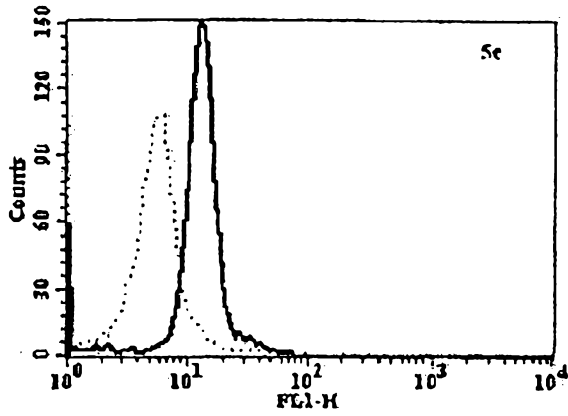
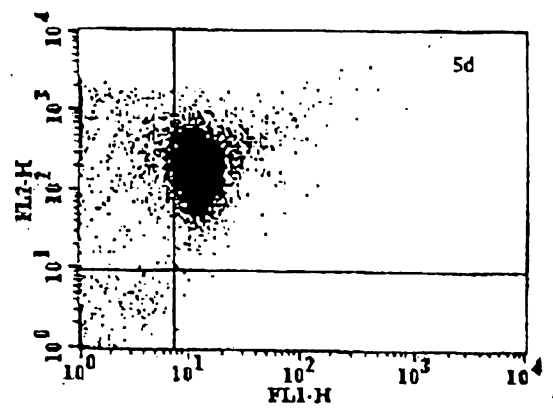
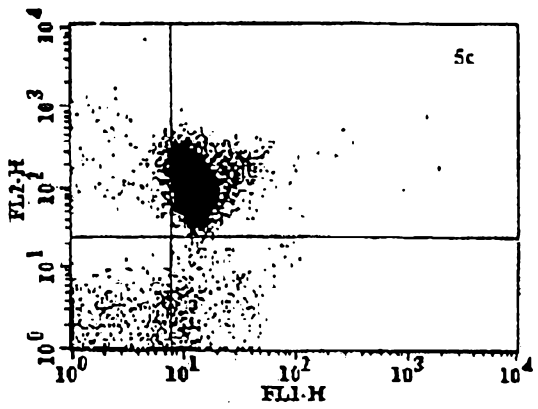
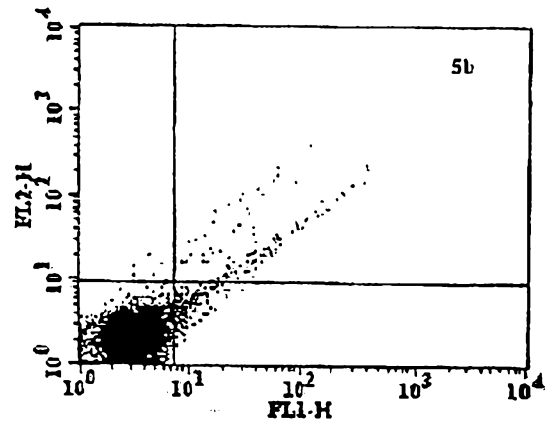
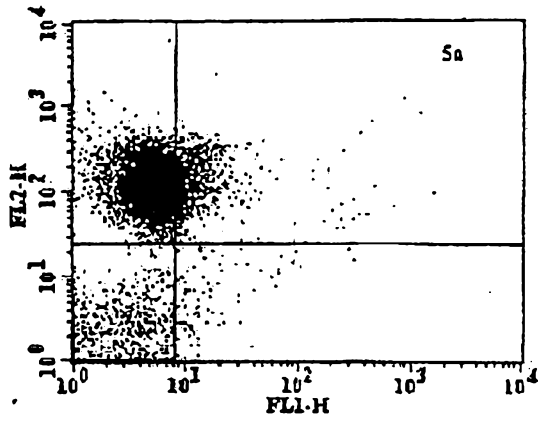
3. ábra



4. ábra

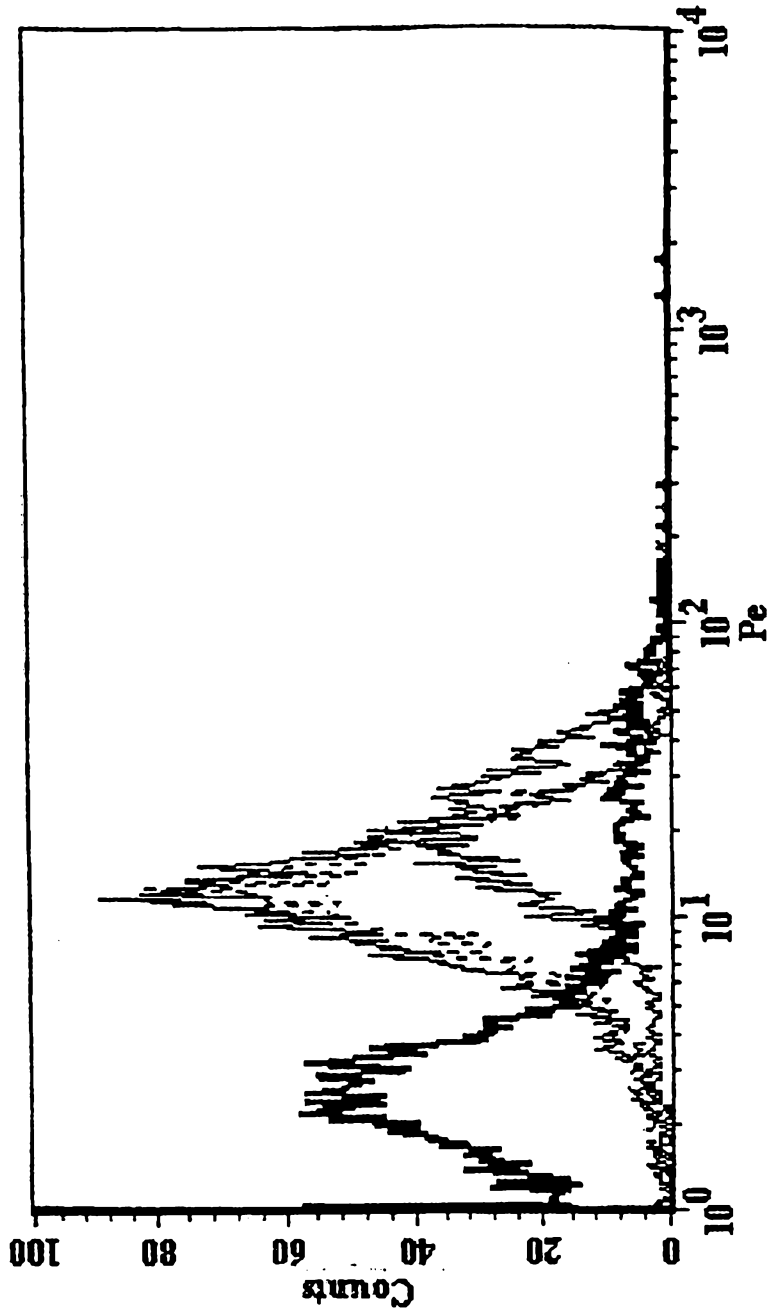
gyerek

felnőtt



—— Y-1 scFv —— kontroll scFv

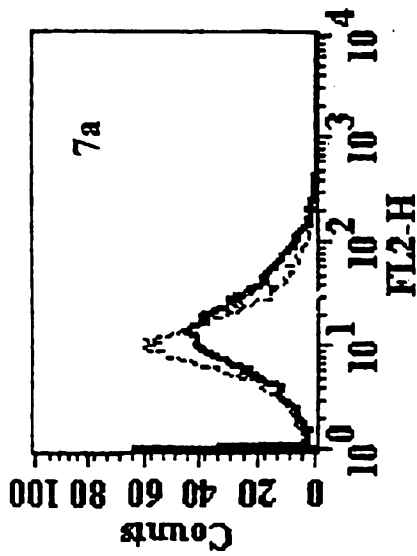
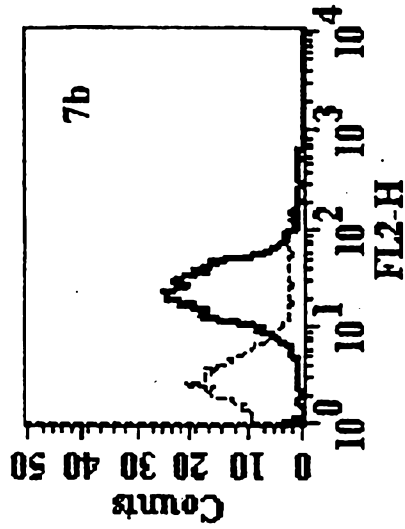
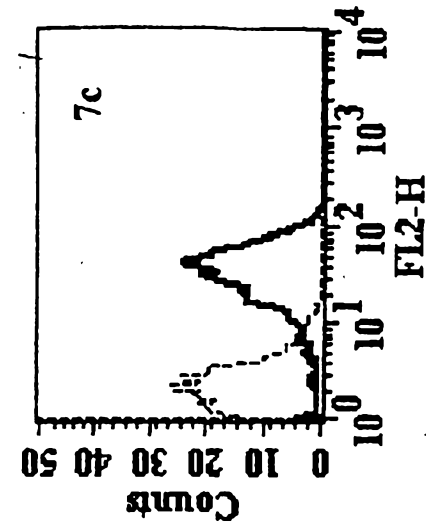
5. ábra



jelmagyarázat

- Negative
- - Triabody-Y1
- · Diabody-Y1
- Monomeric-Y1

6. ábra

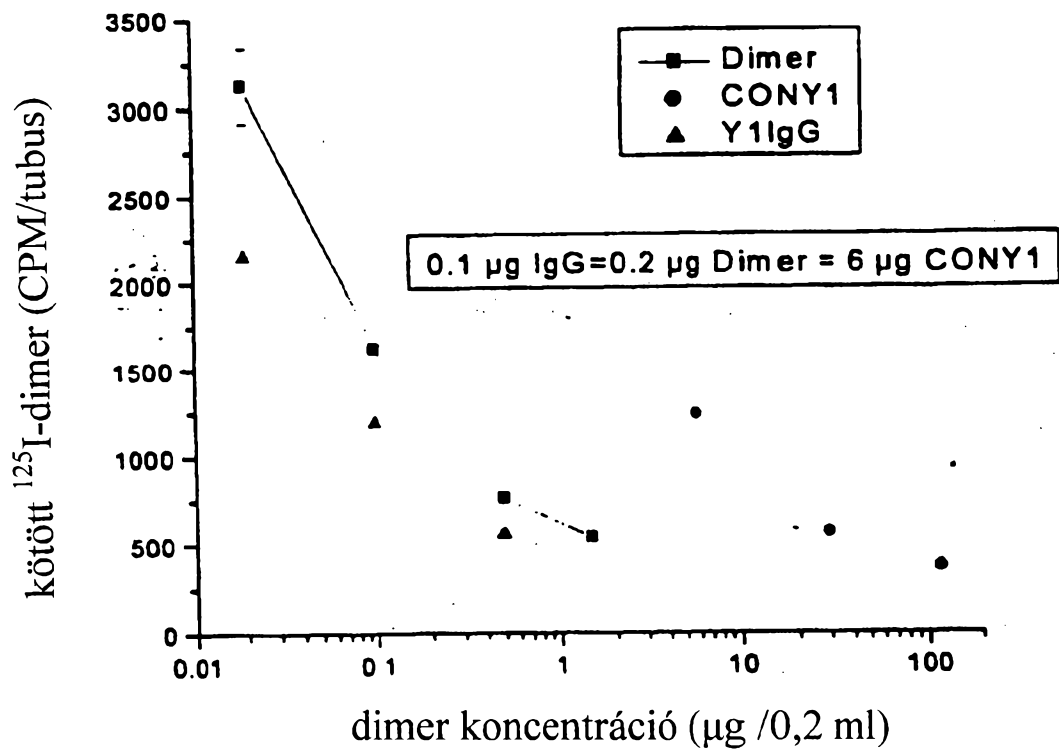


Y-1 antitest

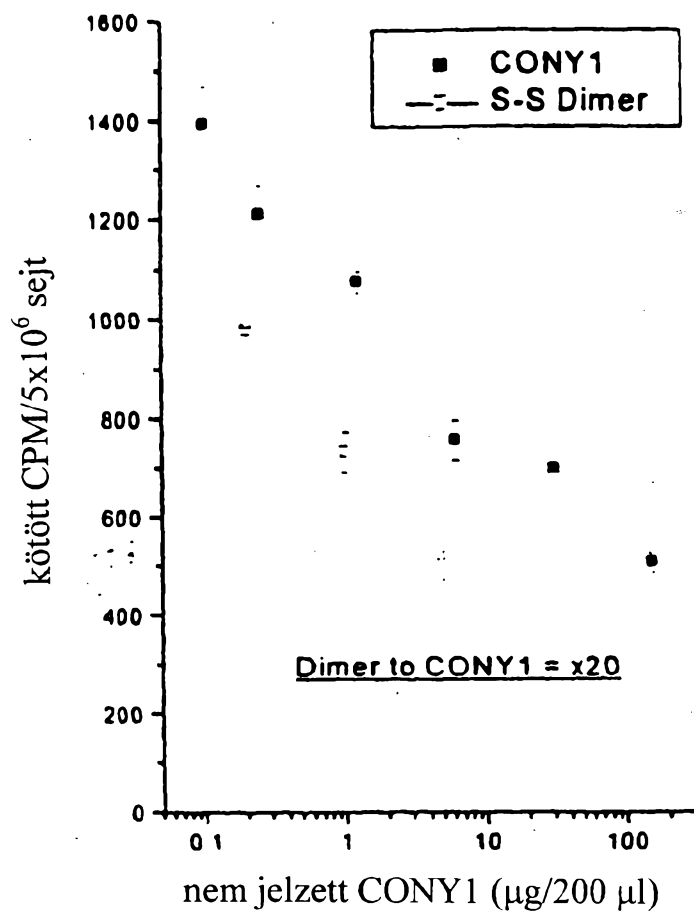
kontroll antitest



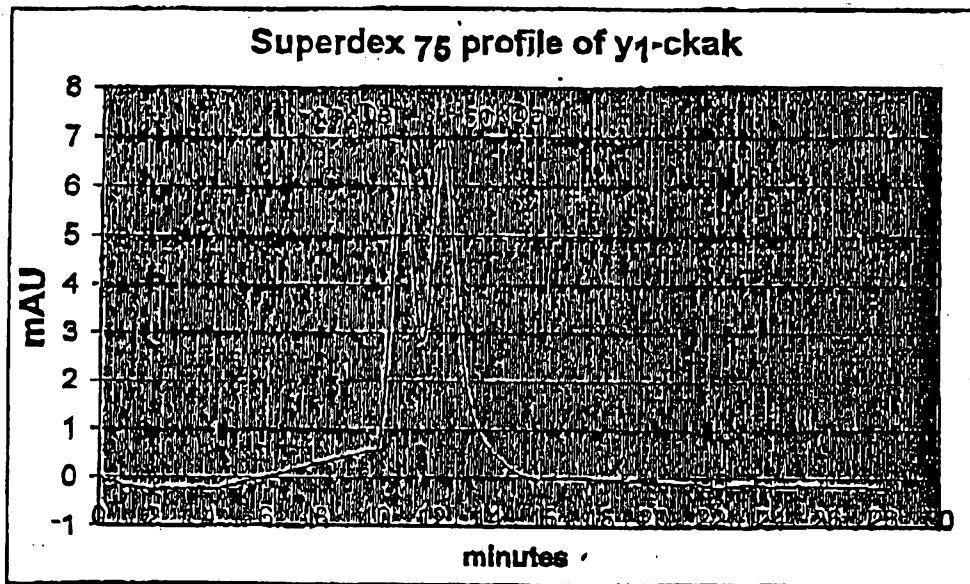
7. ábra



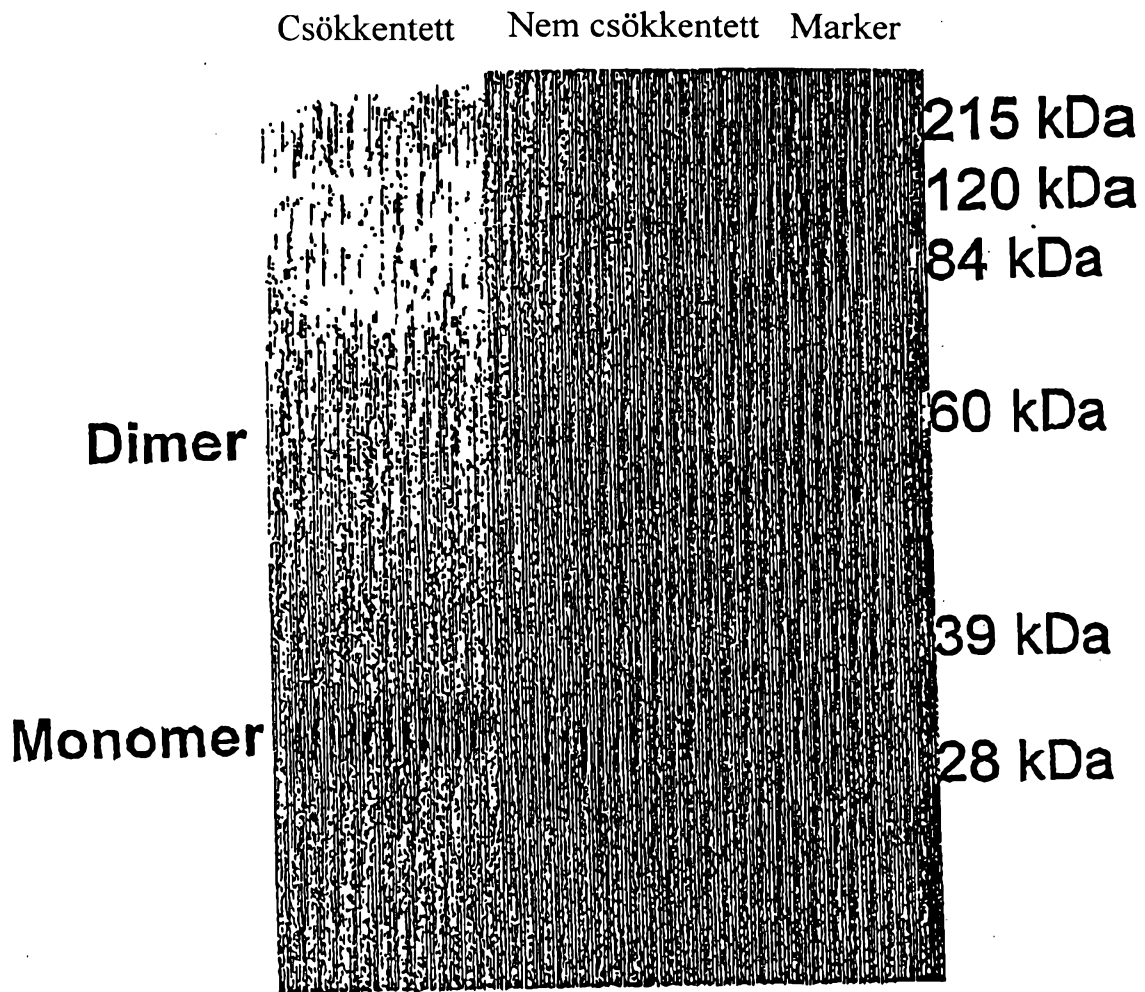
8. ábra



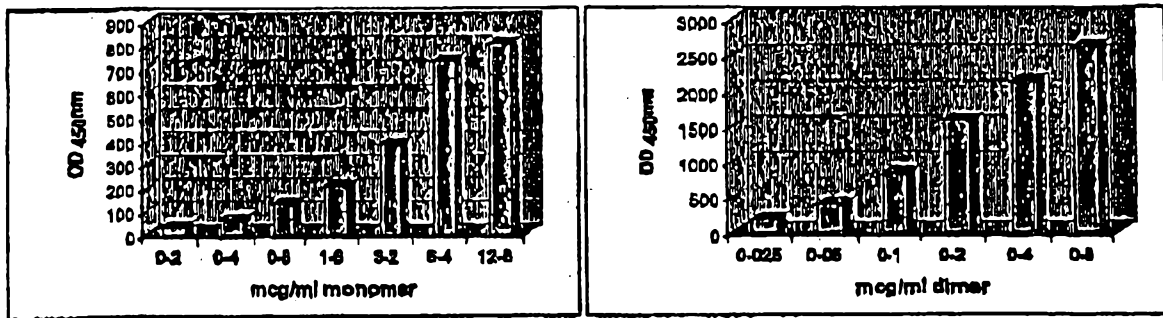
9. ábra



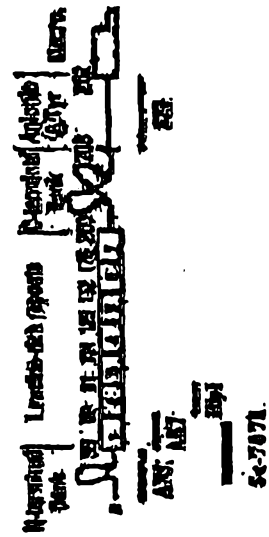
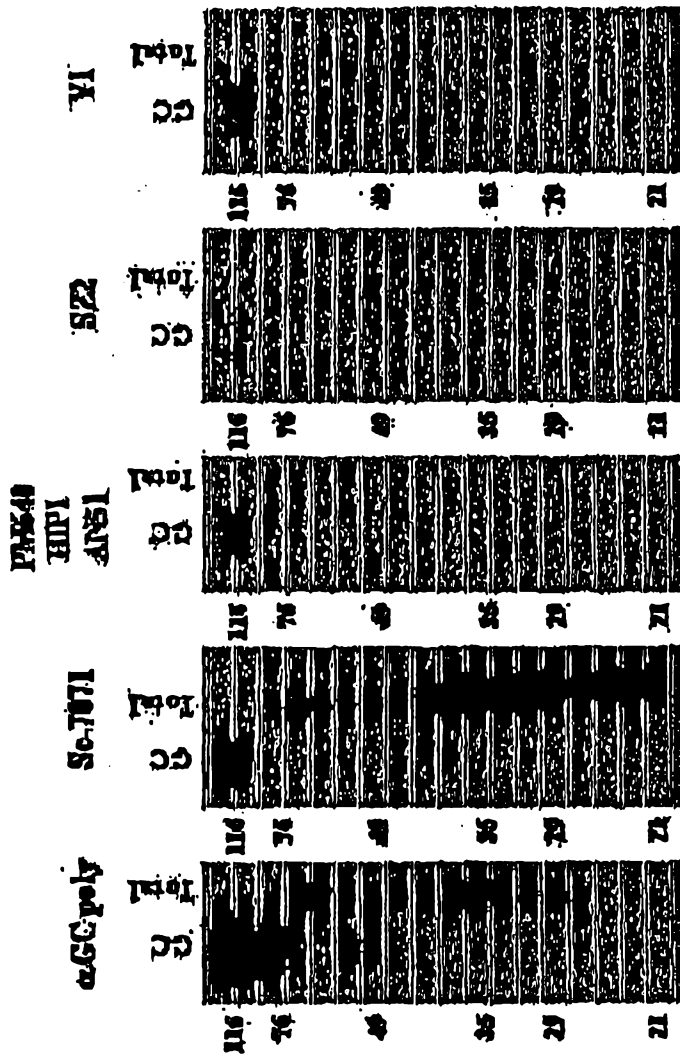
10. ábra



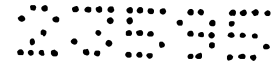
11. ábra



12. ábra



13. ábra



14/14

Y17 scFv

<210> 203

<211> 277

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 203

Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala
1 5 10 15
Ala Gln Pro Ala Met Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
20 25 30
Val Val Arg Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
35 40 45
Phe Thr Phe Asp Asp Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
50 55 60
Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Gly Ile Asn Trp Asn Gly Gly Ser Thr
65 70 75 80
Gly Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
85 90 95
Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
100 105 110
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Leu Thr His Pro Tyr Phe Trp Gly
115 120 125
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
130 135 140
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala
145 150 155 160
Val Ser Val Ala Leu Gly Gln Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp
165 170 175
Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
180 185 190
Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile
195 200 205
Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr
210 215 220
Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser
225 230 235 240
Arg Asp Ser Ser Gly Asn His Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
245 250 255
Thr Val Leu Gly Ala Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp
260 265 270
Leu Asn Gly Ala Ala
275