



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 602 24 291 T2** 2008.12.11

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 427 744 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **602 24 291.6**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US02/27220**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **02 763 536.6**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2003/018771**

(86) PCT-Anmeldetag: **26.08.2002**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **06.03.2003**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **16.06.2004**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **26.12.2007**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **11.12.2008**

(51) Int Cl.⁸: **C07H 21/02** (2006.01)

C07H 21/04 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C12N 15/67 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

315209 P **27.08.2001** **US**

(73) Patentinhaber:

Genentech, Inc., South San Francisco, Calif., US

(74) Vertreter:

LEINWEBER & ZIMMERMANN, 80331 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

**ANDERSEN, Dana C., Redwood City, CA 94061,
US; SIMMONS, Laura C., Burlingame, CA 94010,
US**

(54) Bezeichnung: **SYSTEM ZUR ANTIKÖRPEREXPRESSION UND- SYNTHESE**

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

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

Beschreibung**FACHGEBIET DER ERFINDUNG**

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft im Allgemeinen die Fachgebiete der Molekularbiologie und Protein-technologie. Speziell betrifft die Erfindung rekombinant produzierte Antikörper und deren Verwendungen.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0002] In den letzten Jahren gab es zunehmend Hoffnungen, Antikörper als diagnostische und therapeutische Mittel für verschiedene Leiden und Erkrankungen zu verwenden. Viele Anwendungen in Forschung und im klinischen Bereich erfordern große Mengen funktioneller Antikörper oder Antikörperfragmente, was größere, dennoch wirtschaftliche Systeme zur Antikörperherstellung notwendig macht. Besonders nützlich ist die rekombinante Produktion von Antikörpern unter Verwendung einer Vielzahl von Expressionswirten, die von Prokaryoten wie z. B. *E. coli* oder *B. subtilis* bis zu Hefe, Pflanzen-, Insektenzellen und Säuegetierzellen reichen. Kipriyanov und Little, *Mol. Biotech.* 12, 173–201 (1999).

[0003] Verglichen mit anderen Antikörperproduktionssystemen stellen Bakterien, insbesondere *E. coli*, viele einzigartige Vorteile bereit. Die verwendeten Rohmaterialien (d. h. Bakterienzellen) sind kostengünstig und können einfach gezüchtet werden, wodurch die Produktionskosten reduziert werden. Prokaryotische Wirte wachsen schneller als z. B. Säuegetierzellen, was eine schnellere Analyse von genetischen Manipulationen ermöglicht. Kürzere Verdopplungszeit und leichtere Maßstabsvergrößerung machen bakterielle Fermentation zu einem attraktiveren Mittel für Proteinherstellung in großen Mengen. Die genomische Struktur und biologische Aktivität von vielen Bakterienspezies, einschließlich *E. coli*, sind gut studiert worden, und eine große Zahl an geeigneten Vektoren ist verfügbar, was die Expression eines erwünschten Antikörpers einfacher macht. Verglichen mit Eukaryoten sind in den Herstellungsprozess weniger Schritte involviert, einschließlich Manipulation von rekombinanten Genen, stabile Transformation von Mehrfachkopien in den Wirt, Expressionsinduktion und Charakterisierung der Produkte. Pluckthun und Pack, *Immunotech.* 3, 83–105 (1997).

[0004] Zusätzlich dazu ermöglicht *E. coli* einen einzigartigen Zugang zu willkürlichen Ansätzen. Aufgrund der beispiellosen Wirksamkeit für Transformation durch Plasmide oder Transfektion durch Phagen können *E.-coli*-Systeme zur Herstellung von Phagenbibliotheken vieler Arten von Antikörpervarianten dienen, was insbesondere für funktionelle genomische Studien wichtig ist.

[0005] Verschiedene Ansätze sind verwendet worden, um rekombinante Antikörper in Bakterien herzustellen. Wie andere heterologe Proteine können Antikörpermoleküle aus Bakterien entweder durch Rückfaltung von Einschlusskörpern, die im Zytoplasma exprimiert werden, oder durch Expression gefolgt von Sekretion in das Bakterienperiplasma erhalten werden. Die Wahl zwischen Sekretion und Rückfaltung ist im Allgemeinen von verschiedenen Überlegungen abhängig. Sekretion ist üblicherweise die schnellere und häufiger verwendete Strategie zur Herstellung von Antikörpern. Kipriyanov und Little, siehe oben (1999).

[0006] Opper et al., US-Patent Nr. 6.008.023, beschreiben ein zytoplasmatisches *E.-coli*-Expressionssystem, worin Antikörperfragmente (z. B. Fabs) mit einem Enzym zur Verwendung in Tumorthherapie, auf die abgezielt wird, fusioniert ist. Zemel-Dressen et al., *Gene* 27, 315–322 (1984), berichten über die Sekretion und Verarbeitung einer Antikörper-Leichtkette in *E. coli*. Lo et al., PCT-Veröffentlichung WO 93/07896, berichten über die *E.-coli*-Herstellung eines tetrameren Antikörpers, dem die CH2-Region in seiner Schwarkette fehlt. Die Gene, die für die Leichtkette und die CH2-deletierte Schwarkette kodieren, werden unter der Kontrolle eines einzelnen Promotors im selben Expressionsvektor hergestellt.

[0007] Antikörperexpression in prokaryotischen Systemen kann auf verschiedenen Ebenen durchgeführt werden. Die Schüttelkolbenkulturen (im Bereich von 2–5 Liter) erzeugen typischerweise weniger als 5 mg/Liter Produkte. Carter et al., *Bio/Technology* 10, 12–16 (1992), entwickelten ein Fermentationssystem mit hoher Zelldichte, in welchem eine Expression von Antikörperfragmenten in hohem Ausmaß erhalten wurde (bis zu 2 g/Liter). Die Gramm/Liter-Titer von Fab', die von Carter et al. erhalten wurden, sind großteils auf höhere Zelldichten zurückzuführen, die aus der genauer kontrollierten Umgebung eines Fermenters resultiert anstatt aus jener, die aus einem einfachen Schüttelkolben resultiert. Das System enthält ein dicistronisches Operon, das entworfen ist, um die Leichtketten- und Schwarkettenfragmente zu co-exprimieren. Das di-cistronische Operon ist unter der Kontrolle eines einzelnen *E.-coli*-*phoA*-Promotors, der durch Phosphatmangel induzierbar ist. Jeder Antikörperkette geht eine hitzestabile *E.-coli*-Enterotoxin-II-(still-)Signalsequenz voraus, um die Sekretion in den periplasmatischen Raum zu steuern. Das von Carter et al. (1992) beschriebene System ist hierin nach-

stehend weiter beschrieben.

[0008] Für allgemeine Berichte über Antikörperproduktion in *E. coli* siehe Pluckthun und Pack, Immunotech. 3, 83–105 (1997), Pluckthun et al., in ANTIBODY ENGINEERING: A PRACTICAL APPROACH, Oxford Press, 203–252 (1996), Pluckthun, in HANDBOOK OF EXP. PHARMCOL., Band 3: THE PHARMCOL. OF MONOCLONAL ANTIBODIES, Hrsg. M. Rosenberg und G. P. Moore, Springer-Verlag, Berlin, 269–315 (1994).

[0009] Viele biologische Tests (wie z. B. Röntgenkristallographie) und klinische Anwendungen (wie z. B. Röntgentherapie) erfordern große Mengen an Antikörpern. Dementsprechend besteht Bedarf an einfachen Systemen, die hohe Ausbeute erbringen, zur Produktion von gut assemblierten, löslichen und funktionellen Antikörpern.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0010] Die vorliegende Erfindung stellt neue Verfahren und Zusammensetzungen zur rekombinanten Herstellung von funktionellen Antikörpern oder Antikörperfragmenten in Wirtszellen, wie z. B. prokaryotischen oder eukaryotischen Wirtszellen, bereit. In einer Ausführungsform stellt die Erfindung ein Verfahren zur temporären Trennung der Expression von Leichtkette und Schwereketten eines Antikörpers in einer Wirtszelle, wie z. B. einer prokaryotischen Zelle, bereit, wodurch die Ausbeute von angeordneten, funktionellen Antikörpermolekülen gesteigert wird. Insbesondere umfasst das Verfahren die Transformation der Wirtszelle mit zwei separaten Translationseinheiten, die für die Leicht- und Schwereketten kodieren, Züchten der Zelle unter geeigneten Bedingungen, sodass die Leicht- und Schwereketten auf eine sequentielle Art und Weise exprimiert werden, wodurch die Herstellung der Leicht- und Schwereketten temporär getrennt wird, und Ermöglichen der Anordnung der Leicht- und Schwereketten, um den funktionellen Antikörper oder ein Fragment davon zu bilden. Die zeitlich getrennte Expression von Leicht- und Schwereketten wurde unter Verwendung von zwei verschiedenen Promotoren durchgeführt, welche die Leicht- und Schwereketten separat kontrollieren, worin die verschiedenen Promotoren unter verschiedenen Bedingungen aktiviert werden. Zum Beispiel können DNAs, die für die Leicht- und Schwereketten kodieren, in einen einzelnen Plasmidvektor inkorporiert werden, werden aber in zwei Translationseinheiten getrennt, wovon jede durch einen anderen Promotor kontrolliert wird. Ein Promotor (z. B. ein erster Promotor) kann entweder konstitutiv oder induzierbar sein, während der andere Promotor (z. B. ein zweiter Promotor) induzierbar ist. Beispielsweise wird, wenn die Wirtszellen, die mit einem solchen Vektor transformiert sind, unter Bedingungen gezüchtet werden, die für Aktivierung eines Promotors (z. B. des ersten Promotors) geeignet sind, nur eine Kette (z. B. die Leichtkette) exprimiert. Dann werden nach einem gewünschten Expressionszeitraum der ersten Kette (z. B. der Leichtkette) Züchtungsbedingungen auf geeignete Bedingungen zur Aktivierung des anderen Promotors (z. B. des zweiten Promotors) geändert und daher die Expression der zweiten Kette (z. B. der Schwereketten) induziert. In einer bevorzugten Ausführungsform wird zuerst die Leichtkette exprimiert, gefolgt von der Schwereketten. In einer anderen Ausführungsform wird die Schwereketten zuerst exprimiert, gefolgt von der Leichtkette.

[0011] Die Erfindung stellt auch einen rekombinanten Vektor zur Herstellung eines angeordneten funktionellen Antikörpers oder Fragments davon in einer prokaryotischen oder eukaryotischen Wirtszelle bereit, wobei der Vektor einen ersten Promotor umfasst, der einer ersten Translationseinheit vorausgeht, die für ein Sekretionssignal kodiert, das operabel an eine Leichtkette gebunden ist, und einen zweiten Promotor, der einer zweiten Translationseinheit vorausgeht, die für ein Sekretionssignal kodiert, das operabel an eine Schwereketten gebunden ist. Der erste und zweite Promotor sind unter unterschiedlichen Bedingungen induzierbar.

[0012] Viele prokaryotische und eukaryotische Zellen können als Wirte für Antikörperexpression gemäß der Erfindung verwendet werden. Vorzugsweise ist ein prokaryotischer Wirt ein gramnegatives Bakterium. Noch bevorzugter ist der Wirt *E. coli*. In einem Aspekt ist die Wirtszelle ein genetisch veränderter *E. coli*-Stamm, der für die Herstellung von heterologen Proteinen in großen Mengen geeignet ist. Zum Beispiel können die Wirtszellen ein *E. coli*-Stamm sein, der mutierte Allele für Proteasen und/oder Extrakopien der *dsb*-Gene enthält. Viele bekannte Promotoren, konstitutiv oder induzierbar, sind zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung geeignet, solange sie wirksam in Kombination mit einem anderen Promotor verwendet werden können.

[0013] Die Verfahren und Zusammensetzungen der Erfindung können für die Herstellung einer großen Zahl an assemblierten Antikörpermolekülen, einschließlich intakter Antikörper oder Antikörperfragmente, wie z. B. Fab, Fab', F(ab')₂, F(ab')₂-Leucinzipperfusion, Fv und dsFv, verwendet werden. Weiters können Antikörpermoleküle der Erfindung menschlich, chimär, humanisiert oder affinitätsgerichtet sein. Der Antikörper kann für ein beliebiges geeignetes Antigen spezifisch sein, vorzugsweise jene biologisch wichtigen Polypeptide. Ein Antikörperfragment kann an eine Dimerisierungsdomäne, wie z. B. eine Leucinzipper-Domäne, fusioniert sein.

[0014] Es werden auch verschiedene diagnostische und therapeutische Anwendungen der Antikörper erwogen, die gemäß der hierin beschriebenen Verfahren hergestellt werden. In einer therapeutischen Anwendung wird der rekombinant hergestellte Antikörper oder ein Fragment davon in Kombination mit einem anderen therapeutischen Mittel in einer Behandlung verwendet.

KURZBESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0015] [Fig. 1](#) ist eine schematische Darstellung der Herstellung der AntiCD18-F(ab')₂(Leucinzipper)-Plasmide pS1130 (einzelner Promotor) und pxCD18-7T3 (dualer Promotor).

[0016] [Fig. 2](#) zeigt die insertierte Nucleinsäuresequenz des dualen Promotor-Konstrukts pxCD18-7T3.

[0017] [Fig. 3](#) zeigt die Aminosäuresequenzen, für welche die zwei Translationseinheiten innerhalb des Konstrukts pxCD18-7T3 kodieren. N-terminale STII-Sekretionssignalsequenzen sind unterstrichen.

[0018] [Fig. 4](#) vergleicht die Ausbeuten der angeordneten F(ab')₂ unter Verwendung des einzelnen Promotorsystems (pS1130/59A7) und des dualen Promotorsystems (pxCD18-7T3/59A7).

[0019] [Fig. 5](#) zeigt Anti-CD18-Expressionsprofile mit dem einzelnen Promotorexpressionssystem (pS1130).

[0020] [Fig. 6](#) zeigt Anti-CD 18-Expressionsprofile mit dem dualen Promotorexpressionssystem (pxCD18-7T3).

[0021] [Fig. 7](#) vergleicht die gesamten Schwerkettenausbeuten und Anordnungswirksamkeiten des einzelnen Promotorsystems (pS1130) und des dualen Promotorsystems (pxCD18-7T3). Die Anordnungswirksamkeiten repräsentieren den Anteil von Schwerkette, der während der ersten 10 Stunden der Schwerkettensynthese in F(ab')₂ assembliert wird.

[0022] [Fig. 8](#) ist eine schematische Darstellung der Anti-Gewebefaktor-IgG1-Plasmide paTF130 (PhoA/PhoA-Promotoren) und pxTF-7T3FL (PhoA/TacII-Promotoren).

[0023] [Fig. 9](#) zeigt die insertierte Nucleinsäuresequenz des PhoA/TacII-Promotorkonstrukts pxTF-7T3FL.

[0024] [Fig. 10](#) zeigt die Aminosäuresequenzen, für welche die zwei Translationseinheiten innerhalb des Konstrukts pxTF-7T3FL kodieren. N-terminale STII-Sekretionssignalsequenzen sind unterstrichen.

[0025] [Fig. 11A](#) und [11B](#) sind Ergebnisse von Western-Blots unter reduzierten ([11A](#)) oder nicht-reduzierten ([11B](#)) Bedingungen, wodurch die Anti-Gewebefaktor-IgG1-Expressionen unter Verwendung desselben Promotorsystems (PhoA/PhoA) und des dualen Promotorsystems (PhoA/TacII) verglichen werden.

DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER BEVORZUGTEN AUSFÜHRUNGSFORMEN

[0026] Die Hauptausführungsformen der vorliegenden Erfindung basieren auf der überraschenden Entdeckung, dass Ausbeuten der richtig angeordneten, löslichen Antikörper in einem Wirtszellsystem, wie z. B. einem E.-coli-Fermentationssystem, dramatisch gesteigert werden können, indem die Induktion der Leichtketten- und Schwerkettenexpression temporär getrennt wird. Unter Verwendung eines neuen Rekombinationsystems, worin eine Kette (z. B. die Leichtkette) vor der Induktion der Expression der zweiten Kette (z. B. der Schwerkette) exprimiert wurde, ist eine etwa zweifache Verbesserung im Titer des angeordneten Antikörpers über ein vergleichbares System erreicht worden, worin die Leicht- und Schwerketten gleichzeitig exprimiert wurden.

[0027] Antikörper sind traditionellerweise in Wirtszellen, wie z. B. E. coli, unter Verwendung von dicistronischen Vektoren, in welchen Gene, die für Leichtkette und Schwerkette kodieren, unter der Kontrolle eines einzelnen Promotors stehen, produziert worden. Unter Kultivierungsbedingungen, die für die Aktivierung des Promotors geeignet sind, werden sowohl Leichtketten- als auch Schwerkettengene gleichzeitig exprimiert. Zum Beispiel beschreiben Carter et al., Bio/Technology 10, 163–167 (1992), ein dicistronisches Operon für Leicht- und Schwerkettenfragmente unter der Kontrolle eines einzelnen E.-coli-phoA-Promotors, der durch Phosphatentzug induzierbar ist. Jeder Antikörperkette geht die hitzestabile E.-coli-Enterotoxin-II-(stII-)Signalsequenz voraus, um die Sekretion in den periplasmatischen Raum zu steuern. Wenn dieser Vektor verwendet wurde, um eine bestimmte Antikörperproduktion durchzuführen, insbesondere wenn die Expressionsausmaße sowohl

von Leichtketten als auch Schwerketten hoch waren, wurden signifikante Mengen der individuellen Kettenmoleküle zusammengeschlossen und konnten nicht in lösliche und funktionelle Antikörper assembliert werden. Die Probleme von Aggregation in dicistronischen Vektoren (mit einem einzelnen Promotor sowohl für Leichtketten- als auch Schwerkettenexpression) sind in den nachstehend beschriebenen Beispielen weiters veranschaulicht.

[0028] Ohne Einschränkung auf eine bestimmte Theorie kann das Problem der Aggregation zumindest teilweise auf die eingeschränkte Fähigkeit der individuellen Kette zurückgeführt werden, sich unter den oben beschriebenen Bedingungen zu falten. Individuelle Ketten eines Antikörpers können sich während des Prozesses der Expression, Sekretion und Anordnung in funktionelle Antikörpern unterschiedlich verhalten. Zum Beispiel kann eine Kette (z. B. die Leichtkette) überwiegend löslich bleiben, nachdem sie alleine in den periplasmatischen Raum der Wirtszellen sekretiert wird, während die andere Kette (z. B. die Schwerkette) nach Sekretion großteils aggregiert und unlöslich wird, wenn sie nicht als Teil eines angeordneten Antikörperkomplexes existiert. Daher kann eine frühere Expression der löslicheren Kette die Faltung der weniger löslichen Kette und nachfolgende Anordnung der zwei Ketten erleichtern. Zusätzlich dazu kann die Wirtszelle eingeschränkte Kapazität zur Translokation von exprimierten Polypeptiden über ihren Sekretionsapparat aufweisen. Die Grenze der Sekretionskapazität kann in bestimmten Situationen überschritten werden, zum Beispiel wo mehrere Polypeptide gleichzeitig exprimiert werden oder wo eine große Menge an Vorläuferproteinen durch einen Vektor mit starker Translationsstärke exprimiert wird oder ein großes Protein exprimiert wird oder eine beliebige Kombination davon. Als Ergebnis werden die weniger reifen Proteine sekretiert und sind für eine Anordnung in den Antikörperkomplex geeignet.

[0029] Unabhängig von den Mechanismen stellt die vorliegende Erfindung ein neues (prokaryotisches oder eukaryotisches) System zur Antikörperproduktion mit signifikant gesteigerten Ausbeuten von angeordneten, löslichen und funktionellen Antikörpermolekülen bereit. Unter Verwendung des dualen Promotorexpressionsvektors der Erfindung wird zuerst eine Kette synthetisiert. Nachdem eine bestimmte Menge der ersten Kette exprimiert worden ist, kann die Expression der zweiten Kette unter einem zweiten Promotor induziert werden, der auf eine geänderte Kultivierungsbedingung reagiert. Die neu exprimierte zweite Kette kann dann in der Lage sein, mit der zuvor hergestellten ersten Kette einen Komplex zu bilden, der verfügbar ist, um lösliche Antikörper oder Fragmente davon zu bilden. Daher können durch Manipulation des Timings der Expression der zwei Ketten stärker exprimierte Antikörperketten in den löslichen Antikörperkomplex gesteuert werden, was die Gesamtausbeute davon erhöht.

[0030] Während das temporär getrennte Expressionssystem der vorliegenden Erfindung hauptsächlich durch die Produktion von Antikörpern oder Fragmenten davon veranschaulicht ist, sollte verstanden werden, dass der hierin beschriebene Ansatz in einem beliebigen System anwendbar ist, in welchem mehrere Proteineinheiten/ketten produziert werden sollen und ein Zwischen- oder Endproteinkomplex eine richtige Anordnung von individuellen Einheiten/Ketten erfordert, um funktionell zu sein. Der Ansatz ist insbesondere zur Produktion von Proteinkomplexen nützlich, die immunglobulinähnliche Domänen enthalten, wie z. B. Antikörper, T-Zellrezeptoren, Klasse-I- und Klasse-II-MHC-Moleküle, Integrine, CD8- und CD28-Moleküle und verwandte Fragmente, Derivate, Varianten und Fusionsproteine davon.

Antikörper

[0031] Der Begriff „Antikörper“ wird im weitesten Sinn verwendet und umfasst monoklonale Antikörper, polyclonale Antikörper, mehrwertige Antikörper, multispezifische Antikörper (z. B. bispezifische Antikörper) und Antikörperfragmente, solange sie die gewünschte biologische Aktivität zeigen. Ein natürlich auftretender Antikörper umfasst vier Polypeptidketten, zwei identische Schwer-(H-)Ketten und zwei identische Leicht-(L-)Ketten, die durch Disulfidbindungen miteinander verbunden sind. Jede Schwerkette besteht aus einer variablen Schwerkettenregion (V_H) und einer konstanten Schwerkettenregion, die in ihrer nativen Form aus drei Domänen besteht, CH1, CH2 und CH3. Jede Leichtkette besteht aus einer variablen Leichtkettenregion (V_L) und einer konstanten Leichtkettenregion. Die konstante Leichtkettenregion besteht aus einer Domäne C_L . Die V_H - und V_L -Regionen können weiters in Regionen von Hypervariabilität unterteilt werden, die komplementaritätsbestimmende Regionen (CDR) genannt werden, durchsetzt mit Regionen, die konservierter sind, die Gerüstregionen (FR) genannt werden. Jedes V_H und V_L besteht aus drei CDRs und vier FRs, die vom Aminoterminal zum Carboxyterminal in der folgenden Reihenfolge angeordnet sind: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

[0032] Die Leichtketten von Antikörpern aus einer beliebigen Wirbeltierspezies können einem von zwei klar unterschiedlichen Typen zugeordnet werden, die kappa (κ) und lambda (λ) genannt werden, basierend auf den

Aminosäuresequenzen ihrer konstanten Domänen.

[0033] Abhängig von den Aminosäuresequenzen der konstanten Domänen ihrer Schwarketten können Antikörper (Immunglobuline) zu verschiedenen Klassen zugeordnet werden. Es gibt fünf Hauptklassen von Immunglobulinen: IgA, IgD, IgE, IgG und IgM, und mehrere dieser können weiter in Unterklassen (Isotypen) unterteilt werden, z. B. IgG-1, IgG-2, IgA-1, IgA-2 etc. Die konstanten Schwarkettendomänen, die den verschiedenen Klassen von Immunglobulinen entsprechen, werden jeweils α , δ , ϵ , γ bzw. μ genannt. Die Untereinheitsstrukturen und dreidimensionalen Konfigurationen von verschiedenen Klassen von Immunglobulinen sind fachbekannt und im Allgemeinen z. B. in Abbas et al., Cellular and Mol. Immunology, 4. Auflage (2000), beschrieben.

[0034] Ein Antikörper kann Teil eines größeren Fusionsmolekül sein, gebildet durch kovalente oder nicht-kovalente Assoziation des Antikörpers oder Antikörperabschnitts mit einem oder mehreren anderen Proteinen oder Peptiden. Beispiele für solche Fusionsproteine umfassen die Verwendung von Streptavidin-Kernregionen, um ein tetrameres scFv-Molekül herzustellen (Kipriyanov et al., Human Antibodies and Hybridomas 6, 93–101 (1995)), und Verwendung eines Cysteinrests, eines Markerpeptids und einer C-terminalen Polyhistidin-Markierung, um bivalente und biotinylierte scFv-Moleküle herzustellen (S. M. Kipriyanov et al., Mol. Immunol 31, 1047–1058 (1994)).

[0035] Die vorliegende Erfindung umfasst monoklonale Antikörper. Der Begriff „monoklonaler Antikörper“ wie hierin verwendet betrifft einen Antikörper, der aus einer Population von im Wesentlichen homogenen Antikörpern gewonnen wird, d. h. die individuellen Antikörper, die die Population umfassen, sind identisch, mit Ausnahme von möglichen natürlich auftretenden Mutationen, die in geringeren Mengen gegenwärtig sein können. Monoklonale Antikörper sind höchst spezifisch und sind gegen ein einzelnes Antigen gerichtet. Weiters ist im Gegensatz zu polyklonalen Antikörperformulierungen, die typischerweise verschiedene Antikörper umfassen, die gegen verschiedene Determinanten (Epitope) gerichtet sind, jeder monoklonale Antikörper gegen eine einzelne Determinante auf dem Antigen gerichtet.

[0036] Die monoklonalen Antikörper hierin umfassen insbesondere „chimäre“ Antikörper, in welchen ein Abschnitt der Schwer- und/oder Leichtkette mit den entsprechenden Sequenzen in Antikörpern, die von einer besonderen Spezies abstammen oder einer bestimmten Antikörperklasse oder -unterklasse angehören, identisch oder homolog ist, während der Rest der Kette(n) mit entsprechenden Sequenzen in Antikörpern, die von einer anderen Spezies abstammen oder einer anderen Antikörperklasse oder -unterklasse angehören, identisch oder homolog sind, sowie Fragmente solcher Antikörper, solange sie die gewünschte biologische Aktivität zeigen (US-Patent Nr. 4.816.567 und Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 6851–6855 (1984)).

[0037] Ein „funktioneller“ oder „biologisch aktiver“ Antikörper ist einer, der in der Lage ist, eine oder mehrere seiner natürlichen Aktivitäten in strukturellen, regulierenden, biochemischen oder biophysikalischen Ereignissen auszuüben. Zum Beispiel kann ein funktioneller Antikörper die Fähigkeit haben, sich spezifisch an ein Antigen zu binden, und die Bindung kann wiederum ein zelluläres oder molekulares Ereignis, wie z. B. Signaltransduktion oder enzymatische Aktivität, hervorrufen oder ändern. Ein funktioneller Antikörper kann auch Ligandenaktivierung eines Rezeptors blockieren oder als Agonistenantikörper wirken. Die Fähigkeit eines Antikörpers, eine oder mehrere seiner natürlichen Aktivitäten auszuüben, hängt von verschiedenen Faktoren ab, einschließlich korrekter Faltung und Anordnung der Polypeptidketten. Wie hierin verwendet sind die funktionellen Antikörper, die durch die offenbarten Verfahren erzeugt werden, typischerweise Heterotetramere mit zwei identischen L-Ketten und zwei identischen H-Ketten, die durch mehrere Disulfidbindungen verbunden sind und korrekt gefaltet sind. In einigen Aspekten umfasst die vorliegende Erfindung blockierende Antikörper, Antikörperantagonisten und/oder Antikörperagonisten. Ein „blockierender“ Antikörper oder ein Antikörper-„Antagonist“ ist einer, der biologische Aktivität des Antigens, das es bindet, hemmt oder reduziert. Eine solche Blockade kann durch beliebige Mittel auftreten, z. B. durch das Eingreifen in: Ligandenbindung an den Rezeptor, Rezeptorkomplexbildung, Tyrosinkinase-Aktivität eines Tyrosinkinaserzeptors in einem Rezeptorkomplex und/oder Phosphorylierung von Tyrosinkinaserest(en) in oder durch den Rezeptor. Zum Beispiel bindet ein VEGF-Antagonistenantikörper VEGF und hemmt die Fähigkeit von VEGF, Gefäßendothelzellproliferation zu induzieren. Bevorzugte blockierende Antikörper oder Antagonistenantikörper hemmen die biologische Aktivität des Antigens vollständig.

[0038] Ein „Antikörperagonist“ ist ein Antikörper, der Antigen wie z. B. einen Rezeptor bindet und aktiviert. Im Allgemeinen ist die Rezeptoraktivierungsfähigkeit des Agonistenantikörpers einem nativen Agonistenliganden des Rezeptors zumindest qualitativ ähnlich (und kann im Wesentlichen quantitativ ähnlich sein).

Antigenspezifität

[0039] Die vorliegende Erfindung ist auf Antikörper oder Antikörperfragmente einer beliebigen geeigneten Antigenbindungsspezifität anwendbar. Vorzugsweise sind die Antikörper der Erfindung für Antigene spezifisch, die biologisch wichtige Polypeptide sind. Noch bevorzugter sind die Antikörper der Erfindung für Therapie oder Diagnose von Erkrankungen oder Leiden in einem Säugetier geeignet. Die Antikörper oder Antikörperfragmente, die gemäß der vorliegenden Erfindung erhalten werden, sind als therapeutische Mittel, wie z. B. blockierende Antikörper, Antikörperagonisten oder Antikörperkonjugate, besonders nützlich. Nicht-einschränkende Beispiele für therapeutische Antikörper umfassen Anti-VEGF, Anti-IgE, Anti-CD11, Anti-CD18, Antigewebefaktor und Anti-TrkC-Antikörper. Antikörper, die gegen Nicht-Polypeptidantigene gerichtet sind (wie z. B. tumorassoziierte Glykolipidantigene), werden ebenfalls erwogen.

[0040] Der Begriff „Antigen“ ist im Fachgebiet verständlich und umfasst Substanzen, die immunogen sind, d. h. Immunogene, sowie Substanzen, die immunologische fehlende Reaktionsfähigkeit oder Anergie induzieren, d. h. Anergene. Wenn das Antigen ein Polypeptid ist, kann es ein Transmembranmolekül (z. B. Rezeptor) oder Ligand sein, wie z. B. ein Wachstumsfaktor. Beispielhafte Antigene umfassen Moleküle, wie z. B. Renin, ein Wachstumshormon, einschließlich eines menschlichen Wachstumshormons und Rinderwachstumshormons, Wachstumshormon-Freisetzungsfaktor, Parathormon, thyroidstimulierendes Hormon, Lipoproteine, Alpha-1-Antitrypsin, Insulin-A-Kette, Insulin-B-Kette, Proinsulin, follikelstimulierendes Hormon, Calcitonin, luteinisierendes Hormon, Glukagon, Gerinnungsfaktoren, wie z. B. Faktor VIIIc, Faktor-IX, Gewebefaktor (TF) und Von-Willebrand-Faktor, Anti-Gerinnungsfaktoren, wie z. B. Protein C, atrialen natriuretischen Faktor, Lungentensid, Plasminogenaktivator, wie z. B. Urokinase oder menschlicher Urin- oder Gewebetyp-Plasminogenaktivator (t-PA), Bombesin, Thrombin, blutbildenden Wachstumsfaktor, Tumornekrose-Faktor-alpha und -beta, Enkephalinase, RANTES (reguliert bei Aktivierung, normalerweise von T-Zellen exprimiert und sekretiert), menschliches Makrophagen-Entzündungsprotein (MIP-1-alpha), ein Serumalbumin, wie z. B. menschliches Serumalbumin, Anti-Müller-Substanz, Relaxin-A-Kette, Relaxin-B-Kette, Prorelaxin, Maus-Gonadotropin-assoziiertes Peptid, Mikrobenprotein, wie z. B. Beta-Lactamase, DNase, IgE, ein zytotoxisches T-lymphozyten-assoziiertes Antigen (CTLA), wie z. B. CTLA-4, Inhibin, Activin, Gefäßendothelwachstumsfaktor (VEGF), Rezeptoren für Hormone oder Wachstumsfaktoren, Protein A oder D, Rheumatoidfaktoren, einen neurotrophischen Faktor, wie z. B. von Knochen abstammenden neurotrophischen Faktor (BDNF), Neurotrophin-3, -4, -5 oder -6 (NT-3, NT-4, NT-5 oder NT-6), oder einen Nervenwachstumsfaktor, wie z. B. NGF- β , von Blutplättchen abstammenden Wachstumsfaktor (PDGF), Fibroblastenwachstumsfaktor, wie z. B. aFGF und bFGF, Epidermiswachstumsfaktor (EGF), einen transformierenden Wachstumsfaktor (TGF), wie z. B. TGF-alpha und TGF-beta, einschließlich TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, TGF- β 4 oder TGF- β 5, insulinähnlichen Wachstumsfaktor-I und -II (IGF-I und IGF-II), des(1-3)-IGF-I (Gehirn-IGF-I), insulinähnliche Wachstumsfaktorbindungsproteine, CD-Proteine, wie z. B. CD3, CD4, CD8, CD19 und CD20, Erythropoietin, osteoinduktive Faktoren, Immunotoxine, ein morphogenetisches Knochenprotein (BMP), ein Interferon, wie z. B. Interferon-alpha, -beta und -gamma, koloniestimulierende Faktoren (CSFs), z. B. M-CSF, GM-CSF und G-CSF, Interleukine (ILs), z. B. IL-1 bis IL-10, Superoxiddismutase, T-Zellrezeptoren, Oberflächenmembranproteine, zerfallsbeschleunigenden Faktor, Virusantigen, wie z. B. einen Abschnitt der AIDS-Hülle, Transportproteine, homing-Rezeptoren; Addressine; Regulationsproteine, Integrine, wie z. B. CD11a, CD11b, CD11c, CD18, ein ICAM, VLA-4 und VCAM, ein tumorassoziiertes Antigen, wie z. B. HER2-, HER3- oder HER4-Rezeptor, und Fragmente von beliebigen der oben angeführten Polypeptide.

[0041] Bevorzugte Antigene für Antikörper, die in der vorliegenden Erfindung enthalten sind, umfassen CD-Proteine, wie z. B. CD3, CD4, CD8, CD11a, CD11b, CD18, CD19, CD20, CD34 und CD46, Elemente der ErbB-Rezeptorfamilie, wie z. B. den EGF-Rezeptor, HER2-, HER3- oder HER4-Rezeptor, Zelladhäsionsmoleküle, wie z. B. LFA-1, Mac1, p150.95, VLA-4, ICAM-1, VCAM, α 4/ β 7-Integrin und α v/ β 3-Integrin, einschließlich entweder α - oder β -Untereinheiten davon, Wachstumsfaktoren, wie z. B. VEGF, Gewebefaktor (TF) und TGF- β , Alphainterferon (α -IFN), ein Interleukin, wie z. B. IL-8, IgE, Blutgruppenantigen Apo2, Todesrezeptor, flk2/flt3-Rezeptor, Fettleibigkeits (OB-)Rezeptor, mpl-Rezeptor, CTLA-4, Protein C etc. Die bevorzugtesten Targets hierin sind VEGF, TF, CD19, CD20, CD40, TGF- β , CD11a, CD18, Apo2 und C24.

[0042] Lösliche Antigene oder Fragmente davon, gegebenenfalls an andere Moleküle konjugiert, können als Immunogene zur Herstellung von Antikörpern dienen. Für Transmembranmoleküle, wie z. B. Rezeptoren, können Fragmente dieser Moleküle (z. B. die extrazelluläre Domäne eines Rezeptors) als Immunogen verwendet werden. Alternativ dazu können Zellen, die das Transmembranmolekül exprimieren, als Immunogen verwendet werden. Solche Zellen können aus einer natürlichen Quelle stammen (z. B. Krebszelllinien) oder können Zellen sein, die durch Rekombinationsverfahren transformiert worden sind, um das Transmembranmolekül zu exprimieren. Andere Antigene und Formen davon, die zur Herstellung von Antikörpern nützlich sind, sind Fach-

leuten bekannt.

[0043] Die Antikörper der vorliegenden Erfindung können monospezifisch, bispezifisch, trispezifisch oder von größerer Multispezifität sein. Multispezifische Antikörper können für verschiedene Epitope eines einzelnen Moleküls spezifisch sein oder für Epitope auf verschiedenen Molekülen spezifisch sein. Verfahren zum Entwurf und zur Herstellung multispezifischer Antikörper sind fachbekannt. Siehe z. B. Millstein et al., *Nature* 305, 537–539 (1983), Kostelny et al., *J. Immunol.* 148, 1547–1553 (1992), WO 93/17715.

Antikörperfragmente

[0044] Die vorliegende Erfindung erwägt die prokaryotische oder eukaryotische Produktion von Antikörpern oder Antikörperfragmenten. Viele Formen von Antikörperfragmenten sind fachbekannt und hierin enthalten. „Antikörperfragmente“ umfassen nur einen Abschnitt eines intakten Antikörpers, im Allgemeinen umfassen sie eine Antigenbindungsstelle des intakten Antikörpers, und daher behalten sie die Fähigkeit bei, ein Antigen zu binden. Beispiele für Antikörperfragmente, die in der vorliegenden Erfindung enthalten sind, umfassen: (i) das Fab-Fragment mit VL-, CL-, VH- und CH1-Domänen; (ii) das Fab'-Fragment, das ein Fab-Fragment mit einem oder mehreren Cysteinresten am C-Terminus der CH1-Domäne ist, (iii) das Fd-Fragment mit VH- und CH1-Domänen; (iv) das Fd'-Fragment mit VH- und CH1-Domänen und einem oder mehreren Cysteinresten am C-Terminus der CH1-Domäne; (v) das Fv-Fragment mit den VL- und VH-Domänen eines einzelnen Arms eines Antikörpers; (vi) das dAb-Fragment (Ward et al., *Nature* 341, 544–546 (1989)), das aus einer VH-Domäne besteht, (vii) isolierte CDR-Regionen; (viii) F(ab')₂-Fragmente, ein bivalentes Fragment, einschließlich zweier Fab'-Fragmente, die durch eine Disulfidbrücke an der Gelenk-Region verbunden sind; (ix) einkettige Antikörpermoleküle (z. B. einkettige Fv, scFV) (Bird et al., *Science* 242, 423–426 (1988), und Huston et al., *PNAS* (USA) 85, 5879–5883 (1988)), (x) „Diakörper“ mit zwei Antigenbindungsstellen, die eine variable Schwereketten-domäne (VH) verbunden mit einer variablen Leichtketten-domäne (VL) in derselben Polypeptidkette umfassen (siehe z. B. EP 404.097, WO 93/11161 und Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 6444–6448 (1993)), die gemeinsam mit komplementären Leichtkettenpolypeptiden ein Paar von Antigenbindungsregionen bilden (Zapata et al., *Protein Eng.* 8 (10), 1057–1062 (1995), und US-Patent Nr. 5.641.870).

[0045] Weiters erwägt die vorliegende Erfindung Antikörperfragmente, die modifiziert werden, um ihre Stabilität zu verbessern und/oder Antikörperkomplexe mit Multivalenz zu bilden. Für viele medizinische Anwendungen können Antikörperfragmente ausreichend stabil gegen Denaturierungs- oder Proteolysebedingungen sein, und die Antikörperfragmente sollen idealerweise die Targetantigene mit hoher Affinität binden. Eine Vielzahl von Verfahren und Materialien sind entwickelt worden, um stabilisierte und/oder multivalente Antikörperfragmente bereitzustellen. Ein Antikörperfragment der Erfindung kann an eine Dimerisierungsdomäne fusioniert sein. In einer bevorzugten Ausführungsform werden die Antikörperfragmente der vorliegenden Erfindung durch die Anheftung einer Dimerisierungsdomäne dimerisiert, wie z. B. Leucinzipper.

[0046] „Leucinzipper“ ist ein Proteindimerisierungsmotiv, das in vielen eukaryotischen Transkriptionsfaktoren zu finden ist, wobei es dazu dient, die zwei DNA-Bindungsdomänen in geeignete Juxtaposition für die Bindung an Transkriptions-Enhancersequenzen zu bringen. Dimerisierung von Leucin-Zippern tritt über die Bildung einer kurzen parallelen superspiralisierten α -Helix auf, wobei ein Paar an α -Helices, in einem Superhelix-Twist umeinander gewickelt sind. Zhu et al., *J. Mol. Biol.* 300, 1377–1387 (2000). Diese superspiralisierten α -Helix-Strukturen, die aufgrund ihrer Präferenz für Leucin an jeder 7. Stelle „Leucinzipper“ genannt werden, sind ebenfalls als Dimerisierungsvorrichtungen in anderen Proteinen, einschließlich Antikörpern, verwendet worden. Hu et al., *Science* 250, 1400–1403 (1990), Blondel und Bedouelle, *Protein Eng.* 4, 457 (1992). Mehrere Spezies von Leucinzippern sind als besonders nützlich für dimere und tetramere Antikörperkonstrukte identifiziert worden. Pluckthun und Pack, *Immunotech.* 3, 83–105 (1997), Kostelny et al., *J. Immunol.* 148, 1547–1553 (1992).

Antikörpervarianten

[0047] Aminosäuresequenzmodifikation(en) von Antikörpern oder Fragmenten davon werden erwogen. Zum Beispiel kann es wünschenswert sein, die Bindungsaffinität und/oder andere biologische Eigenschaften des Antikörpers zu verbessern. Aminosäuresequenzvarianten des Antikörpers werden durch Einführung der geeigneten Nucleotidänderung in die Antikörpernucleinsäure oder durch Peptidsynthese hergestellt. Solche Modifikationen umfassen z. B. Deletionen von und/oder Insertionen in und/oder Substitutionen von Reste(n) innerhalb der Aminosäuresequenzen des Antikörpers. Eine beliebige Kombination von Deletion, Insertion und Substitution wird hergestellt, um zum Endprodukt zu gelangen, vorausgesetzt, dass das Endkonstrukt die gewünschten Eigenschaften besitzt. Die Aminosäureänderungen können in die betreffende Antikörperamino-

resequenz zu jenem Zeitpunkt eingeführt werden, zu welchem diese Sequenz hergestellt wird.

[0048] Ein nützliches Verfahren zur Identifikation von bestimmten Resten oder Regionen des Antikörpers, die bevorzugte Stellen für Mutagenese sind, wird „Alaninscanningmutagenese“ genannt, wie von Cunningham und Wells, Science 244, 1081–1085 (1989), beschrieben. Hier wird ein Rest oder eine Gruppe von Targetresten identifiziert (z. B. geladene Reste wie z. B. arg, asp, his, lys und glu) und durch eine neutrale oder negativ geladene Aminosäure (am bevorzugtesten Alanin oder Poylalanin) ersetzt, um die Wechselwirkung der Aminosäuren mit Antigen zu beeinflussen. Diese Aminosäurestellen, die funktionelle Empfindlichkeit auf die Substitutionen zeigen, werden dann durch Einführung weiterer oder anderer Varianten an oder für die Stellen der Substitution verfeinert. Daher muss, während die Stelle zur Einführung einer Aminosäuresequenzvariation vorbestimmt ist, das Wesen der Mutation per se nicht vorbestimmt sein. Zum Beispiel wird zur Analyse der Leistung einer Mutation an einer bestimmten Stelle Ala-Scanning oder zufallsbestimmte Mutagenese an dem/der Target-Codon oder -Region durchgeführt, und die exprimierten Antikörper werden auf die gewünschte Aktivität gescreent.

[0049] Aminosäuresequenzinsertionen umfassen amino- und/oder carboxylterminale Fusionen, die in der Länge von einem Rest bis hin zu Polypeptiden reichen, die hundert oder mehr Reste umfassen, sowie Intra-sequenzinsertionen von einzelnen oder mehreren Aminosäureresten. Beispiele für terminale Insertionen umfassen einen Antikörper mit einem N-terminalen Methionylrest oder den Antikörper, fusioniert an ein zytotoxisches Polypeptid. Andere Insertionsvarianten des Antikörpermoleküls umfassen die Fusion an den N- oder C-Terminus des Antikörpers an ein Enzym (z. B. für ADEPT) oder ein Polypeptid, das die Serumhalbwertszeit des Antikörpers steigert.

[0050] Eine andere Form der Variante ist eine Aminosäuresubstitutionsvariante. Diese Varianten haben zumindest einen Aminosäurerest im Antikörpermolekül, der durch einen anderen Rest ersetzt ist. Die Stellen vom größten Interesse für Substitutionsmutagenese umfassen die hypervariablen Regionen, aber es werden auch FR-Änderungen erwogen. Konservative Substitutionen sind in Tabelle I unter der Überschrift „bevorzugte Substitutionen“ angegeben. Wenn solche Substitutionen zu einer Veränderung der biologischen Aktivität führen, dann können substanziellere Änderungen, die als „beispielhafte Substitutionen“ in Tabelle 1 oder wie später beschrieben in Bezug auf Aminosäureklassen beschrieben sind, eingeführt werden und die Produkte gescreent werden.

Tabelle 1

Ursprünglicher Rest	Beispielhafte Substitutionen	Bevorzugte Substitutionen
Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; asp, lys; arg	gln
Asp (D)	glu; asn	glu
Cys (C)	ser; ala	ser
Gln (Q)	asn; glu	asn
Glu (E)	asp; gln	asp
Gly (G)	ala	ala
His (H)	asn; gln; lys; arg	arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; Norleucin	leu
Leu (L)	Norleucin; ile; val; met; ala; phe	ile
Lys (K)	arg; gln; asn	arg
Met (M)	leu; phe; ile	leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	tyr
Pro (P)	ala	ala
Ser (S)	thr; cys	cys
Thr (T)	ser	ser
Trp (W)	tyr; phe	tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; Norleucin	leu

[0051] Wesentliche Modifikationen der biologischen Eigenschaften des Antikörpers werden durch Auswahl von Substitutionen erreicht, die sich in ihrer Wirkung auf das Aufrechterhalten (a) der Struktur des Polypeptidgerüsts im Bereich der Substitution, z. B. als Faltblatt- oder Helixkonformation, (b) der Ladung oder Hydrophobie des Moleküls an der Targetstelle oder (c) der Sperrigkeit der Seitenkette signifikant unterscheiden. Natürlich auftretende Reste werden basierend auf gemeinsamen Seitenketteneigenschaften in Gruppen unterteilt:

- (1) hydrophob: Norleucin, met, ala, val, leu, ile;
- (2) neutral hydrophil: cys, ser, thr;
- (3) sauer: asp, glu;
- (4) basisch: asn, gln, his, lys, arg;
- (5) Reste, die Kettenorientierung beeinflussen: gly, pro; und
- (6) aromatisch: trp, tyr, phe.

[0052] Nicht-konservative Substitutionen umfassen den Austausch eines Elements einer dieser Klassen durch eine andere Klasse.

[0053] Ein beliebiger Cysteinrest, der nicht in die Aufrechterhaltung der günstigen Konformation des Antikörpers involviert ist, kann auch substituiert werden, im Allgemeinen durch Serin, um die oxidative Stabilität des Moleküls zu verbessern und abnorme Vernetzung zu vermeiden. Im Gegensatz dazu können Cysteinbindung(en) zu dem Antikörper hinzugefügt werden, um seine Stabilität zu verbessern.

[0054] Ein besonders bevorzugter Typ von Substitutionsvariante umfasst die Substitution einer oder mehrerer Reste der hypervariablen Region eines Elternantikörpers (z. B. eines humanisierten oder menschlichen Antikörpers). Im Allgemeinen weist/weisen die resultierende(n) Variante(n), die für weitere Entwicklung ausgewählt ist/sind, verbesserte biologische Eigenschaften in Bezug auf den Elternantikörper auf, aus welchem sie erzeugt wird/werden. Ein herkömmlicher Weg zur Herstellung solcher Substitutionsvarianten umfasst Affinitätsreifung unter Verwendung von Phagendisplay. Kurz gesagt werden mehrere Stellen einer hypervariablen Region (z. B. 6–7 Stellen) mutiert, um alle möglichen Aminosäuresubstitutionen an jeder Stelle zu erzeugen. Die so erzeugten Antikörper werden von filamentösen Phagenteilchen ausgehend als Fusionen an das

Gen-III-Produkt von M13, verpackt innerhalb jedes Teilchens, präsentiert. Die phagen-präsentierten Varianten werden dann auf ihre biologische Aktivität (z. B. Bindungsaffinität) gescreent, wie hierin offenbart. Um Kandidatenstellen von hypervariablen Regionen für Modifikation zu identifizieren, kann Alaninscanningmutagenese durchgeführt werden, um Reste einer hypervariablen Region zu identifizieren, die signifikant zur Antigenbindung beitragen. Alternativ dazu oder zusätzlich dazu kann es vorteilhaft sein, eine Kristallstruktur des Antigen-Antikörper-Komplexes zu analysieren, um Kontaktpunkte zwischen dem Antikörper und Antigen zu identifizieren. Solche Kontaktreste und benachbarten Reste sind Kandidaten für Substitutionen gemäß der hierin angeführten Verfahren. Wenn solche Varianten erzeugt worden sind, wird die Tafel von Varianten wie hierin beschrieben Screening unterworfen, und Antikörper mit besseren Eigenschaften in einem oder mehreren relevanten Tests können für weitere Entwicklung ausgewählt werden.

[0055] Nucleinsäuremoleküle, die für Aminosäuresequenzvarianten des Antikörpers kodieren, werden durch eine Vielzahl von fachbekannten Verfahren hergestellt. Diese Verfahren umfassen unter anderem Isolation aus einer natürlichen Quelle (im Fall von natürlich auftretenden Aminosäuresequenzvarianten) oder Herstellung durch oligonucleotidvermittelte (oder ortsgerichtete) Mutagenese, PCR-Mutagenese und Kassettenmutagenese einer früher hergestellten Variante oder Nicht-Varianten-Version des Antikörpers.

[0056] Es kann wünschenswert sein, eine oder mehrere Aminosäuremodifikationen in einer Fc-Region eines Antikörpers der Erfindung einzuführen, wodurch eine Fc-Regionvariante erzeugt wird. Die Fc-Regionvariante kann eine menschliche Fc-Regionsequenz umfassen (z. B. eine menschliche IgG1-, IgG2-, IgG3- oder IgG4-Fc-Region), die eine Aminosäuremodifikation (z. B. eine Substitution) an einer oder mehreren Aminosäurepositionen umfasst.

[0057] In einer Ausführungsform kann die Fc-Region-Variante veränderte neonatale Fc-Rezeptor-(FcRN-)Bindungsaffinität zeigen. Solche Fc-Region-Varianten können eine Aminosäuremodifikation an einer beliebigen von einer oder mehreren Aminosäurepositionen 238, 252, 253, 254, 255, 256, 265, 272, 286, 288, 303, 305, 307, 309, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 386, 388, 400, 413, 415, 424, 433, 434, 435, 436, 439 oder 447 der Fc-Region umfassen, worin die Nummerierung der Reste in der Fc-Region jene des EU-Indexes wie in Kabat ist. Fc-Region-Varianten mit reduzierter Bindung an einen FcRn können eine Aminosäuremodifikation an einer beliebigen von einer oder mehreren Aminosäurepositionen 252, 253, 254, 255, 288, 309, 386, 388, 400, 415, 433, 435, 436, 439 oder 447 der Fc-Region umfassen, worin die Nummerierung der Reste in der Fc-Region jene des EU-Indexes wie in Kabat ist. Die oben genannten Fc-Region-Varianten können alternativ dazu erhöhte Bindung an FcRn präsentieren und eine Aminosäuremodifikation an einer oder mehreren der Aminosäurepositionen 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 oder 434 der Fc-Region umfassen, worin die Nummerierung der Reste in der Fc-Region jene des EU-Indexes wie in Kabat ist.

[0058] Die Fc-Region-Variante mit reduzierter Bindung an FcγR kann eine Aminosäuremodifikation an einer beliebigen oder mehreren der Aminosäurepositionen 238, 239, 248, 249, 252, 254, 265, 268, 269, 270, 272, 278, 289, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 322, 324, 327, 329, 333, 335, 338, 340, 373, 376, 382, 388, 389, 414, 416, 419, 434, 435, 437, 438 oder 439 der Fc-Region umfassen, worin die Nummerierung der Reste in der Fc-Region jene des EU-Indexes wie in Kabat ist.

[0059] Zum Beispiel kann die Fc-Region-Variante reduzierte Bindung an FcγRI präsentieren und eine Aminosäuremodifikation an einer oder mehreren der Aminosäurepositionen 238, 265, 269, 270, 327 oder 329 der Fc-Region umfassen, worin die Nummerierung der Reste in der Fc-Region jene des EU-Indexes wie in Kabat ist.

[0060] Die Fc-Region-Variante kann reduzierte Bindung an FcγRII präsentieren und eine Aminosäuremodifikation an einer oder mehreren der Aminosäurepositionen 238, 265, 269, 270, 292, 294, 295, 298, 303, 324, 327, 329, 333, 335, 338, 373, 376, 414, 416, 419, 435, 438 oder 439 der Fc-Region umfassen, worin die Nummerierung der Reste in der Fc-Region jene des EU-Indexes wie in Kabat ist.

[0061] Die Fc-Region-Variante von Interesse kann reduzierte Bindung an FcγRIII zeigen und eine Aminosäuremodifikation an einer oder mehreren der Aminosäurepositionen 238 239, 248, 249, 252, 254, 265, 268, 269, 270, 272, 278, 289, 293, 294, 295, 296, 301, 303, 322, 327, 329, 338, 340, 373, 376, 382, 388, 389, 416, 434, 435 oder 437 der Fc-Region umfassen, worin die Nummerierung der Reste in der Fc-Region jene des EU-Indexes wie in Kabat ist.

[0062] Fc-Region-Varianten mit geänderter (d. h. verbesserter oder verringerter) C1q-Bindung und/oder kom-

plementabhängiger Zytotoxizität (CDC) sind in WO99/51642 beschrieben. Solche Varianten können eine Aminosäuresubstitution an einer oder mehreren Aminosäurepositionen 270, 322, 326, 327, 329, 331, 333 oder 334 der Fc-Region umfassen. Siehe auch Duncan & Winter, *Nature* 322, 738–40 (1988), US-Patent Nr. 5.648.260, US-Patent Nr. 5.624.821 und WO 94/29351 betreffend Fc-Region-Varianten.

Menschliche, humanisierte oder affinitätsgereifte Antikörper

[0063] Ein „menschlicher Antikörper“ ist einer, der eine Aminosäuresequenz besitzt, die jener eines Antikörpers entspricht, der von einem Menschen produziert wird, und/oder unter Verwendung von Verfahren zur Herstellung von menschlichen Antikörpern wie hierin offenbart hergestellt worden ist. Diese Definition eines menschlichen Antikörpers schließt insbesondere einen humanisierten Antikörper, der nicht-menschliche Antigenbindungsreste umfasst, aus.

[0064] Die vorliegende Erfindung umfasst sowohl menschliche als auch humanisierte Antikörper. „Humanisierte“ Formen von nicht-menschlichen (z. B. murinen) Antikörpern sind chimäre Antikörper, die eine Minimalsequenz enthalten, die von einem nicht-menschlichen Immunglobulin abstammt. Meistens sind humanisierte Antikörper menschliche Immunglobuline (Empfängerantikörper), in welchen Reste aus einer hypervariablen Region des Empfängers durch Reste aus einer hypervariablen Region einer nicht-menschlichen Spezies (Spenderantikörper), wie z. B. Maus, Ratte, Kaninchen oder nicht-menschlicher Primat, mit der gewünschten Spezifität, Affinität und Kapazität ersetzt sind. In manchen Fällen sind Gerüstregion-(FR-)Reste des menschlichen Immunglobulins durch entsprechende nicht-menschliche Reste ersetzt. Weiters können humanisierte Antikörper Reste umfassen, die im Empfängerantikörper oder im Spenderantikörper nicht zu finden sind. Diese Modifikationen werden durchgeführt, um Antikörperleistung weiter zu verfeinern. Im Allgemeinen umfasst der humanisierte Antikörper im Wesentlichen alle von zumindest einer und typischerweise zwei variabler Domänen, in welchen alle oder im Wesentlichen alle der hypervariablen Schleifen jenen eines nicht-menschlichen Immunglobulins und alle oder im Wesentlichen alle der FRs jene einer menschlichen Immunglobulinsequenz sind. Der humanisierte Antikörper umfasst gegebenenfalls zumindest einen Abschnitt einer konstanten Immunglobulinregion (Fc), typischerweise jene eines menschlichen Immunglobulins. Für weitere Details siehe Jones et al., *Nature* 321, 522–525 (1986), Riechmann et al., *Nature* 332, 323–329 (1988), und Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2, 593–596 (1992). Siehe auch die folgenden Übersichtsartikel und darin zitierten Verweise: Vaswani und Hamilton, *Ann. Allergy, Asthma & Immunol.* 1, 105–115 (1998), Harris, *Biochem. Soc. Transactions* 23, 1035–1038 (1995), Hurlé and Gross, *Curr. Op. Biotech* 5, 428–433 (1994).

[0065] Ein „affinitätsgereinigter“ Antikörper ist einer mit einer oder mehreren Änderungen in einer oder mehreren CDRs davon, die zu einer Verbesserung der Affinität des Antikörpers für Antigen führen, verglichen mit einem Elternantikörper, der keine dieser Änderung(en) besitzt. Bevorzugte affinitätsgereifte Antikörper haben Affinitäten für das Targetantigen in Nanomol- oder sogar Picomolbereich. Affinitätsgereinigte Antikörper werden durch fachbekannte Verfahren produziert. Marks et al., *Bio/Technology* 10, 779–783 (1992), beschreiben Affinitätsreifung durch VH- und VL-Domänen-Shuffling. Willkürliche Mutagenese von CDR- und/oder Gerüstresten ist von Barbas et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 3809–3813 (1994), Schier et al., *Gene* 169, 147–155 (1995), Yelton et al., *J. Immunol.* 155, 1994–2004 (1995), Jackson et al., *J. Immunol.* 154 (7), 3310–9 (1995), und Hawkins et al., *J. Mol. Biol.* 226, 889–896 (1992), beschrieben.

[0066] Verschiedene Verfahren zur Humanisierung von nicht-menschlichen Antikörpern sind fachbekannt. Zum Beispiel kann Humanisierung im Wesentlichen nach dem Verfahren von Winter und Mitarbeitern (Jones et al., *Nature* 321, 522–525 (1986), Riechmann et al., *Nature* 332, 323–327 (1988), Verhoeven et al., *Science* 239, 1534–1536 (1988)) durch Substitution hypervariabler Regionsequenzen für die entsprechenden Sequenzen eines menschlichen Antikörpers durchgeführt werden. Dementsprechend sind solche „humanisierten“ Antikörper chimäre Antikörper (US-Patent Nr. 4.816.567), worin im Wesentlichen weniger als eine intakte menschliche variable Domäne durch die entsprechende Sequenz aus einer nicht-menschlichen Spezies ersetzt wurde. In der Praxis sind humanisierte Antikörper typischerweise menschliche Antikörper, in welchen manche Reste einer hypervariablen Region und möglicherweise einige FR-Reste durch Reste von analogen Stellen in Nagetierantikörpern ersetzt sind.

[0067] Die Wahl der menschlichen variablen Domänen, sowohl Schwer- als auch Leicht-, die in der Herstellung von humanisierten Antikörpern verwendet werden können, ist sehr wichtig, um Antigenität zu reduzieren. Entsprechend der sogenannten „Methode der optimalen Anpassung“ wird die Sequenz der variablen Domäne eines Nagetiers gegen die gesamte Bibliothek von bekannten menschlichen Sequenzen einer variablen Domäne gescreent. Die menschliche Sequenz, die jener des Nagetiers am nächsten ist, wird dann als menschliches Gerüst für den humanisierten Antikörper akzeptiert (Sims et al., *J. Immunol.* 151, 2296 (1993), Chothia

et al., J. Mol. Biol. 196, 901 (1987)). Ein anderes Verfahren verwendet ein spezielles Gerüst, das von der Consensus-Sequenz aller menschlichen Antikörper einer bestimmten Untergruppe von Leicht- oder Schwereketten abstammt. Dasselbe Gerüst kann für mehrere verschiedene humanisierte Antikörper verwendet werden (Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 4285 (1992), Presta et al., J. Immunol. 151, 2623 (1993)).

[0068] Es ist weiters wichtig, dass Antikörper mit Beibehaltung hoher Affinität für das Antigen und anderer günstiger biologischer Eigenschaften humanisiert werden. Um dieses Ziel zu erreichen, werden gemäß einem bevorzugten Verfahren humanisierte Antikörper durch ein Verfahren zur Analyse der Elternsequenzen und verschiedener konzeptueller humanisierter Produkte unter Verwendung von dreidimensionalen Modellen der Eltern- und humanisierten Sequenzen hergestellt. Dreidimensionale Immunglobulinmodelle sind üblicherweise erhältlich und Fachleuten bekannt. Es sind Computerprogramme verfügbar, die mögliche dreidimensionale Konformationsstrukturen von ausgewählten Kandidatenimmunglobulinsequenzen veranschaulichen und präsentieren. Inspektion dieser Präsentationen ermöglicht Analyse der wahrscheinlichen Rolle der Reste in der Funktionsweise der Kandidatenimmunglobulinsequenz, d. h. die Analyse von Resten, die die Fähigkeit des Kandidatenimmunglobulins beeinflussen, ihr Antigen zu binden. Auf diese Weise können FR-Reste ausgewählt und aus den Empfänger- und Importsequenzen kombiniert werden, sodass die gewünschte Antikörpereigenschaft, wie z. B. erhöhte Affinität für das/die Targetantigen(e), erreicht wird. Im Allgemeinen sind die Reste einer hypervariablen Region direkt und in höherem Maße in die Beeinflussung der Antigenbindung involviert.

Antikörperderivate

[0069] Die Antikörper und Antikörpervarianten der vorliegenden Erfindung können weiters modifiziert werden, um weitere nicht-proteinhaltige Gruppierungen zu enthalten, die fachbekannt und einfach verfügbar sind. Derivatisierungen sind insbesondere zur Verbesserung oder Wiederherstellung von biologischen Eigenschaften der Antikörper oder Antikörperfragmente davon nützlich. Zum Beispiel kann PEG-Modifikation von Antikörperfragmenten die Stabilität, In-vivo-Zirkulationshalbwertszeit, Bindungsaffinität, Löslichkeit und Widerstandsfähigkeit gegenüber Proteolyse verändern.

[0070] Vorzugsweise sind die für Derivatisierung geeigneten Gruppierungen des Antikörpers wasserlösliche Polymere. Nicht-einschränkende Beispiele von wasserlöslichen Polymeren umfassen unter anderem Polyethylenglykol (PEG), Copolymere von Ethylenglykol/Propylenglykol, Carboxymethylcellulose, Dextran, Polyvinylalkohol, Polyvinylpyrrolidon, Poly-1,3-dioxolan, Poly-1,3,6-trioxan, Ethylen/Maleinsäureanhydridcopolymer, Polyaminosäuren (entweder Homopolymere oder willkürliche Copolymere) und Dextran oder Poly(n-vinylpyrrolidon)polyethylenglykol, Propylenglykolhomopolymere, Propylpropylenoxid/Ethylenoxid-Copolymere, polyoxyethylierte Polyole (z. B. Glycerin), Polyvinylalkohole und Gemische davon. Polyethylenglykolpropionaldehyd kann aufgrund seiner Stabilität in Wasser Vorteile in der Herstellung haben. Das Polymer kann von beliebigem Molekulargewicht und verzweigt oder unverzweigt sein. Die Zahl der an den Antikörper angehefteten Polymere kann variieren, und wenn mehr als ein Polymer angeheftet wird, können sie dieselben oder unterschiedliche Moleküle sein. Im Allgemeinen kann die Zahl und/oder Art von Polymeren, die zur Derivatisierung verwendet werden können, basierend auf Überlegungen, einschließlich unter anderem der besonderen Eigenschaften oder Funktionen des zu verbessernden Antikörpers, ob das Antikörperderivat in einer Therapie unter definierten Bedingungen verwendet wird, bestimmt werden.

[0071] Im Allgemeinen ist der Antikörper oder das Antikörperfragment, das durch ein prokaryotisches Expressionssystem wie hierin beschrieben hergestellt wird, nicht glykosyliert, und ihm fehlen die detektierbaren Effektoraktivitäten der Fc-Region. In manchen Fällen kann es wünschenswert sein, eine oder mehrere Effektorfunktionen des nativen Antikörpers zumindest teilweise wiederherzustellen. Dementsprechend erwägt die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Wiederherstellung der Effektorfunktion(en) durch Anheftung geeigneter Gruppierungen an identifizierten Reststellen in der Fc-Region des nicht glykosylierten Antikörpers. Eine bevorzugte Gruppierung für diesen Zweck ist EPG, obwohl andere Kohlenhydratpolymere ebenfalls verwendet werden können. Pegylierung kann durch eine beliebige der fachbekannten Pegylierungsreaktionen durchgeführt werden. Siehe zum Beispiel EP 0401384, EP 0154316, WO 98/48837. In einer Ausführungsform ersetzen Cysteinreste zuerst Reste an identifizierten Positionen des Antikörpers, wie z. B. jenen Positionen, worin der Antikörper oder die Antikörpervariante normalerweise glykosyliert ist, oder jenen Positionen auf der Oberfläche des Antikörpers. Vorzugsweise ersetzt das Cystein Rest(e) an einer oder mehreren Positionen 297, 298, 299, 264, 265 und 239 (Nummerierung gemäß dem EU-Index wie in Kabat). Nach Expression kann die cystein-substituierte Antikörpervariante verschiedene Formen von PEG (oder vorsynthetisiertem Kohlenhydrat) chemisch gebunden an freie Cysteinreste aufweisen.

Antikörperproduktion

Vektorherstellung

[0072] Der Begriff „Vektor“ wie hierin verwendet soll ein Nucleinsäuremolekül bezeichnen, das in der Lage ist, eine andere Nucleinsäure zu transportieren, an welche er gebunden ist. Eine Form von Vektor ist ein „Plasmid“, das sich auf eine zirkuläre doppelsträngige DNA-Schleife bezieht, in welche zusätzliche DNA-Segmente ligiert werden können. Eine andere Form von Vektor ist ein Virusvektor, worin zusätzliche DNA-Segmente in das Virusgenom ligiert werden können. Bestimmte Vektoren sind zur autonomen Replikation in einer Wirtszelle in der Lage, in welche sie eingeführt worden sind (z. B. Bakterienvektoren mit einem bakteriellen Replikationsstartpunkt und Episomensäugetiervektoren). Andere Vektoren (z. B. nicht-episomale Säugetiervektoren) können nach Einführung in die Wirtszelle in das Genom einer Wirtszelle integriert werden und dadurch gemeinsam mit dem Wirtsgenom repliziert werden. Weiters sind bestimmte Vektoren in der Lage, die Expression von Genen zu lenken, an welche sie operabel gebunden sind. Solche Vektoren werden hierin als „rekombinante Expressionsvektoren“ bezeichnet (oder einfach „rekombinante Vektoren“). Im Allgemeinen liegen Expressionsvektoren von Nützlichkeit in DNA-Rekombinationsverfahren oft in Form von Plasmiden vor. In der vorliegenden Beschreibung können „Plasmid“ und „Vektor“ austauschbar verwendet werden, da das Plasmid die am häufigsten verwendete Form von Vektor ist.

[0073] Der Begriff „Translationseinheit“ soll sich wie hierin verwendet auf ein genetisches Element beziehen, das die Nucleotidsequenz umfasst, die für eine Polypeptidkette und angrenzende Kontrollregionen kodiert. „Angrenzende Kontrollregionen“ umfassen z. B. eine Translationsinitiationsregion (TIR, wie hierin nachstehend beschrieben) und eine Terminationsregion.

[0074] Die „Translationsinitiationsregion“ oder TIR wie hierin verwendet bezieht sich auf eine Nucleinsäureregion, welche die Wirksamkeit von Translationsinitiation eines Gens von Interesse bereitstellt. Im Allgemeinen umfasst TIR innerhalb einer bestimmten Translationseinheit die Ribosomenbindungsstelle (RBS) und Sequenzen 5' und 3' zu RBS. Die RBS wird so definiert, um zumindest die Shine-Dalgarno-Region und das Startcodon (AUG) zu enthalten. Dementsprechend umfasst eine TIR auch zumindest einen Abschnitt der zu translatierenden Nucleinsäuresequenz. Vorzugsweise umfasst eine TIR die Sequenz, die für ein Sekretionssignalpeptid kodiert, die der Sequenz vorausgeht, die für die Leicht- oder Schwerkette innerhalb einer Translationseinheit kodiert. Eine TIR-Variante enthält Sequenzvarianten (insbesondere Substitutionen) innerhalb der TIR-Region, welche die Wirksamkeit der TIR, wie z. B. ihre Translationsstärke wie hierin nachstehend beschrieben, ändern. Vorzugsweise enthält eine TIR-Variante der Erfindung Sequenzsubstitutionen innerhalb der ersten 2 bis etwa 14, vorzugsweise etwa 4 bis 12, noch bevorzugter etwa 6 Codons, der Signalsequenz, die der Sequenz vorausgeht, die für die Leicht- oder Schwerkette innerhalb einer Translationseinheit kodiert.

[0075] Der Begriff „Translationsstärke“ wie hierin verwendet bezieht sich auf eine Messung eines sekretierten Polypeptids in einem Kontrollsystem, worin eine oder mehrere Varianten einer TIR verwendet werden, um Sekretion eines Polypeptids zu steuern, und die Ergebnisse mit Wildtyp-TIR oder einigen anderen Kontrollen unter denselben Kultur- und Testbedingungen verglichen werden. Ohne auf eine beliebige Theorie beschränkt zu sein, kann „Translationsstärke“ wie hierin verwendet z. B. ein Maß der mRNA-Stabilität, Wirksamkeit von Ribosomenbindung an die Ribosomenbindungsstelle und des Translokationsmodus über eine Membran umfassen.

[0076] „Sekretionssignalsequenz“ oder „Sekretionssignalpeptid“ bezeichnen eine kurze Aminosäuresequenz, die verwendet werden kann, um ein neu synthetisiertes Protein von Interesse durch eine Zellmembran zu steuern, z. B. die innere Membran oder sowohl die inneren als auch äußeren Membranen von Prokaryoten. Als solche wird in prokaryotischen Zellen zum Beispiel das Protein von Interesse, wie z. B. das Leicht- oder Schwerketten-Polypeptid, in das Periplasma der prokaryotischen Wirtszellen oder in das Kulturmedium sekretiert. Die Sekretionssignalsequenzen können zu den Wirtszellen endogen oder exogen sein, einschließlich Signalsequenzen, die für das Polypeptid nativ sind, das exprimiert werden soll. Sekretionssignalsequenzen befinden sich typischerweise am N-terminalen Abschnitt eines Polypeptids und werden typischerweise enzymatisch zwischen Biosynthese und Sekretion des Polypeptids aus dem Zytoplasma entfernt. Daher ist die Sekretionssignalsequenz üblicherweise im Endproteinprodukt nicht gegenwärtig.

[0077] Der Begriff „Wirtszelle“ (oder „rekombinante Wirtszelle“) wie hierin verwendet soll auf eine Zelle Bezug nehmen, die durch Einführung eines exogenen Polynucleotids, wie z. B. eines rekombinanten Plasmids oder Vektors, gentechnisch verändert worden ist oder in der Lage ist, dadurch genetisch verändert zu werden. Es soll verstanden werden, dass solche Begriffe nicht nur auf die bestimmte Subjektzelle, sondern auch auf die

Nachkommen einer solchen Zelle Bezug nehmen sollen. Da bestimmte Modifikationen in nachfolgenden Generationen aufgrund von entweder Mutation oder Umwelteinflüssen auftreten können, müssen solche Nachkommen mit der Elternzelle tatsächlich nicht identisch sein, sind aber im Schutzzumfang des Begriffes „Wirtszelle“ wie hierin verwendet noch enthalten.

[0078] DNA-Sequenzen, die für die Leicht- und Schwerketten des Antikörpermoleküls der Erfindung kodieren, können unter Verwendung von Standard-DNA-Rekombinationsverfahren erhalten werden. Gewünschte DNA-Sequenzen können isoliert werden und aus antikörperproduzierenden Zellen, wie z. B. Hybridomzellen, sequenziert werden. Alternativ dazu kann die DNA unter Verwendung von Nucleotidsynthesegeräten oder PCR-Verfahren synthetisiert werden. Sobald sie gewonnen werden, können DNAs, die für Leicht- und Schwerketten kodieren, in einen rekombinanten Vektor inseriert werden, der in der Lage ist, heterologe Polynucleotide in prokaryotischen oder eukaryotischen Wirte zu replizieren, exprimieren und sekretieren. Viele Vektoren, die verfügbar und fachbekannt sind, können zum Zwecke der vorliegenden Erfindung verwendet werden. Selektion eines geeigneten Vektors hängt hauptsächlich von der Größe von Nucleinsäuren, die inseriert werden sollen, und der speziellen Wirtszelle ab, die mit dem Vektor transformiert werden soll.

[0079] Im Allgemeinen werden rekombinante Vektoren, die Replicon- und Kontrollsequenzen enthalten, die von Spezies abgeleitet sind, die mit der Wirtszelle kompatibel sind, als Elternvektoren für die Herstellung der spezifischen Vektoren der vorliegenden Erfindung verwendet. Der Vektor trägt üblicherweise als Gerüstkomponenten eine Replikationsstartpunktstelle sowie Markierungssequenzen, die in der Lage sind, phänotypische Auswahl in transformierten Zellen bereitzustellen. Die Replikationsstartpunktstelle ist eine Nucleinsäuresequenz, die dem Vektor ermöglicht, sich in einer oder mehreren ausgewählten Wirtszellen zu replizieren. Im Allgemeinen ist in Klonierungsvektoren diese Sequenz eine, die es dem Vektor ermöglicht, sich unabhängig von Wirtschromosomen-DNA zu replizieren, und umfasst Replikationsstartpunkte oder sich autonom replizierende Sequenzen. Solche Sequenzen sind für eine Vielzahl von Bakterien, Hefe und Viren bekannt. Der Replikationsstartpunkt aus dem Plasmid pBR322 ist für die meisten gramnegativen Bakterien geeignet.

[0080] Expressions- und Klonierungsvektoren können ein Selektionsgen enthalten, das auch selektierbarer Marker genannt wird. Typische Selektionsgene kodieren für Proteine, die (a) Resistenz gegenüber Antibiotika oder anderen Toxinen verleihen, z. B. Ampicillin, Neomycin, Methotrexat oder Tetracyclin, (b) auxotrophe Mängel komplementieren oder (c) kritische Nährstoffe bereitstellen, die aus komplexen Medien nicht erhältlich sind, z. B. das Gen, das für D-Alaninracemase für Bacilli kodiert. Ein Beispiel für ein Selektionsschema verwendet ein Arzneimittel, um Wachstum einer Wirtszelle zu arretieren. Diese Zellen, die erfolgreich mit einem heterologen Gen transformiert werden, produzieren ein Protein, das Arzneimittelresistenz verleiht und daher das Selektionsverfahren überlebt. Ein Beispiel für Plasmidvektor, der für E.-coli-Transformation geeignet ist, ist pBR322. pBR322 enthält Gene, die für Ampicillin-(Amp-) und Tetracyclin-(Tet-)Resistenz kodieren, und stellt daher einfache Mittel zur Identifikation von transformierten Zellen bereit. Derivate von pBR322 oder andere Mikروبenplasmide oder Bakteriophagen können ebenfalls als Elternvektoren verwendet werden. Beispiele für pBR322-Derivate, die zur Expression von speziellen Antikörpern verwendet werden, sind in Carter et al., US-Patent Nr. 5.648.237, beschrieben.

[0081] Zusätzlich dazu können Phagenvektoren, die Replicon- und Kontrollsequenzen enthalten, die mit dem Wirtsmikroorganismus kompatibel sind, als transformierende Vektoren in Verbindung mit diesen Wirten verwendet werden. Zum Beispiel kann ein Bakteriophage wie λ GEM.TM-11 zur Herstellung eines rekombinanten Vektors verwendet werden, der dazu eingesetzt werden kann, empfindliche Wirtszellen wie E. coli LE392 zu transformieren.

[0082] Gemäß einer Ausführungsform umfasst der rekombinante Vektor der Erfindung zumindest zwei Translationseinheiten, eine für die Leichtkettenexpression und die andere für die Schwerkettenexpression. Weiters sind die zwei Translationseinheiten für Leichtkette und Schwerkette unter der Kontrolle von verschiedenen Promotoren.

[0083] Promotoren sind nicht-translatierte Sequenzen, die sich stromauf (5') dem Start einer Kodiersequenz befinden (im Allgemeinen innerhalb von etwa 100 bis 1000 bp), die ihre Expression kontrollieren. Solche Promotoren fallen typischerweise in zwei Klassen, induzierbar und konstitutiv. Induzierbare Promotoren sind Promotoren, die erhöhte Ausmaße von Transkription aus DNA unter deren Kontrolle als Reaktion auf einige Veränderungen der Kulturbedingungen, z. B. die Gegenwart oder Abwesenheit eines Nährstoffs oder einer Veränderung der Temperatur oder des pH, initiieren.

[0084] Zum Zwecke der vorliegenden Erfindung können entweder konstitutive oder induzierbare Promotoren

als erste Promotoren, die die rechtzeitige Expression der ersten Kette kontrollieren, und induzierbare Promotoren als zweite Promotoren, die die nachfolgende Expression der zweiten Kette kontrollieren, verwendet werden. In einer bevorzugten Ausführungsform sind sowohl der erste als auch der zweite Promotor induzierbare Promotoren unter strenger Regulation. Eine große Zahl an Promotoren, die durch eine Vielzahl von potenziellen Wirtszellen erkannt werden, sind bekannt. Die ausgewählte Promotorsequenz kann aus der Quellen-DNA über Restriktionsenzymverdau isoliert werden und in den Vektor der Erfindung inseriert werden. Alternativ dazu können die ausgewählten Promotorsequenzen synthetisiert werden. Sowohl die native Promotorsequenz als auch viele heterologe Promotoren können verwendet werden, um Amplifikation und/oder Expression eines Targetgens zu steuern. Jedoch sind heterologe Promotoren bevorzugt, die im Allgemeinen größere Transkription und höhere Ausbeuten von exprimiertem Targetgen im Vergleich zum nativen Targetpolypeptidpromotor erlauben.

[0085] Promotoren, die für die Verwendung mit prokaryotischen Wirten geeignet sind, umfassen PhoA-Promotor, die β -Lactamase- und Lactosepromotorensysteme, ein Tryptophan-(trp-)Promotorsystem und Hybridpromotoren, wie z. B. den tac- oder den trc-Promotor. Jedoch sind andere Promotoren, die in Bakterien funktionell sind (wie z. B. andere bekannte bakterielle oder Phagenpromotoren), ebenfalls geeignet. Ihre Nucleotidsequenzen sind veröffentlicht worden, wodurch einem Fachmann ermöglicht wird, sie unter Verwendung von Linkern oder Adaptoren, um beliebige erforderliche Restriktionsstellen bereitzustellen, operabel an Translationseinheiten zu ligieren, die für die Target-Leicht- und -Schwerketten kodieren (Siebenlist et al., Cell 20, 269 (1980)). Bevorzugte Promotoren zur Verwendung in dieser Erfindung sind der PhoA-Promotor und der TaccII-Promotor. Promotoren, die in eukaryotischen Wirtszellen funktionell sind, sind ebenfalls fachbekannt, z. B. wie in US-Patent Nr. 6.331.415 beschrieben. Beispiele für solche Promotoren können jene umfassen, die von Polyomavirus, Adenovirus-2, oder Simian-Virus-40 (SV40) abstammen.

[0086] Jede Translationseinheit des rekombinanten Vektors der Erfindung enthält zusätzliche nicht-translatierte Sequenzen, die zur ausreichenden Expression der inserierten Gene notwendig sind. Solche wesentlichen Sequenzen von rekombinanten Vektoren sind fachbekannt und umfassen z. B. die Shine-Dalgarno-Region, die sich 5' zum Startcodon befindet, und Transkriptionsterminator (z. B. λ to), der sich am 3'-Ende der Translationseinheit befindet.

[0087] Jede Translationseinheit des rekombinanten Vektors umfasst weiters eine Signalsequenzkomponente, die Sekretion der exprimierten Kettenpolypeptide über eine Membran steuert. Im Allgemeinen kann die Sekretionssignalsequenz eine Komponente des Vektors sein oder sie kann Teil der Target-Polypeptid-DNA sein, die in den Vektor inseriert wird. Die Sekretionssignalsequenz, die zum Zwecke dieser Erfindung ausgewählt wird, soll eine sein, die durch die Wirtszelle erkannt und verarbeitet wird (d. h. durch eine Signalpeptidase gespalten wird). Für prokaryotische Wirtszellen, welche die Signalsequenzen nicht erkennen und verarbeiten, die für die heterologen Polypeptide nativ sind, wird die Signalsequenz durch eine prokaryotische Signalsequenz substituiert, die z. B. aus der Gruppe bestehend aus der alkalischen Phosphatase, Penicillinase, lpp oder hitzestabilen Enterotoxin-II (STII-)Leadern, LamB, PhoE, PelB, OmpA und MBP ausgewählt ist. In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung sind die Signalsequenzen, die in beiden Translationseinheiten des Expressionssystems verwendet werden, STII-Signalsequenzen oder Varianten davon. Vorzugsweise wird die DNA, die für solche Signalsequenz kodiert, in Leseraster an das 5'-Ende von DNA ligiert, die für die Leicht- und Schwerkette kodiert, was zu einem Fusionspolypeptid führt. Sobald sie aus dem Zytoplasma der Wirtszelle sekretiert wird, ist die Signalpeptidsequenz enzymatisch vom reifen Polypeptid abgespalten.

[0088] In einigen Aspekten der Erfindung wird zusätzlich zum Timing der Expression auch das Mengenverhältnis von Leicht- und Schwerkettenexpression moduliert, um die Ausbeute von sekretierten und korrekt angeordneten Antikörpern oder Fragmenten davon zu maximieren. Eine solche Modulation wird durch gleichzeitige Modulation der Translationsstärken für Leicht- und Schwerketten auf dem rekombinanten Vektor der Erfindung erreicht. Ein Verfahren zur Modulation von Translationsstärke ist in Simmons et al., US-Patent Nr. 5.840.523, offenbart. Kurz gesagt verwendet der Ansatz Varianten der Translationsinitiationsregion (TIR) innerhalb einer Translationseinheit. Für eine gegebene TIR kann eine Reihe von Aminosäure- oder Nucleinsäuresequenzvarianten mit einer Reihe von Translationsstärken geschaffen werden, wodurch ein geeignetes Mittel bereitgestellt wird, durch welches dieser Faktor an das gewünschte Expressionsausmaß der spezifischen Kette angepasst wird. TIR-Varianten können durch herkömmliche Mutageneseverfahren erzeugt werden, die zu Codonveränderung führen, welche die Aminosäuresequenz ändern können, obwohl stumme Veränderung der Nucleotidsequenz (wie nachstehend beschrieben) bevorzugt sind. Änderungen der TIR können z. B. Änderungen der Zahl oder des Abstands der Shine-Dalgarno-Sequenz gemeinsam mit Änderungen der Signalsequenz umfassen. Ein bevorzugtes Verfahren zur Herstellung von mutierten Signalsequenzen ist die Herstellung einer „Codonbank“ am Beginn einer Kodiersequenz, welche die Aminosäuresequenz der Signalsequenz

nicht verändert (d. h. die Veränderungen sind stumm). Dies kann durch Veränderung der dritten Nucleotidposition jedes Codons erfolgen; zusätzlich dazu weisen einige Aminosäuren, wie z. B. Leucin, Serin und Arginin, mehrere erste und zweite Positionen auf, die Komplexität in der Herstellung der Bank hinzufügen können. Dieses Mutagenese-Verfahren ist im Detail in Yansura et al., METHODS: A Companion to Methods in Enzymol. 4, 151–158 (1992), beschrieben.

[0089] Vorzugsweise wird eine Gruppe von Vektoren mit einer Reihe von TIR-Stärken für jede Translations-einheit darin erzeugt. Diese eingeschränkte Gruppe stellt einen Vergleich von Expressionsausmaßen von jeder Kette sowie der Ausbeute der Antikörper-Produkte unter verschiedenen TIR-Stärke-Kombinationen bereit. TIR-Stärken können durch Quantifizieren des Expressionsausmaßes eines Reportergens wie im Detail in Simmons et al., US.-Patent Nr. 5.840.523, beschrieben bestimmt werden. Zum Zwecke dieser Erfindung wird die Translationsstärkenkombination für ein bestimmtes Paar von TIRs innerhalb eines Vektors durch (N-Leicht, M-Schwer) repräsentiert, worin N die relative TIR-Stärke der Leichtkette ist und M die relative TIR-Stärke der Schwerekette ist. Zum Beispiel bedeutet (7-Leicht, 3-Schwer), dass der Vektor eine relative TIR-Stärke von etwa 7 für Leichtkettenexpression und eine relative TIR-Stärke von etwa 3 für Schwerekettenexpression bereitstellt. Basierend auf dem Translationsstärkenvergleich werden die gewünschten individuellen TIRs ausgewählt, um in Expressionsvektorkonstrukten der Erfindung kombiniert zu werden.

[0090] Herstellung von geeigneten Vektoren, die eine oder mehrere der oben angeführten Komponenten enthalten, verwendet Standardligationsverfahren und/oder andere fachbekannte molekulare Klonierungsverfahren. Isolierte Plasmide oder DNA-Fragmente werden gespalten, zugeschnitten und in der gewünschten Form religiert, um die erforderlichen Plasmide zu erzeugen.

[0091] Für Analyse zum Nachweis korrekter Sequenzen in den hergestellten Plasmiden werden die Ligationsgemische verwendet, um einen E.-coli-Stamm zu transformieren, und erfolgreiche Transformanten werden wo geeignet durch Ampicillin- oder Tetracyclinresistenz ausgewählt. Plasmide oder Transformanten werden hergestellt, durch Restriktionsendonucleasenverdau analysiert und/oder durch das Verfahren von Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463–5467 (1977), oder Messing et al., Nucleic Acids Res. 9, 309 (1981), oder durch das Verfahren von Maxam et al., Methods in Enzymology 65, 499 (1980), sequenziert. Eine Reihe von automatisierten Sequenzierern, die im Handel erhältlich sind, kann verwendet werden, um die Plasmide zu sequenzieren. Zum Beispiel ist der „ABI PRISM 3700 DNA Analyzer“ (Applied Biosystems, Foster City, CA) ein automatisierter Kapillarelektrophorese-Sequenzierer, der fluoreszenzmarkierte DNA-Fragmente analysiert. Gebrauchsanweisungen für die Herstellung von Proben sind im „Sequencing Chemistry Guide“ bereitgestellt, der dem Instrument beigelegt ist.

[0092] Prokaryotische Wirtszellen, die zur Expression von Antikörpern der Erfindung geeignet sind, umfassen Archaeobacteria und Eubacteria, wie z. B. gramnegative oder grampositive Organismen. Beispiele für nützliche Bakterien umfassen Escherichia-(z. B. E. coli); Bacilli-(z. B. B. subtilis), Enterobacteria-, Pseudomonas-Spezies (z. B. P. aeruginosa), Salmonella typhimurium, Serratia marcescans, Klebsiella, Proteus, Shigella, Rhizobia, Vitreoscilla oder Paracoccus. Vorzugsweise werden gramnegative Zellen verwendet. Noch bevorzugter werden E.-coli-Zellen als Wirte für die Erfindung verwendet.

[0093] Viele E.-coli-Stämme sind als Expressionswirt hierin oder als Elternwirte geeignet, aus welchen modifizierte Expressionswirte geschaffen werden können. E.-coli-Stämme, die bekannt sind und im Fachgebiet erhältlich sind, umfassen unter anderem E. coli W3110 (ATCC 27.325), E. coli 294 (ATCC 31.446), E. coli B, E. coli 1776 (ATCC 31.537) und E. coli RV308 (ATCC 31.608). Mutierte Zellen von beliebigen der oben genannten Bakterien können ebenfalls verwendet werden. Es ist natürlich notwendig, die geeigneten Bakterien auszuwählen, wobei die Replizierbarkeit des Replicons in den Zellen eines Bakteriums berücksichtigt werden muss. Zum Beispiel können E.-coli-, Serratia- oder Salmonella-Spezies in geeigneter Weise als Wirt verwendet werden, wenn bekannte Plasmide wie z. B. pBR322, pBR325, pACYC177 oder pKN410 verwendet werden, um das Replicon bereitzustellen. Vorzugsweise soll die Wirtszelle minimale Mengen von proteolytischen Enzymen sekretieren, und weitere Proteaseinhibitoren können wünschenswerter Weise in die Zellkultur inkorporiert werden.

[0094] Geeignete eukaryotische Wirtszellen sind ebenfalls fachbekannt. Zum Beispiel können Wirtszellen Hefe-, VERO-, HeLa-, CHO-, W138-, BHK-, COS-7- und MDCK-Zellen umfassen.

Transformation und Wachstum von Wirtszellen

[0095] Wirtszellen werden mit den oben beschriebenen rekombinanten Vektoren transformiert und transfiziert

(die Begriffe „transformiert“ und „transfiziert“ werden hierin austauschbar verwendet) und in herkömmlichen Nährstoffmedien kultiviert, die wie geeignet zur Induktion von Promotoren, Selektion von Transformanten oder Amplifikation der Gene, die für die gewünschten Sequenzen kodieren, modifiziert sind.

[0096] Transformation steht für die Einführung von DNA in den prokaryotischen Wirt, sodass die DNA replizierbar ist, entweder als extrachromosomales Element oder durch einen chromosomalen Integranten. Abhängig von der verwendeten Wirtszelle wird Transformation unter Verwendung von Standardverfahren durchgeführt, die für solche Zellen geeignet sind. Die Calciumbehandlung, die Calciumchlorid verwendet, wird im Allgemeinen für Bakterienzellen verwendet, die wesentliche Zellwandbarrieren enthalten. Ein anderes Verfahren zur Transformation verwendet Polyethylenglykol/DMSO. Wieder ein anderes verwendetes Verfahren ist Elektroporation. Transfektion betrifft die Aufnahme eines Expressionsvektors durch eine Wirtszelle, ob beliebige Kodiersequenzen tatsächlich exprimiert werden oder nicht. Zahlreiche Verfahren zur Transfektion sind dem Fachmann bekannt, z. B. CaPO_4 -Fällung und Elektroporation. Erfolgreiche Transfektion wird im Allgemeinen erkannt, wenn eine beliebige Indikation für den Betrieb dieses Vektors innerhalb der Wirtszelle auftritt.

[0097] Prokaryotische Wirtszellen, die verwendet werden, um die Polypeptide der Erfindung zu produzieren, werden in fachbekannten Medien gezüchtet und sind für die Kultur der ausgewählten Wirtszellen geeignet. Beispiele für geeignete Medien umfassen Luria-Broth (LB) plus notwendiger Nährstoffergänzungsmittel. In bevorzugten Ausführungsformen enthält das Medium auch ein Selektionsmittel, das basierend auf der Herstellung des Expressionsvektors ausgewählt wird, um selektiv das Wachstum von prokaryotischen Zellen zu ermöglichen, die den Expressionsvektor enthalten. Zum Beispiel wird Ampicillin zum Medium für das Wachstum von Zellen hinzugefügt, die ampicillinresistentes Gen exprimieren. Jegliche notwendigen Ergänzungsmittel neben Kohlenstoff-, Stickstoff- und anorganischen Phosphatquellen können ebenfalls in geeigneten Konzentrationen alleine oder als Gemisch mit anderen Ergänzungsmitteln oder Medium, wie z. B. einer komplexen Stickstoffquelle, eingeführt werden. Gegebenenfalls kann das Kulturmedium ein oder mehrere Reduktionsmittel enthalten, die aus der Gruppe bestehend aus Glutathion, Cystein, Cystamin, Thioglycollat, Dithioerythrit und Dithiothreitol ausgewählt sind.

[0098] Die prokaryotischen Wirtszellen werden bei geeigneten Temperaturen kultiviert. Für das E.-coli-Wachstum reicht die bevorzugte Temperatur von etwa 20°C bis etwa 39°C, noch bevorzugter von etwa 25°C bis etwa 37°C, noch bevorzugter bei etwa 30°C. Der pH des Mediums kann ein beliebiger pH von etwa 5 bis etwa 9 sein, abhängig hauptsächlich vom Wirtsorganismus. Für E. coli ist der pH vorzugsweise etwa 6,8 bis etwa 7,4 und noch bevorzugter etwa 7,0.

[0099] Eukaryotische Wirtszellen, die verwendet werden, um Antikörper der Erfindung zu produzieren, können in einer Reihe von fachbekannten Medien kultiviert werden. Zum Beispiel sind im Handel erhältliche Medien, wie Ham's F10 (Sigma), Minimal Essential Medium (MEM, Sigma), RPMI-1640 (Sigma) und Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Sigma), zur Kultivierung von eukaryotischen Säugetierwirtszellen geeignet. Zusätzlich können beliebige der in Ham und Wallace, Meth. Enz. 58, 44 (1979), Barnes und Sato, Anal. Biochem. 102, 255 (1980), US-Patent Nr. 4.767.704; 4.657.866, 4.927.762 oder 4.560.655, WO 90/03430; WO 87/00195; US-Patent Re. 30.985 oder US 5.122.469, deren Offenbarungen hierin durch Verweis aufgenommen sind, beschriebenen Medien als Kulturmedium für die Wirtszellen verwendet werden. Beliebige dieser Medien können wenn notwendig mit Hormonen und/oder Wachstumsfaktoren (wie z. B. Insulin, Transferrin oder Epidermiswachstumsfaktor), Salzen (wie z. B. Natriumchlorid, Calcium, Magnesium und Phosphat), Puffer (wie z. B. HEPES), Nucleosiden (wie z. B. Adenosin und Thymidin), Antibiotika (wie z. B. GentamycinTM-Arzneimittel), Spurenelementen (als anorganische Verbindungen definiert, die üblicherweise in Endkonzentrationen im Mikromolarbereich vorliegen) und Glucose oder einer äquivalenten Energiequelle ergänzt sein. Beliebige andere notwendige Ergänzungsmittel können ebenfalls in geeigneten Konzentrationen enthalten sein, die Fachleuten bekannt sind. Die Kulturbedingungen, wie z. B. Temperatur, pH und dergleichen, sind die zuvor mit der Temperatur, pH und dergleichen, sind die zuvor mit der Wirtszelle, die für Expression ausgewählt ist, verwendeten und sind dem gewöhnlichen Fachmann bekannt.

Temporär getrennte Expression von Leicht- und Schwerketten

[0100] Sobald die Wirtszellen auf eine bestimmte Dichte gezüchtet werden, werden die Kultivierungsbedingungen modifiziert, um die Synthese des Proteins/der Proteine zu fördern. Gemäß der vorliegenden Erfindung werden die Leicht- und Schwerketten zu einem anderen Zeitpunkt während der Synthesephase induziert. In einem Aspekt wird eine temporär getrennte Expression von Leicht- und Schwerketten unter Verwendung eines Vektors eines dualen Promotors wie oben beschrieben durchgeführt. Wenn induzierbare(r) Promotor(en) im Vektor des dualen Promotors der Erfindung verwendet werden, wird Proteinexpression unter für die Aktivie-

rung des Promotors geeigneten Bedingungen induziert. In einer bevorzugten Ausführungsform sind beide Promotoren induzierbar. Noch bevorzugter sind die dualen Promotoren *phoA* und *TacII*. Zum Beispiel kann ein Vektor hergestellt werden, worin ein *phoA*-Promotor für die Kontrolle von Transkription der Leichtkette verwendet wird und ein *TacII*-Promotor zur Kontrolle von Transkription der Schwerkette verwendet wird. Während des ersten Induktionsstadiums werden prokaryotische Wirtszellen, die mit einem solchen *phoA/TacII*-Dualpromotor-Vektor transformiert sind, in einem phosphatlimitierten Medium zur Induktion des *phoA*-Promotors und der Expression der Leichtkette kultiviert. Nach einem gewünschten Zeitraum für Leichtkettenexpression wird eine ausreichende Menge von IPTG zur Kultur zur Induktion des *TacII*-Promotors und zur Produktion der Schwerkette hinzugefügt.

[0101] In einem Aspekt kann der Antikörper oder das Antikörperfragment der Erfindung im Cytoplasma einer Bakterienwirtszelle exprimiert werden. Verschiedene Verfahren können verwendet werden, um die Produktion von löslichen und funktionellen Antikörpern oder Antikörperfragmenten in *E.-coli*-Cytoplasma zu verbessern. Zum Beispiel ist festgestellt worden, dass *E.-coli*-Stämme, die einen Mangel an *trxB*-Gen aufweisen, die Bildung von Disulfidbindungen im Cytoplasma verstärken und daher zur Förderung der Expression von funktionellen Antikörpermolekülen mit geeigneten Disulfidbindungsbildungen im Cytoplasma nützlich sind. Proba et al., *Gene* 159, 203–207 (1995). Es können Antikörperfragmentvarianten hergestellt werden, um Cysteinreste zu ersetzen, sodass die Variante keine Bildung von Disulfidbindungen sowohl in V_H als auch V_L erfordert, solche Antikörperfragmentvarianten, die manchmal als „Intrakörper“ bezeichnet werden, können daher in einer reduzierenden Umgebung, die mit effizienter Disulfidbrückenbildung nicht kompatibel ist, wie z. B. in Bakterien-Cytoplasma, hergestellt werden. Proba et al., *J. Mol. Biol.* 275, 245–253 (1998).

[0102] Wenn Sekretionssignalsequenzen im Vektor der Erfindung verwendet werden, werden die exprimierten Leicht- und Schwerkettenpolypeptide in das Periplasma der Wirtszellen sekretiert und daraus gewonnen. Proteingewinnung umfasst typischerweise die Aufschließung des Mikroorganismus, im Allgemeinen durch Mittel wie z. B. osmotischen Schock, Beschallung oder Lyse. Sobald Zellen aufgeschlossen sind, können Zelltrümmer oder ganze Zellen durch Zentrifugation oder Filtration entfernt werden. Die Proteine können weiter gereinigt werden, z. B. durch Affinitätsharzchromatographie. Alternativ dazu können Proteine in das Kulturmedium transportiert und darin isoliert werden. Zellen können aus der Kultur entfernt werden, und der Kulturüberstand kann für eine weitere Reinigung der produzierten Proteine filtriert und konzentriert werden. Die exprimierten Polypeptide können unter Verwendung von herkömmlichen bekannten Verfahren wie z. B. Polyacrylamid-gelelektrophorese (PAGE) und Western-Blot-Test weiter isoliert und identifiziert werden.

[0103] In einem Aspekt der Erfindung wird der Antikörper in einer großen Menge durch ein Fermentationsverfahren hergestellt. Es sind verschiedene Fed-batch-Fermentationsverfahren in großem Maßstab zur Produktion von rekombinanten Proteinen verfügbar. Fermentationen in großem Maßstab weisen zumindest 1.000 Liter Kapazität auf, vorzugsweise etwa 1.000 bis 100.000 Liter Kapazität. Diese Fermenter verwenden Schaufelrührer oder andere geeignete Mittel zur Verteilung von Sauerstoff und Nährstoffen, insbesondere Glucose (die bevorzugte Kohlenstoff/Energiequelle). Fermentation in kleinem Maßstab bezieht sich im Allgemeinen auf Fermentation in einem Fermenter, der nicht mehr als etwa 100 Liter volumetrischer Kapazität umfasst und von etwa 1 Liter bis etwa 100 Liter reichen kann.

[0104] In einem Fermentationsverfahren wird die Induktion von Proteinexpression typischerweise initiiert, nachdem die Zellen unter geeigneten Bedingungen auf eine gewünschte Dichte gezüchtet wurden, z. B. eine OD_{550} von etwa 180–270. Eine Reihe von Induktoren kann gemäß dem Vektorkonstrukt verwendet werden, wie es fachbekannt und oben beschrieben ist. Zellen können für kürzere Zeiträume vor Induktion gezüchtet werden. Zellen werden üblicherweise etwa 12–50 Stunden lang induziert, obwohl eine längere oder kürzere Induktionszeit verwendet werden kann.

[0105] Zur weiteren Verbesserung der Produktionsausbeute und Qualität der Antikörpermoleküle der Erfindung können verschiedene Fermentationsbedingungen modifiziert werden. Zum Beispiel können zur Verbesserung der richtigen Anordnung und Faltung der sekretierten Antikörperpolypeptide zusätzliche Vektoren, die Chaperonprotein überexprimieren, wie z. B. Dsb-Proteine (DsbA, DsbB, DsbC, DsbD und/oder DsbG) oder FkpA (eine Peptidylprolyl-cis,trans-Isomerase mit Chaperonaktivität), verwendet werden, um die prokaryotischen Wirtszellen zu co-transformieren. Von Chaperonproteinen ist gezeigt worden, dass sie die richtige Faltung und Löslichkeit von heterologen Proteinen erleichtern, die in bakteriellen Wirtszellen produziert werden. Chen et al. *J. Bio. Chem.* 274, 19601–19605 (1999), Georgiou et al., US-Patent Nr. 6.083.715, Georgiou et al., US-Patent Nr. 6.027.888, Bothmann und Pluckthun, *J. Biol. Chem.* 275, 17100–17105 (2000), Ramm und Pluckthun, *J. Biol. Chem.* 275, 17106–17113 (2000), Arie et al., *Mol. Microbiol.* 39, 199–210 (2001). Ausreichende Disulfidbindungen sind insbesondere zur Bildung und Faltung von bivalenten Antikörpern voller Länge

wichtig, die über zwei Schwerketten und zwei Leichtketten verfügen.

[0106] Um Proteolyse von exprimierten heterologen Proteinen (insbesondere jenen, die proteolytisch empfindlich sind), wie z. B. in prokaryotischen Wirtszellen, zu minimieren, können bestimmte Wirtsstämme, denen proteolytische Enzyme fehlen, für die vorliegende Erfindung verwendet werden. Zum Beispiel können prokaryotische Wirtszellstämme modifiziert werden, um genetische Mutation(en) in den Genen zu bewirken, die für bekannte bakterielle Proteasen, wie z. B. Protease-III, OmpT, DegP, Tsp, Protease-1, Protease-Mi, Protease-V, Protease-VI und Kombinationen davon, kodieren.

[0107] Einige Protease-defiziente E.-coli-Stämme sind verfügbar und z. B. in Joly et al., s. o. (1998), Georgiou et al., US-Patent Nr. 5.264.365, Georgiou et al., US-Patent Nr. 5.508.192, Hara et al., Microbial Drug Resistance 2, 63–72 (1996), beschrieben.

Antikörperreinigung

[0108] Antikörperzusammensetzungen, die aus Wirtszellen hergestellt werden, werden vorzugsweise zumindest einem Reinigungsschritt unterworfen. Beispiele für geeignete Reinigungsschritte umfassen Hydroxylapatitchromatographie, Gelelektrophorese, Dialyse und Affinitätschromatographie, wobei Affinitätschromatographie das bevorzugte Reinigungsverfahren ist. Die Eignung eines bestimmten Proteins als Affinitätsligand hängt von der Spezies und vom Isotyp einer Immunglobulin-Fc-Domäne ab, die im Antikörper gegenwärtig ist. Zum Beispiel kann Protein A verwendet werden, um Antikörper zu reinigen, die auf menschlichen $\gamma 1$ -, $\gamma 2$ -, oder $\gamma 4$ -Schwerketten basieren. Lindmark et al., J. Immunol. Meth. 62, 1–13 (1983). Protein G ist für alle Mausisotypen und für menschliches $\gamma 3$ empfohlen. Guss et al., EMBO J. 5, 1567–1575 (1986). Die Matrice, an welche der Affinitätsligand angeheftet wird, ist meistens Agarose, aber es sind auch andere Matrizen verfügbar. Mechanisch stabile Matrizen, wie z. B. Glas mit kontrollierter Porengröße oder Poly(styroldivinyl)benzol, ermöglichen schnellere Durchflussraten und kürzere Verarbeitungszeiten als mit Agarose erreicht werden können. Wenn der Antikörper eine C_{H3} -Domäne umfasst, ist das Bakerbond-ABXTM-Harz (J. T. Baker, Phillipsburg, N. J.) zur Reinigung nützlich. Andere Verfahren zur Proteinreinigung, wie z. B. Fraktionierung auf einer Ionenaustauschssäule, Ethanol-fällung, Umkehrphasen-HPLC, Chromatographie auf Kieselgel, Chromatographie auf Heparin-SEPHAROSETM, Chromatographie auf einem Anionen- oder Kationen-Austauschharz (wie z. B. eine Polyasparaginsäuresäule), Chromatofokussierung, SDS-PAGE und Ammoniumsulfatfällung, sind ebenfalls verfügbar, abhängig vom zu gewinnenden Antikörper.

[0109] Vorzugsweise wird der hierin produzierte Antikörper weiter gereinigt, um Formulierungen, die im Wesentlichen homogen sind, für weitere Tests und Anwendungen zu erhalten. Zum Beispiel können die hydrophobe Wechselwirkungschromatographie (HIC), insbesondere das HIC mit niedrigem pH (LPHIC) wie in US-Patent Nr. 6.641.870 beschrieben für weitere Reinigung verwendet werden. insbesondere stellt LPHIC einen Weg bereit, um einen korrekt gefalteten und disulfidgebundenen Antikörper von unerwünschten Kontaminanten (z. B. inkorrekt assoziierten leichten und schweren Fragmenten) zu entfernen.

Aktivitätstests

[0110] Der Antikörper der vorliegenden Erfindung kann aufgrund seiner physikalischen/chemischen Eigenschaften und biologischen Funktionen durch verschiedene fachbekannte Tests charakterisiert werden. In einem Aspekt der Erfindung ist es wichtig, den Antikörper, der in den Dualpromotorsystemen der vorliegenden Erfindung hergestellt wird, mit ähnlichen Antikörpern zu vergleichen, die in anderen Expressionssystemen hergestellt werden, wie z. B. verschiedene Expressionsvektordesigns oder verschiedene Wirtszellsysteme. Insbesondere kann die Menge der angeordneten Antikörperkomplexe, die durch den Dualpromotorvektor der vorliegenden Erfindung exprimiert wird, mit jener verglichen werden, die von verschiedenen polycistronischen Vektoren exprimiert wird. Verfahren zur Proteinquantifizierung sind fachbekannt. Zum Beispiel können Proben der exprimierten Proteine auf ihre quantitativen Intensitäten auf einer Coomassie-gefärbten SDS-PAGE verglichen werden. Alternativ dazu kann/können die spezifische Bande(n) von Interesse (z. B. die angeordnete Bande) z. B. durch Western-Blot-Gelanalyse detektiert werden.

[0111] Der gereinigte Antikörper kann weiters durch eine Reihe von Tests charakterisiert werden, einschließlich unter anderem N-terminale Sequenzierung, Aminosäureanalyse, nicht-denaturierende Größenausschluss-Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC), Massenspektrometrie, Ionenaustauschchromatographie und Papainverdau.

[0112] Ein hierin angeführter Antikörper kann auf seine biologische Aktivität analysiert werden. Vorzugsweise

wird der Antikörper der vorliegenden Erfindung auf seine Antigenbindungsaktivität getestet. Die Antigenbindungstests, die fachbekannt sind und hierin verwendet werden können, umfassen unter anderem beliebige direkte oder kompetitive Bindungstests unter Verwendung von Verfahren wie Western-Blots, Radioimmuntests, ELISA (enzymgekoppelte Immunadsorptionsbestimmung), „Sandwich“-Immuntests, Immunpräzipitationstests, Fluoreszenzimmuntests und Protein-A-Immuntests. Ein Beispiel für einen Antigenbindungstest ist nachstehend im Abschnitt „Beispiele“ bereitgestellt.

Verwendungen des Antikörpers

[0113] Ein Antikörper der vorliegenden Erfindung kann z. B. zur Reinigung, Detektion eines spezifischen Polypeptids und zum Abzielen auf ein spezifisches Polypeptid verwendet werden, das es erkennt, einschließlich sowohl diagnostischer, prophylaktischer oder therapeutischer In-vitro- sowie In-vivo-Verfahren für eine Vielzahl von Störungen oder Erkrankungen.

[0114] Eine „Störung“ ist ein Leiden, das von einer Behandlung mit dem Antikörper profitieren würde. Dies umfasst chronische und akute Störungen oder Erkrankungen, einschließlich pathologischer Leiden, die das Säugetier für die fragliche Störung prädisponieren. Nicht-einschränkende Beispiele für zu behandelnde Störungen umfassen hierin bös- und gutartige Tumoren, Nicht-Leukämien und lymphoide Malignitäten, neuronale, Glia-, Astrozyten-, Hypothalamus- und andere glanduläre, Makrophagen-, Epithel-, stromale und Blastozöl-Störungen und entzündliche, angiogene und immunologische Störungen.

[0115] Eine „Autoimmunerkrankung“ hierin ist eine nicht-bösartige Erkrankung oder Störung, die aus dem eigenen Gewebe des Individuums entsteht und gegen dieses gerichtet ist. Die Autoimmunerkrankungen hierin schließen insbesondere bösartige oder kanzeröse Erkrankungen oder Leiden aus, insbesondere B-Zell-Lymphom, akute lymphoblastische Leukämie (ALL), chronische lymphozytische Leukämie (CLL), Haarzellenleukämie und chronische Myeloblastenleukämie. Beispiele für Autoimmunerkrankungen oder -Leiden umfassen unter anderem Entzündungsreaktionen, wie z. B. entzündliche Hauterkrankungen, einschließlich Psoriasis und Dermatitis (z. B. atopisches Ekzem), systemische Sklerodermia und Sklerose, Reaktionen, die mit entzündlichen Darmerkrankungen assoziiert sind (wie z. B. Crohn-Erkrankung und Colitis ulcerosa), Atemnotsyndrom (einschließlich des Atemnotsyndroms bei Erwachsenen, ARDS), Dermatitis, Meningitis, Enzephalitis, Uveitis, Colitis, Glomerulonephritis, allergische Leiden wie z. B. Ekzem und Asthma und andere Leiden, welche die Infiltration von T-Zellen umfassen, und chronische Entzündungsreaktionen, Atherosklerose, Leukozyten-Adhäsionsmangel, rheumatoide Arthritis, systemischer Lupus erythematodes (SLE), Diabetes mellitus (z. B. Diabetes mellitus Typ I oder insulinabhängiger Diabetes mellitus), multiple Sklerose, Reynaud-Syndrom, Autoimmunthyreoiditis, allergische Enzephalomyelitis, Sjörgen-Syndrom, infantiler Diabetes und Immunreaktionen, die mit akuter und verzögerter Hyperempfindlichkeit assoziiert sind, die durch Cytokine und T-Lymphozyten vermittelt werden, die typischerweise in Tuberkulose, Sarkoidose, Polymyositis, Granulomatose und Vaskulitis zu finden sind, bösartige Anämie (Addison-Erkrankung), Erkrankungen, die Leukozytendiapedese umfassen, Entzündungserkrankungen des zentralen Nervensystems (ZNS), Multiorganversagen, hämolytische Anämie (einschließlich unter anderem Kryoglobulinämie oder Coombs-positive Anämie), Myasthenia gravis, antigen-antikörper-komplex-vermittelte Erkrankungen, Anti-Glomerulus-Basalmembranerkrankung, Antiphospholipidsyndrom, allergische Neuritis, Grave-Erkrankung, Lambert-Eaton-Syndrom, bullöses Pemphigoid, Pemphigus, Autoimmunpolyendokrinopathien, Reiter-Krankheit, Stiff-man-Syndrom, Behçet-Krankheit, Riesenzellarteriitis, Immunkomplexnephritis, IgA-Nephropathie, IgM-Polyneuropathien, Immunthrombozytopenie purpura (ITP) oder Autoimmunthrombozytopenie etc.

[0116] Die Begriffe „Krebs“ und „kanzerös“ bezeichnen oder beschreiben die physiologischen Leiden bei Säugetieren, das typischerweise durch nicht-reguliertes Zellwachstum charakterisiert ist. Beispiele für Krebs umfassen unter anderem Karzinom, Lymphom, Blastom, Sarkom und Leukämie. Genauere Beispiele für solche Krebsarten umfassen Plattenepithelzellkarzinom, kleinzelligen Lungenkrebs, nicht-kleinzelligen Lungenkrebs, Adenokarzinom der Lunge, Plattenepithelkarzinom der Lunge, Krebs des Peritoneums, hepatozellulären Krebs, Magen-Darm-Krebs, Pankreaskrebs, Glioblastom, Zervixkrebs, Ovarialkrebs, Leberkrebs, Blasenkrebs, Hepatom, Brustkrebs, Colonkrebs, kolorektalen Krebs, Endometrium- oder Uteruskarzinom, Speicheldrüsenkrebs, Nierenkrebs, Leberkrebs, Prostatakrebs, Vulvakrebs, Schilddrüsenkrebs Leberkarzinom, und verschiedene Formen von Kopf- und Nackenkrebs.

[0117] Wie hierin verwendet bezeichnet „Behandlung“ klinische Intervention in einem Versuch, den natürlichen Verlauf des zu behandelnden Individuums oder der zu behandelnden Zelle zu ändern, und kann entweder zur Prophylaxe oder während des Verlaufs klinischer Pathologie durchgeführt werden. Gewünschte Wirkungen von Behandlung umfassen Prävention des Auftretens und Wiederauftretens von Erkrankung, Linderung von

Symptomen, Verringerung von beliebigen direkten oder indirekten pathologischen Folgen der Erkrankung, Prävention von Metastasen, Verringerung der Geschwindigkeit des Krankheitsverlaufs, Verbesserung oder Linderung des Krankheitszustands und Remission oder verbesserte Prognose.

[0118] Eine „wirksame Menge“ bezeichnet eine wirksame Menge in Dosierungen und für notwendige Zeiträume, um das gewünschte therapeutische oder prophylaktische Ergebnis zu erreichen. Eine „therapeutisch wirksame Menge“ des Antikörpers kann gemäß Faktoren wie Krankheitszustand, Alter, Geschlecht und Gewicht des Individuums und der Fähigkeit des Antikörpers, eine gewünschte Reaktion im Individuum auszulösen, variieren. Eine therapeutisch wirksame Menge ist eine, in welcher beliebige toxische oder schädliche Wirkungen des Antikörpers durch therapeutisch vorteilhafte Wirkungen aufgewogen werden. Eine „prophylaktisch wirksame Menge“ bezieht sich auf eine wirksame Menge in Dosierungen und für notwendige Zeiträume, um das gewünschte prophylaktische Ergebnis zu erreichen. Typischerweise wird die prophylaktisch wirksame Menge weniger sein als die therapeutisch wirksame Menge, da eine prophylaktische Dosis in Subjekten vor oder in einem früheren Krankheitsstadium verwendet wird.

[0119] In einem Aspekt kann ein Antikörper der Erfindung in Immuntests verwendet werden, um spezifische Antigene in biologischen Proben qualitativ und quantitativ zu messen. Herkömmliche Verfahren zur Detektion von Antigen-Antikörperbindung umfassen zum Beispiel eine enzymgekoppelte Immunadsorptionsbestimmung (ELISA), einen Radioimmuntests (RIA) oder Gewebeimmunhistochemie. Viele Verfahren können eine Markierung verwenden, die an den Antikörper für Detektionszwecke gebunden ist. Die Markierung, die mit dem Antikörper verwendet wird, ist eine detektierbare Funktionalität, die die Bindung an den Antikörper nicht beeinflusst. Zahlreiche Markierungen sind bekannt, einschließlich Radiosotope ^{32}P , ^{32}S , ^{14}C , ^{125}I , ^3H und ^{131}I , Fluorophore, wie z. B. Seltenerdmetallchelate oder Fluorescein und seine Derivate, Rhodamin und seine Derivate, Dansyl, Umbelliferon, Luciferasen, z. B. Glühwürmchen-Luciferase und bakterielle Luciferase (US-Patent Nr. 4.737.456), Luciferin, 2,3-Dihydrophthalazindione, Meerrettichperoxidase (HRP), alkalische Phosphatase, Beta-Galactosidase, Glucoamylase, Lysozym, Saccharidoxidasen, z. B. Glucoseoxidase, Galactoseoxidase und Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase, heterozyklische Oxidasen, wie z. B. Uricase und Xanthinoxidase, Lactoperoxidase, Biotin/Avidin, Spinmarker, Bakteriophagenmarkierungen, stabile freie Radikale, bildgebende Radionucleide (wie z. B. Technetium) und dergleichen.

[0120] Herkömmliche Verfahren sind verfügbar, um diese Markierungen kovalent an die Antikörperpolypeptide zu binden. Zum Beispiel können Bindungsmittel wie Dialdehyde, Carbodiimide, Dimaleinimide, Bis-Imidate, bis-diazotiertes Benzidin und dergleichen verwendet werden, um die Antikörper mit den oben beschriebenen fluoreszierenden, chemilumineszierenden und Enzymmarkierungen zu markieren. Siehe zum Beispiel US-Patent Nr. 3.940.475 (Fluorometrie) und US-Patent Nr. 3.645.090 (Enzyme); Hunter et al., *Nature* 144, 945 (1962); David et al., *Biochemistry* 13, 1014–1021 (1974), Pain et al., *J. Immunol. Methods* 40, 219–230 (1981), und Nygren, *Histochem. and Cytochem.* 30, 407–412 (1982). Bevorzugte Markierungen hierin sind Enzyme wie Meerrettichperoxidase und alkalische Phosphatase. Die Konjugation solcher Markierungen, einschließlich der Enzyme, an das Antikörperpolypeptid ist ein Standard-Manipulationsverfahren für einen Fachmann in Immuntestverfahren. Siehe z. B. O'Sullivan et al., „Methods for the Preparation of Enzyme-antibody Conjugates for Use in Enzyme Immunoassay“, in *Methods in Enzymology*, Hrsg. J. J. Langone und H. Van Vunakis, Band 73, Academic Press, New York, N. Y., 147–166 (1981). Solche Bindungsverfahren sind zur Verwendung mit den Antikörperpolypeptiden dieser Erfindung geeignet.

[0121] Alternativ zur Markierung des Antikörpers kann das Antigen in biologischen Fluiden durch einen kompetitiven Innumtest unter Verwendung eines konkurrierenden Antigenstandards, der mit einer detektierbaren Substanz markiert ist, und einem nicht-markierten Antikörper getestet werden. In diesem Test werden die biologischen Proben, die markierten Antigenstandards und der Antikörper kombiniert, und die Menge des markierten Antigenstandards, der an den nicht-markierten Antikörper gebunden ist, bestimmt. Die Menge des getesteten Antigens in der biologischen Probe ist umgekehrt proportional zur Menge des markierten Antigenstandards, der an den Antikörper gebunden ist.

[0122] In einem Aspekt ist der Antikörper der Erfindung insbesondere zur Detektion und Profilerstellung von Expression von spezifischen Oberflächenantigenen in vitro oder in vivo nützlich. Das Oberflächenantigen kann für einen besonderen Zell- oder Gewebetyp spezifisch sein, wodurch sie als Marker der Zelle oder des Gewebetyps dienen. Vorzugsweise wird der Oberflächenantigenmarker differentiell in verschiedenen Differenzierungsstadien von einer bestimmten Zelle oder Gewebetypen exprimiert. Der Antikörper, der gegen ein solches Oberflächenantigen ausgerichtet ist, kann daher zum Screening von Zell- oder Gewebepopulationen verwendet werden, die den Marker exprimieren. Zum Beispiel kann der Antikörper der Erfindung zum Screening und zur Isolation von Stammzellen wie embryonalen Stammzellen, blutbildenden Stammzellen und Mesen-

chymstammzellen verwendet werden. Der Antikörper der Erfindung kann auch verwendet werden, um Tumorzellen zu detektieren, die tumorassoziierte Oberflächenantigene, wie z. B. HER2-, HER3- oder HER4-Rezeptoren, exprimieren.

[0123] Der Antikörper der Erfindung kann als Affinitätsreinigungsmittel verwendet werden. In diesem Verfahren wird der Antikörper auf einer Festphase, wie z. B. Sephadex-Harz oder Filterpapier, unter Verwendung von fachbekannten Verfahren immobilisiert. Der immobilisierte Antikörper wird mit einer Probe kontaktiert, die das zu reinigende Antigen enthält, und danach wird der Träger mit einem geeigneten Lösungsmittel gewaschen, das im Wesentlichen das gesamte Material in der Probe entfernt, mit Ausnahme des zu reinigenden Antigens, das an den immobilisierten Antikörper gebunden ist. Letztlich wird der Träger mit einem anderen geeigneten Lösungsmittel gewaschen, wie z. B. Glycinpuffer, pH 5,0, das das Antigen aus dem Antikörper freisetzt.

[0124] Der Antikörper der Erfindung kann als Antagonist verwendet werden, um die spezifische Antigenaktivität sowohl in vitro als auch in vivo teilweise oder vollständig zu blockieren. Weiters können zumindest einige der Antikörper der Erfindung Antigenaktivität aus anderen Spezies neutralisieren. Dementsprechend können die Antikörper der Erfindung verwendet werden, um eine spezifische Antigenaktivität zu hemmen, z. B. in einer Zellkultur, die das Antigen enthält, in menschlichen Subjekten oder in anderen Säugetiersubjekten, die über das Antigen verfügen, mit welchem ein Antikörper der Erfindung kreuzreagiert (z. B. Schimpansen, Paviane oder Krallenaffen, Cynomolgus- und Rhesusaffen, Schwein oder Maus).

[0125] Ein Antikörper der Erfindung kann in einem Verfahren zur Hemmung eines Antigens in einem Subjekt verwendet werden, das von einer Störung betroffen ist, bei welcher die Antigenaktivität schädlich ist, umfassend Verabreichung eines Antikörpers der Erfindung an das Subjekt, sodass die Antigenaktivität im Subjekt gehemmt wird. Vorzugsweise ist das Antigen ein menschliches Proteinmolekül und das Subjekt ein menschliches Subjekt. Alternativ dazu kann das Subjekt ein Säugetier sein, das das Antigen exprimiert, an welches sich ein Antikörper der Erfindung bindet. Weiters kann das Subjekt ein Säugetier sein, in welches das Antigen eingeführt worden ist (z. B. durch Verabreichung des Antigens oder durch Expression eines Antigentransgens). Ein Antikörper der Erfindung kann für therapeutische Zwecke an ein menschliches Subjekt verabreicht werden. Weiters kann ein Antikörper der Erfindung an ein nicht-menschliches Säugetier verabreicht werden, das ein Antigen exprimiert, mit welchem der Antikörper kreuzreagiert (z. B. ein Primat, Schwein oder Maus), für veterinäre Zwecke oder als Tiermodell für eine menschliche Erkrankung. Angesichts des Letztgenannten können solche Tiermodelle zur Beurteilung der therapeutischen Wirksamkeit von Antikörpern der Erfindung nützlich sein (z. B. Testen der Dosierung und Zeitverlauf der Verabreichung). Blockierende Antikörper der Erfindung, die therapeutisch nützlich sind, umfassen z. B. unter anderem Anti-VEGF-, Anti-IgE-, Anti-CD11- und Anti-Gewebefaktor-Antikörper. Die blockierenden Antikörper der Erfindung können verwendet werden, um Erkrankungen, Störungen oder Leiden zu diagnostizieren, zu behandeln, zu hemmen oder zu vermeiden, die mit abnormer Expression und/oder Aktivität von einem oder mehreren Antigenmolekülen assoziiert sind, einschließlich unter anderem bösartiger und gutartiger Tumoren, Nicht-Leukämien und lymphoider Malignitäten, neuraler, Glia-, Astrozyten-, Hypothalamus- und anderer glandulärer, Makrophagen-, Epithel-, Stroma- und Blastozellstörungen und entzündlicher, angiogener und immunogener Erkrankungen.

[0126] In einem Aspekt ist der blockierende Antikörper der Erfindung für ein Ligandenantigen spezifisch und hemmt die Antigenaktivität durch Blockade und Beeinflussung der Liganden-Rezeptor-Wechselwirkung, die das Ligandenantigen umfasst, wodurch der entsprechende Signalweg und andere molekulare oder zelluläre Ereignisse gehemmt werden. Die Erfindung zeigt auch receptorspezifische Antikörper, die Ligandenbindung nicht notwendigerweise verhindern, aber in die Rezeptoraktivierung eingreifen, wodurch beliebige Reaktionen gehemmt werden, die normalerweise durch die Ligandenbindung initiiert werden. Die Erfindung umfasst auch Antikörper, die entweder vorzugsweise oder ausschließlich Ligandenrezeptorkomplexe binden. Der Antikörper der Erfindung kann auch als Agonist eines speziellen Antigenrezeptors dienen, wodurch entweder die gesamten oder partiellen Aktivitäten der ligandenvermittelten Rezeptoraktivierung potenziert, verstärkt oder aktiviert werden.

[0127] Es kann ein Immunkonjugat, das den Antikörper konjugiert an ein zytotoxisches Mittel umfasst, verwendet und hergestellt werden. Vorzugsweise werden das Immunkonjugat und/oder Antigen, an welches es/sie gebunden ist/sind, durch die Zelle internalisiert, was zu einer erhöhten therapeutischen Wirksamkeit des Immunkonjugats in der Tötung der Targetzelle führt, an welche sie sich bindet. In einer bevorzugten Ausführungsform ist das zytotoxische Mittel auf die Nucleinsäure in der Targetzelle gerichtet und/oder stört diese.

[0128] Der Begriff „zytotoxisches Mittel“ wie hierin verwendet bezeichnet eine Substanz, welche die Funktion von Zellen hemmt oder verhindert und/oder Zerstörung der Zellen verursacht. Der Begriff soll radioaktive Iso-

tope (z. B. At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} und radioaktive Isotope von Lu), chemotherapeutische Mittel und Toxine wie z. B. kleinmolekulare Toxine oder enzymatisch aktive Toxine bakteriellen, Pilz-, pflanzlichen oder tierischen Ursprungs einschließlich Fragmente und/oder Varianten davon umfassen.

[0129] Ein „chemotherapeutisches Mittel“ ist eine chemische Verbindung, die zur Behandlung von Krebs nützlich ist. Beispiele für chemotherapeutische Mittel umfassen Alkylierungsmittel, wie z. B. Thiotepa und Cyclophosphamid (CYTOXANTM), Alkylsulfonate wie z. B. Busulfan, Improsulfan und Pipsulfan; Aziridine, wie z. B. Benzodopa, Carbochon, Meturedopa und Uredopa; Ethylenimine und Methylmelamine, einschließlich Altretamin, Triethylenmelamin, Triethylenphosphoramid, Triethylthiophosphoramid und Trimethylolmelamin; Acetogenine (insbesondere Bullatacin and Bullatacinon); ein Camptothecin (einschließlich eines synthetischen Analogons Topotecan); Bryostatin; Callystatin; CC-1065 (einschließlich seiner synthetischen Analoga Adozelesin, Carzelesin und Bizelesin); Cryptophycine (insbesondere Cryptophycin 1 und Cryptophycin 8); Dolastatin; Duocarmycin (einschließlich der synthetischen Analoga KW-2189 und CBI-TMI); Eleutherobin; Pancratistatin; ein Sarcodictyin; Spongistatin; Stickstoffsenfgase, wie Chlorambucil, Chlornaphazin, Cholophosphamid, Estramustin, Ifosfamid, Mechlorethamin, Mechlorethaminoxidhydrochlorid, Melphalan, Novembichin, Phenesterin, Prednimustin, Trofosfamid, Uracillost; Nitrosoharnstoffe, wie z. B. Carmustin, Chlorozotocin, Fotemustin, Iomustin, Nimustin, Ranimustin; Antibiotika, wie z. B. die Endiin-Antibiotika (z. B. Calicheamicin, insbesondere Calicheamicin γ_1^I und Calicheamicin θ^I , siehe z. B. Angew. Chem. Intl. Ed. Engl. 33, 183–186 (1994); Dynemicin, einschließlich Dynemicin A; ein Esperamicin; sowie Neocarzinostatinchromophor und verwandte Chromoprotein-Endiin-Antibiotikachromophore), Aclacinomysine, Actinomycin, Authramycin, Azaserin, Bleomycine, Cactinomycin, Carabycin, Carminomycin, Carzinophilin, Chromomycine, Dactinomycin, Daunorubicin, Detorubicin, 6-diazo-5-oxo-L-norleucin, Doxorubicin (einschließlich Morpholinodoxorubicin, Cyanomorpholinodoxorubicin, 2-pyrrolinodoxorubicin and Desoxydoxorubicin), Epirubicin, Esorubicin, Idarubicin, Marcellomycin, Mitomycine, Mycophenolsäure, Nogalamycin, Olivomycine, Peplomycin, Potfiromycin, Puromycin, Quelamycin, Rodorubicin, Streptonigrin, Streptozocin, Tubercidin, Ubenimex, Zinostatin, Zorubicin; Antimetaboliten wie z. B. Methotrexat and 5-Fluoruracil (5-FU); Folsäureanaloga wie z. B. Denopterin, Methotrexat, Pteropterin, Trimetrexat; Purinanaloga wie z. B. Fludarabin, 6-Mercaptopurin, Thiamiprin, Thioguanin; Pyrimidinanaloga wie z. B. Ancitabin, Azacitidin, 6-Azauridin, Carmofur, Cytarabin, Didesoxyuridin, Doxifluridin, Enocitabin, Floxuridin, 5-FU; Androgene wie z. B. Calusteron, Dromostanolonpropionat, Epitiostanol, Mepitiostan, Testolacton; Anti-Adrenale wie z. B. Aminoglutethimid, Mitotan, Trilostan; Folsäure-Replenisher wie z. B. Frolinsäure; Aceglaton; Aldophosphamidglycosid; Aminolävulinsäure; Amsacrin; Bestrabucil; Bisanren; Edatraxat; Defofamin; Demecolcin; Diazichon; Elfornithin; Elliptiniumacetat; ein Epothilon; Etoglucid; Galliumnitrat; Hydroxyharnstoff; Lentinan; Ionidamin; Maytansinoide wie z. B. Maytansin und Ansamitocine; Mitoguzon; Mitoxantron; Mopidamol; Nitracrin; Pentostatin; Phenamet; Pirarubicin; Podophyllinsäure; 2-Ethylhydrazid; Procarbazin; PSK[®], Razoxan; Rhizoxin; Sizofiran; Spirogermanium; Tenuazonsäure; Triazichon; 2,2',2"-Trichlortriethylamin; Trichothecene (insbesondere T-2-Toxin, Verracurin-A, Roridin-A und Anguidin); Urethan; Vindesin; Dacarbazin; Mannomustin; Mitobronitol; Mitolactol; Pipobroman; Gacytosin; Arabinosid („Ara-C“); Cyclophosphamid; Thiotepa; Taxoide, z. B. Paclitaxel (TAXOL[®], Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ) und Doxetaxel (TAXOTERE[®], Rhône-Poulenc Rorer, Antony, Frankreich); Chlorambucil; Gemcitabin; 6-Thioguanin; Mercaptopurin; Methotrexat; Platinanaloga wie z. B. Cisplatin and Carboplatin; Vinblastin; Platin; Etoposid (VP-16); Ifosfamid; Mitomycin-C; Mitoxantron; Vincristin; Vinorelbin; Navelbin; Novantron; Teniposid; Daunomycin; Aminopterin; Xeloda; Ibandronat; CPT-11; Topoisomerasehemmer RFS 2000; Difluormethylornithin (DMFO); Retinsäure; Capecitabin; und pharmazeutisch annehmbare Salze, Säuren oder Derivate der oben genannten. In dieser Definition sind auch anti-hormonelle Mittel enthalten, die wirken, um Hormonwirkung auf Tumoren zu regulieren oder zu hemmen, wie z. B. Anti-Östrogene, einschließlich von z. B. Tamoxifen, Raloxifen, aromatasehemmende 4(5)-Imidazole, 4-Hydroxytamoxifen, Trioxifen, Keoxifen, LY117018, Onapriston und Toremifen (Fareston); und Anti-Androgene wie z. B. Flutamid, Nilutamid, Bicalutamid, Leuprolid und Goserelin; und pharmazeutisch annehmbare Salze, Säuren oder Derivate von beliebigen der oben genannten.

[0130] Konjugate eines Antikörpers und eines oder mehrerer kleinmolekularer Toxine, wie z. B. ein Calicheamicin, ein Maytansin (U.S.-Patent Nr. 5.208.020), ein Trichothene, und CC1065, werden ebenfalls hierin erwo-gen.

[0131] Vorzugsweise wird der Antikörper an ein oder mehrere Maytansinmoleküle (z. B. etwa 1 bis etwa 10 Maytansinmoleküle pro Antikörpermolekül) konjugiert. Maytansin kann z. B. in May-SS-Me überführt werden, das zu May-SH3 reduziert werden kann und mit modifiziertem Antikörper umgesetzt werden kann (Chari et al., Cancer Research 52, 127–131 (1992)), um ein Maytansinoid-Antikörperimmunkonjugat zu erzeugen.

[0132] Ein anderes Immunkonjugat von Interesse umfasst einen Antikörper, der an ein oder mehrere Calicheamicinmoleküle konjugiert ist. Die Calicheamicinfamilie von Antibiotika sind in der Lage, doppelsträngige

DNA-Unterbrechungen in Sub-picomol-Konzentrationen herzustellen. Strukturelle Analoga von Calicheamicin, die verwendet werden können, umfassen unter anderem γ_1^I , α_2^I , α_3^I , N-Acetyl- γ_1^I , PSAG und θ_1^I (Hinman et al., Cancer Research 53, 3336–3342 (1993), und Lode et al., Cancer Research 58: 2925–2928 (1998)). Siehe auch US-Patent Nr. 5.714.586; 5.712.374; 5.264.586 und 5.773.001.

[0133] Enzymatisch aktive Toxine und Fragmente davon, die verwendet werden können, umfassen Diphtherie-A-Kette, nicht-bindende aktive Fragmente von Diphtherietoxin, Exotoxin-A-Kette (aus *Pseudomonas aeruginosa*), Ricin-A-Kette, Abrin-A-Kette, Modeccin-A-Kette, Alpha-sarcin, Aleurites-fordii-Proteine, Dianthinproteine, Phytolacaamericana-Proteine (PAPI, PAPII, and PAP-S), Momordica-charantia-Hemmer, Curcin, Crocin, Sapaonaria-officinalis-Inhibitor, Gelonin, Mitogellin, Restrictocin, Phenomycin, Enomycin und die Tricothecene. Siehe z. B. WO 93/21232, veröffentlicht am 28. Oktober 1993.

[0134] Es wird weiters ein Immunkonjugat erwogen, das zwischen einem Antikörper und einer Verbindung mit nucleolytischer Aktivität (z. B. einer Ribonuclease oder einer DNA-Endonuclease wie z. B. einer Desoxyribonuclease; DNase) gebildet wird.

[0135] Eine Vielzahl von radioaktiven Isotopen sind zur Herstellung von radiokonjugierten Antikörpern erhältlich. Beispiele umfassen At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} und radioaktive Isotope von Lu.

[0136] Konjugate des Antikörpers und des zytotoxischen Mittels können unter Verwendung einer Vielzahl von bifunktionellen Proteinbindungsmitteln wie z. B. N-Succinimidyl-3-(2-pyridyldithiol)propionat (SPDP), Succinimidyl-4-(N-maleinimidomethyl)cyclohexan-1-carboxylat, Iminothiolan (IT), bifunktionellen Derivaten von Imidoestern (z. B. Dimethyladipimidat-HCl), aktiven Estern (z. B. Disuccinimidylsuberat), Aldehyden (z. B. Glutaraldehyd), Bisazido-Verbindungen (z. B. Bis(p-azidobenzoyl)hexandiamin), Bisdiazonium-Derivaten (z. B. Bis(p-diazoniumbenzoyl)ethylendiamin), Diisocyanaten (z. B. Tolyen-2,6-diisocyanat) und bis-aktiven Fluorverbindungen (z. B. 1,5-Difluor-2,4-dinitrobenzol) hergestellt werden. Zum Beispiel kann ein Ricin-Immunotoxin wie in Viletta et al., Science 238, 1098 (1987), beschrieben hergestellt werden. Kohlenstoff-14-markiertes 1-Isothiocyanatobenzyl-3-methyldiethylentriaminpentaessigsäure (MX-DTPA) ist ein exemplarischer Chelatbildner zur Konjugation von Radionucleotid an den Antikörper. Siehe WO94/11026. Der Linker kann ein „spaltbarer Linker“ sein, der die Freisetzung des zytotoxischen Arzneimittels in die Zelle erleichtert. Zum Beispiel kann ein säurelabiler Linker, peptidaseempfindlicher Linker, Dimethyllinker oder disulfidhaltender Linker (Charie et al., Cancer Research 52, 127–131 (1992) verwendet werden.

[0137] Alternativ dazu kann ein Fusionsprotein, das den Antikörper und zytotoxische Mittel umfasst, hergestellt werden, z. B. durch Rekombinationsverfahren oder Peptidsynthese.

[0138] Ein Antikörper kann zur Verwendung in Tumorprätargeting an einen „Rezeptor“ (wie z. B. Streptavidin) konjugiert werden, worin das Antikörper-Rezeptor-Konjugat an den Patienten verabreicht wird, gefolgt von Entfernung des ungebundenen Konjugats aus dem Kreislauf unter Verwendung eines Klärungsmittels und dann Verabreichung eines „Liganden“ (z. B. Avidin), der an ein zytotoxisches Mittel (z. B. ein Radionucleotid) konjugiert ist.

[0139] Antikörper der vorliegenden Erfindung können entweder alleine oder in Kombination mit anderen Zusammensetzungen in einer Therapie verwendet werden. Zum Beispiel kann der Antikörper gemeinsam mit einem anderen Antikörper, (einem) chemotherapeutischen Mittel(n) (einschließlich Cocktails von chemotherapeutischen Mitteln), (einem) anderen zytotoxischen Mittel(n), antiangiogenen Mittel(n), Cytokinen und/oder wachstumshemmenden Mittel(n) verabreicht werden. Wenn der Antikörper das Tumorstadium hemmt, kann es besonders wünschenswert sein, den Antikörper mit einem oder mehreren anderen therapeutischen Mittel(n) zu kombinieren, die auch das Tumorstadium hemmen. Zum Beispiel können Anti-VEGF-Antikörper, die VEGF-Aktivitäten blockieren, in einer Behandlung von metastasierendem Brustkrebs mit Anti-ErbB-Antikörpern (z. B. HERCEPTIN®-Anti-HER2-Antikörper) kombiniert werden. Alternativ oder zusätzlich dazu kann der Patient kombinierte Strahlentherapie erhalten (z. B. externe Bestrahlung oder Therapie mit einem radioaktiv markierten Mittel, wie z. B. einem Antikörper). Solche kombinierten Therapien, die oben angeführt sind, umfassen kombinierte Verabreichung (wo die zwei oder mehrere Mittel in denselben oder getrennten Formulierungen enthalten sind) und separate Verabreichung, in diesem Fall kann die Verabreichung des Antikörpers vor und/oder nach Verabreichung der zusätzlichen Therapie oder Therapien auftreten.

[0140] Der Antikörper (und zusätzliche therapeutisches Mittel) wird/werden durch ein beliebiges geeignetes Mittel verabreicht, einschließlich parenteraler, subkutaner, intraperitonealer, intrapulmonaler und intranasaler Mittel und wenn gewünscht zur lokalen Behandlung, intraläsionalen Verabreichung. Parenterale Infusionen

umfassen intramuskuläre, intravenöse, intraarterielle, intraperitoneale oder subkutane Verabreichung. Zusätzlich dazu wird der Antikörper durch Pulsinfusion in geeigneter Weise verabreicht, insbesondere mit sinkenden Dosen des Antikörpers. Vorzugsweise wird die Dosierung durch Injektionen verabreicht, am bevorzugtesten intravenöse oder subkutane Injektionen, zum Teil abhängig davon, ob die Verabreichung kurz oder chronisch ist.

[0141] Die Antikörperzusammensetzung wird in einer Art und Weise formuliert, dosiert und verabreicht, die der guten medizinischen Praxis entspricht. Faktoren, die in diesem Kontext berücksichtigt werden sollten, umfassen die spezielle zu behandelnde Störung, das spezielle zu behandelnde Säugetier, das klinische Leiden des individuellen Patienten, den Grund für die Störung, die Stelle der Verabreichung des Mittels, das Verabreichungsverfahren, den Verabreichungsplan und andere Ärzten bekannte Faktoren. Der Antikörper muss nicht, kann aber gegebenenfalls mit einem oder mehreren Mitteln formuliert werden, die derzeit verwendet werden, um die fragliche Störung zu vermeiden oder zu behandeln. Die wirksame Menge solcher anderer Mittel hängt von der Menge des in der Formulierung gegenwärtigen Antikörpers ab, der Form von Störung oder Behandlung und anderen oben diskutierten Faktoren. Diese werden im Allgemeinen in den gleichen Dosierungen verwendet und mit den zuvor verwendeten Verabreichungswegen oder etwa 1 bis 99% der zuvor verwendeten Dosierungen verwendet.

[0142] Zur Prävention oder Behandlung von Erkrankung hängt die geeignete Dosis des Antikörpers (wenn alleine oder in Kombination mit anderen Mitteln wie z. B. chemotherapeutischen Mitteln verwendet) von der Art der zu behandelnden Erkrankung, der Art des Antikörpers, der Schwere und des Verlaufs der Erkrankung, ab, ob der Antikörper für präventive oder therapeutische Zwecke verabreicht wird, vorheriger Therapie, der Krankengeschichte des Patienten und Reaktion auf den Antikörper und dem Ermessen des behandelnden Arztes ab. Der Antikörper wird dem Patienten zu einem Zeitpunkt oder über eine Reihe von Behandlungen in geeigneter Weise verabreicht. Abhängig vom Typ und der Schwere der Erkrankung sind etwa 1 µg/kg bis 15 mg/kg (z. B. 0,1 mg/kg–10 mg/kg) des Antikörpers eine anfängliche mögliche Dosierung zur Verabreichung an den Patienten, ob z. B. durch eine oder mehrere getrennte Verabreichungen oder durch kontinuierliche Infusion. Eine typische tägliche Dosis kann von etwa 1 µg/kg bis 100 mg/kg oder mehr reichen, abhängig von den oben genannten Faktoren. Für wiederholte Verabreichungen über mehrere Tage oder länger wird die Behandlung abhängig vom Leiden beibehalten, bis eine gewünschte Unterdrückung der Krankheitssymptome auftritt. Die bevorzugte Dosierung des Antikörpers liegt im Bereich von etwa 0,05 mg/kg bis etwa 10 mg/kg. Daher können ein oder mehrere Dosen von etwa 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 4,0 mg/kg oder 10 mg/kg (oder einer beliebigen Kombination davon) an den Patienten verabreicht werden. Solche Dosierungen können intermittierend verabreicht werden, z. B. jede Woche oder alle drei Wochen (z. B. sodass der Patient etwa 2 bis etwa zwanzig, z. B. etwa sechs Dosen, des Antikörpers erhält). Eine anfängliche höhere Ladungsdosis, gefolgt von einer oder mehreren niedrigen Dosen kann verabreicht werden. Ein beispielhafter Dosierungsplan umfasst die Verabreichung einer anfänglichen Ladungsdosis von etwa 4 mg/kg, gefolgt von einer wöchentlichen Erhaltungsdosis von etwa 2 mg/kg des Antikörpers. Jedoch können andere Dosierungspläne nützlich sein. Das Fortschreiten dieser Therapie wird einfach durch herkömmliche Verfahren und Tests überwacht.

Pharmazeutische Formulierungen

[0143] Therapeutische Formulierungen des Antikörpers werden zur Lagerung durch Mischung des Antikörpers, der über den gewünschten Grad an Reinheit verfügt, mit optionalen physiologisch annehmbaren Trägern, Exzipienten oder Stabilisatoren (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16. Auflage, A. Osol (Hrsg.) (1980)) in Form von wässrigen Lösungen, gefriergetrockneten oder anderen getrockneten Formulierungen hergestellt. Annehmbare Träger, Exzipienten oder Stabilisatoren sind in den verwendeten Dosierungen und Konzentrationen für Empfänger nicht-toxisch und umfassen Puffer, wie z. B. Phosphat, Citrat, Histidin und andere organische Säuren, Antioxidanzien, einschließlich Ascorbinsäure und Methionin, Konservierungsmittel (wie z. B. Octadecyldimethylbenzylammoniumchlorid, Hexamethoniumchlorid, Benzalkoniumchlorid, Benzethoniumchlorid, Phenol, Butyl-, oder Benzylalkohol, Alkylparabene, wie z. B. Methyl- oder Propylparaben, Catechol, Resorcinol, Cyclohexanol, 3-Pentanol und m-Kresol), Polypeptide mit geringem Molekulargewicht (weniger als etwa 10 Reste); Proteine, wie z. B. Serumalbumin, Gelatine oder Immunglobuline, hydrophile Polymere, wie z. B. Polyvinylpyrrolidon, Aminosäuren, wie z. B. Glycin, Glutamin, Asparagin, Histidin, Arginin oder Lysin, Monosaccharide, Disaccharide und andere Kohlenhydrate, einschließlich Glucose, Mannose oder Dextrine, Chelatbildner wie z. B. EDTA, Zucker, wie z. B. Saccharose, Mannit, Trehalose oder Sorbit, salzbildende Gegenionen, wie z. B. Natrium, Metallkomplexe (z. B. Zn-Proteinkomplexe), und/oder nicht-ionische Tenside wie z. B. TWEENTM, PLURONICSTM oder Polyethylenglykol (PEG).

[0144] Die Formulierung hierin kann auch mehr als eine aktive Verbindung umfassen, die für eine bestimmte

zu behandelnde Indikation notwendig ist, vorzugsweise jene mit komplementärer Aktivität, die einander nicht negativ beeinflussen. Solche Moleküle sind in geeigneter Weise in Kombination in Mengen gegenwärtig, die für den beabsichtigten Zweck wirkungsvoll sind.

[0145] Die Wirkstoffe können auch in eine Mikrokapsel, die z. B. durch Koazervationsverfahren oder Grenzflächenpolymerisation hergestellt werden, beispielsweise Hydroxymethylcellulose oder Gelatine-Mikrokapsel bzw. Poly(methylmethacrylat)-Mikrokapsel, in kolloidalen Arzneimittelverabreichungssystemen (z. B. Liposomen, Albuminmikrosphären, Mikroemulsionen, Nanoteilchen und Nanokapseln) oder in Makroemulsionen eingeschlossen sein. Solche Verfahren sind in Remington's Pharmaceutical Sciences, 16. Auflage, A. Osol (Hrsg.) (1980), offenbart.

[0146] Die zur In-vivo-Verabreichung zu verwendenden Formulierungen müssen steril sein. Dies wird durch Filtration durch sterile Filtrationsmembranen erreicht.

[0147] Retard-Formulierungen können hergestellt werden. Geeignete Beispiele für Retardformulierungen umfassen semipermeable Matrizen von festen hydrophoben Polymeren, die den Antikörper enthalten, wobei die Matrizen in Form von geformten Fabrikaten vorliegen, z. B. Filmen oder Mikrokapseln. Beispiele für Retardmatrizen umfassen Polyester, Hydrogele (z. B. Poly(2-Hydroxyethylmethacrylat) oder Poly(vinylalkohol)), Polylactide (US-Patent Nr. 3.773.919), Copolymere von L-Glutaminsäure und γ -Ethyl-L-Glutamat, nicht-abbaubare Ethyl-Vinylacetat, abbaubare Milchsäure-Glykolsäure-Copolymere, wie z. B. das LUPRON DEPOT™ (injizierbare Mikrokügelchen, die aus Milchsäure-Glykosylsäure-Copolymeren und Leuprolidacetat bestehen), und Poly-D-(–)-3-hydroxybuttersäure. Während Polymere wie z. B. Ethylenvinylacetat und Milchsäure-Glykolsäure die Freisetzung von Molekülen über 100 Tage ermöglicht, setzen bestimmte Hydrogele Proteine über kürzere Zeiträume frei. Wenn eingekapselte Antikörper für einen längeren Zeitraum im Körper bleiben, können sie als Folge der Exposition gegenüber Feuchtigkeit bei 37°C denaturieren oder aggregieren, was zu einem Verlust der biologischen Aktivität und möglichen Veränderungen der Immunogenität führt. Rationale Strategien können zur Stabilisierung erwogen werden, abhängig vom involvierten Mechanismus. Zum Beispiel kann, wenn entdeckt wird, dass der Aggregationsmechanismus eine intermolekulare S-S-Bindungsbildung durch Thio-Disulfidaustausch ist, Stabilisierung durch Modifikation von Sulfhydrylresten, Gefriertrocknung aus sauren Lösungen, Kontrolle des Feuchtigkeitgehalts unter Verwendung von geeigneten Zusatzstoffen und Entwicklung spezifischer Polymermatrixzusammensetzungen erreicht werden.

Fabrikate

[0148] Ein Fabrikat, das Materialien enthält, die zur Behandlung der Störungen zweckdienlich sind, wird beschrieben. Das Fabrikat umfasst einen Behälter und ein Etikett oder eine Verpackungsbeilage auf oder im Behälter. Geeignete Behälter umfassen z. B. Flaschen, Phiole, Spritzen etc. Die Behälter können aus einer Reihe von Materialien wie Glas oder Kunststoff hergestellt werden. Der Behälter enthält eine Zusammensetzung, die zur Behandlung des Leidens wirkungsvoll ist, und kann einen sterilen Zugangspunkt aufweisen (zum Beispiel kann der Behälter eine Tasche oder eine Phiole für eine intravenöse Lösung mit einem Stöpsel aufweisen, die mit einer Nadel zur subkutanen Injektion durchstoßen werden kann). Zumindest ein aktives Mittel in der Zusammensetzung ist ein Antikörper der Erfindung. Das Etikett oder die Verpackungsbeilage zeigt, dass die Zusammensetzung zur Behandlung des Leidens der Wahl, wie z. B. Krebs, verwendet wird. Weiters kann das Fabrikat (a) einen ersten Behälter mit einer Zusammensetzung umfassen, die darin enthalten ist, worin die Zusammensetzung einen Antikörper umfasst, und (b) einen zweiten Behälter mit einer Zusammensetzung darin, worin die Zusammensetzung ein weiteres zytotoxisches Mittel umfasst. Das Fabrikat kann weiters eine Verpackungsbeilage umfassen, die zeigt, dass die ersten und zweiten Antikörperzusammensetzungen zur Behandlung von Krebs verwendet werden können. Alternativ oder zusätzlich dazu kann das Fabrikat weiters einen zweiten (oder dritten) Behälter umfassen, der einen pharmazeutisch annehmbaren Puffer umfasst, wie z. B. bakterienstatisches Wasser zur Injektion (BWI), phosphatgepufferte Kochsalzlösung, Ringer-Lösung und Dextroselösung. Es kann weiters andere Materialien umfassen, die aus kommerzieller Sicht und vom Standpunkt des Benutzers aus gesehen wünschenswert sind, einschließlich anderer Puffer, Verdünnungsmittel, Filter, Nadeln und Spritzen.

[0149] Die folgenden Beispiele sollen die Praxis der vorliegenden Erfindung nur veranschaulichen und nicht einschränken.

BEISPIELE

Beispiel 1. Herstellung von AntiCD18-Antikörperfragmenten

Materialien & Verfahren

Plasmidherstellung

[0150] Das Kontrollplasmid pS1130 wurde zur dicistronischen Expression von Anti-CD18-F(ab')₂ hergestellt und basierte auf dem Vektor, der von Carter et al., Bio/Technology 10, 163–167 (1992), beschrieben wurde. Dieser Entwurf stellt Transkription von Genen sowohl für Leichtketten- als auch Schwerekettenfragmente mit einem C-terminalen Leucinzipper unter die Kontrolle eines einzelnen PhoA-Promotors. Transkription endet mit einem λ -Transkriptionsterminator, der sich stromab der Kodiersequenz für den Schwerekettenleucinzipper befindet (Scholtissek und Grosse Nucleic Acids Res. 15 (7), 3185 (1987)). Die hitzestabile Enterotoxin-II-Signalsequenz (STII) geht der Kodiersequenz für jede Kette voraus und steuert die Sekretion des Polypeptids in das Periplasma (Lee et al., Infect. Immun. 42, 264–268 (1983), Picken et al., Infect. Immun. 42, 269–275 (1983)). Leucinzipper wurde an das C-terminale Ende des Schwerekettenfragments angeheftet, um die Dimerisierung der zwei Fab'-Arme zu fördern.

[0151] Dualpromotorplasmid, das zwei separate Translationseinheiten enthält, pxC18-T3, trennt die Transkription der Leichtkette temporär von der Transkription der Schwerekettenkette. Wie in pS1130 bleibt die Leichtkette unter der Kontrolle des phoA-Promotors.

[0152] Jedoch folgt in pxC18-T3 ein λ -Transkriptionsterminator der für die Leichtkette kodierenden Sequenz. Stromab dieses Terminators wurde der TacII-Promotor hinzugefügt, um die Transkription des Schwerekettenfragments/C-terminalen Leucinzippers zu kontrollieren (DeBoer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 21–25 (1983)). Ein zweiter λ -Transkriptionsterminator folgt dieser Kodiersequenz. Stumme Codonvarianten der STII-Signalsequenz wurden verwendet, um die Sekretion beider Ketten zu steuern (Simmons und Yansura, Nature Biotechnology 14, 629–634 (1996)).

[0153] Ein schematischer Vergleich des Kontrollplasmids des einzelnen Promotors mit dem Plasmid des Dualpromotors ist in [Fig. 1](#) dargestellt. Die Expressionskassettensequenz von pxC18-T3 ist in [Fig. 2](#) bereitgestellt (Seq.-ID Nr. 3), und die Aminosäuresequenzen aus den zwei Translationseinheiten sind in [Fig. 3](#) dargestellt (Seq.-ID Nr. 4).

Fermentation

[0154] Der Wirtstamm, der in Fermentation verwendet wird, war ein Derivat von E. coli W3110, das 59A7 genannt wurde. Der vollständige Genotyp von 59A7 ist W3110 Δ fhuA phoA Δ E15 Δ (argF-lac)169 deoC2 degP41 (Δ pstI-Kan^r) IN(rrnD-rrnE) 1 ilvG2096(Val^r) Δ prc prc-Suppressor. Die 59A7-Wirtszellen wurden entweder mit pS1130- oder pxC18-T3-Plasmid transformiert, und erfolgreiche Transformanten wurden ausgewählt und in Kultur gezüchtet. Im Fall des Dualpromotorplasmids wurde ein weiteres Plasmid, pMS421, gemeinsam mit pxC18-T3 co-transformiert. Dieses zusätzliche Plasmid, pMS421, ist ein auf pSC101 basierendes Plasmid, das lacIq bereitstellt, um die Kontrolle des TacII-Promotors zu verbessern, und das auch Spectinomycin- und Streptomycinresistenz bereitstellt.

[0155] Für jede 10-Liter-Fermentation wurde eine einzelne Phiole, die 1,5 ml Kultur in 10–15% DMSO enthielt, in einem 1-l-Schüttelkolben, der 500 ml LB-Medium enthielt, das mit 0,5 ml Tetracyclinlösung (5 mg/ml) und 2,5 ml 1 M Natriumphosphatlösung ergänzt war, aufgetaut. Diese Saatkultur wurde etwa 16 Stunden lang bei 30°C gezüchtet und dann dazu verwendet, einen 10-Liter-Fermenter zu inokulieren.

[0156] Der Fermenter begann anfänglich mit etwa 6,5 Liter Medium, das etwa 4,4 g Glucose, 100 ml von 1 M Magnesiumsulfat, 10 ml einer Spurenelementlösung (100 ml Salzsäure, 27 g Eisen(III)-chloridhexahydrat, 8 g Zinksulfatheptahydrat, 7 g Kobaltchloridhexahydrat, 7 g Natriummolybdatdihydrat, 8 g Kupfer(II)-sulfatpentahydrat, 2 g Borsäure, 5 g Mangansulfatmonohydrat, in einem Endvolumen von 1 Liter), 20 ml Tetracyclinlösung (5 mg/ml in Ethanol), 10 ml Fermax-Adjuvans 27 (oder ein äquivalentes Anti-Schaum-Mittel), 1 Tasche von HCD-Salzen (37,5 g Ammoniumsulfat, 19,5 g dibasisches Kaliumphosphat, 9,75 g monobasisches Natriumphosphat-Dihydrat, 7,5 g Natriumcitratdihydrat, 11,3 g monobasisches Kaliumphosphat) und 200 g NZ-Amin-A (ein Proteinhydrolysat) enthält. Fermentationen wurden bei 30°C mit 10 NI/min Luftfluss durchgeführt und bei einem pH von 7,0 $\pm$ 0,2 gehalten (obwohl in einigen Fällen gelegentliche Abweichungen über diesen Bereich

hinaus auftraten). Der Gegendruck des Fermenters und die Rührrate wurden variiert, um die Sauerstofftransfergeschwindigkeit in den Fermenter zu manipulieren und in der Folge die Zellrespirationsgeschwindigkeit zu kontrollieren.

[0157] Nach Inokulation des Fermenters mit dem zellenhaltigen Medium aus dem Schüttelkolben wurde die Kultur im Fermenter unter Verwendung eines computerbasierten Algorithmus, um dem Fermenter eine konzentrierte Glucoselösung zuzuführen, auf hohe Zelldichten gezüchtet. Ammoniumhydroxid (58% Lösung) und Schwefelsäure (24% Lösung) wurden dem Fermenter ebenfalls wie benötigt zugeführt, um pH zu kontrollieren. Weitere Hinzufügungen von Anti-Schaum-Mittel wurden in einigen Fällen ebenfalls verwendet, um die Schaumbildung zu kontrollieren. Wenn die Kultur eine Zelldichte von etwa 40 OD550 erreichte, wurden zusätzliche 100 ml von 1 M Magnesiumsulfat zum Fermenter hinzugefügt. Zusätzlich dazu wurde eine konzentrierte Salzzufuhr (bestehend aus etwa 10 g Ammoniumsulfat, 26 g dibasischem Kaliumphosphat, 13 g monobasischem Natriumphosphatdihydrat, 2 g Natriumcitratdihydrat und 15 g monobasischem Kaliumphosphat in 1 l Wasser) zum Fermenter bei einer Geschwindigkeit von 2,5 ml/min gestartet, wenn die Kultur etwa 20 OD550 erreichte, und fortgesetzt, bis etwa 1250 ml zur Fermentation hinzugefügt wurden. Fermentationen wurden typischerweise 72–80 Stunden fortgesetzt.

[0158] Während der Fermentation wurde die konzentrierte Glucoselösung, sobald der Sollwert für gelösten Sauerstoff für die Fermentation erreicht wurde, basierend auf dem Sondensignal für gelösten Sauerstoff geliefert, um die Konzentration des gelösten Sauerstoffs beim Sollwert zu kontrollieren. In der Folge manipulierten dementsprechend in diesem Kontrollschema Manipulationen der Fermenter-Betriebsparameter, wie z. B. Rührgeschwindigkeit oder Gegendruck, welche die Sauerstofftransferkapazität in der Fermentation beeinflussen, die Sauerstoffaufnahme- oder Stoffwechselgeschwindigkeit der Zellen.

[0159] Ein Massenspektrometer wurde verwendet, um die Zusammensetzung des Abgases aus den Fermentationen zu überwachen, und ermöglichte die Berechnung der Sauerstoffaufnahme- und Kohlendioxidabgabegeschwindigkeit in den Fermentationen.

[0160] Wenn die Kultur eine Zelldichte von etwa 220 OD550 erreichte, wurde das Rühren über etwa 12 Stunden von einer anfänglichen Geschwindigkeit von 1000 U/min auf etwa 725 U/min reduziert. Für die Fermentation des pxC18-7T3-Systems (worin der TacII-Promotor verwendet wurde, um Schwerkettenexpression zu kontrollieren) wurden 50 ml von 200 mM IPTG etwa 12 Stunden, nachdem die Kultur eine Zelldichte von 220 OD550 erreichte, hinzugefügt, um die Schwerkettenexpression zu induzieren.

Produkttests

[0161] Zur Beurteilung der Menge der Antikörperfragmente, die in den Fermentationen produziert wurden, wurde ein Reihe von Proteintests verwendet. Zur Bestimmung der Menge des angeordneten Anti-CD18-F(ab')₂-Leucinzipper-Komplexes wurde ein Protein-G-Test verwendet. Derrich und Wigley, Nature 359, 752–4 (1992). Zur Herstellung von Proben für diesen Test wurde die gesamte Fermentationsnährlösung zuerst beschallt und dann 2,4 × mit 50 mM Magnesiumsulfat verdünnt. Polyethylenimin (PEI) wurde zu einer Endkonzentration von 0,1% hinzugefügt. Nach einer 20-minütigen Inkubation wurden die Proben etwa 20 Minuten lang bei etwa 14.000 × g in einer Mikrozentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde dann 2 × mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung verdünnt und unter Verwendung eines HP1090- oder HP1100-HPLC-Systems auf eine Protein-G-Säule (Poros G/M-Säule) geladen. Ein 7-minütiger Test wurde verwendet, in welchem die Säule zuerst mit 10 mM PO₄/300 mM NaCl (pH 8) äquilibriert wurde. Nach Injektion der Probe wurde die Säule etwa 5,5 Minuten lang (unter Verwendung von etwa 3 ml Puffer in einer 2,1 × 30-mm-Säule) mit dem Äquilibriumspuffer gewaschen, gefolgt von einer schrittweisen Elution unter Verwendung von 30 mM PO₄/150 mM NaCl/0,01% TFA (pH 1,9).

[0162] Um zu bestätigen, dass die Ergebnisse von Protein G tatsächlich einen angeordneten F(ab')₂-Komplex darstellen, wurde das Produkt auch durch mehrere Chromatographieschritte, einschließlich Ionenaustausch und nach Entfernung des Leucinzipperabschnitts unter Verwendung von immobilisiertem Pepsin einer zusätzlichen Ionenaustauschsäule und einer Phenylsepharose-HIC-Säule, gereinigt. Ein gereinigtes Produkt wurde durch eine Reihe von routinemäßigen Verfahren, wie z. B. Kationenaustauschtest, ein Kapillarzonenelektrophorese-Nicht-Gel-Siebstest und SDS-PAGE-Gele, charakterisiert.

[0163] Zur Beurteilung der Gesamtquantität von Leichtketten- und Schwerkettenfragmenten, die in den Fermentationen produziert wurden, wurde eine alternative Umkehrphasen-HPLC verwendet. Proben, die für diesen Test verwendet wurden, wurden wie oben beschrieben für den Protein-G-Test hergestellt. Die löslichen Ly-

satproben wurden in 6 M Guanidin-HCl, 50 mM Tris, pH 9, verdünnt (typischerweise wurden 100 µl der Probe mit 650 µl der Guanidinlösung verdünnt). 50 µl von 2 M Dithiothreitol (frisch aufgetaut) wurden dann hinzugefügt. Vor Beladung auf die HPLC wurden 200 µl Acetonitril hinzugefügt und durch einen 0,2-µm-Filter filtriert.

[0164] Für das Umkehrphasenverfahren wurde eine Hewlett-Packard™-1100-HPLC mit einer Perseptive-Poros™-R-1-Umkehrphasensäule verwendet. Analysen wurden laufen gelassen, wobei die Säule auf 60–80°C aufgeheizt wurde, und UV-Absorption wurde bei 278 nm überwacht. Die Säule wurde in einer 28% Acetonitrillösung in Wasser mit 0,1% Trifluoressigsäure äquilibriert. 25 µl der Probe wurden dann auf die Säule geladen, und die Elution wurde unter Verwendung eines linearen Gradienten von 28% bis 38% Acetonitril über 20 Minuten durchgeführt, gefolgt von einem 17-minütigen Regenerationszeitraum bei 95% Acetonitril und Re-Äquilibration bei 28% Acetonitril. Peaks für leichtketten- und schwerkettenverwandte Spezies wurden durch Vergleich mit Standards und Analyse unter Verwendung von Massenspektrometrie zum Nachweis identifiziert. Fermentationsproben aus einem Blinddurchlauf, in welchem derselbe Wirt mit Ausnahme eines Plasmids, das die Sequenzen für Schwer- und Leichtketten nicht enthielt, verwendet wurde, wurde auf ähnliche Weise hergestellt und analysiert, um die geeigneten Grundlinien für die Analysen zu bestimmen. Integration der Peakbereiche wurde unter Verwendung von Hewlett-Packard™-1100-Software durchgeführt, und Standards wurden in Blinddurchlaufproben gespickt, um eine Kalibrierungskurve zu erzeugen, um die relative Menge der verschiedenen Spezies in den Proben zu quantifizieren.

[0165] Die unlöslichen Lysatproben wurden auch auf ähnliche Weise analysiert, indem die unlöslichen Pellets, die aus Zelllysaten erhalten wurden, in 950 µl von 6 M Guanidin/HCl, 50 mM TRIS, pH 9 + 50 µl 2 M Dithiothreitol resuspendiert wurden. Beschallung (5 bis 10 Pulse) wurde typischerweise durchgeführt, um zur Resolubilisierung der Pellets beizutragen, gefolgt von Verdünnung von 100 µl resuspendierten Pellets in 650 µl der Guanidinlösung + 50 µl 2 M Dithiothreitol + 200 mM Acetonitril. Die Proben wurden dann filtriert und unter Verwendung desselben Verfahrens wie für die löslichen Lysatproben analysiert.

Ergebnisse

[0166] Eine Reihe von Anti-CD18-F(ab')₂-Fermentationsdurchläufen wurde unter Verwendung von entweder einem pS1130-Einzelpromotorsystem oder des pxC18-7T3-Dualpromotorsystems durchgeführt. Die Ausbeuten des angeordneten Anti-CD18-F(ab')₂-Komplexes wurden unter Verwendung von Proteintests, die in Abschnitt „Verfahren und Materialien“ beschrieben sind, berechnet. Wie in [Fig. 4](#) dargestellt, die ein Balkendiagramm ist, welches die Fermentationsausbeuten (g/l) repräsentiert, erhöhte die Verwendung des phoA-tac-Dualpromotorvektors im Stamm 59A7 die Ausbeuten von angeordnetem F(ab')₂ von etwa 2,5 g/l für den besten identifizierten pS1130/59A7-Transformanten auf etwa 4,6 ± 0,5 g/l, ein etwa doppelter Anstieg.

[0167] Zur weiteren Veranschaulichung der verbesserten Eigenschaften des Dualpromotorsystems wurden Profile der Expression der gesamten Schwerkette, löslicher Leichtketten und des angeordneten F(ab')₂-Komplexes für das Einzelpromotorsystem (pS1130/59A7) und das Dualpromotorsystem (pxCD18-7T3/59A7) geschaffen, die Ergebnisse sind in [Fig. 5](#) bzw. [Fig. 6](#) dargestellt.

[0168] Signifikanterweise trat im Dualpromotorsystem, worin die Leichtkette zuerst exprimiert wurde und in den periplasmatischen Raum sekretiert wurde, gefolgt von einem verlängerten Zeitraum von Schwerkettenproduktion, F(ab')₂-Anordnung fast unmittelbar nach der Induktion von Schwerkettenexpression auf ([Fig. 6](#)), während im Einzelpromotorsystem die anfängliche F(ab')₂-Anordnung nach Induktion von Leicht- und Schwerketten relativ gering war ([Fig. 5](#)). Ohne durch eine bestimmte Theorie gebunden sein zu wollen, lassen diese Ergebnisse vermuten, dass F(ab')₂-Anordnung ineffizient ist, bis sich signifikante Spiegel von löslicher Leichtkette im Periplasma akkumulierten.

[0169] Die beiden Systeme wurden weiters auf ihre Anordnungswirksamkeit verglichen, die als Verhältnis der Schwerkette im F(ab')₂-Komplex zur Gesamtmenge von synthetisierter Schwerkette definiert sind. Wie in [Fig. 7](#) dargestellt stellt das Dualpromotorsystem eine gesteigerte Anordnungswirksamkeit im Vergleich zum traditionellen Einzelpromotorsystem bereit, insbesondere während des anfänglichen Zeitraums (in den ersten 10 Stunden) der Schwerkettensynthese. Ein Vergleich der Schwerkettenexpressionsausmaße der zwei Systeme zeigt, dass die Verwendung des Dualpromotorsystems auch die Gesamtmenge der synthetisierten Schwerkette steigert, wie in [Fig. 7](#) dargestellt.

[0170] Deshalb zeigen die Ergebnisse, dass durch temporäre Trennung der Leicht- und Schwerkettensynthese eine signifikant gesteigerte Ausbeute des angeordneten Anti-CD18-F(ab')₂ erhalten wurde. Das neue System und Beobachtungen finden umfassende Anwendungen in anderen Systemen, in welchen mehrere Prote-

ineinheiten exprimiert und angeordnet werden sollen.

Beispiel 2. Herstellung von Antigewebefaktor-IgG1

[0171] Dieses Beispiel veranschaulicht die andauernden Bemühungen zur Herstellung von Vollängen-Antikörpern in einem E.-coli-System. Als sowohl Leicht- als auch Schwerketten voller Länge gleichzeitig unter Verwendung starker TIRs co-exprimiert wurden, akkumulierte sich eine signifikante Menge an exprimierten Vorläuferpolypeptiden, was zu einer geringeren Menge an reifen Leicht- und Schwerketten und richtig angeordneten Vollängen-Antikörpern führte. Dieses Beispiel zeigt, dass Vorläuferakkumulation durch temporäre Trennung der Expression von Leicht- und Schwerketten überwunden werden kann. Das Stellen jeder Kette unter die Kontrolle eines anderen Promotors wehrt die Sekretionsblockade ab, indem die Expression jeder Kette zu verschiedenen Zeitpunkten ermöglicht wird. Dieser Ansatz ermöglicht die Verwendung von stärkeren TIRs als für gleichzeitige Expression verwendet werden kann, was potenziell zu einem höheren Sekretionsspiegel für jede Kette führt. Solche Expressionskonstrukte mit höheren Expressionsausmaßen von individuellen Ketten sind zur Verbesserung der Ausbeuten von richtig angeordneten Vollängen-Antikörpern geeignet.

Materialien und Verfahren

Plasmidherstellung

[0172] Die Expressionskassette für das Kontrollplasmid paTF130 umfasst von 5' zu 3' Folgendes: (1) einen phoA-Promotor (Kikuchi et al., Nucleic Acids Res. 9(21), 5671–5678 (1981)); (2) trp-Shine-Dalgarno (Yanofsky et al., Nucleic Acids Res. 9, 6647–6668 (1981)), (3) eine TIR-Variante der STII-Signalsequenz (relative TIR-Stärke ~7) (Simmons und Yansura, Nature Biotechnology 14, 629–634 (1996)); (4) Kodiersequenz für Antigewebefaktor-Leichtkette; (5) λ_t -Terminator (Scholtissek und Grosse, Nucleic Acids Res. 15, 3185 (1987)); (6) einen zweiten phoA-Promotor; (7) eine zweite trp-Shine-Dalgarno; (8) eine zweite stumme Codon-Variante der STII-Signalsequenz (relative TIR-Stärke ~3); (9) Kodiersequenz für Antigewebefaktor-Vollängen-Schwerkette; und (10) einen zweiten λ_t -Terminator. Diese Expressionskassette wurde in das Gerüst des E.-coli-Plasmids pBR322 kloniert. Sutcliffe, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 43, 77–90 (1978). Daher wurde die unabhängige Transkription von Leichtkette und Schwerkette in diesem Plasmid durch Stellen jedes Gens unter die Kontrolle seines eigenen phoA-Promotors erreicht, jedoch, da beide phoA-Promotoren unter identischen Bedingungen induzierbar sind, wurden beide Ketten gleichzeitig exprimiert.

[0173] Alternativ dazu ermöglicht das Vektordesign von pxTF-7T3FL die temporär getrennte Expression von jeder Kette durch die Verwendung zweier verschiedener, und nicht zweier identischer, Promotoren. In diesem Plasmid bleibt die Leichtkette unter der Kontrolle des phoA-Promotors. Jedoch wird der tacII-Promotor (DeBoer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 21–25 (1983)) verwendet, um die Transkription von Schwerkette zu kontrollieren. Wie fachbekannt ist, werden phoA- und tacII-Promotoren unter im Wesentlichen unterschiedlichen Bedingungen induziert. Ein schematischer Vergleich von paTF130 und pxTF-7T3FL ist in [Fig. 8](#) dargestellt. Die Nucleinsäuresequenz von pxTF-7T3FL und die Polypeptidsequenzen, für die sie kodiert, sind in [Fig. 9](#) bzw. [Fig. 10](#) bereitgestellt.

Expression, Induktion, Probenherstellung und Analyse

[0174] Für die Expression jedes Konstrukts in kleinem Maßstab wurde E.-coli-Stamm 33D3 mit Genotyp (W3110 kan^R Δ fhua (Δ tonA) ptr3 phoA Δ E15 lacIq lacL8 ompT Δ (nmpc-fepE) deg P) als Wirtszellen verwendet. Nach Transformation wurden ausgewählte Transformantenproben in 5 ml Luria-Bertani-Medium inokuliert, das mit Carbenicillin (50 μ g/ml) ergänzt war, und bei 30°C auf einem Kulturrad über Nacht wachsen gelassen. Jede Kultur wurde dann in phosphatlimitierendes C. R. A. P.-Medium verdünnt (1:50) (3,57 g (NH₄)₂SO₄, 0,71 g Na-Citrat-2H₂O, 1,07 g KCl, 5,36 g Hefeextrakt (zertifiziert), 5,36 g Hycase-SF-Sheffield, mit KOH auf 7,3 angepasster pH, qs auf 872 ml mit SQ-H₂O und autoklaviert, auf 55°C gekühlt und mit 110 ml 1 M MOPS, pH 7,3, 11 ml 50% Glucose, 7 ml 1 M MgSO₄ ergänzt). Carbenicillin wurde dann zur Induktionskultur bei einer Konzentration von 50 μ g/ml hinzugefügt, und wenn nicht anders angegeben wurden alle Schüttelkolbeninduktionen in einem Volumen von 2 ml durchgeführt.

[0175] Nach Inokulation in das Induktionsmedium wurden die Bedingungen für jede Probe abhängig von den verwendeten Promotoren und dem Timing der Promotorinduktion variiert. Für paTF130, den Vektor, der phoA-Promotoren verwendet, um die Transkription von sowohl Leicht- als auch Schwerketten zu kontrollieren, wurde die Induktion bei 30°C unter Schütteln über ~24 Stunden mit keinen anderen Hinzufügungen zur Kultur durchgeführt. Ausreichende Abreicherung des Phosphats in dieser Probe führt zur gleichzeitigen Induktion der

phoA-Promotoren, die sowohl Leicht- als auch Schwerkettentranskription kontrollieren. Für pxTF-7T3FL, den Vektor, der phoA-Promotor verwendet, um die Leichtkettenexpression zu kontrollieren, aber einen tacII-Promotor, um die Schwerkettenexpression zu kontrollieren, wurde die Induktion zuerst unter denselben Kulturbedingungen durchgeführt wie jenen, die für paTF130 verwendet wurden. Nach ~16 Stunden unter Schütteln bei 30°C wurde Kaliumphosphatpuffer (pH 7,4) zu einer Endkonzentration von 1 mM hinzugefügt. Etwa 45 Minuten später wurde IPTG zur Kultur auf eine Endkonzentration von 1 mM hinzugefügt, um den tacII-Promotor zu induzieren. Die Induktion wurde dann weitere ~8 Stunden unter Schütteln bei 30°C fortgesetzt. Daher repräsentiert das paTF130-System Umstände, unter welchen die Transkription sowohl von Leichtketten- als auch Schwerketten gleichzeitig induziert wurde. Andererseits wurde das pxTF-7T3FL-System unter Bedingungen kultiviert, die entworfen waren, um die Expression jeder Kette temporär zu trennen, indem zuerst der phoA-Promotor induziert wurde, die Leichtkettentranskription kontrolliert, und dann zu einem späteren Zeitpunkt der tacII-Promotor induziert wurde, der die Schwerkettentranskription kontrolliert.

[0176] Nicht-reduzierte Ganzzelllysate aus induzierten Kulturen wurden wie folgt hergestellt: (1) 1 ml OD₆₀₀-Pellets wurden in einem Mikrozentrifugenröhrchen zentrifugiert; (2) jedes Pellet wurde in 90 µl TE resuspendiert (10 mM Tris, pH 7,6, 1 mM EDTA); (3) 10 µl von 100 mM Iodessigsäure (Sigma I-2512) wurden zu jeder Probe hinzugefügt, um jedes freie Cystein zu blockieren und Disulfidshuffling zu vermeiden; (4) 20 µl von 10% SDS wurden zu jeder Probe hinzugefügt. Die Proben wurden verwirbelt, auf etwa 90°C ~3 Minuten lang aufgeheizt und dann wieder verwirbelt. Nachdem die Proben auf Raumtemperatur abgekühlt worden waren, wurden ~750 µl Aceton hinzugefügt, um das Protein zu präzipitieren. Die Proben wurden verwirbelt und bei Raumtemperatur etwa 15 min lang stehen gelassen. Nach 5-minütiger Zentrifugation in einer Mikrozentrifuge wurde der Überstand jeder Probe abgesaugt und jedes Proteinpellet in 50 µl dH₂O + 50 µl 2 × NOVEX-Probenpuffer resuspendiert. Die Proben werden dann ~3–5 Minuten bei etwa 90°C erhitzt, gut verwirbelt und auf Raumtemperatur abkühlen gelassen. Eine 5-minütige Endzentrifugation wurde dann durchgeführt, und die Überstände wurden dann transferiert, um Röhrchen zu reinigen.

[0177] Reduzierte Proben wurden durch die folgenden Schritte hergestellt, die jenen, die oben für nicht-reduzierte Proben beschrieben sind, ähneln, mit der Ausnahme, dass 10 µl 1 M DTT zur Zellresuspensionslösung in Schritt (2) hinzugefügt wurde und die Hinzufügung von IAA in Schritt (3) unterlassen wurde. Reduktionsmittel wurde ebenfalls auf eine Konzentration von 100 mM hinzugefügt, als das Proteinpräzipitat in 2 × Probenpuffer + dH₂O resuspendiert wurde.

[0178] Nach Formulierung wurden 5 µl jeder Probe auf ein 12% 1,0-mm-Tris-Glycin-SDS-PAG mit 10 Wells von NOVEX geladen und bei ~120 Volt 1,5–2 Stunden elektrophoresiert. Die resultierenden Gele wurden für Immunblotanalyse verwendet.

[0179] Für Immunblotanalyse wurden die SDS-PAGE-Gele auf Nitrocellulosemembranen (NOVEX) elektrogeblottet. Die Membranen wurden dann unter Verwendung einer Lösung von 1 × NET (150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM Tris, pH 7,4, 0,05% Triton X-100) + 0,5% Gelatine unter Schütteln bei Raumtemperatur für etwa 30 min–1 Stunde blockiert. Nach dem Blockadeschritt wurden die Membranen in eine Lösung von 1 × NET + 0,5% Gelatine + Anti-Fab-Antikörper (Peroxidase-konjugierte Ziegen-IgG-Fraktion gegen menschliches IgG-Fab; CAPPEL Nr. 55223) für nicht-reduzierte Proben oder 1 × NET + 0,5% Gelatine + Anti-Fab-Antikörper + Anti-Fc-Antikörper (Jackson Immuno Research Labs Nr. 109-035-008) für reduzierte Proben platziert. Die Anti-Fab-Antikörperverdünnung reichte von 1:50.000 bis 1:1.000.000, abhängig von der Charge von Antikörper, und der Anti-Fc-Antikörper wurde 1:1.000.000 verdünnt. Die Membranen wurden in der Antikörperlösung über Nacht bei Raumtemperatur unter Rütteln stehen gelassen. Am nächsten Morgen wurden die Membranen mindestens 3 × 10 Minuten in 1 × NET + 0,5% Gelatine und dann 1 × 15 Minuten in TBS (20 mM Tris, pH 7,5, 500 mM NaCl) gewaschen. Die Proteinbanden, die durch den Antikörper gebunden wurden, wurden durch die Verwendung von Amersham-Pharmacia-Biotech-ECL-Detektion und Exposition der Membran gegenüber einem Röntgenfilm sichtbar gemacht.

Ergebnisse

[0180] Plasmide zur Herstellung von Antigewebefaktor-IgG1, paTF130 und pxTF-7T3FL, wurden hergestellt, in Stamm 33D3 transformiert und wie oben beschrieben induziert. Nicht-reduzierte und reduzierte Ganzzelllysatsproben wurden dann hergestellt und durch Immunoblot analysiert. Die Ergebnisse sind in den **Fig. 11A** und **Fig. 11B** dargestellt. Unter Verwendung von TIRs von 7 für Leichtkette und 3 für Schwerkette führt eine gleichzeitige Induktion der Promotoren, die diese Gene kontrollieren, zu einer sekretorischen Blockierung, wie durch die reduzierte Probe für paTF130 gezeigt wird (**Fig. 11A**). Die Akkumulation sowohl von Schwer- als auch Leichtkettenvorläufern ist in dieser Spur klar offensichtlich. Sehr wenig reife Leichtkette und reife Schwerkette

wird detektiert, und die Mehrheit des Proteins akkumuliert als Vorläufer. Jedoch wird, sobald die Expression von Schwer- und Leichtkette temporär getrennt wird, wie in pxTF-7T3FL, eine signifikante Menge an reifer Leichtkette akkumuliert (**Fig. 11A**). Obwohl eine geringe Menge von Leichtkettenvorläufer in dieser Probe immer noch detektiert wird, scheint dieses Ausmaß keine Probleme für Leichtketten oder Schwerekettensekretion zu verursachen. Zusätzlich dazu führt temporäre Expression zur wirkungsvollen Sekretion von reifen Schwereketten auf ein signifikantes größeres Ausmaß als jenes, das mit paTF130 erreicht wird, mit keinem Beweis für die Akkumulation von Vorläufern.

[0181] Die Korrelation der wirkungsvollen Sekretion mit Anordnung des Volllängenantikörpers wird durch nicht-reduzierte Proben dargestellt (**Fig. 11B**). Volllängenantikörper wird in beiden Proben detektiert, jedoch variiert die Menge dramatisch. Wie der Pfeil zeigt, wird nur eine schwache Volllängenbande in der paTF130-Probe detektiert. Diese Bande wird in der pxTF-7T3FL-Probe viel markanter.

Beispiel 3. Herstellung von Antigewebefaktor-F(ab')₂

[0182] In diesem Beispiel wurde ein Einzelpromotorplasmid, pCYC56, als Kontrolle verwendet. pCYC56 ist strukturell zu pS1130 analog, mit Ausnahme davon, dass die Insertsequenz für die Leichtketten- und Schwerekettenfragmente eines Anti-Gewebefaktor-Antikörpers kodiert. Ein Dualpromotorplasmid, pxTF-7T3, wurde ähnlich dem Dualpromotorplasmid pXCD18-7T3 aus Beispiel 1 hergestellt und dazu verwendet, eine temporäre Trennung der Anti-Gewebefaktor-Leichtketten- und -Schwerekettenexpression zu ermöglichen. Die lacI-Sequenz aus dem Plasmid pMS421 wurde auch in pxTF-7T3 inkorporiert, um einen neuen Dualpromotor pJVG3IL herzustellen. Die Hinzufügung von lacI erübrigt den Bedarf an Co-Expression mit pMS421.

[0183] Der Wirtstamm, der in diesen Fermentationen verwendet wurde, war ein Derivat von E. coli W3110, das 60H4 genannt wurde. Der vollständige Genotyp von 60H4 ist: W3110 ΔfhuAΔmanA phoAΔE15 Δ(argF-lac)169 deoC2 degP41 (ΔpstI-Kan^r) IN(rrnD-rrnE) 1 ilvG2096 (Val^r) Δprc prc-Suppressor. Die 60H4-Wirtszellen wurden entweder mit pCYC56, pJVG3IL oder der Kombination von pxTF-7T3 und pMS421 transformiert, und erfolgreiche Transformanten wurden ausgewählt und in Kultur gezüchtet.

[0184] Fermentationen wurden unter Bedingungen laufen gelassen, die den für Anti-CD18-F(ab')₂ wie in Beispiel 1 beschriebenen ähnelten, mit der hauptsächlichen Ausnahme, dass die Laufzeit zwischen etwa 72 und 114 Stunden variierte und Schwerkette unter Verwendung von IPTG von etwa 4 bis 12 Stunden nach Erreichung einer Kultur-OD₅₅₀ von 220 induziert wurde.

[0185] Der Protein-G-Test, der für Anti-CD18-F(ab')₂ verwendet wurde, wurde auch verwendet, um die Anti-Gewebefaktor-F(ab')₂-Produkte zu analysieren, mit der Ausnahme, dass ein Anti-Gewebefaktor-F(ab')₂-Standard verwendet wurde, um die Standardkurve herzustellen.

[0186] Eine Reihe von Anti-Gewebefaktor-F(ab')₂-Fermentationsläufen wurde unter Verwendung des Promotorsystems, das oben beschrieben wurde, durchgeführt. Die Ausbeuten des angeordneten Anti-Gewebefaktor-F(ab')₂-Komplexes stieg von 1 g/l mit dem Einzelpromotorsystem auf 2,6 ± 0,3 g/l (n = 13) unter Verwendung des Dualpromotorsystems mit pJVG3IL.

[0187] Daher zeigen die Ergebnisse, dass durch temporäre Trennung der Leicht- und Schwerekettensynthese eine signifikant gesteigerte Ausbeute von angeordnetem Anti-Gewebefaktor-F(ab')₂ erhalten wurde.

SEQUENZPROTOKOLL

<110> GENENTECH, INC. 602 24 291.6-08

<120> System zur Antikörperexpression und -Anordnung

<130> SJK/FP6202527

<140> EP 02763536.6

<141> 26.8.2002

<150> PCT/US02/27220

<151> 26.8.2002

<150> US 60/315.209

<151> 27.8.2001

<160> 6

<210> 1

<211> 237

<212> PRT

<213> künstliche Sequenz

<220>

<221> Quelle

<223> /Anm.: „Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisch“

<400> 1

Met	Lys	Lys	Asn	Ile	Ala	Phe	Leu	Leu	Ala	Ser	Met	Phe	Val	Phe
1				5					10					15

Ser	Ile	Ala	Thr	Asn	Ala	Tyr	Ala	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser
				20					25					30

Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr
				35					40					45

Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Asp	Ile	Asn	Asn	Tyr	Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln
				50					55					60

Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Tyr	Thr	Ser
				65					70					75

Thr	Leu	His	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	80	85	90
Gly	Thr	Asp	Tyr	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	95	100	105
Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Gly	Asn	Thr	Leu	Pro	Pro	Thr	110	115	120
Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	125	130	135
Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	140	145	150
Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	155	160	165
Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	170	175	180
Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	185	190	195
Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	200	205	210
Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	215	220	225
Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys				230	235	

<210> 2

<211> 300

<212> PRT

<213> künstliche Sequenz

<220>

<221> Quelle

<223> /Anm.: „Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisch“

<400> 2

Met	Lys	Lys	Asn	Ile	Ala	Phe	Leu	Leu	Ala	Ser	Met	Phe	Val	Phe	1	5	10	15
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	---	---	----	----

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

Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr
				245					250					255
Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Arg	Met	Lys
				260					265					270
Gln	Leu	Glu	Asp	Lys	Val	Glu	Glu	Leu	Leu	Ser	Lys	Asn	Tyr	His
				275					280					285
Leu	Glu	Asn	Glu	Val	Ala	Arg	Leu	Lys	Lys	Leu	Val	Gly	Glu	Arg
				290					295					300

<210> 3

<211> 2700

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<221> Quelle

<223> /Anm.: „Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisch“

<400> 3

```

gaattcaact tctccatact ttggataagg aaatacagac atgaaaaatc 50
tcattgctga gttgttattt aagcttgccc aaaaagaaga agagtcgaat 100
gaactgtgtg cgcaggtaga agctttggag attatcgtea ctgcaatget 150
tcgcaatatg gcgcaaaatg accaacagcg gttgattgat caggtagagg 200
gggcgctgta cgaggtaaag cccgatgcca gcattcctga cgacgatacg 250
gagctgctgc gcgattacgt aaagaagtta ttgaagcatc ctcgtcagta 300
aaaagttaat cttttcaaca gctgtcataa agttgtcacg gccgagactt 350
atagtcgctt tgtttttatt ttttaatgta tttgtaacta gtacgcaagt 400
tcacgtaaaa agggtatcta gaattatgaa aaagaatata gcatttcttc 450
ttgcatctat gttcgttttt tctattgcta caaacgcgta cgctgatata 500
cagatgaccc agtccccgag ctccctgtcc gcctctgtgg gcgatagggt 550
caccatcacc tgtcgtgcca gtcaggacat caacaattat ctgaactggt 600

```

atcaacagaa accaggaaaa gctccgaaac tactgattta ctatacctcc 650
 accctccact ctggagtcce ttctcgcttc tctggttctg gttctgggac 700
 ggattacact ctgaccatca gcagtctgca accggaggac ttcgcaactt 750
 attactgtca gcaaggtaat actctgccgc cgacgttcgg acagggcacg 800
 aaggtggaga tcaaacgaac tgtggctgca ccatctgtct tcattctccc 850
 gccatctgat gagcagttga aatctggaac tgctctgttt gtgtgcctgc 900
 tgaataactt ctatcccaga gaggccaaaag tacagtggaa ggtggataac 950
 gccctccaat cgggtaactc ccaggagagt gtcacagagc aggacagcaa 1000
 ggacagcacc tacagcctca gcagcaccct gacgctgagc aaagcagact 1050
 acgagaaaca caaagtctac gcctgcgaag tcacccatca gggcctgagc 1100
 tcgcccgtca caaagagctt caacagggga gagtgttaat taaatcctct 1150
 acgccggagc catcgtggcg agctcggtag ccggggatct aggcctaacg 1200
 ctcggttgcc gccgggcgtt ttttattgtt gccgacgcgc atctcgactg 1250
 cacggtgcac caatgcttct ggcgtcaggc agccatcgga agctgtggta 1300
 tggctgtgca ggtcgtaaat cactgcataa ttcgtgtcgc tcaaggcgca 1350
 ctcccgttct ggataatgtt ttttgcgccg acatcataac ggttctggca 1400
 aatattctga aatgagctgt tgacaattaa tcatcgaact agtttaaatgt 1450
 gtggaattgt gagcggataa caattaagct taggatctag aattatgaag 1500
 aagaatattg cgttctact tgctctatg tttgtctttt ctatagctac 1550
 aaacgcgtac gctgaggttc agctgggtgga gtctggcggg ggcctggtgc 1600
 agccaggggg ctactccgt ttgtcctgtg caacttctgg ctacaccttt 1650
 accgaatata ctatgcactg gatgcgtcag gccccgggta agggcctgga 1700
 atgggttgca gggattaatc ctaaaaacgg tggtagcagc cacaaccaga 1750

ggttcatgga ccgtttcact ataagcgtag ataaatccac cagtacagcc 1800
tacatgcaaa tgaacagcct gcgtgctgag gacactgccg tctattattg 1850
tgctagatgg cgaggcctga actacggctt tgacgtccgt tattttgacg 1900
tctgggggtca aggaaccctg gtcaccgtct cctcggcctc caccaagggc 1950
ccatcggtct tccccctggc accctcctcc aagagcacct ctggggggcac 2000
agcgggccctg ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa ccggtgacgg 2050
tgtcgtggaa ctcaggcgcc ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccggct 2100
gtcctacagt cctcaggact ctactccctc agcagcgtag tgaccgtgcc 2150
ctccagcagc ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg aatcacaagc 2200
ccagcaacac caaggtcgac aagaaagttg agcccaaata ttgtgacaaa 2250
actcacacat gcccgccgtg ccagcacca gaactgctgg gcggccgcat 2300
gaaacagcta gaggacaagg tcgaagagct actctccaag aactaccacc 2350
tagagaatga agtggcaaga ctcaaaaagc ttgtcgggga gcgctaagca 2400
tgcgacggcc ctagagtccc taacgctcgg ttgccgccgg gcgtttttta 2450
ttgttaactc atgtttgaca gcttatcatc gataagcttt aatgcggtag 2500
tttatcacag ttaaattgct aacgcagtca ggcaccgtgt atgaaatcta 2550
acaatgcgct catcgtcac ctcggcaccg tcaccctgga tgctgtaggc 2600
ataggcttgg ttatgccggg actgccgggc ctcttgccgg atatcgcca 2650
ttccgacagc atcgccagtc actatggcgt gctgctagcg ctatatgcgt 2700

<210> 4
 <211> 237
 <212> PRT
 <213> künstliche Sequenz

<220>
 <221> Quelle
 <223> /Anm.: „Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisch“

<400> 4

```

Met Lys Lys Asn Ile Ala Phe Leu Leu Ala Ser Met Phe Val Phe
  1             5             10             15

Ser Ile Ala Thr Asn Ala Tyr Ala Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser
             20             25             30

Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr
             35             40             45

Cys Arg Ala Ser Arg Asp Ile Lys Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln
             50             55             60

Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile Tyr Tyr Ala Thr
             65             70             75

Ser Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser
             80             85             90

Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp
             95             100            105

Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Gly Glu Ser Pro Trp Thr
             110            115            120

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
             125            130            135

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
             140            145            150

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
             155            160            165

Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
             170            175            180

```

Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr		
	185	190 195

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu		
	200	205 210

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser		
	215	220 225

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
	230	235

<210> 5

<211> 470

<212> PRT

<213> künstliche Sequenz

<220>

<221> Quelle

<223> /Anm.: „Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisch“

<400> 5

Met Lys Lys Asn Ile Ala Phe Leu Leu Ala Ser Met Phe Val Phe		
1	5	10 15

Ser Ile Ala Thr Asn Ala Tyr Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser		
	20	25 30

Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys		
	35	40 45

Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Glu Tyr Tyr Met His Trp Val		
	50	55 60

Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Leu Ile Asp		
	65	70 75

Pro Glu Gln Gly Asn Thr Ile Tyr Asp Pro Lys Phe Gln Asp Arg		
	80	85 90

Ala Thr Ile Ser Ala Asp Asn Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln		
	95	100 105

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala		
	110	115 120

Arg Asp Thr Ala Ala Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu	125	130	135
Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro	140	145	150
Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu	155	160	165
Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser	170	175	180
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala	185	190	195
Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr	200	205	210
Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val	215	220	225
Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro	230	235	240
Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro	245	250	255
Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro	260	265	270
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val	275	280	285
Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp	290	295	300
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg	305	310	315
Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr	320	325	330
Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys	335	340	345

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 350 355 360
 Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 365 370 375
 Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 380 385 390
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 395 400 405
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 410 415 420
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 425 430 435
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 440 445 450
 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 455 460 465
 Leu Ser Pro Gly Lys
 470

<210> 6

<211> 3100

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<221> Quelle

<223> /Anm.: „Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisch“

<400> 6

gaattcaact tctccatact ttggataagg aaatacagac atgaaaaatc 50

tcattgctga gttgttatctt aagcttgccc aaaaagaaga agagtcgaat 100

gaactgtgtg cgcaggtaga agctttggag attatcgtca ctgcaatgct 150

tcgcaatatg gcgcaaaatg accaacagcg gttgattgat caggtagagg 200

gggcgctgta cgaggtaaag cccgatgccg gcattcctga cgacgatacg 250

gagctgctgc gcgattacgt aaagaagtta ttgaagcatc ctcgtcagta 300
 aaaagttaat cttttcaaca gctgtcataa agttgtcacg gccgagactt 350
 atagtcgctt tgtttttatt ttttaatgta tttgtaacta gtacgcaagt 400
 tcacgtaaaa agggatatcta gaattatgaa aaagaatata gcatttcttc 450
 ttgcatctat gttcgttttt tctattgcta caaacgcgta cgctgatata 500
 cagatgaccc agtccccgag ctccctgtcc gcctctgtgg gcgatagggt 550
 caccatcacc tgcagagcca gtcgcgacat caagagctat ctgaactgg 600
 atcaacagaa accaggaaaa gctccgaaag tactgattta ctatgctact 650
 agtctcgctg aaggagtccc ttctcgcttc tctggatccg gttctgggac 700
 ggattacact ctgaccatca gcagtctgca gccagaagac ttcgcaactt 750
 attactgtct tcagcacgga gagtctccat ggacatttgg acagggtacc 800
 aagggtggaga tcaaacgaac tgtggctgca ccactctgtct tcattctccc 850
 gccatctgat gaggcagttga aatctggaac tgcttctgtt gtgtgcctgc 900
 tgaataactt ctatcccaga gaggccaaag tacagtggaa ggtggataac 950
 gccctccaat cgggtaactc ccaggagagt gtcacagagc aggacagcaa 1000
 ggacagcacc tacagcctca gcagcaccct gacgctgagc aaagcagact 1050
 acgagaaaca caaagtctac gcctgcgaag tcacccatca gggcctgagc 1100
 tcgcccgtca caaagagctt caacagggga gagtgttaat taaatcctct 1150
 acgccggacg catcgtggcg agctcggtag ccggggatct aggcctaacg 1200
 ctcggttgcc gccgggcgtt ttttattggt gccgacgcgc atctcgactg 1250
 cacggtgcac caatgcttct ggcgtcaggc agccatcgga agctgtggta 1300
 tggctgtgca ggctgtaaata cactgcataa ttcgtgtcgc tcaaggcgca 1350
 ctcccgttct ggataatgtt ttttgcgccg acatcataac ggttctggca 1400

aatattctga aatgagctgt tgacaattaa tcategaact agtttaatgt 1450
gtggaattgt gagcggataa caattaagct taggatctag aattatgaag 1500
aagaatattg cgttcctact tgcctctatg tttgtctttt ctatagctac 1550
aaacgcgtac gctgaggttc agctggtgga gtctggcggg ggccctggtgc 1600
agccaggggg ctcactccgt ttgtcctgtg cagcttctgg cttcaatatt 1650
aaggagtact acatgcactg ggcccgctcag gccccgggta agggcctgga 1700
atggggttga ttgattgac cagagcaagg caacacgac tatgacccga 1750
agttccagga ccgtgccact ataagcgtg acaattccaa aaacacagca 1800
tacctgcaga tgaacagcct gcgtgctgag gacactgccg tctattattg 1850
tgctcgagac acggccgctt acttcgacta ctgggggtcaa ggaaccctgg 1900
tcaccgtctc ctccggcctcc accaagggcc catcgggtctt cccctggca 1950
ccctcctcca agagcacctc tgggggcaca gcggccctgg gctgcctggt 2000
caaggactac ttccccgaac cgggtgacggg gtcgtggaac tcaggcgccc 2050
tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggtg tctacagtc ctcaggactc 2100
tactcctca gcagcgtggg gactgtgccc tctagcagct tgggcacca 2150
gacctacatc tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca 2200
agaaagtga gcccaaatct tgtgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc 2250
ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca gtcttcctct tcccccaaa 2300
accaaggac accctcatga tctcccgac ccctgaggtc acatgcgtgg 2350
tggtggacgt gagccacgaa gacctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg 2400
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta 2450
caacagcacg taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact 2500
ggctgaatgg caaggagtac aagtgcagg tctccaacaa agccctccca 2550

```

gcccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc aaagggcagc cccgagaacc 2600
acaggtgtac accctgcccc catcccgga agagatgacc aagaaccagg 2650
tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg 2700
gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc 2750
cgtgctggac tccgacggct cttcttctct ctacagcaag ctcaccgtgg 2800
acaagagcag gtggcagcag gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat 2850
gaggctctgc acaaccacta cagcagaag agcctctccc tgtctccggg 2900
taaataagca tgcgacggcc cttagatccc taacgctcgg ttgccgccgg 2950
gcgtttttta ttgttaactc atgtttgaca gcttatcatc gataagcttt 3000
aatgcggtag tttatcacag ttaaattgct aacgcagtca ggcaccgtgt 3050
atgaaatcta acaatgcgt catcgctcct ctcggcaccg tcaccctgga 3100

```

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung eines funktionellen Antikörpers oder Fragments davon in einer Wirtszelle, die mit zwei separaten Translationseinheiten transformiert ist, die für die Leicht- bzw. Schwerketten des Antikörpers oder Fragments davon kodieren, umfassend folgende Schritte: a) das Züchten der Wirtszelle unter geeigneten Bedingungen, worin die zwei separaten Translationseinheiten von unterschiedlichen Promotoren gesteuert werden, so dass die Leichtkette und die Schwerkette auf eine sequentielle Art und Weise exprimiert werden, wodurch die Herstellung der Leicht- und Schwerketten temporär getrennt wird; sowie b) das Ermöglichen der Anordnung der Leicht- und Schwerketten, um den funktionellen Antikörper oder ein Fragment davon zu bilden.

2. Verfahren nach Anspruch 1, worin die Wirtszelle prokaryotisch ist, wobei jede Translationseinheit weiters eine Nucleotidsequenz umfasst, die für ein prokaryotisches Sekretionssignal oder eine Variante davon kodiert, das/die operabel an den N'-Terminus der Leicht- oder Schwerkette gebunden ist.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, worin sich die zwei Translationseinheiten auf einem einzelnen rekombinanten Vektor befinden.

4. System zur sequentiellen Expression einer Leichtkette und einer Schwerkette eines Antikörpers oder eines Fragments davon, umfassend eine Wirtszelle, die mit einem rekombinanten Vektor transformiert ist, wobei der Vektor zwei separate Translationseinheiten umfasst, die für die Leichtkette bzw. die Schwerkette kodieren, wobei jede Translationseinheit operabel an einen anderen Promotor gebunden ist, worin die Aktivierung der zwei Translationseinheiten unter geeigneten Bedingungen temporär getrennt wird, wodurch die sequentielle Expression der Leichtkette und der Schwerkette ermöglicht wird.

5. System nach Anspruch 4, worin die Wirtszelle prokaryotisch ist, worin jede Translationseinheit weiters eine Nucleotidsequenz umfasst, die für ein prokaryotisches Sekretionssignal kodiert, das operabel an das 5'-Ende der Nucleinsäure gebunden ist, die für die Leicht- oder die Schwerkette kodiert.

6. Verfahren oder System nach den Ansprüchen 2 oder 5, worin das Sekretionssignal aus der aus STII, OmpA, PhoE, LamB, MBP und PhoA bestehenden Gruppe ausgewählt ist.

7. Verfahren oder System nach Anspruch 6, worin das Sekretionssignal STII oder eine Variante davon ist.

8. Verfahren oder System nach Anspruch 7, worin zwei STII-Varianten jeweils in den zwei Translationseinheiten verwendet werden, um eine Translationsstärkekombination von etwa 7-Leicht, 3-Schwer bereitzustellen.

9. Verfahren oder System nach einem der vorangegangenen Ansprüche, worin jede Translationseinheit operabel an einen anderen Promotor gebunden ist, worin zumindest einer der Promotoren induzierbar ist.

10. Verfahren oder System nach einem der vorangegangenen Ansprüche, worin jede Translationseinheit operabel an einen anderen induzierbaren Promotor gebunden ist.

11. Verfahren oder System nach Anspruch 9 oder 10, worin der induzierbare Promotor aus der aus phoA-, TacI-, TacII-, lpp-, lac-lpp-, lac-, ara-, trp-, trc- und T7-Promotoren bestehenden Gruppe ausgewählt ist.

12. Verfahren oder System nach Anspruch 11, worin ein Promotor der phoA-Promotor ist und der andere Promotor der TacII-Promotor ist.

13. Verfahren oder System nach einem der vorangegangenen Ansprüche, worin das Antikörper-Fragment aus der aus Fab, Fab', F(ab')₂, F(ab')₂-Leucin-Zipper, Fv und dsFv bestehenden Gruppe ausgewählt ist.

14. Verfahren oder System nach einem der vorangegangenen Ansprüche, worin der Antikörper für ein Antigen spezifisch ist, das aus der aus VEGF, IgE, CD11, CD18 und Gewebefaktor (TF) bestehenden Gruppe ausgewählt ist.

15. Verfahren oder System nach Anspruch 14, worin der Antikörper ein Anti-CD18-Antikörper oder ein Anti-Gewebefaktor-Antikörper ist.

16. Verfahren oder System nach einem der vorangegangenen Ansprüche, worin der Antikörper ein chimärer Antikörper, ein humanisierter Antikörper oder ein menschlicher Antikörper ist.

17. Verfahren oder System nach einem der vorangegangenen Ansprüche, worin die Wirtszelle eine prokaryotische Zelle aus einem E.-coli-Stamm ist.

18. Verfahren oder System nach Anspruch 17, worin:

- (a) der E.-coli-Stamm gentechnisch verändert ist, um zumindest ein Chaperon-Protein überzuexprimieren, das aus der aus DsbA, DsbC, DsbG und FkpAI bestehenden Gruppe ausgewählt ist; oder
- (b) der E.-coli-Stamm bezüglich endogener Protease-Aktivitäten defizient ist; oder
- (c) der Genotyp des E.-coli-Stamms Δprc-prc-Suppressor enthält.

19. Verfahren oder System nach einem der vorangegangenen Ansprüche, worin die Schwerekette des Antikörpers eine voller Länge ist.

20. Verfahren oder System nach Anspruch 19, worin die Leichtkette zuerst exprimiert wird und die Schwerekette voller Länge anschließend exprimiert wird.

21. Rekombinanter Vektor zur Herstellung eines funktionellen Antikörpers oder Fragments davon in einer Wirtszelle, wobei der Vektor Folgendes umfasst: a) einen ersten Promotor, der einer ersten Translationseinheit vorausgeht, die für ein Sekretionssignal kodiert, das operabel an eine Leichtkette gebunden ist, und b) einen zweiten Promotor, der einer zweiten Translationseinheit vorausgeht, die für ein Sekretionssignal kodiert, das operabel an eine Schwerekette gebunden ist, wobei der erste und der zweite Promotor unter unterschiedlichen Bedingungen induzierbar sind.

22. Rekombinanter Vektor nach Anspruch 21, worin der erste und der zweite Promotor aus der aus phoA-, TacI-, TacII-, lpp-, lac-lpp-, lac-, ara-, trp-, trc- und T7-Promotoren bestehenden Gruppe ausgewählt ist.

23. Rekombinanter Vektor nach Anspruch 22, worin der erste Promotor der phoA-Promotor und der zweite Promotor der TacII-Promotor ist.

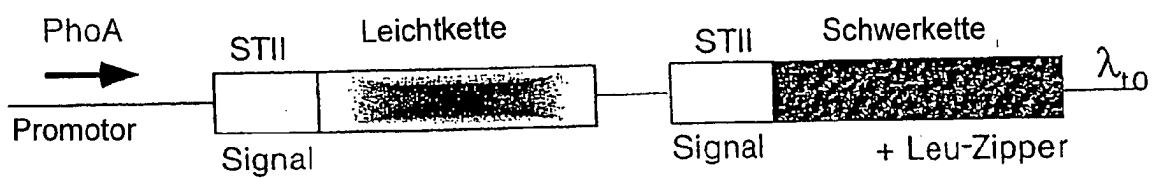
24. Rekombinanter Vektor nach Anspruch 21, worin das Sekretionssignal aus der aus STII, OmpA, PhoE, LamB, MBP und PhoA bestehenden Gruppe ausgewählt ist.

25. Rekombinanter Vektor nach Anspruch 24, worin es sich bei dem Sekretionssignal um ein STII oder eine Variante davon handelt.
26. Rekombinanter Vektor nach Anspruch 21, worin das Antikörper-Fragment aus der aus Fab, Fab', F(ab')₂, Fv und dsFv bestehenden Gruppe ausgewählt ist.
27. Rekombinanter Vektor nach Anspruch 26, worin das Antikörper-Fragment an eine Dimerisationsdomäne fusioniert ist.
28. Rekombinanter Vektor nach einem der Ansprüche 21 bis 27, worin der Antikörper für ein Antigen spezifisch ist, das aus der aus VEGF, IgE, CD11, CD18 und Gewebefaktor (TF) bestehenden Gruppe ausgewählt ist.
29. Rekombinanter Vektor nach Anspruch 28, worin der Antikörper ein Anti-CD18-Antikörper ist.
30. Rekombinanter Vektor nach Anspruch 29, worin der Antikörper eine Anti-CD18-F(ab')₂-Leucinzipper-Fusion ist.
31. Rekombinanter Vektor nach Anspruch 30, wobei der Antikörper eine Leichtkette der Seq.-ID Nr. 1 besitzt; oder der Antikörper eine Schwereketten der Seq.-ID Nr. 2 besitzt.
32. Rekombinanter Vektor nach Anspruch 30, wobei es sich um einen pxC_D18-7T3-Vektor handelt, der die Nucleinsäuresequenz der Seq.-ID Nr. 3 umfasst.
33. Rekombinanter Vektor nach Anspruch 28, worin der Antikörper ein Anti-TF-Antikörper ist.
34. Rekombinanter Vektor nach Anspruch 34, wobei der Antikörper eine Leichtkette der Seq.-ID Nr. 4 besitzt oder der Antikörper eine Schwereketten der Seq.-ID Nr. 5 besitzt.
35. Rekombinanter Vektor nach Anspruch 34, wobei es sich um einen pxTF-7T3FL-Vektor handelt, der die Nucleinsäuresequenz der Seq.-ID Nr. 6 umfasst.

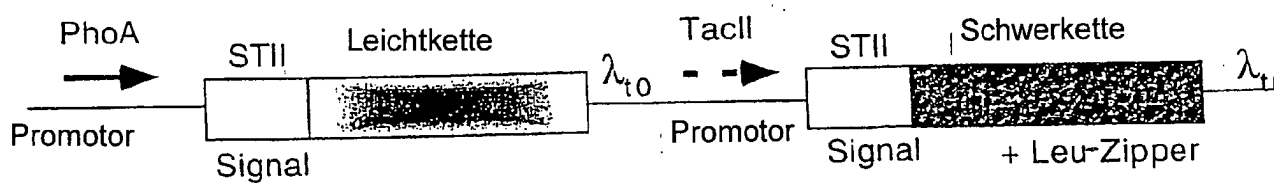
Es folgen 11 Blatt Zeichnungen

Fig.1. Schematische Darstellung der Anti-CD18-Fab'2- (-Leucinzipper-) Plasmide

pS1130



pxCD18-7T3



xCD18-7T3.DNA

GAATTCAACTTCTCCATACTTTGGATAAGGAAATACAGACATGAAAAATCTCATTGCTGA
 GTTGTATTATTAAGCTTGCCCAAAAGAAAGAGTCGAATGAACTGTGTGCGCAGGTTAGA
 AGCTTTGGAGATTATCGTCACTGCAATGCTTCGCAATATGGCGCAAAATGACCAACAGCG
 GTTGATTGATCAGGTAGAGGGGGCGCTGTACGAGGTAAAGCCGATGCCAGCATTCTTGA
 CGACGATACGGAGCTGCTGCGCGATTACGTAAAGAAGTTATTGAAGCATCTCGTCAGTA
 AAAAGTTAATCTTTTCAACAGCTGTCTATAAAGTTGTACGCGCGAGACTTATAGTCGCTT
 TGTTTTATTATTTTAAATGTATTGTAACTAGTACGCAAGTTACGTAATAAGGGTATCTA
 GAATTATGAAAAAGAAATATCGCATTTCTTCTTGCATCTATGTTCTGTTTCTTATTGCTA
 CAAACGCGTACGCTGATATCCAGATGACCCAGTCCCGAGCTCCCTGTCCGCTCTGTGG
 GCGATAGGGTCACCATCACCTGTGCTGCCAGTCAGGACATCAACAATTATCTGAAGTGGT
 ATCAACAGAAACCAGGAAAAGCTCCGAAACTACTGATTTACTATACCTCCACCTCCACT
 CTGGAGTCCCTTCTCGCTTCTCTGGTTCTGGTTCTGGGACGGATTACACTCTGACCATCA
 GCAGTCTGCAACCGGAGGACTTTCGCAACTTATTACTGTGAGCAAGGTAATACTCTGCCG
 CGACGTTCCGACAGGGCACGAAGGTGGAGATCAAACGAACGTGTGGCTGCACCATCTGTCT
 TCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAACTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCTGCTG
 TGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAAT
 CGGGTAATCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCA
 GCAGCACCTGACGCTGAGCAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCTGCGAAG
 TCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTAAAT
 TAAATCCTCTACGCCGGACGCATCGTGGCGAGCTCGGTACCCGGGATCTAGGCCCTAACG
 CTCGGTTGCCCGCGGGCGTTTATTGTTGCCGACGCGCATCTCGACTGCACGGTGCAC
 CAATGCTTCTGGCGTCAGGCAGCCATCGGAAGCTGTGGTATGGCTGTGACGGTCTGTAAT
 CACTGCATAATTCGTGTCGCTCAAGGCGCACTCCCGTTCTGGATAATGTTTTTGGCGCG
 ACATCATAACGGTTCTGGCAATATCTGAAATGAGCTGTGACAAATTAATCATCGAACT
 AGTTTAAATGTGTGAATTTGTGAGCGGATAACAATTAAGCTTAGGATCTAGAATTATGAAG
 AAGAATATTGCGTTCTACTTTGCCCTCTATGTTTGTCTTTTCTATAGCTACAAACGCGTAC
 GCTGAGGTTACGCTGGTGGAGTCTGGCGGTGGCTGGTGCAGCCAGGGGGCTCACTCCGT
 TTGTCTCTGTGCAACTTCTGGCTACACCTTTACCGAATACACTATGCACCTGGATGCGTCAG
 GCCCCGGGTAAGGGCCTGGAATGGGTTGCAGGGATTAACTCTAAAAACGGTGGTACCAGC
 CACAACCAGAGGTTCTATGGACCGTTTCACTATAAGCGTAGATAAATCCACAGTACAGCC
 TACATGCAAAATGAACAGCCTGCGTGTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCTAGATGG
 CGAGGCCTGAACTACGGCTTTGACGTCGGTTATTTTGACGCTGGGGTCAAGGAACCTG
 GTCACCGTCTCCTCGGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCC
 AAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAA
 CCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGT
 GTCTTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCTTCCAGCAGC
 TTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCAACAGCCAGCAACACCAAGGTCCGAC
 AAGAAAGTTGAGCCCCAAATCTTGTGACAAAACCTACACATGCCCGCGTGCACAGCACA
 GAACCTGCTGGGCGGCGCATGAAACAGCTAGAGGACAAGGTGGAAGAGCTACTCTCCAAG
 AACTACCACCTAGAGAATGAAGTGGCAAGACTCAAAAAGCTGTGCGGGAGCGCTAAGCA
 TGCGACGGCCCTAGAGTCCCTAACGCTCGGTTGCCGCGGGCGTTTTTTATTGTTAACTC
 ATGTTTGTACAGCTTATCATCGATAAGCTTTAATGCGGTAGTTTATCACAGTTAAATTGCT
 AACCGAGTCAGGCACCGTGTATGAAATCTAACAATGCGCTCATCGTCACTCTCGGCACCG
 TCACCTGGATGCTGTAGGCATAGGCTTGGTTATGCCGGTACTGCCGGGCTCTTGGCGG
 ATATCGTCCATTCCGACAGCATCGCCAGTCACTATGGCGTGTGCTAGCGCTATATGCGT

Fig. 2

xCD18-7T3 . Protein

STII-xCD18-Leichtkette

MKKNIAFLLASMFVFSIATNAYADIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDINNYLNWY
QQKPGKAPKLLIYYTSTLHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQGNTLP
PTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL
QSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE
C

STII-xCD18-Schwerkette

MKKNIAFLLASMFVFSIATNAYAEVOLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGYTFTEYTMHW
MRQAPGKGLEWVAGINPKNGGTSNQRFMDFRTISVDKSTSTAYMQMNSLRAEDTAVYY
CARWRGLNYGFDVRYFDVWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK
DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP
SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGRMKQLEDKVEELLISKNYHLENEVARLKK
LVGER

Fig. 3

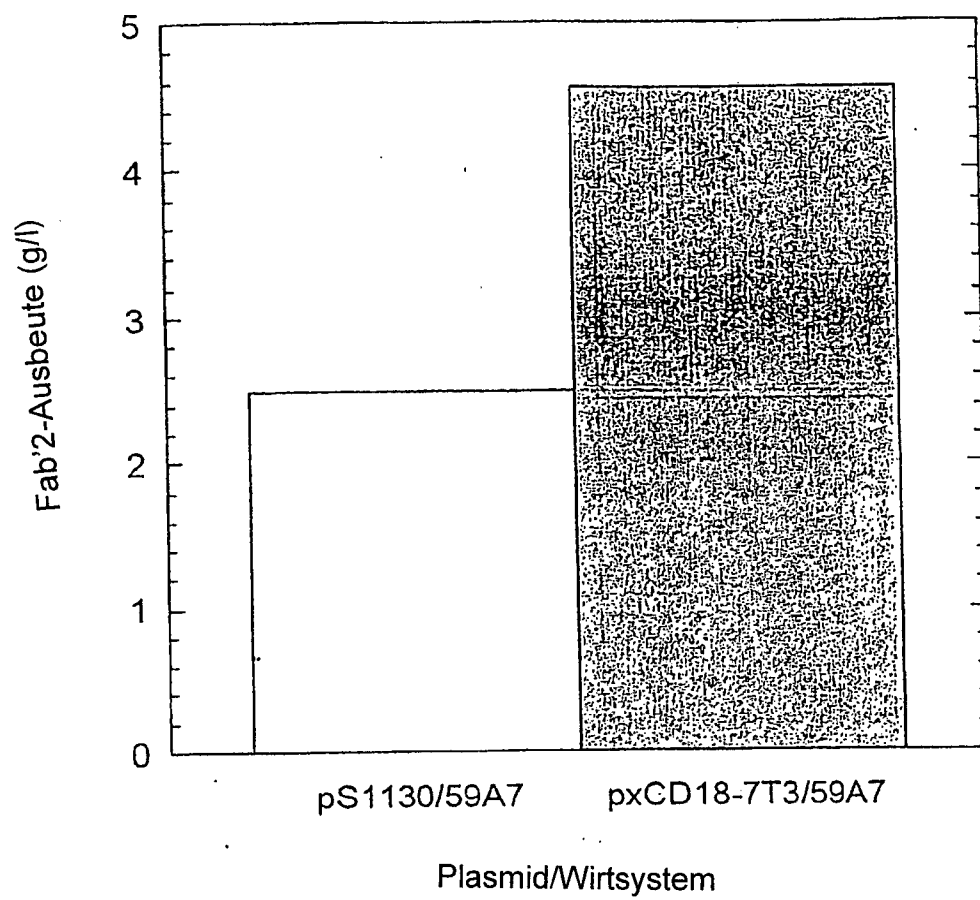


Fig. 4

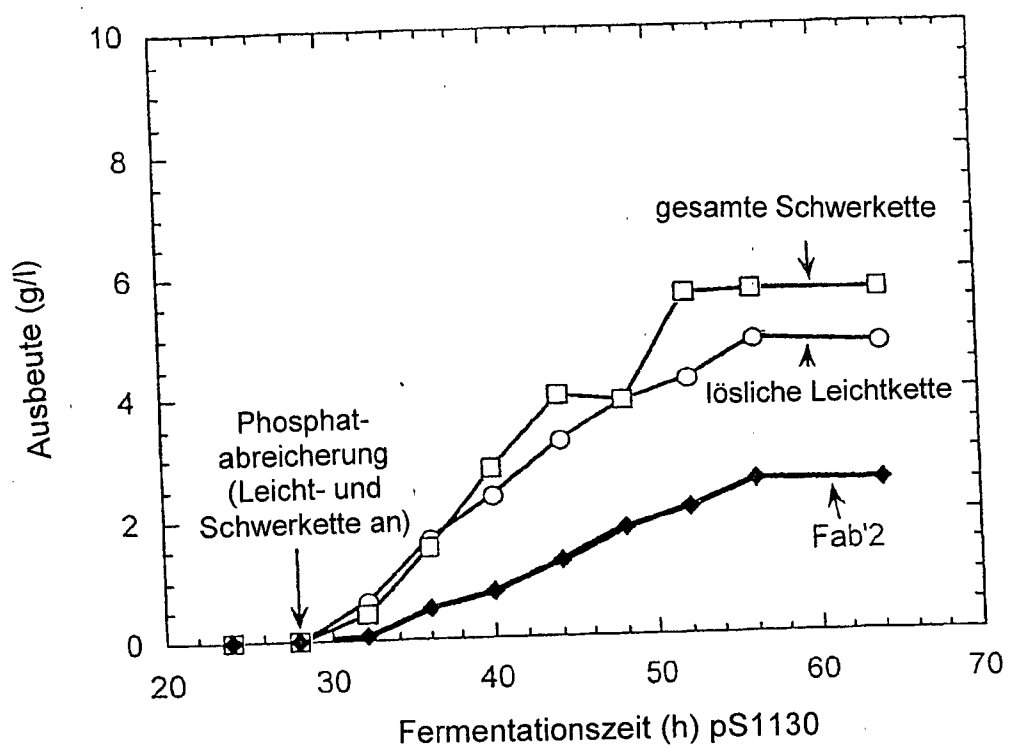


Fig. 5

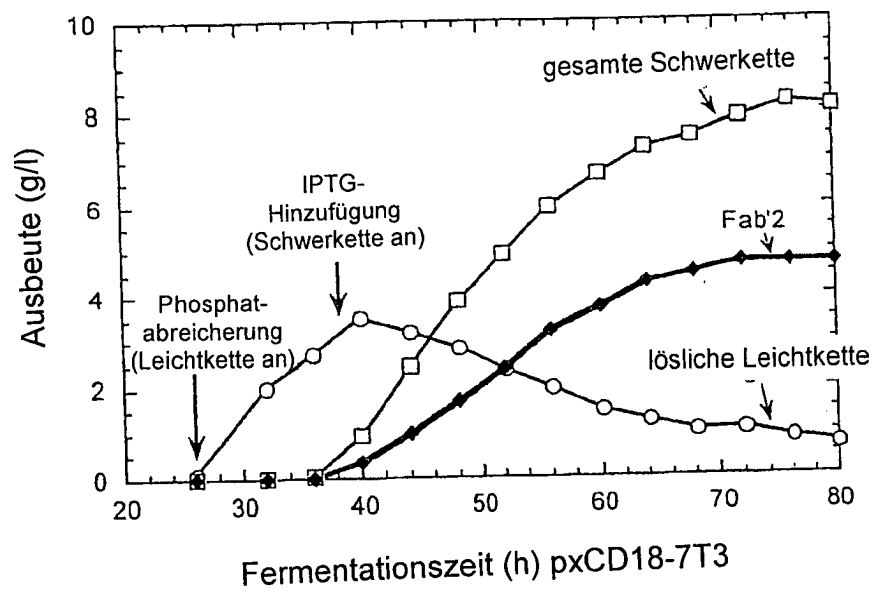


Fig. 6

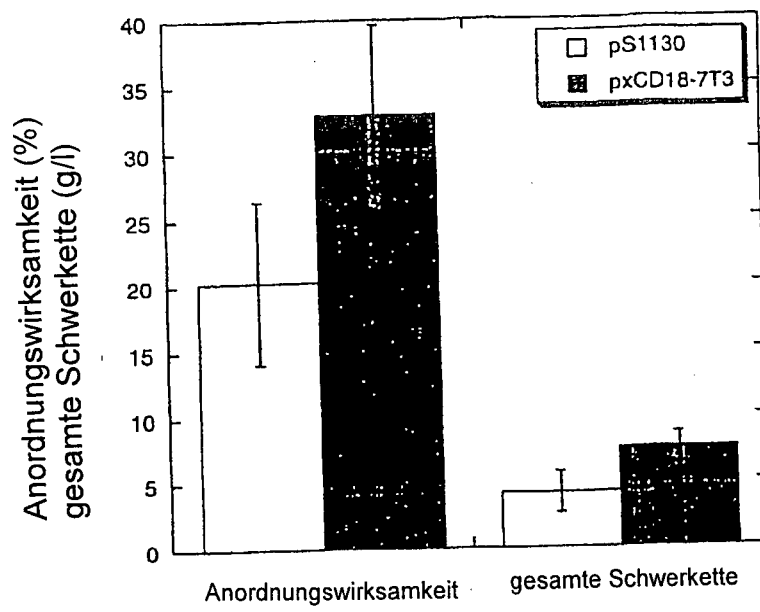
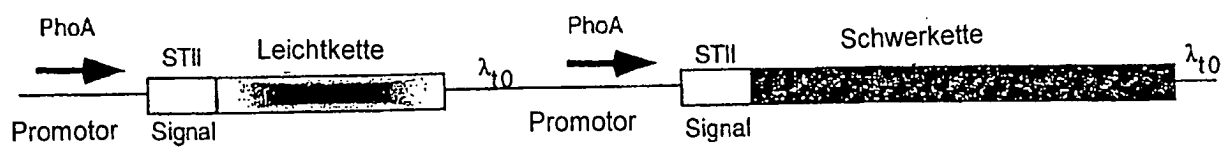


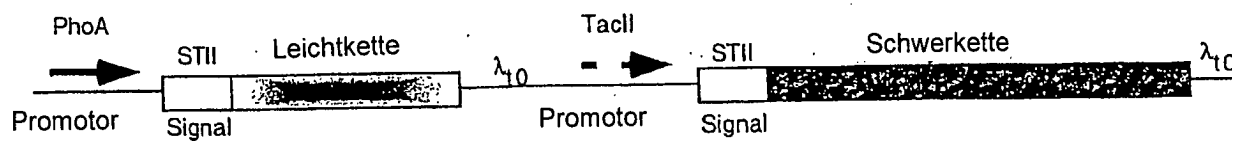
Fig. 7

Fig. 8 Schematische Darstellung der Anti-Gewebefaktor-IgG1-Plasmide

paTF130



pxTF-7T3FL



xTF-7T3FL.DNA

GAATTCAACTTCTCCATACCTTTGGATAAGGAAATACAGACATGAAAAATCTCATTGCTGA
 GTTGTATTATTAAGCTTGCCCAAAAAGAAGAAGAGTGAATGAAGTGTGTGCGCAGGTAGA
 AGCTTTGGAGATTATCGTCACTGCAATGCTTCGCAATATGGCGCAAAATGACCAACAGCG
 GTTGATTGATCAGGTAGAGGGGGCGCTGTACGAGGTAAAGCCCGATGCCAGCATTCCTGA
 CGACGATACGGAGCTGCTGCGCGATTACGTAAAGAAGTTATTGAAGCATCCTCGTCAGTA
 AAAAGTTAATCTTTTCAACAGCTGTCTATAAAGTTGTACGGCCGAGACTTATAGTCGCTT
 TGTTTTTATTTTTTAAATGTATTTGTAAC TAGTACGCAAGTTCACGTAAAAAGGGTATCTA
 GAATTATGAAAAAGAATATCGCATTTCTTCTTGCATCTATGTTCTGTTTTTCTATGTCTA
 CAAACGCGTACGCTGATATCCAGATGACCCAGTCCCGAGCTCCCTGTCCGCCCTGTGG
 GCGATAGGGTCACCATCACCTGCAGAGCCAGTCCGACATCAAGAGCTATCTGAACTGGT
 ATCAACAGAAACCAGGAAAAGCTCCGAAAGTACTGATTTACTATGCTACTAGTCTCGCTG
 AAGGAGTCCCTTCTCGCTTCTCTGGATCCGGTTCGGGACGGATTACACTCTGACCATCA
 CGAGTCTGCAGCCAGAAGACTTCGCAACTTATTACTGTCTTCAGCACGGAGAGTCTCCAT
 GGACATTTGGACAGGGTACCAAGGTGGAGATCAAACGAAGTGTGGCTGCACCATCTGTCT
 TCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGTCTGTGTGTGCGCTGC
 TGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAAT
 CGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCCTCA
 GCAGCACGCTGACGCTGAGCAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAG
 TCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTAAAT
 TAAATCCTCTACGCCGAGCGCATCGTGGCGAGCTCGGTACCCGGGGATCTAGGCCTAACG
 CTCGGTTGCCCGCGGGCGTTTTTTTATTGTTGCCGACGCGCATCTCGACTGCACGGTGCAC
 CAATGCTTCTGGCGTCAAGCAGCCATCGGAAGCTGTGGTATGGCTGTGCAGGTGCTAAAT
 CACTGCATAATTCGTGTGCTCAAGGCGCACTCCCGTCTGGATAATGTTTTTTCGCCCG
 ACATCATAACGGTCTTGGCAATATCTGAAATGAGCTGTGACAATTAATCATCGAACT
 AGTTTAAATGTGTGAATTTGTGAGCGGATAACAATTAAGCTTAGGATCTAGAATTATGAAG
 AAGAATATTGCGTTCTTACTTGCCTCTATGTTTGTCTTTTCTATAGCTACAAACGCGTAC
 GCTGAGGTTCACTGCTGGTGGAGTCTGGCGGTGGCCTGGTGCAGCCAGGGGGCTCACTCCGT
 TTGTCTGTGCACTTCTGGCTTCAATATTAAGGAGTACTACATGCACTGGGTCCGTCAG
 GCGCCGGGTAAAGGCGCTGGAATGGGTGGATTGATTGATCCAGAGCAAGGCAACACGATC
 TATGACCCGAGTTCCAGGACCGTGCCTACTATAAGCGCTGACAATTCACAAACACAGCA
 TACCTGCAGATGAACAGCCTGCGTGTGAGGACACTGCCGCTATTATTGTGCTCGAGAC
 ACGGCCGCTTACTTCGACTACTGGGGTCAAGGAACCCCTGGTACCCGTCTCCTCGGCCCTCC
 ACCAAGGGCCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACA
 GCGGCCCTGGGCTGCCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTGCTGGAAC
 TCAGGCGCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTTACAGTCTCAGGACTC
 TACTCCCTCAGCAGCGTGGTGAAGTGTGCCCTCTAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATC
 TGTGACAAAGTCAACAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCT
 GTGACAAAACTCACACATGCCCAACCGTGGCCAGCACCTGAATCTCTGGGGGGACCGTCA
 GTCTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTC
 ACATGCGTGGTGGTGGAGCTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTG
 GACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAG
 TACCGTGTGGTCAAGCTCTCACCGTCTGACCCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTAC
 AAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGGCC
 AAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCTGCCCCCATCCCGGAAGAGATGACC
 AAGAACCAGGTACGCTGACCTGCTGCTCAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTG
 GAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACTACAAGACCACGCTCCCGTGTGAGAC
 TCCGACGGCTCTTCTTCTCTACAGCAAGCTACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAG
 GGGAAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAG
 AGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATAAGCATGCGACGGCCCTAGAGTCCCTAACCGTCCGG
 TTGCCCGCCGGGCGTTTTTTTATTGTTAACTCATGTTTGACAGCTTATCATCGATAAGCTTT
 AATGCGGTAGTTTATCACAGTTAAATTGCTAACGCAGTCAGGCACCGTGTATGAAATCTA
 ACAATGCGCTCATCGTCATCCTCGGCACCGTACCCCTGGA

Fig. 9

xTF-7T3FL.Protein

STII + Anti-TF-Leichtkette

MKKNIAFLLLASMFVFSIATNAYADIQMTQSPSSLSASVGDRVTTTCRASRDIKSYLWNY
 QQKPGKAPKVLIIYATSLAEGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCLQHGES
 WFTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL
 QSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE
 C

STII + Anti-TF-Schwerkette

MKKNIAFLLLASMFVFSIATNAYAEVOLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKEYYMH
 VRQAPGKGLEWVGLIDPEQGNTIYDPKFQDRATISADNSKNTAYLQMNSLRAEDTAVY
 CARDTAAAYFDYWGGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV
 TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK
 KVEPKSCDKHTCTPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
 VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP
 IEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
 YKTPFVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

Fig. 10

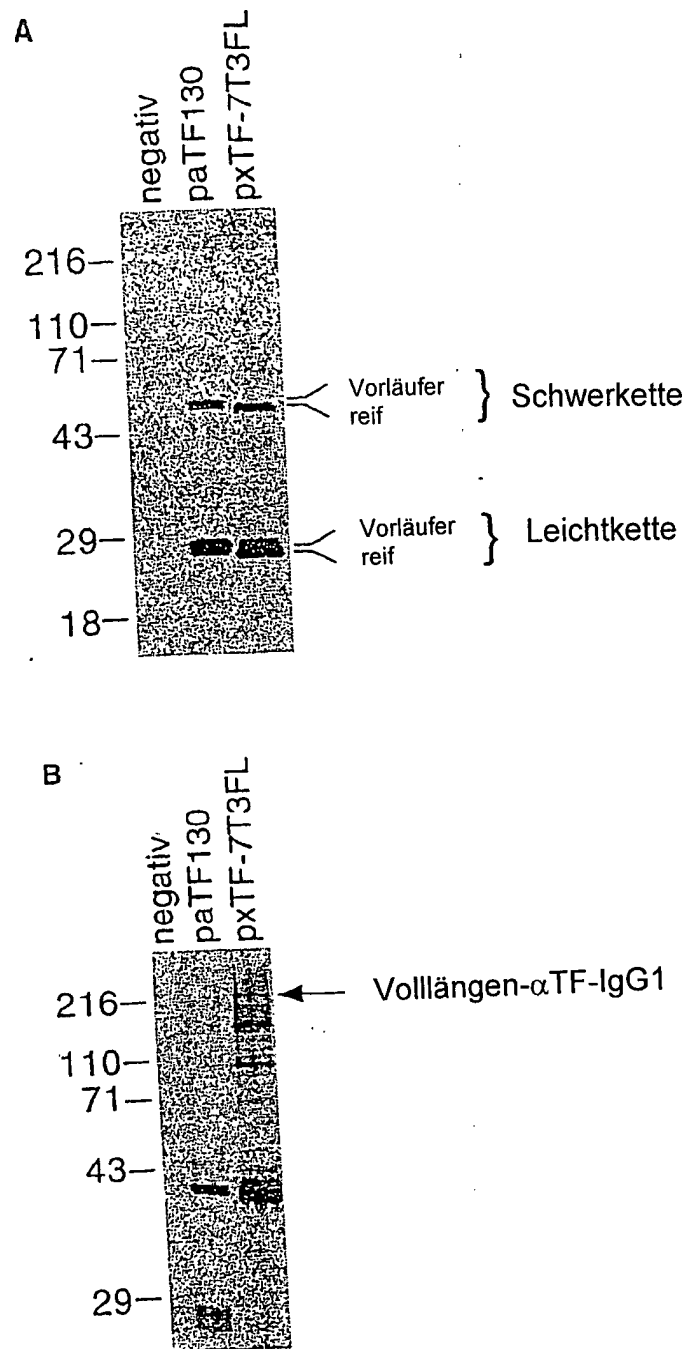


Fig. 11