



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 699 36 927 T2 2008.05.15

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 1 124 568 B1

(21) Deutsches Aktenzeichen: 699 36 927.4

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/US99/24645

(96) Europäisches Aktenzeichen: 99 970 601.3

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 2000/023087

(86) PCT-Anmeldetag: 21.10.1999

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: 27.04.2000

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 22.08.2001

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: 22.08.2007

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 15.05.2008

(51) Int Cl.⁸: C07K 14/705 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

105164 P 21.10.1998 US

(73) Patentinhaber:

Altor BioScience Corp., Miramar, Fla., US

(74) Vertreter:

Patent- und Rechtsanwälte Kraus & Weisert,
80539 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

WEIDANZ, Jon A., Miami, FL 33184, US; CARD,
Kimberlyn, FL 33025, US; SHERMAN, Linda A., La
Jolla, CA 92037, US; KLINMAN, Norman R., La
Jolla, CA 92037, US; WONG, Hing C., Fort
Lauderdale, FL 33332, US

(54) Bezeichnung: POLYSPEZIFISCHE BINDEMOLEKÜLE UND DEREN VERWENDUNG

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

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

Beschreibung

[0001] Verweis auf verwandte Anmeldungen

[0002] Die vorliegende Anmeldung beansprucht die Priorität der vorläufigen US-Anmeldung Nr. 60/105,164, eingereicht am 21. Oktober 1998.

1. Gebiet der Erfindung

[0003] Die vorliegende Erfindung betrifft polyspezifische Bindungsmoleküle, sowie Verfahren zur Herstellung solcher Moleküle und deren Verwendungen. In einem Aspekt betrifft die Erfindung einzelkettige polyspezifische Bindungsmoleküle, die Zielzellen beschädigen oder zerstören können. Die Erfindung ist für eine Vielfalt von Anwendungen, einschließlich der Verwendung beim Assoziieren von Zellen, die einen T-Zellrezeptor oder eine Antikörperbindungsdomäne exprimieren, nützlich.

2. Hintergrund

[0004] Es wurde anerkannt, dass Immunsystemzellen und insbesondere zytotoxische T-Lymphozyten (CTLs) verwendet werden können, um Tumor-assoziierte Antigene (TAAs) zu detektieren. Beispielsweise sind von Melanomen abgeleitete bzw. abstammende CTLs verwendet worden, um eine Vielfalt von Melanom-spezifischen Antigenen zu identifizieren. Siehe z.B. Bruggen et al., *Science*, (1991), 254:1643; Bakker et al., *J. Exp. Med.*, (1994), 179:1005; und Yanuck et al., *Cancer Research*, (1993), 53, 3257.

[0005] Mehrere Antitumortherapien haben versucht, CTLs zum Behandeln von Erkrankungen, wie z.B. Krebs, zu verwenden. Bei einer Herangehensweise werden einem Patienten Antitumor-CTLs entnommen, in vitro expandiert und dem Patienten zurückgegeben, um den Krebs zu behandeln. Jedoch weist diese Herangehensweise signifikante Nachteile auf. Es ist beispielsweise nicht immer unkompliziert, hinreichende Mengen der CTLs aus dem Patienten zu isolieren. Zusätzlich haben zumindest einige der CTLs Spezifitäten, die die Eigentoleranz ("self-tolerance") überlebt haben, die zu zusätzlichen Komplikationen führen könnte. Siehe z.B. Browning et al., *Curr. Opin. Immunol.*, (1992), 4, 613; Mizoguchi et al., *Science*, (1992), 258:1795, und George et al., *J. Immunol.*, (1994), 152, 1802.

[0006] Es hat auch Versuche gegeben, diese und andere Nachteile durch Herstellung und Verwendung rekombinanter Immunmoleküle, wie z.B. jener, die Antikörpern ähnlich sind, zu mildern. Ein Antikörper hat eine anerkannte Struktur, die eine schwere und eine leichte Immunglobulinkette einschließt. Die schweren und leichten Ketten schließen eine N-terminale variable Region (V) und eine C-terminale konstante Region (C) ein. Die variable Region der schweren Kette wird oft als " V_H " bezeichnet, und die variable Region der leichten Kette wird als " V_L " bezeichnet. Die V_H - und V_L -Ketten bilden eine Bindungstasche, die als F(v) bezeichnet worden ist. Siehe im Allgemeinen Davis, *Ann. Rev. of Immunology*, (1985), 3: 537; und Fundamental Immunology, 3. Auflage, W. Paul, Hrsg., Raven Press LTD., New York (1993).

[0007] Rekombinante Antikörpermoleküle sind offenbart worden, beispielsweise sind mehrere rekombinante bispezifische Antikörper (bs-Fv)-Moleküle beschrieben worden. Die meisten dieser bs-Fv-Moleküle schließen ein F(v), formatiert als Einzelkette (sc-Fv), ein. Speziellere sc-Fv-Moleküle schließen eine V_H , verknüpft mit einer V_L durch eine Peptidlinkersequenz, ein. Siehe z.B. Huston et al., *PNAS (USA)*, (1988), 85:5879; Bird et al., *Science*, (1988), 242: 423; WO 94/29350; und US-Patent Nr. 5,455,030.

[0008] Weitere bs-Fv-Moleküle sind offenbart worden. Es ist z.B. beschrieben worden, dass bs-Fv-Moleküle ein T-Zell-Protein, bezeichnet als "CD3", und ein TAA binden. Es ist anerkannt, dass das Binden des bs-Fv eine Reaktion bzw. Antwort des Immunsystems erleichtern kann. Siehe z.B. Jost, C. R., (1996), *Mol. Immunol.*, 33: 211; Lindhofer, H. et al., (1996), *Blond*, 88: 4651; Chapoval, A.I. et al., (1995), *J. of Hematology*, 4: 571.

[0009] Es hat Versuche gegeben, geradlinige Verfahren zum Herstellung bispezifischer Antikörpermoleküle zu entwickeln. Jedoch waren viele dieser Versuche mit Problemen verbunden. Beispielsweise wurde beschrieben, dass viele der Moleküle insbesondere in bakteriellen Expressionssystemen unlöslich sind. Siehe z.B. Wels et al., (1992), *Biotechnology*, 10:1128.

[0010] Versuche zur Herstellung anderer rekombinanter Immunmoleküle sind beschrieben worden. Es hat beispielsweise Versuche gegeben, T-Zellrezeptoren (TCRs) zu manipulieren. Der TCR ist ein Membran gebundenes Heterodimer, bestehend aus einer α - und einer β -Kette, der/die einer variablen (V) und konstanten

(C) Immunglobulinregion ähnelt. Die TCR- α -Kette schließt eine kovalent verknüpfte V- α - und C- α -Kette ein. Die TCR- β -Kette schließt eine V- β -Kette, kovalent verknüpft mit einer C- β -Kette, ein. Siehe im Allgemeinen Davis, supra.

[0011] Es hat spezifische Anstrengungen gegeben, den TCR mittels rekombinanter DNA-Techniken zu manipulieren. In einer Herangehensweise ist der TCR beispielsweise als Einzelketten-Fusionsprotein, das die TCR-V-Regionen umfasst, formatiert wurden (sc-TCR). Es ist beschrieben worden, dass das sc-TCR-Molekül mehrere wichtige Verwendungen hat. Siehe z.B. Soo Hoo, W. F. et al., PNAS (USA), 89, 4759 (1992); Wülfing, C. und Plückthun, A., J. Mol. Biol., 242, 655 (1994); Kurucz, I. et al., PNAS (USA), 90, 3830 (1993); PCT-WO 96/13593; PCT-WO 96/18105; und Schlueter C.J. et al., J. Mol. Biol., 256, 859 (1996).

[0012] Es wird angenommen, dass die vorstehenden rekombinanten Immunmoleküle bzw. die rekombinanten Immunmoleküle des Standes der Technik mit signifikanten Nachteilen verbunden sind.

[0013] Es ist z.B. anerkannt worden, dass viele Tumorantigene von Zellen "abgestoßen" ("shed") werden, wodurch Stellen bzw. Orte für eine unspezifische Immunmolekülbindung bereitgestellt werden. Es ist insbesondere vorgeschlagen worden, dass viele bs-Fv-Moleküle versehentlich mit den abgestoßenen Antigenen Wechsel wirken, wodurch die Effizienz bei der Abtötung von Tumorzellen verringert wird.

[0014] Die Immunmoleküle des Standes der Technik verzeichnen weitere Nachteile. Es ist beispielsweise anerkannt worden, dass viele bs-Fv-Moleküle potentielle Zielantigene, wie bestimmte Peptide auf der Oberfläche von Tumorzellen, nicht binden können. Zur Veranschaulichung, das Tumor-abhängige Protein p53 wird auf Tumorzellen üblicherweise nicht als ein intaktes Protein exprimiert. Es ist stattdessen berichtet worden, dass p53 prozessiert und als ein Peptid im Kontext eines Zelloberflächen-Klasse I- oder -Klasse II-Moleküls präsentiert wird. Unter Bedingungen, bei denen eine Bindung an spezifische Zelloberflächenpeptide benötigt wird, wird sie somit für bs-Fv-Moleküle schwierig oder unmöglich.

[0015] Es ist ferner schwierig gewesen, manche bs-Fv-Moleküle ohne bedeutende Isolierungs- und/oder Rückfaltungsstufen zu isolieren. Siehe z.B. Jost, C.R. et al., supra und die darin zitierten Referenzen.

[0016] Auch die Herstellung und Verwendung vieler sc-TCRs ist mit Problemen in Zusammenhang gebracht worden. Beispielsweise haben mehrere Verfahren des Standes der Technik zur Herstellung der sc-TCR unlösliche und nicht unpassend bzw. falsch gefaltete Moleküle ergeben. Mehrere Strategien sind im Bestreben, die sc-TCR-Ausbeuten zu verbessern, entwickelt worden. Jedoch erfordern die mittels dieser Verfahren hergestellten sc-TCRs oft zeitaufwändige Handhabungen, um selbst bescheidene Mengen an Protein zu erhalten. Siehe z.B. Ward, E.S. et al., supra; Schlueter, C.J., supra; und die veröffentlichten PCT-Anmeldungen WO 96/18105 und WO 96/13593.

[0017] Es besteht deshalb ein Bedarf an rekombinanten Immunmolekülen und insbesondere einzelkettigen polyspezifischen Bindungsmolekülen, die Zielzellen in vitro und in vivo schädigen oder eliminieren (abtöten) können. Es wäre wünschenswert, Verfahren zum Herstellen der polyspezifischen Bindungsmoleküle mit einem Minimum an schwierigen präparativen Stufen zu haben.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0018] Die vorliegende Erfindung betrifft neue Immunmoleküle und insbesondere einzelkettige polyspezifische Bindungsproteine, die gewünschte Zielzellen schädigen oder eliminieren (abtöten). Die vorliegende Erfindung betrifft ein einzelkettiges polyspezifisches Bindungsprotein, umfassend mindestens einen einzelkettigen T-Zell-Rezeptor (sc-TCR) oder ein funktionelles Fragment davon, kovalent verknüpft durch eine erste Peptidlinkersequenz mit mindestens einem Einzelketten-Antikörper (sc-Ab) oder einem funktionellen Fragment davon, wobei der sc-TCR oder das funktionelle Fragment davon ein spezielles Peptid, gebunden an (geladen auf ein) einen MHC (HLA), bindet und der Einzelketten-Antikörper oder das funktionelle Fragment davon ein Antigen bindet. Die vorliegenden einzelkettigen polyspezifischen Bindungsmoleküle sind vollständig löslich und können in signifikanten Mengen mit einem Minimum an schwierigen präparativen Stufen isoliert werden.

[0019] Wir haben neue polyspezifische Bindungsmoleküle hergestellt, die eine breite Vielfalt nützlicher Aktivitäten aufweisen. Beispielsweise können die einzelkettigen polyspezifischen Bindungsproteine Zellen, die den Peptid-gebundenen (geladenen) MHC (HLA) exprimieren, mit Zellen, die das Antigen exprimieren, assoziieren. In den meisten Fällen werden der MHC (HLA) und das Antigen auf separaten Zellen vorliegen. Die Assoziierung der Zellen gemäß der Erfindung erleichtert vorzugsweise eine Immunreaktion, die die Zellen, die die

Peptidgebundenen (geladenen) MHC (HLA)-Komplexe exprimieren, schädigen oder abtöten kann. Die vorliegende Erfindung weist ein weites Spektrum nützlicher Anwendungen, einschließlich der Verwendung bei der Behandlung von bestimmten Krebsarten und viralen Infektionen, auf.

[0020] Insbesondere betrifft die vorliegende Erfindung ein einzelkettiges polyspezifisches Bindungsprotein, umfassend mindestens einen einzelkettigen T-Zell-Rezeptor (sc-TCR) oder ein funktionelles Fragment davon, kovalent verknüpft durch eine erste Peptidlinkersequenz mit mindestens einem Einzelketten-Antikörper (sc-Ab) oder einem funktionellen Fragment davon, wobei der sc-TCR oder das funktionelle Fragment davon ein spezielles Peptid, gebunden an (geladen auf ein) einen MHC (HLA), bindet und der Einzelketten-Antikörper oder das funktionelle Fragment davon ein Antigen bindet, oder sie betrifft ein einzelkettiges polyspezifisches Bindungsprotein, umfassend kovalent verknüpft in Sequenz: 1) einen sc-TCR oder ein funktionelles Fragment davon, 2) eine erste Polypeptidlinkersequenz und 3) einen Einzelketten-Antikörper oder ein funktionelles Fragment davon, wobei der sc-TCR oder das funktionelle Fragment davon ein spezielles Peptid, gebunden an (geladen auf ein) einen MHC (HLA), bindet und der Einzelketten-Antikörper oder das funktionelle Fragment davon ein Antigen bindet. Eine Zelle, die den Peptid-gebundenen (geladenen) MHC oder HLA exprimiert, wird hierin oft als eine "Zielzelle" oder mit einem ähnlichen Begriff bezeichnet. In den meisten Ausführungsformen wird das durch die Antikörperbindungsdomäne gebundene Antigen auf einer Zelloberfläche, üblicherweise auf der Oberfläche einer Immunzelle, exprimiert werden. In bestimmten Ausführungsformen wird das Antigen für die Immunzellen selektiv sein. Bevorzugtere einzelkettige polyspezifische Bindungsmoleküle dieser Erfindung sind dazu fähig, einen spezifischen Bindungskomplex ("Brücke") zwischen dem Peptidgebundenen (geladenen) MHC oder HLA auf der Zielzelle und dem Antigen auf der Immunzelle zu bilden. Ohne an die Theorie gebunden zu sein, wird angenommen, dass die Bildung der Brücke gemäß der Erfindung eine Immunreaktion, die die Zielzellen schädigen oder abtöten kann, erleichtert.

[0021] Polyspezifische Bindungsmoleküle dieser Erfindung binden spezifisch MHC- oder HLA-Komplexe. Sofern nicht anders angegeben, bedeutet der Begriff MHC und HLA, wie hierin verwendet, einen Komplex, an (auf) den ein bestimmtes Peptid gebunden (geladen) ist. In manchen Fällen wird auf die MHC (HLA)-Komplexe als "pMHC", "pHLA" oder mit einem ähnlichen Begriff Bezug genommen, um die Peptidbindung (Beladung) zu kennzeichnen. Die polyspezifischen Bindungsmoleküle sind somit zum Binden der MHC- und HLA-Komplexe und zum Verbrücken ("bridging") dieser Komplexe mit einer Immunzelle, die ein gewünschtes Antigen exprimiert, verwendbar. In manchen Fällen wird das durch ein bestimmtes polyspezifisches Bindungsmolekül gebundene Immunzellantigen als ein "Aktivierungs"-Molekül oder -Marker bezeichnet werden, um eine bevorzugte Aktivierung der Immunzelle nach Bindung durch das polyspezifische Molekül zu bezeichnen.

[0022] Demgemäß betrifft die vorliegende Erfindung einzelkettige polyspezifische Bindungsproteine, die mindestens einen sc-TCR, kovalent verknüpft (d.h. fusioniert) mit mindestens einem einzelkettigen Antikörper (sc-Ab), einschließen. Die sc-TCR- und die sc-Ab-Moleküle können direkt miteinander fusioniert sein, obwohl es im Allgemeinen bevorzugt ist, den sc-TCR und den sc-Ab voneinander durch eine geeignete (erste) Peptidlinkersequenz zu trennen. Alternativ können funktionelle Fragmente der sc-TCR- und/oder sc-Ab-Moleküle in dem Protein eingesetzt werden. In bevorzugten Ausführungsformen werden die polyspezifischen Bindungsproteine den sc-TCR, verknüpft mit dem sc-Ab durch die erste Peptidlinkersequenz einschließen.

[0023] Spezieller ist der sc-TCR vorzugsweise eine einzelkettige V-Kette. Die V-Kette wird typischerweise eine $\text{V}\alpha,\beta$ -Sequenz einschließen, in der eine $\text{V}\alpha$ -Kette mit einer $\text{V}\beta$ -Kette fusioniert ist. In einer spezifischen Ausführungsform wird die Fusion durch kovalente Verknüpfung der Moleküle durch eine (zweite) Peptidlinkersequenz erreicht. Das Fusionsprodukt kann ferner über die $\text{V}\alpha$ - oder $\text{V}\beta$ -Kette mit einer konstanten Kette eines Immunglobulins (Ig-C_L) oder einem Fragment davon verknüpft sein, sofern gewünscht.

[0024] In einer spezifischeren Ausführungsform ist der C-Terminus der sc-TCR-V- α -Kette kovalent durch die zweite Peptidlinkersequenz mit dem N-Terminus der $\text{V}\beta$ -Kette verknüpft. Alternativ kann der C-Terminus der sc-TCR-V- β -Kette kovalent durch die zweite Peptidlinkersequenz mit dem N-Terminus der $\text{V}\alpha$ -Kette verknüpft sein.

[0025] In einer weiteren Ausführungsform ist eine TCR-C- β -Kette oder ein Fragment davon kovalent verknüpft zwischen dem C-Terminus und der sc-TCR-V- β -Kette und dem N-Terminus der ersten Peptidlinkersequenz. Alternativ kann die TCR-C- β -Kette oder das Fragment davon kovalent verknüpft sein zwischen dem C-Terminus der TCR-V- α -Kette und dem N-Terminus der ersten Peptidlinkersequenz.

[0026] In einer weiteren Ausführungsform ist eine TCR-C- α -Kette oder ein Fragment davon kovalent verknüpft zwischen dem C-Terminus der sc-TCR-V- α -Kette und dem N-Terminus der zweiten Peptidlinkersequenz.

quenz, fusioniert mit der V- β -Sequenz. Alternativ kann die C- α -Kette oder das Fragment davon kovalent verknüpft sein zwischen dem C-Terminus der V- β -Kette und dem N-Terminus der zweiten Peptidlinkersequenz, fusioniert mit der V- α -Sequenz.

[0027] In einer speziellen Ausführungsform schließt der sc-TCR die TCR-C- α -Kette oder das Fragment davon, kovalent verknüpft zwischen dem C-Terminus der sc-TCR-V- α -Kette und dem N-Terminus der zweiten Peptidlinkersequenz, fusioniert mit der sc-TCR-V- β -Sequenz, ein. Ferner ist die TCR-C- β -Kette oder Fragment davon kovalent zwischen dem C-Terminus der V- β -Kette und dem N-Terminus der ersten Peptidlinkersequenz verknüpft.

[0028] Wie diskutiert, schließen die polyspezifischen Bindungsmoleküle dieser Erfindung mindestens einen sc-Ab ein. In einer speziellen Ausführungsform schließt die Antikörperbindungsdomäne mindestens ein sc-Fv ein. Bevorzugtere einzelkettige polyspezifische Bindungsproteine schließen ein sc-Fv oder ein funktionelles Fragment davon ein. Ein illustratives sc-Fv schließt mindestens zwei Immunglobulinketten, und insbesondere zwei variable Immunglobulinketten, d.h. eine leichte Kette (V_L), die mit einer schweren Kette (V_H) fusioniert ist, ein. In dieser Ausführungsform können die V_L - und V_H -Ketten miteinander fusioniert sein, obwohl es im Allgemeinen bevorzugt ist, die Ketten durch eine (dritte) Peptidlinkersequenz kovalent zu verknüpfen.

[0029] In einer speziellen Ausführungsform ist der C-Terminus der V_L -Kette durch die dritte Peptidlinkersequenz kovalent mit dem N-Terminus der V_H -Kette verknüpft. In einer weiteren Ausführungsform ist der C-Terminus der V_H -Kette kovalent durch die dritte Peptidlinkersequenz mit dem N-Terminus der V_L -Kette verknüpft.

[0030] In einer spezielleren Ausführungsform ist der C-Terminus der sc-TCR-V- β -Kette kovalent verknüpft mit der dritten Polypeptidlinkersequenz, deren Sequenz weiterhin mit dem N-Terminus der V_H -Kette verknüpft ist. Alternativ ist der C-Terminus der sc-TCR-V- β -Kette kovalent mit der dritten Polypeptidlinkersequenz, wie diskutiert, verknüpft, außer dass die Polypeptidsequenz weiterhin mit dem N-Terminus der V_L -Kette verknüpft ist. In einer weiteren Ausführungsform ist der C-Terminus der sc-TCR-V- β -Kette kovalent mit einer C- β -Kette verknüpft, wobei diese Kette kovalent mit der dritten Linkersequenz verknüpft ist, wobei die Sequenz mit dem N-Terminus der V_H -Kette verknüpft ist. Alternativ ist der C-Terminus der sc-TCR-V- β -Kette mit einer C- β -Kette kovalent verknüpft, wobei die Kette mit der dritten Polypeptidlinkersequenz kovalent verknüpft ist, wobei die Sequenz mit dem N-Terminus der V_L -Kette verknüpft ist.

[0031] In einer bevorzugten Ausführungsform stellt die vorliegende Erfindung einzelkettige "bispezifische" Bindungsproteine bereit, die mindestens einen sc-TCR (oder ein Fragment davon) und mindestens ein sc-Fv (oder ein Fragment davon), kovalent miteinander durch eine geeignete Peptidlinkersequenz verknüpft, einschließen, bereit. In Fällen, in denen mehr als ein sc-TCR und/oder sc-Fv verwendet werden, sind die sc-TCRs und sc-Fvs vorzugsweise die gleichen. Das einzelkettige bispezifische Bindungsprotein wird hierin manchmal als ein "bispezifisches Hybridmolekül" oder "sc-TCR/scFv-Hybridmolekül" oder mit einem ähnlichen Begriff bezeichnet. Die bispezifischen Hybridmoleküle dieser Erfindung können zusätzliche Aminosäuresequenzen, wie z.B. Proteinmarkierungen bzw. Protein-Tags einschließen. Bevorzugtere bispezifische Bindungsproteine werden nachstehend diskutiert.

[0032] Beispielsweise schließen in einer Ausführungsform die bispezifischen Bindungsmoleküle kovalent in Sequenz verknüpft ein: 1) einen interessierenden sc-TCR oder ein interessierendes funktionelles Fragment davon, 2) eine geeignete Peptidlinkersequenz, und 3) einen sc-Fv oder ein funktionelles Fragment davon. In einer spezielleren Ausführungsform schließt der sc-TCR weiterhin kovalent in Sequenz verknüpft ein: 4) die V- α -Kette, 5) eine geeignete Peptidlinkersequenz, 6) eine V- β -Kette und 7) ein optionales C- β -Kettenfragment. Alternativ kann der sc-TCR kovalent in Sequenz verknüpft einschließen: 4) die V- β -Kette, 5) die Linkersequenz, 6) die V- α -Kette und 7) eine optionale C- β -Kette oder ein Fragment davon. In einer weiteren speziellen Ausführungsform schließt der sc-TCR weiterhin eine C- α -Kette oder ein Fragment davon ein, kovalent verknüpft zwischen der V- α -Kette und der Peptidlinkersequenz, die mit der V- β -Kette fusioniert ist.

[0033] In einer weiteren speziellen Ausführungsform schließen die bispezifischen Bindungsmoleküle ein sc-Fv ein, welches kovalent in Sequenz verknüpft einschließt: 8) die V_H -Kette, 9) eine geeignete Polypeptidlinkersequenz und 10) die V_L -Kette. In einer weiteren Ausführungsform schließt das sc-Fv kovalent in Sequenz verknüpft ein: 8) die V_L -Kette, 9) die Polypeptidlinkersequenz und 10) die VH -Kette.

[0034] Die einzelkettigen polyspezifischen Bindungsproteine dieser Erfindung können ferner mindestens ein Protein-Tag, der daran kovalent gebunden ist, vorzugsweise etwa 1 bis 3 derartiger Tags einschließen. Vorzugsweise ist der Protein-Tag mit dem C-Terminus eines gewünschten Bindungsmoleküls fusioniert, obwohl

für manche Anwendungen eine Fusion mit dem N-Terminus bevorzugter sein kann.

[0035] In einer spezifischeren Ausführungsform schließt das einzelkettige polyspezifische Bindungsprotein kovalent in Sequenz verknüpft ein: 1) die TCR-V- α -Kette, 2) eine Peptidlinkersequenz, 3) die TCR-V- β -Kette, die kovalent mit einem C- β -Kettenfragment verknüpft ist, 4) eine Peptidlinkersequenz, 5) die V_L-Kette, 5) eine Peptidlinkersequenz und 6) die V_H-Kette. In einer weiteren Ausführungsform schließt das einzelkettige polyspezifische Bindungsprotein kovalent in Sequenz verknüpft ein: 1) die TCR-V- α -Kette, 2) eine Peptidlinkersequenz, 3) die TCR-V- β -Kette, die kovalent mit einem C- β -Kettenfragment verknüpft ist, 4) eine Peptidlinkersequenz, 5) die V_H-Kette, 5) eine Polypeptidlinkersequenz und 6) die V_L-Kette.

[0036] Bezeichnenderweise ist die vorliegende Erfindung flexibel. Das heißt, die Erfindung betrifft polyspezifische Bindungsmoleküle, die eine Vielfalt von sc-TCR- und sv-FV-Komponenten einschließen können. Es wird geschätzt werden, dass die Reihenfolge, in der die Komponenten bzw. Bestandteile hergestellt oder zusammengesetzt werden, üblicherweise nicht wichtig ist, solange die gewünschten Bindungs- und Aktivierungsmerkmale erzielt werden.

[0037] Hierin sind auch mehrkettige polyspezifische Bindungsproteine beschrieben, die mindestens einen sc-TCR (funktionelles Fragment davon) und mindestens eine Antikörperbindungsdomäne, die z.B. ein F(v) oder sc-Fv sein kann, einschließen. Die Bindungsmoleküle schließen spezifischer mindestens ein "Verbindungsmolekül" ("joining molecule") zum Verbinden des sc-TCR und der Antikörperbindungsdomäne ein. Wie es nachstehend genauer diskutiert werden wird, kann das Verbindungsmolekül mit dem sc-TCR, der Antikörperbindungsdomäne oder beiden kovalent oder nicht-kovalent verknüpft sein. Beispielsweise sind in einer bevorzugten Ausführungsform zwei kompatible Verbindungsmoleküle jeweils unabhängig mit dem sc-TCR und dem sc-Fv fusioniert.

[0038] Der Begriff "Verbindungsmolekül" bedeutet eine Aminosäuresequenz, die zur spezifischen Bindung, entweder kovalent oder nicht-kovalent, einer zweiten Aminosäuresequenz fähig ist. Manchmal wird auf die zweite Aminosäuresequenz als eine "kognate" bzw. "erkennende" Sequenz Bezug genommen, um die Fähigkeit zur Bildung eines spezifischen Bindungspaares zu bezeichnen. Auf die zweite Sequenz kann hierin manchmal auch als ein zweites Verbindungsmolekül Bezug genommen werden, wobei das zweite Verbindungsmolekül das gleiche wie das (erste) Verbindungsmolekül oder davon verschieden sein kann. Speziellere Verbindungsmoleküle schließen Immunglobulinketten und besonders konstante Ketten (H oder L) oder geeignete Fragmente davon, "coiled-coil"-Motive bzw. superspiralisierte Motive und Helix-turn-Helix-Motive ein. Spezifischere Beispiele für Verbindungsmoleküle sind nachstehend offenbart.

[0039] Aus der nachstehenden Diskussion wird offensichtlich sein, dass ein Verbindungsmolekül in manchen Fällen auch als ein Protein-Tag dienen kann.

[0040] Ein spezielleres mehrkettiges polyspezifisches Bindungsmolekül schließt mehr als ein Verbindungsmolekül und vorzugsweise etwa zwei derartige Verbindungsmoleküle ein. In einer spezielleren Ausführungsform ist ein sc-TCR mit dem ersten Verbindungsmolekül fusioniert. Das erste Verbindungsmolekül kann entweder kovalent oder nicht-kovalent mit dem zweiten Verbindungsmolekül, das weiterhin mit der Antikörperbindungsdomäne verknüpft ist, verknüpft sein. In manchen Ausführungsformen jedoch, z.B. wenn das erste und zweite Verbindungsmolekül geeignete Immunglobulinketten sind, kann eine Kombination aus kovalenten und nicht-kovalenten Bindungen eingesetzt werden, um den sc-TCR und die Antikörperbindungsdomäne durch das erste und zweite Verbindungsmolekül zu verknüpfen.

[0041] Zur Erläuterung schließt ein bestimmtes mehrkettiges polyspezifisches Bindungsprotein, kovalent mit mindestens einem sc-TCR, vorzugsweise einem sc-TCR, verknüpft, eine schwere Kette eines Immunglobulins (Ig-C_H) oder ein funktionelles Fragment davon ein. Auf dieses Konstrukt wird hierin manchmal als ein "sc-TCR/Ig-Fusionsprotein", "sc-TCR/Ig" oder mit einem ähnlichen Begriff Bezug genommen. Es wird geschätzt werden, dass der Immunglobulin-schwere-Kette-Teil des sc-TCR/Ig-Fusionsproteins für einen Typ von Verbindungsmolekül, wie er oben stehend und in der nachstehenden Diskussion definiert ist, repräsentativ ist. In einer spezifischeren Ausführungsform schließt das Bindungsmolekül ferner ein zweites Verbindungsmolekül ein, das vorzugsweise eine geeignete schwere Immunglobulinkette bzw. eine schwere Kette eines Immunglobulins ist, die dazu fähig ist, einen Bindungskomplex zu bilden. Der Isotyp der Immunglobulinketten kann verschieden sein, ist aber vorzugsweise der gleiche, um die Bindung zu erleichtern. Das zweite Verbindungsmolekül ist mit der Antikörperbindungsdomäne, die vorzugsweise ein F(v) und insbesondere ein sc-Fv ist, gebunden. In anderen Ausführungsformen kann der sc-TCR ferner kovalent oder nicht-kovalent an eine variable Immunglobulinkette, und vorzugsweise eine variable leichte Kette, gebunden sein.

[0042] Die einzel- und mehrkettigen polyspezifischen Bindungsproteine, die hierin offenbart sind, schließen vorzugsweise TCR-V- α - und die V- β -Ketten ein, die zu mindestens 90% mit T-Zell-Rezeptor-V-Ketten, die auf einer zytotoxischen T-Zelle vorhanden sind, identisch sind. Vorzugsweise ist mindestens der sc-TCR-Teil des Proteins humanisiert worden und, stärker bevorzugt, ist das gesamte Bindungsprotein humanisiert worden, um die Patientenkompatibilität zu verstärken. Bei derartigen Ausführungsformen kann es wünschenswert sein, mindestens einen Protein-Tag einzuschließen, der z.B. ein detektierbar-markiertes Molekül, das für diagnostische oder Bildgebungsstudien geeignet ist, sein kann.

[0043] Wie nachstehend beschrieben wird, können die polyspezifischen Bindungsmoleküle unmodifiziert sein oder können, sofern gewünscht, kovalent mit einem gewünschten Molekül, z.B. Wirkstoffen, Toxinen, Enzymen oder radioaktiven Substanzen, durch eine verknüpfte Peptidlinkersequenz verknüpft sein.

[0044] Die polyspezifischen Bindungsmoleküle stellen mehrere signifikante Vorteile bereit.

[0045] Beispielsweise sind polyspezifische Bindungsproteine dazu fähig, eine MHC-exprimierende Zielzelle und eine Immunzelle zu assoziieren. Das heißt, die vorliegenden Bindungsproteine bilden vorzugsweise eine Brücke, die die Immunzelle mit der MHC- oder HLA-exprimierenden Zelle verbindet. Wie angemerkt, wird angenommen, dass die Assoziation die Erkennung verstärkt und die Schädigung an oder das Abtöten der Zielzelle erleichtert. Im Gegensatz dazu sind die meisten Immunsystemmoleküle des Standes der Technik, und insbesondere bs-Fv-Moleküle, nicht zum Binden von pMHC- oder pHLa-Komplexen optimiert. Demgemäß stellen die Moleküle ein wirksames Mittel zum Abtöten von Zielzellen, die ein pMHC- oder pHLa-Molekül exprimieren, bereit.

[0046] Zusätzlich wird angenommen, dass die Verwendung der polyspezifischen Bindungsproteine mit weniger nachteiligen Aktivitäten im Vergleich zu vielen Immunmolekülen des Standes der Technik assoziiert sind. Zur Erläuterung, es ist berichtet worden, dass viele bs-Fv-Moleküle des Standes der Technik an abgestoßene TAAs binden. Im Gegensatz dazu binden bevorzugte polyspezifische Bindungsmoleküle dieser Erfindung TAAs im Kontext von MHC- oder HLA-Molekülen spezifisch, wodurch die unspezifische Bindung an den abgestoßenen Debris wesentlich verringert oder vollständig eliminiert wird. Bezeichnenderweise gab es auf diesem Gebiet viel weniger Bedenken hinsichtlich MHC- und HLA-Abstoßung ("MHC and HLA shedding").

[0047] Ferner können die hierin offenbarten polyspezifischen Bindungsmoleküle ein wesentlich breiteres Spektrum von Molekülen als die meisten rekombinanten Immunmoleküle des Standes der Technik binden. Insbesondere ist verstanden worden, dass targetierbare Antigene oft in Zellen verborgen sind, was eine Erkennung und Bindung schwierig macht. Es ist ein weiteres Ziel der vorliegenden Erfindung, Moleküle zu beschreiben, die diese verborgenen Antigene spezifisch binden. Beispielsweise schließen die polyspezifischen Bindungsmoleküle mindestens einen sc-TCR (oder ein funktionelles Fragment) ein, der (das) Antigene im Kontext eines MHC oder HLA binden kann. Somit sind die Bindungsmoleküle dazu fähig, eine große Vielfalt von Antigenen, die üblicherweise in Zellen verborgen sind, zu binden. Im Gegensatz dazu sind die meisten rekombinanten Immunsystemmoleküle des Standes der Technik nicht dazu fähig, MHC- oder HLA-präsentierte Antigene wirksam zu binden.

[0048] Die vorliegende Erfindung stellt noch weitere Vorteile bereit. Beispielsweise erforderte die Praxis im Stand der Technik im Allgemeinen eine ausgedehnte Manipulation von TCR-verwandten bzw. mit TCR zusammenhängenden Proteinen (z.B. TCR-Rezeptoren, TCR-Heterodimere, sc-TCRs), bevor signifikante Proteinfusionen erhalten werden konnten. Im Gegensatz dazu sind die polyspezifischen Bindungsmoleküle der vorliegenden Erfindung vollständig löslich und können in signifikanten Mengen isoliert werden. Darüber hinaus kann eine breite Vielfalt der polyspezifischen Bindungsmoleküle für eine Wechselwirkung mit zahlreichen Immunsystemkomponenten, wie z.B. Superantigene oder APCs, präsentiert werden.

[0049] Darüber hinaus schließen die einzel- und mehrkettigen polyspezifischen Bindungsmoleküle Immunoglobulinketten ein, die mittels immunologischer Standardverfahren leicht isoliert werden. Das Vorliegen dieser Ketten kann üblicherweise die Detektion, Analyse und Isolierung der Bindungsmoleküle erleichtern, wie nachstehend diskutiert.

[0050] In einem weiteren Gesichtspunkt betrifft die Erfindung Polynucleotide (RNA, mRNA, cDNA, genomische DNA oder Chimären davon), die eine Sequenz, die für ein einzelkettiges polyspezifisches Bindungsprotein codiert, einschließen oder daraus bestehen. In einer Ausführungsform schließt das Polynucleotid Sequenzen ein, die im Wesentlichen für das gesamte Bindungsprotein codieren, z.B. wenn das Bindungsprotein ein einzelkettiges Konstrukt ist.

[0051] In einer anderen Ausführungsform schließen die Polynucleotide eine Sequenz ein, die für einen Teil des polyspezifischen Bindungsproteins und insbesondere einen Teil bestimmter mehrkettiger Bindungsproteine codiert, wie nachstehend diskutiert. Beispielsweise kann ein spezielles Polynucleotid dieser Erfindung für einen sc-TCR, fusioniert mit einer schweren Immunglobulinkette oder einem geeigneten Fragment davon (z.B. ein sc-TCR/Ig-Molekül), codieren. In dieser Ausführungsform kann der verbleibende Teil des polyspezifischen Bindungsproteins auf mehrere Weisen bereitgestellt werden. Er kann beispielsweise durch eine Zelle oder einen Extrakt davon, die/der zum Synthetisieren von Antikörpermolekülen, wie z.B. einer Antikörperbindungsdomäne, fähig ist, bereitgestellt werden. Der Antikörper oder die Antikörperbindungsdomäne kann durch das Zellgenom codiert werden, oder er/sie kann durch einen eingeführten DNA-Abschnitt codiert werden. Vorzugsweise wird die Zelle eine Antikörper-produzierende Zelle sein, z.B. eine Hybridomzelle. Alternativ wird der verbleibende Teil des Bindungsproteins durch eine zweite Polynucleotidsequenz, die den DNA-Abschnitt einschließt, bereitgestellt. In dieser Ausführungsform wird das Bindungsprotein vorzugsweise konstruiert, indem die codierten Proteinteile miteinander unter Bedingungen in Kontakt gebracht werden, die zur Bildung des gewünschten Bindungsproteins führen. Wie nachstehend diskutiert wird, können die polyspezifischen Bindungsproteine dieser Erfindung mittels einer oder einer Kombination von Strategien, einschließlich zellulärer, genetischer und chemischer Verfahren, verbunden werden.

[0052] Insbesondere werden DNA-Vektoren in Betracht gezogen, die die Polynucleotide dieser Erfindung einschließen oder daraus bestehen. Beispielhafte DNA-Vektoren schließen jene ein, die mit einem herkömmlichen prokaryotischen oder eukaryotischen Proteinexpressionssystem kompatibel sind. Spezifischere Beispiele für Polynucleotide und DNA-Vektoren.

[0053] Die Polynucleotide weisen bedeutende Vorteile auf. Wie es aus der nachstehenden Offenbarung offensichtlich wird, schließen beispielsweise bevorzugte Nucleotide dieser Erfindung DNA-Abschnitte ein, die für kovalent verknüpfte sc-TCR- und sc-Ab-Moleküle codieren. Die DNA-Abschnitte sind bevorzugt in einem "Kassetten"-Format angeordnet, so dass ein für einen sc-TCR oder sc-Ab codierender Abschnitt, wie gewünscht, durch einen für einen anderen sc-TCR oder sc-Ab codierenden Abschnitt ausgetauscht werden kann.

[0054] Es werden auch Zusammensetzungen und Verfahren zum Selektieren polyspezifischer Bindungsproteine beschrieben. Spezieller können die Zusammensetzungen und Verfahren dazu eingesetzt werden, sc-TCR- und sc-Ab-Moleküle mit gewünschten Eigenschaften zu selektieren, wodurch die Herstellung und Verwendung von polyspezifischen Bindungsproteinen, die diese Moleküle einschließen, erleichtert wird.

[0055] In einer Ausführungsform erwähnt die Beschreibung Bakteriophagen, die mindestens einen sc-TCR (oder ein funktionelles Fragment) und mindestens ein sc-Fv (oder ein funktionelles Fragment) als Fusionsproteine einschließen. Wie diskutiert wird, können die Bakteriophagen z.B. eingesetzt werden, um sc-TCR- und sc-Fv-Moleküle auf gewünschte Bindungseigenschaften zu selektieren. Bevorzugt sind bispezifische Bakteriophagen. Auf die rekombinanten Bakteriophagen kann hierin manchmal als "polyfunktionell" oder "polyspezifisch" Bezug genommen werden, um eine Bindung durch die sc-TCR- und die sc-Fv-Fusionsproteine zu bezeichnen. Die rekombinanten Bakteriophagen können von gut bekannten filamentösen "fd"-Phagen abgeleitet werden, obwohl in manchen Fällen damit verwandte Phagen verwendet werden können.

[0056] Spezieller schließen die hierin beschriebenen rekombinanten Bakteriophagen eine Vielzahl von Fusionsproteinen ein, die jeweils einschließen: 1) mindestens einen sc-TCR oder ein funktionelles Fragment davon, fusioniert mit einem ersten Bakteriophagenhüllprotein, oder 2) mindestens einen sc-Ab oder ein funktionelles Fragment davon, fusioniert mit einem zweiten Bakteriophagenhüllprotein, das das gleiche wie das erste Bakteriophagenhüllprotein oder davon verschieden ist. Bevorzugte Bakteriophagenhüllproteine sind im Wesentlichen von voller Länge oder können Fragmente davon sein, die bereitgestellt werden, so dass das Fragment dazu hinreicht, um das fusionierte Molekül zu präsentieren. Mit "präsentieren" ("display") ist gemeint, dass die Proteinfusion ("protein fusion") Teil der Bakteriophagenhülle ist und auf dem Bakteriophagen mittels Standard-Screeningtechniken, wie z.B. jenen die nachstehend offenbart sind, leicht detektierbar ist.

[0057] In einem damit zusammenhängenden Gesichtspunkt wird eine rekombinante Bakteriophagen-Bibliothek bereitgestellt, die eine Vielzahl rekombinanter Bakteriophagen einschließt, in denen jeder Bakteriophage eine Vielzahl einzelkettiger polyspezifischer Bindungsproteine umfasst, die jeweils mit einem Bakteriophagenhüllprotein als Fusionsprotein verknüpft sind, wobei jedes einzelkettige Bindungsprotein umfasst: 1) einen sc-TCR oder ein funktionelles Fragment davon, verknüpft mit einem ersten Bakteriophagenhüllprotein oder -fragment, oder 2) einen sc-Ab oder ein funktionelles Fragment davon, verknüpft mit einem zweiten Bakteriophagenhüllprotein oder -fragment. Stärker bevorzugte rekombinante Bakteriophagen-Bibliotheken schließen Bakteriophagen ein, die bispezifische Bindungsproteine präsentieren.

[0058] Die rekombinanten Bakteriophagen-Bibliotheken können so formatiert werden, dass sie eine Vielfalt von TCR-V-Ketten und/oder variablen Immunglobulinketten einschließen.

[0059] Demgemäß können Bibliotheken zum Selektieren rekombinanter Bakteriophagen, die gewünschte sc-TCR- und sc-Ab-Moleküle präsentieren, verwendet werden.

[0060] Die rekombinanten Bakteriophagen können mittels einer Vielfalt herkömmlicher Techniken isoliert werden. In einer Ausführungsform wird ein Verfahren zum Isolieren des rekombinanten Bakteriophagen beschrieben, in welchem das Verfahren mindestens einen und vorzugsweise alle der nachstehenden Stufen einschließt:

- a) Einführen eines ersten Polynucleotids, umfassend eine Sequenz, die für ein erstes Fusionsprotein, umfassend einen sc-TCR, der mit einem ersten Bakteriophagenhüllprotein oder -fragment kovalent verknüpft ist, codiert, in Wirtszellen,
- b) Einführen eines zweiten Polynucleotids, umfassend eine Sequenz, die für ein zweites Fusionsprotein, umfassend ein sc-Fv, das mit einem zweiten Bakteriophagenhüllprotein oder -fragment kovalent verknüpft ist, codiert, in Wirtszellen,
- c) Kultivieren der Wirtszellen in Medium unter Bedingungen, die die Propagierung von Bakteriophagen und Präsentation der Fusionsproteine erlauben; und
- d) ein Verfahren zum Isolieren der rekombinanten Bakteriophagen aus der Wirtszelle oder dem Medium.

[0061] In einer speziellen Ausführungsform schließt das Verfahren ferner das Inkontaktbringen eines Extraks aus der Wirtszelle oder dem kultivierten Medium/des kultivierten Mediums mit einer synthetischen Matrix, die dazu fähig ist, eines der Fusionsproteine spezifisch zu binden, und (Auf)reinigen des rekombinanten Bakteriophagen aus der synthetischen Matrix, um den Bakteriophagen zu isolieren, ein. In einer noch spezielleren Ausführungsform schließt die synthetische Matrix ein Antikörperfragment ein, das dazu fähig ist, den rekombinanten Bakteriophagen spezifisch zu binden. Spezifischere Bakteriophagen-Isolierungstechniken werden nachstehend diskutiert.

[0062] Darüber hinaus wird ein Kit, umfassend die vorliegenden rekombinanten Bakteriophagen, beschrieben, wobei der Kit auch geeignete prokaryotische Zellen zum Propagieren des Bakteriophagen und Anweisungen zur Verwendung des Kits einschließen kann. Es wird auch ein Kit beschrieben, der die oben stehend diskutierte Bakteriophagenbibliothek einschließt.

[0063] Die rekombinanten Bakteriophagen weisen zusätzliche Verwendungen und Vorteile auf. Beispielsweise können die Bakteriophagen gemäß Standard-Screeningtechniken zum Erleichtern der Analyse eines gewünschten polyspezifischen Bindungsmoleküls *in vitro* verwendet werden. Insbesondere können die rekombinanten Bakteriophagen dazu verwendet werden, zu bewerten, ob ein spezifischer sc-TCR oder sc-Ab, wie z.B. ein sc-Fv, die Fähigkeit zum Erkennen, Binden und/oder Abtöten von Zielzellen von Interesse hat. Zusätzliche Vorteile schließen eine relativ schnelle und geradlinige Verfahrensweise zum Herstellen und Testen bispezifischer sc-TCR/sc-Ab-Moleküle, ein kurzes und einfaches Aufreinigungsverfahren und ein beschleunigtes Verfahren zum Testen großer Zahlen verschiedener Hybridmoleküle auf eine Wirksamkeit beim Schädigen oder Abtöten von Zielzellen (z.B. Tumortötung) ein.

[0064] Die hierin beschriebenen einzel- und mehrketigen polyspezifischen Bindungsproteine können als vollständig funktionelle und lösliche Proteine mittels eines Verfahrens oder einer Kombination von Verfahren hergestellt werden. Im Allgemeinen umfassen die Verfahren zelluläre, DNA-Rekombinations- und chemische Techniken oder Kombinationen davon.

[0065] Beispielsweise wird in einer Ausführungsform ein Verfahren zum Herstellen eines einzelkettigen polyspezifischen Bindungsproteins, umfassend mindestens einen einzelkettigen T-Zell-Rezeptor (sc-TCR) oder ein funktionelles Fragment davon und mindestens ein einzelkettiges Fv (sc-Fv) oder ein funktionelles Fragment davon, wobei der sc-TCR oder das funktionelle Fragment davon ein spezielles Peptid, gebunden an (geladen auf ein) einen MHC (HLA), bindet und der Einzelketten-Antikörper oder das funktionelle Fragment davon ein Antigen bindet, wobei das Verfahren umfasst:

- a) Einführen eines DNA-Vektors, der für ein einzelkettiges polyspezifisches Bindungsprotein von Interesse codiert, in eine Wirtszelle;
- b) Kultivieren der Wirtszelle in Medien unter Bedingungen, die ausreichend sind, um das einzelkettige polyspezifische Bindungsprotein in der Zelle oder in dem Medium zu exprimieren; und
- c) Aufreinigen des einzelkettigen polyspezifischen Bindungsproteins aus den Hybridomzellen oder Medien, bereitgestellt.

[0066] Weiterhin werden hierin Verfahren zum Herstellen mehrkettiger polyspezifischer Bindungsproteine, die mindestens einen sc-TCR oder ein funktionelles Fragment davon und eine Antikörperbindungsdomäne oder ein funktionelles Fragment davon umfassen, beschrieben. In einer Ausführungsform des Verfahrens ist die Antikörperbindungsdomäne ein F(v). Insbesondere wird eine Zelle oder ein Zellextrakt verwendet, um mindestens einen Teil des mehrkettigen Bindungsproteins zu bilden. Spezieller wird eine Antikörper-produzierende Zelle, wie z.B. eine Hybridomzelle, eingesetzt. In einer Ausführungsform schließt das Verfahren mindestens einen und vorzugsweise alle der nachstehenden Stufen ein:

- Einführen eines DNA-Vektors, der für mindestens einen sc-TCR, vorzugsweise einen sc-TCR (oder ein funktionelles Fragment), der/das kovalent mit einer konstanten schweren Immunglobulinkette oder einem Fragment davon verknüpft ist, codiert, in eine Hybridomzelle,
- Kultivieren der Hybridomzelle in Medien unter Bedingungen, die zur Bildung eines spezifischen Bindungskomplexes zwischen der konstanten schweren Immunglobulinkette oder dem Fragment, codiert durch den DNA-Vektor, und Immunglobulinketten, die durch das Hybridom produziert werden, führen; und
- Aufreinigen des mehrkettigen polyspezifischen Bindungsproteins aus den Hybridomzellen oder den Medien.

[0067] In einer spezifischeren Ausführungsform stellt das Verfahren ein mehrkettiges polyspezifisches Bindungsprotein bereit, das eine variable leichte Immunglobulinkette, kovalent verknüpft mit dem sc-TCR, einschließt, d.h. ein bispezifisches Bindungsprotein bereit.

[0068] Die vorliegende Beschreibung stellt weitere Verfahren zur Herstellung der mehrkettigen polyspezifischen Bindungsproteine bereit. Beispielsweise wird in einer Ausführungsform jede Kette eines gewünschten Bindungsproteins unabhängig hergestellt, z.B. mittels DNA-Rekombinations- oder chemischer Verfahren. Vorzugsweise schließt das Bindungsprotein ferner mindestens ein Verbindungsstück, vorzugsweise zwei Verbindungsstücke, die gleich oder verschieden sind, ein. In einer speziellen Ausführungsform schließt das Verfahren mindestens eine und vorzugsweise alle der nachstehenden Stufen ein:

- Bereitstellen einer ersten Sequenz, die mindestens einen sc-TCR oder ein funktionelles Fragment davon in kovalenter Verknüpfung mit einem ersten Verbindungsstück einschließt,
- Inkontaktbringen der ersten Sequenz mit einer zweiten Sequenz, die mindestens ein sc-Fv oder ein funktionelles Fragment davon, verknüpft mit einem zweiten Verbindungsstück, einschließt, wobei das Inkontaktbringen unter Bedingungen erfolgt, die dazu hinreichen, einen spezifischen Bindungskomplex zwischen dem ersten und zweiten Verbindungsstück zu bilden; und
- Bilden des mehrkettigen polyspezifischen Bindungsproteins. Vorzugsweise ist das mehrkettige polyspezifische Bindungsprotein bispezifisch. Spezifischere DNA-Rekombinations- und chemische Verfahren zur Herstellung der mehrkettigen polyspezifischen Bindungsproteine sind nachstehend offenbart.

[0069] Wie diskutiert, finden die vorliegenden polyspezifischen Bindungsproteine auch bedeutende Anwendungen in vivo, Beispielsweise können die Bindungsproteine dazu verwendet werden, die Spezifität bestimmter Immunzellen umzuleiten, z.B. um Zielzellen, wie z.B. virusinfizierte oder Tumorzellen zu eliminieren. In manchen Fällen können die Tumorzellen auch virusinfiziert sein. Wie diskutiert, kann eine bevorzugte Verwendung der vorliegenden Bindungsstücke den Schaden an oder die Eliminierung von Zielzellen erhöhen. Demgemäß kann die vorliegende Erfindung in vivo verwendet werden, um Zielzellen abzutöten, indem die Immunsystemaktivierung gegen diese Zielzellen verstärkt wird. Eine bevorzugte in vivo-Verwendung der vorliegenden polyspezifischen Bindungsstücke schließt eine Verwendung in einem Säuger, wie z.B. einem Nager, Primaten oder domestizierten Tier, und insbesondere in einem menschlichen Patienten, ein.

[0070] Demgemäß werden unter einem Gesichtspunkt Mittel zur Schädigung oder vorzugsweise Abtötung einer Zielzelle, umfassend einen MHC oder HLA von Interesse, bereitgestellt. In einer Ausführungsform schließt dies mindestens eine und vorzugsweise alle der nachstehenden Stufen ein:

- Inkontaktbringen einer Vielzahl von Zellen mit einem polyspezifischen Bindungsprotein, wobei die Vielzahl von Zellen Immunzellen, umfassend ein Antigen, und Zielzellen, umfassend den MHC oder das HLA, umfasst,
- Bildung eines spezifischen Bindungskomplexes (Brücke) zwischen dem MHC oder HLA auf den Zielzellen und dem Antigen auf den Immunzellen, der dazu ausreicht, die Immunzellen zu aktivieren; und
- Abtöten der Zielzellen mit den aktivierten Immunzellen. Es wird verstanden werden, dass mit dem Begriff "aktiviert" gemeint ist, dass die Immunzellen dazu fähig sind, die Zielzelle, wie z.B. mittels Zytokin- und Zytotoxizitätsassays, die nachstehend beschrieben sind, bestimmt, zu schädigen oder abzutöten.

[0071] Sofern gewünscht, kann das oben stehend beschriebene Verfahren in vitro, z.B. in einer Zellkulturschale, durchgeführt werden.

[0072] Die einzel- und mehrkettigen polyspezifischen Bindungsproteine finden weitere Verwendungen in vitro und in vivo.

[0073] Beispielsweise können bevorzugte polyspezifische Bindungsmoleküle in vitro oder in vivo zum Detektieren und vorzugsweise Bilden einer Brücke zwischen Zielzellen und Immunzellen verwendet werden. Die Bildung der Brücke kann dazu verwendet werden, Zellen, die einen gewünschten MHC, HLA oder gewünschte Antigenmarker exprimieren, zu isolieren.

[0074] Die vorliegenden polyspezifischen Bindungsproteine finden auch eine Verwendung bei der Detektion und Analyse von MHC- oder HLA-Molekülen und Zelloberflächenantigenen. Die vorliegenden Bindungsproteine können auch für diagnostische Zwecke, wie z.B. zur Detektion von Immunsystemzellen und insbesondere T-Zellen mit pathogenen Eigenschaften verwendet werden. Die vorliegenden Bindungsmoleküle können darüber hinaus in funktionellen, zellulären und molekularen Assays und in der Strukturanalyse, einschließlich Röntgenkristallographie, kernmagnetischer Resonanzbildgebung, Berechnungstechniken, wie z.B. Computergrafikdarstellung, eingesetzt werden.

[0075] Unter einem anderen Aspekt stellt die Erfindung ferner Behandlungsmittel zum Verringern oder Eliminieren des Vorhandenseins von Zielzellen in einem Säuger bereit. Insbesondere schließen die Verwendungen die Verabreichung eines polyspezifischen Bindungsproteins dieser Erfindung in einer pharmazeutisch verträglichen bzw. annehmbaren Formulierung ein. Sofern gewünscht, kann der sc-TCR- oder sc-Ab-Anteil von bestimmten polyspezifischen Bindungsmolekülen vor oder während der Verabreichung entfernt werden, um ein spezifisches Behandlungsverfahren zu vereinfachen bzw. zu erleichtern.

[0076] In einer spezielleren Ausführungsform kann die Behandlung von Krebs und einer Virusinfektion erfolgen. Insbesondere schließen die Verwendungen die Verabreichung einer therapeutisch wirksamen Menge mindestens eines polyspezifischen Bindungsproteins dieser Erfindung an einen Säuger, und insbesondere einen menschlichen Patienten an. Vorzugsweise ist die Menge hinreichend, um den Krebs und/oder die Virusinfektion zu behandeln. Die Erfindung kann dazu verwendet werden, einen bestehenden Zustand zu behandeln oder sie kann prophylaktisch nach Bedarf verwendet werden. Die vorliegenden Behandlungen können alleine oder in Kombination mit anderen Therapien verwendet werden, sofern gewünscht.

[0077] Bevorzugte Behandlungen verringern oder eliminieren das Vorhandensein von spezifischen Zielzellen in einem Säuger, insbesondere einem Nager oder einem Primaten, wie z.B. einem Menschen. In einer Ausführungsform schließen die Behandlungen das Erhalten eines sc-TCR oder sc-Ab aus dem polyspezifischen Bindungsmolekül (z.B. mittels Proteasebehandlung) ein. Der so erhaltene sc-TCR oder sc-Ab kann dem Säuger anstelle des oder in Verbindung mit dem polyspezifischen Bindungsmolekül verabreicht werden. Für die meisten Anwendungen, die mit einer Tierverwendung zusammenhängen, wird es bevorzugt sein, unerwünschte Immunreaktionen gegen die vorliegenden Bindungsmoleküle zu minimieren, z.B. indem Immunglobulinketten eines mit dem verwendeten Tier-kompatiblen Haplotypen verwendet werden.

KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0078] Die [Fig. 1A](#)-[Fig. 1D](#) sind Zeichnungen, die DNA-Konstrukte für einzelkettige T-Zell-Rezeptoren (sc-TCR) und einzelkettige Fv (sc-Fv) zeigen. [\(Fig. 1A\)](#) DO11.10-sc-TCR-Konstrukt, [\(Fig. 1B\)](#) p149-sc-TCR-Konstrukt, [\(Fig. 1C\)](#) 145-2C11-sc-Fv-, [\(Fig. 1D\)](#) F23.1-sc-Fv-DNA-Konstrukt.

[0079] Die [Fig. 2A](#)-[Fig. 2E](#) sind Zeichnungen, die sc-TCR-Inserts zahlreicher Vektoren zeigen: [\(Fig. 2A\)](#) pSun22; [\(Fig. 2B\)](#) pSun23; [\(Fig. 2C\)](#) pSun21; [\(Fig. 2D\)](#) pSun19 und [\(Fig. 2E\)](#) pSun20.

[0080] [Fig. 3](#) ist eine schematische Darstellung des pSUN23-Vektors.

[0081] [Fig. 4](#) ist eine schematische Darstellung des pNAG2-Vektors.

[0082] [Fig. 5](#) ist eine schematische Darstellung des pSUN27-Vektors.

[0083] [Fig. 6](#) ist eine Zeichnung, die die bevorzugten bispezifischen Hybridmoleküle pBISP/DO11.10 und pBISP/149 zeigt.

[0084] [Fig. 7A](#) ist eine schematische Zeichnung, die ein Verfahren zur Herstellung eines chimären bispezifischen Antikörpermoleküls zeigt. Das Verfahren verwendet eine Hybridomexprimierende Zellen (145-2C11-Hy-

bridom) zum Produzieren von Antikörperketten (schwere Reihen), die mit einem sc-TCR/Ig-Fusionsmolekül (leichte Kette) in der Zelle kombinieren. Eine bevorzugte Struktur für das sc-TCR/Ig-Molekül ist in [Fig. 7B](#) dargestellt.

[0085] [Fig. 8](#) ist eine Zeichnung, die den Vektor pSUN7-Vektor zeigt.

[0086] Die [Fig. 9A](#)-[Fig. 9B](#) sind Diagramme, die Ergebnisse von ELISA-Assays, die zum Detektieren des BISP/149-Fusionsproteins verwendet wurden, zeigen. Die verwendeten Antikörper waren ([Fig. 9A](#)) α EE (Fang Ab) und α V α 2 (B20.1, Sonden-Ab), ([Fig. 9B](#)) α V β 11 (RR3-15, Fang Ab). RR3-15 ist ein monoklonaler Antikörper, der für die α V β 11-Kette spezifisch ist. B20.1 ist ein monoklonaler Antikörper, der für die α V α 2-Kette spezifisch ist. Der Sonden-Ab ist in [Fig. 9B](#) auf der x-Achse.

[0087] Die [Fig. 10A](#)-[Fig. 10B](#) sind Diagramme, die Ergebnisse von ELISA-Assays, die zum Detektieren des BISP/DO11.10-Fusionsproteins verwendet wurden, zeigen. Die verwendeten Antikörper waren ([Fig. 10A](#)) F23.1 (Sonden-Ab) oder ([Fig. 10B](#)) H57-597 (Sonden-Ab). In den [Fig. 9A](#) und [Fig. 9B](#) ist der Fang-Ab auf der x-Achse.

[0088] [Fig. 11](#) ist ein Diagramm, das Ergebnisse von ELISA-Assays, die zum Detektieren chimärer bispezifischer Moleküle verwendet wurden, zeigt. Der Fang-Ab ist Ziege-Anti-Maus-IgG2b (x-Achse). Der Sonden-Ab ist Ziege-Anti-Hamster-IgG.

[0089] [Fig. 12](#) ist eine Wiedergabe eines Western-Blots, der die Expression der bispezifischen Hybridmoleküle BISP/DO11.10 und BISP/p149 zeigt. Reduzierte Formen der Proteine sind auch gezeigt (Pfeil).

[0090] [Fig. 13](#) ist eine Wiedergabe eines SDS-Gels, das mit Coomassie-Blau gefärbt wurde. Das Gel zeigt die Expression der bispezifischen Hybridmoleküle BISP/DO11.10 und BISP/p149. Reduzierte Formen der Proteine sind auch gezeigt (Pfeil).

[0091] [Fig. 14](#) ist ein Diagramm, das IL-2-Level, exprimiert durch T-Hybridomzellen, als Funktion des monoklonalen Antikörpers KJ-1 zeigt.

[0092] [Fig. 15](#) ist ein Diagramm, das IL-2, exprimiert durch T-Hybridomzellen, als eine Funktion von BISP- oder BPSP plus MR-5-Antikörper-Zugabe zeigt.

[0093] [Fig. 16](#) ist ein Diagramm, das IL-2-Expression von T-Hybridomzellen als Funktion der Zugabe von monoklonalem Antikörper zeigt.

[0094] [Fig. 17](#) ist ein Diagramm, das durch Durchflusszytometrie die Bindung von pBisp149-Zellen an 2B4-T-Zellen zeigt.

[0095] [Fig. 18](#) ist ein Diagramm, das durch Durchflusszytometrie die Bindung des gereinigten Proteins pBISP/DO11.10 zwischen 2B4-Zellen T-Zellen zeigt.

[0096] [Fig. 19](#) ist ein Diagramm, das Durchflusszytometrie-Bindungsstudien zwischen löslichem α -CD3 und gereinigtem Protein pBISP/149 zeigt.

[0097] [Fig. 20](#) ist ein Diagramm, das die Ergebnisse eines T-Zell-Proliferationsassays zeigt. BALG/c-Splenozyten wurden mit rIL-2 vorstimuliert und in Abwesenheit oder unter Vorhandensein von 10 μ g/Well angereichertem scBisp-149-Molekül mit ungepulsten Zielzellen (T2) oder p149-Peptid-gepulsten T2-Zellen inkubiert.

[0098] Die [Fig. 21A](#) und [Fig. 21B](#) sind Zeichnungen, die spezifische Oligonucleotidprimer (SEQ ID NOs: 16-43) zeigen.

DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0099] Die vorliegende Erfindung ist wie in den Ansprüchen spezifiziert. Wie oben stehend zusammengefasst, betrifft die Erfindung unter einem Aspekt einzelkettige polyspezifische Bindungsproteine und Verfahren zur Herstellung der Proteine und ihre Verwendung. Die bevorzugte Verwendung der vorliegenden Bindungs-moleküle schließt das Schädigen oder Eliminieren (Abtöten) MIC-exprimierender Zielzellen in vitro oder in vivo ein. Ferner beschrieben sind hochgradig nützliche rekombinante Bakteriophagen und Verfahren zur Verwen-

dung dieser, die zum Selektieren auf gewünschte Bindungsmoleküle verwendet werden können.

[0100] Wie hierin verwendet, bedeutet der Begriff "polyspezifisches Bindungsprotein" oder ein ähnlicher Ausdruck ein einzelkettiges oder mehrkettiges Molekül, das bevorzugt einschließt 1) eine Bindungsdomäne, die zur Bindung eines MHC- oder HLA-Komplexes, vorzugsweise eines Zellziels, das ein(en) pMHC oder pHMA (oder einen Teil davon) exprimiert, fähig ist, und 2) eine Antikörperbindungsdomäne, die zur Bindung eines Antigenziels, vorzugsweise eines Antigen- oder Epitopeils davon, das/der auf der Oberfläche einer Immunzelle exprimiert wird, fähig ist. Vorzugsweise ist der pMHC- oder pHMA-Teil dazu fähig, spezifisch durch einen TCR gebunden zu werden, und der Antigenteil ist dazu fähig, spezifisch durch einen Antikörper gebunden zu werden. In bevorzugten Ausführungsformen ist das Antigen ein Zelloberflächenantigen, das für die Immunzelle bezeichnend ist. In zusätzlich bevorzugten Ausführungsformen ist jede der Bindungsdomänen hinreichend zum Binden des pMHCs oder pHAs und der Antigenziele zu wechselnden Zeiten oder zur gleichen Zeit. Wie hierin diskutiert, können die Bindungsdomänen auf der gleichen Kette vorliegen (d.h. auf einer Einzelkette), oder die Bindungsdomänen können auf mehr als einer Kette vorliegen (d.h. auf einer Mehrfachkette, und insbesondere von etwa 2 bis 4 Ketten, wobei 2 Ketten bevorzugt sind).

[0101] Mit dem Begriff "Antikörperbindungsdomäne" ist eine Antikörperbindungsstelle gemeint, die mindestens ein und vorzugsweise zwei variable Immunglobulinketten umfasst, die zur spezifischen Bindung des Antigens oder Epitops davon fähig sind. Beispielsweise ist in einer bevorzugten Ausführungsform die Antikörperbindungsdomäne ein einzelkettiges Konstrukt (sc-Ab) und schließt eine einzelne variable Immunglobulinregion (V_L oder V_H); zwei oder mehr variable Regionen ($V_L + V_H$; $V_L + V_L$; oder $V_H + V_H$); oder die Antigenerkennungsstellen bzw. "complementary determining regions" davon ein. Ein spezielleres Beispiel für eine geeignete sc-Ab-Antikörperbindungsdomäne ist ein sc-Fv-Molekül. In einer weiteren Ausführungsform schließt die Antikörperbindungsdomäne ferner eine konstante leichte Immunglobulinkette ($Ig-C_L$) und/oder eine schwere Immunglobulinkette ($Ig-C_H$) ein. Bevorzugte Beispiele schließen Fab-, F(v)-, Fab'- und F(ab')2-Moleküle ein, sind aber nicht darauf beschränkt. Spezifischere Antikörperbindungsdomänen werden nachstehend diskutiert.

[0102] In einer spezielleren Ausführungsform ist das polyspezifische Bindungsprotein ein einzelkettiges Konstrukt, das mindestens einen sc-TCR (oder ein funktionelles Fragment) und mindestens einen sc-Ab und insbesondere ein sc-Fv (oder ein funktionelles Fragment) einschließt. Das einzelkettige polyspezifische Bindungsprotein kann von etwa 1 bis 5 sc-TCR-Moleküle und/oder von etwa 1 bis 5 sc-Fv-Moleküle einschließen, wobei ein sc-TCR und ein sc-Fv im Allgemeinen für die meisten Anwendungen bevorzugt sind. In Ausführungsformen, in denen das Bindungsprotein mindestens einen sc-TCR oder ein sc-Fv einschließt, können die Moleküle als Tandem verknüpft sein und sind vorzugsweise von einander durch geeignete Peptidlinkersequenzen getrennt.

[0103] Speziellere polyspezifische Bindungsmoleküle dieser Erfindung sind bispezifische Bindungsmoleküle und schließen ein sc-TCR- und ein sc-Ab- und insbesondere ein sc-Fv-Molekül ein. In dieser Ausführungsform sind der sc-TCR und das sc-Fv durch eine geeignete Peptidlinkersequenz getrennt.

[0104] Im Allgemeinen schließen die vorliegenden polyspezifischen Bindungsproteine vorherbestimmte Bindungsspezifitäten ein. Das heißt, die Wahl eines bestimmten sc-TCR oder einer bestimmten Antikörperbindungsdomäne wird durch anerkannte Parameter, wie z.B. die beabsichtigte Verwendung und die Zielzellen und Immunzellen von Interesse gelenkt. In den meisten Fällen werden die Bindungsspezifitäten unterschiedlich sein, wie durch die nachstehend beschriebenen spezifischen Bindungassays bestimmt. Jedoch wird es in manchen Ausführungsformen nützlich sein, Bindungsdomänen mit den gleichen oder eng verwandten Bindungsspezifitäten zu selektieren. Verfahren zum Selektieren gewünschter Bindungsdomänen und zum Auswählen geeigneter sc-TCR- und sc-Ab-Moleküle werden nachstehend beschrieben.

[0105] Wie diskutiert, schließen die polyspezifischen Bindungsproteine in einer Ausführungsform einen sc-TCR oder ein funktionelles Fragment davon ein, der/das pMHC- oder pHMA-exprimierende Zielzellen bindet. In einer spezielleren Ausführungsform wird der sc-TCR zum spezifischen Binden eines Klasse I- oder Klasse II-pMHC-Moleküls (oder eines pHMA-Antigens) auf der Zielzelle gewählt.

[0106] Wie hierin verwendet, meint der Begriff "funktionelles Fragment" eines sc-TCRs einen Teil eines Vollängen-sc-TCR (d.h., Vollängen-V-Ketten umfassend), der dazu fähig ist, mindestens etwa 70% und bevorzugt mindestens etwa 80%, 90%, 95% bis zu 100% oder mehr eines MHC oder HLA im Vergleich zu einem Vollängen-sc-TCR spezifisch zu binden. Ein Vollängen-sc-TCR ist als ein Molekül mit einer Vollängen-V- α und -V- β -Kette definiert. Assays zum Detektieren einer spezifischen Bindung werden nachstehend diskutiert und schließen Durchflusszytometrie und BiaCore ein.

[0107] Wie zuvor erwähnt, schließt der sc-TCR TCR-V- α - und -V- β -Ketten ein, die kovalent durch eine geeignete Peptidlinkersequenz verknüpft sind. Beispielsweise kann die V- α -Kette mit der V- β -Kette kovalent durch eine geeignete Peptidlinkersequenz, fusioniert mit dem C-Terminus der V- α -Kette und dem N-Terminus der V- β -Kette, verknüpft sein. Die V- α - und V- β -Ketten des sc-TCR-Fusionsproteins werden durch Nucleinsäuren codiert, die im Allgemeinen etwa 200 bis 400 Nucleotide lang, vorzugsweise etwa 300 bis 350 Nucleotide lang sind, und die zu mindestens 90% identisch und vorzugsweise 100% identisch mit den V- α - und V- β -Ketten eines natürlich vorkommenden TCRs sein werden. Mit dem Begriff "identisch" ist gemeint, dass die Aminosäuren der V- α - oder V- β -Kette zu 100% mit den entsprechenden natürlich vorkommenden TCR-V- β - oder -V- α -Ketten homolog sind. Siehe die nachstehenden Beispiele 1-3 und die anhängigen US-Anmeldungen Aktenzeichen 08/813,981 und 08/943,086 für eine spezifischere Offenbarung in Bezug auf sc-TCR-V-Ketten.

[0108] Wie zuvor erwähnt, kann die V- α -Kette des sc-TCR-Moleküls ferner eine TCR-C- β -Kette oder ein Fragment davon, fusioniert mit dem C-Terminus der V- β -Kette, einschließen. Ferner kann die V- α -Kette eine TCR-C- α -Kette oder ein Fragment davon, fusioniert mit dem C-Terminus der V- α -Kette und dem N-Terminus der Peptidlinkersequenz, einschließen. In jenen sc-TCR-Fusionsproteinen, die ein C- β -Kettenfragment einschließen, wird das Fragment im Allgemeinen eine Länge von näherungsweise 50 bis 126 Aminosäuren aufweisen und wird üblicherweise den letzten Cysteinrest an Position 127 nicht einschließen. Für jene Fusionsproteine, die eine C- α -Kette einschließen, kann die Länge zwischen näherungsweise 1 bis 90 Aminosäuren (d.h. die C- α -Kette bis zum, aber nicht einschließlich des, letzten Cysteins) variieren. Beispielsweise schließt in einer Ausführungsform das Fusionsprotein ein C- α -Kettenfragment von etwa 1 bis 72 Aminosäuren, ausgehend von Aminosäure 1 bis 72 ein. In einer weiteren Ausführungsform ist das C- α -Kettenfragment von etwa 1 bis 22 Aminosäuren, ausgehend von der ersten Aminosäure bis 22 (Leucin). Das C- α -Kettenfragment schließt typischerweise keinerlei Cysteinreste ein, abgesehen von der C_{α90}-Variante, die zwei cys-Reste einschließt. In den meisten Fällen wird die Auswahl der C α - und C β -Kettenlänge von mehreren Parametern, einschließlich der ausgewählten speziellen V-Ketten und der beabsichtigten Verwendung des speziellen polyspezifischen Bindungsproteins, gelenkt. Siehe die nachstehende Diskussion und die Beispiele 1-2 unten für eine spezifischere Offenbarung in Bezug auf sc-TCR-C- β - und -C- α -Ketten.

[0109] Es ist möglich, die Expression vollständig löslicher und funktioneller sc-TCR-Fusionsproteine durch Hinzufügung einer Ig-C_L-Kette oder eines geeigneten Ig-C_L-Fragments davon zu erleichtern. Spezifischer ist die Ig-C_L-Kette oder das Kettenfragment mit dem sc-TCR-Molekül kovalent verknüpft, z.B. mit dem C-Terminus der V- β -Kette oder des C- β -Fragments. Obwohl es typischerweise nicht bevorzugt ist, ist es möglich, die Ig-C_L oder das Fragment davon mit dem N-Terminus der V- α -Kette kovalent zu verknüpfen. Sofern gewünscht, kann die Ig-C_L-Kette vor dem Einbau in ein polyspezifisches Bindungsmolekül entfernt werden.

[0110] Wie oben stehend diskutiert, kann der sc-TCR eines polyspezifischen Bindungsproteins in einer Vielfalt geeigneter Formate bereitgestellt werden. Beispielsweise kann der sc-TCR mit z.B. zwei Peptidlinkersequenzen bereitgestellt werden, wobei die erste Peptidlinkersequenz zwischen dem C-Terminus der V- α -Kette und dem N-Terminus der V- β -Kette fusioniert ist. Der C-Terminus der V- β -Kette kann mit dem N-Terminus eines C- β -Kettenfragments fusioniert werden, sofern gewünscht. Der zweite Peptidlinker wird dann mit dem C-Terminus der V- β -Kette oder des C- β -Kettenfragments und dem N-Terminus z.B. eines Effektors oder eines Protein-Tags fusioniert.

[0111] In anderen illustrativen Ausführungsformen schließt der sc-TCR des polyspezifischen Bindungsmoleküls eine V- β -Kette, fusioniert mit der V- α -Kette durch einen geeigneten Peptidlinker, in welchem der C-Terminus der V- β -Kette oder des C- β -Kettenfragments davon und der N-Terminus der V- α -Kette kovalent verknüpft sind, ein.

[0112] Die zuvor genannten sc-TCR-Moleküle werden ferner mit einer Peptidlinkersequenz fusioniert, wobei die Sequenz typischerweise ferner kovalent verknüpft ist mit einer Antikörperbindungsdomäne von Interesse. Bevorzugte einzelkettige polyspezifische Bindungsproteine schließen, kovalent in Sequenz verknüpft, einen sc-TCR, eine Peptidlinkersequenz und einen sc-Ab, wie z.B. ein sc-Fv, ein.

[0113] Es ist möglich, eine Vielfalt von sc-TCR-Molekülen herzustellen und zu verwenden. Insbesondere ist es im Allgemeinen bevorzugt, dass der sc-TCR V α , β -Ketten einschließt, für die eine codierende Sequenz voller Länge oder im Wesentlichen voller Länge einfach verfügbar ist. Verfahren zum Erhalten von Volllängen-TCR-V-Kettensequenzen aus Zellquellen sind gut bekannt. Alternativ können die V α , β -Kettenregionen mittels PCR-Amplifikation öffentlich verfügbarer V α , β -Ketten erhalten werden. Beispielhafte V β -Gensequenzen schließen die V β 8.1-, V β 6.1-, V β 5.1-, V β 5.2-, V β 5.3-, V β 2.1- und V β 2.3-Gensequenzen ein. Siehe Abe et al. (1992) PNAS (USA) 89: 4066; Wang et al., (1993); PNAS (USA) 90: 188; Lahesma et al. (1993), J. Immuno-

nol., 150: 4125; Kotzin et al., (1991), PNAS (USA) 88: 9161; Uematsu et al. (1991) PNAS (USA) 88: 8534. Siehe auch Kabat, E.A. et al. (1991), Sequences of Proteins of Immunological Interest, (5. Ausgabe), Public Health Science, NIH, und Chotia, C. et al. (1988), EMBO J., 7:3745 für weitere TCR-V- β -, Va-Kettensequenzen.

[0114] Zusätzlich stellen die nachstehenden Beispiele 1-3 Oligonucleotidprimer zur PCR-Amplifikation spezifischer V- α - und V- β -Ketten bereit. Siehe auch die [Fig. 21A](#)-[Fig. 21B](#) für Beispiele von Oligonucleotidprimern, die zum Isolieren der TCR-V-Ketten verwendet werden können.

[0115] In Fällen, in denen gewünscht ist, TCR-V-Ketten aus einer biologischen Quelle zu erhalten, kann ein gewünschter TCR mittels herkömmlicher immunologischer Verfahren, einschließlich der Verwendung TCR-spezifischer Antikörper, die ein Epitop der TCR-V-Region vorwiegend binden und vorzugsweise dafür spezifisch sind, identifiziert werden. Typischerweise kann eine Oberflächenexpression unter Anwendung bekannter Techniken, wie z.B. Fluoreszenzmikroskopie, Durchflusszytometrie oder Immunchemie, detektiert werden. Eine Anzahl von Antikörpern, die spezifisch variable TCR-Regionen binden, ist bekannt. Siehe auch die veröffentlichte PCT-Anmeldung WO 90/06758.

[0116] Die DNA oder RNA des detektierten TCR kann direkt, oder vorzugsweise nach einer PCR-Amplifikation, mittels spezifischer Hybridisierung mit Oligonucleotidsonden für die verschiedenen TCR-Genfamilien unter Verwendung von Hybridisierungsverfahren, die im Fachgebiet gut bekannt sind, untersucht werden. Im Allgemeinen werden hoch stringente Nucleinsäure-Hybridisierungsbedingungen durchgeführt. Wie hierin verwendet, bedeutet der Begriff "hoch stringente Hybridisierung" Nucleinsäureinkubationsbedingungen von näherungsweise 65°C in 0,1 × SSC. Sie Sambrook, et al., *infra*. Die TCR-DNA-Sequenz oder der gewünschte Teil davon können direkt aus der amplifizierten DNA oder RNA erhalten werden und können, wie gewünscht, in einen geeigneten Vektor subkloniert werden.

[0117] Andere Verfahren zum Erhalten von TCR-V-Region-DNA sind bekannt. Beispielsweise kann ein gewünschter TCR, umfassend V-Region-Gene, durch Sequenzieren des TCR oder vorzugsweise eines Teils davon, der der V-Region entspricht, identifiziert werden. Die DNA-Sequenz kann bestimmt werden, z.B. nach Klonieren der DNA in einen geeigneten Sequenzierungsvektor, wie sie im Fachgebiet bekannt sind, oder indem zuerst die Proteinsequenz von wenigstens einem Teil des TCR bestimmt und die DNA-Sequenz bestimmt wird. Es wird für Fachleute auf dem Gebiet leicht offensichtlich sein, dass die oben genannten Manipulationen, so wie andere, die dem Fachmann bekannt sind, eingesetzt werden können, um einen gewünschten TCR erfolgreich zu identifizieren, und um die V-Region-Gene aus diesem TCR zu erhalten, so dass ein einzelkettiges Va β -Konstrukt hergestellt werden kann.

[0118] Spezifischer kann, wenn es gewünscht ist, eine TCR-V-Region-DNA aus einer biologischen Quelle zu erhalten, ein DNA-Segment, das für die gewünschte V- α - und V- β -Kette codiert, aus Zellen, wie z.B. T-Zell-Hybridomen oder zytotoxischen T-Zellen (CTLs), erhalten werden. Die T-Zellen (z.B. T_S-, T_C- oder T_H-Zellen) können in vivo erhalten werden, oder die T-Zellen können (ein) kultivierte(s) T-Zell-Hybridom(e) sein (z.B. D10- oder B12-Zelllinien). Siehe die nachstehenden Beispiele 1-3. CTLs können nicht-induziert sein oder sie können mit einer pathogenen Immunsystemreaktion in einem Nager (z.B. Maus, Ratte, Kaninchen) oder einem Primaten (z.B. Mensch oder Schimpanse) assoziiert sein. Beispielsweise können CTLs oder andere T-Zellen aus Patienten stammen, die an Lyme-Krankheit, Kawasaki-Krankheit, Lepra, Krebs (d.h. Immunreaktionen gegen Tumor-assozierte Antigene, wie z.B. CEA) oder einer Autoimmunerkrankung, insbesondere jene, die mit Transplantationsabstoßung, multipler Sklerose, Insulin-abhängigem Diabetes, rheumatoider Arthritis und Allergien assoziiert sind; oder einer Infektionskrankheit, insbesondere einer Infektionskrankheit unter Beteiligung eines RNA- oder DNA-Virus, leiden oder im Verdacht stehen, diese zu haben. Besondere Viren von Interesse schließen die humanen Immundefizienzviren (HIV), Zytomegalovirus (CMV), Influenza, Hepatitis, Pockenvirus, Epstein-Barr, Adenovirus oder Polyoma-Viren ein. Beispielhafte Quellen für CTLs sind Antigen-spezifische CTLs und TILs, isoliert aus Patienten mit etablierten Karzinomen und Melanomen (siehe z.B. Cox, A. et al., *Science* (1994) 264: 716; Rosenberg, S.A. et al., *N. Eng. J. Med.* (1988) 319: 1676; Kawakami, Y. et al., *J. Exp. Med.* (1994) 180: 347; Kawakami, Y. et al., *PNAS* (1994) 91:6458).

[0119] Wie zuvor hinsichtlich des Erhaltens von V- α - und V- β -Ketten aus Zellquellen erwähnt, können mehrere alternative Verfahrensweisen zum Präparieren von Nucleinsäuren, die daraus isoliert wurden, verwendet werden. Spezieller wird zum Präparieren von V- α - und V- β -Ketten-DNA mRNA aus jenen Zellen isoliert, die eine gewünschte TCR-Bindungsspezifität zeigen. Derartige Verfahren schließen im Allgemeinen die Verwendung eines geeigneten PCR-Protokolls unter Verwendung einer Erststrang-cDNA-Matrize, hergestellt aus der mRNA, ein. Standard-Rekombinationstechniken können dann eingesetzt werden, um die gewünschten α - und β -Ketten herzustellen. Der DNA-Abschnitt, der für die gewünschten V- α - und V- β -Ketten codiert, wird dann so

modifiziert, dass er eine geeignete Peptidlinkersequenz und (ein) Protein-Tag(s) einschließt, sofern gewünscht.

[0120] Im Allgemeinen wird ein DNA-Oligonucleotidprimer zur Verwendung in dem PCR-Verfahren etwa 12 bis 50 Nucleotide lang, vorzugsweise etwa 20-25 Nucleotide lang sein. Die PCR-Oligonucleotidprimer können geeigneterweise Restriktionsstellen zum Hinzufügen spezifischer Restriktionsenzym-Spaltstellen zu dem PCR-Produkt nach Bedarf einschließen, z.B., um eine Ligationsstelle einzuführen. Beispielhafte Primer werden in den nachstehenden Beispielen und Zeichnungen bereitgestellt. Die hergestellten PCR-Produkte werden amplifizierte V- α - und V- β -Kettensequenzen einschließen und können so modifiziert werden, dass sie, nach Wunsch, Ribosomenbindungs-, Leader- und Promotorsequenzen für eine optimale Expression des Fusionsproteins einschließen.

[0121] Ein für ein gewünschtes sc-TCR-Molekül codierender DNA-Abschnitt kann in signifikanten Mengen (Milligramm-Mengen pro Gramm Zellen) gemäß den nachstehend offenbarten Verfahren hergestellt werden.

[0122] Speziellere sc-TCRs, die zum Herstellen der vorliegenden polyspezifischen Bindungsproteine verwendet wurden, schließen jene sc-TCRs mit V- α - und V- β -Ketten, die von einem Säuger stammen bzw. hiervon abgeleitet sind, ein. Beispiele schließen Primaten, insbesondere Mensch und Schimpansen; Nager, z.B. immunologisch naive Mäuse, wie z.B. Nacktmäuse, oder Mäuse, die ein Transgen, das zum Exprimieren eines HLA-A2-Antigenkomplexes (Vitiello, A. et al., J. Exp. Med., (1991) 175, 1002) fähig ist, einschließen, ein. Spezielle Menschen von Interesse schließen jene ein, die an einer der vorstehend erwähnten Pathologien, wie z.B. einer Autoimmunerkrankung, leiden, ein. Chimäre Konstrukte, umfassen V- α und V- β -DNA-Sequenzen, die aus verschiedenen Säugern stammen, können gemäß bekannter Verfahren konstruiert werden und sind auch innerhalb des Umfangs der vorliegenden Erfindung.

[0123] Es ist bevorzugt, dass eine Peptidlinkersequenz, verwendet zum Herstellen des sc-TCRs, dazu fähig sein soll, die V- α und V- β -Ketten wirksam zum Bilden einer Ligandenbindungstasche zu positionieren. Der sc-TCR ist somit vorzugsweise zur spezifischen Bindung eines gewünschten Liganden, wie z.B. ein Superantigen oder Peptidantigen im Kontext eines MHC/HLA-Peptidkomplexes, oder ein kleines Molekül, fähig. In einigen Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung können die polyspezifischen Bindungsmoleküle dazu verwendet werden, mit natürlich vorkommenden TCRs auf der Oberfläche von T-Zellen zu konkurrieren. Mit "konkurrieren" ist gemeint, dass das lösliche Fusionsprotein dazu fähig ist, den Liganden in einem Ausmaß zu binden, das der spezifischen Bindungsaffinität des TCR für den gleichen Liganden gleich ist oder diese in manchen Fällen übertrifft. Beispielsweise kann, gemäß dem nachstehend beschriebenen Verfahren und der anhängigen US-Anmeldung Nr. 08/943,086 das sc-TCR-Fusionsprotein (oder das davon abgeleitete sc-TCR-Molekül) eine Bindungsaffinität aufweisen, die etwa gleich der oder bis zu näherungsweise 2- bis 10-fach höher als die des natürlich vorkommenden TCRs ist. Beispielhafte Bindungsassays sind hierin offenbart und schließen Standard-Western-Blottingassays und Oberflächenplasmonresonanzassays, nachstehend offenbart, ein.

[0124] Im Allgemeinen werden die hierin offenbarten Peptidlinkersequenzen (auf die manchmal als ein Poly-peptidlinker, Spacersequenz, Peptidlinker oder mit einem verwandten Begriff Bezug genommen wird) ausgewählt, um die Bindungswechselwirkungen zwischen einem speziellen polyspezifischen Bindungsmolekül und seinem Bindungsziel oder seinen Zielen zu maximieren. Beispielsweise wird eine für den sc-TCR geeignete Peptidlinkersequenz vorzugsweise so gewählt, dass der sc-TCR eine spezifische Bindungsstelle ausbildet, die der einer natürlich vorkommenden TCR-V- α - und -V- β -Kette ähnelt. Zusätzliche Peptidlinkersequenzen, wie z.B. jene, die zur Herstellung von sc-Ab-Molekülen verwendet werden, würden auch ausgewählt, um die Bindung an spezifische Antigene zu optimieren. In einzelkettigen Konstrukten werden Peptidlinkersequenzen, die den sc-TCR mit dem sc-Ab fusionieren, ausgewählt, wobei sie typischerweise die Wechselwirkung zwischen dem sc-TCR, dem sc-Ab und jeweiligen Zielen dieser Bindungseinheiten maximieren.

[0125] Spezieller positioniert die Peptidlinkersequenz, die die V α , β -Ketten des sc-TCR trennt, vorzugsweise die V-Ketten flexibel in einer Tasche, die zur spezifischen Bindung eines Liganden fähig ist. Bevorzugte Liganden in diesem Fall sind Antigene und insbesondere Peptidliganden, die im Kontext eines MHC präsentiert werden. Wie nachstehend in der folgenden Diskussion vollständiger erklärt werden wird, kann die Ligandenbindung an den sc-TCR dazu verwendet werden, die T-Zellaktivität zu modulieren, wie durch nachstehend beschriebene spezifische Assays bestimmt. Beispiele für derartige Assays schließen in vitro-Assays ein, die aufeinander folgende Stufen des Kultivierens von T-Zellen, die einen TCR exprimieren, Inkontaktbringen der T-Zellen mit dem sc-TCR-Protein (oder dem daraus erhaltenen sc-TCR) unter Bedingungen, die eine Bindung zwischen dem TCR und dem Liganden erlauben, und dann Bewerten, ob das lösliche Fusionsprotein zum Modulieren der Aktivität der T-Zellen fähig ist, umfassen.

[0126] In einer spezifischeren Ausführungsform umfasst die Polypeptidlinkersequenz etwa 7 bis 25 Aminosäuren, stärker bevorzugt etwa 10 bis 20 Aminosäuren, noch stärker bevorzugt etwa 12 bis 20 Aminosäuren. Die Linkersequenz ist typischerweise flexibel im Fusionsprotein angeordnet ("disposed"), um die V- α - und V- β -Ketten in einer Konfiguration zu positionieren, die eine spezifische Bindung eines gewünschten Liganden, wie z.B. ein Peptidantigen, bereitstellt. Der Linker umfasst vorzugsweise vorwiegend Aminosäuren mit kleinen Seitenketten, wie z.B. Glycin, Alanin und Serie, um eine optimale Flexibilität bereitzustellen. Vorzugsweise umfassen etwa 80 oder 90% oder mehr der Linkersequenz Glycin-, Alanin- oder Serinreste, insbesondere Glycin- und Serinreste. Vorzugsweise enthält die Linkersequenz keine Prolinreste, welche die Flexibilität beeinträchtigen bzw. inhibieren könnten. Die Linkersequenz ist geeigneterweise an den C-Terminus der V- α -Kette und den N-Terminus der V- β -Kette eines Fusionsproteins gebunden. Siehe die nachstehenden Beispiele 1-3 und 5 für eine Offenbarung betreffend die Herstellung und Verwendung spezifischer Peptidlinkersequenzen.

[0127] Spezifischer schließen geeignete Peptidlinkersequenzen gemäß der Erfindung etwa 5 bis 25 Aminosäuresequenzen, wie z.B. die (GGGGS)₄-Sequenz (d.h., Gly Gly Gly Gly Ser)₄ (SEQ ID NO: 1), ein. Vorzugsweise ist eine ausgewählte Peptidlinkersequenz kovalent verknüpft zwischen dem C-terminalen Rest der V- α -Kette und der ersten Aminosäure der V- β -Kette des sc-TCR. Etliche Polypeptidlinkersequenzen sind als annehmbar zur Verwendung beim Verbinden variabler Antikörperregionen offenbart worden (siehe M. Whitlow et al., Methods: A Companion to Methods in Enzymology, 2:97-105 (1991)). Viele dieser beschriebenen Peptidlinkersequenzen können zum Herstellen des sc-TCRs verwendet werden.

[0128] Alternativ können andere geeignete Linkersequenzen leicht auf empirische Weise identifiziert werden. Beispielsweise kann ein DNA-Vektor, der einen DNA-Abschnitt, codierend für ein Fusionsprotein, das die Linkersequenz einschließt, einschließt, kloniert und exprimiert werden, und das Fusionsmolekül kann untersucht werden, um zu bestimmen, ob das Molekül zur Antigenbindung fähig ist. Ein Beispielhafter Assay ist ein herkömmlicher Antigenbindungsassay, wie z.B. jene, die in Harlow und Lane, supra, offenbart sind. Alternativ kann das die Linkersequenz umfassend exprimierte Fusionsprotein auf eine Kapazität zum Modulieren der Aktivität einer T-Zelle, wie durch die hierin offenbarten Assays bestimmt, untersucht werden. Geeignete Größen und Sequenzen von Linkersequenzen können auch mittels herkömmlicher Computermodellierungstechniken, basierend auf der vorhergesagten Größe und Form des Fusionsproteins, bestimmt werden. Beispielhafte Peptidlinkersequenzen sind jene, die geeignete Restriktionsstellen (z.B. Xhol und Spel) an den Enden der Polypeptidlinkersequenz zwischen den V- α - und V- β -Ketten einschließen.

[0129] Obgleich sich die vorstehende Diskussion auf die Auswahl geeigneter sc-TCR-Peptidlinkersequenzen konzentriert hat, wird verstanden werden, dass ähnliche Betrachtungen verwendet werden können, um andere Peptidlinkersequenzen auszuwählen, die zur Herstellung der polyspezifischen Bindungsmoleküle dieser Erfindung verwendbar sind. Weitere Peptidlinkersequenzen schließen jene ein, die verwendet werden, um bestimmte Antikörperbindungsdomänen, und insbesondere den sc-Ab herzustellen, sowie Peptidlinkersequenzen, die dazu verwendet werden, den sc-Ab und den sc-TCR in einzelkettigen Konstrukten zu verbinden.

[0130] Insbesondere sind bevorzugte Peptidlinker zur Herstellung von sc-Ab-Molekülen, und insbesondere sc-Fv-Molekülen, üblicherweise in helikaler Struktur. Im Allgemeinen erleichtern derartige Peptidlinkersequenzen die korrekte Faltung des sc-Fv und können die Löslichkeit des sc-Fv und des polyspezifischen Bindungsproteins erhöhen. Stärker bevorzugte Peptidlinkersequenzen schließen etwa 5 bis 25 Aminosäuren und vorzugsweise etwa 10 bis 25 Aminosäuren ein. Eine spezifischere Offenbarung in Bezug auf geeignete sc-Fv-Peptidlinkersequenzen kann im US-Patent Nr. 5,637,481, erteilt an Ledbetter et al., dessen Offenbarung hierin durch Bezugnahme aufgenommen ist, gefunden werden.

[0131] Stärker bevorzugte sc-Fv-Peptidlinkersequenzen schließen die folgenden Peptidsequenzen ein: (G₄S)₃ (d.h. Gly Gly Gly Gly Ser)₃ (SEQ ID NO: 2) und (G₄SG₄APG₄5) (d.h. Gly Gly Gly Ser Ala Pro Gly Gly Gly Ser) (SEQ ID NO: 3). Siehe [Fig. 1A](#)-B und Beispiele 4, 5 unten.

[0132] Bevorzugte Peptidlinkersequenzen zum Verbinden des sc-TCR mit dem sc-Fv können die gleichen sein wie oder eng verwandt sein mit jenen Peptidlinkersequenzen, die zum Herstellen des sc-TCRs verwendet wurden. Stärker bevorzugt sind Peptidlinkersequenzen mit den folgenden Sequenzen: (G₄S)₄ (SEQ ID NO: 1) und VNAKTTAPSVPVSGSSGSG (SEQ ID NO: 4). Siehe auch [Fig. 6](#) und Beispiel 7 unten.

[0133] Der sc-TCR der vorliegenden Bindungsmoleküle kann wie oben sowie in den Beispielen, die folgen, diskutiert hergestellt werden. Im Allgemeinen kann DNA, codierend für eine gewünschte V- α - oder V- β -Kette, aus einer geeigneten Quelle, wie z.B. einer T-Zelle, T-Zelle-Hybridomlinie oder einer öffentlich verfügbaren V- α - und V- β -Kettensequenz erhalten werden, wie zuvor beschrieben. Die DNA kann mittels PCR, Klonierung

oder anderen geeigneten Mitteln amplifiziert werden. Beispielsweise kann DNA, codierend für eine gewünschte V- α -Kette, in einen geeigneten Vektor kloniert werden, gefolgt von der Klonierung von DNA, codierend für eine gewünschte V- β -Kette und eine geeignete einzelkettige Linkersequenz, um einen gewünschten sc-TCR herzustellen. Wie zuvor offenbart, wird der sc-TCR in manchen Fällen eine DNA, codierend für ein C- α - und/oder C- β -Kettenfragment, einschließen. In manchen Fällen wird es nützlich sein, ferner eine Ig-C_L-Kette oder ein Ig-C_L-Fragment mit dem sc-TCR zu fusionieren, z.B. die murine oder humane C_k-Kette oder ein geeignetes C_k-Kettenfragment. Wie zuvor bemerkt, kann DNA, codierend für die C_k-Kette, mittels PCR amplifiziert und mit der DNA, die für den sc-TCR codiert, ligiert werden. Alternativ kann die C_k-Kette in einen DNA-Vektor, wie z.B. jene, die von Near et al., infra, offenbart werden, eingeschlossen sein. Der DNA-Abschnitt, der für das Fusionsprotein codiert, wird dann in den DNA-Vektor eingeführt. Der DNA-Vektor wird dann in einer Wirtszelle exprimiert und Fusionsprotein wird geerntet und gereinigt, sofern gewünscht.

[0134] Beispielhafte sc-TCRs werden im Allgemeinen von einem DNA-Abschnitt codiert, der kovalent in Sequenz verknüpft einschließt: Promotor/Leadersequenz/V- α -Kette/einzelkettige Linkersequenz/- β -Kette; Promotor/Leadersequenz/- α -Kette/einzelkettige Linkersequenz/V- β -Kette, C- β -Kettenfragment; Promotor/Leadersequenz/V- α -Kette, C- α -Kette/einzelkettige Linkersequenz/V- β -Kette/C_k-Kette; oder Promotor/Leadersequenz/V- α -Kette, C- α -Kettenfragment/einzelkettige Linkersequenz/V- β -Kette, C- β -Kettenfragment. Weitere sc-TCR-Moleküle sind wie oben beschrieben, außer dass eine C_k-Kette mit dem DNA-Abschnitt fusioniert ist. Die DNA-Vektoren, die für die sc-TCR-Proteine codieren, werden zur löslichen Expression des Fusionsproteins in gewünschte Zellen, einschließlich jener spezifischen Expressionssysteme, die hierin offenbart sind, eingeführt.

[0135] Wie diskutiert, können einzelkettige variable Regionen der vorliegenden Bindungsmoleküle von nahezu jedem/jeder geeigneten TCR oder variablen Region eines Immunglobulins abgeleitet sein. Hinsichtlich des TCR-Anteils der vorliegenden Bindungsmoleküle werden geeignete V α , β -Ketten jene sein, für die es eine Erhöhung der Genexpression infolge immunologischer Induktion gibt. Verfahren zum Austesten einer Erhöhung der TCR-V-Kettenexpression sind bekannt (siehe z.B. Hafler, D.A. et al., *J. Exp. Med.*, 167: 1313 (1988); und Mantgazza, R. et al., *Autoimmunity* 3, 431 (1990)).

[0136] Weitere spezifische sc-TCR-Moleküle schließen jene Moleküle ein, die dazu fähig sind, bekannte oder noch zu entdeckende TAAs zu binden. Beispielhafte TAAs schließen p53 und Her-2 Neu ein.

[0137] Wie ebenfalls diskutiert, schließen die vorliegenden polyspezifischen Bindungsmoleküle auch eine Antikörperbindungsdomäne, wie z.B. einen se-Ab, und insbesondere einen sc-Fv oder ein funktionelles Fragment davon, ein. Wie ebenfalls diskutiert, sind Verfahren zur Herstellung und Verwendung zahlreicher sc-Fv-Moleküle beschrieben worden. Siehe z.B. das US-Patent Nr. 5,637,481; Jost, C.R. et al., *supra*, und Lindhofer, H. et al. (1996), *supra*.

[0138] Speziellere sc-Ab-Moleküle schließen im Allgemeinen Immunglobulinketten ein, die dazu fähig sind, ein Antigen spezifisch zu binden. Die Immunglobulinketten können Volllängen-Immunglobulinketten, z.B. eine Volllängen-V_L- und -V_H-Kette, einschließen; oder sie können ein funktionelles Fragment einer oder beider Volllängen-Immunglobulinketten einschließen. Der Begriff "funktionelles Fragment", wie er in Bezug auf einen sc-Ab verwendet wird, meint einen Teil der Volllängen-Immunglobulinkette, die diesen sc-Ab bildet, der dazu fähig ist, mindestens etwa 70% und vorzugsweise mindestens etwa 80%, 90% oder 95% bis zu etwa 100% eines spezifischen Antigens im Vergleich zu der Volllängen-Immunglobulinkette zu binden. Die spezifische Bindung kann mittels einer Vielfalt von Techniken, wie z.B. einem Western-Blot oder anderen geeigneten Antikörperbindungsassays, wie nachstehend beschrieben, quantifiziert werden.

[0139] Spezifischere Beispiele einer Antikörperbindungsdomäne gemäß der Erfindung schließen ein, sind aber nicht beschränkt auf: (1) eine einzelne variable Region eines Antikörpers (V_L oder V_H), (2) zwei oder mehr einzelkettige variable Regionen (z.B. V_L + V_H; V_L + V_L; oder V_H + V_H) oder die Antigenerkennungsstelle (CDR) davon. Jedes Fragment einer variablen Region (V_L oder V_H) wird vorzugsweise von V_L + J_L- oder V_H + D_H + J_H-Sequenzen codiert und besteht aus näherungsweise 100 Aminosäuren. Innerhalb dieser Sequenzen sind drei Regionen der Hypervariabilität, die Antigenerkennungsstellen bzw. Komplementaritäts-bestimmende Regionen (CDR) genannt werden, die die Aminosäuren zu enthalten scheinen, die die kombinierende Stelle des Antikörpers auskleiden bzw. bilden ("line"). Die CDRs sind eingestreut in vier Regionen geringerer Variabilität, die Gerüstregionen (FR) genannt werden.

[0140] In einer Ausführungsform kann die Antikörperbindungsdomäne eines polyspezifischen Bindungsmoleküls durch die Assoziation der V_L- und V_H-Polypeptide in eine β -Faltblattkonformation gebildet werden, wobei

die CDR-Regionen an oder nahe bei den Schleifen zwischen den Strängen enthalten sind. Gelegentlich können die $V_L + V_L$ -Paare oder die $V_H + V_H$ -Paare oder das V_L oder V_H alleine ein Antigen binden.

[0141] In einer stärker bevorzugten Ausführungsform ist die Antikörperbindungsdomäne ein sc-Ab, und insbesondere ein sc-Fv, einschließlich mindestens eines und vorzugsweise eines aus den folgenden: (1) eine V_L -Kette und eine V_H -Kette; (2) eine V_L -Kette und eine V_L -Kette; (3) eine V_H -Kette und eine V_H -Kette; (4) eine einzelne V_L -Kette; oder (5) eine einzelne V_H -Kette. Die Bindungsdomäne kann Immunglobulinketten von jedem beliebigen geeigneten Isotyp, z.B. IgG oder IgM, einschließen.

[0142] In Ausführungsformen, in denen die polyspezifische Bindungsregion eine Antikörperbindungsdomäne einschließt, die als zwei variable Regionen, verknüpft als einzelkettiges Protein, wie z.B. ein sc-Fv (z.B., $V_L + V_H$; $V_L + V_L$; $V_H + V_H$), vorliegt, wird das einzelkettige Protein vorzugsweise eine Polypeptidlinkersequenz einschließen, um die zwei variablen Domänen miteinander zu verknüpfen. Eine Vielzahl von Peptidlinkern ist dafür bekannt, für die Herstellung von sc-Fv-Konstrukten geeignet zu sein. Siehe z.B. Huston, J.S. (1988) PNAS (USA) 85:5879; und Pluckthorn, A. (1992) Immunological Rev., 103:151. Ein spezifisch bevorzugter Linker hat die folgende allgemeine Formel (Gly4Ser)_n, in der n etwa 2 bis 5 und vorzugsweise etwa 3 ist.

[0143] Eine Vielfalt von Immunglobulin- V_H - und - V_L -Ketten ist auf der Nucleinsäure- und Proteinebene beschrieben worden. Siehe, z.B., Davis in Fundamental Immunology (1993) supra; Kabat E.A., supra; US-Patent Nr. 5,637,481; Jost, C.R. et al., supra, und Lindhofer, H. et al. (1996), und die Brookhaven-Proteindatenbank (Brookhaven Protein Data Base, Chemistry Dept. Brookhaven National Laboratory, Upton, N.Y. (1973)).

[0144] Wie zuvor erwähnt, ist eine Vielfalt von sc-Fv-Konstrukten beschrieben worden. Die Konstrukte können gemäß der Erfindung verwendet werden, um ein breites Spektrum von polyspezifischen Bindungsproteinen herzustellen. Siehe im Allgemeinen Pastan, I. und Fitzgerald D., (1991), Science 254:1173; Webber, et al., Molecular Immunol. (1995), 32:249; und die veröffentlichten PCT-Anmeldungen Nrn. WO 96/05228 und WO 97/28191 für eine Offenbarung bezüglich der Herstellung und Verwendung einzelkettiger Antikörper.

[0145] Spezifischere sc-Fv-Moleküle sind jene, die dazu fähig sind, Zelloberflächenziele, wie z.B. Glycoproteine und Lipoproteine spezifisch zu binden. Beispiele für spezielle Glycoproteine schließen CD3/TcR und CD28 ein, sind aber nicht darauf beschränkt. Siehe Gilliland, L.K. et al., (1996), Tissue Antigens, 47:1, für eine Offenbarung bezüglich der Erzeugung und Charakterisierung von sc-Fv-Molekülen, die diese Moleküle und andere Oberflächenmoleküle binden. Weitere spezifische sc-Fv-Konstrukte sind in Colcher, D. et al. (1990), J. Nat. Cancer Inst., 82:1191; und Yokota, T. et al. (1992) Cancer Res., 52:3402 offenbart worden.

[0146] Weitere Sequenzinformationen bezüglich spezifischer sc-TCR- und sc-Ab-Ketten ist bei der National Center for Biotechnology Information (NCBI)-Gensequenzdatenbank (Genbank) bei der National Library of Medicine, 38A, 8N05, Rockville Pike, Bethesda, MD 20894 verfügbar. Genbank ist auch im Internet unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> verfügbar. Siehe Benson, D.A. et al. (1997) Nucl. Acids. Res. 25: 1 für eine Beschreibung für Genbank.

[0147] Die Ig- C_L -Kette eines polyspezifischen Bindungsproteins dieser Erfindung ist eine leichte Immunglobulinkettenregion vom κ - oder λ -Typ. Die konstante Region der leichten Immunglobulinkette vom κ -Typ wird hierin manchmal als "C_k-Kette" bezeichnet werden, während die konstante Region der leichten Immunglobulinkette vom λ -Typ häufig als "C_λ-Kette" bezeichnet werden wird. Beispielsweise kann die Ig- C_L -Kette eine C_k-Kette oder ein geeignetes Fragment davon, wie z.B. jene, die unten offenbart sind, sein. Zusätzlich kann eine Ig- C_H -Kette des polyspezifischen Bindungsproteins, wie gewünscht, vom μ -, δ -, γ -, α - oder ϵ -Typs sein. Vorzugsweise sind die Aminosäuresequenzen der leichten und schweren Immunglobulinketten bekannt.

[0148] Wie bemerkt, sind die vorliegenden polyspezifischen Bindungsmoleküle vollständig funktionell und löslich. Mit dem Begriff "vollständig funktionell" oder einem ähnlichen Begriff ist gemeint, dass die Bindungsmoleküle andere Moleküle, für die eine Bindung beabsichtigt ist, spezifisch binden können. Spezifischer ist ein Bindungsmolekül dieser Erfindung vollständig funktionell, wenn der sc-TCR-Teil des Moleküls einen pMHC oder pHMA (oder einen Teil davon) spezifisch binden kann. Der Begriff bedeutet auch, dass der sc-Fv-Teil des Bindungsmoleküls ein Antigen oder einen Teil davon spezifisch binden kann. Assays zum Detektieren einer spezifischen Bindung zwischen einem polyspezifischen Bindungsmolekül von Interesse und dem pMHC (pHMA) oder dem Antigen schließen Western Blots und andere Standardassays, wie z.B. jene, die nachstehend offenbart sind, ein.

[0149] Mit dem Begriff "spezifische Bindung" oder einem ähnlichen Begriff ist ein hierin offenbartes Molekül

gemeint, welches ein anderes Molekül bindet, wodurch ein spezifisches Bindungspaar gebildet wird. Jedoch erkennt das Molekül andere Moleküle nicht oder bindet nicht daran, wie z.B. durch Western-Blotting, ELISA, RIA, Mobilitätsverschiebungssassay, Enzymimmunassay, kompetitive Assays, Sättigungsassays oder andere Proteinbindungsassays, die auf dem Fachgebiet bekannt sind, bestimmt wird. Siehe im Allgemeinen Ausubel et al., *infra*, Sambrook et al., *infra*; Harlow und Lane, *supra*, und die darin zitierten Referenzen für Beispiele von Verfahren zum Detektieren einer spezifischen Bindung zwischen Molekülen.

[0150] Mit dem Begriff "vollständig löslich" oder einem ähnlichen Begriff ist gemeint, dass das Fusionsprotein unter Zentrifugation bei geringer G-Kraft nicht leicht aus einem wässrigen Puffer, z.B. Zellmedien, sedimentiert wird. Ferner ist ein spezifisches Bindungsmolekül dieser Erfindung löslich, wenn es bei einer Temperatur von mehr als etwa 5-37°C und bei oder nahe neutralem pH in Gegenwart einer geringen oder keiner Konzentration an einem anionischen oder nicht-ionischen Detergenz in wässriger Lösung bleiben kann. Unter diesen Bedingungen wird ein lösliches Protein häufig einen geringen Sedimentationswert haben, z.B. weniger als etwa 10 bis 50 Svedberg-Einheiten. Wässrige Lösungen, die hierin erwähnt sind, weisen typischerweise eine puffernde Verbindung zum Etablieren eines pH-Werts, typischerweise innerhalb eines pH-Bereichs von etwa 5-9, und eine Ionenstärke im Bereich zwischen etwa 2 mM und 500 mM auf. Manchmal wird ein Proteaseinhibitor oder ein mildes nichtionisches Detergenz zugesetzt und, sofern gewünscht, kann ein Trägerprotein bzw. Carrier-Protein, wie z.B. Rinderserumalbumin (BSA), bis zu einigen mg/ml zugesetzt werden. Beispielhafte wässrige Puffer schließen Phosphat-gepufferte Standardsalzlösung, Tris-gepufferte (Standard) Salzlösung oder andere bekannte Puffer und Zellmedienformulierungen ein.

[0151] Herkömmlicherweise gibt es mehrere Mittel zum Verknüpfen der hierin offenbarten polyspezifischen Bindungsmoleküle, einschließlich zellulärer, genetischer, chemischer und biochemischer Verfahren. Wie geschätzt werden wird, können bestimmte polyspezifische Bindungsmoleküle dieser Erfindung verbunden (vernetzt) werden durch chemische Vernetzung; natürliche Vernetzung durch Disulfidbindungen; natürliche Assoziation ohne Disulfidbindungen und Verbinden mittels eines genetisch codierten Peptidlinkers (Bird, R.E. et al. (1988) *Science*, 242; Huston et al., *supra*). Beispielsweise wird die Kupplung zwischen gewünschten polyspezifischen Bindungsmolekülen Standardprotein-Kupplungsreaktionen einschließen, wie z.B. jene, die allgemein beschrieben sind in Means, G.E. und Feeney, R.E. (1974) in *Chemical Modification of Proteins*, Holden-Day. Siehe auch S.S. Wong (1991) in *Chemistry of Protein Conjugation and Cross-Linking*, CRC Press.

[0152] Es wird weiterhin geschätzt werden, dass die polyspezifischen Bindungskomplexe der Erfindung auf mehrere gut bekannte Weisen zur Anpassung an beabsichtigte Verwendungen modifiziert werden können. Beispielsweise können die Komplexe gemäß bekannter Verfahren Disulfid-stabilisiert werden, siehe z.B. die veröffentlichte PCT-Anmeldung Nr. WO/29350.

[0153] Die vorliegenden Bindungsmoleküle können auch hergestellt werden, indem inerte Polymere, die Dendrimere genannt werden, eingesetzt werden. In einer spezifischeren Ausführungsform kann ein spezielles Dendrimer, bekannt als das Janice-Face-Dendrimer, verwendet werden, um Teile der vorliegenden Bindungsmoleküle zu verbinden oder zu kuppeln. In einer spezifischen Ausführungsform dieser Erfindung kann das sc-Fv-Molekül so hergestellt werden, dass es einen C-terminalen Cysteinrest einschließt, der verwendet werden kann, um den Antikörper mit dem Dendrimer insbesondere durch Disulfidbindungen zu vernetzen. Der sc-TCR würde dann mit dem Dendrimer durch freie Amingruppen gekuppelt werden. Ein bevorzugtes resultierendes Produkt ist ein stabiles polyfunktionelles Dendrimermolekül. Siehe Beispiel 19 unten.

[0154] Wie oben diskutiert, betrifft die vorliegende Erfindung mehrkettige polyspezifische Bindungsproteine, umfassend mindestens einen sc-TCR und eine Antikörperbindungsdomäne. In einer Ausführungsform wird das Bindungsprotein durch die nachstehende allgemeine Formel:

[A-B1-C1]

||

[D-B2-C2]

dargestellt,
worin

- A eine Antikörperbindungsdomäne oder ein funktionelles Fragment davon darstellt,
- B1, B2 jeweils unabhängig ein Verbindungsmolekül, das gleiche oder verschieden, sind,
- C1, C2 jeweils unabhängig -H oder ein Protein-Tag sind; und
- D mindestens ein sc-TCR-Molekül oder ein funktionelles Fragment davon wiedergibt.

[0155] Hinsichtlich der oben angegebenen Formel gibt eine einzelne Linie eine kovalente Bindung (z.B. eine Peptidbindung) wieder, während eine Doppellinie eine oder mehrere kovalente Bindungen, z.B. eine Disulfidbindung, wie z.B. jene, die schwere Immunglobulinketten verknüpfen, wiedergibt; oder die Doppellinie gibt Wasserstoff-(Brücken) Bindungen wieder. Die eckigen Klammern weisen auf Flexibilität in der sequenziellen Anordnung der eingeklammerten Moleküle (d.h. Untereinheiten) hin. Somit ist die Reihenfolge der Untereinheiten nicht wichtig, solange jede Untereinheit die Funktion ausführt, für die sie beabsichtigt ist.

[0156] In der oben gezeigten Formel geben die Untereinheiten A, B1, B2, C1, C2 und D jeweils unabhängig vorzugsweise ein Molekül oder eine Vielzahl von Molekülen wieder. In Fällen, in denen A oder D eine Vielzahl von Molekülen wiedergibt, wird jedes Molekül vorzugsweise an den gleichen Molekültyp gebunden sein (z.B. sc-TCR, fusioniert mit einem anderen sc-TCR, sc-Fv, fusioniert mit einem anderen sc-Fv). Vorzugsweise wird jedes Molekül in der Vielzahl von einem anderen durch eine geeignete Peptidlinkersequenz beabstandet sein. Die Zahl verknüpfter Moleküle wird in Abhängigkeit von der beabsichtigten Verwendung variieren, wird aber im Allgemeinen zwischen etwa 2 und 10, vorzugsweise etwa 2 bis 5, stärker bevorzugt 2 derartige Moleküle, und, am stärksten bevorzugt, 1 Molekül sein. Jede der oben beschriebenen Untereinheiten kann direkt mit einer anderen Untereinheit fusioniert werden oder sie kann davon durch einen geeigneten Peptidlinker beabstandet sein, z.B. um die Flexibilität oder Bindungsaffinität zu erhöhen.

[0157] In einer speziellen Ausführungsform des oben wiedergegebenen mehrkettigen polyspezifischen Bindungsmoleküls gibt A ein F(v)- oder sc-Fv-Molekül wieder; D gibt ein sc-TCR-Molekül wieder und jedes von C1 und C2 ist -H.

[0158] Gemäß der vorliegenden Erfindung kann eine Vielfalt von Verbindungsmolekülen verwendet werden. Beispielsweise kann, in einer Ausführungsform, jedes von B1, B2 in der obigen Formel eine Immunglobulinkette oder ein geeignetes Fragment davon darstellen, die/das zur Bildung eines spezifischen Bindungskomplexes fähig ist, wie z.B. bestimmt durch RIA, Western-Blot oder einen anderen geeigneten Bindungssassay. In einer spezielleren Ausführungsform ist jedes von B1 und B2 ganz oder teilweise von einer schweren Immunglobulinkette abgeleitet. In dieser Ausführungsform können die Verbindungsmoleküle die gleichen oder von unterschiedlicher Klasse (IgG-, IgA-, IgM-, IgD- oder IgE-Klasse) sein, vorausgesetzt, dass die Moleküle zur Bildung eines spezifischen Bindungspaares fähig sind. Zusätzlich sind Verbindungsmoleküle, bestehend aus chimären schweren Immunglobulinketten, innerhalb des Rahmens der vorliegenden Erfindung. Bevorzugte Verbindungsmoleküle schließen eine schwere Immunglobulinkette von Volllänge ($Ig-C_H$) oder Fragmente davon, wie z.B. C_H^1 ; $C_H^1-C_H^2$; $C_H^1-C_H^3$ und $C_H^1-C_H^2-C_H^3$ ein. Weiterhin bevorzugte Fragmente sind dazu fähig, mindestens eine Disulfidbrücke bzw. -bindung mit einer/einem anderen geeigneten Immunglobulinkette oder Fragment zu bilden. Ein besonders bevorzugtes Paar von Verbindungsmolekülen ist ein Paar von schweren Immunglobulinketten mit einem IgG-Isotyp.

[0159] In einer weiteren Ausführungsform ist jedes von B1 und B2 eine leichte Immunglobulinkette, gleich oder verschieden, vorausgesetzt, dass die leichten Ketten zur Bildung eines spezifischen Bindungspaares fähig sind, wie durch RIA, Western-Immunblot oder einen anderen geeigneten Bindungssassay bestimmt. Geeignete Verbindungsmoleküle leichter Immunglobulinketten ("immunoglobulin light chain joining molecules") können von voller Länge oder Fragmente davon sein und können vom κ - oder λ -Typ sein. Wie geschätzt werden wird, wird ein geeignetes Fragment eines Verbindungsmoleküls eines sein, das zur Bildung eines spezifischen Bindungspaares fähig ist, wie durch hierin beschriebene Assays bestimmt.

[0160] Ein Immunglobulin-Verbindungsmolekül gemäß der Erfindung kann weiterhin von tierischem (z.B. ein Nager, wie z.B. eine Maus oder Ratte) oder menschlichem Ursprung sein, oder kann chimär oder humanisiert (siehe z.B. Morrison et al., PNAS, 81, 6851 (1984); Jones et al., Nature, 321, 522 (1986)) sein. Beispielhafte Verbindungsmoleküle schließen jene ein, die dazu fähig sind, spezifisch durch Anti-Idiotyp-Antikörper, wie z.B. jene, die unten stehend offenbart sind, sowie im Handel erhältliche Anti-Idiotyp-Antikörper, gebunden zu werden. Siehe z.B. Linscott's Directory (40 Glen Drive, Mill Valley, Kalifornien, 94941), und über die American Type Culture Collection (ATCC), 12301 Parklawn Drive, Rockville, Md 20852.

[0161] Spezifischere Beispiele mehrkettiger polyspezifischer Bindungsproteine sind in der [Fig. 7A](#) wiedergegeben. In der Figur schließt das Bindungsprotein einen sc-TCR, verknüpft mit einer ersten schweren Immunglobulinkette ($Ig-C_H$), ein. Die erste $Ig-C_H$ ist mit einer zweiten $Ig-C_H$ verknüpft, um ein spezifisches Bindungspaar zu bilden. Die zweite $Ig-C_H$ ist der gleiche Isotyp (IgG) wie die erste schwere Immunglobulinkette und ist ferner mit einem F(v), produziert durch eine Hybridomzelle, verknüpft. Der sc-TCR ist ferner mit einer leichten Immunglobulinkette, produziert durch die Hybridomzelle, verknüpft. Weitere mehrkettige polyspezifische Bindungskomplexe (auf die hierin manchmal als "chimäre bispezifische" Moleküle oder Antikörper Bezug genommen

men wird) können unter Verwendung anderer Hybridomzellen oder anderer sc-TCR/Ig-Moleküle hergestellt werden.

[0162] Wie zuvor erwähnt, betrifft die vorliegende Erfindung auch polyspezifische Bindungsproteine, die Nicht-Immunglobulin-Verbindungs moleküle einschließen. Zum Beispiel kann jedes von B1 und B2 in der oben gezeigten Formel ein Polypeptid sein, das ein Protein-Protein-Bindungsmotiv, wie z.B. ein Helix-Turn-Helix- oder Leucin-Zipper-Motiv, einschließt. Viele Beispiele dieser Bindungsmotive sind beschrieben worden und sind im Fachgebiet bekannt. Siehe z.B. Horberg et al. (1993) *Science*, 262: 1401; Kamtekar et al., (1993) *Science* 262: 1680; Harris et al., *J. Mol. Biol.* (1996) 236: 1356.

[0163] Spezifischer kann jedes von B1 und B2 ein Polypeptid sein, das aus einem Protein-Protein-Bindungsmotiv besteht, das zur Bildung eines spezifischen Bindungspaares fähig ist. Beispielsweise kann jedes von B1 und B2 ein Protein-Protein-Bindungsmotiv eines Transkriptionsfaktors, wie z.B. fos oder jun, sein. Spezifische Beispiele für Protein-Protein-Bindungsmotive schließen *birA* (LXLIFEAQKIEWR; SEQ ID NO: 5), *Avidin* (ARKCSLTGKWTNDLGSNMT; SEQ ID NO: 6), *EE* (EEEEYMPME; SEQ ID NO: 7), *6 × HIS* (GMAHHHHHH; SEQ ID NO: 8), *fos/jun* und *(TPPPEPET*; SEQ ID NO: 9) ein. Siehe Rhind, S. K. (1992) US-Patent Nr. 5,354,554; Altman, J. D. (1996) *Science*, 274: 94; Shatz, P. (1993) *Biotechnology*, 11: 1138. Siehe auch die Beispiele 1-3 unten.

[0164] Wie diskutiert, stellt die vorliegende Erfindung Polynucleotide bereit, die für einzelkettige polyspezifische Bindungsproteine (oder Teile davon) codieren. In einer Ausführungsform wird das polyspezifische Bindungsprotein durch ein Polynucleotid codiert, das RNA, DNA oder eine Chimäre daraus sein kann. Typischerweise wird das Polynucleotid eine DNA-Sequenz (Abschnitt), die für das Bindungsprotein codiert, einschließen oder daraus bestehen.

[0165] Beispielsweise schließt ein Polynucleotid gemäß der Erfindung typischerweise eine funktionell verknüpfte Leadersequenz zum Bereitstellen geeigneter Zellprozessierungssignale ein. Die Leadersequenz kann mit dem 5'-Ende der DNA-Sequenz, die für das sc-TCR-Molekül codiert, fusioniert werden. Insbesondere kann der Leader kovalent mit dem 5'-Ende der DNA-Sequenz, codierend für die V- α -Kette oder, in manchen Ausführungsformen, die V- β -Kette des sc-TCR, verknüpft werden. In anderen Ausführungsformen wird der Leader mit dem sc-Ab und insbesondere dem sc-Fv fusioniert werden. In einer spezifischeren Ausführungsform kann die Leadersequenz mit der V_H-Kette oder der V_L-Kette des sc-Fv fusioniert werden. Es wird jedoch anerkannt werden, dass, obgleich eine spezifische Leadersequenz mit einer speziellen sc-TCR- oder sc-Fv-Sequenz verknüpft wird, die Leadersequenz häufig unter Verwendung von Rekombinationstechniken ohne einen schädlichen Effekt auf die Prozessierung des Fusionsproteins ausgetauscht werden kann. Somit wird, in einer Ausführungsform, das 5'-Ende der V- α -Kette kovalent mit dem 3'-Ende einer geeigneten Leadersequenz verknüpft.

[0166] Eine Vielfalt spezifischer Leadersequenzen kann mit den Polynucleotiden verwendet werden. In einer Ausführungsform ist die Leadersequenz etwa 12 bis 26 Aminosäurereste lang. In einer spezifischen Ausführungsform kann eine DNA-Sequenz, entworfen zur Insertion in einen bakteriellen Expressionsvektor, eine Pel B-Leadersequenz einschließen. Alternativ können DNA-Abschnitte zur Insertion in Sägerexpressionsvektoren einen Ig-C_L-Leader, wie z.B. eine Säger-C_K-Leadersequenz, einschließen. Ein beispielhafter C_K-Leader wird unten bereitgestellt.

[0167] Weiterhin werden Polynucleotide bereitgestellt, die für mindestens einen Teil eines polyspezifischen Bindungsproteins und insbesondere bestimmte mehrkettige polyspezifische Bindungsproteine, wiedergegeben in der vorstehend gezeigten Formel, codieren. In einer spezielleren Ausführungsform ist der Teil dazu hinreichend, für mindestens die A-B1- oder D-B2-Untereinheiten zu codieren. Siehe die Beispiele 8, 9 und 12 unten.

[0168] Weitere Polynucleotide gemäß der Erfindung schließen eine DNA-Sequenz ein, die für ein einzelkettiges polyspezifisches Bindungsprotein dieser Erfindung codiert. Spezifischer wird das Polynucleotid üblicherweise einen Promotor, ein Translationsinitiierungssignal und eine Leadersequenz, funktionell verknüpft mit der Sequenz, einschließen. Für eine optimale Expression in bakteriellen Wirten ist der Promotor vorzugsweise *phoA* und der Leader ist *pelB* aus *E. coli*. Sofern gewünscht, kann die DNA-Sequenz ferner eine Ribosomenbindungsstelle aus einer Gen-10-Sequenz umfassen. Für eine optimale Expression in eukaryotischen Wirten ist der Promotor vorzugsweise ein Zytomegalovirus (CMV)-Promotor, funktionell verknüpft mit einem CMV-Enhancerelement, und der Leader ist ein Maus-kappa-Kettenleader. Der Begriff "funktionell verknüpft" bedeutet, dass eine genetische Sequenz funktionsfähig (d.h. funktionell) mit einem Polynucleotid oder Sequenzen, stromaufwärts (5') oder stromabwärts (3') eines gegebenen Abschnitts oder einer gegebenen Sequenz, ver-

knüpft ist.

[0169] Ferner codieren Polynucleotide gemäß der Erfindung für mindestens einen sc-TCR oder mindestens ein sc-Fv, jeweils unabhängig fusioniert mit einer DNA-Sequenz, die für ein geeignetes Bakteriophagenhüllprotein codiert. Vorzugsweise ist das Bakteriophagenhüllprotein ein Gen VIII- oder Gen III-Protein. Verfahren zur Herstellung und Verwendung der Polynucleotide sind beschrieben worden. Siehe auch US-Patent Nr. 5,759,817 für eine Offenbarung bezüglich der Konstruktion und Verwendung von Bakteriophagenfusionsproteinen.

[0170] Spezifischere Polynucleotide dieser Erfindung schließen eine DNA-Sequenz ein, die für einen sc-TCR codiert, der eine V- α -Kette, kovalent verknüpft durch eine geeignete Peptidlinkersequenz mit dem N-Terminus einer V- β -Kette, einschließt. Vorzugsweise codiert die DNA-Sequenz ferner für eine Antikörperbindungsdomäne und insbesondere ein sc-Fv, wie oben stehend diskutiert, getrennt von dem sc-TCR durch eine geeignete Peptidlinkersequenz.

[0171] Polynucleotide, die für die vorliegenden polyspezifischen Bindungsproteine codieren, können aus einer Vielfalt von Quellen, einschließlich Polymerasekettenreaktions-(PCR)-Amplifikation öffentlich verfügbarer DNA-Sequenzen, erhalten werden. In einer Ausführungsform wird das Polynucleotid in einem DNA-Vektor bereitgestellt, der zum Exprimieren des Moleküls in einem geeigneten eukaryotischen oder prokaryotischen Zellexpressionssystem fähig ist. Wie diskutiert, können Polynucleotide dieser Erfindung funktionell verknüpfte transkriptionelle Elemente bzw. Transkriptionselemente, wie z.B. einen Promotor, Leader- und optimale Enhancersequenzen zum Steuern der Expression des löslichen sc-TCR-Fusionsproteins in einem gewünschten Zellexpressionssystem einschließen. Alternativ kann der DNA-Vektor ausgewählt werden, um einige oder alle der Kontrollelemente bereitzustellen.

[0172] Der Begriff "Vektor", wie hierin verwendet, bedeutet eine Nucleinsäuresequenz, die dazu fähig ist, in eine(r) Wirtszelle aufgenommen bzw. eingebaut und repliziert zu werden, was typischerweise in der Expression eines Nucleinsäureabschnitts von Interesse, z.B. ein Polynucleotid, das für ein polyspezifisches Bindungsprotein codiert, wie hierin beschrieben, resultiert. Die Vektoren können z.B. lineare Nucleinsäureabschnitte oder -sequenzen, Plasmide, Cosmide, künstliche Hefechromosomen (YACs), Phagemide und extrachromosomal DNA einschließen. Spezifischerweise kann der Vektor rekombinante DNA sein. Der ebenfalls hierin verwendete Begriff "Expression" oder "Genexpression" soll sich auf die Produktion des Proteinprodukts der Nucleinsäuresequenz von Interesse, einschließlich Transkription der DNA und Translation der RNA-Transkription, beziehen. Typischerweise wird ein DNA-Abschnitt, der für ein sc-TCR-Fusionsprotein der Erfindung codiert, in den Vektor, vorzugsweise ein DNA-Vektor, inseriert, um den DNA-Abschnitt in einer geeigneten Wirtszelle zu replizieren.

[0173] Speziellere DNA-Vektoren gemäß der Erfindung werden Kontrollelemente einschließen, die zum Optimieren der Expression in einem Wirt, für den es beabsichtigt ist, ausgewählt sind. Beispielsweise kann ein DNA-Vektor zur Verwendung in einem bakteriellen Wirt einen Promotor, wie z.B. den trp-Operon-Promotor, lac-Promotor, trp-lac-Promotor, lac^{UVS}- oder phoA-Promotor, einschließen. Beispielhafte Promotoren sind jene, wie z.B. phoA, die eine starke, regulierte Expression während langsamer Induktionsbedingungen, die über mehrere Stunden andauern (z.B. 2 bis 10 Stunden), bereitstellen. Unter geeigneten Kulturbedingungen sind die meisten starken Promotoren dazu fähig, lösliches Fusionsprotein in Konzentrationen bis zu und überschreitend näherungsweise 10% des gesamten Wirtszellproteins bereitzustellen.

[0174] In einigen Ausführungsformen der Erfindung wird ein Polynucleotid, das für ein polyspezifisches Bindungsprotein von Interesse codiert, rekombinant (gentechnisch) in einen geeigneten DNA-Vektor eingeführt werden ("recombinantly engineered"). Zum Beispiel werden, in Ausführungsformen, in denen der gewünschte TCR oder die gewünschte Immunglobulinkette mittels PCR amplifiziert wird, die Oligonucleotidprimer üblicherweise mit geeigneten Restriktionsstellen an beiden Enden der Primer konfiguriert, so dass das Polynucleotid durch eine andere gewünschte DNA ersetzt werden kann. Somit ist ein geeigneter DNA-Vektor der Erfindung einer, in den das gewünschte Bindungsmolekül leicht in den Vektor inseriert werden kann. Manchmal, wie wenn ein sc-TCR/IgG oder eine andere Fusion zwischen dem sc-TCR oder der schweren Immunglobulinkette oder einem Fragment davon gewünscht ist, wird die Ig-C_L-Kette oder das Kettenfragment durch den Vektor codiert werden und wird mit dem DNA-Abschnitt durch Ligation fusioniert werden. In anderen Fällen wird die Ig-C_L-Kette oder das Fragment vor der Ligation mit dem Vektor mit dem DNA-Abschnitt fusioniert werden.

[0175] Im Allgemeinen kann die Herstellung der vorliegenden polyspezifischen Bindungsproteine mittels spezifischer Verfahrensweisen, hierin offenbart, und mittels anerkannter DNA-Rekombinationstechniken bewerk-

stelligt werden. Beispielsweise sind Herstellung von Plasmid-DNA, DNA-Spaltung mit Restriktionsenzymen, Ligation von DNA, Einführung von DNA in eine Zelle, Kultivieren der Zelle und Isolation und Reinigung des exprimierten Proteins bekannte Techniken. Siehe im Allgemeinen Sambrook et al. in Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2. Ausgabe 1989); und Ausubel et al. (1989), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York.

[0176] Speziellere Strategien können dazu eingesetzt werden, die hierin beschriebenen polyspezifischen Bindungsmoleküle zu exprimieren. Zum Beispiel kann, in einer Herangehensweise, ein Polynucleotid, das für ein polyspezifisches Bindungsprotein von Interesse codiert, in einen DNA-Vektor durch bekannte Mittel, z.B. durch die Verwendung von Enzymen zur Restriktion des Vektors an vorher festgelegten Stellen, gefolgt von Ligation der DNA in den Vektor, eingebaut werden. Der Vektor, der die DNA-Sequenz enthält, wird dann in einen geeigneten Wirt zur löslichen Expression des Bindungsproteins eingeführt. Die Auswahl geeigneter Vektoren kann empirisch auf Faktoren, die mit dem Klonierungsprotokoll zusammenhängen, basiert sein. Zum Beispiel sollte der Vektor mit der Wirtszelle, die eingesetzt wird, kompatibel sein und das geeignete Replikon dafür aufweisen. Ferner muss der Vektor dazu fähig sein, die DNA-Sequenz, die für das Protein, das zu exprimieren ist, codiert, aufzunehmen. Bevorzugte Vektoren sind jene, die zum Expressieren der löslichen Proteine in Säugerzellen fähig sind, z.B. pCDNA3, erhältlich von InVitrogen. Siehe auch Sambrook et al., supra und Ausubel et al., supra für geeignete Vektoren zur Verwendung in Säugerzellen. Typischerweise werden DNA-Vektoren, die für die Expression in Bakterien konzipiert sind und für lösliche Fusionsproteine codieren, kein Vollängen- C_{λ} oder - C_{κ} -Intron einschließen, obgleich diese Sequenzen in Vektoren eingeschlossen sein können, die für die Expression in Säugerzellen, die zum RNA-Spleißen fähig sind, konzipiert sind.

[0177] Stärker bevorzugte DNA-Vektoren sind so konzipiert, dass sie das polyspezifische Bindungsprotein in eukaryotischen Zellen, insbesondere Säugerzellen, exprimieren. Die DNA-Vektoren können für eine Replikation in einem bakteriellen Wirt formatiert sein, sofern gewünscht, so dass geeignete Mengen des DNA-Vektors erhalten werden können. Zum Beispiel wird ein DNA-Vektor üblicherweise einschließen: (i) einen Replikationsstartpunkt (Ori), der in *E. coli* funktionell ist; (ii) ein selektierbares Antibiotikaresistenzgen (z.B. Amp-, Tet-, Neo- oder Kan-Resistenz); (iii) einen starken viralen Promotor, wie den Zytomegalovirus (CMV)-Promotor und, gegebenenfalls, ein CMV-Enhancerelement, (iv) eine Ig- C_L -Leadersequenz, (v) ein sc-TCR-Molekül von Interesse, (vi) ein Vollängen-Ig- C_L -Intron, verknüpft mit einem Ig- C_L -Exon, (vii) eine Wachstumshormon-Polyadenylierungssequenz, z.B. die bovine Wachstumshormon (bgh)-PolyA-Sequenz, und (viii) DNA, die für einen selektierbaren eukaryotischen Marker codiert, wie z.B. einen starken viralen Promotor (z.B. Simian-Virus 40 (SV40)-Promotor), verknüpft mit dem Antibiotikaresistenz-Gen, und fusioniert mit einer viralen Polyadenylierungssequenz (z.B. die SV40-PolyA-Sequenz). Alternativ kann der DNA-Vektor alle von (i)-(v) und (vii)-(viii), oben, einschließen, ohne das Vollängen-Ig- C_L -Intron, verknüpft mit dem Ig- C_L -Exon von (vi). Eine beispielhafte Ig- C_L -Leadersequenz ist der Maus-kappa-Leader. Ein Beispiel für ein Vollängen-Ig- C_L -Intron und -Exon ist das Vollängen- C_{κ} -Gen.

[0178] Ein Beispiel eines spezifisch bevorzugten DNA-Vektors zum Expressieren der vorliegenden einzelketigen polyspezifischen Bindungsproteine in Säugerzellen ist der pSUN27-Vektor, erläutert in [Fig. 5](#). Die Konstruktion und Verwendung des pSUN27-Vektors ist zuvor beschrieben worden. Der pSUN27-Vektor ist gemäß dem Budapest Vertrag bei der American Type Culture Collection (ATCC) in 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209 hinterlegt worden. Der DNA-Vektor wurde bei der ATCC am 17. September 1997 hinterlegt und erhielt die Eingangsnummer 209276. Der pSUN27-Vektor schließt einen CMV-Promotor, eine murine Leichtketten-Leadersequenz, eine Kozak-Konsensussequenz und die murine C_{κ} -Gen-Intron- und -Exonsequenz ein. Siehe auch Near et al., Mol. Immunology (1990) für eine spezifischere Offenbarung, betreffend die murine Schwerkettensequenz.

[0179] Zusätzlich bevorzugt sind DNA-Vektoren, die zur Verbindung eines gewünschten sc-TCRs oder funktionellen Fragmente mit einer schweren Immunglobulinkette oder einem Fragment geeignet sind. Zum Beispiel kann der DNA-Vektor in einer Ausführungsform in einem bakteriellen Wirt repliziert werden, sofern gewünscht. Insbesondere wird der DNA-Vektor üblicherweise einschließen: (i) einen Replikationsstartpunkt (Ori), der in *E. coli* funktionell ist; (ii) ein selektierbares Antibiotikaresistenzgen (Amp, Tet, Neo oder Kan); (iii) einen starken viralen Promotor, wie den CMV-Promotor und, optional, CMV-Enhancer; (iv) eine V_H -Kette oder ein V_H -Fragment; (v) eine C_H -Kette; (vi) eine Wachstumshormon-Polyadenylierungssequenz, z.B. die bgh-PolyA-Sequenz; und (vii) einen starken viralen Promotor (z.B. der SV40-Promotor), verknüpft mit dem Antibiotikaresistenz-Gen und fusioniert mit einer viralen Polyadenylierungssequenz (z.B. die SV40-PolyA-Sequenz).

[0180] Ein Beispiel eines spezifisch bevorzugten DNA-Vektors zum Verbinden eines gewünschten sc-TCR mit den Immunglobulinketten ist PSUN7, gezeigt in [Fig. 8](#).

[0181] Ein DNA-Vektor der Erfindung kann gemäß herkömmlicher Techniken modifiziert werden, um die Expression in Säugerzellen zu optimieren. Zum Beispiel kann der eukaryotische Marker, der für das Neomycinresistenz-Gen des pSUN27- oder pSUN7-Vektors, oben beschrieben, codiert, durch DNA ersetzt werden, die für das Thymidinkinase (TK)-Gen codiert, um die Expression des sc-TCR-Fusionsproteins in TK-(TK-defizienten)-Säugerzellen zu erleichtern bzw. zu ermöglichen. Der DNA-Vektor kann auf andere Weisen, die im Fachgebiet gut bekannt sind, modifiziert werden (z.B. Austauschen von Promotoren, Antibiotikaresistenz-Genen, Ersetzen des CMV-Promotors durch einen Promotor, erhalten aus einem Immunglobulin, SV40, einem Adenovirus, oder Papillomviruspromotor, um die Expression des sc-TCR-Fusionsproteins in einer gewünschten Säugerzelle zu optimieren). Alternativ kann die DNA-Sequenz, die für das sc-TCR-Protein codiert, in gut bekannte Vektoren, die zur Expression in Hefe- oder Insektenzellen geeignet sind, wie gewünscht, inseriert werden. Siehe z.B. Ausubel et al., supra und Summer und Smith, infra.

[0182] Ein DNA-Vektor, der speziell für die Replikation und Expression eines gewünschten Bindungsproteins in Bakterien konzipiert ist, schließt z.B. ein: (i) einen Replikationsstartpunkt, der in *E. coli* funktionell ist und z.B. aus pBR322 stammt, vorzugsweise aus gut bekannten pUC19-Vektoren; (ii) ein selektierbares Antibiotikaresistenzgen, z.B. das Ampicillin- und/oder Neomycinresistenz-Gen; (iii) eine Transkriptionsterminationsregion, z.B. die Terminationsregion des *E. coli*-trp-Operons; (iv) einen Transkriptionspromotor, z.B. einen *phoA*, *tac*-, *tac-lac*-, *lacZ*-, *lac^{UVS}*-, T7- oder T3-Promotor; (v) eine Leadersequenz, z.B. einen *pelB*- oder *ompA*-Leader; (vi) eine DNA-Sequenz, codierend für den sc-TCR, fusioniert mit einem gewünschten sc-Fv durch eine geeignete Peptidlinkersequenz; (vii) einen Transkriptionsterminator, z.B. die T1T2-Sequenz aus dem ribosomalen RNA-Lokus von *E. coli*. Alternativ kann der Vektor (i)-(vii), oben, einschließen, außer dass der sc-TCR mit einer/einem fusionierten Ig-C_L-Kette oder -Fragment bereitgestellt wird.

[0183] Geeignete Wirtszellen können mittels einer Vielzahl von Verfahren transformiert werden, einschließlich retroviral Transfer, virale oder Bakteriophageninfektion, Calcium-, Liposomen- oder Polybren-vermittelte Transfektion, biolistischer Transfer oder anderer Techniken, die im Fachgebiet bekannt sind.

[0184] Wie zuvor festgestellt, kann es in manchen Fällen wünschenswert sein, das polyspezifische Bindungsprotein in Nicht-Säugerzellen zu exprimieren. Beispielsweise schließen geeignete Wirtszellen zum Expressieren der Fusionsproteine in Bakterien Zellen ein, die dazu fähig sind, leicht transformiert zu werden und rasches Wachstum in Kulturmedium aufweisen. Besonders bevorzugte Wirtszellen schließen *E. coli*, *Bacillus subtilis*, etc. ein. Andere Wirtszellen schließen Hefen, z.B. *S. cerevisiae*, und Insektenzellen ein. Beispielhafte Zellen zur Insektenzellexpression sind jene, die dazu fähig sind, durch einen Bakulovirus infiziert zu werden, wie z.B. Sf9-Zellen. Siehe auch Summer und Smith (1988) A Manual of Methods for Baclovirus Vectors and Insect Cell Culture Procedures, Texas Agricultural Experimental Station Bulletin Nr. 1555, College Station, Texas.

[0185] Obgleich in den Beispielen, die folgen, Zellen, mit Säugerabstammung verwendet werden, ist im Prinzip beinahe jede beliebige eukaryotische Zelle in der Ausführung der vorliegenden Erfindung verwendbar. Beispiele schließen Primatenzellen, z.B. humane Zellen, wie z.B. Fibroblastenzellen, und Zellen aus anderen Tieren, wie z.B. ovine, porzine, murine und bovine Zellen, ein. Spezifische Beispiele für Säugerzellen schließen COS-, HeLa- und CHO-Zellen ein.

[0186] Im Allgemeinen werden Zellkultivierungsbedingungen eingesetzt, in denen stabil transformierte oder transizierte Zelllinien selektiert werden, z.B. durch Einbau eines geeigneten Zellselektionsmarkers in den Vektor (z.B. ein Antibiotikaresistenz-Gen oder G418). Zellen, die ein gewünschtes polyspezifisches Bindungsmolekül dieser Erfindung exprimieren, können mittels bekannter Verfahrensweisen bestimmt werden, z.B. mittels ELISA-Assay unter Verwendung von im Handel erhältlichen monoklonalen Antikörpern, die das Bindungsmolekül spezifisch an einer gewünschten Stelle binden. Illustrative derartiger Stellen schließen die V- α - oder V- β -Kette des sc-TCR oder die variable Kette einer Antikörperbindungsstelle, z.B. die V_H- oder V_L-Kette des sc-Fv, ein. Alternativ kann in Ausführungsformen, in denen ein polyspezifisches Bindungsmolekül eine schwere Immunglobulinkette einschließt, z.B. ein sc-TCR/IgG-Molekül, ein monoklonaler Antikörper gewählt werden, der die C_κ- oder C_λ-Kette (oder das Fragment) spezifisch bindet. Beispiele für monoklonale Antikörper und geeignete Assays werden in den unten stehenden Beispielen bereitgestellt.

[0187] Sofern eingeschlossen, führt eine Leadersequenz in einem DNA-Vektor in geeigneter Weise die Expression des Bindungsproteins zu Wirtszellmembranen oder zum Wirtszellmedium, und kann so formatiert sein, dass sie eine Restriktionsstelle einschließt, so dass DNA, die z.B. für eine V- α -Kette von Interesse codiert, in zweckdienlicher Weise mit dem Konstrukt ligiert werden kann. Geeigneterweise ist die Restriktionsstelle in das 3'-Ende der Leadersequenz, hierin manchmal als Verbindungssequenz bezeichnet, z.B. mit einer Länge von etwa 2 bis 10 Codons, eingebaut und mit der V- α -Kette verknüpft, so dass die codierende Region für die

V- α -Kette typischerweise die erste Aminosäure der V- α -codierenden Region ist. Alternativ kann die Leadersequenz mit der V_H- oder der V_L-codierenden Region der sc-Fv-Kette verknüpft sein. Zum Beispiel ist eine Restriktionsstelle die Sfil-Stelle, obgleich andere Spaltstellen vor der V- α -Kette-codierenden Region eingebaut sein können, um die zweckdienliche Insertion der V- α -Kette in das Vektorkonstrukt zu steigern. Wie oben diskutiert, ermöglicht die Verwendung einer derartigen Restriktionsstelle in Kombination mit einer zweiten Restriktionsstelle, typischerweise am Beginn der V- α -Kette positioniert, die rasche und unkomplizierte Insertion von Sequenzen, die für eine breite Vielfalt von V- α -Ketten oder V- α , C- α -Ketten codieren. Bevorzugte Leadersequenzen enthalten eine starke Translationsinitiationsstelle und können manchmal eine Cap-Stelle am 3'-Ende ihrer mRNA einschließen.

[0188] Wie oben erwähnt, schließen beispielhafte Leadersequenzen pe1B und OmpA für bakterielle Expression und eine C_k-Maus-kappa-Ketten-Leadersequenz für Sängerexpression ein.

[0189] Die vorliegende Beschreibung schließt auch Verfahren zum Isolieren der Polynucleotide oder Vektoren, die für diese codieren, ein. Im Allgemeinen schließen die Verfahren das Einführen des Vektors oder Polynucleotids in gewünschte Wirtszellen, Kultivieren der Zellen und Aufreinigen des codierten polyspezifischen Bindungsmoleküls (oder Teils davon) aus den Wirtszellen zum Erhalten von im Wesentlichen reinem Protein ein. Der Vektor oder das Polynucleotid kann auch in im Wesentlichen reiner Form mittels Standardverfahren isoliert werden. Typischerweise wird der Vektor oder das Polynucleotid für die meisten rekombinanten Manipulationen DNA sein.

[0190] In einigen Fällen werden die polyspezifischen Bindungsproteine ein oder mehrere fusionierte Protein-Tags (typischerweise ein oder zwei) einschließen. Zum Beispiel können die Protein-Tags zur Unterstützung des Reinigens des Proteins aus natürlich vorkommenden Zellkomponenten, die typischerweise das Fusionsprotein begleiten, verwendet werden. In anderen Fällen kann der Protein-Tag dazu verwendet werden, eine vorher festgelegte chemische oder proteolytische Spaltstelle in das lösliche Fusionsprotein einzuführen. Insbesondere ist die Einführung eines Abschnitts, codierend für ein Protein-Tag, in einen DNA-Vektor, z.B. zwischen der Sequenz, codierend für das lösliche Fusionsprotein, und der Ig-C_L-Kette oder einem geeigneten Fragment, so dass das sc-TCR-Molekül von der/dem IgC_L-Kette oder -Fragment abgespalten (d.h. getrennt) werden kann, sofern gewünscht.

[0191] In polyspezifischen Bindungsmolekülen, die einen Protein-Tag einschließen, kann der Tag nach Bedarf mit dem Molekül mittels genetischer oder chemischer Manipulationen fusioniert sein. In einer Ausführungsform schließt das Bindungsmolekül einen Protein-Tag, fusioniert mit dem C-Terminus des Proteins ein. Alternativ kann der Protein-Tag mit dem N-Terminus des Bindungsproteins fusioniert sein. In einer weiteren Ausführungsform ist der Protein-Tag zwischen den sc-TCR- und sc-Ab-Molekülen des polyspezifischen Bindungsproteins fusioniert.

[0192] Die polyspezifischen Bindungsproteine dieser Erfindung können mittels mehrerer herkömmlicher Techniken gereinigt werden. Zum Beispiel können, wie zuvor erwähnt, die Bindungsproteine wenigstens einen Protein-Tag (der/die gleiche oder verschieden), einschließlich Tags, die eine chemische oder Proteasespaltstelle umfassen, einschließen. Insbesondere kann ein Protein-Tag ein Polypeptid sein, das bei physiologischem pH eine Ladung trägt, wie z.B. 6 × HIS. In dieser Ausführungsform kann eine geeignete synthetische Matrix zum Aufreinigen des Fusionsproteins verwendet werden. Spezieller kann die synthetische Matrix eine im Handel erhältliche Sepharosematrix, wie z.B. Ni-Sepharose oder andere derartige geeignete Matrizes, die zum Binden des 6 × HIS-Tags bei etwa pH 6-9 fähig sind, sein. Andere geeignete Tags schließen die EE- oder MYC-Epitope ein, die von im Handel erhältlichen monoklonalen Antikörpern spezifisch gebunden werden. Im Allgemeinen ist eine breite Vielfalt von Epitopen, die dazu fähig sind, von einem Antikörper, z.B. einem monoklonalen Antikörper, spezifisch gebunden zu werden, dazu fähig, als Protein-Tag bzw. Protein-Markierung zu dienen. Andere geeignete synthetische Matrizes schließen jene mit einem gebundenen Antikörper, fähig zum spezifischen Binden der vorliegenden sc-TCR-Proteine, ein. Beispiele für Protein-Tags bzw. Protein-Markierungen schließen jene mit einer Enterokinase-, Faktor Xa-, Schlangengift- oder Thrombinspaltstelle ein. Siehe z.B. die veröffentlichte PCT-Anmeldung WO 96/13593. Siehe auch die unten stehenden Beispiele 6-7.

[0193] Ein exprimiertes polyspezifisches Bindungsprotein kann mittels bekannter Verfahren, einschließlich Immunaffinitätschromatographie, Immunabsorption, Immunpräzipitation und dergleichen, isoliert und aufgereinigt werden. Es ist bedeutend, dass die präparativen Verfahrensweisen üblicherweise keine verlängerten Isolationsstufen zum Erhalten signifikanter Ausbeuten an dem Fusionsprotein erfordern werden. Gemäß der hierin unten vollständiger beschriebenen Proteinaufreinigungsverfahren liegen Ausbeuten für die meisten polyspezifischen Bindungsproteine im Bereich von etwa 2 bis 6 Milligramm pro Liter.

[0194] Wie diskutiert, können die polyspezifischen Bindungsproteine dieser Erfindung mittels einer oder einer Kombination von Strategien exprimiert und aufgereinigt werden. Bei einer Herangehensweise wird ein polyspezifisches Bindungsprotein, wie z.B. ein einzelkettiges Fusionsprotein, in einer geeigneten Zelle exprimiert. Vorzugsweise wird das Bindungsprotein in der Zelle oder dem Zellmedium exprimiert. Ein Zellextrakt oder Wirtszellkulturmedium wird erhalten und dann zentrifugiert. Der resultierende Überstand kann mittels Affinitäts- oder Immunaffinitätschromatographie, z.B. Protein-A- oder Protein-G-Affinitätschromatographie oder eines Immunaffinitätsprotokolls, umfassend die Verwendung eines Antikörpers, der das Bindungsprotein spezifisch bindet, aufgereinigt werden. Beispiele für einen derartigen Antikörper sind im Handel erhältliche monoklonale Antikörper, die dazu fähig sind, den sc-TCR, das sc-Fv oder einen anderen Teil des Bindungsmoleküls, wie den Protein-Tag oder den Schwerkettenteil des Immunglobulins, spezifisch zu binden. Spezifischere Beispiele für geeignete monoklonale Antikörper sind jene, die dazu fähig sind, eine V- α -Kette oder V- β -Kette des sc-TCR zu binden, z.B. H57, B20.1, MR5-2 und F23.1 (Pharmagen). Spezifische Beispiele derartiger Antikörper sind Anti-Idiotyp-Antikörper, wie jene in den unten stehenden Beispielen.

[0195] Wie oben beschrieben, werden die polyspezifischen Bindungsmoleküle der vorliegenden Erfindung in einer löslichen und vollständig funktionellen Form bereitgestellt. Somit werden die Bindungsmoleküle in einer Ausführungsform stabil in ein Kulturmedium segretiert und sind dazu fähig, einen Liganden von Interesse, wie z.B. ein TCR-Antigen oder einen Teil davon, fähig zum Binden des Bindungsmoleküls, spezifisch zu binden. In Ausführungsformen der Erfindung, in denen ein polyspezifisches Bindungsmolekül als eine Einzelkette vorliegt, ist das Molekül vorzugsweise stabil unter physiologischen Bedingungen in der wesentlichen oder vollständigen Abwesenheit eines chaotropen Mittels, wie z.B. eines Detergents oder dergleichen. Somit werden die Bindungsmoleküle üblicherweise keine Region einschließen, die reich an hydrophoben Aminosäuren sind, wie z.B. jene Aminosäuren, die in einer TCR-Transmembranregion gefunden werden.

[0196] Die polyspezifischen Bindungsmoleküle, die hierin bereitgestellt werden, können mittels Standardverfahren modifiziert werden, so dass sie eine Vielzahl kovalent verknüpfter Protein-Tags (Effektoren) einschließen. Beispielsweise können dem Bindungsmolekül ein oder mehrere Effektoren oder Tags hinzugefügt werden, um eine Brückenbildung zwischen gebundenen Zellen zu visualisieren und/oder die Erkennung, Schädigung oder Abtötung durch Immunzellen zu verstärken ("to boost"). Potentielle Stellen zum Hinzufügen der Effektoren oder Tags schließen den sc-TCR-, sc-Fv- oder Immunglobulin-Schwerkettenteil (sofern vorhanden) ein. Bevorzugte Tags verleihen im Allgemeinen eine gewünschte biologische, chemische oder physikalische Eigenschaft.

[0197] Weitere Beispiele für geeignete Protein-Tags schließen Polypeptidsequenzen ein, die eine Ladung bei physiologischem pH aufweisen, wie z.B. 6 × HIS. In diesem Fall wäre eine geeignete synthetische Matrix zum Aufreinigen des polyspezifischen Bindungskomplexes z.B. eine im Handel erhältliche Metallo-Sepharose, wie z.B. Ni-Sepharose oder eine andere derartige geeignete Matrix, die dazu fähig ist, 6 × HIS bei etwa pH 6-9 zu binden. Das EE-Epitop und das myc-Epitop sind weitere Beispiele für geeignete Protein-Tags, wobei diese Epitope spezifisch von einem oder mehreren im Handel erhältlichen monoklonalen Antikörpern gebunden werden können. Effektormoleküle können mit den polyspezifischen Bindungskomplexen mittels eines heterobifunktionalen Proteinvernetzungsmittels, wie z.B. SPDP, Carbodiimid oder dergleichen, konjugiert werden. Siehe Meany und Feeney, supra; Wong, supra.

[0198] Für einige Anwendungen wird es nützlich sein, die polyspezifischen Bindungskomplexe der Erfindung in nicht-rekombinanter Weise durch nicht-genetische Mittel zu modifizieren. Beispielsweise können die Bindungskomplexe eine Vielfalt von pharmazeutischen Mitteln zusätzlich zu jenen, die oben stehend beschrieben sind, wie Wirkstoffe, Enzyme, Hormone, Chelatbildner, die dazu fähig sind, z.B. ein Radionuklid zu binden, sowie andere Proteine und Polypeptide, die zur Diagnose oder Behandlung einer Krankheit nützlich sind, einschließen. Für diagnostische Zwecke kann das polyspezifische Bindungsmolekül entweder markiert ("labeled") oder unmarkiert sein. Zum Beispiel kann eine breite Vielfalt von Markierungen in geeigneter Weise eingesetzt werden, wie z.B. Radionuklide, "fluors", Enzyme, Enzymsubstrate, Enzym-Co-Faktoren, Enzyminhibitoren, Liganden, wie z.B. Haptene, und dergleichen.

[0199] Für manche Anwendungen wird es wünschenswert sein, ein polyspezifisches Bindungsmolekül durch Einschließen einer fusionierten Peptidlinkersequenz zu positionieren. Mehrere geeignete Peptidlinker und Verfahren zum Testen dieser sind beschrieben worden. In manchen Fällen kann es nützlich sein, dem fusionierten Peptidlinker gemäß gut bekannter Techniken ein Agens bzw. Mittel hinzuzufügen. Beispiele für verwendbare Agenzien bzw. Mittel schließen photometrisch detektierbare Markierungen, wie z.B. einen Farbstoff oder ein "fluor"; ein Enzym (z.B. β -Galactosidase, alkalische Phosphatase oder Meerrettich-Peroxidase; welche Enzyme dazu fähig sind, eine photometrisch detektierbare Markierung zu bilden) ein. Siehe im Allgemeinen das

US-Patent Nr. 5,434,051 für eine Diskussion geeigneter photometrisch detektierbarer Markierungen. Alternativ können die Agenzien bzw. Mittel direkt mit den hierin offenbarten polyspezifischen Bindungsmolekülen konjugiert werden, und zwar durch eine Vielfalt anderer Mittel, die einen Peptidlinker nicht betreffen, wobei einige von diesen offenbart sind.

[0200] Ferner können die polyspezifischen Bindungsproteine der Erfindung, sofern gewünscht, post-translational modifiziert werden, z.B. durch Kohlenhydrat- oder Fettsäure-Addition. Zum Beispiel können die Bindungsmoleküle durch Glycosylierung modifiziert werden. Glycosylierungsstellen auf Proteinen sind im Fachgebiet bekannt und sind typischerweise entweder N-verknüpft (Asparagin-verknüpft) oder O-verknüpft (Serin- oder Threonin-verknüpft). Derartige Glycosylierungsstellen können durch Untersuchung der Proteinsequenz leicht identifiziert werden. Die vorliegenden Bindungsmoleküle können durch geeignete eukaryotische Zellen glycosyliert werden, wie z.B. durch SDS-PAGE-Gelelektrophorese nachgewiesen. SDS-PAGE-Gelelektrophorese und andere verwandte Verfahren können mit herkömmlichen biochemischen Techniken, wie z.B. enzymatischem Verdau, kombiniert werden, um ein Kohlenhydrat, das an die polyspezifischen Bindungsproteine der Erfindung gebunden ist, zu detektieren. Beispiele für bevorzugte verdauende Enzyme schließen z.B. Endoglycosidasen und Exoglycosidasen ein, die z.B. bei New England Biolabs (Beverly MA) erhältlich sind. Demgemäß können die polyspezifischen Bindungsmoleküle der Erfindung leicht auf das Vorhandensein von Kohlenhydratgruppen, insbesondere Oligosaccharidgruppen analysiert werden.

[0201] In manchen Fällen kann es nützlich sein, im Wesentlichen reine polyspezifische Bindungsmoleküle der Erfindung in glycosylierter Form zu erhalten. Insbesondere können derartige glycosylierte Moleküle in vivo weniger Abbau aufweisen, wenn sie als therapeutisches Mittel verabreicht werden, wodurch die Kreislaufhalbwertszeit erhöht wird (siehe z.B. Goto, M. et al., Bio/Technology, 6:67 (1988)).

[0202] Insbesondere sind die vorliegenden polyspezifischen Bindungsmoleküle auch für eine Vielzahl von in vitro- und in vivo-Verwendungen, einschließlich diagnostischer und Bildgebungsanwendungen, sowie HLA-Typisierung geeignet. Siehe z.B. A.K. Abbas, Cellular and Molecular Immunology, Seite 328 (W.B. Saunders Co., 1991). Für in vivo-Bildgebungsanwendungen kann ein polyspezifisches Bindungsprotein von Interesse detektierbar durch Hinzufügung bzw. Addition von ^{125}I , ^{32}P , ^{99}Tc oder einer anderen detektierbaren Markierung detektierbar markiert werden. Die markierten polyspezifischen Bindungsmoleküle können dann an einen Säuger verabreicht werden und das Subjekt mittels bekannter Verfahren abgetastet bzw. gescannt werden. Eine derartige Analyse des Säugers könnte die Diagnose und Behandlung einer Zahl von Erkrankungen, einschließlich z.B. unerwünschte Expression von APCs, begleitend Immunsystemerkrankungen, unterstützen.

[0203] Die Molekulargewichte der vorliegenden polyspezifischen Bindungsmoleküle werden in Abhängigkeit von einer Zahl von Faktoren, einschließlich, ob ein bestimmtes Bindungsmolekül ein oder mehrere sc-TCR-Moleküle einschließt, welche spezifische Antikörperbindungsdomäne eingeschlossen ist, ob eine Volllängen- C_κ - oder - C_λ -Kette vorhanden ist, oder ob ein oder mehrere Protein-Tags eingesetzt werden, variieren. Im Allgemeinen wird das Bindungsmolekül in Ausführungsformen, in denen das polyspezifische Bindungsmolekül als eine Einzelkette vorliegt, ein Molekulargewicht von etwa 80 bis 100 kDa, und insbesondere von etwa 90 bis 100 kDa aufweisen. In dieser Ausführungsform werden die V- α - und V- β -Ketten des sc-TCRs ein Molekulargewicht von mehr als etwa 16 kDa, typischerweise von etwa 12 bis etwa 20 kDa, aufweisen. Zusätzlich werden, in Ausführungsformen, in denen das sc-Fv eine V- H - und eine V- L -Kette einschließt, die Ketten ein Molekulargewicht von mehr als etwa 18, typischer etwa 12 bis etwa 20 kDa, aufweisen. Das Molekulargewicht eines spezifischen Bindungsmoleküls wird von mehreren Parametern, einschließlich der Zahl vorhandener sc-TCR- oder sc-Fv-Moleküle, abhängen.

[0204] Wie diskutiert, sind einige der hierin beschriebenen polyspezifischen Bindungsmoleküle mehrkettige Moleküle und insbesondere bispezifische chimäre Antikörper. Siehe die [Fig. 7A](#) und [Fig. 7B](#). Typischerweise werden die mehrkettigen Moleküle ein Molekulargewicht von etwa 150 bis etwa 250 kDa oder mehr, abhängig z.B. von der Zahl der vorhandenen sc-TCR- oder sc-Fv-Moleküle, aufweisen. Alle der oben genannten Molekulargewichte werden mittels herkömmlicher Molekulargrößenbestimmungsexperimente, wie z.B. SDS-PAGE-Gelelektrophorese oder Zentrifugation, bestimmt. Siehe im Allgemeinen Sambrook et al., *supra*, Harlow und Lane, *supra*; Ausubel et al., *supra*.

[0205] In einigen Situationen kann es nützlich sein, die Valenz eines bestimmten polyspezifischen Bindungsmoleküls zu erhöhen. Beispielsweise besteht ein Weg zum Erhöhen der Valenz eines polyspezifischen Bindungsmoleküls darin, zwischen einem und vier Bindungsmoleküle (die gleichen oder verschiedene) kovalent zu verknüpfen, indem z.B. Standard-Biotin-Streptavidin-Markierungstechniken angewendet werden, oder durch Konjugation mit geeigneten festen Trägern, wie z.B. Latexkügelchen. Chemisch vernetzte Proteine (z.B.

zu Dendrimeren vernetzt) sind auch geeignete polyvalente Spezies. Beispielsweise kann ein Protein modifiziert werden, indem Sequenzen, die für Aminosäurereste mit chemisch reaktiven Seitenketten, wie z.B. Cys oder His, codieren, eingeschlossen werden. Derartige Aminosäuren mit chemisch reaktiven Seitenketten können in einer Vielzahl von Positionen im Fusionsprotein, vorzugsweise distal zur Bindungsregion des sc-TCR oder sc-Fv, positioniert werden.

[0206] Als spezifisches Beispiel kann der C-Terminus des polyspezifischen Bindungsmoleküls kovalent mit einem Proteinaufreinigungs-Tag oder einem anderen fusionierten Protein, welches eine derartige reaktive Aminosäure/derartige reaktive Aminosäuren einschließt, verknüpft werden. Geeignete Seitenketten können eingeschlossen werden, um zwei oder mehr Fusionsproteine mit einem geeigneten Dendrimerpartikel chemisch zu verknüpfen, wodurch ein multivalentes bzw. mehrwertiges Molekül erhalten wird. Dendrimere sind synthetische chemische Polymere, die eine beliebige aus einer Zahl verschiedener funktioneller Gruppen auf ihrer Oberfläche aufweisen können (D. Tomalia, Aldrichimica Acta, 26:91:101 (1993)). Beispielhafte Dendrimere zur Verwendung gemäß der vorliegenden Erfindung schließen z.B. E9-Starburst-Polyamindendrimer und E9-Combust-Polyamindendrimer, ein, welche Cysteinreste binden ("link") können.

[0207] Hochgradig nützliche in vitro- und in vivo-T-Zell-Bindungsassays sind offenbart worden. Die offensichtlichen T-Zell-Bindungsassays können verwendet oder leicht angepasst werden, wenn es nötig ist, die Funktion der polyspezifischen Bindungsproteine dieser Erfindung zu untersuchen.

[0208] Die Fähigkeit eines polyspezifischen Bindungsproteins der vorliegenden Erfindung, die Aktivität einer Immunzelle, und insbesondere einer T-Zelle zu modulieren (d.h. Bewirken oder Hervorrufen von T-Zell-Aktivität, wie Proliferation), kann gemäß den Assays und Materialien zur Durchführung der bekannten Assays leicht bestimmt werden. Siehe auch Matsui et al. (1994) PNAS ((USA) (1994) 91:12862.

[0209] Spezieller können in vitro-Assays durchgeführt werden, um festzustellen, ob ein Molekül dazu fähig ist, die T-Zell-Aktivität zu modulieren. Derartige Assays können modifiziert werden, um die Funktionalität der polyspezifischen Bindungsproteine festzustellen. Im Allgemeinen wird ein beispielhafter Assay wie folgt, durch die unten stehenden sequenziellen Schritte 1-4, durchgeführt. T-Zellen exprimieren geeigneterweise einen Marker, der untersucht werden kann und der eine T-Zell-Aktivierung oder eine Modulation der T-Zell-Aktivität nach einer Aktivierung anzeigt. Somit kann, wie in den früheren Anmeldungen offenbart, das murine T-Zell-Hybridom DO11.10, das nach einer Aktivierung Interleukin-2 (IL-2) exprimiert, eingesetzt werden. IL-2-Konzentrationen können gemessen werden, um festzustellen, ob ein bestimmtes sc-TCR-Fusionsmolekül dazu fähig ist, die Aktivität des T-Zell-Hybridoms zu modulieren (z.B. steigende IL-2-Produktion). Ein allgemeines Beispiel für einen derartigen geeigneten Assay wird durch die nachstehenden sequenziellen Schritte durchgeführt:

1. Geeignete T-Zell-Hybridome oder T-Zellen werden erhalten.
2. Das T-Zell-Hybridom oder die T-Zellen werden dann unter Bedingungen, die eine Proliferation erlauben, kultiviert.
3. Das proliferierende T-Zell-Hybridom oder die proliferierenden T-Zellen werden dann mit einem oder mehreren der polyspezifischen Bindungsproteine in Kontakt gebracht. Die Zellen werden typischerweise nicht proliferieren (d.h. sie sind ruhend) bis das polyspezifische Bindungsprotein zusammen mit geeigneten Zielzellen zugegeben wird.
4. In Fällen, in denen Nicht-Hybridom-T-Zellen eingesetzt werden, wie z.B. naive T-Zellen, kann es nützlich sein, einen geeigneten co-stimulatorischen Faktor zum Bereitstellen von Signalen, die zur Aktivierung nötig sind, zuzugeben. Die T-Zell-Hybridome oder T-Zellen werden nachfolgend auf einen Marker untersucht, z.B. wird die IL-2-Produktion gemessen. In Ausführungsformen, in denen ein bispezifisches Molekül verwendet wird, ist die Produktion von IL-2 ein Weg, um das Ausmaß, in dem das bispezifische Molekül die T-Zell-Antwort modifizieren kann, zu bewerten. Bevorzugt sind bispezifische Bindungsmoleküle, die eine Brückenbildung zwischen Zellen ("cell bridging") bereitstellen und eine etwa 2- bis etwa 3-fache Erhöhung von IL-2 gegenüber einer geeigneten Kontrolle (z.B. eine nicht-stimulierte T-Zelle) erleichtern. Weiterhin bevorzugt sind bispezifische Moleküle, die, wenn sie ohne zugegebene Immunzellen verwendet werden, nicht in einer Stimulation und in signifikanter IL-2-Produktion, wie durch den oben stehenden erwähnten allgemeinen Assay gemessen, resultieren werden. Das heißt, dass die Zugabe des polyspezifischen Bindungsmoleküls ohne Zugabe von Zielzellen nicht in einer signifikanten T-Zell-Stimulation (d.h. IL-2-Produktion) resultieren wird. Siehe das unten stehende Beispiel 14 für einen spezifischeren Assay.

[0210] Wie zuvor offenbart, werden die in den Assays eingesetzten T-Zellen üblicherweise unter Bedingungen, die für eine Proliferation geeignet sind, inkubiert. Beispielsweise wird ein DO11.10-T-Zell-Hybridom geeigneterweise bei etwa 37°C und 5% CO₂ in komplettem Kulturmedium (RPMI 1640, supplementiert mit 10% FBS, Penicillin/Streptomycin, L-Glutamin und 5 × 10⁵ M 2-Mercaptoethanol) inkubiert. Serielle Verdünnungen

eines Fusionsproteins können dem T-Zell-Kulturmedium in Konzentrationen zugegeben werden, die typischerweise im Bereich von 10^{-8} bis 10^{-5} M liegen. Die T-Zell-Aktivierungssignale werden bevorzugt durch Antigen-präsentierende Zellen bereitgestellt, die mit dem geeigneten Antigen beladen worden sind.

[0211] Wie zuvor offenbart, kann die Modulation der T-Zell-Aktivierung, anstelle der Messung eines exprimierten Proteins, wie IL-2, geeigneterweise durch Änderungen in der Antigen-abhängigen T-Zell-Proliferation festgestellt werden, wie durch radioaktive Markierungstechniken, wie sie auf dem Fachgebiet anerkannt sind, gemessen wird. Zum Beispiel kann ein detektierbares markiertes (z.B. tritiertes) Nucleotid in ein Assay-Kulturmedium eingeführt werden. Der Einbau eines solchen markierten Nucleotids in die DNA dient als ein Maß der T-Zell-Proliferation. Dieser Assay ist nicht geeignet für T-Zellen, die keine Antigenpräsentation zum Wachstum erfordern, z.B. T-Zell-Hybridome. Er ist geeignet zur Messung der Modulation der T-Zell-Aktivierung bei untransformierten T-Zellen, die aus Säugern isoliert werden. Die T-Zell-Proliferation infolge des Kontakts mit dem Fusionsprotein (nur in Gegenwart von Peptid/MHC-Zielzellen) zeigt an, dass das Molekül die Aktivität der T-Zellen moduliert und eine Immunantwort supprimieren kann. Der in vitro-T-Zell-Proliferationsassay ist zum Messen der Wirkungen von Fusionsproteinen auf Antigen-spezifische Änderungen in der T-Zell-Kolonieexpansion in vivo bevorzugt. Die Messung der IL-2-Produktion oder T-Zellproliferation kann eingesetzt werden, um festzustellen, ob das polyspezifische Bindungsprotein zum Modifizieren der T-Zell-Aktivierung fähig ist.

[0212] Weiterhin bevorzugte bispezifische Bindungsmoleküle schließen jene ein, die dazu fähig sind, die CTL-Abtötung gewünschter Zielzellen zu vermitteln, wie durch einen Zytotoxizitätsassay, wie einen herkömmlichen Chrom (Cr^{51})-Freisetzungssassay, gemessen. In einer spezifischen Ausführungsform wird der Chromfreisetzungssassay verwendet, um die CTL-Abtötung zu messen. Die Zellabtötung kann, sofern gewünscht, durch eine Anzahl geeigneter Mittel, einschließlich der Messung des freigesetzten Chroms, überwacht und quantifiziert werden. Der Chromfreisetzungssassay ist leicht zur Verwendung mit beinahe jedem hierin offenbarten polyspezifischen Bindungsmolekül und geeigneten Tumorzellzielen adaptierbar. Bevorzugt sind bispezifische Bindungsmoleküle, die dazu fähig sind, zwischen mindestens etwa 10 bis 15% Lyse, bezogen auf die spontane Freisetzung aus geeigneten Kontrollzellen, freizusetzen. Siehe das unten stehende Beispiel 18 für spezifische Information hinsichtlich des Chromfreisetzungssassays.

[0213] Im Allgemeinen werden geeignete T-Zellen für die Assays durch transformierte T-Zell-Linien, wie z.B. T-Zell-Hybridome oder T-Zellen, isoliert aus einem Säuger, z.B. einem Primaten, wie z.B. aus einem Menschen oder aus einem Nager, wie z.B. ein(e) Maus, Ratte oder Kaninchen, bereitgestellt. Andere geeignete T-Zellen schließen ein: 1) T-Zell-Hybridome, die öffentlich erhältlich sind oder mittels bekannter Verfahren hergestellt werden können, 2) T-Helfer-Zellen und 3) T-zytotoxische-Zellen, vorzugsweise zytotoxische CD8+-Zellen. T-Zellen können mittels bekannter Verfahren aus einem Säuger isoliert werden. Siehe z.B. R. Shimonkevitz et al., J. Exp. Med., (1983) 158:303.

[0214] Damit zusammenhängende in vitro- und in vivo-Assays zum Untersuchen von sc-TCR-Molekülen sind beschrieben worden. Derartige Assays können leicht für die Verwendung mit den vorliegenden polyspezifischen Bindungsmolekülen nach Bedarf adaptiert werden.

[0215] Siehe das unten stehende Beispiel 14 für einen besonders bevorzugten Assay zum Detektieren der Stimulation von T-Hybridomzellen unter Verwendung bevorzugter bispezifischer Hybridmoleküle.

[0216] Die vorliegende Beschreibung stellt zusätzliche Verfahren zum Untersuchen der einzelkettigen und mehrkettigen polyspezifischen Bindungsproteine, die hierin offenbart sind, bereit. Zum Beispiel kann die Funktionalität des sc-TCR- oder Antikörper-bindenden Teils der Bindungsmoleküle leicht durch eine Vielzahl spezifischer Bindungssassays gezeigt werden. Bevorzugte Bindungssassays überwachen die spezifische Bindung zwischen dem Antikörper-bindenden Teil und einem gewünschten Zelloberflächenprotein, und quantifizieren diese vorzugsweise. Bevorzugte spezifische Bindungssassays schließen Western-Blotting, ELISA, RIA, Mobilitäts-Verschiebungssassay ("mobility shift assay"), Enzymimmunassay, kompetitive Assays, Sättigungssassays, zytometrische Assays oder andere Proteinassays, die auf dem Fachgebiet bekannt sind, ein. Bevorzugt sind Assays, die dazu fähig sind, ein Zelloberflächenprotein, z.B. einen TCR, ein Glycoprotein oder ein anderes geeignetes Molekül, zu detektieren.

[0217] Ein bevorzugter Assay zum Analysieren der vorliegenden polyspezifischen Bindungsmoleküle ist ein ELISA-Assay. Zum Beispiel werden in einer Ausführungsform geeignete Wirtszellen, die ein gewünschtes bispezifisches Hybridmolekül exprimieren, in einem ELISA-Format unter Verwendung eines Antikörpers, der zur spezifischen Bindung des Hybridmoleküls fähig ist, gescreent bzw. durchmustert. Bevorzugt sind bispezifische Hybridmoleküle, die ein Protein-Tag, wie z.B. ein EE-getaggetes bzw. -markiertes Molekül, einschließen. In die-

sem Fall können die getagten Moleküle unter Verwendung von im Handel erhältlichen Antikörpern, die den Tag spezifisch binden, untersucht werden. Der gebundene Antikörper kann zweckdienlicherweise unter Verwendung eines Standard-ELISA, z.B. durch Bindung eines zweiten detektierbar markierten Antikörpers, der den Antikörper, der den EE-Tag erkennt, bindet, detektiert werden. Alternativ kann das bispezifische Hybridmolekül mit einem Antikörper untersucht werden, der den sc-TCR oder die Antikörperbindungsdomäne, und insbesondere das sc-Fv bindet, untersucht werden.

[0218] Die oben stehend beschriebenen ELISA-Assays können verwendet werden, um beinahe jedes der hierin offenbarten polyspezifischen Bindungsproteine zu detektieren und zu charakterisieren. Weiterhin können die ELISA-Assays dazu verwendet werden, um Zellen auf die Fähigkeit, ein gewünschtes polyspezifisches Bindungsprotein zu exprimieren, zu screenen. Siehe Beispiel 3 und die [Fig. 9A](#), [Fig. 9B](#), [Fig. 10A](#), [Fig. 10B](#) und [Fig. 11](#) für Ergebnisse illustrativer ELISA-Assays.

[0219] Weiter bevorzugte Assays zum Analysieren der vorliegenden polyspezifischen Bindungsproteine schließen Western-Immunblots ein. Kurz gesagt, kann ein bestimmtes polyspezifisches Bindungsprotein, wie z.B. ein bispezifisches Hybridmolekül, durch herkömmliche Gelelektrophorese aufgetrennt und auf ein geeignetes Trägermedium transferiert werden. Der transferierte Blot kann dann mittels einer breiten Vielfalt von Antikörpern, wie z.B. jene, die den sc-TCR oder die Antikörperbindungsdomäne, z.B. das sc-Fv, spezifisch binden, untersucht werden. Gebundener Antikörper kann mittels Standard-Detektionsverfahren sichtbar gemacht werden. Siehe die unten stehenden Beispiele und [Fig. 12](#).

[0220] Weiter bevorzugte Assays zum Analysieren der vorliegenden polyspezifischen Bindungsproteine umfassen die Durchflusszytometrieanalyse. Zum Beispiel kann die spezifische Bindung zwischen dem sc-TCR- oder sc-Fv-Teil eines bispezifischen Hybridproteins und einem Glycoprotein oder einem anderen geeigneten Marker, exprimiert auf einer Zelle, mittels Durchflusszytometrieanalyse festgestellt werden. In einem spezielleren Beispiel werden T-Hybridomzellen oder andere geeignete Zellen, die das CD3-Molekül exprimieren, mit dem bispezifischen Hybridmolekül unter Bedingungen, die zur Bildung eines spezifischen Bindungskomplexes führen, in Kontakt gebracht. Die Zellen werden dann gewaschen und mit einem detektierbar markierten Antikörper (z.B. biotinyliert), spezifisch für eine V-Kette des sc-TCR oder einen Protein-Tag, gebunden an das bispezifische Hybridmolekül (z.B. der EE-Tag), in Kontakt gebracht. Ein chromogener Standardassay wird dann unter Verwendung von markiertem Streptavidin und spektralphotometrischen Detektionsverfahren durchgeführt. Die Funktionalität des sc-Fv kann durch Färbung der T-Hybridomzellen gezeigt werden. Eine unspezifische Färbung kann mittels einer Vielzahl von Verfahren, einschließlich der Verwendung von T-Hybridom-Zellen, die das CD3-Molekül nicht exprimieren, detektiert werden. Für einige Anwendungen kann es nützlich sein, die Bindungsspezifität durch Einschließen eines geeigneten Antikörpers, der mit dem bispezifischen Hybridprotein um die Bindung der Zellen kompetitieren kann, zu prüfen. Bevorzugte bispezifische Bindungsproteine werden eine Erhöhung an Cytochrom von etwa 5- bis 1000-fach und vorzugsweise von etwa 10- bis 100-fach, im Vergleich zu einer geeigneten Kontrolle, aufweisen. Siehe Beispiel 15 und die [Fig. 17](#)-[Fig. 19](#) für Ergebnisse einer Durchflusszytometrieanalyse.

[0221] Wie diskutiert, betrifft die vorliegende Beschreibung rekombinante Bakteriophagen, die Fusionsproteine einschließen, die sc-TCR- oder sc-Fv-Moleküle, fusioniert mit einem geeigneten Bakteriophagenprotein oder Fragment davon, umfassen. Wie diskutiert, sind sc-Fv-Fusionsproteine, die ein Bakteriophagenhüllprotein umfassen, im Fachgebiet bekannt. Verfahren zur Herstellung und Verwendung von sc-TCR-Fusionsproteinen, die ein Bakteriophagenhüllprotein umfassen, sind offenbart worden im US-Patent Nr. 5,759,817. Es wird aus den Beispielen, die folgen, ersichtlich werden, dass die offebarten Verfahren nach Bedarf adaptiert werden können, um die Herstellung der vorliegenden rekombinanten Bakteriophagen zu erleichtern.

[0222] Spezieller zeigen bzw. präsentieren ("display") die vorliegenden rekombinanten Bakteriophagen Fusionsproteine, die jeweils einen sc-TCR oder ein sc-Fv, verknüpft mit einem Bakteriophagenhüllprotein oder -fragment, einschließen. Bevorzugte rekombinante Bakteriophagen dieser Erfindung sind bispezifisch und weisen die Bindungsspezifität der sc-TCR- und sc-Fv-Fusionsproteine auf. Das sc-TCR-Fusionsprotein schließt im Allgemeinen ein Bakteriophagenhüllprotein oder ein Fragment davon, kovalent verknüpft mit einer V_H-Kette, fusioniert mit einer V_L-Kette, vorzugsweise durch eine flexible Peptidlinkersequenz, ein. Vorzugsweise ist das Bakteriophagenhüllprotein ein Gen III- oder Gen VIII-Bakteriophagenprotein. Das sc-Fv-Fusionsprotein schließt typischerweise ein Bakteriophagenhüllprotein oder -fragment, kovalent verknüpft mit der V_H- oder V_L-Kette, vorzugsweise durch ein flexibles Peptidlinkerprotein, ein.

[0223] Wie hierin verwendet, schließt "Bakteriophagenhüllprotein" das Vollängen-Hüllprotein ein. Ein geeignetes Fragment dieses Hüllproteins ist dazu fähig, die Verpackung des sc-TCR oder sc-Fv und das Zeigen

("displaying") des sc-TCR oder sc-Fv als eine Fusionsproteinkomponente auf der Bakteriophagenhülle zu erleichtern. Eine erfolgreiche Verpackung kann auf zahlreiche Weisen, einschließlich Plaque-Assays, die die Produktion infektiöser Partikel quantifizieren, gezeigt werden. Eine spezifischere Offenbarung, betreffend Verfahren zur Herstellung und Verwendung, der Bakteriophagen, kann in den unten stehenden Beispielen 21, 24, 26-28 gefunden werden.

[0224] In einer Ausführungsform zeigen die rekombinanten Bakteriophagen sc-TCR- und sc-Fv-Fusionsproteine, die jeweils optional ein oder mehrere fusionierte Protein-Tags (typischerweise ein oder zwei) einschließen. Die Anheftung von wenigstens einem Protein-Tag hat mehrere Vorteile, einschließlich der Bereitstellung eines unkomplizierten Weges der Aufreinigung der Bakteriophagen aus Zellbestandteilen, die sie begleiten können. Bevorzugt sind Protein-Tags, die eine chemische oder immunologische Erkennung des Bakteriophagen erleichtern, wie z.B. jene spezifischen Tags, die nachstehend beschrieben werden. Ein besonders bevorzugter Tag ist die EE-Sequenz.

[0225] Insbesondere können die sc-TCR- und sc-Fv-Fusionsproteine der rekombinanten Bakteriophagen nahezu jedes hierin beschriebene sc-TCR- oder sc-Fv-Molekül einschließen. Zum Beispiel kann das sc-TCR-Fusionsprotein kovalent in Sequenz verknüpft einschließen: 1) eine V- α -Kette, 2) eine geeignete Peptidlinkersequenz, 3) eine V- β -Kette, 4) eine C $_{\beta}$ -Kette und 5) ein erstes Bakteriophagenhüllprotein oder -fragment. Das sc-Fv-Fusionsprotein kann kovalent in Sequenz verknüpft einschließen: 1) eine V $_{\text{H}}$ -Kette, 2) eine geeignete Peptidlinkersequenz, 3) eine V $_{\text{L}}$ -Kette und 4) ein zweites Bakteriophagenhüllprotein oder -fragment. Das erste und zweite Bakteriophagenhüllprotein kann das gleiche oder verschieden sein, abhängig von der Menge oder Qualität des gewünschten Zeigens ("display").

[0226] In Ausführungsformen, in denen der rekombinante Bakteriophage Fusionsproteine einschließt, die jeweils ein sc-TCR- oder sc-Fv-Fusionsprotein umfassen, wird auf diesen Bakteriophagen hierin manchmal als ein "bispezifischer Bakteriophage" oder einfach "bispezifischer Phage" Bezug genommen. Beispielformen derartige bispezifische Phagen schließen jene ein, die einen gewünschten sc-TCR, fusioniert mit dem Gen VI-II-Bakteriophagenprotein, und das sc-Fv, fusioniert mit dem Gen III-Protein, zeigen. In einigen Fällen kann es jedoch nützlich sein, rekombinante bispezifische Bakteriophagen herzustellen, die den sc-TCR, fusioniert mit dem Gen III-Protein, und das sc-Fv, fusioniert mit dem Gen VIII-Protein, zeigen.

[0227] Gegebenenfalls kann ein Protein-Tag kovalent mit dem C-Terminus des C- β -Fragments und dem N-Terminus des Gen III-Bakteriophagenproteins verknüpft sein. Ferner wird ein sc-TCR-Fusionsprotein offenbart, das einen ersten Protein-Tag, kovalent verknüpft zwischen dem C-Terminus der V- β -Kette und dem N-Terminus des Gen III-Bakteriophagenproteins, und einen zweiten Protein-Tag, kovalent verknüpft mit dem C-Terminus des Fusionsproteins, einschließt.

[0228] Weiterhin offenbart wird ein sc-TCR-Fusionsprotein, das kovalent in Sequenz verknüpft einschließt: 1) eine V- α -Kette, 2) eine Peptidlinkersequenz, 3) eine V- β -Kette, kovalent verknüpft mit einem C- β -Kettenfragment, und 4) ein Gen VIII-Bakteriophagenprotein. Offenbart wird ebenfalls ein sc-TCR-Fusionsprotein, das kovalent in Sequenz verknüpft einschließt: 1) eine V- α -Kette, kovalent verknüpft mit einem C- α -Kettenfragment, 2) eine Peptidlinkersequenz, 3) eine V- β -Kette, kovalent verknüpft mit einem C- β -Kettenfragment, und 4) ein Gen VIII-Bakteriophagenprotein. In dieser Ausführungsform kann der sc-TCR ferner einen ersten Protein-Tag, kovalent verknüpft mit dem C-Terminus der V- β -Kette und dem N-Terminus des Gen VIII-Proteins, und einen zweiten Protein-Tag, kovalent verknüpft mit dem C-Terminus des Fusionsproteins, einschließen. Zusätzlich kann ein Protein-Tag kovalent verknüpft sein mit dem C-Terminus des C- β -Kettenfragments und dem N-Terminus des Gen VIII-Proteins.

[0229] Sofern gewünscht, können die rekombinanten Bakteriophagen so manipuliert werden, dass sie Valenzen von etwa 2 bis 10 und vorzugsweise von etwa 2 bis 3 aufweisen. Das heißt, die Bakteriophagen können so formatiert werden, dass sie einschließen: 1) von etwa 2 bis 3 sc-TCR-Fusionsproteine, 2) von etwa 2 bis 3 sc-Fv-Fusionsproteine oder 3) von etwa 2 bis 3 sc-TCR- und sc-Fv-Fusionsproteine. Derartige polyspezifische Bakteriophagen sind hochgradig nützlich, z.B. wenn es wünschenswert ist, die Avidität oder Bindungsaffinität eines sc-TCR- oder sc-Fv-Fusionsproteins, gezeigt auf dem Bakteriophagen, zu erhöhen.

[0230] Die vorliegende Beschreibung stellt auch Verfahren zur Herstellung der hierin beschriebenen rekombinanten polyspezifischen Bakteriophagen bereit. Zum Beispiel werden, in einer Ausführungsform, bakterielle Wirtszellen mit Polynukleotiden, die für einen sc-TCR oder ein sc-Fv codieren, in denen der/das codierte sc-TCR oder sc-Fv mit einem geeigneten Bakteriophagenhüllprotein oder -fragment fusioniert ist, transfiziert. In Betracht gezogen werden auch Polynukleotide, die für ein funktionelles Fragment des sc-TCR oder sc-Fv

codieren. In Betracht gezogen werden auch Polynucleotide, die für mehrfache Kopien (d.h. etwa 2 bis 5) des sc-TCR oder sc-Fv codieren.

[0231] Die vorliegenden rekombinanten Bakteriophagen können mittels einer oder einer Kombination von Strategien produziert werden. Bevorzugt sind Verfahren, die bakterielle Wirtszellen, wie z.B. E. coli, verwenden, die zu der Bakteriophagenpropagation führen. In einer speziellen Ausführungsform würden die Wirtszellen mit einem Polynucleotid, das für das sc-TCR-Fusionsprotein codiert, unter Bedingungen transfiziert, die hinreichend sind, um dieses als Teil der Bakteriophagenhülle oder des Capsids zu zeigen bzw. zu präsentieren. Die Wirtszelle kann zur gleichen Zeit oder zu einer späteren Zeit mit einem Polynucleotid, das für das sc-Fv-Fusionsprotein codiert, unter Bedingungen transfiziert werden, die auch zum Zeigen bzw. Präsentieren des sc-Fv-Fusionsproteins auf dem Capsid führen. Die Produktion der polyspezifischen Bakteriophagen kann, sofern gewünscht, mittels einer Vielzahl herkömmlicher Verfahren, wie z.B. RIA, ELISA, Western-Immunblot und Affinitätschromatographie, detektiert und quantifiziert werden.

[0232] In einer weiteren Ausführungsform werden die rekombinanten polyspezifischen Bakteriophagen hergestellt, indem geeignete Wirtszellen mit "monospezifischen" rekombinanten Bakteriophagen, die unabhängig die hierin beschriebenen sc-TCR- oder sc-Fv-Fusionsproteine tragen, infiziert werden. Eine spezifischere Offenbarung in Bezug auf derartige Bakteriophagen kann im US-Patent Nr. 5,759,817 gefunden werden. In einer spezifischeren Ausführungsform können z.B. die polyspezifischen Bakteriophagen hergestellt werden, indem geeignete bakterielle Wirtszellen zuerst mit einem monospezifischen Bakteriophagen infiziert werden, und dann die gleichen Wirtszellen mit dem anderen monospezifischen Bakteriophagen infiziert werden. Alternativ kann die Infektion durch Co-Infizieren mit beiden monospezifischen Bakteriophagen durchgeführt werden.

[0233] Es wird geschätzt werden, dass die Verfahren zur Herstellung der rekombinanten polyspezifischen Bakteriophagen in hohem Maße flexibel sind. Das heißt, dass die Reihenfolge, in der die Wirtszellen mit einem speziellen Polynucleotid (oder rekombinantem Bakteriophagen) transfiziert (oder infiziert) werden, nicht wichtig ist, solange der resultierende rekombinante Bakteriophage die beabsichtigten Bindungsspezifitäten aufweist. Die rekombinanten Bakteriophagen bieten eine Anzahl wichtiger Verwendungen und Vorteile. Zum Beispiel zeigen bzw. präsentieren die Bakteriophagen vorzugsweise sc-TCR- und sc-Fv-Moleküle von Volllänge oder beinahe vollständiger Länge. Demgemäß beeinflusst die Verwendung der vorliegenden Bakteriophagen-Bibliotheken die Analyse von sc-TCR- und sc-Fv-Molekülen, insbesondere sc-TCR- und sc-Fv-Bindungstaschen, positiv.

[0234] Die rekombinanten Bakteriophagen sind besonders nützlich für ein breites Spektrum von Durchmusterungen ("screens"), wie z.B. jenen, die so formatiert sind, dass sie die spezifische Bindung eines sc-TCR- und von sc-Fv-Molekülen detektieren und bewerten. Die Bakteriophagen sind auch nützlich zum Analysieren einer Vielzahl von Bindungsmolekülen, wie z.B. Antigene, Antikörper, kleine Moleküle, Superantigene und MHC/HLA-Peptidkomplexe. Es ist bedeutsam, dass die vorliegenden Bakteriophagen-Displaybibliotheken Fusionsproteine mit einer V- α - und einer V- β -Kette exprimieren, wodurch die Herstellung von Fusionsproteinen, die für TCRs, die in vivo gefunden werden, vollständiger repräsentativ sind, ermöglicht wird.

[0235] Weiterhin können die Bakteriophagen manipuliert werden, um die Bildung spezifischer Bindungskomplexe zwischen den Bakteriophagen und gewünschten Bindungsmolekülen oder sogar Zellen zu maximieren, wodurch die Detektion der Bindungsmoleküle oder Zellen, die selten oder schwach bindend sein können, erhöht wird. Die Bakteriophagen sind insbesondere für Biopanning-Techniken (z.B. Zell-Panning und Immunpanning) zugänglich.

[0236] Wie diskutiert, können die rekombinanten Bakteriophagen und Bakteriophagen-Bibliotheken in Kit-Form bereitgestellt werden. Der Kit kann rekombinante Bakteriophagen, die einen einzelnen Typ von sc-TCR und sc-Fv zeigen bzw. präsentieren, einschließen. Alternativ kann der Kit eine rekombinante Bakteriophagenbibliothek einschließen, wobei die Bibliothek in diesem Fall eine Vielzahl verschiedener sc-TCR- und sc-Fv-Fusionsproteine einschließen wird. Spezifischere Kits schließen ferner passende Wirtszellen und/oder Reagenzien zur Detektion der Bakteriophagen, z.B. Antikörper, und Anweisung zur Verwendung des Kits ein.

[0237] Die vorliegende Beschreibung erwähnt auch eine Vielzahl von Verfahren zur Verabreichung wenigstens eines polyspezifischen Bindungsproteins an einen Säuger und vorzugsweise einen Nager oder einen Primaten, wie z.B. einen menschlichen Patienten. In einer Ausführungsform wird z.B. ein Verfahren zum Verabreichen eines Polynucleotids, das für ein polyspezifisches Bindungsmolekül und insbesondere ein einzelkettiges polyspezifisches Bindungsmolekül codiert, bereitgestellt. Bevorzugt werden Polynucleotide, die das einzelkettige Bindungsmolekül in dem Säuger exprimieren können. Vorzugsweise wird DNA, die die codierenden

Regionen des Bindungsproteins trägt, geeigneterweise unter der Kontrolle eines starken eukaryotischen Pro-motors, wie z.B. eines starken viralen Promotors (z.B. CMV) direkt in die Skelettmuskulatur des Subjekts gemäß bekannter Verfahren injiziert. Verfahren zur Verabreichung von Plasmid-DNA, Aufnahme dieser DNA durch Zellen des Subjekts, an das verabreicht wurde, und Expression des Proteins sind beschrieben worden (siehe J. Ulmer et al., *Science*, (1993) 259:1745-1749). In Ausführungsformen, in denen das polyspezifische Bindungsmolekül an einen Säuger und insbesondere einen Menschen verabreicht wird, ist es bevorzugt, dass der Isotyp des Moleküls mit dem eingesetzten Wirt kompatibel ist.

[0238] Wie zuvor festgestellt, haben die polyspezifischen Bindungsproteine der vorliegenden Erfindung therapeutische Anwendungen. Zum Beispiel, wie diskutiert, können die Bindungsmoleküle verwendet werden, um die Spezifität einer bestimmten Immunzelle und insbesondere einer T-Zelle, CTL, CD8+-Zelle, NK-Zelle oder eines Makrophagen umzuleiten bzw. neu auszurichten, um eine gewünschte Zielzelle, die MHC exprimiert, wie z.B. eine virusinfizierte oder eine Tumorzelle, zu eliminieren. Die Vernetzung der Immunzellen mit den Zielzellen stellt eine wirksame bzw. starke Immunantwort bereit, die ausreicht, um die Zielzelle zu schädigen oder abzutöten.

[0239] Weiterhin können die hierin beschriebenen polyspezifischen Bindungsproteine verabreicht werden, um eine Immunantwort in einem Säuger zu verringern oder zu eliminieren, z.B. um einen Säuger, wie z.B. einen Menschen, der an Krebs und einer Infektionskrankheit leidet oder dafür empfänglich ist, zu behandeln. Zur Behandlung geeignet sind jene Subjekte, die an einer unerwünschten Immunantwort leiden oder wahrscheinlich daran leiden, z.B. Patienten, die sich einer Transplantationsoperation, wie z.B. der Transplantation von Herz, Niere, Haut oder anderen Organen, unterziehen. In Situationen, die mit einer Transplantatabstoßung zusammenhängen, kann ein Behandlungsprotokoll geeigneterweise vor der chirurgischen Vorgehensweise begonnen werden.

[0240] Die Verabreichung der hierin beschriebenen polyspezifischen Bindungsmoleküle kann über beliebige geeignete Mittel, wie z.B. Verabreichung einer therapeutisch wirksamen Menge des Fusionsproteins oder des für dieses codierenden Polynukleotids erfolgen. In einigen Ausführungsformen, in denen eine DNA-Verabreichung gewünscht wird, kann es hilfreich sein, zwei oder mehr Polynukleotide, codierend für Teile eines gewünschten polyspezifischen Bindungsproteins, bereitzustellen, wie etwa, wenn die Verwendung eines bispezifischen Hybridmoleküls gewünscht wird.

[0241] Eine Zahl spezifischer Herangehensweisen kann eingesetzt werden, um gewünschte Zielzellen gemäß der vorliegenden Erfindung zu verringern oder abzutöten. Zum Beispiel stellt ein Behandlungsverfahren zum Schädigen und vorzugsweise Abtöten von Zielzellen die Verabreichung einer therapeutisch wirksamen Menge eines gewünschten polyspezifischen Bindungsmoleküls zum Verknüpfen von Zielzellen, die einen MHC-Komplex exprimieren, mit spezifischen Immunzellen, die ein Zelloberflächenantigen exprimieren, bereit. Die Assoziation zwischen den Zielzellen und den Immunzellen erleichtert eine Immunreaktion, die die Zielzellen schädigt und vorzugsweise eliminiert. In einigen Ausführungsformen kann, nach Bedarf, mehr als ein polyspezifisches Bindungsmolekül verabreicht werden. In einigen Fällen können T-Zell-vermittelte Immunantworten, wie z.B. T-Zell-Proliferation, -Differenzierung, -Aktivierung oder B-Lymphozyten-Stimulation, selektiv kontrolliert werden.

[0242] Die hierin beschriebenen polyspezifischen Bindungsproteine können einem Sauger mittels Injektion, z.B. intraperitoneale oder intravenöse Injektion, verabreicht werden. In bevorzugten Ausführungsformen werden die polyspezifischen Bindungsproteine vorzugsweise durch bzw. aus Säuerzellen oder anderen geeigneten Zellen produziert und vor der Verwendung aufgereinigt, so dass sie im Wesentlichen oder vollständig frei von Pyrogenen sind. Die optimale Dosis für eine gegebene therapeutische Anwendung kann durch herkömmliche Mittel bestimmt werden und wird im Allgemeinen in Abhängigkeit von einer Zahl von Faktoren, einschließlich des Verabreichungswegs, des Patientengewichts, der allgemeinen Gesundheit, des Geschlechts und anderer derartiger Faktoren, die vom Fachmann auf dem Gebiet erkannt werden, variieren.

[0243] Die Verabreichung kann in einer Einzeldosis oder einer Reihe von Dosen, getrennt durch Intervalle von Tagen oder Wochen, erfolgen. Der Begriff "einzelne Dosis", wie hierin verwendet, kann eine solitäre Dosis sein und kann auch eine Dosis mit anhaltender Freisetzung sein. Das Subjekt kann ein Säuger (z.B. ein Mensch oder Tierbestand, wie z.B. Rinder und Haustiere, wie z.B. Hunde und Katzen) sein und eine Behandlung als eine pharmazeutische Zusammensetzung einschließen, welche wenigstens ein polyspezifisches Bindungsprotein und typischerweise ein derartiges Protein umfasst. Derartige pharmazeutische Zusammensetzungen der Erfindung werden gemäß Verfahrensweisen, die im Fachgebiet bekannt sind, hergestellt und verwendet. Zum Beispiel können Formulierungen, die eine therapeutisch wirksame Menge des Bindungsproteins enthalten,

ten, in Einzeldosis- oder Mehrfachdosisbehältern, z.B. verschlossene Ampullen und Glasfläschchen bzw. Vials, bereitgestellt werden und können in einem gefriergetrockneten (lyophilisierten) Zustand gelagert werden, wobei nur die Zugabe des sterilen Flüssigkeitsträgers, z.B. Wasserinjektionen, unmittelbar vor der Verwendung erforderlich ist. Liposomenformulierungen können auch für viele Anwendungen bevorzugt sein. Andere Zusammensetzungen zur parenteralen Verabreichung werden auch geeignet sein und schließen wässrige und nicht-wässrige sterile Injektionslösungen ein, die Antioxidanzien, Puffer, Bakteriostatika und gelöste Stoffe, welche die Formulierung mit dem Blut des beabsichtigten Empfängers isotonisch machen, enthalten können; und wässrige und nicht-wässrige sterile Suspensionen, die Suspendiermittel und Verdickungsmittel einschließen können, ein.

[0244] Verwendungen der Erfindung, die das Verringern oder Eliminieren von Zielzellen, die z.B. einen Tumor- oder Viruspeptid-beladenen MHC exprimieren, einschließen, können in Kombination mit anderen Therapien, wie z.B. antiviralen, immunsuppressiven, Antikrebs- oder anti-inflammatorischen Therapien verwendet werden, um ein wirksameres Behandlungsregime bereitzustellen. Zum Beispiel können die polyspezifischen Bindungsproteine dieser Erfindung mit spezifischen antiviralen Mitteln, wie z.B. jene, die zum Verringern oder Eliminieren einer Retrovirusinfektion, und insbesondere einer Infektion mit dem AIDS-Virus, verwendet werden, verwendet werden. Weiterhin können die polyspezifischen Bindungsproteine mit Standard-Antikrebs-Therapien, wie z.B. Chemotherapie oder Immuntherapie verwendet werden.

[0245] Wie zuvor erwähnt, kann es in manchen Fällen nützlich sein, Antikörper gegen die hierin beschriebenen polyspezifischen Bindungsproteine oder Fragmente davon zu erzeugen.

[0246] Wie oben stehend erwähnt, können die hierin beschriebenen polyspezifischen Bindungsmoleküle leicht durch eine oder eine Kombination von Strategie(n) modifiziert werden, um die Bindung zu verbessern.

[0247] Im Wesentlichen reine lösliche Fusionsproteine oder Nucleinsäuren sind zu wenigstens etwa 90 bis 95% rein und vorzugsweise zu wenigstens 98 bis 99% oder mehr rein für eine pharmazeutische Verwendung. Sobald sie partiell oder zu wesentlicher Reinheit aufgereinigt sind, können die löslichen Fusionsproteine therapeutisch (einschließlich extrakorporeal) oder in der Entwicklung oder Durchführung von in vitro- oder in vivo-Assays, wie hierin offenbart, verwendet werden.

[0248] Die folgenden nicht-einschränkenden Beispiele sind für die Erfindung erläuternd.

Beispiel 1 – Konstruktion von p-149-Einzelketten (sc)-TCR

[0249] Der T-Zell-Klon, p-149, erkennt ein Peptidfragment (STPPPGTRV, SEQ ID NO: 10) des humanen Wildtyp-Tumorsuppressorproteins p53, restriktiert bzw. geschnitten durch HLA-A2.1. (Siehe Theobald et al., PNAS, 1995). Das T-Zell-Rezeptorgen wurde in ein Einzelkettenformat von drei Domänen kloniert, für das zuvor gezeigt worden war, dass es löslichen TCR und funktionelle Rezeptormoleküle produziert ([Fig. 1A](#)).

[0250] Kurz gesagt, wurde mRNA aus dem T-Zell-Klon isoliert und cDNA wurde unter Verwendung des Marathon-cDNA-Amplifikationskits (Clontech) hergestellt. Die cDNA wurde als Matrize in einer Polymerasekettenreaktion (PCR) mit den Primern KC171 und KC174 verwendet, um ein 5'SfiI3'Spel-Vα-Kettenfragment, einschließlich der ersten sieben Aminosäuren des N-Terminus der Ca-Kette, zu produzieren. Die gleiche cDNA wurde dann als PCR-Matrize mit den Primern KC172 und KC176 verwendet, um ein 5'Xhol-3'XmaI-V-beta-C-beta-Kettenfragment zu erzeugen. Die C-beta-Kette wurde genau vor dem Cysteinrest an Aminosäure 127 der Volllangen-C-beta-Kette trunkiert bzw. verkürzt.

[0251] Die alpha- und beta-Kettenfragmente wurden zur DNA-Sequenzbestimmung in das pGEM-T Easy Vector System (Promega) kloniert. Korrekte Fragmente wurden restriktionsverdaut und in Restriktionsvektor pKC60 kloniert, um ein V-alpha-(G₄S)₄-V-beta-C-beta-sc-TCR-Molekül zu schaffen. Der pKC60-Vektor wird hierin als PSUN23 ([Fig. 3](#)) bezeichnet. Der pKC60-Vektor ist in der anhängigen US-Anmeldung Nr. 08/813,731 beschrieben worden. Der neue Vektor wurde pNAG2 genannt ([Fig. 4](#)).

[0252] Das E. coli-DNA-Konstrukt pNAG2 wurde dann mittels PCR mit den Primern KC203 und KC208 reamplifiziert, um ein 5'AgeI-3'HpaI/BspEI/NruI/Clal-DNA-Fragment zu erzeugen. Das sc-TCR-Fragment wurde zur DNA-Sequenzbestimmung in das pGEM-T Easy Vektor System kloniert.

[0253] Dieser neue pGEM-basierte Vektor wurde dann als "Shuttlevektor" zur Einführung anderer DNA-Fragmente verwendet, um ein bispezifisches sc-Molekül zu schaffen.

1. Klonierung und Expression varianter p-149-sc-TCR-Formen in E. coli.

[0254] Es ist möglich, den p-149-sc-TCR in einer Vielzahl nützlicher Konstrukte bereitzustellen. Zum Beispiel können vier Variationen des pSUN21-Konstrukts, unten stehend beschrieben, verwendet werden, um den sc-TCR zu exprimieren. Es ist gefunden worden, dass der Level an löslichem sc-TCR erhöht ist, wenn der sc-TCR in dem pSUN21-sc-TCR-Design, das in [Fig. 1B](#) gezeigt ist, exprimiert wird. Daher wird eine initiale Klonierung unter Verwendung dieses einzelkettigen Konstrukts als Matrize bewerkstelligt werden. Wie beschrieben, wird eine zweistufige Klonierungsverfahrensweise verwendet werden, um den sc-TCR in den Expressionsvektor einzubauen. Wie diskutiert, ist die p-149-cDNA, die für die Volllängen-alpha- und -beta-Ketten dieses Rezeptors codiert, kloniert worden. Damit verwandte Klonierungsverfahren können zum Herstellen der Varianten verwendet werden.

[0255] Zum Beispiel wird eine Variante des p-149-TCR-Konstrukts dem DO11.10-sc-TCR, kloniert in den Vektor pSUN21, stark ähneln. Dieses Konstrukt enthält die $\text{V}\alpha$ -Domäne, einen Bereich von 10-25 Aminosäuren, gefolgt von einem (G4S)4-Linker, und die $\text{V}\beta/\text{C}\beta$ -Domänen. Eine EE-Tag-Sequenz wird in die carboxyterminale Region eingeschlossen werden. Diese erleichtert die Detektion der Moleküle auf Immunblots und kann zur Vernetzung von sc-TCR-Molekülen verwendet werden. Ein geringfügig modifiziertes zweites Konstrukt wird für eine BirA-Stelle (siehe unten stehendes Beispiel 24) am carboxyterminalen Ende codieren. BirA ist als eine Biotinylierungssequenz charakterisiert worden und ist verwendet worden, um tetramere Formen von MHC-Molekülen zu produzieren. Siehe Altman et al., *Science*, 274, 94-96 (1996). Die Stelle wird zum Konstruieren tetramerer sc-TCR-Moleküle zur Bewertung des sc-TCR in Zellbindungs- und Blockierungsassays verwendet werden. In Betracht gezogen wird auch die Konstruktion monomerer Formen durch Vernetzung des sc-TCR mit dem sc-Fv, enthaltend die BirA- bzw. Avidin (siehe unten stehendes Beispiel 24) -Tags. Die Hinzufügung der BirA-Stelle durch genetische Manipulation weist einen Vorteil auf gegenüber traditionelleren Biotinylierungsverfahren, die auf chemischen Vernetzungsprotokollen beruhen. In manchen Fällen resultiert die Verwendung solcher Kupplungsmittel in der Denaturierung des Proteins, welche vermieden werden könnte, indem eine Stelle zur Biotinylierung auf dem Genlevel codiert wird. Ein weiterer Vorteil davon die BirA-Stelle zu haben, ist, dass stöchiometrisch ein eins:eins Molverhältnis von sc-TCR:sc-Fv zusammengesetzt werden kann.

[0256] In einem weiteren Beispiel kann eine p-149-sc-TCR-Variante hergestellt werden, die die DNA, die für die jun-Sequenz codiert, enthalten wird. Diese wird als ein 3'-DNA-Fragment in das sc-TCR-Design kloniert. Die sc-TCR/jun-Fusion wird für eine Vernetzung mit der sc-Fv/fos-Fusion verfügbar sein.

[0257] In noch einem weiteren Beispiel einer p-149-Variante kann ein Fusionsprotein hergestellt werden, wobei die carboxyterminale Region des $\text{C}\beta/\text{EE}$ -Tags genetisch mit pVIII, dem Haupthüllprotein filamentöser Phagen, fusioniert ist. Eine Vielzahl von sc-TCR-Fusionen, die Bakteriophagenproteine, einschließlich der pVIII- und pIII-Proteine, umfassen, sind in der anhängigen US-Anmeldung Nr. 08/813,781 offenbart worden. Wie wir beschrieben haben, wird die Konstruktion eines bispezifischen Phagen (Expression von sowohl sc-TCR- als auch sc-Fv-Fragmenten auf der Oberfläche des Phagen) die eine Form dieses Hybridmoleküls sein. Das Molekül weist eine Vielzahl wichtiger Anwendungen, einschließlich des Abtötens von Tumorzellen in vitro und in vivo durch Bildung einer "Brücke" zwischen CTL und Zielzellen, auf. Der pSUN21-Vektor wird zum Klonieren der sc-TCR/pVIII-Fusion verwendet werden. Der Vektor weist einen lacZ-Promotor auf und ist in der Entwicklung des sc-TCR/Phage-Displaymodells, diskutiert im Abschnitt vorläufige Ergebnisse, verwendet worden. Dieser ist ein modifizierter pBlue Script-Vektor, der Phagen, exprimierend sc-TCR/pVIII-Moleküle, nach Superinfektion mit Wildtyp-Phagen, produzieren kann.

[0258] Wie in den anhängigen US-Anmeldungen Nrn. 08/813,781 und 08/813,781 offenbart, kann eine Vielzahl spezifischer DNA-Vektoren verwendet werden, um einen gewünschten sc-TCR mit Bakteriophagenhüllproteinen zu fusionieren. Zum Beispiel offenbaren die anhängigen US-Anmeldungen die DNA-Vektoren pKC46 (pSUN18) und pKC62 (pSUN19). Diese Vektoren sind gemäß dem Budapest Vertrag bei der American Type Culture Collection (ATCC) hinterlegt worden. Die DNA-Vektoren wurden bei der ATCC am 26. Februar 1997 hinterlegt und erhielten die Eingangsnummern 97895 (pSUN18) und 97896 (pSUN19). Der DNA-Vektor pKC62 (pSUN19) schließt einen phoA-Promotor, eine modifizierte pelB-Sequenz, eine Gen-10-Ribosomenbindungsstelle und ein Gen VIII-Bakteriophagenprotein ein. Der DNA-Vektor pKC46 (pSUN18) schließt den lacZ-Promotor, einen EE-Tag und ein Gen III-Bakteriophagenprotein ein. Die DNA-Vektoren können in *E. coli* oder anderen geeigneten Wirtszellen gemäß Standardverfahren propagiert werden.

[0259] Die DNA-Vektoren pKC46 (pSUN18) und pKC62 (pSUN19) sind dazu konzipiert, eine Vielzahl von $\text{V}\alpha$ -, $\text{V}\beta$ - $\text{C}\beta$ - und Polypeptidlinkersequenzen aufzunehmen. Die $\text{V}\alpha$ -Kette beider DNA-Vektoren kann durch Restriktionsverdau mit S_FI und S_pI entfernt werden. Die $\text{V}\beta$ - $\text{C}\beta$ -Kette kann durch Restriktionsverdau mit

Xhol-XmaI entfernt werden. Weiterhin ermöglichen die DNA-Vektoren den Austausch der Peptidlinkersequenz durch Restriktionsverdau mit SphI und Xhol. Siehe die [Fig. 2A](#)-[Fig. 2E](#) für spezifischere Beispiele von sc-TCR-Konstrukten.

Beispiel 2 – Aufreinigung und Charakterisierung des p-149-sc-TCR

[0260] Die anhängige US-Anmeldung, Aktenzeichen Nr. 08/943,086 offenbart eine Vielzahl von Verfahren zum Aufreinigen von sc-TCR-Proteinen, einschließlich derer, die den DO11.10-sc-TCR umfassen. Diese Verfahren können adaptiert werden, um das p-149-Fusionsprotein aufzureinigen. Zum Beispiel kann zum Aufreinigen des sc-TCR ein Antikörper mit Spezifität für ein Konformationsepitop auf V β 11.0 oder V α 2.3 entsprechend der Vorgaben, die in der anhängigen US-Anmeldung offenbart sind, verwendet werden. Insbesondere kann der p-149-sc-TCR an einer Immunaffinitätssäule unter Verwendung der nachstehenden Verfahrensweise gereinigt werden.

[0261] Eine Zellpaste, erzeugt ausgehend von einem Fermentor, kann im Extraktionspuffer suspendiert werden, gefolgt von mechanischen Lysieren der Zellen mittels Passage durch eine French-Presse. Der Überstand wird mittels Zentrifugation bei 25.000 $\times g$ geklärt und auf eine Q-Sepharose-Säule aufgebracht. Der sc-TCR wird im Durchfluss bzw. Eluat ("flow-thru") gesammelt und dann auf eine Protein-A-Sepharose-Säule, vernetzt mit mAb H57-95, aufgebracht. Dies ist ein Hamster-mAb, der für ein Epitop auf der C-beta-Domäne von murinen TCRs spezifisch ist. Dieser Antikörper zeigt gute Bindungseigenschaften für murine TCRs und ist zuvor verwendet worden, um intakte sc-TCR-Moleküle sowie Bruchstücke bzw. Abbauprodukte aus dem Lysat aufzureinigen. Um die abgebauten oder falsch gefalteten Rezeptoren zu entfernen, wird eine zweite Antikörper-Affinitätssäule verwendet werden, die zwischen sc-TCR, der eine intakte Konformation aufweist, und sc-TCR, der abgebaut worden ist, unterscheiden kann. Gebundener sc-TCR wird unter Verwendung eines 50 mM Glycypuffers, pH 11, eluiert und die sc-TCR-Präparation wird mittels Laufenlassen einer Probe an einem 12%igen SDS-Polyacrylamidgel und Färben mit Coomassie Brilliant Blue oder Western-Blotting analysiert werden.

[0262] Um festzustellen, ob das exprimierte Protein funktionell ist, kann der sc-TCR gemäß Assays, die in den anhängigen US-Anmeldungen, Aktenzeichen 08/813,781 und 08/943,086, offenbart sind, wie z.B. ein Zellbindungsassay und ein Blockierungsassay, untersucht werden. Der Zellbindungsassay kann wie in den anhängigen US-Anmeldungen diskutiert, durchgeführt werden. Alternativ können die Assays durch Bildung von Tetrameren unter Verwendung von sc-TCR-Molekülen, die eine einzelne Biotinsequenz am carboxyterminalen Ende einschließen, modifiziert werden. Siehe unten stehendes Beispiel 24. Die Tetramere werden durch Zufügung von Streptavidin, gekuppelt an PE, und dann Inkubieren dieser Moleküle mit Tumorzellen, die dafür bekannt sind, das 149-Peptid, assoziiert mit HLA-A2.1, natürlicherweise zu prozessieren und zu präsentieren, gebildet. Kontrollen werden Zellen einschließen, die nur das HLA-A2.1-Antigen exprimieren, und Zellen, die weder das HLA-A2.1 noch das Peptid exprimieren. Es wird antizipiert, dass sich ein Peak in der Fluoreszenz von Zellen, die das Peptid, assoziiert mit HLA-A2.1 exprimieren, verschiebt.

Beispiel 3 – Konstruktion, Expression und Charakterisierung des DO11.10-sc-TCR

[0263] Der DO11.10-TCR erkennt das OVA-Peptid (323-339) im Kontext des Klasse II-MHC-IA d -Moleküls. (Siehe Haskins et al., J. Exp. Med., 1983). Das E. coli-DNA-Konstrukt pKC60 wurde mittels PCR mit den Primern KC169 und KC208 reamplifiziert, um ein 5'Agel-3'HpaI/BspEI/NruI/Clal-DNA-Fragment zu erzeugen. Das sc-TCR-DNA-Fragment wurde zur DNA-Sequenzbestimmung in das pGEM-T Easy Vector System kloniert. Die korrekte sc-TCR-DNA wurde dann mit Agel und HpaI restriktionsverdaut und in den "Shuttlevektor" kloniert, wobei das vorherige sc-TCR-DNA-Fragment ersetzt wurde, um ein neues bispezifisches sc-Molekül vom Typ sc-TCR/scSc-Fv zu erzeugen. Das bispezifische DO11.10-sc-Molekül wurde dann in pSUN27 kloniert, um pBISP/DO11.10 zu erzeugen ([Fig. 6](#)).

[0264] Der pBISP/DO11.10-Vektor (pSUN 28) ist gemäß dem Budapester Vertrag bei der ATCC am 03. September 1998 hinterlegt worden und hat die Eingangsnummer 203186 erhalten.

1. Expression von varianten sc-TCR-Molekülen in E. coli.

[0265] Die Wirkung von Änderungen im Design des sc-TCR wurde auf der Ebene der Proteinexpression untersucht. Vektoren, die für die verschiedenen sc-TCR- und Fusionskonstrukte codieren, wurden verwendet, um E. coli-K91-Zellen zu transformieren. Die Expressionsexperimente wurden durchgeführt, indem transformierte K91-Zellen über Nacht in Medien, die anorganisches Phosphat enthielten, um einer Aktivierung des phoA-Pro-

motors und Induzieren der Proteinexpression vorzubeugen, wachsen gelassen wurden. Am folgenden Morgen wurde eine neue Kultur, ausgehend von der Über-Nacht-Kultur begonnen und wachsen gelassen, bis das Phosphat verbraucht war. Die Dauer der Induktion wurde durch Überwachung des Phosphatverbrauchs über die Zeit in der Kultur normalisiert. Siehe die anhängigen US-Anmeldungen, Aktenzeichen 08/813,781 und 08/943,086, für eine weitere Offenbarung bezüglich des Produzierens von sc-TCR-Fusionsmolekülen.

[0266] Um den Expressionslevel zwischen den verschiedenen Konstrukten zu vergleichen, wurde Protein aus Proben zur Analyse aus Zelllysaten, die auf die gleiche Absorptionsablesung bei 600 nm (10 OD/ml) normalisiert worden waren, präpariert. Protein wurde aus den Zellen mittels (Ultra-)Schallbehandlung freigesetzt und die Probe wurde mittels Zentrifugation bei $25.000 \times g$ für 20 Minuten geklärt. Die Proben wurden auf ein 12%iges SDS-PAGE-Gel geladen und, nach Elektrophorese und Transfer der Proteine auf eine Nylonmembran, wurde der TCR durch Untersuchung mit einem Antikörper, der für den EE-Tag spezifisch ist, detektiert. Wir beobachteten in diesem Expressionsexperiment, dass Änderungen im grundlegenden Design des sc-TCR bedeutende Änderungen im Level des exprimierten löslichen Proteins erzeugen können. Zum Beispiel ist das sc-TCR-Konstrukt pSUN22, das die $\text{V}\alpha$ - und $\text{V}\beta$ -Domänen, verbunden durch einen synthetischen Linker, einschließt, in der löslichen Fraktion bei der aufgegebenen Materialkonzentration nicht detektierbar. Ein Signal kann detektiert werden, indem 50-mal mehr Probe aufgegeben wird, obgleich das Signal noch nicht äquivalent ist zu den Leveln, die bei pSUN21 festgestellt werden. Diese Daten weisen daraufhin, dass hohe Level bzw. Konzentrationen an löslichem sc-TCR in *E. coli* produziert werden können, indem das Design des Konstrukts modifiziert wird.

2. Charakterisierung des löslichen sc-TCR

A. Immunpräzipitation

[0267] Die Integrität der Faltung des sc-TCR-Proteins, produziert durch die DNA-Vektoren pSUN23 und pSUN19, wurde analysiert, indem Bindungsassayexperimente unter Verwendung von zwei mAb (MR5-2 und F23.1) mit Spezifität für korrekt gefaltete Epitope auf $\text{V}\beta$ 8.2 durchgeführt wurden. Ferner wurden sc-TCRs mit korrekter Paarung von $\text{V}\alpha$ - mit $\text{V}\beta$ -Ketten unter Verwendung eines Anti-Idiotyp-mAb, KJ1, erzeugt gegen den DO11.10-TCR, untersucht. Die Bindungsassayexperimente sind in den anhängigen US-Anmeldungen, Aktenzeichen 08/813,781 und 08/943,086, beschrieben worden. Die Daten zeigen an, dass das sc-TCR-Protein eine konformationell korrekte $\text{V}\beta$ -Domäne und korrekt gepaarte $\text{V}\alpha$ - und $\text{V}\beta$ -Domänen hat.

B. Enzym-gekoppelter Immunassay (ELISA)

[0268] Ein Sandwich-ELISA-Assay wurde verwendet, um die Faltungsdomänen des sc-TCR weiter zu charakterisieren. Die Verwendung des ELISA-Assays ist in den anhängigen US-Anmeldungen, Aktenzeichen 08/813,781 und 08/943,086, vollständiger beschrieben. Kurz gesagt wurde der sc-TCR in verschiedenen Verdünnungen durch einen Anti-EE-Tag-mAb, als Beschichtung auf Wells, gefangen und unter Verwendung eines der folgenden mAbs, H57 ($\text{C}\beta$), MR5-2 ($\text{V}\beta$ 8.2), F231 ($\text{V}\beta$ 8.2) und KJ1 ($\text{V}\alpha/\text{V}\beta$), detektiert. Diese Daten bestätigen das Vorhandensein eines korrekt gefalteten sc-TCRs und zeigten an, dass der sc-TCR selbst nach Elution bei hohem pH (11,0) und Lagerung bei 4°C für mehrere Wochen stabil ist.

C. Oberflächenplasmonresonanz (BioCore)-Bindungsstudien unter Verwendung von Antikörpern und eines Superantigens.

[0269] Das sc-TCR/Gen-VIII-Fusionsprotein wurde unter Verwendung von Oberflächenplasmonresonanz ("surface plasmon resonance") charakterisiert. Die Technik ist in der anhängigen US-Anmeldung, Aktenzeichen 08/813,781, vollständiger beschrieben. Wie in der anhängigen US-Anmeldung, Aktenzeichen 08/813,781, offenbart, zeigen die Daten, dass die zwei Anti-TCR-mAbs, obwohl sie verschiedene Epitope erkennen, eine sterische Hinderung zeigten, die die Bindung beider mAbs an die beta-Kette in diesem Assayformat verhinderte. Um das Vorhandensein des pVIII-Bakteriophagenproteins auf dem sc-TCR-Fusionsprotein zu zeigen, wurde der sc-TCR durch den Anti-M13-Antikörper gebunden. Die Bindung des *Streptococcus*-Sag, bekannt als SEC3 (Toxin Technology, Tampa FL), an die sc-TCR/Gen-VIII-Fusion ist auch in der anhängigen US-Anmeldung, Aktenzeichen 08/813,781, offenbart. Diese Daten zeigen, zusammen mit den Antikörperbindungsdaten, dass der von *E. coli* produzierte sc-TCR korrekt gefaltet ist.

3. Aufreinigung des DO11.10-sc-TCR

[0270] Verfahren zur Aufreinigung von sc-TCR-Fusionsproteinen sind in den anhängigen US-Anmeldungen,

Aktenzeichen Nrn. 08/813,781 und 08/943,086, offenbart worden. Der DO11.10-sc-TCR kann mittels jener Verfahren, einschließlich des folgenden spezifischen Verfahrens, aufgereinigt werden.

[0271] Das durch den Vektor pSUN23 codierte Fusionsprotein wurde aus transformierten Zellen mittels Immunaffinitätschromatographie gemäß herkömmlicher Verfahren aufgeeinigt. Kurz gesagt wurde die Aufreinigung durchgeführt, indem eine Affinitätssäule durch Kupplung von 4 mg Anti-Idiotyp-Antikörper, KJ1, pro ml Protein-A-beschichteter Sepharose-Kügelchen (Pharmacia) hergestellt wurde. *E. coli*-Lysate wurden durch Solubilisieren von 50 g aus einem Fermentor-stammender Zellpaste in 600 ml Solubilisierungspuffer hergestellt. Die resuspendierten Zellen wurden mittels zweier Passagen durch eine French-Presse lysiert. Unlösliches Material wurde mittels Zentrifugation bei 27.000 g für 30 Minuten entfernt und der Überstand wurde auf eine Q-Sepharose-Anionenaustauschersäule aufgebracht. Das sc-TCR-Protein wurde im Durchfluss bzw. Eluat gesammelt und nachfolgend auf die Antikörpersäule aufgebracht. Gebundener sc-TCR wurde mit einem 50 mM Glycinpuffer, pH 11,0, eluiert und Fraktionen, die Protein enthielten, wurden zur Charakterisierung verwendet.

[0272] Die sc-TCR-Proteinpräparationen wurden mittels Elektrophorese an einem SDS-PAGE-Gel, gefolgt von Färbung mit Coomassie Brilliant Blue, hinsichtlich der Reinheit bewertet. Die Proteinintegrität wurde mittels Immunblotting bestimmt, wobei als Sonde entweder der Antikörper H57-597 oder der Anti-Glu-Glu (EE)-Tag-Antikörper verwendet wurde. Schließlich wurde ein Aliquot von aufgereinigtem sc-TCR unter reduzierenden und nichtreduzierenden Bedingungen laufen gelassen und die Membran wurde nach dem Transfer der Proteine mit dem Anti-EE-Tag-Antikörper untersucht. Die Western-Blot-Ergebnisse zeigten an, dass der aufgereinigte sc-TCR als Monomer vorlag, da sowohl reduzierte als auch nicht-reduzierte Proben mit dem 46kD-Molekulargewichtsmarker wanderten.

Beispiel 4 – Konstruktion von 145-2C11 sc-Fv

[0273] Die Hybridomzelllinie 145-2C11, die einen monoklonalen Anti-Maus-CD3-epsilon-Antikörper produziert, wurde von der American Type Culture Collection erworben. (Siehe Leo et al., PNAS, 1987). Die DNA-Sequenz der für die variable Kette des Antikörpers codierenden Regionen sind über das world wide web verfügbar.

[0274] Das sc-Fv wurde als ein V_L -Linker- V_H -Genkonstrukt konzipiert. (Siehe Jost et al., J. Biol. Chem., 1994). Zuerst wurde ein kürzerer $(G_4S)_3$ -Linker konzipiert und durch Anlagerung komplementärer Oligos, KC245 und KC246, unter Bildung eines 5'Spel-3'Xhol-DNA-Fragments hergestellt. pKC60 wurde mit den geeigneten Restriktionsenzymen restriktionsverdaut, um das vorherige Linker-DNA-Fragment zu entfernen und die Ligation mit den angelagerten Oligos zu ermöglichen.

[0275] Um DNA, die für die V-Regionen des mAb codiert, herzustellen, wurde mRNA aus 10^6 145-2C11-Hybridomzellen isoliert, wobei der RNeasy-Gesamt-RNA-Kit (Qiagen) gemäß den Anweisungen des Herstellers verwendet wurde. V_H -Kette-cDNA wurde hergestellt, indem ein Gemisch, enthaltend den "Rückwärts"-Primer ("back" Primer) KC244, zusammen mit der 145-2C11-mRNA inkubiert wurde. Standardmengen an Nucleotiden und reverser Transkriptase wurden dem Gemisch zugegeben, um cDNA zu bilden. Die V_H -Kette-cDNA wurde auf eine ähnliche Weise hergestellt, mit der Ausnahme, dass der "Rückwärts"-Primer KC253 anstelle des KC244-Primers verwendet wurde. V_L -Kette-cDNA wurde als Matrize mit den Primern KC243 und KC244 in einer PCR-Reaktion verwendet, um ein 5'Sfil-3"Spel- V_L -Kettenfragment von 320 bp zu amplifizieren. V_H -Kette-cDNA wurde als Matrize mit den Primern KC247 und KC253 auf eine ähnliche Weise verwendet, um ein 5'Xhol-3"XmaI- V_H -Kettenfragment von 350 bp zu amplifizieren.

[0276] Die V_L - und V_H -Kettenfragmente wurden zur DNA-Sequenzbestimmung in das pGEM-T-Easy-Vektor-System kloniert. Korrekte Fragmente wurden restriktionsverdaut und in den pKC60-Expressionsvektor, der bereits die oben stehend beschriebene kürzere Linkersequenz enthielt, kloniert.

[0277] Sobald das 145-2C11-sc-Fv komplett war, wurden die DNA-Konstrukte mittels PCR mit den Primern KC250 und KC251 reamplifiziert, um ein 5'BspEI-3'NruI-DNA-Fragment zu erzeugen. Das Fragment wurde zur DNA-Sequenzbestimmung in das pGEM-T-Easy-Vektorsystem kloniert. Die korrekte DNA wurde dann restriktionsverdaut und in den "Shuttlevektor", stromabwärts des sc-TCR, kloniert. Siehe die [Fig. 1C-Fig. 1D](#) für Darstellungen der 145-2C11-sc-Fv (IC)- und F23.1-sc-Fv (ID)-Moleküle.

Beispiel 5 – Konzeption der sc-Molekül-Linkersequenz

[0278] Um den sc-TCR und das scSc-Fv miteinander als einzelkettiges Fusionsprotein zu verbinden, wurden zwei verschiedene Linkersequenzen konzipiert. Ein Satz angelagerter Oligos, KC209 und KC210, codierte für einen Teil der CH1-Domäne der murinen schweren Kette, gefolgt von der Standard-(G4S)-Sequenz. Eine zweite, kürzere Linkersequenz wurde auf ähnliche Weise konzipiert, jedoch ohne die CH1-Domäne, wobei die angelagerten Oligos KC295 und KC296 verwendet wurden. Die Oligos wurden angelagert, um ein 5'HpaI-3'BspEI-DNA-Fragment zu erzeugen. Der "Shuttlevektor" wurde mit den geeigneten Restriktionsenzymen verdaut, um das vorherige Linker-DNA-Fragment zu entfernen und die Ligation von einer der beiden neuen Linkersequenzen zwischen dem sc-TCR und dem sc-Fv zu ermöglichen.

Beispiel 6 – Hinzufügung eines 3'-Peptid-Tags zum sc-Molekül-Konstrukt

[0279] In der oben dargelegten "Shuttlevektor"-Konzeption wurden ein Stopp-Codon und eine Spleißstelle zwischen den NruI- und Clal-Restriktionsstellen als Teil der PCR-Amplifikation des sc-TCR mit dem "Rückwärts"-Primer KC208 eingeführt. Um die nachgelagerte Aufreinigung des bispezifischen sc-Proteins zu unterstützen, wurde ein Satz angelagerter Oligos (KC237 und KC238) zum Einführen eines 3'-EE-Tags (EEEEYMP-ME; SEQ ID NO: 7) mit Stopp-Codon und Spleißstelle konzipiert. Das angelagerte Oligopaar wurde in den "Shuttlevektor", der bereits für das vollständige bispezifische sc-Molekül codierte, 5'NruI-3'Clal kloniert. Alternativ wurden die Oligos KC239 und KC240 (nur Spleißstelle) angelagert und auf gleiche Weise kloniert, um die Expression des bispezifischen sc-Moleküls als ein Maus-kappa-Leichtketten-Fusionsprotein zu ermöglichen.

Beispiel 7 – Vervollständigung des bispezifischen p149-sc-Moleküls

[0280] Nach Klonierung der sc-TCR-, sc-Fv-, Linker- und Tag-DNA-Fragmente in den "Shuttlevektor" zur Vervollständigung der Konzeption bzw. des Designs des bispezifischen sc-Moleküls wurde die DNA restriktionsverdaut (Agel-Clal) und in den Säugerzellexpressionsvektor pSUN27 ([Fig. 5](#)) (zuvor in der anhängigen US-Anmeldung, Aktenzeichen 08/943,086, beschrieben) kloniert, um pBISP/149 zu schaffen ([Fig. 6](#)).

Beispiel 8 – Konstruktion des p149-sc-TCR/IgG-Fusionsmoleküls

[0281] Es ist erkannt worden, dass die Expression des 145-2C11-scSc-Fv alleine, d.h. nicht als Teil eines bispezifischen sc-Moleküls, sehr niedrig ist. Ohne an die Theorie gebunden zu sein, kann der geringe Level an sc-Fv-Expression ein limitierender Faktor in der Expression von bispezifischen Molekülen sein. Die native 145-2C11-Hybridomzelllinie wurde als Antikörperquelle verwendet und die Zellen wurden mit einem sc-TCR, fusioniert mit der murinen IgG2b-Schwerkette ([Fig. 7A](#)-[Fig. 7B](#)), transfiziert. Die transfizierte Hybridomzelllinie sollte einige Chimäre 145-2C11/sc-TCR-Moleküle sezernieren, falls das Hamster-IgG des Wirts wirksam mit der murinen IgG2b-Schwerkette paaren kann.

[0282] Um den p149-sc-TCR als eine IgG-Fusion zu klonieren, wurde zuerst eine interne EcoRI-Restriktionsstelle unter Verwendung ortsgerichteter Mutagenese mutiert. Kurz gesagt, wurde ein Paar komplementärer Oligonukleotide, KC293 und KC294, konzipiert, die die gewünschte Mutation enthalten. Das pNAG2-DNA-Konstrukt wurde mittels PCR unter Verwendung von Pfu-DNA-Polymerase amplifiziert. Das resultierende PCR-Produkt wurde mit DpnI verdaut, welche die Eltern-DNA-Matrize verdaut, wobei die mutierte DNA intakt bleibt. Die mutierte sc-TCR-DNA wurde sequenziert und dann mittels PCR mit den Primern KC276 und KC268 reamplifiziert, um ein 5'NruI-3'EcoRI-DNA-Fragment zu erzeugen. Die mutierte sc-TCR-DNA wurde zur DNA-Sequenzbestimmung in das pGEM-T-Easy-Vektor-system kloniert. Die korrekte sc-TCR-DNA wurde restriktionsverdaut und in den Säugerzellexpressionsvektor pSUN7 kloniert, um das p149-sc-TCR/IgG-Fusionsmolekül zu schaffen.

Beispiel 9 – Konstruktion des DO11.10-sc-TCR/IgG-Fusionsmoleküls

[0283] Das pKC60-DNA-Konstrukt wurde mittels PCR mit den Primern KC275 und KC268 reamplifiziert, um ein 5'-NruI-3'EcoRI-DNA-Fragment zu erzeugen. Das sc-TCR-Fragment wurde zur DNA-Sequenzierung in das pGEM-T-Easy-Vektorsystem kloniert. Die korrekte sc-TCR-DNA wurde restriktionsverdaut und in Säugerzellexpressionsvektor pSUN7 kloniert, um das DO11.10-sc-TCR/IgG-Fusionsmolekül zu schaffen (Siehe [Fig. 7A](#) und [Fig. 7B](#)).

Beispiel 10 – Konstruktion des Maus-IgG2b-Expressionsvektors

[0284] Die Konstruktion des Maus-IgG2b-(schwere Kette)-Expressionsvektors war wie folgt. Das Grundgerüst bzw. die Grundstruktur des Vektors war das Plasmid pCDNA3 (Invitrogen). Das Plasmid wurde mit HindIII und Xhol geschnitten und ein "Leichtketten-Polylinker"-DNA-Fragment wurde inseriert, um den Ausgangs-"Leichtkettenvektor" pCDNA3.LCPL zu schaffen. Dieser Linker enthielt die Restriktionsstellen HindIII, KpnI, Clal, PmII, EcoRV, XmaI, BamHI und Xhol zur Erleichterung nachfolgender Klonierungsschritte. Ein SmaI-BclI-DNA-Fragment, enthaltend einen Leichtkettenleader, ein genomisches Fragment einer Maus-Anti-CKMB-Leichtkette vom kappa-Typ und eine 3'-UTR, wurde in die EcoRV-BamHI-Stellen von pCDNA3.LCPL kloniert. Dann wurde eine Mutagenese durchgeführt, um eine NruI-, MluI- und BstBI-Stelle zu eliminieren und um eine NheI- und BamHI-Stelle einzuführen, um das Plasmid pCDNA3.mut.LCPL.LCVK zu schaffen.

[0285] Der "Schwerkettenvektor" pCDNA3mut.LCPL wurde ausgehend von dem pCDNA3mut.LCPL.LCVK-Plasmid konstruiert, indem die Leichtkettenexpressionsregion (HindIII-Xhol) durch einen "Schwerketten-Polylinker", bestehend aus den Restriktionsstellen HpaI, BspEI, EcoRV, KpnI und Xhol, ersetzt wurde. Dieses Plasmid wurde mit EcoRV und KpnI verdaut. Ein SmaIKpnI-verdautes DNA-Fragment, enthaltend einen Schwerkettenleader und ein genomisches Fragment einer Anti-CKMB-IgG2b-Maus-Schwerkette (siehe Near et al., Molecular Immun., 1990) wurde dann in das EcoRV-KpnI-verdaute Plasmid ligiert. Ein KpnI-Sall-Oligonucleotidfragment, enthaltend eine 3'UTR und eine NotI-Stelle stromaufwärts der Sall-Stelle wurde nachfolgend in das KpnI-Xhol-verdaute Plasmid (die Xhol-Stelle ausschaltend) kloniert, um das Plasmid pCDNA3mut.HCPL.HCV2b zu schaffen, auch bekannt als der Maus-IgG2b-Expressionsvektor pSUN7 ([Fig. 8](#)).

Beispiel 11 – Expression bispezifischer sc-Moleküle

[0286] CHO-Zellen wurden durch Waschen mit kalter DPBS für die Transfektion vorbereitet. Die Zellen wurden in DPBS resuspendiert und mit 10-40 µg Pvul-linearisiertem pBISP/149 oder pBISP/DO 11.10 gemischt. Nach fünf Minuten auf Eis wurden die Zellen elektroporiert, wobei ein Gene Pulser (BioRad)-Satz verwendet wurde, um einen Puls von 250 Volt, 960 µ Fd oder 0,25 µ Fd zu liefern. Die gepulsten Zellen wurden für fünf Minuten auf Eis gegeben. Die Zellen wurden in 10 ml 10% IMDM-Medium (IMDM, 10% FBS, 2 mM Glutamin, 5000 Einheiten/ml Penicillin, 5000 µg/ml Streptomycin) verdünnt und über Nacht bei 37°C mit 10% CO₂ in einem TC-Kolben vom Typ T-25cm² wachsen gelassen. Am nächsten Tag wurden die Zellen in 96-Well-Platten mit Neomycin-Selektivmedium (10% IMDM plus 0,75 mg/ml G418) ausplattiert und alle 3-7 Tage zurückgeführt bzw. wieder gespeist ("refed").

[0287] Transfektanten wurden in einem ELISA-Assayformat auf die Expression von löslichen bispezifischen sc-Molekülen gescreent. EE-getaggte Moleküle wurden unter Verwendung eines Anti-EE-Tag-Antikörpers, mit dem eine 96-Well-Platte über Nacht passiv beschichtet wurde, detektiert. Am Tag des Assays wurden die Platten für 1 Stunde mit 10% FBS/PBS blockiert. Die Wells wurden gewaschen und Überstand aus den Transfektanten wurde zu der Platte gegeben. Nach Inkubation und Waschen wurde biotinylierter Anti-C-beta-mAb H57-597 (die Zelllinie wurde von der ATCC erworben) zu der Platte gegeben, gefolgt von Waschen und Inkubation mit Streptavidin-HRP (Sigma). Positive Wells wurden mittels Zugabe des TMB-Substrats, gequenched mit 1N Schwefelsäure und abgelesen bei einer Absorption von 450 nm, identifiziert. Eine kleine Zahl positiver Klonen wurde zur Expansion selektiert und eine "limiting dilution"-Klonierung wurde durchgeführt, um stabil transizierte Zelllinien zu etablieren ([Fig. 9A](#)-[Fig. 9B](#)).

[0288] Transfektanten wurden auch auf die Expression bispezifischer sc-Moleküle in einem ELISA-Assayformat gescreent, wobei mAbs verwendet wurden, die den sc-TCR spezifisch erkennen, gefolgt von Detektion mit biotinyliertem Anti-C-beta-mAb und Streptavidin-HRP. Für das bispezifische sc-Molekül vom Typ p149-sc-TCR wurde ein konformationaler mAb gegen die V-alpha-Domäne (B20.1, Pharmagen) als Beschichtungsantikörper verwendet. Die bispezifischen sc-Moleküle vom Typ DO11.10 konnten unter Verwendung des antiidiotypischen Anti-DO11.10-TCR-mAb KJ-1 detektiert werden ([Fig. 9A](#)-B, [Fig. 10A](#)-B). Positive Klone wurden wie oben stehend beschrieben detektiert, expandiert und primär kloniert, um stabil transizierte Zelllinien zu etablieren. Es ist gefunden worden, dass die scBISP-Moleküle in Säugerzellen bei hohen Leveln exprimiert werden (1 bis 2 mg/l).

[0289] Die folgenden Informationen werden zum Verständnis der [Fig. 9A](#)-B, [Fig. 10A](#)-B hilfreich sein:

Figur 9A

Verdünnung	OD450
1:2	0,4755
unverdünnt	0,8545

Figur 9B:

Verdünnung	OD450	
1:2	H57	B20.1
unverdünnt	0,206	1,21
	0,511	1,975

Figur 10A:

Verdünnung	OD450	
1:4	Anti-EE	KJ-1
1:2	0,0825	0,5935
unverdünnt	0,186	0,9095
	0,3435	1,1195

Figur 10B:

Verdünnung	OD450		
1:2	Anti-EE	KJ-1	F23.1
unverdünnt	0,185	1,143	1,227
	0,381	1,1655	1,898

Beispiel 12 – Expression von chimären bispezifischen Molekülen

[0290] Die 145-2C11-Hybridomzelllinie wurde entweder mit p149-sc-TCR/IgG-Fusion-DNA oder DO11.10-sc-TCR/IgG-Fusion-DNA transfiziert, wobei das gleiche Verfahren angewendet wurde, wie es oben stehend für die Transfektion des bispezifischen sc-Moleküls beschrieben ist.

[0291] Transfektanten wurden in einem ELISA-Assayformat auf die Expression von löslichen chimären bispezifischen Molekülen gescreent. 96-Well-Platten wurden passiv mit Ziege-Anti-Maus-IgG2b (Caltech) beschichtet. Die Inkubations- und Waschschritte wurden wie oben stehend beschrieben durchgeführt. Ziege-Anti-Hamster-IgG-HRP (Jackson Immuno.) wurde verwendet, um die Wells zu untersuchen ([Fig. 11](#)). Positive Klonen wurden identifiziert, expandiert und primär kloniert, um stabil transfizierte Zelllinien zu etablieren. Die folgenden Informationen werden zum Verständnis von [Fig. 11](#) hilfreich sein:

Konstrukt	OD450
	unverdünnt
BISP/149	1:2
BISP/DO1	0,6305
	0,2985
	0,964
	0,6983

Beispiel 13 – Reinigung von bispezifischem sc-Protein

[0292] Bispezifische sc-Proteine wurden aus Transfektanten-Überständen unter Verwendung von Standard-Affinitätschromatographieverfahren aufgereinigt. Für EE-getaggte Proteine wurde eine Agarosesäule, an die ein Anti-EE-Tag mittels CNBr gekuppelt war, zum Anreichern von Volllängen-sc-Molekülen verwendet. Der Überstand wurde einmal oder mehrmals über das Säulenbett geführt. Nach Waschen mit PBS wurde das gebundene Protein durch die Zugabe von Natriumbicarbonat/Carbonat-Puffer mit hohem pH von der Säule eluiert und durch Zugabe einer 1- bis 10-fachen Verdünnung von 2 M Tris, pH 8,0, neutralisiert. Das gereinigte Protein wurde unter Verwendung einer Konzentrationseinheit mit einer MW-Trenngrenze von 30 kD in PBS umgepuffert. Die endgültige Proteinkonzentration wurde mittels einer OD280-Ablesung festgestellt. Eine Western-Blot-Analyse (untersucht mit Anti-EE-Tag-Antikörper) ([Fig. 12](#)) und Coomassie-Blue-Färbung des aufgereinigten Proteins ([Fig. 13](#)) zeigen eine Anreicherung des bispezifischen Volllängen-sc-Moleküls.

Beispiel 14 – Stimulation von T-Hybridomzellen durch bispezifische sc-Moleküle

[0293] T-Hybridomzell-Stimulationsassays wurden durchgeführt, um zu bewerten, ob die bispezifischen sc-Moleküle biologische Aktivität zeigten. Wir entwickelten ein Arbeitsmodellsystem unter Verwendung des murinen T-Zell-Hybridoms 2B4 (Matsui et al., PNAS USA (1994) 91, 12862). Das 2B4-T-Zell-Hybridom hatte einen β TCR, bestehend aus V 11.0 und V β 3.0 und erkennt die Aminosäurereste 88-104 von Tauben-Cytochrome C, präsentiert im Kontext des MHC-Klasse II-Moleküls IE κ . Mehrere verschiedene immobilisierte Abs, entweder für den DO11.10- oder 149-TCR spezifisch, wurden auf Kreuzreaktivität gegen den 2B4-TCR untersucht, stellten sich aber als unreaktiv gegenüber dem 2B4-TCR heraus. Falls ein immobilisierter Ab Kreuzreaktivität für den 2B4-TCR zeigen würde, würden wir erwarten, eine Stimulation der T-Hybridomzellen und Secretion von IL-2 in den Kulturüberstand zu beobachten. Die bewerteten Abs schlossen zwei, die für den 149-TCR spezifisch waren, den Anti-V2 und den Anti-V β 11, und zwei, die für den DO11.10-TCR spezifisch waren, den Anti-V β 8.0 (F23.1) und den Anti-Idiotyp-mAb (KJ-1), ein. Wir bewerteten auch immobilisiertes IA δ /OVA (das erkennende MHC/Peptid für den DO11.10-TCR), beobachteten aber keinerlei Stimulation. Dann immobilisierten wir diese Moleküle und bewerteten die Aktivität der bispezifischen DO11.10- und 149-sc-Moleküle. Um das bispezifische DO11.10-2C11-sc-Molekül zu untersuchen, beschichteten wir Wells entweder mit KJ-1 oder F23.1. Nach Inkubation über Nacht mit 10^5 2B4-Zellen unter Verwendung verschiedener Mengen an bispezifischen (Molekülen) untersuchten wir den Überstand auf das Vorhandensein von IL-2, welches ein guter Indikator für die Zellstimulation ist. Wie in [Fig. 13](#) gezeigt, aktivierte immobilisierter KJ-1 die Hybridomzellen wirksam. Um zu bewerten, ob eine ähnliche Antwort bzw. Reaktion auftreten könnte, wenn immobilisiertes IA δ /OVA verwendet wird, inkubierten wir die 2B4-Zellen als nächstes über Nacht in Gegenwart von an die Platte gebundener IA δ /OVA mit bispezifischen Molekülen. Das Vorhandensein von IL-2 im Überstand wurde im IL-2-ELISA-Assay nicht detektiert ([Fig. 14](#)), was nahe legt, dass der TCR auf dem bispezifischen (Molekül) den MHC/Peptid-Liganden nicht in einer Weise belegte ("engaging"), die für eine Zellstimulation ausreicht. Auf der Basis dieser und mehrerer anderer Feststellungen schlugen wir vor, dass es wesentlich sein kann, die Avidität bzw. Bindungsfreudigkeit der bispezifischen sc-Moleküle durch Dimerisierung zu verbessern, wobei ein Antikörper verwendet wird, der für den TCR spezifisch ist, aber die bispezifische Bindung an MHC/Peptid nicht stören würde. In unserem Beispiel wählten wir den MR5-2-mAb (PharMingen), der eine Spezifität für ein Epitop auf V β 8.2 aufweist. Nach Untersuchung unter diesen modifizierten Bedingungen beobachteten wir ein Signal in den Wells, die immobilisiertes IA δ /OVA enthielten, detektierten aber kein Signal in Blindproben-Wellen ("blank wells"). Weiterhin erzeugte die Wirkung der Vernetzung des bispezifischen sc-Moleküls in mit KJ-1-mAb beschichteten Wells einen höheren IL-2-Ausstoß, was nahe legt, dass die Dimerisierung des bispezifischen sc-Moleküls vielleicht zu einer stärkeren und/oder unterschiedlichen Signalisierung und Stimulation führt ([Fig. 15](#)).

[0294] Die folgenden Informationen werden zum Verständnis der [Fig. 14](#) und [Fig. 15](#) hilfreich sein:

Figur 14

BISP ng/Well	OD450
2	0,013
3,9	0,036
7,8	0,196
15,6	0,72
31,2	1,01
62,5	1,3375
125	1,746
250	2,066

Figur 15:

Konstrukt	BISP	BISP + MR5
Blindprobe ("Blank")	0	0,12
IAd/OVA	0,01	0,271

[0295] Um das bispezifische sc-Molekül 149-2C11-EE-Tag zu bewerten, beschichteten wir Wells entweder mit Anti-V2.0- oder Anti-V β 11.0-mAb. Blindprobenwells wurden als naive Kontrollen verwendet. Die in diesen Versuchen erzeugten Befunde waren ähnlich zu jenen, die für die bispezifischen sc-Moleküle DO11.10-2C11 berichtet wurden und zeigten, dass wir eine IL-2-Produktion nur in Gegenwart von immobilisiertem Antikörper,

der für den 149-TCR spezifisch ist, beobachteten (Fig. 16). Ferner zeigten wir in diesem Beispiel, dass die Vernetzung durch das bispezifische (Molekül) zum Stimulieren der T-Hybridome wirksam unter Verwendung von löslichem Anti-CD3-F(ab)₂ 145-2C11 blockiert werden konnte. Diese Befunde sprechen in vorteilhafter Weise für funktionelle bispezifische sc-Moleküle und zeigen, dass der Anti-CD3-Teil der bispezifischen (Moleküle) durch direkte Bindung an das CD3-Molekül auf T-Zellen wirkt (Fig. 16).

[0296] Die folgenden Informationen werden zum Verständnis von [Fig. 16](#) hilfreich sein:

Konstrukt	OD450			
	1:2	1:4	1:2/CD3	1:4/CD3
Blindprobe	0,01	0,01	0,01	0,01
RR3-15	1,07	1,03	0,185	0,282
B20.1	1,2	1,08	0,112	0,118

Beispiel 15 – Durchflusszytometrieanalyse für direkte Zellbindungsstudien

[0297] Um die Funktionalität des scSc-Fv-Teils des bispezifischen sc-Moleküls zu zeigen, wurden 2B4-T-Hybridomzellen in Bindungsstudien mit dem aufgereinigten Protein verwendet. 2B4-Zellen zeigen bzw. präsentieren CD3 auf ihrer Oberfläche und korrekt gefaltetes 145-2C11-sc-Fv sollte CD3ε erkennen. Für jede Untersuchungsprobe wurden 10^6 2B4-Zellen mit kalter DPBS gewaschen und in 40 µl 1% FBS/DPBS (Resuspensions- und Waschpuffer) mit oder ohne Zugabe von aufgereinigtem bispezifischem sc-Protein resuspendiert. Nach Inkubation auf Eis wurden die Zellen sanft herabzentrifugiert und mit 0,5 µg biotinyliertem Antikörper resuspendiert (pBISP/149 wurde mit einem Antikörper gegen die Va2-Domäne (B20.1) inkubiert; pBISP/DO11.10 wurde mit einem Antikörper gegen die Vβ8-Domäne (F23.1) inkubiert). Die Proben wurden auf Eis inkubiert, herabzentrifugiert und mit Streptavidin-Cychrome (Becton-Dickenson) resuspendiert. Nach zweimaligem Waschen wurden die Zellen wieder resuspendiert und auf einem FACScan-Instrument (Becton-Dickenson) unter Verwendung der CellQuest-Software (Becton Dickenson) erfasst/analysiert.

[0298] Die Inkubation von 2B4-Zellen entweder mit dem aufgereinigten pBISP/149- oder pBISP/DO11.10-Protein resultierte in signifikanten Verschiebungen bei der Zellfärbung.

[0299] Wenn mehr bispezifisches sc-Protein zugegeben wurde, war die Verschiebung der Fluoreszenz stärker ausgeprägt, was die Fähigkeit des scSc-Fv zum Binden an den CD3 auf der Zelloberfläche zeigt ([Fig. 17](#)-[Fig. 18](#)).

[0300] Die CD3-Bindung ist spezifisch und kann durch die Zugabe von löslichem Anti-CD3, der mit den bispezifischen sc-Molekülen um Bindungsstellen auf der 2B4-Zelloberfläche kompetitiert, blockiert werden ([Fig. 19](#)).

[0301] Die [Fig. 17](#)-[Fig. 19](#) werden im Lichte der folgenden Tabellen I, II und III vollständiger verstanden.

TABELLE I [Figur 17]

Schlüssel	Name	Parameter	Eingrenzung ("Gate")
-	062498.001	FL3-H	keine Eingrenzung
-	062498.002	FL3-H	keine Eingrenzung
-	062498.003	FL3-H	keine Eingrenzung
-	062498.004	FL3-H	keine Eingrenzung

Datei: 062498.001 [kein BISP] Proben-Bezeichnung ("Sample ID"):

2B4 ANTI-VA2-B-SA-CY

Eingrenzung: keine Eingrenzung

Marker	Ereignisse	% einge-grenzt	% gesamt	Mittelwert	Median	Peak-Kanal ("Peak Ch")
Alle	10000	100,00	100,00	7,78	3,19	1

Datei: 062498.002 [1X BISP] Proben-Bezeichnung: 2B4 1UL149 BISP ANTI VA2-B-SA-CY

Eingrenzung: keine Eingrenzung

Marker	Ereignisse	% einge-grenzt	% gesamt	Mittelwert	Median	Peak-Kanal ("Peak Ch")
Alle	10000	100,00	100,00	10,96	7,10	8

Datei: 062498.003 [10X BISP] Proben-Bezeichnung: 2B4 1OUL 149BISP ANTI VA2-B-SA-CY
 Eingrenzung: keine Eingrenzung

Marker	Ereignisse	% einge-grenzt	% gesamt	Mittelwert	Median	Peak-Kanal ("Peak Ch")
Alle	10000	100,00	100,00	88,96	62,08	55

Datei: 062498.004 [25X BISP] Proben-Bezeichnung: 2B4 25UL 149BISP ANTI VA2-B-SA-CY
 Eingrenzung: keine Eingrenzung

Marker	Ereignisse	% einge-grenzt	% gesamt	Mittelwert	Median	Peak-Kanal ("Peak Ch")
Alle	10000	100,00	100,00	186,06	177,83	215

TABELLE 2 [Figur 18]

Schlüssel	Name	Parameter	Eingrenzung ("Gate")
	062498.009	FL3-H	keine Eingrenzung
	062498.010	FL3-H	keine Eingrenzung
	062498.011	FL3-H	keine Eingrenzung
	062498.012	FL3-H	keine Eingrenzung

Datei: 062498.009 [kein BISP] Proben-Bezeichnung: 2B4 ANTI-VB8.2-B-SA-CY
 Eingrenzung: keine Eingrenzung

Marker	Ereignisse	% einge-grenzt	% gesamt	Mittelwert	Median	Peak-Kanal ("Peak Ch")
Alle	10000	100,00	100,00	8,08	2,48	1

Datei: 062498.010 [1X BISP] Proben-Bezeichnung: 2B4 IUL DO11BISP ANTI VB8.2-B-SA-CY
 Eingrenzung: keine Eingrenzung

Marker	Ereignisse	% einge-grenzt	% gesamt	Mittelwert	Median	Peak-Kanal ("Peak Ch")
Alle	10000	100,00	100,00	7,51	3,65	3

Datei: 062498.011 [5XBISP] Proben-Bezeichnung: 2B4 5UL DO11BISP ANTI VB8.2-B-SA-CY
 Eingrenzung: keine Eingrenzung

Marker	Ereignisse	% einge-grenzt	% gesamt	Mittelwert	Median	Peak-Kanal ("Peak Ch")
Alle	10000	100,00	100,00	19,31	14,46	15

Datei: 062498.012 [10XBISP] Proben-Bezeichnung: 2B4 10UL DO11BISP ANTI VB8.2-B-SA-CY
 Eingrenzung: keine Eingrenzung

Marker	Ereignisse	% einge-grenzt	% gesamt	Mittelwert	Median	Peak-Kanal ("Peak Ch")
Alle	10000	100,00	100,00	28,29	24,56	27

TABELLE 3 [Figur 19]

Schlüssel	Name	Parameter	Eingrenzung ("Gate")
-	051398.003	FL3-H	G1
-	051398.002	FL3-H	G1
-	051398.005	FL3-H	G1
-	051398.006	FL3-H	G1

Datei: 051398.003 [kein BISP/kein α C3] Proben-Bezeichnung: 2B4 VA2 CYCH PI
 Eingrenzung: G1

eingegrenzte Ereignisse: 9853 gesamte Ereignisse: 11724

Ereignisse	% eingegrenzt	% gesamt	Mittelwert	Median	Peak-Kanal ("Peak Ch")
9853	100,00	84,04	5,20	4,66	4

Datei: 051398.002 [BISP/kein α CD3] Proben-Bezeichnung: 2B4 BISP VA2 CYCH PI
 Eingrenzung: G1

eingegrenzte Ereignisse: 9907 gesamte Ereignisse: 11420

Ereignisse	% eingegrenzt	% gesamt	Mittelwert	Median	Peak-Kanal ("Peak Ch")
9907	100,00	86,75	8,21	7,84	9

Datei: 051398.005 [kein BISP/kein α CD3] Proben-Bezeichnung: 2B4 ANTI-CD3 VA2 CYCH PI
 Eingrenzung: G1

eingegrenzte Ereignisse: 9905 gesamte Ereignisse: 11715

Ereignisse	% eingegrenzt	% gesamt	Mittelwert	Median	Peak-Kanal ("Peak Ch")
9905	100,00	84,65	5,60	5,14	4

Datei: 051398.006 [BISP/kein α CD3] Proben-Bezeichnung: 2B4 ANTI-CD3 BISP VA2 CYCH PI
 Eingrenzung: G1

eingegrenzte Ereignisse: 9933 gesamte Ereignisse: 11218

Ereignisse	% eingegrenzt	% gesamt	Mittelwert	Median	Peak-Kanal ("Peak Ch")
9933	100,00	88,55	5,43	5,00	5

Beispiel 16 – T-Zellproliferationsassay

[0302] Ein T-Zellassay wurde durchgeführt, um festzustellen, ob das scBisp 149-Molekül eine spezifische T-Zellaktivierung vermitteln könnte. Ein Proliferationsassay wurde unter Verwendung langzeitig kultivierter T-Zellen, kultiviert in Gegenwart von ungepulsten oder 149-Peptid-gepulsten T2 (29)-Zielzellen, die vor der Verwendung in dem Assay in 1% Paraformaldehyd fixiert worden waren, durchgeführt. Es wurden Bedingungen gewählt, um zu untersuchen, ob das scBisp-149-Molekül T-Zellen zum Proliferieren aktivieren könnte, wenn mit ungepulsten oder p149-Peptid-gepulsten T2-Zielzellen inkubiert wird. Der Assay wurde wie folgt durchgeführt. Kurz gesagt wurden Milzen, isoliert aus BALG/c-Mäusen, verwendet, um Splenozytensuspensionen herzustellen. RBCs wurden unter Verwendung von Gey-Lösung lysiert und die gewonnenen Splenozyten wurden für 10-15 Tage bei $1,25 \times 10^6$ Zellen/ml in IMAM-Medien, supplementiert mit 10% fatalem Rinderserum (FBI), enthaltend 50 U/ml an murinem rIL-2, kultiviert. Die Medien wurden alle 3 Tage gewechselt und nicht-adhäsierende Zellen wurden gewonnen, gezählt und zu $1,25 \times 10^6$ Zellen/ml resuspendiert. Vor der Verwendung der Zellen im Proliferationsassay wurden lebende Zellen an einem Ficoll-Hypaque-Dichtegradienten isoliert. Die Kulturen wurden für 3 Tage inkubiert und die T-Zellproliferation wurde unter Verwendung des kolorimetrischen Proliferationsreagenzes WST-1 (Boehringer Mannheim) gemäß den Anweisungen des Herstellers gemessen. Wie in [Fig. 20](#) gezeigt, zeigten nur T-Zellen, inkubiert in Gegenwart von T2-Zellen, die mit dem bispezifischen und dem 149-Peptid beladen waren, eine signifikante Proliferation, während die Kulturen, die in Abwesenheit entweder des 149-Peptids oder des scBishp-149-Moleküls inkubiert wurden, keine Proliferation aufwiesen. Diese Daten waren bedeutsam, da sie den "Machbarkeitsbeweis" ("proof of principle") illustrieren, dass sc-TCRs, verwendet in einem hybriden scBisp-Molekülformat, T-Zell-Antworten auf Zielzellen, die HLA-A2 und das spezifische Peptid präsentieren, vermitteln können.

[0303] Splenozyten wurden aus Milzen, isoliert aus Balb/c-Mäusen, präpariert. Kurz gesagt wurden RBCs durch Lysieren unter Verwendung von Gey-Lösung entfernt und die gewonnenen Splenozyten wurden dann für 10-15 Tage bei $1,25 \times 10^6$ Zellen/ml kultiviert, wobei 50 U/ml an murinem rIL-2 enthalten waren. Die Medien wurden alle 3 Tage gewechselt und nicht-adhäsierende Zellen wurden gewonnen, gezählt und zu $1,25 \times 10^6$ Zellen/ml resuspendiert. Vor der Verwendung der Zellen im Proliferationsassay isolierten wir die lebenden Zellen (hauptsächlich T-Zellen) an einem Ficoll-Hypaque-Dichtegradienten. In diesem Beispiel untersuchten wir, ob das 149-2C11-sc-Molekül erkennendes MHC/Peptid auf präsentierenden Zellen wirksam erkennen und daran binden konnte und die Vernetzung und Aktivierung von T-Zellen erleichtern konnte. Der Proliferationsassay wurde unter Verwendung von langzeitig kultivierten T-Zellen, kultiviert in Gegenwart von ungepulsten oder 149-Peptid-gepulsten T2-Zielzellen, die dann in 1% Paraformaldehyd fixiert wurden, bevor sie im Assay verwendet wurden, durchgeführt. Die Kulturen wurden für 3 Tage inkubiert, und die T-Zellproliferation wurde unter Verwendung des kolorimetrischen Proliferationsreagenzes WST-1 (Boehringer Mannheim) gemäß den Anweisungen des Herstellers gemessen. Nach einer 1-stündigen Inkubation bei 37°C wurden 100 µl des Überstandes in eine Flachbodenplatte zur Ablesung bei einer dualen Wellenlänge (450-620 nm) transferiert. Wie in [Fig. 19](#) gezeigt, zeigten T-Zellen, inkubiert in Gegenwart von T2-Zellen, beladen mit dem bispezifischen und dem 149-Peptid, eine signifikante Proliferation, während die Kulturen, die in Abwesenheit des p149-Peptids oder des bispezifischen (Peptids) inkubiert wurden, keine signifikante Proliferation aufwiesen. Diese Daten unterstützen die oben stehend beschriebenen T-Hybridom-Stimulierungsergebnisse und legen nahe, dass das bispezifische 149-2C11-sc-Molekül biologisch aktiv ist.

Beispiel 17 – Profiling der Cytokinproduktion

[0304] Ein weiterer wichtiger zu bewertender Parameter ist die Fähigkeit des bispezifischen sc-Moleküls, Cytokinantworten zu vermitteln. Die Zytokinproduktion kann mittels eines ELISA-Assays, der für das Cytokin von Interesse spezifisch ist, detektiert werden. 96-Well-Platten werden über Nacht passiv mit Anti-Cytokin "A" beschichtet. Am Tag des Assays werden die Wells für 1 Stunde mit 10% FBS/PBS blockiert, bevor der Überstand aus dem Proliferationstypversuch zugegeben wird. Die Wells werden mit biotinyliertem Anti-Cytokin "A", gefolgt von Inkubation mit Streptavidin-HRP, untersucht. Positive Wells werden durch Zugabe von ABTS-Substrat detektiert und bei einer Absorption von 405 nm ausgelesen.

[0305] Die Cytokinproduktion kann auch intrazellulär unter Verwendung eines Saponinpermeabilisierungsprotokolls betrachtet werden. Die Zellen werden mit Formaldehyd fixiert und dann hinsichtlich des Cytokins von Interesse in Gegenwart von 0,5% Saponin gefärbt. Die Proben können dann unter Verwendung von Durch-

flusszytometrie analysiert werden.

Beispiel 18 – Messung der zytotoxischen Aktivität in vitro

[0306] Einer der wichtigsten zu messenden Parameter wird sein, ob das bispezifische sc-Molekül eine Ziel- oder Tumorzellabtötung vermitteln kann. Diese Assays werden unter Verwendung eines Standard-Cr⁵¹-Freisetzung-CTL-Abtötungsassays durchgeführt werden. Der Assay wird wie folgt durchgeführt werden: Zuerst werden Zielzellen (d.h. Tumore) mit dem Isotop Cr⁵¹ markiert. Das Cr⁵¹ wird von den Tumorzellen aufgenommen und nach Zelllyse durch die spezifisch aktivierte zytotoxischen T-Zellen in den Kulturüberstand freigesetzt. Das freie oder freigesetzte Cr⁵¹ wird dann ausgezählt, und die spezifische Zelllyse wird bestimmt. Wir werden diesen Typ eines Assays verwenden, um die Fähigkeit des sc-Moleküls 149-2C11, Zielzelllyse zu vermitteln, zu bewerten. In unserem Assay werden wir Tumorzelllinien (d.h. MDA-238, BT549 und MCF-7, erhältlich bei der ATCC), die dafür bekannt sind, Oberflächen-HLA-A2 zu exprimieren, und erhöhte Level an Wildtyp-p53 zu produzieren, verwenden. Die Kontrollen werden A2-negative Tumorlinien (Ramos) und A2-positive, aber p53-negative Zelllinien (Saos-2) einschließen.

Beispiel 19 – Erzeugung von bispezifischen Molekülen durch chemische Vernetzung mit Dendrimeren.

[0307] Um das bispezifische Molekül unter Anwendung einer chemischen Vernetzungsherangehensweise zu konstruieren, wurden der 2C11-mAb und der DO11.10-sc-TCR verwendet. Anstelle einer direkten Vernetzung der zwei Moleküle wurden Dendrimere als Gerüst zum Anlagern bzw. Binden der Moleküle verwendet. Dendrimere sind positiv geladene Polyamine, die gleichförmig synthetisiert werden. Da die Größe und Form jedes Dendrimers, das während der Synthese abgeleitet wird, exakt die gleiche ist, resultiert die Zugabe von Proteinen zum Dendrimer in der Bildung von homogenen Molekülen. Das Dendrimer ist auch inert und unter physiologischen Bedingungen löslich. Volllängen-2C11-mAb wurde mittels Pepsin verdaut, um F(ab')₂-Fragmente zu produzieren, die mittels Gelfiltration isoliert wurden. Der F(ab')₂-Peak wurde vereinigt und umgepuffert, und Fab'-Moleküle wurden durch Inkubieren der F(ab')₂-Präparation unter sanften reduzierenden Bedingungen, gefolgt von einer Aufreinigung an einer Größentrennungssäule produziert. Die isolierten Fab'-Moleküle wurden dann direkt durch freie Sulfhydrylgruppen an Sulfo-succinimidyl-(4-iodacetyl)-aminobenzoat (Sulfo-SIAB)-derivatisierte Dendrimere in einem Verhältnis von einem Fab'- zu einem SIAB-derivatisierten Dendrimer gekuppelt. Reaktive Aldehydgruppen wurden an terminalen Kohlenhydratresten des DO11.10-sc-TCR-Moleküls zur Kupplung an freie Aminogruppen auf Dendrimeren erzeugt. Der sc-TCR wurde in einem 1:1-Verhältnis mit dem 2C11-Fab'-Dendrimer gekuppelt, wodurch ein bispezifisches Molekül erhalten wurde. Das bispezifische Molekül wurde hinsichtlich seiner Fähigkeit, T-Hybridomzellen in einem Stimulationsassay zu aktivieren, bewertet. Ein Arbeitsmodellsystem wurde unter Verwendung des murinen T-Zellhybridoms 2B4 entwickelt. Siehe Davis, M.M. et al., Ciba Fund. Symp. (1997). Das 2B4-T-Zellhybridom hat einen β-TCR, bestehend aus V_{11.0} und V_{β3.0} und erkennt die Aminosäurereste 88-104 von Tauben-Cytochrom C, präsentiert im Kontext des MHC-Klasse II-Moleküls IE^k. Als das bispezifische/Dendrimer zu den 2B4-T-Zellen enthaltenden Wells gegeben wurde, wurden hohe Level an IL-2 berichtet, die anzeigen, dass eine Stimulation erfolgt war. Eine weitere Analyse deckte auf, dass die stark positive Ladung auf dem Dendrimerkomplex eine unspezifische Bindung an die T-Zelloberfläche bewirkte, die in einer Stimulation resultierte.

Beispiel 20 – Maus-Modelle: Bewertung der Aktivität des bispezifischen Moleküls in vivo.

[0308] Drei verschiedene etablierte Mausmodelle sind etabliert worden, um die potentielle Tumorsuppressionsaktivität der bispezifischen Moleküle zu bewerten. Das erste Modell schließt die Verwendung eines normalen Mäusestammes (d.h. Balb/c-Maus) und Injizieren pS3/HLA-A2-transformierter EL-4-Zellen in diese Maus ein. Diese Tumorzellen proliferieren schnell und töten die Maus innerhalb weniger Tage. Das folgende Behandlungsprotokoll wird anfänglich verwendet. Um unser bispezifisches Molekül zu bewerten, werden die Mäuse mit 0,5 mg an bispezifischem 149-2C11-sc-Molekül am Tag 0 vorbehandelt werden. Am folgenden Tag werden die Mäuse eine zweite Dosis des bispezifischen sc-Moleküls zusammen mit den p53/A2-positiven transfizierten EL-4-Zellen erhalten. Der zu messende Hauptparameter in diesem Modell wird sein, ob Mäuse, die das bispezifische Molekül erhalten, für einen längeren Zeitraum überleben werden als Kontrollmäuse (solche, die das bispezifische Molekül nicht erhalten). Da die EL-4-Tumorlinien ein derart rasches Wachstum zeigen, kann es für uns erforderlich sein, das Behandlungsregime zu modifizieren, um jegliche erhöhte Überlebenszeit mit dem bispezifischen sc-Molekül zu beobachten.

[0309] Das zweite Modell wird SCID-Mäuse, denen murine Tumore implantiert wurden, die zum Exprimieren von HLA-A2 und humanem Wildtyp p53 transfiziert wurden, verwenden. Dieses Modell läuft üblicherweise für 2 bis 3 Wochen. Kurz gesagt können wir, nach dem Implantieren von Tumoren, das Wachstum des Tumors

messen und dann in diese Mäuse aufgereinigte murine CD8+-T-Zellen einführen und verschiedene Mengen des bispezifischen Moleküls injizieren. In machen Fällen wird es nötig sein, die T-Zellen vorzuaktivieren, und dies wird durchgeführt, indem T-Zellen *in vitro* in Gegenwart von rIL-2 inkubiert werden. Wir werden dann die Wirkung auf das Tumorwachstum und die Änderung der Überlebenszeit bewerten, um festzustellen, ob das bispezifische sc-Molekül eine Anti-Tumor-Aktivität *in vivo* aufweist.

[0310] Das dritte und relevanteste Modell wird die Fähigkeit des bispezifischen sc-Moleküls, eine Tumorabtötung *in vivo* von humanen Tumoren zu vermitteln, bewerten. SCID-Mäusen werden humane Brustkrebslinien (d.h. MDA-238, BT549, MCF-7) implantiert, und diese werden für 4 bis 6 Wochen wachsen gelassen. Dann werden aufgereinigte T-Zellen und Teilmengen-Populationen, voraktiviert *in vivo* mit rIL-2, in die Mäuse eingeführt werden. Die potentielle Anti-Tumor-Aktivität wird festgestellt, indem Tumorverringerung und erhöhte Überlebenszeit gemessen werden. Diese Studien werden verwendet werden, um festzustellen, ob eine "humanisierte" Version des bispezifischen Moleküls konstruiert werden sollte.

Beispiel 21 – "Humanisiertes" bispezifisches sc-Molekül

[0311] Da der Antikörper, der in unserem gegenwärtigen bispezifischen sc-Molekül verwendet wird, für murines CD3ε spezifisch ist, werden wir ihn/es zur Verwendung bei der Behandlung von humanen Neoplasmen zu modifizieren haben. Ferner werden wir die Hybridomtechnologie verwenden, die am wahrscheinlichsten murine mAbs, die spezifisch für humane(s) TCRs oder CD3 sind, isolieren wird, die einer "Humanisierung" unterzogen werden müssen. Die Humanisierung wird durch Durchführen von "CDR-Grafting" erfolgen. Dies hat üblicherweise die negative Wirkung der Verringerung der Bindungsavidität des Abs. Der TCR kann hauptsächlich durch Austauschen der konstanten C-beta-Domäne durch die humane konstante C-beta-Region "humanisiert" werden.

Beispiel 22 – Präsentation von sc-TCR-Fusionsproteinen auf Bakteriophagen

[0312] Wie in der anhängigen US-Anmeldung, Aktenzeichen 08/813,781, offenbart, ist es möglich, eine Vielzahl von sc-TCR-Konstrukten auf der Oberfläche eines fd-Bakteriophagen zu präsentieren. Kurz gesagt, offenbart die anhängige Anmeldung Verfahren zum Exprimieren eines gewünschten sc-TCR mit drei Domänen als eine Fusion mit dem Haupthüllprotein, pVIII, eines filamentösen Phagen. Der Grund dafür ist es, die Valenz des sc-TCR auf der Oberfläche des Phagen zu erhöhen, was in einer Erhöhung der Bindungsfreudigkeit von sc-TCR/pVIII für den MHC/Peptid-Komplex resultieren sollte. Wie in der anhängigen US-Anmeldung, Aktenzeichen 08/813,781, offenbart, präsentieren die sc-TCR-Fusionsproteine auf dem Bakteriophagen einen funktionellen TCR.

A. Charakterisierung präsentierter sc-TCR-Fusionsproteine

1. Western-Blot-Daten

[0313] Viele Studien sind publiziert worden, die zeigen, dass sc-Fv/pVIII-Fusionsproteine auf der Oberfläche von Phagen exprimiert werden. Siehe Castagnoli et al., *J. Mol. Biol.*, (1991), 222: 301 und Huset et al., *J. Immunol.*, (1992) 149:2914. Die anhängige US-Anmeldung, Aktenzeichen 08/813,781, offenbart Verfahren zur Herstellung und die Verwendung spezifischer rekombinanter Bakteriophagen, die sc-TCR-Fusionsproteine präsentieren. Hier wurde eine Western-Blot-Analyse verwendet, um die Präsentation des sc-TCR/pVIII-Moleküls auf der Capsidhülle des Phagen zu bestätigen. Kurz gesagt, wurden Bakteriophagen mittels einer Standard-Polyethylenglykol (PEG)-Präzipitationsverfahrensweise aufgereinigt und nachfolgend wurde ein Aliquot der gereinigten Phagen auf einem SDS-PAGE-Gel laufen gelassen. Die sc-TCR/pVIII-Fusion wurde in dem rekombinanten Phagen (aber nicht in Kontrollphagen, die den sc-TCR ohne den EE-Tag exprimieren) detektiert, indem die Membranen mit einem mAb gegen die EE-Tag-Sequenz untersucht wurden. Obwohl mehrere kleinere Banden, die Abbauprodukte der sc-TCR-Fusion darstellen, beobachtet wurden, zeigte das Vorhandensein einer 50 kD-Proteinbande an, dass ein Volllängen-α/β-sc-TCR in das Phagencapsid eingebaut worden war.

2. ELISA-Daten

[0314] Wie in der anhängigen US-Anmeldung, Aktenzeichen 08/813,781, offenbart, können ELISA-Assays verwendet werden, um rekombinante Bakteriophagen zu charakterisieren, die ein gewünschtes sc-TCR-Fusionsprotein einschließen. Die konformationelle Integrität der Vβ8.2-Kette wurde unter Verwendung von zwei konformationsabhängigen mAbs, MR5-2 und F23.1, bewertet; und die genaue bzw. präzise Faltung der

$\text{V}\alpha 13.1$ -, JaDO -, $\text{V}\beta 8.2$ -, $\text{D}\beta 1$ - und $\text{J}\beta 1.1$ -Domänen, die die CDR3-Bindungstasche des Rezeptors binden, wurde unter Verwendung des Anti-Idiotyp-mAb KJ1 festgestellt. Ein Hintergrundsignal wurde als Phagenbindung an Wells, beschichtet entweder mit BSA oder dem mAb-Anti- $\text{V}\beta 17$, angesehen und vom beobachteten Gesamtsignal abgezogen. Die vier Antikörper reagierten spezifisch mit dem Phagen-TCR, was anzeigt, dass die sc-TCR/pVIII-Fusion auf dem Phagen in entsprechender Orientierung präsentiert wurde.

B. Phagen-Panning

[0315] Das Panning von Antikörper- und Peptid-Bibliotheken ist als ein Verfahren zum verlässlichen Screening auf spezifische Bindungsmoleküle fest etabliert, Greenwood, supra. Verfahren für das Panning von Bakteriophagen, die sc-TCR-Fusionsproteine präsentieren, sind in der anhängigen US-Anmeldung, Aktenzeichen 08/813,781, offenbart worden. Kurz gesagt schließen die Verfahren Standard-Antikörper, Zell-Panning und Panning mit sc-MHC/Peptid-Komplexen ein, offenbart in der veröffentlichten PCT-Anmeldung Nr. US 95/09816, sowie in den anhängigen US-Anmeldungen, Aktenzeichen Nrn. 08/382,454 und 08/596,387. Die Ergebnisse aus diesen Anreicherungsstudien korrelieren gut mit anderen publizierten Befunden hinsichtlich Antikörper-Panning. Siehe Winter et al., Annu. Rev. Immunol., (1994), 12.

C. Blockierungsassay

[0316] Um die MHC/Peptid-Bindungsspezifität des TCR-tragenden Phagen zu charakterisieren, ein kompetitiver Blockierungsassay. Der kompetitive Blockierungsassay ist in der anhängigen US-Anmeldung, Aktenzeichen 08/943,086, offenbart worden. Kurz gesagt, war es das Ziel dieses Beispiels, festzustellen, ob ein TCR-tragender Phage mit dem nativen TCR auf DO11.10-Hybridom-T-Zellen um die Bindung an MHC/Peptid-Komplexe in einem Zellbasierten Assay kompetitieren könnte. Diese Ergebnisse zeigen, dass der DO11.10-Rezeptor auf dem Phagen funktionell war und fähig war, zwischen verschiedenen Peptidsequenzen zu unterscheiden.

[0317] Um die Möglichkeit, dass der TCR-tragende Phage vielleicht die IL-2-Produktion der DO11.10-Zellen auf eine unspezifische Weise beeinträchtigt hat, zu eliminieren, wurden Wells mit dem mAb-Anti-CD3-epsilon beschichtet, um die Hybridome durch das T-Zellrezeptorkomplex-CD3-Molekül zur Produktion von IL-2 zu stimulieren. Die Ergebnisse aus diesen Experimenten zeigen an, dass der Phage keine unspezifische inhibitorische Wirkung auf die T-Hybridomzellen hatte. Somit werden die sc-TCRs auf der Oberfläche von Bakteriophagen des funktionellen Moleküls präsentiert, die dazu fähig sind, mit spezifischen MHC/Peptid-Zielen zu Wechselwirken.

Beispiel 23 – Klonierung und Expression des F23.1-sc-Fv

[0318] Eine bevorzugte Komponente der hierin offenbarten polyspezifischen Bindungsmoleküle ist ein sc-Fv mit Spezifität für eine bestimmte Sub-Population von T-Zellrezeptoren. Wie diskutiert, kann ein breites Spektrum verschiedener sc-Fv-Moleküle gemäß der vorliegenden Erfindung verwendet werden.

[0319] Ein spezifischeres polyspezifisch(er)es Bindungsmolekül ist ein bispezifisches Molekül, welches eine einzelkettige Form des murinen mAb F23.1 einschließt. Es ist möglich, solch ein sc-Fv mittels Standardtechniken zu klonieren und zu exprimieren. Der native F23.1-Antikörper ist gut charakterisiert worden (1) und es ist gezeigt worden, dass er $\text{V}\beta 8.2$ -tragende T-Zellen durch Vernetzung des TCR auf ihrer Oberfläche aktiviert, Hiller et al., Biochem. J., (1991) 278: 573. Das sc-Fv kann mittels der folgenden allgemeinen Schritte kloniert und exprimiert werden.

1. cDNA-Synthese und Klonierung der Gene für die schwere und leichte Kette von F23.1

[0320] Die Erststrang-cDNA-Synthese kann mit mRNA, isoliert aus 107 F23.1-Zellen bewerkstelligt werden. Unter Verwendung des Primers JS300 (GAAX₁TAX₂CCCTTGACCAGGC, worin X₁ = A, G und X₂ = A, C, G; SEQ ID NO: 11) haben wir die Schwerketten-cDNA synthetisiert. Dieser Primer codiert für die ersten zwei Aminosäuren der Schwerketten-CH1-Domäne. Die Leichtketten-cDNA wurde im Wesentlichen auf die gleiche Weise synthetisiert, abgesehen davon, dass wir den Primer OKA57 (GCACCTCCAGATGTTAACTGCTC; SEQ ID NO: 12) verwendeten, der für das 3'-Ende von Framework vier der kappa-Kette spezifisch ist.

[0321] Doppelsträngige DNA wurde durch Amplifizieren der cDNA wie folgt hergestellt. Die Schwerkette wurde durch Verwendung des Primersatzes PMC18 (vorne bzw. "front")

(CCCGGGCCACCATGGX₁ATGX₂AGCTGX₃GTX₄ATX₅CTC, worin X₁ = A, G; X₂ = C, G; X₃ = G, T; X₄ = A, C; X₅ = C, G; SEQ ID NO: 13) und JS300 amplifiziert, und die Leichtkette wurde unter Verwendung des Primer- satzes PMC14 (vorne bzw. "front")

(CCCGGGCCACCATGGAGX₁CACAX₂X₃CTCAGGTC, worin X₁ und X₃ ____ sind und X₂ G, T ist; SEQ ID NO: 44) und OKA57 amplifiziert. Die amplifizierten PCR-Produkte wurden dann in den pGEM-T-Easy-Vektor (Promega) kloniert und zur Nucleotidsequenzbestimmung eingereicht. Ein nachfolgender Schritt wird es sein, die schweren und leichten Ketten in ein einzelkettiges Format für die Expression von sc-Fv-Fragmenten zu klonieren.

Beispiel 24 – Klonierung und Expression des F23.1-Antikörpers als ein einzelkettiges Molekül.

[0322] Es ist möglich, eine einzelkettige Version des F23.1-Antikörpers, für den gezeigt worden ist, dass er eine konformationelle Determinante auf murinen T-Zellen, die V β 8.2-TCRs tragen, erkennt, zu klonieren. Im Allgemeinen wird die V β 8.2-Familie der TCRs mit einer Häufigkeit von 20% auf T-Zellen in den meisten Mäusestämmen exprimiert, Staertz, U., J. Immunol., (1995) 134, 3994. Nachdem das Antikörpergen kloniert worden ist, wird es möglich sein, das sc-Fv-Molekül in E. coli zur Charakterisierung zu exprimieren.

[0323] Die Volllangen-Schwer- und -Leichtketten (V/CH; V/CL), die den F23.1-Antikörper darstellen, sind separat in den Vektor pGEMT-easy (Promega) kloniert worden, und die VH- und VL-Gene sind mittels Sequenzierung bestätigt worden. Das F23.1-Antikörper-Gen wird in ein einzelkettiges Molekül kloniert werden, indem die Gene, die für die VH- und VL-Domänen codieren, zusammengespleißt werden. Eine Herangehensweise ist es z.B., das sc-Fv in den Expressionsvektor pEN2 für eine Produktion von sc-Fv-Fragmenten in E. coli zu klonieren. Der pEN2-Vektor ist z.B. im US-Patent Nr. 5,763,284 offenbart worden.

[0324] Das Klonierungsprotokoll kann unter Anwendung einer zweistufigen PCR-Amplifikationsherangehensweise durchgeführt werden. Im ersten Durchgang werden die VH- und VL-Gene separat amplifiziert, indem ein spezifischer Primersatz, der sich an die "Front" und an das "Ende" der VH- und VL-Gene anlagert, verwendet wird. In zukünftigen Experimenten werden T-Zellen gegen Tumore targetiert werden, wobei Antikörper, die gegen CD3, CD4 und gegen spezielle TCRs reaktiv sind, als der Antikörperteil verwendet werden. Jedoch wird dieser spezielle Antikörper bevorzugt, da er T-Zellen aktivieren kann und spezifischer CTLs aktiviert. Um das sc-Fv-Konstrukt herzustellen, wird ein zweiter Amplifikationsschritt durchgeführt, wobei die überlappende-PCR-Methodologie angewandt wird, um die VH- und VL-Gene "zusammenzuspleißen". Die zwei Ketten werden unter Verwendung eines 16 Aminosäuren langen Linkers (G4SG4APG4S), enthaltend die Restriktionsstelle für den 8-Basen-Schneider Acsl, verbunden. In den Fällen, in denen eine überlappende PCR unternommen werden muss, können zwei Primer wie folgt verwendet werden: JSS32(T) (GGTGGCGGCGCGCCGG-GAGGCAGGCGGTTC; SEQ ID NO: 14), der innerhalb der Linkersequenz am 5'-Ende der Leichtkette überlappt, und der untere Primer ("bottom Primer") JSS33(B) (GCCTCCGGCGGCCGCCACCCGCTGCCACCGC-CACC; SEQ ID NO: 15), der innerhalb der Linkerregion überlappt und in das 3'-Ende der Schwerkette läuft. Das überlappende PCR-Produkt wird mit Sfil und Spel verdaut und dann durch Laufen lassen der Probe an einem 1% Agarosegel und Ausschneiden der sc-Fv-Bande isoliert.

[0325] Dann wird das sc-Fv-Gen als ein Sfil- bis Spel-Fragment in den Expressionsvektor pEN2 kloniert, und die Induktion des Proteins wird durch den phoA-Promotor kontrolliert. Es wird angenommen, dass näherungsweise 50% der sc-Fv-Moleküle in E. coli als lösliches und funktionelles Protein exprimiert werden können. Wenn eine spezielle Wirtszelle oder spezielle Kulturbedingungen unlösliches Protein erzeugen, kann das sc-Fv gemäß Standardtechniken zum Erhalten von löslichem Protein rückgefaltet werden.

Beispiel 25 – Konstruktion von sc-Fv/pIII-Fusionen zur Expression auf einem Bakteriophagen

[0326] Wie diskutiert, ist es möglich, eine Vielzahl von sc-Fv-Fusionsproteinen auf der Oberfläche eines Bakteriophagen als eine Komponente des Phagencapsids zu exprimieren. Es ist z.B. möglich, einen bispezifischen Bakteriophagen herzustellen, der mit Bindungsaaffinität für ein Epitop auf einem gewünschten T-Zellrezeptor und auf einer Zieltumorzelle ausgestattet ist.

[0327] Spezifischer wird, um ein Beispiel für den bisspezifischen Phagen zu geben, das F23.1-Antikörpermolekül als eine sc-Fv/Gen III-Fusion kloniert werden. Wie in der anhängigen US-Anmeldung, Aktenzeichen 08/813,781, diskutiert, ist das Gen III-Protein ein Protein von 406 Aminosäuren, das als fünf Kopien auf der Oberfläche von Phagen exprimiert wird. Ein spezifischer fd-tet-Bakteriophage ist durch Hinzufügung zweckdienlicher Spel- und NotI-Stellen für die Klonierung von sc-Fv-Genen als pIII-Fusionen modifiziert worden. Durch Amplifizieren des F23.1-sc-Fv-Gens aus dem pEN2-Vektor, beschrieben in Beispiel 23, wird das Gen

als ein Spei-NotI-Fragment in die N-terminale Region des Wildtyp-pIII-Proteins kloniert werden. Da die Induktion der sc-Fv/pIII-Fusion unter der Kontrolle des tac-Promotors steht, wird die Expression nach Zugabe von 1 mM IPTG auftreten. Im Allgemeinen ist berichtet worden, dass eine Kopie des sc-Fv pro Phage als eine Gen III-Fusion präsentiert wird. Deshalb stellt der Phage ein attraktives System zur Verwendung zum Präsentieren einzelner Kopien des Antikörpermoleküls dar. Dies wird dabei helfen, unspezifische Wechselwirkungen zu minimieren und wird es dem Phagen ermöglichen, das Idealkonzept des Präsentierens monovalenter sc-Fv-Moleküle stark nachzuahmen. Siehe die [Fig. 2D](#)-[Fig. 2E](#) für Beispiele spezifischer sc-TCR-Fusionskonstrukte.

1. Modifikationen an dem sc-Fv-Konstrukt durch Hinzufügung spezifischer Tags

[0328] Verschiedene ersatzweise Wege werden verwendet werden, um sc-Fv-Moleküle, die Tags in der carboxyterminalen Region enthalten, herzustellen, DNA, die für die Sequenz jedes Tags codiert, wird mit dem 3'-Ende des Leichtkettengens fusioniert werden. Das Einschließen eines carboxyterminalen Tags wird in der Detektion des Moleküls resultieren. Beispiele für Tags schließen KT3, TPPPEPET; (SEQ ID NO: 9); 6 × His, GMAHHHHHH; (SEQ ID NO: 8); Avidin; ARKCSLTGKWTNDLGSNMT; (SEQ ID NO: 6), fos, BirA, LXLI-FEAQKIEWR; (SEQ ID NO: 5) oder jun ein. Das Molekül KT3EE (EEEEYMPME, SEQ ID NO: 7) kann auch in manchen Fällen verwendet werden. Siehe Hiller et al., (1991), Biochem., J., 278, 573; Patel et al., 1994), Proc. Natl. Acad. Sci USA, (1994), 91, 7360; Kruif et al., J. Biol. Chem., 271: 7630 und Schatz, P., Bio/Technology, (1993) 11, 1138.

Beispiel 26 – Aufreinigung und Analysen des sc-Fv F23.1 hinsichtlich der Bindung an nativen und einzelkettigen TCR.

[0329] Metall-Chelat-Chromatographie ("metal-chelating chromatography") ist eine in der Aufreinigung rekombinanter Proteine weithin verwendete Verfahrensweise geworden. Diese Verfahrensweise kann verwendet werden, um das sc-Fv-Molekül aufzureinigen. Ein 6 × His-Tag ist gentechnisch in das Design bzw. die Konzeption des sc-Fv-Moleküls eingeführt worden, um eine einfache Aufreinigung an einer Ni²⁺ + NTA-Säule zu ermöglichen. Die Herstellung der löslichen Fraktion wird bewerkstelligt, indem eine *E. coli*-Zellpaste in Extraktionspuffer suspendiert und die Zellen dann in einer French-Presser lysiert werden. Die Probe wird dann unter Bedingungen, die eine Bindung von 6 × His-getagten Proteinen ermöglichen, auf eine Ni²⁺ + NTA-Säule aufgebracht und gebundenes Protein wird unter Verwendung von Imidazol, pH 7,4, eluiert werden. Die Proben werden mittels SDS-PAGE und Färbung des Gels mit Coomassie Blue auf die Reinheit analysiert werden. Western-Blot-Analyse wird verwendet werden, um die Integrität des sc-Fv zu bewerten, indem Membranen mit einem Antikörper, der für einen KT3-Tag spezifisch ist, untersucht werden.

[0330] Sofern gewünscht, kann eine weitere Aufreinigung des sc-Fv wie folgt durchgeführt werden. Zum Beispiel kann eine Affinitätsäule hergestellt werden, indem zuerst der Anti-EE-Tag-rAb an Protein-A-Sepharose-Kügelchen gekuppelt wird. die Anti-EE-Tag-beschichteten Kügelchen werden dann verwendet, um den aufgereinigten DO11.10-sc-TCR zu fangen, der dann mit dem mAb vernetzt werden wird. Die Säule kann verwendet werden, um den sc-Fv (F23.1)-Antikörper aufzureinigen, da er eine Spezifität für die V β 8.2-Domäne aufweist. Dieses zweistufige Aufreinigungsschema wird eine homogene sc-Fv-Präparation ergeben.

[0331] Um festzustellen, ob das aufgereinigte sc-Fv F23.1 funktionell ist, können Oberflächenplasmonresonanzstudien verwendet werden, um die Bindungskonstanten-Assoziationen ("binding constant associations") des sc-Fv an sc-TCR(DO11.10)-Protein, biotinyliert und gekuppelt an einen Streptavidin-beschichteten Chip, zu messen. Als Kontrolle kann die Bindungskonstanten-Assoziation des nativen F23.1-Antikörpers zum Vergleich mit dem rekombinanten F23.1-Antikörper bestimmt werden. Siehe auch die anhängige US-Anmeldung, Aktenzeichen Nr. 08/813,781, für eine Offenbarung in Bezug auf die Durchführung dieses Assays.

[0332] Zusätzlich zum Vergleichen der Bindungsprofile zwischen den nativen und rekombinanten F23.1-Antikörpern hinsichtlich des sc-TCR ist es möglich, die Fähigkeit dieser Antikörper an den nativen TCR auf DO11.10-T-Zellen zu binden, zu untersuchen. Eine Durchflusszytometrieanalyse wird eingesetzt werden, um die Bindung von Biotin-markierten Antikörpern an die Rezeptoren auf den Zellen zu detektieren. Es wird angenommen, dass die Daten aus diesen Experimenten die Fähigkeit des sc-Fv-Fragments, T-Zellen durch Bindung der V β 8.2-tragenden Rezeptoren zu aktivieren, vorhersagen werden. Eine Offenbarung, betreffend die Durchführung der Durchflusszytometrieanalyse kann in den anhängigen US-Anmeldungen, Aktenzeichen Nrn. 08/813,781 und 08/943,086, gefunden werden.

Beispiel 27 – Expression des F23.1-sc-Fv als Gen III-Fusion auf der Oberfläche von Bakteriophagen.

[0333] Wie diskutiert, kann das F23.1-sc-Fv als pIII-Fusion zur Präsentation auf der Oberfläche von Bakteriophagen exprimiert werden. Diese Herangehensweise stellt einen einzigartigen Weg dar, das sc-Fv-Molekül rasch zu charakterisieren, bevor die Anstrengung des Exprimierens und Aufreinigens des Antikörpers aus *E. coli* unternommen wird. Um viele der beschriebenen Charakterisierungsstudien zu bewerkstelligen, können hinreichende Zahlen an Phagen aus 2 bis 5 Litern einer Übernachtkultur erhalten werden. Darüber hinaus kann, als eine Alternative zum Aufreinigen der sc-Fv-Moleküle, wie in Beispiel 6 beschrieben (anstelle der Verwendung eines ausgefeilten Affinitätsaufreinigungssystems, wie wir es zur Aufreinigung von sc-Fv-Molekülen aus *E. coli*-Lysat beschrieben haben) die Aufreinigung des Bakteriophagen leicht durch zwei Durchgänge einer Polyethylenglykol (PEG)-Präzipitation bewerkstelligt werden. Falls es nötig ist, den Phagen weiter aufzureinigen, kann die Anreicherung an einem CsCl-Gradienten verwendet werden. Nach der Klonierung kann der Phage, der das sc-Fv exprimiert, produziert und aufgereinigt werden und ist zur Untersuchung in einer kürzeren Zeitdauer, verglichen mit der Expression und Aufreinigung löslicher sc-Fv-Moleküle, verfügbar. Zellbindungsassays können verwendet werden, um zu untersuchen, ob Phagen sc-Fv/pIII-Fusionen exprimieren. Dies wird durchgeführt werden, indem Phagen mit DO11.10-T-Zellen inkubiert werden und auf gebundene Phagen unter Verwendung eines Biotin-markierten Antikörpers, der für Phagen spezifisch ist, untersucht werden. Eine spezifischere Offenbarung, betreffend die Durchführung der Zellbindungsassays, kann in der anhängigen US-Anmeldung, Aktenzeichen Nr. 08/813,781, gefunden werden. Die Detektion eines Antikörper-markierten Phagen wird durch Zugeben eines Streptavidin-Phycoerythrin (PE)-onjugats analysiert werden. Sc-Fv-Moleküle, die als pIII-Fusionen exprimiert werden, behalten normalerweise ihre konformationelle Aktivität bei und verhalten sich in vielen Fällen besser als das rekombinante Fv-Fragment. Ein Ziel ist es, zu bestätigen, dass ein funktionelles sc-Fv-Fragment nur auf der Spitze des Phagen präsentiert wird.

Beispiel 28 – Fähigkeit von rekombinanten Bakteriophagen, T-Zellen zu aktivieren.

[0334] Das F23.1-sc-Fv-Molekül weist vorzugsweise eine Fähigkeit zum Stimulieren von DO11.10-T-Zellhybridomen oder zum Aktivieren einer Population nicht-angereicherter muriner T-Zellen auf. Alle Experimente werden den nativen F23.1-Antikörper als Positivkontrolle verwenden, insbesondere da einige Berichte gezeigt haben, dass er T-Zellen aktivieren kann. Siehe Staerz, supra. Im ersten Experiment werden Bakteriophagen, die die sc-Fv/Fusion exprimieren, direkt an Kunststoff-Well absorbieren oder durch Fangen mit einem Antikörper gegen den Phagen immobilisiert werden. Eine andere Herangehensweise wird den Phagen in Suspension verwenden. Kurz gesagt, werden 105 DO11.10-T-Hybridomzellen zu Wells, enthaltend den Phagen, wie oben stehend beschrieben, gegeben werden. Nach einer Inkubation über Nacht werden die Platten zentrifugiert werden, um die Zellen zu pelletieren und der Überstand wird isoliert und unter Verwendung eines Anti-IL-2-ELISA auf IL-2 untersucht werden.

[0335] Im zweiten Experiment werden T-Zellen, isoliert aus Balb/c-Mäusen verwendet werden. Zwei Parameter werden gemessen werden, um die Aktivierung zu bewerten. Der erste Parameter wird sein, IL-2-Level nach Inkubieren von 106 naiven Zellen in Gegenwart des Antikörper-Phagen zu untersuchen. Das zweite Verfahren wird sein, naive Zellen auf Aktivierungsmarker, identifiziert auf T-Zellen, nach Inkubation mit dem Phagen zu färben. Es ist möglich, eine Zahl von Oberflächenmarkern, die nach Aktivierung exprimiert oder hochreguliert sind, zu untersuchen. Parallele Studien können unter Verwendung des gereinigten sc-Fv anstelle des Phagen durchgeführt werden. Jedoch ist es in diesem Falle bevorzugt, dass das Molekül mit einem mAb immobilisiert werden wird, der eine Spezifität für den KT3-Tag, lokalisiert an der carboxyterminalen Region des sc-Fv-Moleküls, hat. Aufgrund dieser zwei Versuche ist es möglich, die Wirksamkeit bzw. Effektivität der Verwendung von sc-Fv-Phagen zum Stimulieren oder Aktivieren von T-Zellen zu bewerten.

Beispiel 29 – Engineering bzw. Konstruktion bispezifischer Hybridmoleküle (d.h. bispezifischer Bakteriophagen) und Charakterisierung ihrer Tumorabtötungseigenschaften in vitro.

[0336] Eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, zu illustrieren, dass die vorliegenden polyspezifischen Bindungsmoleküle und insbesondere die bispezifischen sc-TCR/sc-Fv-Moleküle Tumorzellen in vitro abtöten können. Die bispezifischen Moleküle können auf eine Anzahl von Weisen gemäß der Erfindung, einschließlich der folgenden spezifischen Verfahren, hergestellt werden.

[0337] Eine Herangehensweise zur Herstellung bispezifischer Moleküle wird es sein, Bakteriophagen als Vektor zum simultanen Präsentieren sowohl des sc-TCR als auch des sc-Fv zu verwenden. Bispezifische Phagen werden hergestellt, indem K91-*E. coli*-Zellen, zuvor transformiert mit dem pSUN26-Phagomidvektor, dann mit dem sc-Fv/pIII-exprimierenden Phagen infiziert werden. Nach PEG-Aufreinigung des bispezifischen Pha-

gen kann der Phage charakterisiert werden, um sicherzustellen, dass sowohl die sc-TCR- als auch sc-Fv-Fusionen auf der Oberfläche exprimiert werden. Dies wird durchgeführt werden mittels ELISA-Assays, bei denen Wells mit 1 µg/Well an gereinigtem sc-TCR (DO11.10), der das V 8.2-Epitop trägt, beschichtet werden. Phagen, die ein funktionelles sc-Fv F23.1 exprimieren, sollten an den DO11.10-sc-TCR binden. Streptavidin-HRP wird verwendet werden, um den p-149-sc-TCR, der auf der Oberfläche des Phagen präsentiert wird, zu detektieren. Anti-V 2.3- oder Anti-V 11.0-mAb (PharMingen) wird verwendet werden, gefolgt von Streptavidin-HRP.

Beispiel 30 – Strategien zum Verknüpfen von sc-TCR- und sc-Fv-Molekülen mit Verbindungsmolekülen.

[0338] Wie diskutiert, können die vorliegenden polyspezifischen Bindungsmoleküle mittels einem oder einer Kombination verschiedener Verbindungsmoleküle verbunden werden. Mehrere spezifische Verbindungsmoleküle schließen Immunglobulin-Schwerketten und die oben stehend offenbarten Moleküle, die dazu fähig sind, spezifische Bindungskomplexe zu bilden, ein.

[0339] Das Biotin-Bindungsmotiv von Avidin ist z.B. ein spezifischer Typ Verbindungsmolekül. Dieses Verbindungsmolekül ist genetisch im Design bzw. in der Konzeption des p-149-sc-Fv-Moleküls codiert worden. Deshalb werden sc-Fv-Moleküle mit einer Sequenz von Aminosäuren, abgeleitet von Avidin, welche ein Biotinbindungsmotiv enthält (siehe Hiller et al., Biochem., (1991), 278, 573-585 exprimiert werden. Der sc-TCR wird exprimiert werden, wobei er die carboxylterminale Biotinylierungssequenz, BirA, enthält, siehe Schatz, P., Bio/Technology, 11, 1138-1143 (1993), wie in Ziel 2 beschrieben, die freies Biotin in vivo oder in vitro in Gegenwart von Biotinligase, Schatz, P., supra, ein Enzym, das zur Hinzufügung eines einzelnen Biotinmoleküls an der BirA-Stelle fähig ist, binden kann. Monovalente bispezifische Moleküle können unter Anwendung dieser Herangehensweise effizient gebildet werden. Ein Reiz für die Anwendung dieser Herangehensweise ist die starke Wechselwirkung zwischen Avidin und Biotin (10^{-15} M) (siehe Green, N. Methods Enzymol., (1990) 184, 85-133) und die hohe Wahrscheinlichkeit der Bildung von Heterodimeren (sc-TCR:sc-Fv), verglichen mit der Homodimerbildung (sc-TCR:sc-TCR oder sc-Fv:sc-Fv).

[0340] Die Verwendung zusätzlicher Verbindungsmoleküle wird in Erwägung gezogen. Zum Beispiel kann eine weitere Herangehensweise angewendet werden, in der es möglich ist, einen gewünschten sc-TCR und ein sc-Fv miteinander durch Verwendung des fos/jun-Leucinzipper zu verknüpfen, sie z.B. Patel et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1994) 91, 7360-7364 und Segal et al., Annals. New York Academy of Sciences, (1991) 636, 288-294. Wieder würde jedes Molekül separat hergestellt werden. Beispielsweise wird das sc-Fv eine carboxylterminale fos-Sequenz haben und der sc-TCR wird so manipuliert, dass er eine carboxylterminale jun-Sequenz hat. Ein einzelner Cysteinrest wird jede Seite der fos- und jun-Gruppierungen flankieren, um die Bildung von Disulfidbrücken zum Verstärken der Stabilität der Wechselwirkung zu erleichtern. Wie auch die Avidin/Biotin-Herangehensweise, hat diese Technologie den Vorteil, dass sie Heterodimere mit einer sehr hohen Frequenz bzw. Häufigkeit bildet, verglichen mit der Homodimerbildung, Patel et al., supra.

[0341] Die Erfindung ist hierin unter Bezugnahme auf bevorzugte Ausführungsformen davon beschrieben worden, jedoch wird geschätzt werden, dass Fachleute auf dem Gebiet in Ansehung dieser Offenbarung Modifikationen und Verbesserungen innerhalb des Rahmens der Erfindung machen können.

SEQUENZPROTOKOLL

<110> SUNOL MOLECULAR CORPORATION

<120> Polyspezifische Bindungsmoleküle und deren Verwendung

<130> 11530

<140> 99 970 601.3

<141> 1999-10-21

<150> US 60/105,164

<151> 1998-10-21

<160> 44

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 20

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Peptidlinker

<400> 1

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser

20

<210> 2

<211> 15

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Peptidlinker

<400> 2

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 3
<211> 12
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Peptidlinker

<400> 3
Gly Gly Gly Gly Ser Ala Pro Gly Gly Gly Ser
1 5 10

<210> 4
<211> 23
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Peptidlinker

<400> 4
Val Asn Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu Glu Pro Val
1 5 10 15

Ser Gly Ser Ser Gly Ser Gly
20

<210> 5
<211> 13
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Proteinbindungsmotiv

<220>
<221> unsure
<222> (2)
<223> Xaa = beliebige Aminosäure

<400> 5

Leu Xaa Leu Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp Arg
1 5 10

<210> 6
<211> 19
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Proteinbindungsmotiv

<400> 6
Ala Arg Lys Cys Ser Leu Thr Gly Lys Trp Thr Asn Asp Leu Gly Ser
1 5 10 15

Asn Met Thr

<210> 7
<211> 9
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Proteinbindungsmotiv

<400> 7
Glu Glu Glu Glu Tyr Met Pro Met Glu
1 5

<210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Proteinbindungsmotiv

<400> 8

Gly Met Ala His His His His His His

1

5

<210> 9

<211> 8

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Proteinbindungsmotiv

<400> 9

Thr Pro Pro Pro Glu Pro Glu Thr

1

5

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Peptidfragment des
humanen Tumor-Suppressorproteins p53

<400> 10

Ser Thr Pro Pro Pro Gly Thr Arg Val

1

5

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<220>

<221> unsure

<222> (4)

<223> r = g oder a

<220>
 <221> unsure
 <222> (7)
 <223> v = a, c oder g

<400> 11
 gaartavccc ttgaccaggc

20

<210> 12
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 12
 gcacacctccag atgttaactg ctc

23

<210> 13
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <221> unsure
 <222> (16)
 <223> r = g oder a

<220>
 <221> unsure
 <222> (20,32)
 <223> s = g oder c

<220>
 <221> unsure
 <222> (29)
 <223> m = a oder c

<220>
 <221> unsure
 <222> (26)
 <223> k = g oder t

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

```

<400> 13
cccgggcccac catggratgs agctgkgtma tsctc 35

<210> 14
<211> 29
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 14
ggtgtggcgccg cgccgggagg cggcggttc 29

<210> 15
<211> 39
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 15
gcctcccggc gcgcgcac caccgctgcc accgcacc 39

<210> 16
<211> 32
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 16
gaggtgaccg gtgagcaggt ggagcagctt cc 32

<210> 17
<211> 44
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

```

<400> 17
gaggtggagg cccagccggc catggcccaag caggtgagac aaag 44

<210> 18
<211> 36
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 18
gaggtggagc tcgagcaatg ctgggtgtcat ccaaac 36

<210> 19
<211> 30
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 19
gaggtggaga ctagtagctt ctgggttctg 30

<210> 20
<211> 33
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 20
gaggtggagc ccgggggtctg ctcgccccca ggc 33

<210> 21
<211> 32
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 21

gaggtgaccg gtcagcaggt gagacaaaagt cc

32

<210> 22

<211> 68

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 22

gtggagatcg ataagtgtac ttacgtttc attatcgcgta tccggagtta acgtctgctc 60
ggccccag 68

<210> 23

<211> 46

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 23

aacgcaaaga caaccggccc ttcaagtataat ccactagcgc ccgttt

46

<210> 24

<211> 47

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 24

ccggaaacgg gcgctagtgg atatactgaa gggggcggttg tcgcgtt

47

<210> 25

<211> 54

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 25

cgagaggaag aagagtacat gccgatggaa taataaaaac gtaagtacac ttat 54

<210> 26

<211> 54

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<220>

<221> unsure

<222> (19)

<223> m = a oder c

<400> 26

cgataagtgt acttacgtmc attattccat cggcatgtac tcttcttcct ctcg 54

<210> 27

<211> 21

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 27

cgaaaacgta agtacactta t 21

<210> 28

<211> 23

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 28

cgataagtgt acttacgttt tcg 23

<210> 29

```

<211> 39
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 29
gaggtggccc agccggccat ggccgacatc cagatgacc 39

<210> 30
<211> 31
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 30
gaggtgacta gttttgattt ccagcttgggt g 31

<210> 31
<211> 51
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 31
ctagtggagg tggcggatca ggaggcggag gttctggcgg aggtgggagt c 51

<210> 32
<211> 51
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 32
tcgagactcc cacctccgcc agaacctccg cctcctgatc cgccacctcc a 51

<210> 33

```

```

<211> 28
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 33
gaggtgctcg aggaggtgca gctgggtgg                                28

<210> 34
<211> 27
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 34
gaggtgtccg gagacatcca gatgacc                                27

<210> 35
<211> 28
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 35
gaggtgtcgc gatgaggaga cggtgacc                                28

<210> 36
<211> 43
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 36
gaggtggaat tctcattacc cgggtgagga gacggtgacc atg                43

<210> 37

```

<211> 28

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 37

gtggaggaat tcgtctgctc ggccccag

28

<210> 38

<211> 52

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 38

gaggtgtcgc gacagctacc ggtgtccact ccgagcaggt ggagcagctt cc

52

<210> 39

<211> 52

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 39

gaggtgtcgc gacagctacc ggtgtccact cccagcaggt gagacaaagt cc

52

<210> 40

<211> 32

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 40

caagcagcct caggaactct ggaaatacgc tc

32

<210> 41

```

<211> 32
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 41
gagcgtatcc ccagagttcc tgaggctgct tg 32

<210> 42
<211> 19
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 42
aacgggtggag ggggctcat 19

<210> 43
<211> 23
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 43
ccggatgagc cccctccacc gtt 23

<210> 44
<211> 32
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<220>
<221> unsure
<222> (18,24)
<223> n = a, t, c oder g

```

<220>
 <221> unsure
 <222> (23)
 <223> k = g oder t

<400> 44
 cccgggcccac catggagnca caknctcagg tc

32

Patentansprüche

1. Einzelkettiges polyspezifisches Bindungsprotein, umfassend mindestens einen einzelkettigen T-Zell-Rezeptor (sc-TCR) oder ein funktionelles Fragment davon, kovalent verknüpft durch eine erste Peptidlinkersequenz mit mindestens einem Einzelketten-Antikörper (sc-Ab) oder einem funktionellen Fragment davon, wobei der sc-TCR oder das funktionelle Fragment davon ein spezielles Peptid, gebunden an (geladen auf ein) einen MHC (HLA), bindet und der Einzelketten-Antikörper oder das funktionelle Fragment davon ein Antigen bindet.
2. Bindungsprotein nach Anspruch 1, wobei der sc-TCR eine V- α -Kette, kovalent verknüpft mit einer V- β -Kette durch eine zweite Peptidlinkersequenz, umfasst.
3. Bindungsprotein nach Anspruch 2, wobei der C-Terminus der V- α -Kette kovalent durch die zweite Peptidlinkersequenz mit dem N-Terminus der V- β -Kette verknüpft ist.
4. Bindungsprotein nach Anspruch 2, wobei der C-Terminus der V- β -Kette kovalent durch die zweite Peptidlinkersequenz mit dem N-Terminus der V- α -Kette verknüpft ist.
5. Bindungsprotein nach Anspruch 2, weiterhin umfassend eine C- β -Kette oder ein Fragment, kovalent verknüpft zwischen dem C-Terminus der V- β -Kette und dem N-Terminus der ersten Peptidlinkersequenz.
6. Bindungsprotein nach Anspruch 2, weiterhin umfassend eine C- α -Kette oder ein Fragment, kovalent verknüpft zwischen dem C-Terminus der V- α -Kette und dem N-Terminus der zweiten Peptidlinkersequenz.
7. Bindungsprotein nach Anspruch 5, weiterhin umfassend eine C- α -Kette oder ein Fragment, kovalent verknüpft zwischen dem C-Terminus der V- β -Kette und dem N-Terminus der zweiten Peptidlinkersequenz.
8. Bindungsprotein nach Anspruch 6 oder 7, wobei das C- α -Ketten-Fragment zwischen etwa 5 und 25 Aminosäuren lang ist.
9. Bindungsprotein nach Anspruch 5, wobei das C- β -Ketten-Fragment zwischen etwa 50 und 126 Aminosäuren lang ist.
10. Bindungsprotein nach Anspruch 2, wobei die erste und die zweite Peptidlinkersequenz jeweils unabhängig zwischen etwa 2 und 25 Aminosäuren lang sind.
11. Bindungsprotein nach Anspruch 2, wobei der Einzelketten-Antikörper eine erste und eine zweite variable Kette eines Immunglobulins, kovalent miteinander verknüpft durch eine dritte Polypeptidlinkersequenz, umfasst.
12. Bindungsprotein nach Anspruch 11, wobei die erste variable Kette eine leichte Kette (V_L) ist und die zweite variable Kette eine schwere Kette (V_H) ist.
13. Bindungsprotein nach Anspruch 12, wobei der C-Terminus der V_L-Kette kovalent durch die dritte Peptidlinkersequenz mit dem N-Terminus der V_H-Kette verknüpft ist.
14. Bindungsprotein nach Anspruch 12, wobei der C-Terminus der V_H-Kette kovalent durch die dritte Peptidlinkersequenz mit dem N-Terminus der V_L-Kette verknüpft ist.
15. Bindungsprotein nach Anspruch 12, wobei die dritte Peptidlinkersequenz zwischen etwa 2 und 25 Aminosäuren lang ist.

16. Bindungsprotein nach Anspruch 12, wobei der C-Terminus der sc-TCR-V- β -Kette kovalent mit der dritten Polypeptidlinkersequenz verknüpft ist, wobei diese Sequenz mit dem N-Terminus der V_H- oder V_L-Kette verknüpft ist.

17. Bindungsprotein nach Anspruch 16, wobei der C-Terminus der sc-TCR-V- β -Kette kovalent mit einer C- β -Kette verknüpft ist, wobei diese Kette kovalent mit der dritten Polypeptidlinkersequenz verknüpft ist, wobei diese Sequenz mit dem N-Terminus der V_H- oder V_L-Kette verknüpft ist.

18. Bindungsprotein nach Anspruch 17, wobei der sc-TCR eine V- α -Kette umfasst, kovalent verknüpft mit einer C- α -Kette oder einem Fragment, wobei die C- α -Kette oder das Fragment kovalent zwischen dem C-Terminus der V- α -Kette und dem N-Terminus der zweiten Peptidlinkersequenz verknüpft ist.

19. Einzelkettiges polyspezifisches Bindungsprotein, umfassend kovalent verknüpft in Sequenz: 1) einen sc-TCR oder ein funktionelles Fragment davon, 2) eine erste Polypeptidlinkersequenz und 3) einen Einzelketten-Antikörper oder ein funktionelles Fragment davon, wobei der sc-TCR oder das funktionelle Fragment davon ein spezielles Peptid, gebunden an (geladen auf ein) einen MHC (HLA), bindet und der Einzelketten-Antikörper oder das funktionelle Fragment davon ein Antigen bindet.

20. Bindungsprotein nach Anspruch 19, wobei der sc-TCR weiterhin kovalent verknüpft in Sequenz umfasst: 4) eine V- α -Kette, 5) eine zweite Peptidlinkersequenz, 6) eine V- β -Kette und 7) ein C- β -Ketten-Fragment.

21. Bindungsprotein nach Anspruch 19, wobei der sc-TCR weiterhin kovalent verknüpft in Sequenz umfasst: 4) eine V- β -Kette, 5) eine zweite Peptidlinkersequenz, 6) eine V- α -Kette und 7) eine C- β -Kette oder ein Fragment davon.

22. Bindungsprotein nach Anspruch 20, weiterhin umfassend eine C- α -Kette oder ein Fragment davon, kovalent verknüpft zwischen der V- α -Kette und der ersten Polypeptidlinkersequenz.

23. Bindungsprotein nach Anspruch 19, wobei der Einzelketten-Antikörper weiterhin kovalent verknüpft in Sequenz umfasst: 4) eine V_H-Kette, 5) eine dritte Polypeptidlinkersequenz und 6) eine V_L-Kette.

24. Bindungsprotein nach Anspruch 19, wobei der Einzelketten-Antikörper weiterhin kovalent verknüpft in Sequenz umfasst: 4) eine V_L-Kette, 5) eine dritte Polypeptidlinkersequenz und 6) eine V_H-Kette.

25. Bindungsprotein nach Anspruch 19, weiterhin umfassend mindestens eine Protein-Markierung bzw. einen Protein-Tag, die/der damit kovalent verknüpft ist.

26. Polyspezifisches Bindungsprotein nach Anspruch 1, wobei mindestens der sc-TCR des Proteins humanisiert wurde.

27. Bindungsmolekül nach Anspruch 26, wobei der sc-TCR und die Einzelketten-Antikörper-Regionen humanisiert wurden.

28. Lösliches Fusionsprotein nach Anspruch 25, wobei die Protein-Markierung ein detektierbar markiertes Molekül ist, das für diagnostische oder Bildgebungsuntersuchungen geeignet ist.

29. Polynucleotid, codierend für das einzelkettige polyspezifische Bindungsmolekül nach Anspruch 1.

30. Polynucleotid nach Anspruch 29, wobei das Polynucleotid weiterhin einen Promotor, ein Translationsinitiierungssignal und eine Leader-Sequenz umfasst, funktionell verknüpft mit einer ersten Sequenz, die für das polyspezifische Bindungsmolekül codiert.

31. Polynucleotid nach Anspruch 30, wobei der sc-TCR, codiert durch die erste Sequenz, eine V- α -Kette umfasst, kovalent verknüpft durch eine zweite Peptidlinkersequenz mit dem N-Terminus einer V- β -Kette.

32. Polynucleotid nach Anspruch 31, wobei der C-Terminus der V- α -Kette kovalent durch die zweite Peptidlinkersequenz mit dem N-Terminus der V- β -Kette verknüpft ist.

33. Polynucleotid nach Anspruch 31, wobei der C-Terminus der V- β -Kette kovalent durch die zweite Polypeptidsequenz mit dem N-Terminus der V- α -Kette verknüpft ist.

34. Polynucleotid nach Anspruch 32, wobei der C-Terminus der V- α -Kette weiterhin ein C- α -Ketten-Fragment umfasst, kovalent verknüpft zwischen dem C-Terminus der V- α -Kette und dem N-Terminus der zweiten Peptidlinkersequenz.

35. Polynucleotid nach Anspruch 32, wobei die V- β -Kette weiterhin eine C- β -Kette oder ein Fragment umfasst, kovalent verknüpft zwischen dem C-Terminus der V- β -Kette und der ersten Peptidlinkersequenz.

36. Polynucleotid nach Anspruch 30, wobei der Promotor phoA ist und der Leader pelB aus *E. coli* ist, wobei das DNA-Segment weiterhin eine Ribosomenbindungsstelle aus einer Gen 10-Sequenz umfasst.

37. Polynucleotid nach Anspruch 30, wobei der Promotor ein Cytomegalovirus (CMV)-Promotor ist, der funktionell mit einem CMV-Enhancer-Element verknüpft ist, und der Leader ein Maus-kappa-Kette-Leader ist.

38. DNA-Vektor, umfassend das Polynucleotid nach Anspruch 29.

39. Kit, umfassend mindestens ein einzelkettiges polyspezifisches Bindungsprotein wie in Anspruch 1 oder Anspruch 19 und ein Polynucleotid, das für das Protein codiert.

40. Verfahren zum Herstellen eines einzelkettigen polyspezifischen Bindungsproteins, umfassend mindestens einen einzelkettigen T-Zell-Rezeptor (sc-TCR) oder ein funktionelles Fragment davon und mindestens ein einzelkettiges Fv (sc-Fv) oder ein funktionelles Fragment davon, wobei der sc-TCR oder das funktionelle Fragment davon ein spezielles Peptid, gebunden an (geladen auf ein) einen MHC (HLA), bindet und der Einzelketten-Antikörper oder das funktionelle Fragment davon ein Antigen bindet, wobei das Verfahren umfasst:

- a) Einführen eines DNA-Vektors, der für ein einzelkettiges polyspezifisches Bindungsprotein von Interesse codiert, in eine Wirtszelle;
- b) Kultivieren der Wirtszelle in Medien unter Bedingungen, die ausreichend sind, um das einzelkettige polyspezifische Bindungsprotein in der Zelle oder in dem Medium zu exprimieren; und
- c) Aufreinigen des einzelkettigen polyspezifischen Bindungsproteins aus den Hybridomzellen oder Medien.

41. Verwendung eines einzelkettigen polyspezifischen Bindungsproteins, umfassend mindestens einen einzelkettigen T-Zell-Rezeptor (sc-TCR) oder ein funktionelles Fragment davon und mindestens ein einzelkettiges Fv (sc-Fv) oder ein funktionelles Fragment davon, zur Herstellung einer medizinischen Zubereitung zum Abtöten einer Zielzelle, umfassend einen Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) oder ein humanes Leukozyten-assoziiertes Antigen (HLA), wobei die Zielzelle eine Tumorzelle, eine virusinfizierte Zelle oder eine virusinfizierte Tumorzelle ist, wobei die medizinische Zubereitung angepasst ist für:

- a) In-Kontakt-Bringen einer Vielzahl von Zellen mit der medizinischen Zubereitung, wobei die Vielzahl von Zellen weiterhin Immunzellen und die Zielzellen, umfassend den MHC, umfasst,
- b) wobei Schritt a) in der Bildung eines spezifischen Bindungskomplexes (Brücke) zwischen dem MHC auf den Zielzellen und einem Aktivierungsmolekül (Marker) auf den Immunzellen, ausreichend, um die Immunzellen zu aktivieren, resultiert; und
- c) Abtöten der Zielzellen mit den aktivierte Immunzellen.

42. Verwendung nach Anspruch 41, wobei das einzelkettige polyspezifische Bindungsprotein bispezifisch ist und einen sc-TCR, kovalent verknüpft mit einem (und einen) Einzelketten-Antikörper durch eine Peptidlinkersequenz, umfasst.

43. Verwendung nach Anspruch 41, wobei die Zielzellen Tumorzellen oder virusinfizierte Zellen sind, die ein spezifisches Peptid im Kontext eines HLA-Moleküls (pHLA) exprimieren.

44. Verwendung nach Anspruch 41, wobei die Immunzellen T-Zellen, NK-Zellen oder Makrophagen sind.

45. Verwendung nach Anspruch 44, wobei die Immunzellen ein Antigen (Marker), ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus p53, CD3/TCR, CD28 und Her2-Neu, umfassen.

46. Verwendung eines einzelkettigen polyspezifischen Bindungsproteins, umfassend mindestens einen einzelkettigen T-Zell-Rezeptor (sc-TCR) oder ein funktionelles Fragment davon und mindestens einen Einzelketten-Antikörper oder ein funktionelles Fragment davon zur Herstellung einer medizinischen Zubereitung zum Verhindern oder Behandeln eines Krebses bei einem Patienten, bei dem der Krebs pHLA-exprimierende Tumorzellen aufweist, wobei die medizinische Zubereitung angepasst ist:

- a) an einen Patienten verabreicht zu werden;

b) wobei Schritt a) in der Bildung eines spezifischen Bindungskomplexes (Brücke) zwischen den pHLA-exprimierenden Tumorzellen und Immunzellen, ausreichend, um die Immunzellen zu aktivieren, resultiert; und c) an Schädigen oder Abtöten der Tumorzellen, ausreichend, um den Krebs bei einem Patienten zu verhindern oder zu behandeln.

47. Einzelkettiges polyspezifisches Bindungsprotein nach Anspruch 1, wobei der einzelkettige T-Zell-Rezeptor (sc-TCR) ein p149-sc-TCR ist.

48. Einzelkettiges polyspezifisches Bindungsprotein nach Anspruch 1, wobei das sc-TCR-Fragment spezifisch an einen Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) oder ein humanes Leukozyten-assoziiertes Antigen (HLA) bindet, komplexiert mit Peptid mit mindestens etwa 70% Affinität im Vergleich zur spezifischen Bindung der V- α - und der V- β -Kette mit voller Länge, und wobei das sc-Ab-Fragment weiterhin spezifisch an das spezifische Antigen mit mindestens etwa 70% Affinität im Vergleich zu der spezifischen Bindung der Immunglobulinette mit voller Länge bindet.

Es folgen 24 Blatt Zeichnungen

V α 13.1	(G ₄ S) ₄	V β 8.2 C β
-----------------	---------------------------------	-------------------------

FIG. 1A

V α 2 + 7AA C α	(G ₄ S) ₄	V β 11 C β
-------------------------------	---------------------------------	------------------------

FIG. 1B

V leicht	(G ₄ S) ₃	V schwer
----------	---------------------------------	----------

FIG. 1C

V schwer	G ₄ SG ₄ APG ₄ S	V leicht
----------	---	----------

FIG. 1D

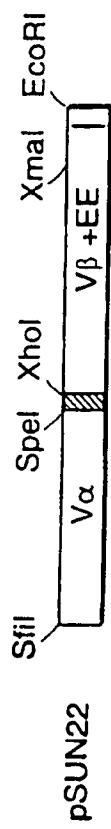


FIG. 2A

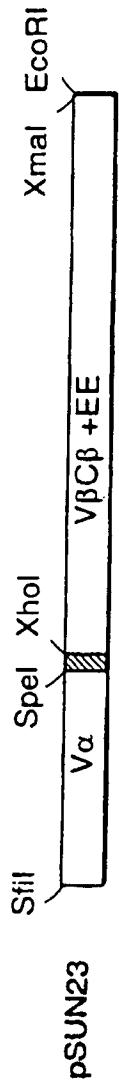


FIG. 2B



FIG. 2C



FIG. 2D

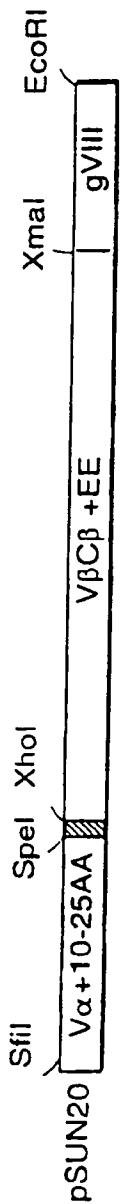


FIG. 2E

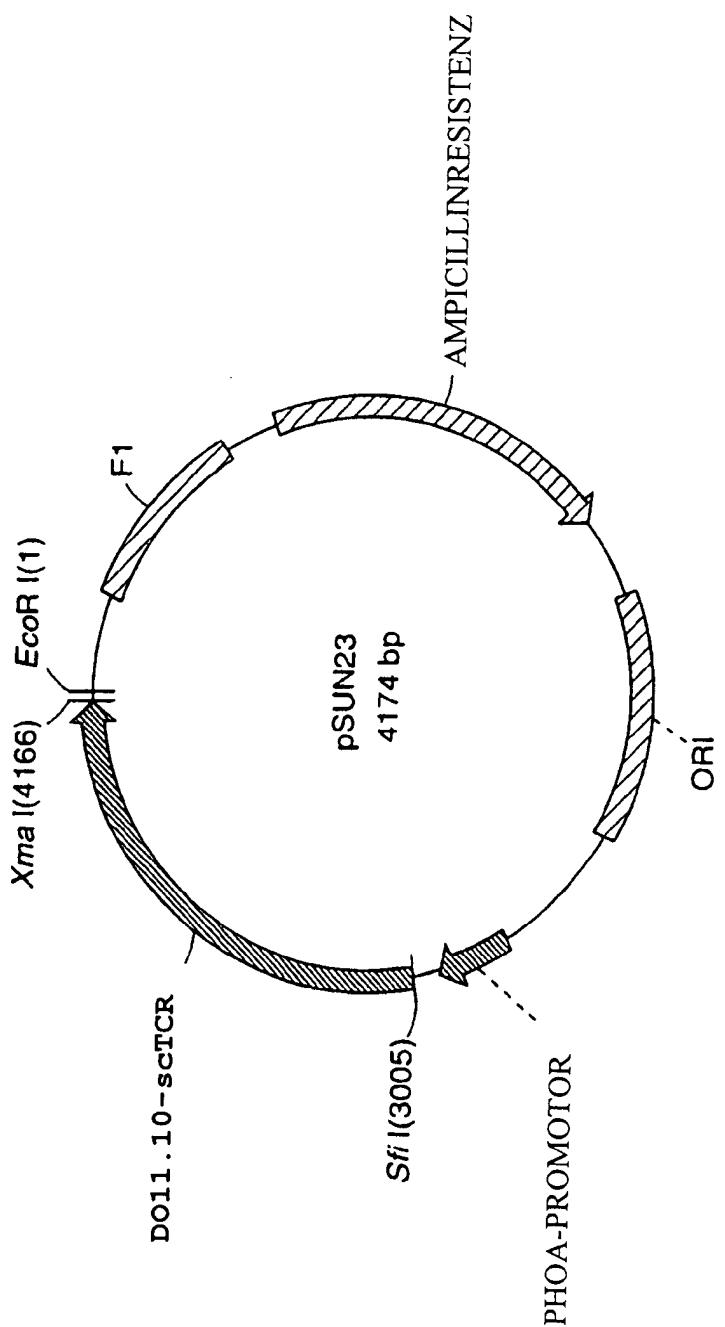


FIG. 3

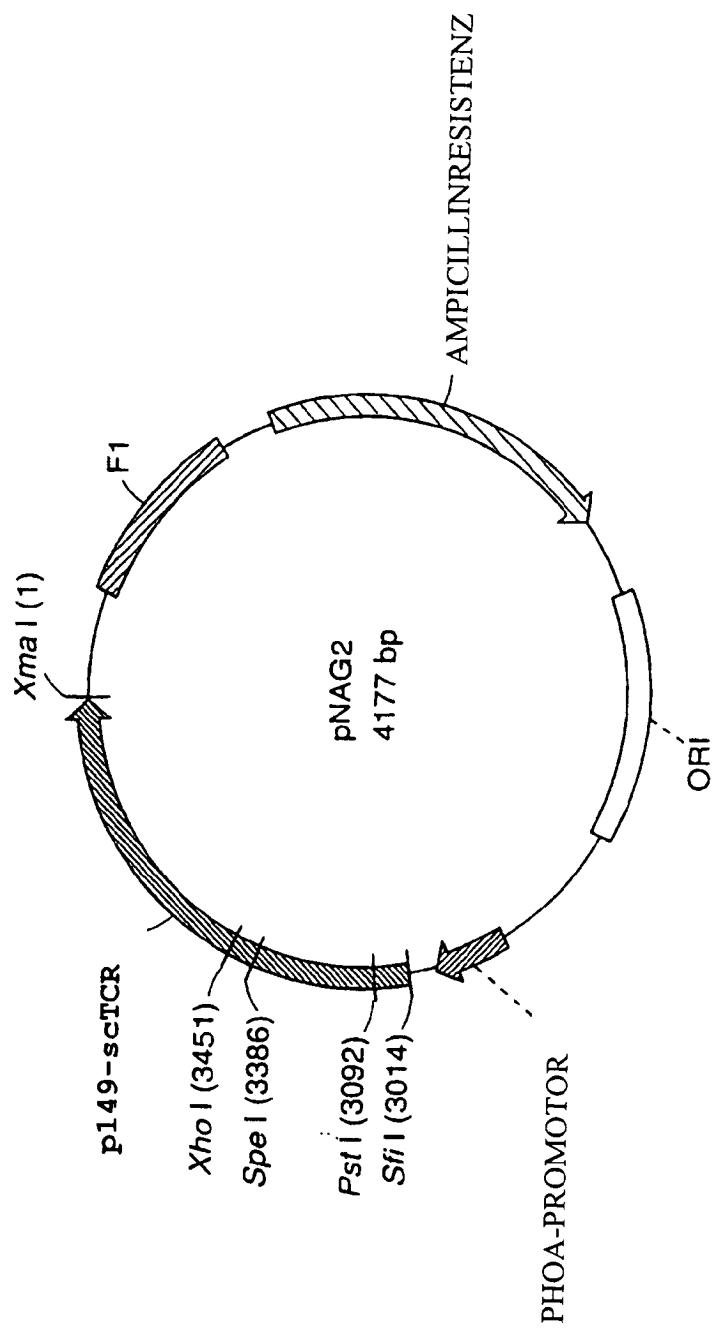


FIG. 4

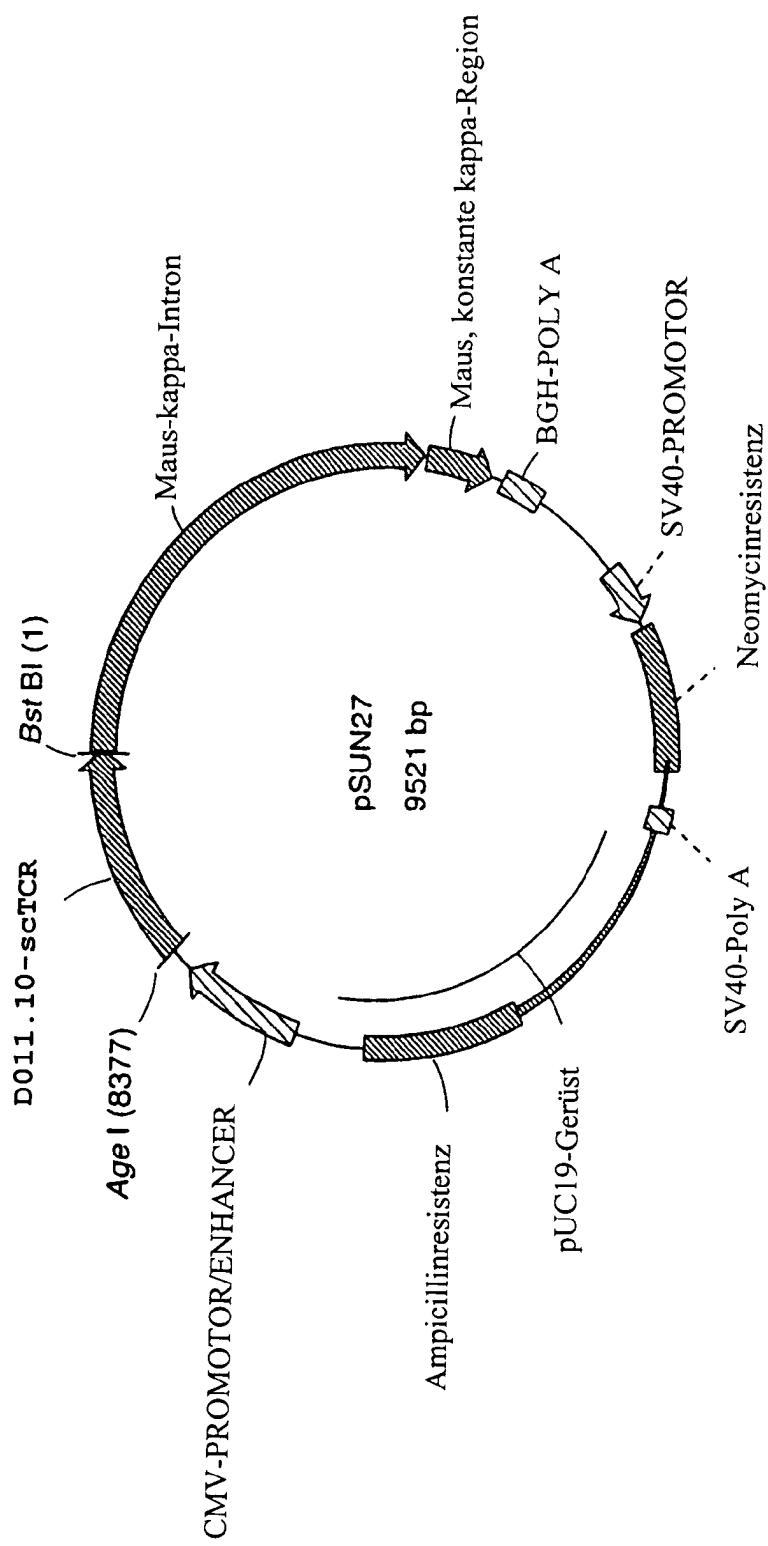
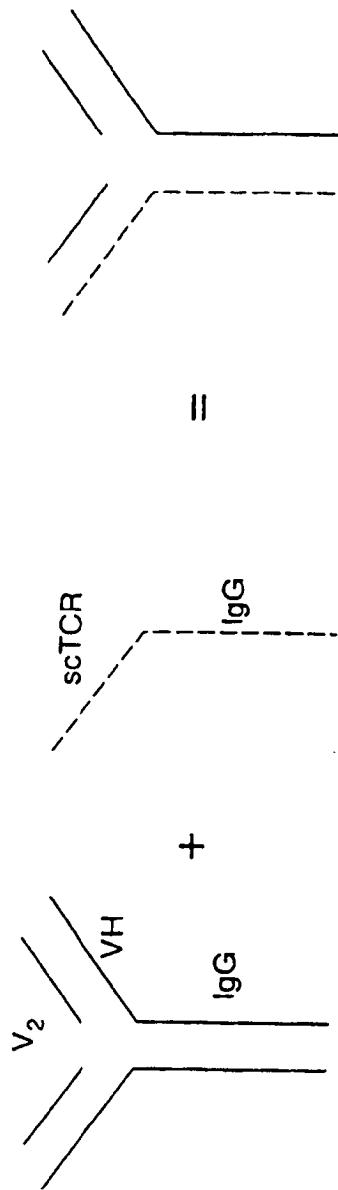


FIG. 5

BISP/DO11.10	DO11.10-sctCR	Linker	145-2c11-scFv	EE
BISP/149	p149-sctCR	Linker	145-2c11-scFv	EE

FIG. 6



145-2C11
Hybridom-MoAb

scTCR/IgG
FUSIONSMOLEKÜL

CHIMÄRES BISPEZIFISCHES
MOLEKÜL
(UND ANDERE MOLEKÜLE)

FIG. 7A

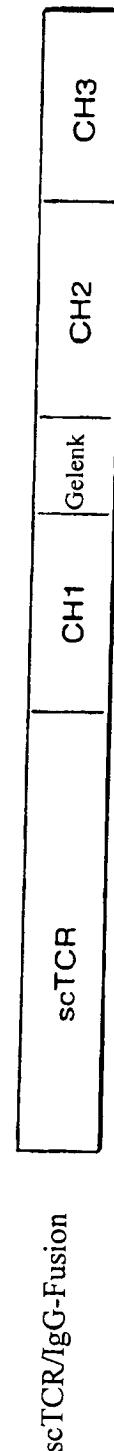


FIG. 7B

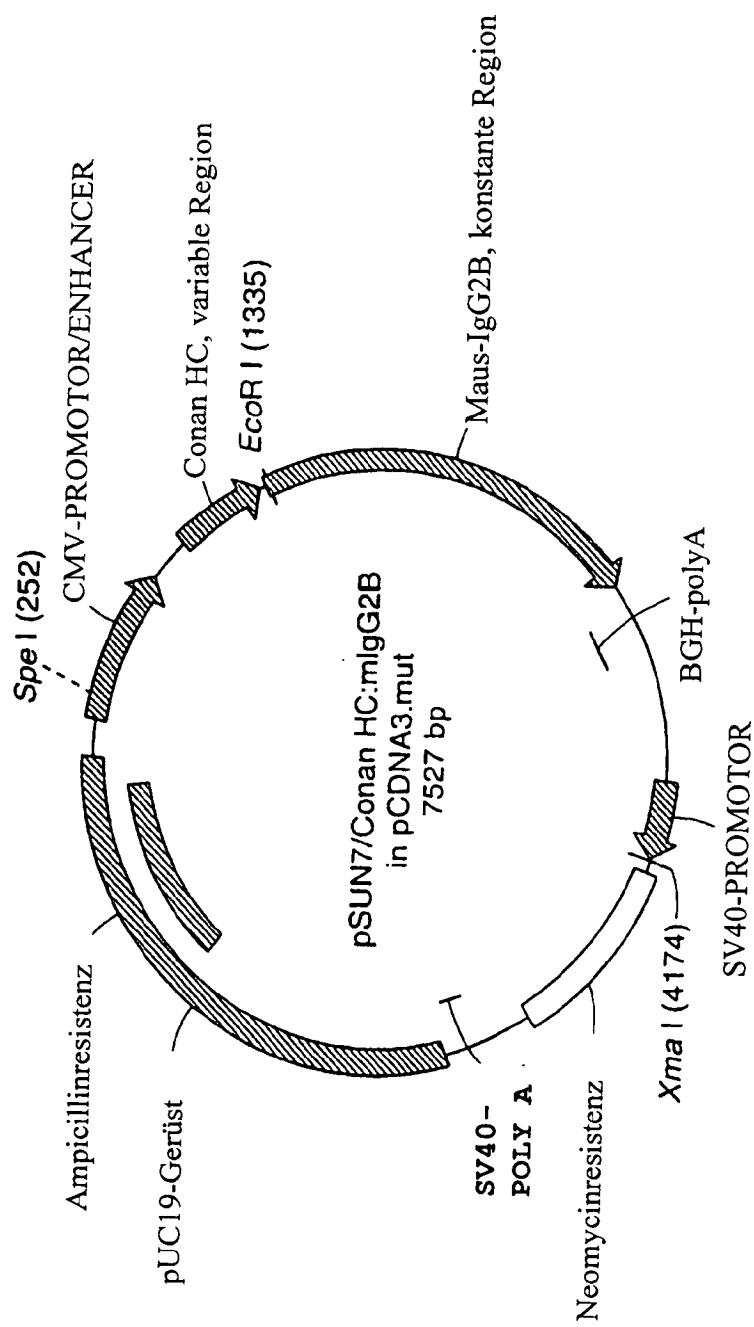


FIG. 8

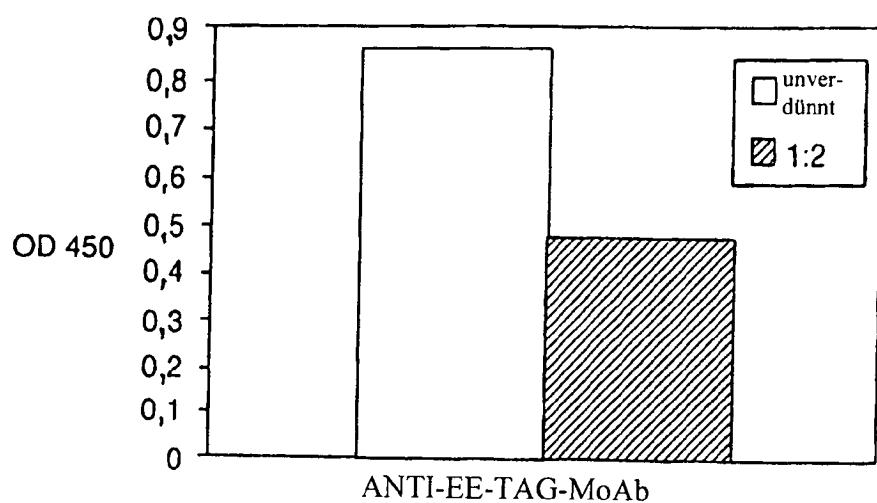


FIG. 9A

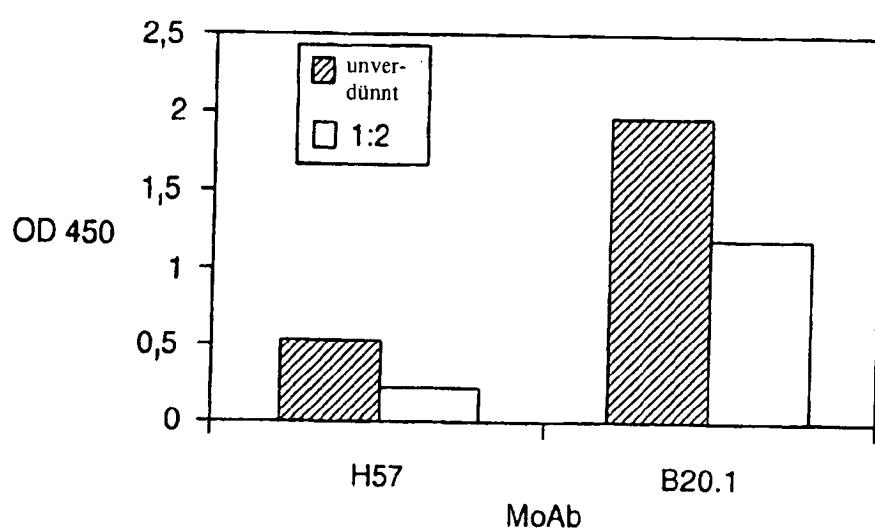


FIG. 9B

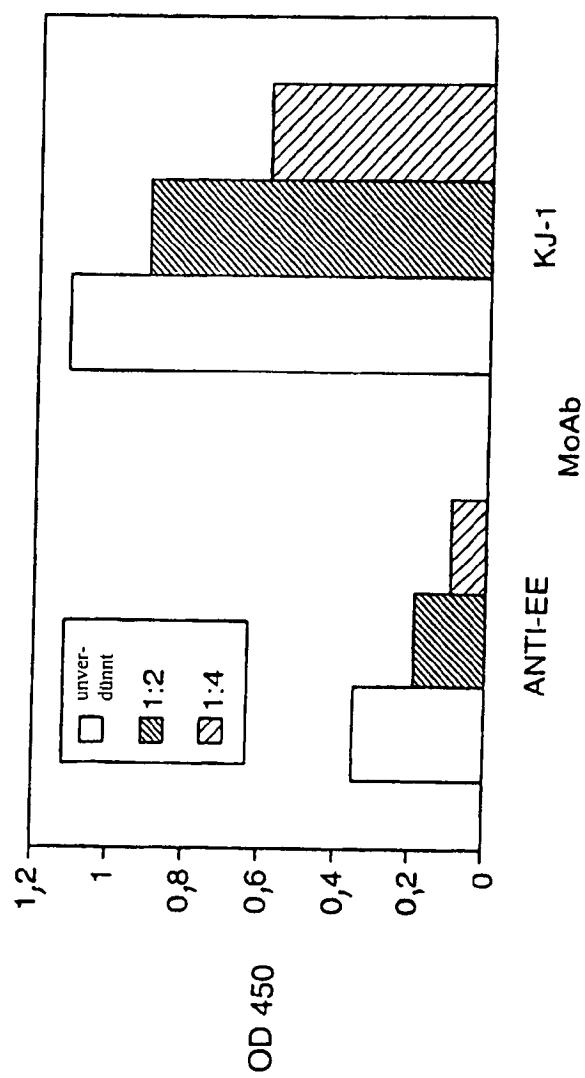


FIG. 10A

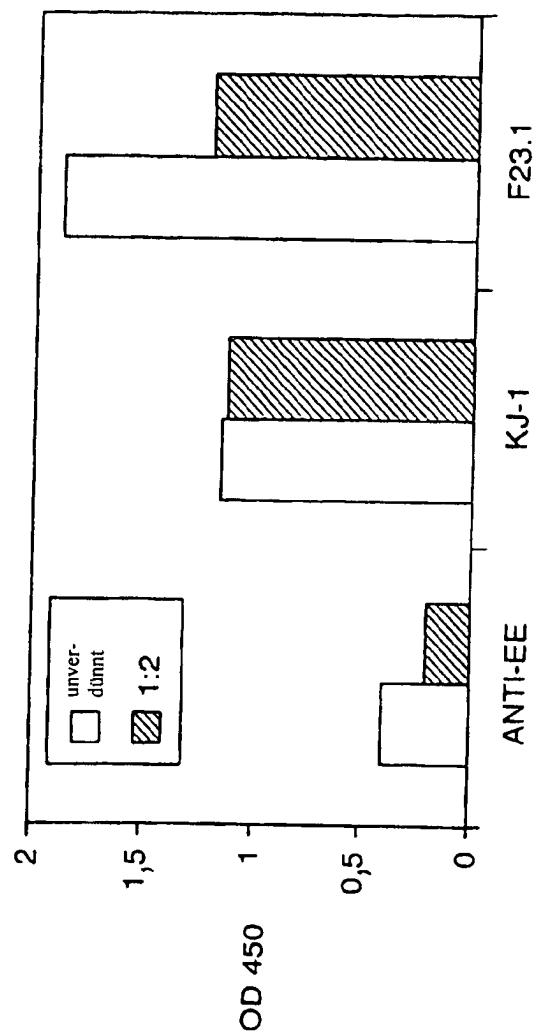


FIG. 10B

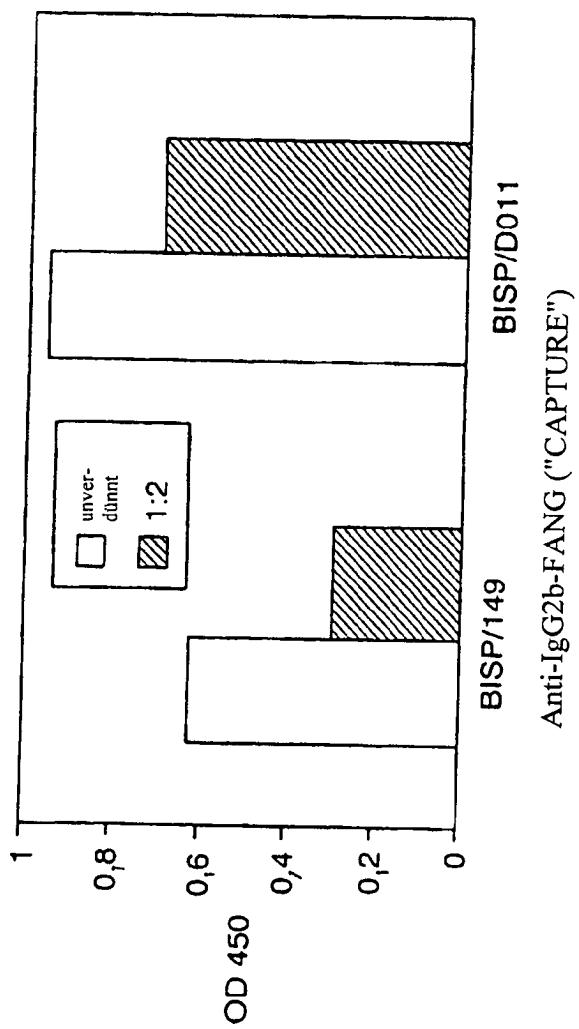


FIG. 11

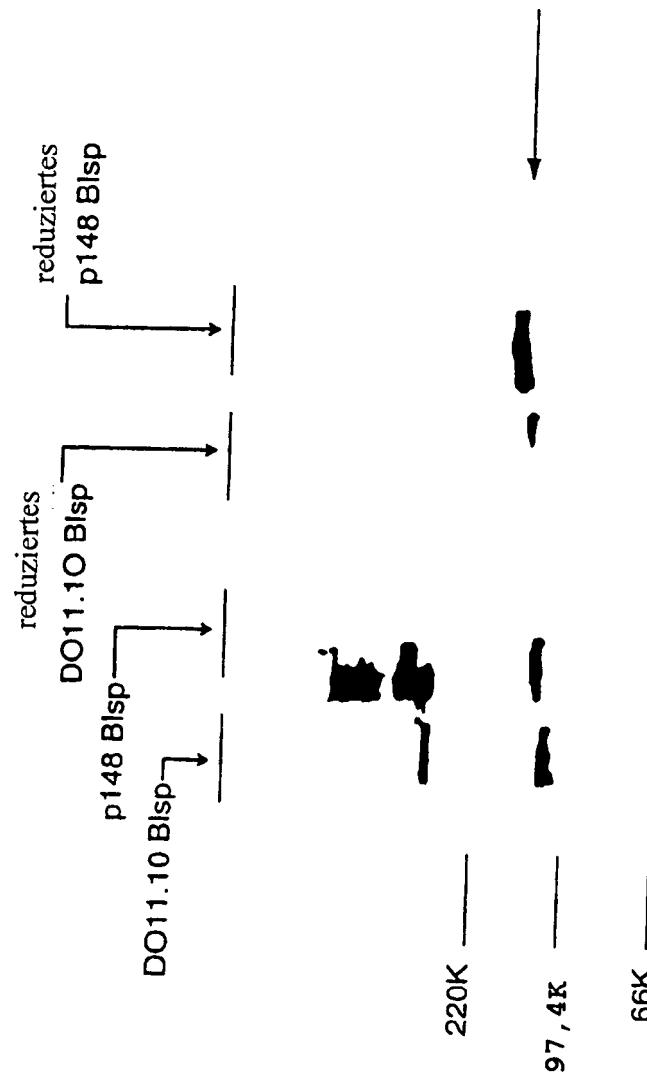


FIG. 12

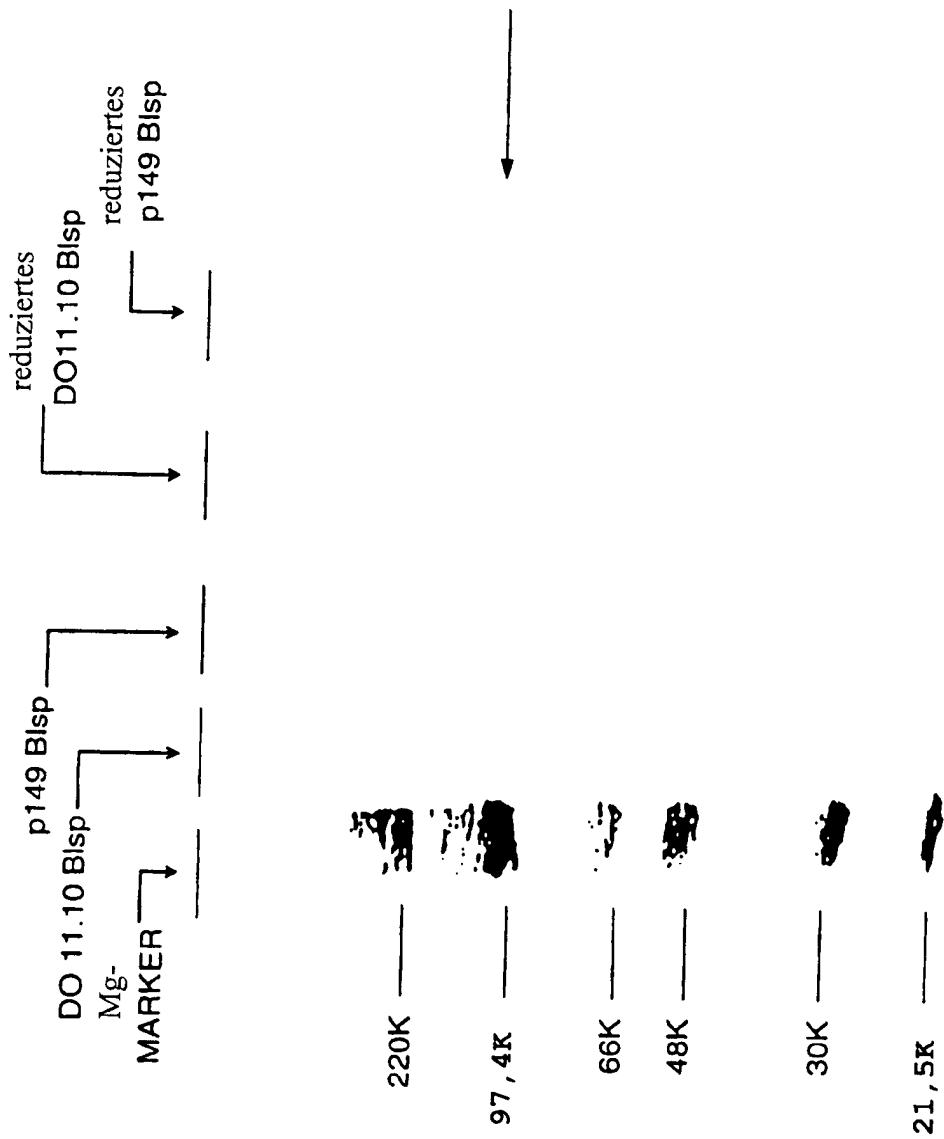


FIG. 13

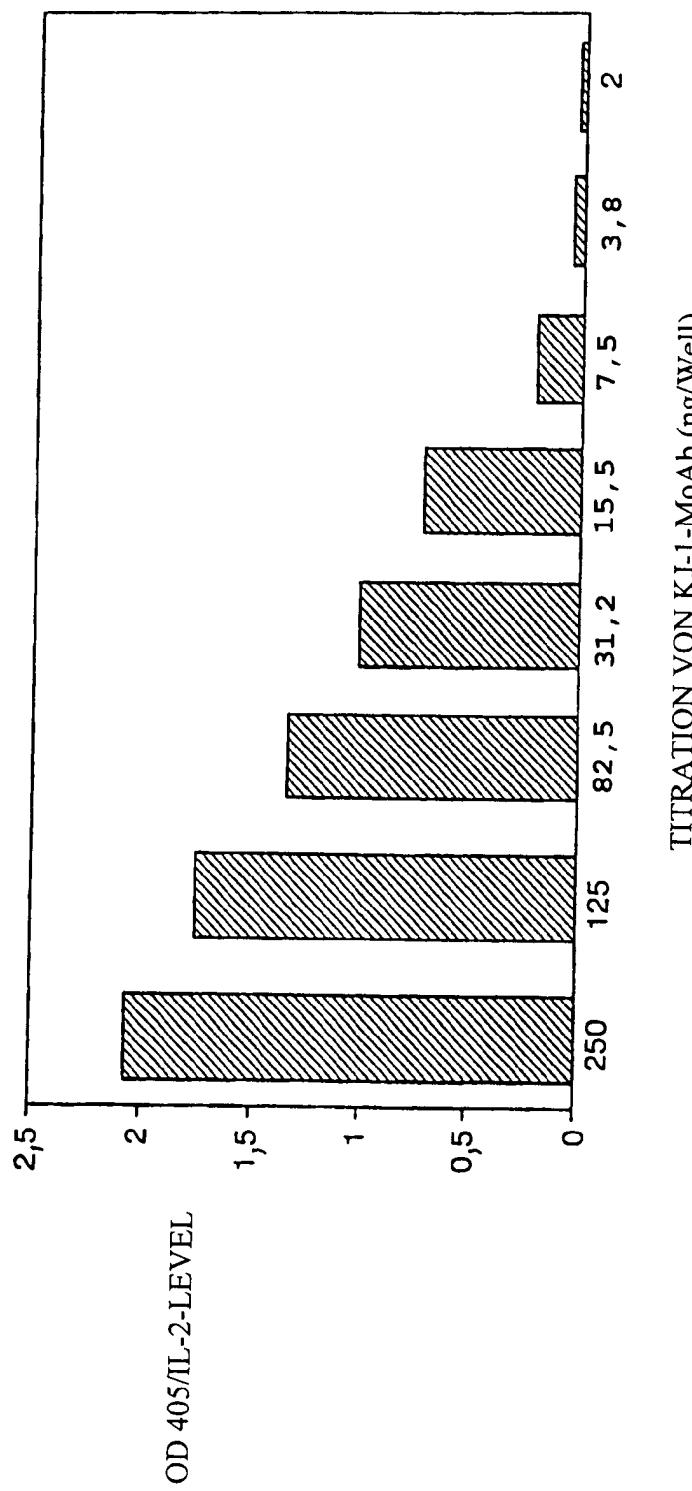
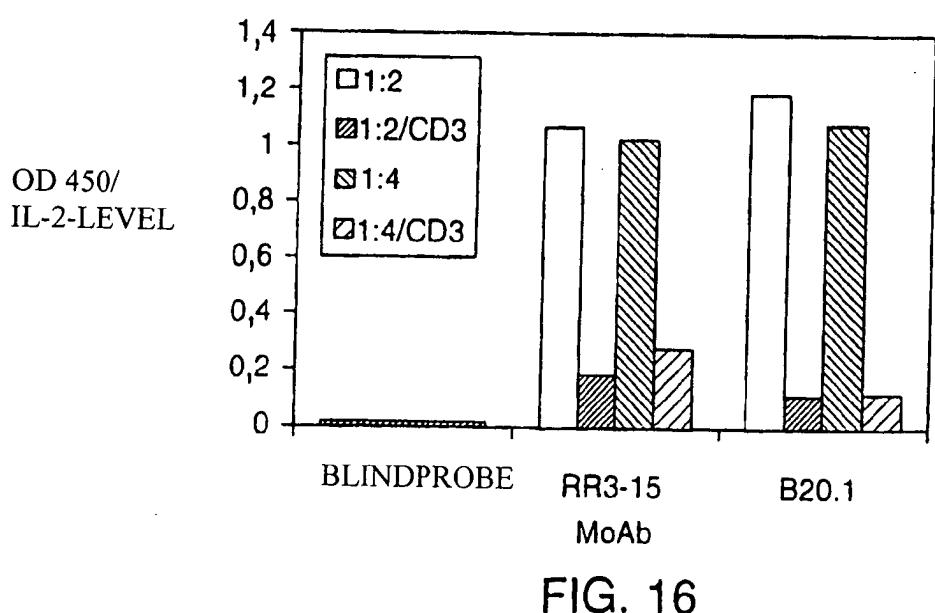
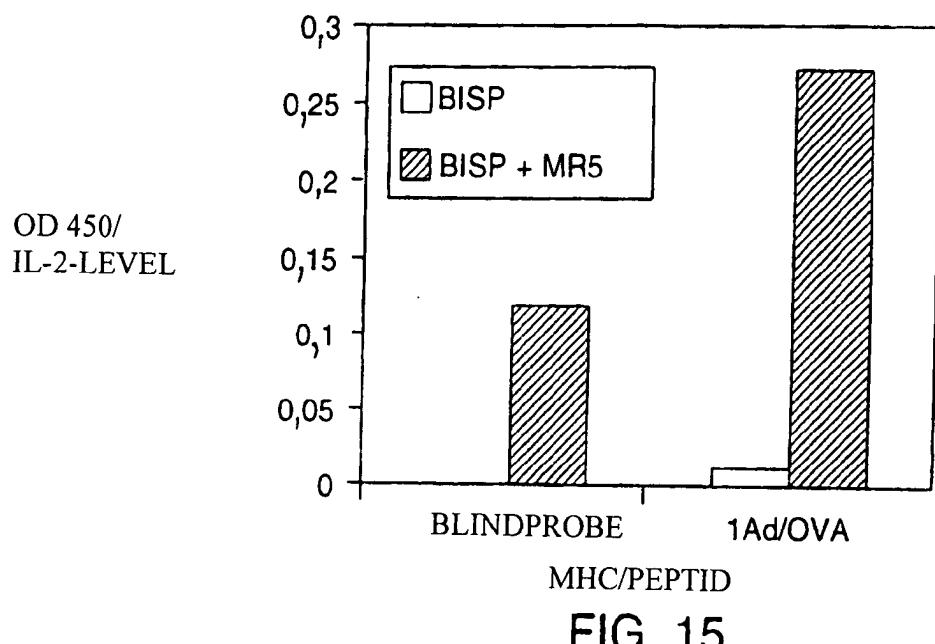


FIG. 14



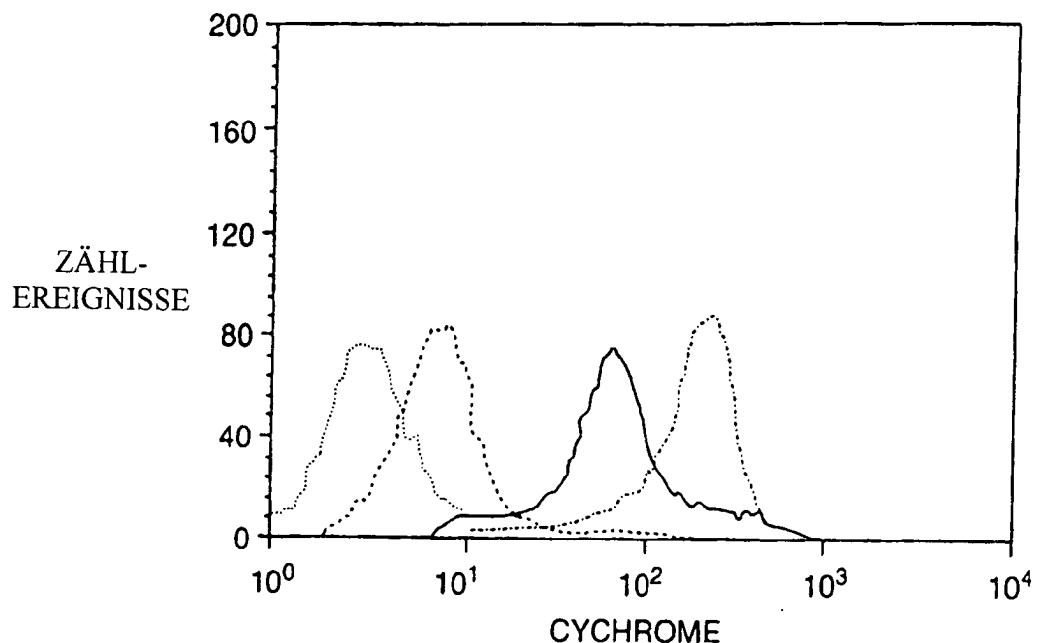


FIG. 17

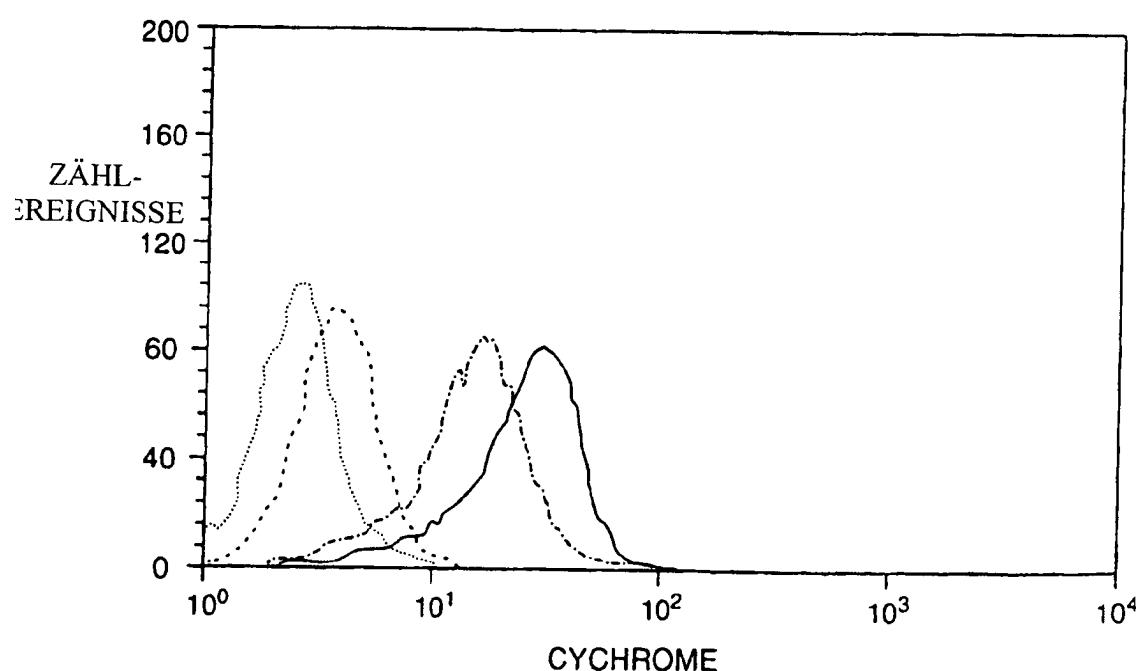


FIG. 18

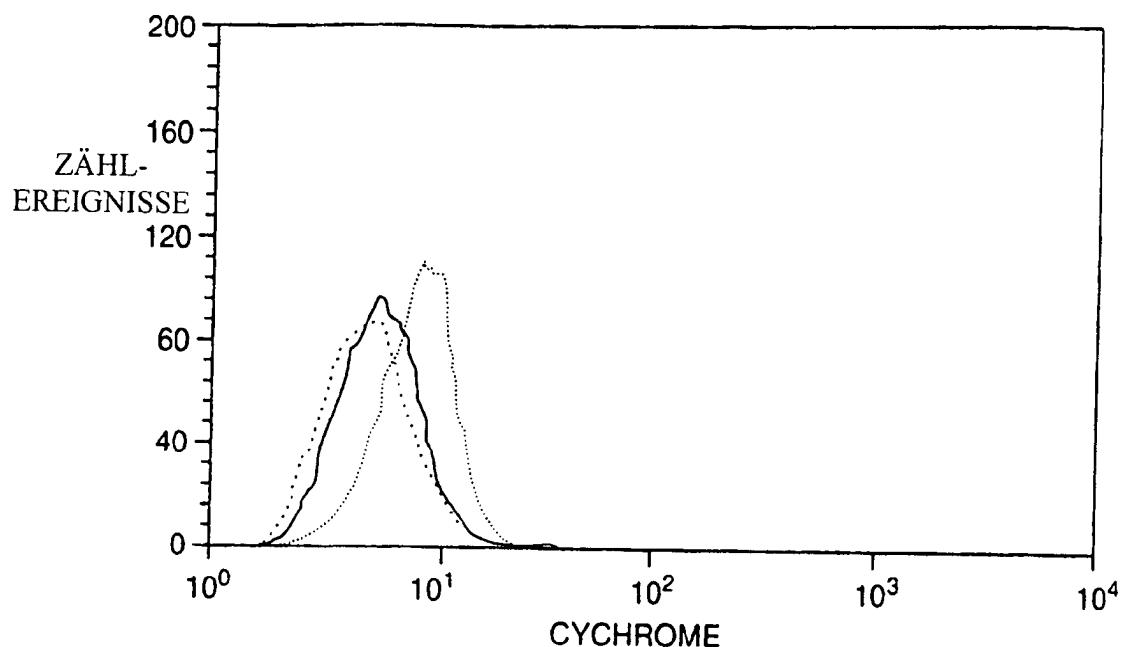


FIG. 19

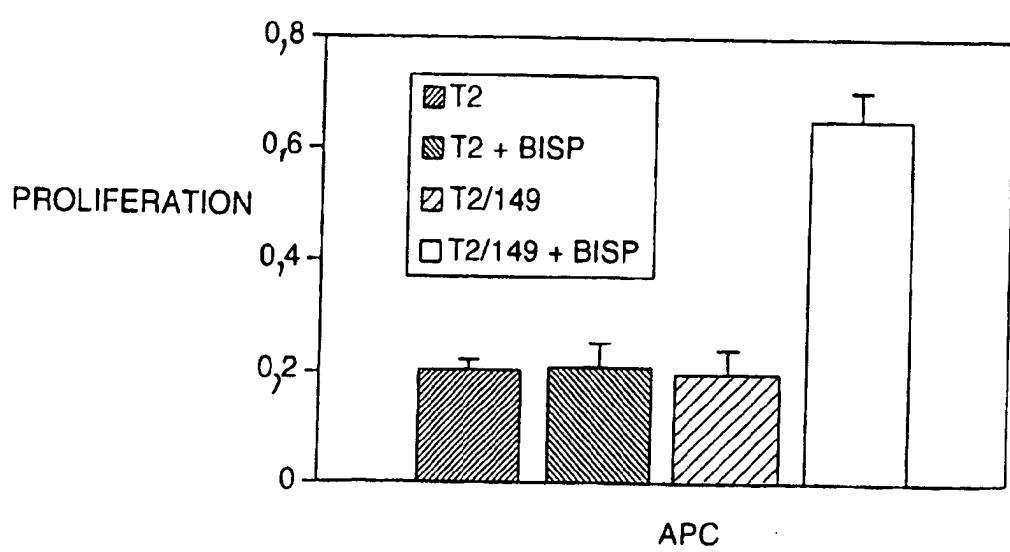


FIG. 20

FIG. 21A-1

FIG. 21A-2

FIG. 21A-3

KC169 GAG GTG ACC GGT GAG CAG GTG GAG CAG CTT CC (SEQ ID NO:16).

KC171 GAG GTG GAG GCC CAG CCG GCC ATG GCC CAG CAG GTG AGA CAA AG
(SEQ ID NO:17).

5

FIG. 21A

KC 172 GAG GTG GAG CTC GAG CAA TGC TGG TGT CAT CCA AAC
(SEQ ID NO:18).

KC 174 GAG GTG GAG ACT AGT AGC TTC TGG GTT CTG (SEQ ID NO:19).

10

KC 176 GAG GTG GAG CCC GGG GTC TGC TCG GCC CCA GGC
(SEQ ID NO:20).

FIG. 21A-1

- 15 KC203 GAG GTG ACC GGT CAG CAG GTG AGA CAA AGT CC (SEQ ID NO:21) .
- KC208 GTG GAG ATC GAT AAG TGT ACT TAC GTT TTC ATT ATC GCG ATC CGG
AGT TAA CGT CTG CTC GGC CCC AG (SEQ ID NO:22) .
- 20 KC209 AAC GCA AAG ACA ACC GCC CCT TCA GTA TAT CCA CTA GCG CCC GTT T
(SEQ ID NO:23) .
- KC210 CCG GAA ACG GGC GCT AGT GGA TAT ACT GAA GGG GCG GTT GTC
GCG TT (SEQ ID NO:24) .
- 25 KC237 CGA GAG GAA GAG TAC ATG CCG ATG GAA TAA TGA AAA CGT AAG
TAC ACT TAT (SEQ ID NO:25) .

FIG. 21A-2

KC238 CGA TAA GTG TAC TTA CGT m CAT TAT TCC ATC GGC ATG TAC TCT
TCT TCC TCT CG (SEQ ID NO.:26) .

30

KC239 CGA AAA CGT AAG TAC ACT TAT (SEQ ID NO.:27) .

FIG. 21A-3

FIG. 21B-1

FIG. 21B-2

FIG. 21B-3

FIG. 21B

KC240 CGA TAA GTG TAC TTA CGT TTT CG (SEQ ID NO:28) .

KC 243 GAG GTG GCC CAG CCG GCC ATG GCC GAC ATC CAG ATG ACC (SEQ ID NO:29) .

5 KC244

GAG GTG ACT AGT TTT GAT TTC CAG CTT GGT G (SEQ ID NO:30) .

KC245

CTA GTG GAG GTG GCG GAT CAG GAG GCG GAG GTT CTC GCG GAG GTG GGAGTC (SEQ ID NO:31) .

10 KC246

TCG AGA CTC CCA CCT CCG CCA GAA CCT CCG CCT CCT GAT CCG CCA CCT CCA (SEQ ID NO:32) .

FIG. 21B-1

- 15 KC247 GAG GTG CTC GAG GAG GTG CAG CTG GTG G (SEQ ID NO :33) .
- KC250 GAG GTG TCC GGA GAC ATC CAG ATG ACC (SEQ ID NO :34) .
- KC251 GAG GTG TCG CGA TGA GGA GAC GGT GAC C (SEQ ID NO :35) .
- 20 KC253 GAG GTG GAA TTC TCA TTA CCC GGG TGA GGA GAC GGT GAC CAT G (SEQ ID NO:36) .
- KC268 GTG GAG GAA TTC TGC TGC TCG GCC CCA G (SEQ ID NO :37) .
- 25 KC275 GAG GTG TCG CGA CAG CTA CCG GTG TCC ACT CCG AGC AGG TGG AGC AGC TTC C (SEQ ID NO :38) .
- KC276 GAG GTG TCG CGA CAG CTA CCG GTG TCC ACT CCC AGC AGG TGA GAC AAA GTC C (SEQ ID NO :39) .

FIG. 21B-2

- 30 KC293 CAA GCA GCC TCA GGA ACT CTG GAA ATA CGC TC (SEQ ID NO : 40) .
- KC294 GAG CGT ATT TCC AGA GTT CCT GAG GCT GCT TG (SEQ ID NO : 41) .
- 35 KC295 AAC GGT GGA GGG GGCTCA T (SEQ ID NO : 42) .
- KC296 CCG GAT GAG CCC CCT CCA CCG TT (SEQ ID NO : 43) .

FIG. 21B-3