



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 697 21 548 T2 2004.04.01

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 0 929 578 B1

(21) Deutsches Aktenzeichen: 697 21 548.2

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/US97/02219

(96) Europäisches Aktenzeichen: 97 906 572.9

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 97/029131

(86) PCT-Anmeldetag: 10.02.1997

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: 14.08.1997

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 21.07.1999

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: 02.05.2003

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 01.04.2004

(51) Int Cl.⁷: C07K 16/24

C12N 15/13, C12N 15/64, C12N 5/10,
C12N 1/21, A61K 39/395, G01N 33/68

(30) Unionspriorität:

599226 09.02.1996 US
31476 P 25.11.1996 US

(73) Patentinhaber:

Abbott Laboratories(Bermuda)Ltd., Hamilton, BM

(74) Vertreter:

Reitstötter, Kinzebach & Partner (GbR), 81679
München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

SALFELD, G., Jochen, North Grafton, US; ALLEN,
J., Deborah, London N17 9YD, GB;
KAYMAKCALAN, Zehra, Westboro, US;
LABKOVSKY, Boris, Framingham, US;
MANKOVICH, A., John, Andover, US;
MCGUINNESS, T., Brian, Cambridge CB2 5HP, GB;
ROBERTS, J., Andrew, Cambridge CB1 3AE, GB;
SAKORAFAS, Paul, Shrewsbury, US;
HOOGENBOOM, R., Hendricus, B-3500 Hasselt,
BE; SCHOENHAUT, David, Clifton, US; VAUGHAN,
J., Tristan, Cambridge CB4 4NZ, GB; WHITE,
Michael, Framingham, US; WILTON, J., Alison,
Cambridge CB3 0HH, GB

(54) Bezeichnung: HUMANE ANTIKÖRPER WELCHE AN HUMANEN TNFalpha BINDEN

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 eingelebt, 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**Hintergrund der Erfindung**

[0001] Der Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF α) ist ein von zahlreichen Zelltypen, einschließlich Monozyten und Macrophagen, produziertes Cytokin, das ursprünglich aufgrund seiner Fähigkeit, die Nekrose in bestimmten Maus-Tumoren zu induzieren, identifiziert wurde (siehe z. B. Old, L. (1985) *Science* 230: 630–632). Anschließend wurde gezeigt, dass ein als Cachectin bezeichneter Faktor, der mit Cachexia verbunden ist, das gleiche Molekül wie TNF α ist. TNF α wurde mit der Vermittlung von Schock in Verbindung gebracht (siehe beispielsweise Beutler, B. und Cerami, A. (1988) *Annu. Rev. Biochem.* 57: 505–518; Beutler, B. und Cerami, A. (1989) *Annu. Rev. Immunol.* 7: 625–655). Ferner wurde TNF α mit der Pathophysiologie zahlreicher weiterer menschlicher Erkrankungen und Störungen in Verbindung gebracht, einschließlich Sepsis, Infektionen, Autoimmunerkrankungen, Transplantatabstoßungen und Transplantat-Wirt-Reaktion (siehe beispielsweise Moeller, A. et al. (1990) *Cytokine* 2: 162–169; das U.S.-Patent Nr. 5,231,024 von Moeller et al.; die europäische Patentveröffentlichung Nr. 260,610 B1 von Moeller, A., et al. Vasilli, P. (1992) *Annu. Rev. Immunol.* 10: 411–452; Tracey, K. J. und Cerami, A. (1994) *Annu. Rev. Med.* 45: 491–503).

[0002] Aufgrund der schädlichen Rolle von humanem TNF α (hTNF α) in zahlreichen Erkrankungen des Menschen, wurden therapeutische Strategien entwickelt, um die Wirkung von hTNF α zu hemmen oder ihr entgegenzuwirken. Insbesondere wurde nach Antikörpern, die an hTNF α binden und dieses neutralisieren, als Mittel zur Hemmung der hTNF α -Aktivität gesucht. Einige der zuerst gefundenen derartigen Antikörper waren monoklonale Maus-Antikörper (mAbs), welche von Hybridomas sekretiert wurden, die aus den Lymphozyten von mit hTNF α immunisierten Mäusen hergestellt wurden (siehe beispielsweise Hahn T. et al. (1985) *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 3814–3818; Liang, C-M. et al. (1986) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 137: 847–854; Hirai, M. et al. (1987) *J. Immunol. Methods* 96: 57–62; Fendly, B. M. et al. (1987) *Hybridoma* 6: 359–370; Moeller, A. et al. (1990) *Cytokine* 2: 162–169; das U.S.-Patent Nr. 5,231,024 von Moeller et al.; die europäische Patentveröffentlichung Nr. 186 833 B1 von Wallach, D.; die europäische Patentanmeldung Nr. 218 868 A1 von Old et al; die europäische Patentveröffentlichung Nr. 260 610 B1 von Moeller, A. et al.). Während diese Maus-anti-hTNF α -Antikörper häufig eine hohe Affinität für hTNF α zeigen (z. B. einen K_d 10^{-9} M) und fähig sind, die hTNF α -Aktivität zu neutralisieren, kann ihre Verwendung *in vivo* durch Probleme bei der Verabreichung von Maus-Antikörpern an Menschen beschränkt sein, wie einer kurzen Halbwertszeit im Serum, der Unfähigkeit, bestimmte menschliche Effektorfunktionen auszulösen, und einer unerwünschten Immunantwort gegen den Maus-Antikörper im Menschen (die „Mensch-anti-Maus-Antikörper-“ (HAMA) Reaktion).

[0003] In einem Versuch, die Probleme, die mit vollständig von Maus stammenden Antikörpern beim Menschen verbunden sind, zu lösen, wurden auf genetischem Weg „Menschen-ähnlichere“ Maus-anti-hTNF α -Antikörper erzeugt. Chimere Antikörper, in denen zahlreiche Bereiche der Antikörperkette von der Maus stammen und die konstanten Bereiche der Antikörperkette vom Menschen stammen, wurden hergestellt (Knight, D. M. et al. (1993) *Mol. Immunol.* 30: 1443–1453; PCT-Veröffentlichung Nr. WO 92/16553 von Daddona, P. E., et al.). Ferner wurden auch humanisierte Antikörper, worin die hypervariablen Domänen der variablen Antikörperregionen von der Maus stammen, die restlichen variablen Regionen und die konstanten Antikörperregionen jedoch vom Menschen stammen, hergestellt (PCT-Veröffentlichung Nr. WO 92/11383 von Adair, J. R., et al.). Da diese chimeren und humanisierten Antikörper jedoch immer noch einige Maus-Sequenzen enthalten, können sie eine unerwünschte Immunreaktion, die Mensch-anti-chimerer Antikörper-(HACA) Reaktion hervorrufen, insbesondere wenn sie über längere Zeiträume verabreicht werden, z. B. bei chronischen Indikationen, wie rheumatoide Arthritis (siehe beispielsweise Elliott, M. J. et al. (1994) *Lancet* 344: 1125–1127; Elliott, M. J., et al. (1994) *Lancet* 344: 1105–1110).

[0004] Ein gegenüber Maus-mAbs oder Derivaten davon (z. B. chimere oder humanisierte Antikörper) bevorzugtes hTNF α -hemmendes Mittel für wäre ein vollständig humaner Anti-hTNF α -Antikörper, da ein solcher Stoff, selbst wenn er über längere Zeiten verwendet wird, keine HAMA-Reaktion hervorrufen sollte. Humane monoklonale Autoantikörper gegen hTNF α wurden mit Hilfe von Verfahren mit humanen Hybridomas hergestellt (Boyle, P., et al. (1993) *Cell Immunol.* 152: 556–568; Boyle, P., et al. (1993) *Cell. Immunol.* 152: 569–581; europäische Patentanmeldung Nr. 614 984 A2 von Boyle et al.). Diese Hybridoma-stämmigen monoklonalen Autoantikörpern zeigten jedoch eine Affinität für hTNF α , die zu gering war, als dass man sie mit herkömmlichen Verfahren hätte bestimmen können, und sie konnten weder lösliches hTNF α binden noch die hTNF α -induzierte Zytotoxizität neutralisieren (siehe Boyle et al., wie oben). Ferner hängt der Erfolg des Human-Hybridoma-Verfahrens davon ab, ob im humanen peripheren Blut natürlicherweise Lymphozyten vorliegen, welche hTNF α -spezifische Autoantikörper produzieren. Einige Studien haben Serum-Autoantikörper gegen hTNF α in Menschen gefunden (Fomsgaard, A., et al. (1989) *Scand. J. Immunol.* 30: 219–223; Bendtzen, K., et al. (1990) *Prog. Leukocyte Biol.* 10B: 447–452), wohingegen andere dies nicht taten (Leusch, H.-G., et al. (1991) *J. Immunol. Methods* 139: 145–147).

[0005] Eine Alternative zu natürlich vorkommenden humanen Anti-hTNF α -Antikörpern sind rekombinante hT-

hTNF α -Antikörper. Rekombinante humane Antikörper, die hTNF α mit relativ geringer Affinität (d. h. $K_d \sim 10^{-7}$ M) und einer hohen Dissoziationsrate (d. h. $K_{off} \sim 10^{-2}$ s $^{-1}$) binden, wurden beschrieben (Griffiths, A. D., et al. (1993) EMBO J. 12: 725–734). Aufgrund ihrer relativ schnellen Dissoziationskinetiken sind diese Antikörper für die therapeutische Verwendung jedoch nicht geeignet. Ferner wurde ein rekombinanter humarer Anti-hTNF α beschrieben, der die hTNF α -Aktivität nicht neutralisiert, sondern die Bindung von hTNF α an die Oberfläche von Zellen und die Aufnahme von hTNF α fördert (Lidbury, A., et al. (1994) Biotechnol. Ther. 5: 27–45; PCT-Veröffentlichung Nr. WO 92/03145 von Aston, R., et al.).

[0006] Demnach besteht weiterhin ein Bedarf an humanen Antikörpern, wie rekombinanten humanen Antikörpern, die lösliches hTNF α mit hoher Affinität und langsamer Dissoziationskinetik binden und die die Fähigkeit besitzen, die hTNF α -Aktivität, einschließlich der hTNF α -induzierten Zytotoxizität (in vitro und in vivo) und der hTNF α -induzierten Zellaktivierung, zu neutralisieren.

Zusammenfassung der Erfindung

[0007] Die Erfindung stellt humane Antikörper, vorzugsweise rekombinante humane Antikörper bereit, die spezifisch an humanes TNF α binden. Die erfindungsgemäßen Antikörper sind durch das Binden an hTNF α mit hoher Affinität und langsamer Dissoziationskinetik und durch das Neutralisieren der hTNF α -Aktivität, einschließlich der hTNF α -induzierten Zytotoxizität (in vitro und in vivo) sowie der hTNF α -induzierten zellulären Aktivierung, gekennzeichnet. Die erfindungsgemäßen Antikörper sind ferner durch das Binden an hTNF α , nicht jedoch an hTNF β (Lymphotoxin), und durch die Fähigkeit, neben humanem TNF α , andere TNF α s aus Primaten und Nicht-Primaten zu binden.

[0008] Die erfindungsgemäßen Antikörper können Full-Length-Antikörper sein (z. B. ein IgG1- oder IgG4-Antikörper) oder können nur einen Antigen-bindenden Teil enthalten (z. B. ein Fab-, F(ab') $_2$ - oder scFv-Fragment). Der am meisten bevorzugte erfindungsgemäße rekombinante Antikörper, der als D2E7 bezeichnet wird, besitzt eine CDR3-Domäne der leichten Kette, welche die Aminosäuresequenz der SEQ ID NO: 3 umfasst, und eine CDR3-Domäne der schweren Kette, welche die Aminosäuresequenz der SEQ ID NO: 4 umfasst. Der D2E7-Antikörper besitzt vorzugsweise eine variable Region der leichten Kette (LCVR) mit der Aminosäuresequenz der SEQ ID NO: 1 und eine variable Region der schweren Ketten (HCVR) mit der Aminosäuresequenz der SEQ ID NO: 2.

[0009] Eine erfindungsgemäße Ausführungsform betrifft einen isolierten humanen Antikörper oder einen Antigen-bindenden Bereich davon, der von humanem TNF α mit einer K_d von 1×10^{-8} M oder weniger und einer K_{off} -Geschwindigkeitskonstante von 1×10^{-3} s $^{-1}$ oder weniger dissoziiert, beide bestimmt mittels Oberflächen-Plasmon-Resonanz, und die humane TNF α -Zytotoxizität in einem Standard-in vitro-L929-Assay mit einem IC_{50} -Wert von 1×10^{-7} M oder weniger neutralisiert. Weiter bevorzugt dissoziiert der isolierte humane Antikörper oder der Antigen-bindende Bereich davon von humanem TNF α mit einem K_{off} von 5×10^{-4} s $^{-1}$ oder weniger, noch weiter bevorzugt mit einem K_{off} von 1×10^{-4} s $^{-1}$ oder weniger. Weiter bevorzugt neutralisiert der isolierte humane Antikörper oder der Antigen-bindende Bereich davon die humane TNF α -Zytotoxizität in einem Standard-in vitro-L929-Assay mit einem IC_{50} -Wert von 1×10^{-8} M oder weniger, weiter bevorzugt mit einem IC_{50} von 1×10^{-9} M oder weniger und noch weiter bevorzugt mit einem IC_{50} von 5×10^{-10} M oder weniger.

[0010] In einer weiteren Ausführungsform stellt die Erfindung einen humanen Antikörper oder einen Antigen-bindenden Bereich mit folgenden Merkmalen bereit:

- er dissoziiert von humanem TNF α mit einer K_{off} von 1×10^{-3} s $^{-1}$ oder weniger, bestimmt mittels Oberflächen-Plasmon-Resonanz;
- er besitzt eine CDR3-Domäne der leichten Kette mit der Aminosäuresequenz der SEQ ID NO: 3 oder einer durch eine einzelne Alanin-Substitution in Position 1, 4, 5, 7 oder 8 oder durch ein bis fünf konservative Aminosäuresubstitutionen in den Positionen 1, 3, 4, 6, 7, 8 und/oder 9 der SEQ ID NO: 3 modifizierten Sequenz;
- er besitzt eine CDR3-Domäne der schweren Kette mit der Aminosäuresequenz der SEQ ID NO: 4 oder einer durch eine einzelne Alanin-Substitution in Position 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10 oder 11 oder durch ein bis fünf konservative Aminosäuresubstitutionen in den Positionen 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11 und/oder 12 der SEQ ID NO: 4 modifizierten Sequenz.

[0011] Weiter bevorzugt dissoziiert der Antikörper oder der Antigen-bindende Bereich davon von humanem TNF α mit einer K_{off} von 5×10^{-4} s $^{-1}$ oder weniger. Noch weiter bevorzugt dissoziiert der Antikörper oder der Antigen-bindende Bereich davon von humanem TNF α mit einer K_{off} von 1×10^{-4} s $^{-1}$ oder weniger.

[0012] Eine andere erfindungsgemäße Ausführungsform betrifft einen humanen Antikörper oder einen Antigen-bindenden Bereich davon mit einer LCVR, die eine CDR3-Domäne mit der Aminosäuresequenz der SEQ ID NO: 3 oder einer durch eine einzelne Alanin-Substitution in Position 1, 4, 5, 7 oder 8 der SEQ ID NO: 3 modifizierten Sequenz enthält, und mit einer HCVR, die eine CDR3-Domäne mit der Aminosäuresequenz der SEQ ID NO: 4 oder einer durch eine einzelne Alanin-Substitution in Position 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10 oder 11 der

SEQ ID NO: 4 modifizierten Sequenz enthält. Weiter bevorzugt besitzt die LCVR ferner eine CDR2-Domäne mit der Aminosäuresequenz der SEQ ID NO: 5 und die HCVR eine CDR2-Domäne mit der Aminosäuresequenz der SEQ ID NO: 6. Noch weiter bevorzugt hat die LCVR ferner eine CDR1-Domäne mit der Aminosäuresequenz der SEQ ID NO: 7 und die HCVR eine CDR1-Domäne mit der Aminosäuresequenz der SEQ ID NO: 8.

[0013] In einer weiteren Ausführungsform stellt die Erfindung einen isolierten humanen Antikörper oder einen Antigen-bindenden Bereich davon bereit mit einer LCVR mit der Aminosäuresequenz der SEQ ID NO: 1 und einer HCVR mit der Aminosäuresequenz der SEQ ID NO: 2. In manchen Ausführungsformen besitzt der Antikörper eine konstante IgG1-Region der schweren Kette oder eine konstante IgG4-Region der schweren Kette. In noch weiteren Ausführungsformen ist der Antikörper ein Fab-Fragment, ein F(ab')₂-Fragment oder ein einkettiges Fv-Fragment.

[0014] Noch weitere erfindungsgemäße Ausführungsformen betreffen Antikörper oder Antigen-bindende Bereiche davon mit einer LCVR mit einer CDR3-Domäne, die eine Aminosäuresequenz enthält, welche aus der Gruppe aus SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13 und SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26 ausgewählt ist, oder mit einer HCVR mit einer CDR3-Domäne, welche eine Aminosäuresequenz enthält, die aus der Gruppe aus SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34 und SEQ ID NO: 35 ausgewählt ist.

[0015] Eine weitere erfindungsgemäße Ausführungsform betrifft einen isolierten humanen Antikörper oder einen Antigen-bindenden Bereich davon, welcher die Aktivität von humanem TNF α , nicht jedoch von humanem TNF β (Lymphotoxin), neutralisiert. In einer bevorzugten Ausführungsform neutralisiert der humane Antikörper oder der Antigen-bindende Bereich davon die Aktivität von humanem TNF α , TNF α aus Schimpansen und TNF α aus wenigstens einem weiteren Primaten, ausgewählt aus der Gruppe aus Pavian-TNF α , Krallenaffen-TNF α , Cynomolgus-TNF α und Rhesus-TNF α . Der Antikörper neutralisiert vorzugsweise auch die Aktivität wenigstens eines TNF α 's aus einem Nicht-Primaten. In einer Unterausführungsform neutralisiert der isolierte humane Antikörper oder ein Antigen-bindender Bereich davon beispielsweise auch die Aktivität von Hund-TNF α . In einer weiteren Unterausführungsform neutralisiert der isolierte humane Antikörper oder der Antigen-bindende Bereich davon auch die Aktivität von Schweine-TNF α . In einer weiteren Unterausführungsform neutralisiert der isolierte humane Antikörper oder ein Antigen-bindender Bereich davon auch die Aktivität von Mäuse-TNF α .

[0016] Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft Nukleinsäuremoleküle, welche für die erfindungsgemäßen Antikörper oder Antigen-bindenden Bereiche kodieren. Eine bevorzugte erfindungsgemäße Nukleinsäure, die für ein D2E7-LCVR kodiert, besitzt die in **Fig. 7** und SEQ ID NO: 36 gezeigte Nukleotidsequenz. Eine weitere bevorzugte erfindungsgemäße Nukleinsäure, welche für ein D2E7-HCVR kodiert, besitzt die in **Fig. 8** und SEQ ID NO: 37 gezeigte Nukleotidsequenz. Rekombinante Expressionsvektoren, welche die erfindungsgemäßen Antikörper-kodierenden Nukleinsäuren tragen, sowie Wirtszellen, in die solche Vektoren eingeführt wurden, sind auch von der Erfindung umfasst, ebenso wie Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäßen Antikörper durch Kultivieren der erfindungsgemäßen Wirtszellen.

[0017] Ein anderer Aspekt der Erfindung betrifft Verfahren, mit dem man die Aktivität von humanem TNF α durch einen erfindungsgemäßen Antikörper oder Antigen-bindenden Bereichs davon hemmen kann. In einer Ausführungsform umfasst das Verfahren, dass man humanes TNF α mit dem erfindungsgemäßen Antikörper oder einem Antigen-bindenden Bereich davon zusammenbringt, um die Aktivität des humanen TNF α s zu hemmen. In einer weiteren Ausführungsform umfasst das Verfahren, dass man einen erfindungsgemäßen Antikörper oder einen Antigen-bindenden Bereich davon einem Menschen, der unter einer Störung leidet, bei der die TNF α -Aktivität schädlich ist, verabreicht, um die Aktivität von humanem TNF α in dem Menschen zu hemmen. Die Störung kann beispielsweise Sepsis, eine Autoimmunerkrankung (z. B. rheumatoide Arthritis, eine Allergie, Multiple Sklerose, Autoimmundiabetes, Autoimmunuveitis und ein Nephrosyndrom), eine infektiöse Erkrankung, eine Malignität, eine Transplantatabstoßung oder Transplantat-Wirt-Reaktion, eine Lungenerkrankung, eine Knochenerkrankung, eine Darmkrankheit oder eine Herzkrankheit sein.

Kurzbeschreibung der Zeichnungen

[0018] Die **Fig. 1A** und **1B** zeigen die Aminosäuresequenzen der variablen Region der leichten Kette von D2E7 (D2E7 VL; auch in SEQ ID NO: 1 gezeigt), Alanin-Scan-Mutanten von D2E7 VL (LD2E7*.A1, LD2E7*.A3, LD2E7*.A4, LD2E7*.A5, LD2E7*.A7 und LD2E7*.A8), die variable Region der leichten Kette des D2E7-verwandten Antikörpers 2SD4 (2SD4 VL; auch in SEQ ID NO: 9 gezeigt) und weitere D2E7-verwandte variable Regionen der leichten Kette (EP B12, VL10E4, VL100A9, VL100D2, VL10F4, LOES, VLLOF9, VLLOF10, VLLOG7, VLLOG9, VLLOH1, VLLOH10, VL1B7, VL1C1, VL1C7, VL0.1F4, VL0.1H8, LOE7, LOE7.A und LOE7.T). **Fig. 1A** zeigt die FR1-, CDR1-, FR2- und CDR2-Domänen. **Fig. 1B** zeigt die FR3-, CDR3- und

FR4-Domänen. Die CDR1- („CDR L1-“), CDR2- („CDR L2-“) und CDR3- („CDR L3-“) Domänen der leichten Kette sind umrahmt.

[0019] Die **Fig.** 2A und 2B zeigen die Aminosäuresequenzen der variablen Region der schweren Kette von D2E7 (D2E7 VH; auch in SEQ ID NO: 2 gezeigt), Alanin-Scan-Mutanten von D2E7 VH (HD2E7*.A1, HD2E7*.A2, HD2E7*.A3, HD2E7*.A4, HD2E7*.A5, HD2E7*.A6, HD2E7*.A7, HD2E7*.A8 und HD2E7*.A9), die variable Region der schweren Kette des D2E7-verwandten Antikörpers 2SD4 (2SD4 VH; auch in SEQ ID NO: 10 gezeigt) und weitere D2E7-verwandte variable Regionen der schweren Kette (VH1B11, VH1D8, VH1A11, VH1B12, VH1-D2, VH1E4, VH1F6, VH1G1, 3C-H2, VH1-D2.N und VH1-D2.Y). **Fig.** 2A zeigt die FR1-, CDR1-, FR2- und CDR2-Domänen. Die **Fig.** 2B zeigt die FR3-, CDR3- und FR4-Domänen. Die CDR1- („CDR H1-“), CDR2- („CDR H2-“) und CDR3- („CDR H3-“) Domänen der schweren Kette sind umrahmt.

[0020] **Fig.** 3 ist eine Darstellung, in der die Hemmung der TNF α -induzierten L929-Zytotoxizität durch den humanen Anti-hTNF α -Antikörper D2E7 im Vergleich zu dem Maus-anti-hTNF α -Antikörper MAK 195 gezeigt wird.

[0021] **Fig.** 4 ist eine Darstellung, in der die Hemmung der rhTNF α -Bindung an hTNF α -Rezeptoren auf U-937-Zellen durch den humanen Anti-hTNF α -Antikörper D2E7 im Vergleich zu dem Maus-anti-hTNF α -Antikörper MAK 195 gezeigt wird.

[0022] **Fig.** 5 ist eine Darstellung, in der die Hemmung der TNF α -induzierten ELAM-1-Expression auf HUVEC durch den humanen Anti-hTNF α -Antikörper D2E7 im Vergleich zu dem Maus-anti-hTNF α -Antikörper MAK 195 gezeigt wird.

[0023] **Fig.** 6 ist eine Balkendarstellung, in der der Schutz vor der TNF α -induzierten Lethalität in mit D-Galactosamin sensibilisierten Mäusen durch die Verabreichung des humanen Anti-hTNF α -Antikörpers D2E7 (schwarze Balken) im Vergleich zu dem Maus-anti-hTNF α -Antikörper MAK 195 (gestreifte Balken) gezeigt wird.

[0024] **Fig.** 7 zeigt die Nukleotidsequenz der variablen Region der leichten Kette von D2E7, wobei die vorhergesagte Aminosäuresequenz unter der Nukleotidsequenz dargestellt ist. Die CDR L1-, CDR L2- und CDR L3-Regionen sind unterstrichen.

[0025] **Fig.** 8 zeigt die Nukleotidsequenz der variablen Region der schweren Kette von D2E7, wobei die vorhergesagte Aminosäuresequenz unter der Nukleotidsequenz dargestellt ist. Die CDR H1-, CDR H2- und CDR H3-Regionen sind unterstrichen.

[0026] **Fig.** 9 ist eine Darstellung, welche die Wirkung der Behandlung mit dem D2E7-Antikörper auf die durchschnittliche Gelenkgröße transgener Tg197-Mäuse als Modell für Polyarthritis zeigt.

Ausführliche Beschreibung der Erfindung

[0027] Die Erfindung betrifft isolierte humane Antikörper oder Antigen-bindende Bereiche davon, die an humanes TNF α mit hoher Affinität, einer geringen Dissoziationsrate und einer hohen Neutralisierungsfähigkeit binden. Verschiedene erfindungsgemäße Aspekte betreffen Antikörper und Antikörperfragmente und pharmazeutische Zusammensetzungen davon sowie Nukleinsäuren, rekombinante Expressionsvektoren und Wirtszellen zur Herstellung solcher Antikörper und Fragmente. Verfahren zur Verwendung erfindungsgemäßer Antikörper zum Nachweis von humanem TNF α oder zum Hemmen der Aktivität von humanem TNF α , entweder in vitro oder in vivo, sind auch von der Erfindung umfasst.

[0028] Zum besseren Verständnis der vorliegenden Erfindung werden zunächst einige Begriffe definiert.

[0029] Der Begriff „humanes TNF α “ (hier abgekürzt als hTNF α oder einfach hTNF) steht, wie hier verwendet, für ein humanes Cytokin, das in sekretierter Form mit 17 kD und in Membran-assoziiierter Form mit 26 kD vorliegt, wobei die biologisch aktive Form aus einem Trimer nicht-kovalent gebundener Moleküle mit 17 kD besteht. Die Struktur von hTNF α ist beispielsweise weiter beschrieben in Pennica, D., et al. (1984) *Nature* 312: 724–729; Davis, J. M., et al. (1987) *Biochemistry* 26: 1322–1326 und Jones, E. Y., et al. (1989) *Nature* 338: 225–228. Der Begriff humanes TNF α versteht sich einschließlich rekombinantem humanen TNF α (rhTNF α), welches durch übliche rekombinante Expressionsverfahren hergestellt oder gewerblich bezogen werden kann (R & D Systems, Katalog Nr. 210-TA, Minneapolis, MN).

[0030] Der hier verwendete Begriff „Antikörper“ betrifft Immunglobulinmoleküle, die aus vier Polypeptidketten bestehen, zwei schwere (H) Ketten und zwei leichte (L) Ketten, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Jede schwere Kette besteht aus einer variablen Region der schweren Kette (hier als HCVR oder VH abgekürzt) und einer konstanten Region der schweren Kette. Die konstante Region der schweren Kette umfasst drei Domänen, CH1, CH2 und CH3. Jede leichte Kette besteht aus einer variablen Region der leichten Kette (hier als LCVR oder VL abgekürzt) und einer konstanten Region der leichten Kette. Die konstante Region der leichten Kette besteht aus einer Domäne, CL. Die VH- und VL-Regionen lassen sich ferner in Regionen der Hypervariabilität unterteilen, die als Komplementaritäts-bestimmende Bereiche (CDR) bezeichnet werden und mit konservierteren Regionen, die als Framework-Regionen (FR) bezeichnet werden, durchsetzt sind. Jede VH und VL besteht aus drei CDRs und vier FRs, die vom Aminoterminal zum Carboxyterminus in folgender Reihenfolge vorliegen: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

[0031] Der Begriff „Antigen-bindender Bereich“ eines Antikörpers (oder einfach „Antikörperbereich“) steht hier für ein oder mehrere Fragmente eines Antikörpers, die weiterhin die Fähigkeit besitzen, spezifisch an ein Antigen (z. B. hTNF α) zu binden. Es wurde gezeigt, dass die Antigen-bindende Funktion eines Antikörpers durch Fragmente von Full-Length-Antikörpern ausgeübt werden kann. Beispiele von Bindungsfragmenten, die unter dem Begriff „Antigen-bindender Bereich“ eines Antikörpers fallen, umfassen (i) ein Fab-Fragment, ein einwertiges Fragment, das aus den VL-, VH-, CL- und CH1-Domänen besteht; (ii) ein F(ab')₂-Fragment, ein zweiwertiges Fragment, das aus zwei miteinander im Gelenkbereich über eine Disulfidbrücke verknüpften Fab-Fragmenten besteht; (iii) ein Fd-Fragment, das aus den VH- und CH1-Domänen besteht; (iv) ein Fv-Fragment, das aus den VL- und VH-Domänen eines einzelnen Antikörperarms besteht; (v) ein dAb-Fragment (Ward et al., (1989) *Nature* 341: 544–546), welches aus einer VH-Domäne besteht; und (vi) eine isolierte Komplementaritäts-bestimmende Region (CDR). Ferner, obwohl die zwei Domänen des Fv-Fragments, VL und VH, von getrennten Genen kodiert werden, können sie durch rekombinante Verfahren durch einen synthetischen Linker verbunden werden und so in Form einer Proteinkette hergestellt werden, in der sich die VL- und VH-Bereiche zu einwertigen Molekülen zusammenfügen (bekannt als einzelkettiges Fv (scFv); siehe beispielsweise Bird et al., (1988) *Science* 242: 423–426 und Huston et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 5879–5883). Solche einzelkettigen Antikörper werden auch von dem Begriff "Antigen-bindender Bereich" eines Antikörpers umfasst. Weitere Formen einzelkettiger Antikörper, wie Diakörper, sind auch umfasst. Diakörper sind zweiwertige, doppelt-spezifische Antikörper, bei denen die VH- und VL-Domänen von einer einzigen Polypeptidkette exprimiert werden; dabei wird jedoch ein Linker verwendet, der zu kurz ist, um eine Paarbildung zwischen den zwei Domänen auf der gleichen Kette zu ermöglichen, so dass die Domänen dazu gezwungen werden, sich mit komplementären Domänen anderer Ketten zu paaren und so zwei Antigen-bindende Stellen entstehen (siehe beispielsweise Holliger, P., et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444–6448; Poljak, R. J., et al. (1994) *Structure* 2: 1121–1123).

[0032] Ferner kann ein Antikörper oder ein Antigen-bindender Bereich davon Teil eines größeren Immunoadhäsionsmoleküls sein, das durch kovalente oder nicht-kovalente Assozierung des Antikörpers oder eines Antikörperbereichs mit ein oder mehreren weiteren Proteinen oder Peptiden entsteht. Bei solchen Immunoadhäsionsmolekülen verwendet man beispielsweise den Streptavidinkernbereich, um ein tetrameres scFv-Molekül herzustellen (Kipriyanov, S. M., et al. (1995) *Human Antibodies and Hybridomas* 6: 93–101) oder einen Cysteinrest, ein Markerpeptid oder einen C-terminalen Polyhistidin-Schwanz, um bivalente und biotinylierte scFv-Moleküle zu erzeugen (Kipriyanov, S. M., et al. (1994) *Mol. Immunol.* 31: 1047–1058). Antikörperbereiche, wie Fab- und F(ab')₂-Fragmente, können mit Hilfe herkömmlicher Verfahren aus ganzen Antikörpern hergestellt werden, wie durch Papain- bzw. Pepsin-Verdau ganzer Antikörper. Ferner können Antikörper, Antikörperbereiche und Immunadhäsionsmoleküle durch übliche rekombinante DNA-Verfahren, wie hier beschrieben, gewonnen werden.

[0033] Der Begriff „humaner Antikörper“ umfasst hier Antikörper mit variablen und konstanten Bereichen, die von Immunglobulinsequenzen der humanen Keimbahn abstammen. Die erfindungsgemäßen humanen Antikörper umfassen Aminosäurereste, die nicht von den Immunglobulinsequenzen der humanen Keimbahn abstammen (er wurden beispielsweise *in vitro* Mutationen durch statistische oder ortsspezifische Mutagenese oder *in vivo* durch somatische Mutation eingeführt), beispielsweise in den CDRs und insbesondere in CDR3. Der hier verwendete Begriff „humaner Antikörper“ umfasst jedoch keine Antikörper, in denen CDR-Sequenzen, die von der Keimbahn anderer Säugetierarten, wie der Maus, abstammen, in humane Framework-Sequenzen eingefügt wurden.

[0034] Der Begriff „rekombinanter humaner Antikörper“, wie hier verwendet, umfasst alle humanen Antikörper, die mittels rekombinanter Mittel hergestellt, exprimiert, erzeugt oder isoliert werden, wie Antikörper, die mit Hilfe eines in eine Wirtszelle transfizierten rekombinanten Expressionsvektors (ferner beschrieben in nachstehendem Abschnitt I) exprimiert werden, Antikörper, die aus einer rekombinanten, kombinatorischen humanen Antikörperbank isoliert werden (ferner nachstehend in Abschnitt III beschrieben), Antikörper, welche aus einem für humane Immunglobulingene transgenen Tier (beispielsweise einer Maus) isoliert werden (siehe beispielsweise Taylor, L. D., et al. (1992) *Nucl. Acids Res.* 20: 6287–6295) oder Antikörper, die durch andere Mittel hergestellt, exprimiert, erzeugt oder isoliert werden, bei denen humane Immunglobulin-Gensequenzen oder andere DNA-Sequenzen gespliced werden. Solche rekombinanten humanen Antikörper haben variable und konstante Regionen, die von Immunglobulinsequenzen der humanen Keimbahn abstammen. In bestimmten Ausführungsformen unterliegen solche rekombinanten humanen Antikörper jedoch einer *in vitro*-Mutagenese (oder, wenn für humane Ig-Sequenzen transgene Tiere verwendet werden, einer somatischen *in vivo*-Mutagenese) und daher sind die Aminosäuresequenzen der VH- und VL-Regionen der rekombinanten Antikörper Sequenzen, die, obwohl sie von humanen Keimbahn-VH- und -VL-Sequenzen abstammen und damit verwandt sind, nicht natürlich *in vivo* in dem humanen Antikörper-Keimbahn-Spektrum vorkommen.

[0035] Ein „isolierter Antikörper“, wie hier verwendet, steht für einen Antikörper, der im wesentlichen frei von anderen Antikörpern mit einer anderen antigenen Spezifität ist (ein isolierter Antikörper, der hTNF α spezifisch bindet, enthält im wesentlichen keine Antikörper, die spezifisch Antigene anderer hTNF α binden). Ein isolierter

Antikörper, der hTNF α spezifisch bindet, kann jedoch eine Kreuzreaktivität mit anderen Antigenen, wie TNF α -Molekülen anderer Spezies besitzen (dies wird nachstehend ausführlicher beschrieben). Ferner sollte ein isolierter Antikörper im wesentlichen kein weiteres zelluläres Material und/oder Chemikalien enthalten.

[0036] Ein „neutralisierender Antikörper“, wie hier verwendet (oder ein „Antikörper, der die hTNF α -Aktivität neutralisiert“), steht für einen Antikörper, dessen Bindung an hTNF α zur Hemmung der biologischen Aktivität von hTNF α führt. Diese Hemmung der biologischen Aktivität von hTNF α kann durch Messen eines oder mehrerer Indikatoren der biologischen Aktivität von hTNF α , wie der hTNF α -induzierten Zytotoxizität (entweder in vitro oder in vivo), der hTNF α -induzierten zellulären Aktivierung und der hTNF α -Bindung an hTNF α -Rezeptoren bestimmt werden. Diese Indikatoren der biologischen Aktivität von hTNF α können durch einen oder mehrere in vitro- oder in vivo-Standardassays, die auf dem Gebiet bekannt sind, bestimmt werden (siehe Beispiel 4). Vorzugsweise wird die Fähigkeit eines Antikörpers, die hTNF α -Aktivität zu neutralisieren, durch die Hemmung der durch hTNF α induzierten Zytotoxizität von L929-Zellen bestimmt. Als zusätzlicher oder alternativer Parameter der hTNF α -Aktivität kann die Fähigkeit eines Antikörpers, die durch hTNF α induzierte Expression von ELAM-1 auf HUVEC, als Maß der hTNF α -induzierten zellulären Aktivierung, bestimmt werden.

[0037] Der Begriff „Oberflächen-Plasmon-Resonanz“, wie hier verwendet, steht für ein optisches Phänomen, das die Analyse der biospezifischen Echtzeit-Wechselwirkung durch den Nachweis von Veränderungen der Proteinkonzentration innerhalb einer Biosensormatrix ermöglicht, beispielsweise durch Verwenden des BIAcore-Systems (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Schweden und Piscataway, NJ). Für weitere Beschreibungen siehe Beispiel 1 und Jönsson, U., et al. (1993) Ann. Biol. Clin. 51: 19–26; Jönsson, U., et al. (1991) Biotechniques 11: 620–627; Johnsson, B., et al. 81995) J. Mol. Recognit. 8: 125–131; und Johnnson, B. et al. (1991) Anal. Biochem. 198: 268–277.

[0038] Der hier verwendete Begriff „ K_{off} “ steht für die "Off-rate"-Konstante der Dissoziation eines Antikörpers aus dem Antikörper/Antigen-Komplex.

[0039] Der hier verwendete Begriff „ K_d “ steht für die Dissoziationskonstante einer bestimmten Antikörper-Antigen-Wechselwirkung.

[0040] Der hier verwendete Begriff „Nukleinsäuremolekül“ umfasst DNA-Moleküle und RNA-Moleküle. Ein Nukleinsäuremolekül kann einzelsträngig oder doppelsträngig sein, ist jedoch vorzugsweise doppelsträngige DNA.

[0041] Der Begriff „isoliertes Nukleinsäuremolekül“, wie hier in Bezug auf Nukleinsäuren verwendet, die für hTNF α bindende Antikörper oder Antikörperteile (z. B. VH, VL, CDR3) kodieren, steht für ein Nukleinsäuremolekül, worin die für den Antikörper oder den Antikörperteil kodierenden Nukleotidsequenzen keine weiteren Nukleotidsequenzen enthalten, die für Antikörper oder Antikörperteile kodieren, welche andere Antigene als hTNF α binden; diese weiteren Sequenzen können in der humanen genomischen DNA natürlich an die Nukleinsäure angrenzen. Demnach enthält eine erfundungsgemäße isolierte Nukleinsäure, die für eine VH-Region eines Anti-TNF α -Antikörpers kodiert, keine weiteren, für andere VH-Regionen kodieren Sequenzen, die andere Antigene als TNF α binden.

[0042] Der hier verwendete Begriff „Vektor“ steht für ein Nukleinsäuremolekül, das fähig ist, anderen Nukleinsäuren, mit denen es verknüpft ist, zu transportieren. Ein Vektortyp, das „Plasmid“ steht für eine kreisförmige doppelsträngige DNA-Schleife, in die weitere DNA-Segmente ligiert sein können. Weitere Vektortypen sind virale Vektoren, in denen zusätzliche DNA-Segmente in das virale Genom ligiert sein können. Bestimmte Vektoren sind fähig, sich in einer Wirtszelle, in die sie eingeführt werden, autonom zu vervielfältigen (z. B. bakterielle Vektoren mit einem bakteriellen Replikationsursprung und episomale Säugetier-Vektoren). Weitere Vektoren (z. B. nicht-episomale Säugetiervektoren) können beim Einführen in die Wirtszelle in das Genom der Wirtszelle integriert werden und werden dadurch gemeinsam mit dem Wirtsgenom repliziert. Ferner sind bestimmte Vektoren fähig, die Expression von Genen, an die sie operativ geknüpft sind, zu lenken. Solche Vektoren werden hier als „rekombinante Expressionsvektoren“ (oder einfach „Expressionsvektoren“) bezeichnet. Allgemein liegen Expressionsvektoren, die bei rekombinanten DNA-Techniken nützlich sind, häufig in Form von Plasmiden vor. In vorliegender Beschreibung werden „Plasmid“ und „Vektor“ austauschbar verwendet, da das Plasmid die am häufigsten verwendete Form eines Vektors ist. Die Erfindung umfasst jedoch auch andere Formen von Expressionsvektoren, wie virale Vektoren (z. B. Replikations-defektive Retroviren, Adenoviren und Adeno-assoziierte Viren), welche die gleiche Funktion erfüllen.

[0043] Der Begriff „rekombinante Wirtszelle“ (oder einfach „Wirtszelle“), wie hier verwendet, steht für eine Zelle, in die ein rekombinanter Expressionsvektor eingeführt wurde. Es versteht sich, dass sich diese Begriffe nicht nur auf die jeweilige Zielzelle sondern auf alle Abkömmlinge einer solchen Zelle beziehen. Da in nachfolgenden Generationen bestimmte Modifikationen entweder aufgrund einer Mutation oder aufgrund von Umwelt-einflüssen auftreten können, sind Abkömmlinge in der Tat nicht immer mit der Elternzelle identisch, sind jedoch dennoch von dem hier verwendeten Begriff „Wirtszelle“ umfasst.

[0044] Zahlreiche Aspekte der Erfindung sind in nachstehenden Unterabschnitten ausführlicher beschrieben.

I. Humane Antikörper, die humanes TNF α binden

[0045] Die Erfindung betrifft isolierte humane Antikörper oder Antigen-bindende Bereiche davon, welche humanes TNF α mit hoher Affinität, einer geringen Dissoziationsrate und hoher Neutralisierungskapazität binden. Die erfindungsgemäßen humanen Antikörper sind vorzugsweise rekombinante, neutralisierende humane Anti-hTNF α -Antikörper. Der am meisten bevorzugte erfindungsgemäße rekombinante, neutralisierende Antikörper wird hierin als D2E7 bezeichnet und besitzt VL- und VH-Sequenzen, wie in **Fig. 1A, 1B** bzw. **Fig. 2A, 2B** gezeigt (die Aminosäuresequenz der D2E7 VL-Region ist auch in SEQ ID NO: 1 gezeigt; die Aminosäuresequenz der D2E7 VH-Region ist auch in SEQ ID NO: 2 gezeigt). Die Bindungseigenschaften von D2E7 im Vergleich zu dem mAb Maus-anti-hTNF α MAK 195, der eine hohe Affinität und langsame Dissoziationskinetik zeigt, und einem weiteren humanen Anti-hTNF α -Antikörper, der eine Sequenzähnlichkeit zu D2E7 aufweist, nämlich 2SD4, sind nachstehend zusammengefasst:

Antikörper	$K_{off} \text{ s}^{-1}$	$K_{on} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$K_d \text{ M}$	Stöchiometrie
D2E7 IgG1	$8,81 \times 10^{-5}$	$1,91 \times 10^5$	$6,09 \times 10^{-10}$	1,2
2SD4 IgG4	$8,4 \times 10^{-3}$	$4,20 \times 10^5$	$2,00 \times 10^{-8}$	0,8
MAK 195 F(ab') ₂	$8,70 \times 10^{-5}$	$1,90 \times 10^5$	$4,60 \times 10^{-10}$	1,4

[0046] Der D2E7-Antikörper und verwandte Antikörper zeigen auch eine starke Fähigkeit, die hTNF α -Aktivität zu neutralisieren, was durch mehrere in vitro- und in vivo-Assays bestimmt wurde (siehe Beispiel 4). Diese Antikörper neutralisieren die durch hTNF α -induzierte Zytotoxizität von L929-Zellen mit einem IC₅₀-Wert im Bereich von etwa 10^{-7} M bis etwa 10^{-10} M. D2E7, wenn er als Full-Length-IgG1-Antikörper exprimiert wird, neutralisiert die durch hTNF α -induzierte Zytotoxizität von L929-Zellen mit einem IC₅₀ von etwa $1,25 \times 10^{-10}$ M. Ferner bleibt die Neutralisierungsfähigkeit von D2E7 erhalten, wenn der Antikörper als Fab-, F(ab')₂- oder scFv-Fragment exprimiert wird. D2E7 hemmt auch die TNF α -induzierte zelluläre Aktivierung, wie gemessen durch die hTNF α -induzierte ELAM-1-Expression auf HUVEC (IC₅₀ = etwa $1,85 \times 10^{-10}$ M) und die Bindung von hTNF α an hTNF α -Rezeptoren auf U-937-Zellen (IC₅₀ = etwa $1,56 \times 10^{-10}$ M). In Bezug auf die Letztere hemmt D2E7 das Binden von hTNF α sowohl an den p55-als auch den p75-hTNF α -Rezeptor. Ferner hemmt der Antikörper die durch hTNF α -induzierte in vivo-Sterblichkeit von Mäusen (ED₅₀ = 1–2,5 $\mu\text{g}/\text{Maus}$).

[0047] Hinsichtlich der Bindungsspezifität von D2E7 bindet dieser Antikörper an humanes TNF α verschiedener Formen, einschließlich lösliches hTNF α , transmembranen hTNF α und hTNF α , welches an zelluläre Rezeptoren gebunden ist. D2E7 bindet nicht spezifisch an andere Cytokine, wie Lymphotoxin (TNF β), IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IFNy und TGF β . Dennoch zeigt D2E7 eine Kreuzreaktivität zu Tumor-Nekrose-Faktoren anderer Arten. Der Antikörper neutralisiert beispielsweise die Aktivität von wenigstens fünf TNF α 's von Primaten (Schimpanse, Pavian, Krallenaffe, Cynomologus und Rhesus) mit etwa gleichen IC₅₀-Werten wie bei der Neutralisierung von hTNF α (siehe Beispiel 4, Unterabschnitt E). D2E7 neutralisiert auch die Aktivität von Maus-TNF α , jedoch etwa 1000-fach schlechter als humanes TNF α (siehe Beispiel 4, Unterabschnitt E). D2E7 bindet auch an Hunde- und Schweine-TNF α .

[0048] In einem Aspekt betrifft die Erfindung D2E7-Antikörper und Antikörperbereiche, D2E7-verwandte Antikörper und Antikörperbereiche sowie weitere humane Antikörper und Antikörperbereiche mit äquivalenten Eigenschaften zu D2E7, wie einer hoch-affinen Bindung an hTNF α mit niedriger Dissoziationskinetik und hoher Neutralisierungsfähigkeit. In einer Ausführungsform stellt die Erfindung einen isolierten humanen Antikörper oder einen Antigen-bindenden Bereich davon bereit, der von humanem TNF α mit einer K_d von 1×10^{-8} M oder weniger und einer K_{off} -Geschwindigkeitskonstante von $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ oder weniger dissoziiert, beides bestimmt mittels Oberflächen-Plasmon-Resonanz, und die humane TNF α -Zytotoxizität in einem üblichen in vitro-L929-Assay mit einem IC₅₀ von 1×10^{-7} oder weniger neutralisiert. Weiter bevorzugt dissoziiert der isolierte humane Antikörper oder ein Antigen-bindender Bereich davon von humanem TNF α mit einer K_{off} von $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ oder weniger oder noch mehr bevorzugt mit einer K_{off} von $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ oder weniger. Weiter bevorzugt neutralisiert der isolierte humane Antikörper oder ein Antigen-bindender Bereich davon die Zytotoxizität von humanem TNF α in einem üblichen in vitro-L929-Assay mit einem IC₅₀ von 1×10^{-8} M oder weniger, noch weiter bevorzugt mit einem IC₅₀ von 1×10^{-9} M oder weniger und noch weiter bevorzugt mit einem IC₅₀ von 5×10^{-10} M oder weniger. In einer bevorzugten Ausführungsform ist der Antikörper ein isolierter humarer rekombinanter Antikörper oder ein Antigen-bindender Bereich davon. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform neutralisiert der Antikörper auch die durch TNF α -induzierte Aktivierung, wie man mit Hilfe eines herkömmlichen in vitro-Assays für die TNF α -induzierte ELAM-1-Expression auf humanen Nabelvenen-Endothelzellen (HUVEC) bestimmen konnte.

[0049] Die Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Analyse für die Bestimmung der K_d und K_{off} kann wie in Beispiel 1 beschrieben, durchgeführt werden. Ein üblicher in vitro-L929-Assay zur Bestimmung der IC₅₀-Werte ist in Bei-

spiel 4, Unterabschnitt A beschrieben. Ein üblicher in vitro-Assay für die durch TNF α -induzierte ELAM-1-Expression auf humanen Nabelvenen-Endothelzellen (HUVEC) ist in Beispiel 4, Unterabschnitt C beschrieben. Beispiele rekombinanter humaner Antikörper, die die zuvor genannten kinetischen und Neutralisierungskriterien erfüllen oder von denen erwartet wird, dass sie diese erfüllen, umfassen Antikörper mit folgenden [VH/VL-Paaren, deren Sequenzen in den **Fig. 1A, 1B, 2A und 2B** gezeigt sind (siehe auch Beispiele 2, 3 und 4 für die Kinetik- und Neutralisationsanalysen): [D2E7 VH/D2E7 VL], [HD2E7*.A1/D2E7 VL], [HD2E7*.A2/D2E7 VL], [HD2E7*.A3/D2E7 VL], [HD2E7*.A4/D2E7 VL], [HD2E7.A5/D2E7 VL], [HD2E7*.A6/D2E7 VL], [HD2E7*.A7/D2E7 VL], [HD2E7*.A8/D2E7 VL], [HD2E7*.A9/D2E7 VL], [D2E7 VH/LD2E7*.A1], [D2E7 VH/LD2E7*.A4], [D2E7 VH/LD2E7*.A5], [D2E7 VH/LD2E7*.A7], [D2E7 VH/LD2E7*.A8], [HD2E7*.A9/LD2E7*.A1], [VH1-D2/LOE7], [VH1-D2.N/LOE7.T], [VH1-D2.Y/LOE7.A], [VH1-D2.N/LOE7.A], [VH1-D2/EP B12] und [3C-H2/LOE7].

[0050] Es ist aus dem Stand der Technik allgemein bekannt, dass die CDR3-Domänen der schweren und leichten Antikörperkette eine wichtige Rolle bei der Bindungsspezifität/Affinität eines Antikörpers für ein Antigen spielen. Entsprechend betrifft ein Aspekt der Erfindung humane Antikörper mit einer langsamen Dissoziationskinetik für die Assoziation mit hTNF α und mit CDR3-Domänen der leichten und schweren Kette besitzen, die strukturell identisch zu oder mit denen von D2E7 verwandt sind. Wie in Beispiel 3 gezeigt, kann die Position 9 der D2E7 VL CDR3 von Ala oder Thr besetzt sein, ohne dass dies die K_{off} wesentlich beeinflusst. Entsprechend umfasst ein Konsensusmotiv für D2E7 VL CDR3 die Aminosäuresequenz: Q-R-Y-N-R-A-P-Y-(T/A) (SEQ ID NO: 3). Ferner kann die Position 12 der D2E7 VH CDR3 von Tyr oder Asn besetzt sein, ohne dass dies die K_{off} wesentlich beeinflusst. Entsprechend umfasst ein Konsensusmotiv für D2E7 VH CDR3 die Aminosäuresequenz: V-S-Y-L-S-T-A-S-S-L-D-(Y/N) (SEQ ID NO: 4). Ferner, wie in Beispiel 2 gezeigt, kann die CDR3-Domäne der schweren und leichten Ketten von D2E7 mittels Substitution mit einem einzigen Alaninrest (in Position 1, 4, 5, 7 oder 8 innerhalb der VL CDR3 oder in Position 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10 oder 11 innerhalb der VH CDR3) verändert werden, ohne dass dies die K_{off} wesentlich beeinflusst. Zudem wird der Fachmann erkennen, dass man, angesichts der Veränderbarkeit der D2E7 VL- und VH CDR3-Domänen für Substitutionen durch Alanin, andere Aminosäuren in der CDR3-Domäne substituieren und dabei die niedrige Dissoziationsratenkonstante des Antikörpers beihalten kann, insbesondere konservative Aminosäuren. Eine „konservative Aminosäure-Substitution“, wie hier verwendet, ist eine, in der ein Aminosäurerest durch einen anderen Aminosäurerest mit einer ähnlichen Seitenkette ausgetauscht wird. Familien von Aminosäureresten mit ähnlichen Seitenketten wurden auf dem Gebiet definiert, und zwar solche mit basischen Seitenketten (z. B. Lysin, Arginin, Histidin), sauren Seitenketten (z. B. Asparaginsäure, Glutaminsäure), ungeladenen polaren Seitenketten (z. B. Glycin, Asparagin, Glutamin, Serin, Threonin, Tyrosin, Cystein), nicht-polaren Seitenketten (z. B. Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin, Prolin, Phenylalanin, Methionin, Tryptophan), Beta-verzweigten Seitenketten (z. B. Threonin, Valin, Isoleucin) und aromatischen Seitenketten (z. B. Tyrosin, Phenylalanin, Tryptophan, Histidin). Vorzugsweise werden nicht mehr als ein bis fünf konservative Aminosäure-Substitutionen in den D2E7 VL- und/oder VH CDR3-Domänen durchgeführt. Weiter bevorzugt werden nicht mehr als ein bis drei konservative Aminosäure-Substitutionen in den D2E7 VL- und/oder VH CDR3-Domänen durchgeführt. Zudem sollten konservative Aminosäure-Substitutionen nicht in Aminosäure-Positionen erfolgen, die für die Bindung an hTNF α entscheidend sind. Wie in Beispiel 3 gezeigt, scheinen die Positionen 2 und 5 der D2E7 VL CDR3 und die Positionen 1 und 7 der D2E7 VH CDR3 entscheidend für die Wechselwirkung mit hTNF α zu sein und daher sollten konservative Aminosäure-Substitutionen vorzugsweise nicht an diesen Positionen erfolgen (obwohl eine Alanin-Substitution in Position 5 des D2E7 VL CDR3, wie oben beschrieben, möglich ist).

[0051] Demnach stellt die Erfindung in einer weiteren Ausführungsform einen isolierten humanen Antikörper oder einen Antigen-bindenden Bereich davon mit den Merkmalen bereit, dass er:

- von humanem TNF α mit einer K_{off} -Geschwindigkeitskonstante von $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ oder weniger, dissoziiert, bestimmt mittels Oberflächen-Plasmon-Resonanz;
- eine CDR3-Domäne der leichten Kette besitzt, welche die Aminosäuresequenz der SEQ ID NO: 3 oder eine durch eine einzige Alanin-Substitution in Position 1, 4, 5, 7 oder 8 oder durch ein bis fünf konservative Aminosäure-Substitutionen in Position 1, 3, 4, 6, 7, 8 und/oder 9 der SEQ ID NO: 3 modifizierten Sequenz besitzt;
- eine CDR3-Domäne der schweren Kette besitzt, welche die Aminosäuresequenz von SEQ ID NO: 4 oder eine durch eine einzige Alanin-Substitution in Position 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10 oder 11 oder durch ein bis fünf konservative Aminosäure-Substitutionen in Position 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11 und/oder 12 modifizierte Sequenz der SEQ ID NO: 4 enthält.

[0052] Weiter bevorzugt dissoziiert der Antikörper oder der Antigen-bindende Bereich davon von humanem TNF α mit einer K_{off} von $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ oder weniger. Noch weiter bevorzugt dissoziiert der Antikörper oder ein Antigen-bindender Bereich davon von humanem TNF α mit einer K_{off} von $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ oder weniger.

[0053] Eine weitere Ausführungsform der Erfindung betrifft einen isolierten humanen Antikörper oder einen Antigen-bindenden Bereich davon mit einer variablen Region der leichten Kette (LCVR), welche eine

CDR3-Domäne mit der Aminosäuresequenz der SEQ ID NO: 3 oder einer durch eine einzige Alanin-Substitution in Position 1, 4, 5, 7 oder 8 modifizierten Sequenz der SEQ ID NO: 3 umfasst, und mit einer variablen Region der schweren Kette (HCVR), welche eine CDR3-Domäne mit der Aminosäuresequenz der SEQ ID NO: 4 oder einer durch eine einzige Alanin-Substitution in Position 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10 oder 11 modifizierten Sequenz von SEQ ID NO: 4 umfasst. Vorzugsweise besitzt die LCVR ferner eine CDR2-Domäne, welche die Aminosäuresequenz der SEQ ID NO: 5 umfasst (d. h. die D2E7 VL CDR2) und die HCVR hat vorzugsweise eine CDR2-Domäne, welche die Aminosäuresequenz der SEQ ID NO: 6 umfasst (d. h. die D2E7 VH CDR2). Noch weiter bevorzugt hat die LCVR ferner eine CDR1-Domäne mit der Aminosäuresequenz der SEQ ID NO: 7 (d. h. der D2E7 VL CDR1) und die HCVR hat eine CDR1-Domäne mit der Aminosäuresequenz der SEQ ID NO: 8 (d. h. der D2E7 VH CDR1). Die Framework-Bereiche von VL stammen vorzugsweise aus der humanen $V_{\kappa}I$ -Keimbahnfamilie, weiter bevorzugt aus dem humanen A20-Keimbahn-V κ -Gen und am meisten bevorzugt aus den in **Fig. 1A** und **1B** gezeigten D2E7 VL-Framework-Sequenzen. Die Framework-Regionen von VH stammen vorzugsweise aus der humanen $V_{\kappa}3$ -Keimbahnfamilie, weiter bevorzugt aus dem humanen DP-31-VH-Gen und am meisten bevorzugt aus den in **Fig. 2A** und **2B** gezeigten D2E7 VH-Framework-Sequenzen.

[0054] In einer weiteren Ausführungsform stellt die Erfindung einen isolierten humanen Antikörper oder einen Antigen-bindenden Bereich davon mit einer variablen Region der leichten Kette (LCVR) bereit, welche die Aminosäuresequenz der SEQ ID NO: 1 umfasst (d. h. den D2E7 VL), und einer variablen Region der schweren Kette (HCVR) mit der Aminosäuresequenz der SEQ ID NO: 2 (d. h. den D2E7 VH). In bestimmten Ausführungsformen enthält der Antikörper eine konstante Region der schweren Kette, wie eine konstante IgG1-, IgG2-, IgG3-, IgG4-, IgA-, IgE-, IgM- oder IgD-Region. Vorzugsweise ist die konstante Region der schweren Kette eine konstante IgG1- oder IgG4-Region der schweren Kette. Ferner kann der Antikörper eine konstante Region der leichten Kette, entweder eine konstante Kappa-Region der leichten Kette oder eine konstante Lambda-Region der leichten Kette enthalten. Vorzugsweise umfasst der Antikörper eine konstante Kappa-Region der leichten Kette. Alternativ kann der Antikörperbereich beispielsweise ein Fab-Fragment oder ein Einzelketten-Fv-Fragment sein.

[0055] In noch weiteren Ausführungsformen stellt die Erfindung einen isolierten humanen Antikörper oder einen Antigen-bindenden Bereich davon bereit, der D2E7-verwandte VL- und VH-CDR3-Domänen besitzt, beispielsweise Antikörper oder Antigen-bindende Bereiche davon mit einer variablen Region der leichten Kette (LCVR) mit einer CDR3-Domäne, die eine Aminosäuresequenz, ausgewählt aus der Gruppe aus SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25 und SEQ ID NO: 26 enthält, oder mit einer variablen Region der schweren Kette (HCVR) mit einer CDR3-Domäne, welche eine Aminosäuresequenz, ausgewählt aus der Gruppe aus SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34 und SEQ ID NO: 35, enthält.

[0056] In einer weiteren Ausführungsform stellt die Erfindung einen rekombinanten humanen Antikörper oder einen Antigen-bindenden Bereich davon bereit, der die Aktivität von humanem TNF α , nicht jedoch von humanem TNF β neutralisiert. Vorzugsweise neutralisiert der Antikörper oder der Antigen-bindende Bereich davon auch die Aktivität von Schimpansen-TNF α und wenigstens eines weiteren Primaten-TNF α s, ausgewählt aus der Gruppe aus Pavian-TNF α , Krallenaffe-TNF α , Cynomolgus-TNF α und Rhesus-TNF α . Vorzugsweise neutralisiert der Antikörper oder der Antigen-bindende Bereich davon humanes TNF α , Schimpansen-TNF α und/oder weiteres Primaten-TNF α in einem Standard-in vitro-L929-Assay mit einem IC₅₀ von 1×10^{-8} M oder weniger, bevorzugt 1×10^{-9} M oder weniger und noch weiter bevorzugt 5×10^{-10} M oder weniger. In einer Unterausführungsform neutralisiert der Antikörper auch die Aktivität von Hunde-TNF α , vorzugsweise in einem Standard-in vitro-L929-Assay mit einem IC₅₀ von 1×10^{-7} M oder weniger, vorzugsweise 1×10^{-8} M oder weniger und noch weiter bevorzugt 5×10^{-9} M oder weniger. In einer weiteren Unterausführungsform neutralisiert der Antikörper auch die Aktivität von Schweine-TNF α , vorzugsweise mit einem IC₅₀ von 1×10^{-5} M oder weniger, weiter bevorzugt 1×10^{-6} M oder weniger und noch weiter bevorzugt 5×10^{-7} M oder weniger. In einer noch weiteren Ausführungsform neutralisiert der Antikörper auch die Aktivität von Maus-TNF α , vorzugsweise mit einem IC₅₀ von 1×10^{-4} M oder weniger, weiter bevorzugt 1×10^{-5} M oder weniger und noch weiter bevorzugt 5×10^{-6} M oder weniger.

[0057] Ein erfindungsgemäßer Antikörper oder Antikörperbereich kann derivatisiert oder an ein weiteres funktionales Molekül (z. B. ein weiteres Peptid oder Protein) gebunden sein. Demnach ist beabsichtigt, dass die erfindungsgemäßen Antikörper und Antikörperbereiche derivatisierte und anderweitig modifizierte Formen der hier beschriebenen humanen Anti-hTNF α -Antikörper, einschließlich Immunoadhäsionsmoleküle, umfassen. Ein erfindungsgemäßer Antikörper oder Antikörperbereich kann beispielsweise funktional (durch chemische Kopplung, genetische Fusion, nicht-kovalente Assoziation oder auf sonstige Weise) an ein oder mehrere andere Moleküleinheiten, wie andere Antikörper (z. B. einen bispezifischen Antikörper oder einen Diakörper), ein Nachweismittel, ein zytotoxisches Mittel, ein pharmazeutisches Mittel und/oder ein Protein oder Peptid, das die

Assoziation des Antikörpers oder Antikörperbereichs mit einem weiteren Molekül (wie einem Streptavidin-Kernbereich oder einem Polyhistidin-Schwanz) vermitteln kann, gebunden sein.

[0058] Ein Typ derivatisierter Antikörper wird durch Vernetzen zweier oder mehrerer Antikörper (des gleichen Typs oder verschiedener Typen, z. B. um bispezifische Antikörper zu erzeugen) hergestellt werden. Geeignete Vernetzungsmittel umfassen solche, die heterobifunktional sind und zwei verschiedene reaktive, durch einen geeigneten Spacer getrennte Gruppen besitzen (z. B. m-Maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimidester), oder solche, die homobifunktional sind (z. B. Disuccinimidylsuberat). Solche Linker können von der Pierce Chemical Company, Rockford, IL bezogen werden.

[0059] Geeignete Nachweismittel, mit denen ein erfindungsgemäßer Antikörper oder Antikörperbereich derivatisiert werden kann, umfassen fluoreszierende Verbindungen. Beispiele für fluoreszierende Nachweismittel umfassen Fluoreszein, Fluoreszeinisothiocyanat, Rhodamin, 5-Dimethylamin-1-naphthalinsulfonylchlorid, Phycoerythrin und dergleichen. Ein Antikörper kann auch mit nachweisbaren Enzymen, wie alkalischer Phosphatase, Meerrettichperoxidase, Glucoseoxidase und dergleichen, derivatisiert werden. Wird ein Antikörper mit einem nachweisbaren Enzym derivatisiert, kann man ihn durch die Zugabe weiterer Reagenzien, mit denen das Enzym ein nachweisbares Reaktionsprodukt bildet, nachweisen. Liegt beispielsweise als nachweisbares Mittel Meerrettichperoxidase vor, führt die Zugabe von Wasserstoffperoxid und Diaminobenzidin zu einem farbigen Reaktionsprodukt, welches nachweisbar ist. Ein Antikörper kann auch mit Biotin derivatisiert und durch die indirekte Messung der Avidin- oder Streptavidin-Bindung nachgewiesen werden.

II. Expression von Antikörpern

[0060] Ein erfindungsgemäßer Antikörper oder Antikörperbereich kann durch rekombinante Expression der Immunglobulingene der leichten und schweren Kette in einer Wirtszelle hergestellt werden. Um einen Antikörper rekombinant zu exprimieren, wird eine Wirtszelle mit einem oder mehreren rekombinanten Expressionsvektoren transfiziert, die DNA-Fragmente tragen, welche für die schwere und leichte Immunglobulinkette des Antikörpers kodieren, so dass die leichte und schwere Kette in der Wirtszelle exprimiert und vorzugsweise in das Medium, in dem die Wirtszellen kultiviert werden, sekretiert werden, wobei sich die Antikörper aus dem Medium gewinnen lassen. Übliche rekombinante DNA-Verfahren werden zur Gewinnung der Gene der schweren und leichten Kette des Antikörpers verwendet, wobei diese Gene in rekombinante Expressionsvektoren eingebracht und die Vektoren in Wirtszellen eingeführt werden, wie solche, beschrieben in Sambrook, Fritsch und Maniatis (Herausgeber), Molecular Cloning; A Laboratory Manual zweite Ausgabe, Cold Spring Harbor, N. Y., (1989), Ausubel, F. M., et al. (Herausgeber) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates, (1989) und in dem U.S.-Patent Nr. 4,816,397 von Boss et al.

[0061] Um D2E7 oder einen D2E7-verwandten Antikörper zu exprimieren, werden zunächst DNA-Fragmente gewonnen, die für die variablen Bereiche der schweren Kette kodieren. Diese DNAs können mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durch Amplifikation und Modifikation der variablen Sequenzen der leichten und schweren Kette aus der Keimbahn gewonnen werden. Keimbahn-DNA-Sequenzen der Gene der variablen Region von humanen schweren und leichten Ketten sind aus dem Stand der Technik bekannt (siehe beispielsweise die humane Keimbahn-Sequenz-Datenbank „Vbase“; siehe auch Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, S. Ausgabe, U.S.-Gesundheitsministerium, NIH-Publikationsnummer 91-3242; Tomlinson, I. M., et al. (1992) "The Repertoire of Human Germline V_H Sequences Reveals about Fifty Groups of V_H Segments with Different Hypervariable Loops" J. Mol. Biol. 227: 776-798; und Cox, J. P. L. et al. (1994) „A Directory of Human Germline V_K Segments Reveals a Strong Bias in their Usage“ Eur. J. Immunol. 24: 827-836; auf deren Inhalt hier jeweils ausdrücklich Bezug genommen wird). Um ein DNA-Fragment zu gewinnen, das für die variable Region der schweren Kette von D2E7 oder einem D2E7-verwandten Antikörper kodiert, wird ein Mitglied der V_H 3-Familie der humanen Keimbahn-VH-Gene durch Standard-PCR amplifiziert. Am meisten bevorzugt wird die DP-31-VH-Keimbahnsequenz amplifiziert. Um ein DNA-Fragment zu gewinnen, das für die variable Region der leichten Kette von D2E7 oder einem D2E7-verwandten Antikörper kodiert, wird ein Mitglied der V_K I-Familie der humanen Keimbahn-VL-Gene durch Standard-PCR amplifiziert. Am meisten bevorzugt wird die A20-VL-Keimbahnsequenz amplifiziert. PCR-Primer, die sich für die Verwendung bei der Amplifizierung der DP-31-Keimbahn-VH- und A20-Keimbahn-VL-Sequenzen eignen, können auf Basis der in den oben zitierten Referenzen beschriebenen Nukleotidsequenzen mit Hilfe herkömmlicher Verfahren entworfen werden.

[0062] Sobald die Keimbahn-VH- und -VL-Fragmente gewonnen sind, können diese Sequenzen mutiert werden, so dass sie für die hierin beschriebenen D2E7- oder D2E7-verwandten Aminosäuresequenzen kodieren. Die von den Keimbahn-VH- und -VL-DNA-Sequenzen kodierten Aminosäuresequenzen werden zunächst mit den D2E7- oder D2E7-verwandten VH- und VL-Aminosäuresequenzen verglichen, um in den D2E7- oder D2E7-verwandten Sequenzen Aminosäurereste zu identifizieren, die sich von der Keimbahn unterscheiden. Dann werden die geeigneten Nukleotide der Keimbahn-DNA-Sequenzen mutiert, so dass die mutierte Keimbahnsequenz für die D2E7- oder D2E7-verwandte Aminosäuresequenz kodiert, wobei man den genetischen

Code verwendet, um zu bestimmen, welche Nukleotidänderungen vorgenommen werden sollen. Die Mutagenese von Keimbahnsequenzen erfolgt durch übliche Verfahren, wie die PCR-vermittelte Mutagenese (worin die mutierten Oligonukleotide in die PCR-Primer inkorporiert sind, so dass das PCR-Produkt die Mutationen enthält) oder die zielgerichtete Mutagenese.

[0063] Ferner sei erwähnt, dass, wenn die mittels PCR-Amplifikation gewonnenen "Keimbahn"-Sequenzen in den Framework-Bereichen im Vergleich zu der echten Keimbahnkonfiguration für andere Aminosäuren kodieren (d. h. Unterschiede in den amplifizierten Sequenzen im Vergleich zur wahren Keimbahnsequenz, beispielsweise als Folge einer somatischen Mutation, vorliegen), es wünschenswert sein kann, diese Aminosäure-Unterschiede zur echten Keimbahnsequenz zurückzuverändern (d. h. "Rückmutation" der Framework-Reste zur Keimbahnkonfiguration).

[0064] Sobald man DNA-Fragmente hat, die für D2E7- oder D2E7-verwandte VH- und VL-Segmente kodieren (durch Amplifikation und Mutagenese von Keimbahn-VH- und VL-Genen, wie oben beschrieben), können diese DNA-Fragmente weiter durch übliche rekombinante DNA-Verfahren manipuliert werden, beispielsweise um die Gene der variablen Region in Full-Length-Gene der Antikörperkette, Fab-Fragment-Gene oder scFv-Gen umzuwandeln. Bei diesen Manipulationen wird ein VL- oder VH-kodierendes DNA-Fragment operativ an ein anderes DNA-Fragment geknüpft, das für ein anderes Protein kodiert, wie die konstante Region eines Antikörpers oder einen flexiblen Linker. Der Begriff "operativ geknüpft", wie in diesem Zusammenhang verwendet, soll bedeuten, dass zwei DNA-Fragmente derart miteinander verbunden werden, dass die Aminosäuresequenzen, die von den zwei DNA-Fragmenten kodiert werden, im Leserahmen bleiben.

[0065] Die für die VH-Region kodierende isolierte DNA kann in ein Full-Length-Gen der schweren Kette umgewandelt werden, indem man die für VH kodierende DNA operativ an ein anderes DNA-Molekül knüpft, das für die konstanten Regionen der schweren Kette kodiert (CH1, CH2 und CH3). Die Sequenzen der humanen Gene für die konstante Region der schweren Kette sind allgemein bekannt (siehe beispielsweise Kabat, E. A., et al., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fünfte Ausgabe, U.S.-Gesundheitsministerium, NIH Publication No. 91-3242), und DNA-Fragmente, die diese Regionen enthalten, können durch übliche PCR-Amplifikation gewonnen werden. Die konstante Region der schweren Kette kann eine konstante IgG1-, IgG2-, IgG3-, IgG4-, IgA-, IgE-, IgM- oder IgD-Region sein, vorzugsweise ist es jedoch eine konstante IgG1- oder IgG4-Region. Bei einem Fab-Fragment-Gen der schweren Kette kann die VH-kodierende DNA operativ an ein weiteres DNA-Molekül gebunden sein, das nur für die konstante CH1-Region der schweren Kette kodiert.

[0066] Die für die VL-Region kodierende isolierte DNA kann in ein Full-Length-Gen der leichten Kette (sowie ein Fab-Gen der leichten Kette) umgewandelt werden, indem man die für VL kodierende DNA operativ an ein anderes DNA-Molekül bindet, das für die konstante Region, CL, der leichten Kette kodiert. Die Sequenzen der humanen Gene der konstanten Region der leichten Kette sind allgemein bekannt (siehe beispielsweise Kabat, E. A., et al., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fünfte Ausgabe, U.S.-Gesundheitsministerium, NIH Publikations-Nr. 91-3242), und DNA-Fragmente, die diese Regionen enthalten, können durch übliche PCR-Amplifikation gewonnen werden. Die konstante Region der leichten Kette kann eine konstante Kappa- oder Lambda-Region sein, ist jedoch am meisten bevorzugt eine konstante Kappa-Region.

[0067] Um ein scFv-Gen zu erzeugen, werden die für VH- und VL-kodierenden DNA-Fragmente operativ an ein anderes Fragment geknüpft, das für einen flexiblen Linker kodiert, z. B. für die Aminosäuresequenz (Gly₄-Ser)₃, so dass die VH- und VL-Sequenzen in Form eines aneinanderengrenzenden einzelsträngigen Proteins exprimiert werden, bei dem die VL- und VH-Regionen über eine flexiblen Linker miteinander verbunden sind (siehe beispielsweise Bird et al. (1988) Science 242: 423–426; Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879–5883; McCafferty et al., Nature (1990) 348: 552–554).

[0068] Um die erfindungsgemäßen Antikörper oder Antikörperbereiche zu exprimieren, werden DNAs, die für einen Teil der leichten oder schweren Ketten oder die Full-Length-Ketten kodieren, wie oben beschrieben gewonnen, in Expressionsvektoren eingefügt, so dass die Gene operativ an transkriptionale und translationale Kontrollsequenzen geknüpft sind. In diesem Zusammenhang bedeutet der Begriff "operativ geknüpft", dass ein Antikörpergen derart in einen Vektor ligiert wird, dass transkriptionale und translationale Kontrollsequenzen innerhalb des Vektors ihre angedachte Funktion zur Regulierung der Transkription und Translation des Antikörpergens erfüllen können. Die Expressionsvektoren und die Expressionskontrollsequenzen werden so ausgewählt, dass sie mit der verwendeten Expressions-Wirtszelle kompatibel sind. Das Gen für die leichte Kette des Antikörpers und das Gen für die schwere Kette des Antikörpers können in getrennte Vektoren eingefügt werden, oder, typischerweise, werden beide Gene in den gleichen Expressionsvektor eingefügt. Die Antikörpergene werden durch übliche Verfahren in den Expressionsvektoren eingebracht (z. B. Ligation komplementärer Restriktionsstellen auf dem Antikörper-Genfragment und Vektor oder Ligation von stumpfen Enden, falls keine Restriktionsstellen vorliegen). Vor der Insertion der D2E7- oder D2E7-verwandten Sequenzen der schweren oder leichten Kette kann der Expressionsvektor bereits konstante Regionen der Antikörpersequenzen tragen. Ein Ansatz, um die D2E7- oder D2E7-verwandten VH- oder VL-Sequenzen in Full-Length-Antikörperfogene umzuwandeln, besteht beispielsweise darin, sie in Expressionsvektoren einzubringen, die bereits für konstante

Regionen der schweren bzw. leichten Kette kodieren, so dass das VH-Segment im Vektor operativ an das oder die CH-Segmente und das VL-Segment im Vektor operativ an das CL-Segment geknüpft wird. Zusätzlich oder alternativ kann der rekombinante Expressionsvektor für ein Signalpeptid kodieren, das die Sekretion der Antikörperkette aus einer Wirtszelle erleichtert. Das Gen für die Antikörperkette kann derart in den Vektor kloniert werden, dass das Signalpeptid im Leserahmen an das Aminoende des Gens der Antikörperkette gebunden wird. Das Signalpeptid kann ein Immunglobulin-Signalpeptid oder ein heterologes Signalpeptid sein (d. h. ein Signalpeptid aus einem nicht-Immunglobulin-Protein).

[0069] Neben den Genen der Antikörperkette können die erfindungsgemäßen rekombinanten Expressionsvektoren regulatorische Sequenzen tragen, welche die Expression der Gene der Antikörperkette in einer Wirtszelle kontrollieren. Der Begriff "regulatorische Sequenz" umfasst Promotoren, Enhancer und andere Expressions-Kontrollelemente (z. B. Polyadenylierungssignale), welche die Transkription oder Translation der Gene der Antikörperkette kontrollieren. Solche regulatorischen Sequenzen sind beispielsweise beschrieben in Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990). Der Fachmann wird erkennen, dass die Entwicklung des Expressionsvektors, einschließlich der Auswahl der regulatorischen Sequenzen, von solchen Faktoren wie der Wahl der zu transformierenden Wirtszelle, dem Expressionsgrad des gewünschten Proteins usw. abhängt. Bevorzugte regulatorische Sequenzen für die Wirtszellexpression in Säugern umfassen virale Elemente, welche die hohen Spiegel der Proteinexpression in Säugetierzellen steuern, wie Promotoren und/oder Enhancer, die vom Cytomegalovirus (CMV) (wie der CMV-Promotor/Enhancer), Simian-Virus-40 (SV40) (wie der SV-40-Promotor/Enhancer), Adenovirus (z. B. der späte Hauptpromotor des Adenovirus (AdMLP)) und Polyoma abstammen. Zur weiteren Beschreibung viraler regulatorischer Elemente und deren Sequenzen siehe beispielsweise das U.S.-Patent Nr. 5,168,062 von Stinski, U.S.-Patent Nr. 4,510,245 von Bell et al., und das U.S.-Patent Nr. 4,968,615 von Schaffner et al.

[0070] Neben den Antikörperketten-Genen und regulatorischen Sequenzen können die erfindungsgemäßen rekombinanten Expressionsvektoren weitere Sequenzen, wie Sequenzen, welche die Replikation des Vektors in Wirtszellen regulieren (z. B. Replikationsursprünge), und selektierbare Markergene enthalten. Diese selektierbaren Markergene erleichtern die Auswahl von Wirtszellen, in die der Vektor eingeführt wurde (siehe beispielsweise die U.S.-Patente Nr. 4,399,216, 4,634,665 und 5,179,017, alle von Axel et al.). Zum Beispiel verleiht das selektierbare Markergen einer Wirtszelle, in die der Vektor eingeführt wird, typischerweise eine Resistenz gegen Wirkstoffe, wie G418, Hygromycin oder Methotrexat. Bevorzugte selektierbare Markergene umfassen das Dihydrofolat-Reduktase-(DHFR)-Gen (zur Verwendung in dhfr-Wirtszellen mit Methotrexat-Selektion/Amplifikation) und das neo-Gen (für die G418-Selektion).

[0071] Für die Expression der leichten und schweren Ketten werden der oder die Expressionsvektoren, die für die schwere und leichte Kette kodieren, durch übliche Verfahren in eine Wirtszelle transfiziert. Die verschiedenen Formen des Begriffs "Transfektion" umfassen eine breite Vielfalt von Verfahren, die üblicherweise zum Einführen exogener DNA in eine prokaryotische oder eukaryotische Wirtszelle verwendet werden, z. B. Elektroporation, Calcium-Phosphat-Präzipitation, DEAE-Dextran-Transfektion und dergleichen. Obwohl es theoretisch möglich ist, die erfindungsgemäßen Antikörper sowohl in prokaryotischen als auch in eukaryotischen Wirtszellen zu exprimieren, wird die Expression von Antikörpern in eukaryotischen Zellen und noch besser in Säugetier-Wirtszellen bevorzugt, da solche eukaryotischen Zellen und insbesondere Säugetierzellen, eine höhere Wahrscheinlichkeit als prokaryotische Zellen haben, einen richtig gefalteten und immunologisch aktiven Antikörper zusammenzufügen und zu sekretieren. Die prokaryotische Expression von Antikörpergenen wurde als ineffektiv zur Herstellung hoher Ausbeuten aktiver Antikörper beschrieben (Boss, M. A. und Wood, C. R. (1985) Immunology Today 6: 12-13).

[0072] Bevorzugte Säugetier-Wirtszellen für die Expression der erfindungsgemäßen rekombinanten Antikörper umfassen chinesische Hamsterovarien (CHO-Zellen) (einschließlich dhfr-CHO-Zellen, beschrieben in Urbaul und Chasin, (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216-4220, die zusammen mit einem DHFR-selektierbaren Marker verwendet werden, z. B. wie beschrieben in R. J. Kaufman und P. A. Sharp (1982) Mol. Biol. 159: 601-621), NSO-Myelomazellen, COS-Zellen und SP2-Zellen. Werden rekombinante, für Antikörpergene kodierende Expressionsvektoren in Säugetier-Wirtszellen eingeführt, werden die Antikörper durch Kultivieren der Wirtszellen für einen Zeitraum, der zur Expression des Antikörpers in den Wirtszellen ausreicht, oder vorzugsweise durch Sekretion des Antikörpers in das Kulturmedium, in dem die Wirtszellen aufgezogen werden, hergestellt. Die Antikörper können durch übliche Proteinreinigungsverfahren aus dem Kulturmedium gewonnen werden.

[0073] Wirtszellen können auch verwendet werden, um Teile von intakten Antikörpern, wie Fab-Fragmente oder scFv-Moleküle, herzustellen. Es versteht sich, dass Änderungen des obigen Verfahrens zum Umfang der Erfindung gehören. Beispielsweise kann es wünschenswert sein, eine Wirtszelle mit DNA, die entweder für die leichte Kette oder die schwere Kette (nicht jedoch beide) eines erfindungsgemäßen Antikörpers kodiert, zu transfizieren. Mittels rekombinanter DNA-Technologie kann auch ein Teil der oder die gesamte DNA, die entweder für die leichte oder die schwere Kette oder beide kodiert und die nicht für die Bindung an hTNF α benötigt wird, entfernt werden. Die von solchen verkürzten DNA-Molekülen exprimierten Moleküle sind auch von den

erfindungsgemäßen Antikörpern umfasst. Ferner können bifunktionale Antikörper hergestellt werden, worin eine schwere und eine leichte Kette einen erfindungsgemäßen Antikörper ausmachen und die andere schwere und leichte Kette spezifisch für ein Antigen, außer hTNF α , sind, indem man einen erfindungsgemäßen Antikörper durch übliche chemische Vernetzungsverfahren an einen zweiten Antikörper bindet.

[0074] In einem bevorzugten erfindungsgemäßen System zur rekombinanen Expression eines Antikörpers oder eines Antigen-bindenden Teils davon wird ein rekombinanter Expressionsvektor, der sowohl für die schwere Kette des Antikörpers als auch die leichte Kette des Antikörpers kodiert, mittels Calcium-Phosphat-Transfektion in dhfr-CHO-Zellen eingeführt. In dem rekombinanen Expressionsvektor sind die Gene für die schwere und leichte Kette des Antikörpers jeweils operativ an regulatorische Enhancer-Promotor-Elemente geknüpft (z. B. die von SV40, CMV, Adenovirus und dergleichen, wie ein regulatorisches CMV-Enhancer/AdMLP-Promotorelement oder ein regulatorisches SV40-Enhancer/AdMLP-Promotorelement), um die Transkription der Gene auf hohe Werte zu treiben. Der rekombinante Expressionsvektor trägt auch ein DHFR-Gen, welches die Selektion von CHO-Zellen ermöglicht, die mit Hilfe der Methotrexatselektion/Amplifikation transfiziert wurden. Die selektierten transformierten Wirtszellen werden kultiviert, so dass die schwere und leichte Kette des Antikörpers exprimiert werden, und der intakte Antikörper wird aus dem Kulturmedium gewonnen. Übliche molekularbiologische Verfahren werden verwendet, um den rekombinanen Expressionsvektor herzustellen, die Wirtszellen zu transfizieren, die Transformanten zu selektieren, die Wirtszellen zu kultivieren und den Antikörper aus dem Kulturmedium zu gewinnen.

[0075] Angesichts des Vorstehenden betrifft ein weiterer Aspekt der Erfindung Nukleinsäure-, Vektor- und Wirtszellzusammensetzungen, die für die rekombinante Expression der erfindungsgemäßen Antikörper und Antikörperbereiche verwendet werden können. Die für die variable Region der leichten D2E7-Kette kodierende Nukleotidsequenz ist in **Fig. 7** und SEQ ID NO: 36 gezeigt. Die CDR1-Domäne der LCVR umfasst die Nukleotide 70 bis 102, die CDR2-Domäne umfasst die Nukleotide 148 bis 168 und die CDR3-Domäne umfasst die Nukleotide 265 bis 291. Die für die variable Region der schweren D2E7-Kette kodierende Nukleotidsequenz ist in **Fig. 8** und SEQ ID NO: 37 gezeigt. Die CDR1-Domäne der HCVR umfasst die Nukleotide 91 bis 105, die CDR2-Domäne umfasst die Nukleotide 148 bis 198 und die CDR3-Domäne umfasst die Nukleotide 295 bis 330. Der Fachmann wird erkennen, dass die für die D2E7-verwandten Antikörper oder Teile davon (z. B. eine CDR-Domäne, wie eine DCR3-Domäne) kodierende Nukleotidsequenz aus den für D2E7-LCVR und -HCVR stammenden Nukleotidsequenzen anhand des genetischen Codes und üblicher molekularbiologischer Verfahren gewonnen werden können.

[0076] Eine Ausführungsform der Erfindung betrifft eine isolierte Nukleinsäure, die für die CDR3-Domäne der leichten Kette kodiert und die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 3 (d. h. die D2E7-VL-CDR3) oder eine durch eine einzige Alanin-Substitution an Position 1, 4, 5, 7 oder 8 oder durch ein bis fünf konservative Aminosäuresubstitutionen in Position 1, 3, 4, 6, 7, 8 und/oder 9 modifizierte Sequenz der SEQ ID NO: 3 enthält. Diese Nukleinsäure kann nur für die CDR3-Region oder vorzugsweise für die gesamte variable Region der leichten Kette des Antikörpers (LCVR) kodieren. Die Nukleinsäure kann beispielsweise für eine LCVR kodieren, die eine CDR2-Domäne mit der Aminosäuresequenz der SEQ ID NO: 5 (d. h. die D2E7-VL-CDR2) und eine CDR1-Domäne mit der Aminosäuresequenz der SEQ ID NO: 7 (d. h. die D2E7-VL-CDR1) enthält.

[0077] In einer weiteren Ausführungsform stellt die Erfindung eine isolierte Nukleinsäure bereit, die für die CDR3-Domäne einer schweren Kette kodiert, welche die Aminosäuresequenz der SEQ ID NO: 4 (d. h. die D2E7-VH-CDR3) oder eine durch eine einzige Alanin-Substitution in Position 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10 oder 11 oder durch ein bis fünf konservative Aminosäuresubstitutionen in Position 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11 und/oder 12 modifizierte Sequenz der SEQ ID NO: 4 enthält. Diese Nukleinsäure kann nur für die CDR3-Region kodieren oder kodiert vorzugsweise für die gesamte variable Region der schweren Kette des Antikörpers (HCVR). Die Nukleinsäure kodiert beispielsweise für eine HCVR mit einer CDR2-Domäne, welche die Aminosäuresequenz der SEQ ID NO: 3 umfasst (d. h. die D2E7-VH-CDR2), und einer CDR1-Domäne, welche die Aminosäuresequenz der SEQ ID NO: 8 umfasst (d. h. die D2E7-VH-CDR1).

[0078] Eine weitere erfindungsgemäße Ausführungsform betrifft isolierte Nukleinsäuren, die für eine D2E7-verwandte CDR3-Domäne kodieren, z. B. eine Aminosäuresequenz, ausgewählt aus der Gruppe aus: SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34 und SEQ ID NO: 35.

[0079] In einer weiteren Ausführungsform stellt die Erfindung eine isolierte Nukleinsäure bereit, die für die variable Region der leichten Kette eines Antikörpers kodiert, umfassend die Aminosäuresequenz der SEQ ID NO: 1 (d. h. die D2E7-LCVR). Vorzugsweise umfasst diese Nukleinsäure die Nukleotidsequenz der SEQ ID NO: 36, obwohl der Fachmann erkennen wird, dass auf Grund der Degenerierung des genetischen Codes weitere Nukleotidsequenzen für die Aminosäuresequenz der SEQ ID NO: 1 kodieren können. Die Nukleinsäure kann nur für die LCVR kodieren oder kann auch eine konstante Region der leichten Antikörperkette kodieren, welche

operativ an die LCVR geknüpft ist. In einer Ausführungsform ist diese Nukleinsäure in einem rekombinanten Expressionsvektor.

[0080] In einer weiteren Ausführungsform stellt die Erfindung eine isolierte Nukleinsäure bereit, die für die variable Region der schweren Kette eines Antikörpers kodiert, welche die Aminosäuresequenz der SEQ ID NO: 2 umfasst (d. h. die D2E7-HCVR). Vorzugsweise umfasst diese Nukleinsäure die Nukleotidsequenz der SEQ ID NO: 37, obwohl der Fachmann erkennen wird, dass auf Grund der Degenerierung des genetischen Codes andere Nukleotidsequenzen für die Aminosäuresequenz der SEQ ID NO: 2 kodieren können. Die Nukleinsäure kann nur für die HCVR kodieren oder kann auch für eine konstante Region der schweren Kette kodieren, welche operativ an die HCVR geknüpft ist. Die Nukleinsäure kann beispielsweise eine konstante IgG1- oder IgG4-Region umfassen. In einer Ausführungsform ist diese Nukleinsäure in einem rekombinanten Expressionsvektor enthalten.

[0081] In Erfindung stellt auch rekombinante Expressionsvektoren bereit, die sowohl für eine schwere Antikörperkette als auch eine leichte Antikörperkette kodieren. In einer Ausführungsform stellt die Erfindung beispielsweise einen rekombinanten Expressionsvektor bereit, der für:

- a) eine leichte Antikörperkette mit einer variablen Region, welche die Aminosäuresequenz der SEQ ID NO: 1 enthält (d. h. die D2E7 LCVR); und
- b) eine schwere Antikörperkette mit einer variablen Region, welche die Aminosäuresequenz der SEQ ID NO: 2 (d. h. die D2E7 HCVR) enthält, kodiert.

[0082] Die Erfindung stellt auch Wirtszellen bereit, in die ein oder mehrere erfindungsgemäße Expressionsvektoren eingeführt wurden. Vorzugsweise ist die Wirtszelle eine Säugetier-Wirtszelle, weiter bevorzugt ist die Wirtszelle eine CHO-Zelle, eine NSO-Zelle oder eine COS-Zelle.

[0083] Ferner stellt die Erfindung ein Verfahren zur Synthese eines erfindungsgemäßen rekombinanten humanen Antikörpers durch Kultivieren einer erfindungsgemäßen Wirtszelle in einem geeigneten Kulturmöedium, bis ein erfindungsgemäßer rekombinanter humaner Antikörper synthetisiert wird, bereit. Das Verfahren kann ferner das Isolieren des rekombinanten humanen Antikörpers aus dem Kulturmöedium umfassen.

III. Selektion rekombinanter humaner Antikörper

[0084] Erfindungsgemäße rekombinante humane Antikörper neben den hierin beschriebenen D2E7- oder D2E7-verwandten Antikörpern können durch Screenen einer rekombinanten kombinatorischen Antikörperbank, vorzugsweise einer scFv-Phagenbank, mit humanen VL- und VH-cDNAs, die aus mRNA von humanen Lymphozyten hergestellt wurden, gewonnen werden. Verfahren zum Herstellen und Screenen solcher Banken sind allgemein bekannt. Neben gewerbllich erhältlichen Kits zur Erzeugung von Phagenbanken (z. B. das Recombinant Phage Antibody System von Pharmacia, Katalog Nr. 27-9400-01; und das SurfZAP™-Phage Display Kit von Stratagene, Katalog-Nr. 240612) sind Beispiele für Verfahren und Reagenzien, welche besonders für die Herstellung und zum Screenen von Antikörperbanken anpassbar sind, beispielsweise zu finden in Ladner et al., US-Patent Nr. 5,223,409; Kang et al., PCT-Veröffentlichungs-Nr. WO 92/18619; Dower et al., PCT-Veröffentlichungs-Nr. WO 91/17271; Winter et al., PCT-Veröffentlichungs-Nr. WO 92/20791; Markland et al., PCT-Veröffentlichungs-Nr. WO 92/15679; Breitling et al., PCT-Veröffentlichungs-Nr. WO 93/01288; McCafferty et al., PCT-Veröffentlichungs-Nr. WO 92/01047; Garrard et al., PCT-Veröffentlichungs-Nr. WO 92/09690; Fuchs et al., (1991) Bio/Technology 9: 1370-1372; Hay et al., (1992) Hum Antibod Hybridomas 3: 81-85; Huse et al., (1989) Science 246: 1275-1281; McCafferty et al., Nature (1990) 348: 552-554; and Griffiths et al., (1993) EMBO J 12: 725-734; Hawkins et al., (1992) J. Mol. Biol. 226: 889-896; Clackson et al., (1991) Nature 352: 624-628; Gram et al., (1992) PNAS 89: 3576-3580; Garrad et al., (1991) Bio/Technology 9: 1373-1377; Hoogenboom et al., (1991) Nuc Acid Res 19: 4133-4137; und Barbas et al. (1991) PNAS 88: 7978-7982.

[0085] In einer bevorzugten Ausführungsform wird, um humane Antikörper mit hoher Affinität und einer niedrigen Dissoziationskonstante für hTNF α zu isolieren, zunächst ein Maus-anti-hTNF α -Antikörper mit hoher Affinität und niedriger Dissoziationskonstante für hTNF α (z. B. MAK 195, dessen Hybridoma die Hinterlegungsnummer ECACC 87 050801 hat) verwendet, um humane Sequenzen der schweren und leichten Kette mit ähnlichen Bindungseigenschaften gegenüber hTNF α auszuwählen, wobei die in Hoogenboom et al., PCT-Veröffentlichung Nr. WO 93/06213 beschriebenen "Epitope Imprinting"- oder "Guided Selection"-Verfahren verwendet werden. Die in diesen Verfahren verwendeten Antikörperbanken sind vorzugsweise scFv-Banken, die wie in McCafferty et al., PCT-Veröffentlichung Nr. WO 92/01047, McCafferty et al., Nature (1990) 348: 552-554; und Griffiths et al., (1993) EMBOJ 12: 725-734 beschrieben hergestellt und gescreent werden. Die scFv-Antikörperbanken werden vorzugsweise mit rekombinantem humanem TNF α als Antigen gescreent.

[0086] Sobald die humanen VL- und VH-Ausgangssegmente ausgewählt sind, werden "Mix and match"-Versuche durchgeführt, bei denen verschiedene Paare der ursprünglich ausgewählten VL- und VH-Segmente auf die hTNF α -Bindung gescreent werden, durchgeführt, um die bevorzugten VL-/VH-Paarkombinationen auszuwählen. Ferner, um die Affinität zu verbessern und/oder die Dissoziationskonstante der hTNF α -Bindung zu er-

niedrigen, können die VL- und VH-Segmente des oder der bevorzugten VL/VH-Paare statistisch mutiert werden, vorzugsweise in der CDR3-Region von VH und/oder VL, und zwar gemäß einem Verfahren, das analog zu dem somatischen in vivo-Mutationsverfahren ist, das für Affinitätsmutationen von Antikörpern während der natürlichen Immunantwort verantwortlich ist. Diese in vitro-Affinitätsmutation kann durch Amplifizieren der VH- und VL-Regionen mit PCR-Primern erfolgen, welche komplementär zu der VH CDR3 bzw. VL CDR3 sind, wobei die Primer mit einem statischen Gemisch der vier Nukleotidbasen an bestimmten Positionen "gespiked" werden, so dass die erhaltenen PCR-Produkte für VH- und VL-Segmente kodieren, in die statistische Mutationen in den VH- und/oder VL-CDR3-Regionen eingeführt wurden. Diese statistisch mutierten VH- und VL-Segmente können erneut auf die Bindung an hTNF α untersucht werden und Sequenzen, welche eine hohe Affinität und eine niedrige Dissoziationsrate für die hTNF α -Bindung zeigen, können ausgewählt werden.

[0087] Die Aminosäuresequenzen der ausgewählten schweren und leichten Ketten können mit schweren und leichten Ketten von Keimbahn-Aminosäuresequenzen verglichen werden. In Fällen, in denen sich bestimmte Framework-Reste ausgewählter VL- und/oder VH-Ketten von der Keimbahnkonfiguration unterscheiden (z. B. als Folge einer somatischen Mutation der Immunglobulingene, die zur Herstellung der Phagenbank verwendet wurden) kann es wünschenswert sein, die veränderten Framework-Reste der ausgewählten Antikörper in die Keimbahnkonfiguration "zurückzumutieren" (d. h. die Aminosäuresequenzen aus dem Framework der ausgewählten Antikörper so zu verändern, dass sie den Aminosäuresequenzen der Keimbahn-Framework entsprechen). Eine solche "Rückmutation" (oder "Germlining") der Framework-Reste kann durch molekularbiologische Standardverfahren zur Einführung spezifischer Mutationen erfolgen (z. B. zielgerichtete Mutagenese; PCR-vermittelte Mutagenese und dergleichen).

[0088] Nach dem Screenen und Isolieren des erfindungsgemäßen Anti-hTNF α -Antikörpers aus einer rekombinanten Immunglobulinbank, kann die Nukleinsäure, die für den ausgewählten Antikörper kodiert, aus dem Paket (z. B. dem Phagengenom) gewonnen und durch andere rekombinante DNA-Standardverfahren in andere Expressionsvektoren subkloniert werden. Falls gewünscht, kann die Nukleinsäure ferner manipuliert werden, um andere erfindungsgemäße Antikörperperformen zu erzeugen (z. B. an eine Nukleinsäure geknüpft werden, die für weitere Immunglobulindomänen, wie zusätzliche konstante Regionen, kodiert). Um einen durch Screenen aus einer kombinatorischen Bank isolierten rekombinanten humanen Antikörper zu exprimieren, wird die für den Antikörper kodierende DNA in einen rekombinanten Expressionsvektor kloniert und in eine Säugetier-Wirtszelle eingeführt, wie ausführlicher in obigem Abschnitt II beschrieben.

IV. Pharmazeutische Zusammensetzungen und pharmazeutische Verabreichung

[0089] Die erfindungsgemäßen Antikörper und Antikörperbereiche können in pharmazeutische Zusammensetzungen eingebracht werden, die für die Verabreichung an ein Subjekt geeignet sind. Üblicherweise umfasst die pharmazeutische Zusammensetzung den erfindungsgemäßen Antikörper oder Antikörperbereich und einen pharmazeutisch annehmbaren Träger. Wie hier verwendet umfasst "pharmazeutisch annehmbarer Träger" alle physiologisch kompatiblen Lösungsmittel, Dispersionsmittel, Überzüge, antibakterielle und antifungizide Mittel, isotonische und Absorptions-verzögernde Mittel und dergleichen. Beispiele pharmazeutisch annehmbarer Träger umfassen einen oder mehrere aus Wasser, Kochsalzlösung, Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung, Dextrose, Glycerol, Ethanol und dergleichen sowie Kombinationen davon. In vielen Fällen ist es bevorzugt isotonische Mittel, beispielsweise Zucker, Polyalkohole, wie Mannitol, Sorbitol oder Natriumchlorid, in die Zusammensetzung einzufügen. Pharmazeutisch annehmbare Träger können ferner geringere Mengen Hilfssubstanzen enthalten, wie Benetzungsmittel oder Emulgatoren, Konservierungsmittel oder Puffer, die die Halbwertszeit oder Wirksamkeit des Antikörpers oder Antikörperbereichs verbessern.

[0090] Die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen können in einer Vielzahl Formen vorkommen. Diese umfassen beispielsweise flüssige, halbfeste und feste Dosierungsformen, wie flüssige Lösungen (z. B. injizierbare und infundierbare Lösungen), Dispersionen oder Suspensionen, Tabletten, Pillen, Pulver, Liposomen und Zäpfchen. Die bevorzugte Form hängt von der beabsichtigten Verabreichungsart und der therapeutischen Anwendung ab. Typische bevorzugte Zusammensetzungen sind in Form injizierbarer oder infundierbarer Lösungen, wie Zusammensetzungen, ähnlich zu denen, die zur passiven Immunisierung von Menschen mit anderen Antikörpern verwendet werden. Der bevorzugte Verabreichungsweg ist parenteral (z. B. intravenös, subkutan, intraperitoneal, intramuskulär). In einer bevorzugten Ausführungsform wird der Antikörper durch intravenöse Infusion oder Injektion verabreicht. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird der Antikörper durch intramuskuläre oder subkutane Injektion verabreicht.

[0091] Therapeutische Zusammensetzungen müssen typischerweise steril und unter den Herstellungs- und Lagerbedingungen stabil sein. Die Zusammensetzungen können als Lösung, Mikroemulsion, Dispersion, Liposom oder anders geordnete Struktur formuliert sein, die für eine hohe Wirkstoffkonzentration geeignet ist. Sterile injizierbare Lösungen können durch Einbringen des Wirkstoffs (d. h. des Antikörpers oder Antikörperbereichs) in die benötigte Menge eines geeigneten Lösungsmittels, falls erforderlich, mit einem der oben genannten Inhaltsstoffe oder einer Kombination davon, hergestellt und anschließend steril-filtriert werden. Allgemein

werden Dispersionen hergestellt, indem man den Wirkstoff in ein steriles Vehikel, welches ein Dispersionsbassismedium und die anderen der oben aufgeführten benötigten Inhaltsstoffe enthält, einbringt. Im Fall steriler Pulver zur Herstellung steriler injizierbarer Lösungen sind die bevorzugten Herstellungsverfahren die Vakuumtrocknung und Gefriertrocknung, bei denen ein Pulver aus dem Wirkstoff und weiteren gewünschten Inhaltsstoffen aus einer zuvor steril-filtrierten Lösung davon hergestellt wird. Die richtige Fluidität einer Lösung kann beispielsweise durch die Verwendung eines Überzugs, wie Lecithin, durch die Erhaltung der benötigten Teilchengröße im Fall einer Dispersion und durch die Verwendung oberflächenaktiver Mittel erreicht werden. Eine längere Absorption der injizierbaren Zusammensetzungen lässt sich erreichen, indem man ein Mittel, welches die Absorption verzögert, beispielsweise Monostearatsalze und Gelatine, in die Zusammensetzung einbringt. [0092] Die erfindungsgemäßen Antikörper und Antikörperbereiche können durch eine Vielzahl bekannter Verfahren verabreicht werden, obwohl bei vielen therapeutischen Anwendungen der bevorzugte Weg/Modus der Verabreichung die intravenöse Injektion oder Infusion ist. Wie der Fachmann erkennen wird, hängt der Weg und/oder Modus der Verabreichung von den gewünschten Ergebnissen ab. In bestimmten Ausführungsformen kann der Wirkstoff mit einem Träger hergestellt werden, der die Verbindung vor einer schnellen Freisetzung schützt, wie Formulierungen mit kontrollierter Freisetzung, einschließlich Implantate, transdermale Pflaster und mikroverkapselte Abgabesysteme. Biologisch zersetzbare, biologisch kompatible Polymere, wie Ethylenvinylacetat, Polyanhydride, Polyglycolsäure, Collagen, Polyorthoesther und Polymilchsäure, können verwendet werden. Viele Herstellungsverfahren für solche Formulierungen sind patentiert und dem Fachmann allgemein bekannt; siehe beispielsweise Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, Herausgeber, Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

[0093] In bestimmten Ausführungsformen kann der erfindungsgemäße Antikörper oder Antikörperbereich oral verabreicht werden, beispielsweise mit einem inerten Verdünnungsmittel oder einem assimilierbaren essbaren Träger. Die Verbindung (und andere Inhaltsstoffe, falls gewünscht) können auch in einer Hart- oder Weichgelatinekapsel eingeschlossen, zu Tabletten komprimiert oder direkt in die Nahrung des Subjekts eingefügt werden. Für die orale therapeutische Verabreichung können die Verbindungen mit Corrigenzien inkorporiert werden und in Form von mit der Nahrung aufzunehmender Tabletten, bukkaler Tabletten, Pastillen, Kapseln, Elixiers, Suspensionen, Sirup, Oblaten und dergleichen verwendet werden. Um eine erfindungsgemäße Verbindung anders als durch die parenterale Verabreichung zu geben, kann es nötig sein, die Verbindung mit einem Material zu überziehen oder die Verbindung zusammen mit einem Material zu verabreichen, um seine Inaktivierung zu verhindern.

[0094] Aktive Hilfsverbindungen können auch in die Zusammensetzungen eingebracht werden. In bestimmten Ausführungsformen wird ein erfindungsgemäßer Antikörper oder Antikörperbereich zusammen mit einem oder mehreren zusätzlichen therapeutischen Mitteln, die zur Behandlung von Erkrankungen, bei der die TNF α -Aktivität stört, nützlich sind, formuliert und/oder verabreicht. Ein erfindungsgemäßer Anti-hTNF α -Antikörper oder -Antikörperbereich kann beispielsweise gemeinsam mit einem oder mehreren weiteren Antikörpern, die an andere Ziele binden (z. B. Antikörper, welche an andere Cytokine oder Zelloberflächenmoleküle binden), einem oder mehreren Cytokinen, einem löslichen TNF α -Rezeptor (siehe beispielsweise die PCT-Veröffentlichung Nr. WO 94/06476) und/oder einem oder mehreren chemischen Mitteln, welche die hTNF α -Produktion oder -Aktivität hemmen (wie die in der PCT-Veröffentlichung Nr. WO 93/19751 beschriebenen Cyclohexan-yliden-Derivate) formuliert und/oder verabreicht werden. Ferner können ein oder mehrere erfindungsgemäße Antikörper zusammen mit einem oder mehreren der vorstehenden therapeutischen Mittel verwendet werden. Solche Kombinationstherapien können vorteilhaft sein, um die Dosierung der verabreichten therapeutischen Mittel zu verringern und dadurch mögliche Toxizitäten oder Komplikationen zu vermeiden, die mit verschiedenen Monotherapien verbunden sind.

[0095] Nicht-beschränkende Beispiele therapeutischer Mittel für rheumatoide Arthritis, mit denen ein erfindungsgemäßer Antikörper oder Antikörperbereich kombiniert werden kann, umfassen folgende: ein oder mehrere nicht-steroidale entzündungshemmende Wirkstoffe (NSAIDs); ein oder mehrere Cytokin-suppressive entzündungshemmende Wirkstoffe (CSAIDs); (CDP-571/BAY-10-3356 (humanisierter Anti-TNF α -Antikörper; Celltech/Bayer); cA2 (chimerer Anti-TNF α -Antikörper; Centocor); 75 kdTNFR-IgG (75 kD TNF-Rezeptor-IgG-Fusionsprotein; Immunex, siehe beispielsweise Arthritis & Rheumatism (1994) Band 37, S295; J. Invest. Med. (1996), Band 44, 234A); 55 kd-TNFR-IgG (55 kD TNF-Rezeptor-IgG-Fusionsprotein; Hoffmann-La-Roche); IDEC-CE9.1/SB 210396 (nicht-erschöpfender primatisierter Anti-CD4-Antikörper; DEC/SmithKline; siehe beispielsweise Arthritis & Rheumatism (1995) Band 38, S185; DAB 486-IL-2 und/oder DAB 389-IL-2 (IL-2-Fusionsproteine; Seragen; siehe beispielsweise Arthritis & Rheumatism (1993) Band 36, S1223); Anti-Tac (humanisierter Anti-IL-2Ra; Protein-Entwicklungslabor/Roche); IL-4 (entzündungshemmendes Cytokin; DNAX/Schering); IL-10 (SCH 52000; rekombinantes IL-10, entzündungshemmendes Cytokin; DNAX/ Schering); IL-4; IL-10- und/oder IL-4-Agonisten (z. B. Agonisten-Antikörper); IL-1RA IL-1-Rezeptor-Antagonisten; Synergen/Amgen); (TNF-bp/s-TNFR (lösliches TNF-bindendes Protein; siehe beispielsweise Arthritis & Rheumatism (1996) Band 39, Nr. 9 (Zusatzband), S284; Amer. J. Physiol. – Heart and Circulatory Physiology (1995) Band 286, Seiten 97–42); R973401 (Phosphodiesterase Typ IV-Inhibitor; siehe beispielsweise Arthritis

&Zusatzband), S282); Rheumatism (1996) Band 39, Nr. 9 (MK-966 (COX-2-Inhibitor; siehe beispielsweise Arthritis & Rheumatism (1996) Band 39, Nr. 9 (Zusatzband), S81); Iloprost siehe beispielsweise Arthritis & Rheumatism (1996) Band 39, Nr. 9 Zusatzband), S82); Methotrexat; Thalidomid (siehe beispielsweise Arthritis & Rheumatism (1996) Band 39, Nr. 9 (Zusatzband), S282) und Thalidomid-verwandte Wirkstoffe (z. B. Celgen); Leflunomid (entzündungshemmend und Cytokin-Inhibitor; siehe beispielsweise Arthritis & Rheumatism (1996) Band 39, Nr. 9 (Zusatzband), S131; Inflammation Research (1996) Band 45, Seiten 103–107); Tranexaminsäure (Inhibitor der Plasminogenaktivierung; siehe beispielsweise Arthritis & Rheumatism (1996) Band 39, Nr. 9 (Zusatzband), S284); T-614 (Cytokin-Inhibitor; siehe beispielsweise Arthritis & Rheumatism (1996) Band 39, Nr. 9 (Zusatzband), S282); Prostaglandin E1 (siehe beispielsweise Arthritis & Rheumatism (1996) Band 39, Nr. 9 (Zusatzband), S282); Tenidap (nicht-steroidaler entzündungshemmender Wirkstoff; siehe beispielsweise Arthritis & Rheumatism (1996) Band 39, Nr. 9 (Zusatzband), S280); Naproxen (nicht-steroidaler entzündungshemmender Wirkstoff; siehe beispielsweise Neuro Report (1996) Band 7, Seiten 1209–1213); Meloxicam (nicht-steroidaler entzündungshemmender Wirkstoff); Ibuprofen (nicht-steroidaler entzündungshemmender Wirkstoff); Piroxicam (nicht-steroidaler entzündungshemmender Wirkstoff); Diclofenac (nicht-steroidaler entzündungshemmender Wirkstoff); Indomethacin (nicht-steroidaler entzündungshemmender Wirkstoff); Sulfasalazin (siehe beispielsweise Arthritis & Rheumatism (1996) Band 39, Nr. 9 (Zusatzband), S281); Azathioprine (siehe beispielsweise Arthritis & Rheumatism (1996) Band 39, Nr. 9 (Zusatzband), S281); ICE-Inhibitor (Inhibitor des Interleukin-1 β -umwandelnden Enzyms); zap-70- und/oder Ick-Inhibitor (Inhibitor der Tyrosinkinase zap-70 oder Ick); VEGF-Inhibitor und/oder VEGF-R-Inhibitor (Inhibitoren des vaskulären Endothelzell-Wachstumsfaktors oder des vaskulären Endothelzell-Wachstumsfaktorrezeptors; Inhibitoren der Angiogenese); entzündungshemmende Corticosteroid-Wirkstoffe (z. B. SB203580); TNF-Konvertase-Inhibitoren; Anti-IL-12-Antikörper, Interleukin-11 (siehe beispielsweise Arthritis & Rheumatism (1996) Band 39, Nr. 9 (Zusatzband), S296); (Interleukin-13 (siehe beispielsweise Arthritis & Rheumatism (1996) Band 39, Nr. 9 (Zusatzband), S308); Interleukin-17-Inhibitoren (siehe beispielsweise Arthritis & Rheumatism (1996) Band 39, Nr. 9 (Zusatzband), S120); Gold; Penicillinamin; Chloroquin; Hydrochloroquin; Chlorambucil; Cyclophosphamid; Cyclosporin; Bestrahlung des gesamten lymphatischen Systems; Anti-Thymozytenglobulin; Anti-CD4-Antikörper; CD5-Toxine; oral-verabreichte Peptide und Collagen; Lobenzaritdinatrium; die Cytokin-regulierenden Mittel (CRAs) HP228 und HP466 (Houghten Pharmaceuticals, Inc.); gegen ICAM-1 gerichtete Antisense-Phosphothioat-Oligodesoxynukleotide (ISIS 2302; Isis Pharmaceuticals, Inc.); löslicher Komplementrezeptor 1 (TP10; T Cell Sciences, Inc.); Prednison; Orgotein; Glycosaminoglycan-polysulfat; Minocyclin; Anti-IL2R-Antikörper; meeresbiologische und botanische Lipide (Fettsäuren aus Fisch- und Pflanzensamen; siehe beispielsweise DeLuca et al. (1995) Rheum. Dis. Clin. North Am. 21: 759–777); Auranofin; Phenylbutazon; Meclofenaminsäure; Flufenaminsäure; intravenöses Immunglobulin; Zileuton; Mycophenolsäure (RS-61443); Tacrolimus (FK-506); Sirolimus (Rapamycin); Amiprilose (Therafectin); Cladribin (2-Chlordeoxyadenosin); und Azabin.

[0096] Nicht-beschränkende Beispiele für therapeutische Mittel gegen entzündliche Darmerkrankung, mit denen der erfindungsgemäße Antikörper oder Antikörperbereich kombiniert werden kann, umfassen Folgende: Budenosid; epidermaler Wachstumsfaktor; Corticosteroide; Cyclosporin, Sulfasalazin, Aminosalicylate; 6-Mercaptopurin; Azathioprin; Metronidazol; Lipoxygenase-Inhibitoren; Mesalamin; Olsalazin; Balsalazid; Antioxidantien; Thromboxan-Inhibitoren; IL-1-Rezeptorantagonisten; monoklonale Anti-IL-1 β -Antikörper; monoklonale Anti-IL-6-Antikörper; Wachstumsfaktoren; Elastase-Inhibitoren; Pyridinyl-Imidazol-Verbindungen; CDP-571/BAY-10-3356 (humanisierter Anti-TNF α -Antikörper; Celltech/Bayer); cA2 (chimerer Anti-TNF α -Antikörper; Centocor); 75 kd-TNFR-IgG (75 kD TNF-Rezeptor-IgG-Fusionsprotein; Immunex; siehe beispielsweise Arthritis & Rheumatism (1994) Band 37, S295; J. Invest. Med. (1996) Band 44, 235A); 55 kd-TNFR-IgG (55 kD TNF-Rezeptor-IgG-Fusionsprotein; Hoffmann-LaRoche); Interleukin-10 (SCH 52000; Schering Plough); IL-4; IL-10- und/oder IL-4-Agonisten (z. B. Agonistenantikörper); Interleukin-11; Glucuronid- oder Dextran-konjugierte Vorläuferwirkstoffe von Prednisolon; Dexamethason oder Budesonid; ICAM-1-Antisense-Phosphothioat-Oligodeoxynucleotide (ISIS 2302); Isis Pharmaceuticals, Inc.); löslicher Komplementrezeptor 1 (TP10; T Cell Sciences, Inc.); langsam-freigesetztes Mesalazin; Methotrexat; Antagonisten des Blutplättchen-aktivierenden Faktors (PAF); Ciprofloxacin; und Lignocain.

[0097] Nicht beschränkende Beispiele für therapeutische Mittel gegen Multiple Sklerose, mit denen der erfindungsgemäße Antikörper, oder Antikörperbereich kombiniert werden kann, umfassen folgende: Corticosteroide; Prednisolon; Methylprednisolon; Azathioprin; Cyclophosphamid; Cyclosporin; Methotrexat; 4-Aminopyridin; Tizanidin; Interferon- β 1a (AvonexTM; Biogen); Interferon- β 1b (BetaseronTM; Chiron/Berlex); Copolymer 1 ("Cop-1; CopaxoneTM; Teva Pharmaceutical Industries, Inc.); hyperbarer Sauerstoff; intravenöses Immunglobulin; Cladribin; CDP-571/BAY-10-3356 (humanisierter Anti-TNF α -Antikörper; Celltech/Bayer); cA2 (chimerer Anti-TNF α -Antikörper; Centocor); 75 kd-TNFR-IgG (75 kD TNF-Rezeptor-IgG-Fusionsprotein; Immunex; siehe beispielsweise Arthritis & Rheumatism (1994) Band 37, S295; J. Invest. Med. (1996) Band 44, 235A); 55 kd-TNFR-IgG (55 kD TNF-Rezeptor-IgG-Fusionsprotein; Hoffmann-LaRoche); IL-10; IL-4- und IL-10- und/oder IL-4-Agonisten (z. B. Agonistenantikörper).

[0098] Nicht-beschränkende Beispiele für therapeutische Mittel gegen Sepsis, mit denen der erfindungsgemäße Antikörper oder Antikörperbereich kombiniert werden kann, umfassen folgende: hypertonische Kochsalzlösungen; Antibiotika; intravenöses Gammaglobulin; kontinuierliche Hämofiltration; Carbapenems (z. B. Meropenem); Antagonisten der Cytokine wie TNF α , IL-1 β , IL-6 und/oder IL-8; CDP-571/BAY-10-3356 (humanisierte Anti-TNF α -Antikörper; Celltech/Bayer); cA2 (chimerer Anti-TNF α -Antikörper; Centocor); 75 kd-TNFR-IgG (75 kd TNF-Rezeptor-IgG-Fusionsprotein; Immunex; siehe beispielsweise Arthritis & Rheumatism (1994) Band 37, S295; J. Invest. Med. (1996) Band 44, 235A); 55 kd-TNFR-IgG (55 kd TNF-Rezeptor-IgG-Fusionsprotein; Hoffmann-LaRoche); Cytokin-regulierende Mittel (CRAs) HP228 und HP466 (Houghten Pharmaceuticals, Inc.); SK&F 107647 (niedermolekulares Peptid; SmithKline Beecham); vierwertiges Guanylhydrazon CNI-1493 (Picower Institute); Gewebefaktor-Syntheseweg-Inhibitor (TFPI; Chiron); PHP (chemisch modifiziertes Hämoglobin; APEX Bioscience); Eisen-Chelatoren und -Chelate, einschließlich Diethylenetriamin-Pentaessigsäure-Eisen(III)-Komplex (DTPA-Eisen(III); Molichem Medicines); Lisofyllin (synthetisches kleines Methylxanthinmolekül; Cell Therapeutics, Inc.); PGG-Glucan (wässriges lösliches β 1,3-Glucan; Alpha-Beta Technology); Apolipoprotein A-1, rekonstituiert mit Lipiden; chirale Hydroxamsäuren (synthetische antibakterielle Mittel, die die Lipid A-Biosynthese hemmen); Anti-Endotoxin-Antikörper; E5531 (synthetischer Lipid A-Antagonist; Eisai America, Inc.); rBPI₂₁ (rekombinantes N-terminales Fragment des humanen Bakterizid/Permeabilitäts-erhöhenden Proteins); und synthetische Anti-Endotoxin-Peptide (SAEP; BiosYnth Research Laboratories).

[0099] Nicht-beschränkende Beispiele für therapeutische Mittel gegen das Adult-Respiratory-Distress-Syndrom (ARDS), mit denen der erfindungsgemäße Antikörper oder Antikörperbereich kombiniert werden kann, umfassen folgende: Anti-IL-8-Antikörper; Surfactant-Ersatztherapie; CDP-571/BAY-10-3356 (humanisierter Anti-TNF α -Antikörper; Celltech/Bayer); cA2 (chimerer Anti-TNF α -Antikörper; Centocor); 75 kd-TNFR-IgG (75 kd TNF-Rezeptor-IgG-Fusionsprotein; Immunex; siehe beispielsweise Arthritis & Rheumatism (1994) Band 37, S295; J. Invest. Med. (1996) Band 44, 235A); und 55 kd-TNFR-IgG (55 kd TNF-Rezeptor-IgG-Fusionsprotein; Hoffmann-LaRoche).

[0100] Die Verwendung der erfindungsgemäßen Antikörper oder Antikörperbereiche zusammen mit weiteren therapeutischen Mitteln ist ferner in dem Unterabschnitt N beschrieben.

[0101] Die erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzungen können eine "therapeutisch wirksame Menge" oder eine "prophylaktisch wirksame Menge" des erfindungsgemäßen Antikörpers oder Antikörperbereichs enthalten. Eine "therapeutisch wirksame Menge" steht für eine Menge, die wirksam ist, in Dosierungen und über Zeiträume, die notwendig sind, um das gewünschte therapeutische Ergebnis zu erzielen. Die "therapeutisch wirksame Menge" des Antikörpers oder Antikörperbereichs kann in Abhängigkeit von Faktoren, wie dem Erkrankungszustand, Alter, Geschlecht und Gewicht des Individuums, sowie der Fähigkeit des Antikörpers oder Antikörperbereichs, eine gewünschte Antwort in dem Individuum hervorzurufen, schwanken. Eine "therapeutisch wirksame Menge" ist auch eine, bei der jegliche toxische oder schädliche Wirkungen des Antikörpers oder Antikörperbereichs durch den vorteilhaften therapeutischen Effekt übertroffen werden. Eine "prophylaktisch wirksame Menge" steht für eine Menge, die wirksam ist, in Dosierungen und über Zeiträume, die notwendig sind, um das gewünschte prophylaktische Ergebnis zu erzielen. Da eine prophylaktische Dosis einem Subjekt vor der Erkrankung oder zu einem frühen Stadium der Erkrankung gegeben wird, liegt die "prophylaktisch wirksame Menge" typischerweise unter der therapeutisch wirksamen Menge.

[0102] Dosierungspläne können so eingestellt werden, dass die bestmögliche gewünschte Antwort erzielt wird (z. B. eine therapeutische oder prophylaktische Antwort). Es können beispielsweise ein einziger Bolus oder mehrere über einen Zeitraum verteilte Teildosen verabreicht werden oder die Dosis kann je nach Anforderung der therapeutischen Situation proportional verringert oder erhöht werden. Es ist besonders vorteilhaft parenterale Zusammensetzungen in Dosierungseinheiten zu formulieren, die leicht zu verabreichen sind und bei denen die Dosierungsform einheitlich ist. Dosierungsform, wie hier verwendet, steht für physisch diskrete Einheiten, die als Einzeldosierungen für zu behandelnde Säugetier-Subjekte geeignet sind; jede Einheit enthält eine vorbestimmte Menge des Wirkstoffs, so berechnet, dass die gewünschte therapeutische Wirkung erzielt wird, zusammen mit dem benötigten pharmazeutischen Träger. Die Spezifikation der erfindungsgemäßen Dosierungsformen werden durch (a) die spezifischen Eigenschaften des Wirkstoffs und insbesondere des zu erzielenden therapeutischen oder prophylaktischen Effekts und (b) die Beschränkungen der Compoundierungs-technik für solche Wirkstoffe zur Behandlung der Sensitivität in Individuen vorgegeben sein oder direkt von diesen abhängen.

[0103] Ein Beispiel eines nicht-beschränkenden Bereichs einer therapeutisch oder prophylaktisch wirksamen Menge eines erfindungsgemäßen Antikörpers oder Antikörperbereichs beträgt 0,1–20 mg/kg, weiter bevorzugt 1–10 mg/kg. Es sei erwähnt, dass die Dosierungswerte mit dem Typ und der Schwere des zu lindernden Zustands variieren. Es versteht sich ferner, dass bei einem bestimmten Subjekt der spezifische Dosierungsplan über die Zeit gemäß den individuellen Bedürfnissen und der professionellen Bewertung der verabreichenden oder die Verabreichung der Zusammensetzungen überwachenden Person angepasst werden sollte, und dass die hier angegebenen Dosierungen nur Beispiele sind und den Umfang oder die Verwendung der beanspruch-

ten Zusammensetzung in keiner Weise beschränken.

IV. Verwendung der erfindungsgemäßen Antikörper

[0104] Aufgrund ihrer Fähigkeit, an hTNF α zu binden, können die erfindungsgemäßen Anti-hTNF α -Antikörper oder Teile davon verwendet werden, um hTNF α (z. B. in einer biologischen Probe wie Serum oder Plasma) mit Hilfe eines herkömmlichen Immunoassays, wie einem Enzymimmunoassay (ELISA), einem Radioimmunoassay (RIA) oder von Gewebeimmunochemie nachzuweisen. Die Erfindung stellt ein Verfahren zum Nachweis von hTNF α in einer biologischen Probe bereit, wobei man eine biologische Probe mit einem erfindungsgemäßen Antikörper oder einem Antikörperbereich zusammenbringt und entweder den an hTNF α gebundenen Antikörper (oder Antikörperbereich) oder den nicht-gebundenen Antikörper (oder Antikörperbereich) ermittelt, um dadurch hTNF α in der biologischen Probe nachzuweisen. Der Antikörper wird direkt oder indirekt mit einer nachweisbaren Substanz markiert, um den Nachweis des gebundenen oder ungebundenen Antikörpers zu erleichtern. Geeignete Nachweissubstanzen umfassen verschiedene Enzyme, prostethische Gruppen, fluoreszierende Materialien, lumineszierende Materialien und radioaktive Materialien. Beispiele geeigneter Enzyme umfassen Meerrettichperoxidase, alkalische Phosphatase, β -Galactosidase oder Acetylcholinesterase; Beispiele für geeignete prostethische Gruppen-Komplexe umfassen Streptavidin/Biotin und Avidin/Biotin; Beispiele geeigneter fluoreszierender Materialien umfassen Umbelliferon, Fluoreszin, Fluoreszinisothiocyanat, Rhodamin, Dichlortriazinylamin-fluoreszein, Dansylchlorid oder Phycoerythrin; ein Beispiel für ein lumineszierendes Material umfasst Luminol und Beispiele geeigneter radioaktiver Materialien umfassen ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S oder ^3H .

[0105] Alternativ zur Markierung des Antikörpers kann hTNF α in biologisch Fluiden durch einen Kompetitions-Immunoassay mit Hilfe rhTNF α -Standards, die mit einer nachweisbaren Substanz markiert sind, und einem unmarkierten Anti-hTNF α -Antikörper nachgewiesen werden. In diesem Assay werden die biologische Probe, die markierten rhTNF α -Standards und der Anti-hTNF α -Antikörper zusammengebracht, und die Menge des markierten rhTNF α -Standards, der an den unmarkierten Antikörper bindet, wird bestimmt. Die Menge an hTNF α in der biologischen Probe ist umgekehrt proportional zu der Menge des markierten, an den Anti-hTNF α -Antikörper gebundenen rhTNF α -Standards.

[0106] Ein erfindungsgemäßer D2E7-Antikörper kann auch zum Nachweis von TNF α aus anderen Arten als dem Menschen, insbesondere TNF α s aus Primaten (z. B. Schimpansen, Pavian, Krallenaffe, Zynomologus und Rhesus}, Schwein und Maus verwendet werden, da D2E7 an all diese TNF α s binden kann (ferner beschrieben in Beispiel 4, Unterabschnitt E).

[0107] Die erfindungsgemäßen Antikörper und Antikörperbereiche sind fähig, die hTNF α -Aktivität sowohl in vitro als auch in vivo zu neutralisieren (siehe Beispiel 4). Ferner können wenigstens einige der erfindungsgemäßen Antikörper, wie D2E7, die TNF α -Aktivität anderer Arten neutralisieren. Daher können die erfindungsgemäßen Antikörper und Antikörperbereiche zur Hemmung der TNF α -Aktivität verwendet werden, z. B. in einer hTNF α -haltigen Zellkultur in Menschen oder in anderen Säugetier-Subjekten, die TNF α s besitzen, mit denen der erfindungsgemäße Antikörper kreuzreagiert (z. B. Schimpanse, Pavian, Krallenaffe, Zynomologus und Rhesus), Schwein oder Maus. In einer erfindungsgemäßen Ausführungsform wird ein Verfahren zum Hemmen der TNF α -Aktivität bereitgestellt, wobei man TNF α mit einem erfindungsgemäßen Antikörper oder Antikörperbereich zusammenbringt, um die TNF α -Aktivität zu hemmen. Das TNF α ist vorzugsweise humanes TNF α . Beispielsweise kann man in einer Zellkultur, die hTNF α enthält oder von der angenommen wird, dass sie hTNF α enthält, einen erfindungsgemäßen Antikörper oder Antikörperbereich in das Kulturmedium gegeben, um die hTNF α -Aktivität in der Kultur zu hemmen.

[0108] Eine weitere erfindungsgemäße Ausführungsform betrifft ein Verfahren zum Hemmen der TNF α -Aktivität in einem Subjekt, welches unter einer Krankheit leidet, bei der die TNF α -Aktivität schädlich ist. TNF α wurde mit der Pathophysiologie einer großen Vielzahl von Erkrankungen in Verbindung gebracht (siehe beispielsweise Moeller, A. et al. (1990) Cytokine 2: 162–169; das U.S.-Patent Nr. 5,231,024 von Moeller et al.; die europäische Patentveröffentlichung Nr. 260 610 B1 von Moeller, A.). Die Erfindung stellt Verfahren zur Hemmung der TNF α -Aktivität in einem Subjekt bereit, das unter einer solchen Krankheit leidet, wobei man bei dem Verfahren einen erfindungsgemäßen Antikörper oder Antikörperbereich an ein Subjekt verabreicht, um die TNF α -Aktivität in dem Subjekt zu hemmen. Vorzugsweise ist das TNF α humanes TNF α und das Subjekt ein Mensch. Alternativ kann das Subjekt ein Säugetier sein, welches ein mit dem erfindungsgemäßen Antikörper kreuzreagierendes TNF α exprimiert. Das Subjekt kann auch ein Säugetier sein, in das hTNF α (z. B. durch Verabreichen von hTNF α oder durch Expression eines hTNF α -Transgens) eingeführt wurde. Ein erfindungsgemäßer Antikörper kann einem Menschen zu therapeutischen Zwecken (nachstehend ausführlicher beschrieben) verabreicht werden. Ferner kann ein erfindungsgemäßer Antikörper zu veterinärmedizinischen Zwecken oder als Tiermodell für menschliche Erkrankungen an ein nicht-humaner Säugetier verabreicht werden, welches ein mit dem Antikörper kreuzreagierendes TNF α exprimiert. Was den letzteren Zweck angeht, so können solche Tiermodelle nützlich sein, um die therapeutische Wirkung der erfindungsgemäßen Antikörper abzuschätzen (z. B. Testen der Dosierungen und des Zeitverlaufs der Verabreichung).

[0109] Der hier verwendete Begriff „eine Störung, bei der die TNF α -Aktivität schädlich ist“ umfasst Erkrankungen und andere Störungen, bei denen gezeigt werden konnte oder von denen vermutet wird, dass das Vorliegen von TNF α in einem unter der Erkrankung leidenden Subjekt entweder für die Pathophysiologie der Erkrankung verantwortlich ist oder ein Faktor ist, der zur Verschlechterung der Erkrankung beiträgt. Demnach ist eine Störung, bei der die TNF α -Aktivität schädlich ist, eine Störung, bei der man davon ausgeht, dass die Hemmung der TNF α -Aktivität die Symptome und/oder das Fortschreiten der Störung lindert. Solche Störungen zeigen sich beispielsweise durch einen Anstieg der TNF α -Konzentration in einem biologischen Fluid eines Subjekts, das unter der Störung leidet (z. B. einen Anstieg der TNF α -Konzentration im Serum, Plasma, der Synovia usw. des Subjekts), was beispielsweise mit Hilfe des oben beschriebenen Anti-TNF α -Antikörpers nachgewiesen werden kann. Es gibt zahlreiche Beispiele für Erkrankungen, in denen die TNF α -Aktivität störend ist. Die Verwendung der erfindungsgemäßen Antikörper und Antikörperbereiche bei der Behandlung spezifischer Erkrankungen wird nachstehend ausführlicher beschrieben:

A. Sepsis

[0110] Der Tumor-Nekrose-Faktor hat eine anerkannte Rolle bei der Pathophysiologie von Sepsis, mit biologischen Wirkungen, einschließlich Hypotonie, Herzmuskel-Suppression, dem vaskulären Leck-Syndrom, Organnekrose, der Stimulierung der Freisetzung toxischer Sekundärmediatoren und der Aktivierung der Gerinnungskaskade (siehe beispielsweise Moeller, A. et al. (1990) Cytokine 2: 162–169; das U.S.-Patent Nr. 5,231,024 von Moeller et al.; die europäische Patentveröffentlichung Nr. 260 610 B1 von Moeller, A.; Tracey, K. J. und Cerami, A. (1994) Annu. Rev. Med. 45: 441–503; Russell, D. und Thompson, R. C. (1993) Curr. Opin. Biotech. 4: 714–721). Die erfindungsgemäßen humanen Antikörper und Antikörperbereiche können entsprechend zur Behandlung von Sepsis in all seinen klinischen Erscheinungsformen verwendet werden, einschließlich septischem Schock, endotoxischem Schock, Gram-negativer Sepsis und dem toxischen Schocksyndrom.

[0111] Ferner kann man, um Sepsis zu behandeln, einen erfindungsgemäßen Anti-hTNF α -Antikörper oder Antikörperbereich gemeinsam mit einem oder mehreren zusätzlichen therapeutischen Mitteln verabreichen, welche die Sepsis weiter lindern können, wie einem Interleukin-1-Inhibitor (wie denjenigen, die in den PCT-Veröffentlichungen Nr. WO 92/16221 und WO 92/17583 beschrieben sind), dem Cytokin Interleukin-6 (siehe beispielsweise die PCT-Veröffentlichung Nr. WO 93/11793) oder einem Antagonisten des Blutplättchen-aktivierenden Faktors (siehe beispielsweise die europäische Patentanmeldung Nr. EP 374 510). Weitere Kombinationstherapien zur Behandlung von Sepsis sind ausführlicher in Unterabschnitt III beschrieben.

[0112] Ferner wird in einer bevorzugten Ausführungsform ein erfindungsgemäßer Anti-TNF α -Antikörper oder Antikörperbereich an einen Menschen aus einer Untergruppe von Sepsispatienten mit einer IL-6-Serum- oder -Plasma-Konzentration über 500 pg/ml und weiter bevorzugt über 1000 pg/ml zum Zeitpunkt der Behandlung verabreicht (siehe die PCT-Veröffentlichung Nr. WO 95/20978 von Daum, L. et al.).

B. Autoimmunerkrankungen

[0113] Der Tumor-Nekrose-Faktor wurde mit einer Rolle bei der Pathophysiologie einer Vielzahl Autoimmunerkrankungen in Verbindung gebracht. TNF α wurde beispielsweise mit der Aktivierung von Gewebeentzündungen und der Verursachung von Gelenkzerstörungen bei rheumatoider Arthritis in Verbindung gebracht (siehe beispielsweise Moeller, A. et al. (1990) Cytokine 2: 162–169; das U.S.-Patent Nr. 5,231,024 von Moeller et al.; die europäische Patentveröffentlichung Nr. 260 610 B1 von Moeller, A.; Tracey und Cerami, siehe oben; Arend, W. P. und Dayer, J. M. (1995) Arth. Rheum. 38: 151–160; Fava, R. A. et al. (1993) Clin. Exp. Immunol. 94: 261–266). TNF α wurde auch damit in Verbindung gebracht, dass es den Tod von Inselzellen fördert und eine Insulinresistenz bei Diabetes vermittelt (siehe beispielsweise Tracey und Cerami, siehe oben; die PCT-Veröffentlichung Nr. WO 94/08609). TNF α wurde auch mit der Vermittlung einer Zytotoxizität bei Oligodendrozyten und einer Induktion von entzündlichen Plaques bei multipler Sklerose in Verbindung gebracht (siehe beispielsweise Tracey und Cerami, siehe oben). Chimere und humanisierte Maus-anti-hTNF α -Antikörper wurden klinisch hinsichtlich der Behandlung von rheumatoider Arthritis getestet (siehe beispielsweise Elliott, M. J. et al. (1994) Lancet 344: 1125–1127; Elliott, M. J. et al. (1994) Lancet 344: 1105–1110; Rankin, E. C., et al. (1995) Br. J. Rheumatol. 34: 334–342).

[0114] Die erfindungsgemäßen Antikörper und Antikörperbereiche können zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen verwendet werden, insbesondere denen, die mit Entzündungen einhergehen, einschließlich rheumatoider Arthritis, rheumatoider Spondylitis, Osteoarthritis und Gichtarthritis, Allergie, Multipler Sklerose, Autoimmundiabetes, Autoimmunuveitis und Nephrose. Typischerweise wird der Antikörper oder der Antikörperbereich systemisch verabreicht, obwohl bei bestimmten Erkrankungen die lokale Verabreichung des Antikörpers oder Antikörperbereichs an der Entzündungsstelle vorteilhaft sein kann, (z. B. die lokale Verabreichung an die Gelenke bei rheumatoider Arthritis oder die topische Verabreichung bei diabetischen Geschwüren, alleine oder in Kombination mit einem Cyclohexan-yliden-Derivat, wie beschrieben in der PCT-Veröffentlichung

Nr. WO 93/19751). Ein erfindungsgemäßer Antikörper oder Antikörperbereich kann auch zusammen mit einem oder mehreren zusätzlichen therapeutischen Mitteln verabreicht werden, die bei der Behandlung von Autoimmunerkrankungen nützlich sind, wie ferner in Unterabschnitt III beschrieben.

C. Infektiöse Erkrankungen

[0115] Der Tumor-Nekrose-Faktor wurde mit der Vermittlung biologischer Wirkungen in Verbindung gebracht, die bei einer Vielzahl infektiöser Erkrankungen beobachtet werden. TNF α wurde beispielsweise mit der Vermittlung von Gehirnentzündungen und Kapillararthrombose sowie der Infarktbildung bei Malaria in Verbindung gebracht. TNF α wurde auch mit der Vermittlung von Gehirnentzündungen, einschließlich dem Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke, dem Auslösen des septischen Schocksyndroms und der Aktivierung des venösen Infarkts bei Meningitis in Verbindung gebracht. TNF α wurde auch mit der Induzierung von Kachexie, dem Stimulieren der viralen Proliferation und der Vermittlung von Schäden im Zentralnervensystem bei dem erworbenen Immunschwächesyndrom (AIDS) in Verbindung gebracht. Demnach können die erfindungsgemäßen Antikörper und Antikörperbereiche bei der Behandlung infektiöser Erkrankungen, einschließlich bakterieller Meningitis (siehe beispielsweise die europäische Patentanmeldung Nr. EP 585 705), zerebraler Malaria, AIDS und AIDS-verwandten Komplexen (ARC) (siehe beispielsweise die europäische Patentanmeldung Nr. EP 230 574) sowie Cytomegalovirus-Infektionen als Folge von Transplantationen (siehe beispielsweise Fietze, E., et al. (1994) Transplantation 58: 675-680) verwendet werden. Die erfindungsgemäßen Antikörper und Antikörperbereiche können auch zum Lindern von Symptomen verwendet werden, die mit infektiösen Erkrankungen assoziiert sind, einschließlich Fieber und Myalgie aufgrund von Infektionen (wie Influenza) und Kachexie aufgrund von Infektionen (z. B. aufgrund von AIDS oder ARC).

D. Transplantation

[0116] Der Tumor-Nekrose-Faktor wurde mit einem Schlüsselmediator für die Transplantatabstoßung und die Transplantat-Wirt-Reaktion (GVHD) sowie mit der Vermittlung einer Gegenreaktion, die man beobachtet, wenn man den gegen den T-Zell-Rezeptor-CD3-Komplex gerichteten Ratten-Antikörper OKT3 verwendet, um die Abstoßung von Nierentransplantaten zu hemmen, in Verbindung gebracht (siehe beispielsweise Eason, J. D., et al. (1995) Transplantation 59: 300-305; Suthanthiran, M. und Strom, T. B. (1994) New Engl. J. Med. 331: 365-375). Die erfindungsgemäßen Antikörper und Antikörperbereiche können demnach verwendet werden, um die Transplantatabstoßung, einschließlich der Abstoßung von Allotransplantaten und Xenotransplantaten zur Hemmung der GVHD, zu hemmen. Obwohl der Antikörper oder Antikörperbereich alleine verwendet werden kann, wird er vorzugsweise in Kombination mit einem oder mehreren Mitteln verwendet, die die Immunantwort gegen das Allotransplantat hemmen oder die GVHD inhibieren. In einer Ausführungsform wird der erfindungsgemäße Antikörper oder Antikörperbereich beispielsweise zusammen mit OKT3 verwendet, um OKT3-induzierte Reaktionen zu hemmen. In einer weiteren Ausführungsform wird ein erfindungsgemäßer Antikörper oder Antikörperbereich in Kombination mit einem oder mehreren Antikörpern verwendet, die gegen weitere Ziele gerichtet sind, welche an der Regulierung von Immunantworten beteiligt sind, wie die Zell-Oberflächenmoleküle CD25 (Interleukin-2-Rezeptor- α), CD11 α (LFA-1), CD54 (ICAM-1), CD4, CD45, CD28/CTLA4, CD80 (B7-1) und/oder CD86 (B7-2). In einer weiteren Ausführungsform wird der erfindungsgemäße Antikörper oder Antikörperbereich zusammen mit einem oder mehreren allgemein immunsuppressiven Mitteln, wie Cyclosporin A oder FK506 verwendet.

E. Malignität

[0117] Der Tumor-Nekrose-Faktor wurde mit der Induzierung von Kachexie, dem Stimulieren des Tumorwachstums, der Förderung des metastatischen Potentials und der Vermittlung von Zytotoxizität in Malignitäten in Verbindung gebracht. Die erfindungsgemäßen Antikörper und Antikörperbereiche können daher zur Behandlung von Malignitäten verwendet werden, um das Tumorwachstum oder die Metastasierung zu hemmen und/oder die durch eine Malignität hervorgerufene Kachexie zu lindern. Der Antikörper oder Antikörperbereich kann systemisch oder lokal auf die Tumorstelle verabreicht werden.

F. Lungenerkrankungen

[0118] Der Tumor-Nekrose-Faktor wurde mit der Pathophysiologie des Adult-Respiratory-Distress-Syndroms (ARDS), einschließlich der Stimulierung der Leukozyten-Endothel-Aktivierung, dem Lenken von Zytotoxizität auf Pneumozyten und dem Induzieren des vaskulären Lecksyndroms, in Verbindung gebracht. Die erfindungsgemäßen Antikörper und Antikörperbereiche können demnach verwendet werden, um verschiedene Lungenerkrankungen, einschließlich dem Adult-Respiratory-Distress-Syndrom (siehe beispielsweise die PCT-Ver-

öffentlichung Nr. WO 91/04054), der Schocklunge, der chronischen entzündlichen Lungenerkrankung, Lungen- sarkoidose, Lungenfibrose und Silikose, zu behandeln. Der Antikörper oder Antikörperbereich kann systemisch oder lokal auf die Lungenfläche aufgebracht werden, beispielsweise als Aerosol. Der erfindungsgemäße Antikörper oder Antikörperbereich kann auch mit einem oder mehreren zusätzlichen therapeutischen Mitteln, die zur Behandlung von Lungenerkrankungen nützlich sind, verabreicht werden, wie weiter in Unterabschnitt III beschrieben.

G. Darmerkrankungen

[0119] Der Tumor-Nekrose-Faktor wurde mit der Pathophysiologie entzündlicher Darmerkrankungen in Verbindung gebracht (siehe beispielsweise Tracy, K. J. et al. (1986) *Science* 234: 470–474; Sun, X.-M. et al. (1988) *J. Clin. Invest.* 81: 1328–1331; MacDonal, T. T. et al. (1990) *Clin. Exp. Immunol.* 81: 301–305). Chimere Maus-anti-hTNF α -Antikörper wurden klinisch für die Behandlung der Crohn's-Erkrankung untersucht (van Dullemen, H. M. et al. (1995) *Gastroenterology* 109: 129–135). Die erfindungsgemäßen humanen Antikörper und Antikörperbereiche können auch zur Behandlung von Darmerkrankungen verwendet werden, wie der idiopathischen entzündlichen Darmerkrankung, welche zwei Syndrome umfasst: die Crohn's-Erkrankung und Colitis ulcerosa. Ein erfindungsgemäßer Antikörper oder Antikörperbereich kann auch mit einem oder mehreren zusätzlichen therapeutischen Mitteln, die für die Behandlung von Darmerkrankungen nützlich sind, verabreicht werden, wie weiter in Unterabschnitt III beschrieben.

H. Herzerkrankungen

[0120] Die erfindungsgemäßen Antikörper und Antikörperbereiche können auch zur Behandlung verschiedener Herzerkrankungen, einschließlich Ischmie des Herzens (siehe beispielsweise die europäische Patentanmeldung Nr. EP 453 898) und Herzinsuffizienz (Schwäche des Herzmuskels) (siehe beispielsweise die PCT-Veröffentlichung Nr. WO 94/20139) verwendet werden.

I. Weitere

[0121] Die erfindungsgemäßen Antikörper und Antikörperbereiche können auch zur Behandlung weiterer Erkrankungen verwendet werden, in denen die TNF α -Aktivität schädlich ist. Beispiele weiterer Erkrankungen und Störungen, bei denen die TNF α -Aktivität mit der Pathophysiologie in Verbindung gebracht wurde und welche daher mit dem erfindungsgemäßen Antikörper oder Antikörperbereich behandelt werden können, umfassen entzündliche Knochenerkrankungen und Knochen-Resorptions-Erkrankungen (siehe beispielsweise Bertolini, D. R., et al. (1986) *Nature* 319: 516–518; Konig, Al. et al. (1988) *J. Bone Miner. Res.* 3: 621–627; Lerner, U. H. und Ohlin, A. (1993) *J. Bone Miner. Res.* 8: 147–155; und Shankar, G. und Stern, P. H. (1993) *Bone* 14: 871–876), Hepatitis, einschließlich alkoholischer Hepatitis (siehe beispielsweise McClain, C. J. und Cohen, D. A. (1989) *Hepatology* 9: 349–351; Felver, M. E. et al. (1990) *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 14: 255–259; und Hansen, J. et al. (1994) *Hepatology* 20: 461–474), virale Hepatitis (Sheron, N. et al. (1991) *J. Hepatol.* 12: 241–245; und Hussain, M. J. et al. (1994) *J. Clin. Pathol.* 47: 1112–1115) und fulminante Hepatitis; Gerinnungsstörungen (siehe beispielsweise van der Poll, T. et al. (1990) *N. Engl. J. Med.* 322: 1622–1627; und van der Poll, T. et al. (1991) *Prog. Clin. Biol. Res.* 367: 55–60), Verbrennungen (siehe beispielsweise Giroir, B. P. et al. (1994) *Am. J. Physiol.* 267: H118–124; und Liu, X. S. et al. (1994) *Burns* 20: 40–44), Neudurchblutungsverletzungen (siehe beispielsweise Scales, W. E. et al. (1994) *Am. J. Physiol.* 267: G1122–1127; Serrick, C. et al. (1994) *Transplantation* 58: 1158–1162; und Yao, Y. M. et al. (1995) *Resuscitation* 29: 157–168), Keloidbildung (siehe beispielsweise McCauley, R. L. et al. (1992) *J. Clin. Immunol.* 12: 300–308), die Bildung von Narbengewebe; Fieber; Peridontalerkrankungen; Fettleibigkeit und Toxizität durch Bestrahlung.

[0122] Die Erfindung wird nun durch nachfolgende Beispiele verdeutlicht, die nicht als beschränkend anzusehen sind. Der Inhalt aller Referenzen, Patente und veröffentlichter Patentanmeldungen, die in dieser Anmeldung zitiert sind, sind hierin durch die Bezugnahme enthalten.

BEISPIEL 1: Kinetische Analyse der Bindung von humanen Antikörpern an hTNF α

[0123] Echtzeit-Bindungswechselwirkungen zwischen Ligand (biotinyliertem rekombinantem humanem TNF α (rhTNF α), immobilisiert auf einer Biosensor-Matrix) und Analyt (Antikörper in Lösung) wurden durch Oberflächen-Plasmon-Resonanz (SPR) mit Hilfe des BIACore-Systems (Pharmacia Biosensor, Piscataway, NJ) gemessen. Das System verwendet die optischen Eigenschaften der SPR, um Veränderungen in der Proteinkonzentration in einer Dextran-Biosensor-Matrix festzustellen. Proteine werden in bekannten Konzentrationen kovalent an die Dextran-Matrix gebunden. Antikörper werden durch die Dextran-Matrix injiziert und die spezifische Bindung zwischen injizierten Antikörpern und immobilisiertem Ligand führt zu einer erhöhten Ma-

trix-Protein-Konzentration und einer daraus folgenden Veränderung des SPR-Signals. Diese Veränderungen des SPR-Signals werden als Resonanzeneinheiten (RU) aufgezeichnet und in Abhängigkeit von der Zeit entlang der Y-Achse eines Sensorgramms dargestellt.

[0124] Um die Immobilisierung der biotinylierten rhTNF α auf der Biosensor-Matrix zu erleichtern, wurde Streptavidin kovalent über freie Aminogruppen an die Dextranmatrix gebunden, indem man zunächst die Carboxylgruppen auf der Matrix mit 100 mM N-Hydroxysuccinimid (NHS) und 400 mM N-Ethyl-N'-(3-diethylamino-propyl)carbodiimidhydrochlorid (EDC) aktivierte. Als nächstes wurde Streptavidin über die aktivierte Matrix injiziert. 35 μ l Streptavidin (25 μ g/ml), verdünnt in Natriumacetat, pH 4,5, wurden über den aktivierte Biosensor injiziert und freie Amine auf dem Protein wurden direkt an die aktivierte Carboxylgruppen gebunden. Nicht-umgesetzte Matrix-EDC-Ester wurden durch die Injektion von 1 M Ethanolamin inaktiviert. Streptavidin-gekoppelte Biosensorchips sind auch gewerblich erhältlich (Pharmacia BR-1000-16, Pharmacia Biosensor, Piscataway, NJ).

[0125] Biotinyliertes rhTNF α wurde hergestellt, indem man zunächst 5,0 mg Biotin (D-Biotinyle-aminocapron-säure-N-hydroxysuccinimidester; Boehringer Mannheim Katalog Nr. 1008 960) in 500 μ l Dimethylsulfoxid löste, um eine 10 mg/ml-Lösung herzustellen. 10 μ l Biotin wurden pro ml rhTNF α (bei 2,65 mg/ml) zugegeben, so dass man ein Molverhältnis von Biotin zu rhTNF α von 2 : 1 erhielt. Der Reaktionsansatz wurde vorsichtig gemischt und 2 Stunden im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Eine PD-10-Säule, Sephadex G-25M (Pharmacia Katalog Nr. 17-0851-01) wurde mit 25 ml kaltem PBS äquilibriert und mit 2 ml rhTNF α -Biotin pro Säule beladen. Die Säule wurde mit 10 \times 1 ml kaltem PBS eluiert. Fraktionen wurden gewonnen und bei OD280 (1,0 OD = 1,25 mg/ml) ausgelesen. Die geeigneten Fraktionen wurden vereint und bis zum Gebrauch bei -80°C gelagert. Biotinyliertes rhTNF α ist auch gewerblich erhältlich (R & D Systems Katalog Nr. FTA00, Minneapolis, MN).

[0126] Biotinyliertes rhTNF α , das über Streptavidin auf der Matrix immobilisiert werden sollte, wurde in PBS-Laupuffer verdünnt (Gibco Katalog Nr. 14190-144, Gibco BRL, Grand Island, NY), der mit 0,05% (BIAcore) Surfactant-P20 (Pharmacia BR-1000-54, Pharmacia Biosensor, Piscataway, NJ) angereichert worden war. Um die Fähigkeit von rhTNF α -spezifischen Antikörpern, an immobilisiertes rhTNF α zu binden, zu bestimmen, wurde ein Bindungsassay wie folgt durchgeführt. Aliquots aus biotinyliertem rhTNF α (25 nM; 10 μ l-Aliquots) wurden mit einer Fließrate von 5 μ l/min durch die Streptavidin-gekoppelte Dextranmatrix injiziert. Vor dem Injizieren des Proteins und direkt danach ließ man PBS-Puffer alleine durch jede Zelle fließen. Der Nettouterschied im Signal zwischen der Grundlinie und etwa 30 Sekunden nach Abschluss der Injektion von biotinyliertem rhTNF α wurde als Bindungswert genommen (etwa 500 RU). Die direkte Bindung von rhTNF α -spezifischem Antikörper an immobilisiertes biotinyliertes rhTNF α wurde gemessen. Antikörper (20 μ g/ml) wurden in PBS-Laupuffer verdünnt und 25 μ l-Aliquots wurden mit einer Fließrate von 5 μ l/min durch die immobilisierten Proteinmatrices injiziert. Vor der Injektion des Antikörpers und direkt danach ließ man PBS-Puffer alleine durch jede Zelle fließen. Der Nettouterschied zwischen dem Grundliniensignal und dem Signal nach Abschluss der Antikörperinjektion wurde als Bindungswert für jedes Beispiel genommen. Die Biosensor-Matrices wurden mit Hilfe von 100 mM HCl vor dem Injizieren der nächsten Probe regeneriert. Um die Konstanten für die Dissoziationsrate (K_{off}), die Bindungsrate (K_{on}), die Assoziationsrate (K_a) und die Dissoziationsrate (K_d) zu bestimmen, wurden die BIAcore-Kinetik-Auswertungssoftware (Version 2.1) verwendet.

[0127] Repräsentative Ergebnisse der D2E7- (Full-Length-IgG4-Antikörper) Bindung an biotinyliertes rhTNF α im Vergleich zu dem mAb Maus-MAK-195 (F(ab')₂-Fragment) sind nachstehend in Tabelle 1 gezeigt.

Tabelle 1: Bindung von D2E7-IgG4 bzw. MAK-195 an biotinyliertes rhTNF α

Antikörper	[Ab], nM	rhTNF α , gebunden, RUs	Ab, gebunden, RUs	rhTNF α /Ab	K_{off} , s $^{-1}$, (Mittelwert)
D2E7	267	373	1215	1,14	$8,45 \times 10^{-5}$
	133	420	1569	1,30	$5,42 \times 10^{-5}$
	67	434	1633	1,31	$4,75 \times 10^{-5}$
	33	450	1532	1,19	$4,46 \times 10^{-5}$
	17	460	1296	0,98	$3,47 \times 10^{-5}$
	8	486	936	0,67	$2,63 \times 10^{-5}$
	4	489	536	0,38	$2,17 \times 10^{-5}$
	2	470	244	0,18	$3,68 \times 10^{-5}$ ($4,38 \times 10^{-5}$)
MAK 195	400	375	881	1,20	$5,38 \times 10^{-5}$
	200	400	1080	1,38	$4,54 \times 10^{-5}$
	100	419	1141	1,39	$3,54 \times 10^{-5}$
	50	427	1106	1,32	$3,67 \times 10^{-5}$
	25	446	957	1,09	$4,41 \times 10^{-5}$
	13	464	708	0,78	$3,66 \times 10^{-5}$
	6	474	433	0,47	$7,37 \times 10^{-5}$
	3	451	231	0,26	$6,95 \times 10^{-5}$ ($4,94 \times 10^{-5}$)

[0128] In einer zweiten Versuchsreihe wurden die molekularkinetischen Wechselwirkungen zwischen einer IgG1-Full-Length-Form von D2E7 und biotinyliertem rhTNF α quantitativ mit Hilfe der BIACore-Technologie, wie oben beschrieben, untersucht und die in nachstehenden Tabellen 2, 3 und 4 zusammengefassten kinetischen Geschwindigkeitskonstanten wurden daraus abgeleitet.

Tabelle 2: Apparente Dissoziationsratenkonstanten für die Wechselwirkung zwischen D2E7 und biotinyliertem rhTNF

<u>Versuch</u>	k_d (s $^{-1}$)
1	$9,58 \times 10^{-5}$
2	$9,26 \times 10^{-5}$
3	$7,60 \times 10^{-5}$
Mittelwert	$8,81 \pm 1,06 \times 10^{-5}$

Tabelle 3: Apparente Assoziationsratenkonstanten für die Wechselwirkung zwischen D2E7 und biotinyliertem rhTNF

<u>Versuch</u>	k_a (M $^{-1}$, s $^{-1}$)
1	$1,33 \times 10^5$
2	$1,05 \times 10^5$
3	$3,36 \times 10^5$
Mittelwert	$1,91 \pm 1,26 \times 10^5$

Tabelle 4: Apparente kinetische Geschwindigkeits- und Affinitätskonstanten von D2E7 und biotinyliertem rhT-NF

<u>Versuch</u>	$k_a (M^{-1}, s^{-1})$	$k_d (s^{-1})$	$K_d (M)$
1	$1,33 \times 10^5$	$9,58 \times 10^{-5}$	$7,20 \times 10^{-10}$
2	$1,05 \times 10^5$	$9,26 \times 10^{-5}$	$8,82 \times 10^{-10}$
3	$3,36 \times 10^5$	$7,60 \times 10^{-5}$	$2,26 \times 10^{-10}$
Mittelwert	$1,91 \pm 1,26 \times 10^5$	$8,81 \pm 1,06 \times 10^{-5}$	$6,09 \pm 3,42 \times 10^{-10}$

[0129] Dissoziations- und Assoziationsratenkonstanten wurden durch Untersuchen der Dissoziations- und Assoziationsbereiche der Sensorgramme mit Hilfe der BIA-Analysesoftware berechnet. Herkömmliche chemische Reaktionskinetiken wurden für die Wechselwirkung zwischen D2E7 und einem biotinyliertem rhTNF-Molekül angenommen: eine Dissoziationskinetik nullter Ordnung und eine Assoziationskinetik erster Ordnung. Zum Zwecke der Analyse wurde bei der Auswahl der Molekülmodelle für die Analyse der kinetischen Daten nur die Wechselwirkung zwischen einem Gramm des zweiwertigen D2E7-Antikörpers und einer Einheit des dreiwertigen biotinylierten rhTNFs berücksichtigt. Drei unabhängige Versuche wurden durchgeführt und die Ergebnisse wurden getrennt analysiert. Die mittlere apparte Dissoziationsratenkonstante (k_d) der Wechselwirkung zwischen D2E7 und biotinyliertem rhTNF betrug $8,81 \pm 1,06 \times 10^{-5} s^{-1}$ und die mittlere apparte Assoziationsratenkonstante, k_a betrug $1,91 \pm 1,26 \times 10^5 M^{-1}s^{-1}$. Die apparte intrinsische Dissoziationskonstante (K_d) wurde dann durch die Formel: $K_d = k_d/k_a$ berechnet. Demnach betrug der mittlere K_d des D2E7-Antikörpers für rhTNF, der aus den kinetischen Parametern abgeleitet wurde, $6,09 \pm 3,42 \times 10^{-10} M$. Kleinere Unterschiede zwischen den kinetischen Werten der IgG1-Form von D2E7 (in den Tabellen 2, 3 und 4 gezeigt) und der IgG4-Form von D2E7 (in der Tabelle 1 und den Beispielen 2 und 3 gezeigt) werden nicht als echte Unterschiede, die auf das Vorliegen entweder der konstanten Region eines IgG1 oder eines IgG4 zurückgehen, gewertet, sondern vielmehr wird vermutet, dass sie auf genauere Antikörperkonzentrationsmessungen bei der kinetischen Analyse des IgG1 zurückgehen. Daher hält man die hier gezeigten kinetischen Werte für die IgG1-Form von D2E7 für die genauesten kinetischen Parameter des D2E7-Antikörpers.

BEISPIEL 2: Alanin-Scannin-Mutagenese der D2E7-CDR3-Domänen

[0130] Eine Reihe einzelner Alanin-Mutationen wurden durch Standardverfahren entlang der CDR3-Domäne der D2E7-VL- und D2E7-VH-Regionen eingeführt. Die Mutationen in der leichten Kette sind in **Fig. 1B** gezeigt (LD2E7*.A1, LD2E7*.A3, LD2E7*.A4, LD2E7*.A5, LD2E7*.A7 und LD2E7*.A8, und zwar mit einer Alanin-Mutation in Position 1, 3, 4, 5, 7 bzw. 8 für die D2E7-VL-CDR3-Domäne). Die Mutationen der schweren Kette sind in **Fig. 2B** gezeigt (HD2E7*.A1, HD2E7*.A2, HD2E7*.A3, HD2E7*.A4, HD2E7*.A5, HD2E7*.A6, HD2E7*.A7, HD2E7*.A8 und HD2E7*.A9, mit einer Alanin-Mutation in Position 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10 bzw. 11 der D2E7-VH-CDR3-Domäne). Die Kinetik der rhTNF α -Wechselwirkung mit einem Antikörper, der aus Wildtyp-D2E7-VL und -VH bestand, wurde mit der der Antikörper verglichen, die aus 1) einem Wildtyp-D2E7-VL, gepaart mit einem Alanin-substituierten D2E7-VH; 2) einem Wildtyp-D2E7-VH, gepaart mit einem Alanin-substituierten D2E7-VL; oder 3) einem Alanin-substituierten D2E7-VL, gepaart mit einem Alanin-substituierten D2E7-VH bestanden. Alle Antikörper wurden als Full-Length-IgG4-Moleküle getestet.

[0131] Die Kinetik der Wechselwirkung zwischen Antikörpern und rhTNF α wurde wie in Beispiel 1 beschrieben mittels Oberflächen-Plasmon-Resonanz bestimmt. Die K_{off} -Geschwindigkeiten der verschiedenen VH/VL-Paare sind nachstehend in Tabelle 5 zusammengefasst:

Tabelle 5: Bindung von D2E7-Alanin-Scan-Mutanten an biotinyliertes rhTNF α

<u>VH</u>	<u>VL</u>	<u>K_{off} (s⁻¹)</u>
D2E7 VH	D2E7 VL	9,65 x 10 ⁻⁵
HD2E7*.A1	D2E7 VL	1,4 x 10 ⁻⁴
HD2E7*.A2	D2E7 VL	4,6 x 10 ⁻⁴
HD2E7*.A3	D2E7 VL	8,15 x 10 ⁻⁴
HD2E7*.A4	D2E7 VL	1,8 x 10 ⁻⁴
HD2E7*.A5	D2E7 VL	2,35 x 10 ⁻⁴
HD2E7*.A6	D2E7 VL	2,9 x 10 ⁻⁴
HD2E7*.A7	D2E7 VL	1,0 x 10 ⁻⁴
HD2E7*.A8	D2E7 VL	3,1 x 10 ⁻⁴
HD2E7*.A9	D2E7 VL	8,1 x 10 ⁻⁴
D2E7 VH	LD2E7*.A1	6,6 x 10 ⁻⁵
D2E7 VH	LD2E7*.A3	nicht nachweisbar
D2E7 VH	LD2E7*.A4	1,75 x 10 ⁻⁴
D2E7 VH	LD2E7*.A5	1,8 x 10 ⁻⁴
D2E7 VH	LD2E7*.A7	1,4 x 10 ⁻⁴
D2E7 VH	LD2E7*.A8	3,65 x 10 ⁻⁴
HD2E7*.A9	LD2E7*.A1	1,05 x 10 ⁻⁴

[0132] Die Ergebnisse zeigen, dass der Großteil der Positionen der CDR3-Domänen der D2E7-VL-Region und -VH-Region durch die Substitution mit einem einzigen Alaninrest veränderbar sind. Die Substitution eines einzigen Alanins in Position 1, 4, 5 oder 7 der D2E7-VL-CDR3-Domäne oder in Position 2, 5, 6, 8, 9 oder 10 der D2E7-VH-CDR3-Domäne beeinflusst die Dissoziationsrate der hTNF α -Bindung nicht wesentlich im Vergleich zu dem parenteralen Wildtyp-D2E7-Antikörper. Die Substitution von Alanin in Position 8 der D2E7-VL-CDR3 oder in Position 3 der D2E7-VH-CDR3 führt zu einer 4-fach höheren K_{off} und eine Alanin-Substitution in Position 4 oder 11 der D2E7-VH-CDR3 zu einer 8-fach höheren K_{off}, was darauf hinweist, dass diese Positionen für die Bindung an hTNF α kritischer sind. Eine einzige Alanin-Substitution in Position 1, 4, 5, 7 oder 8 der D2E7-VL-CDR3-Domäne oder in Position 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10 oder 11 der D2E7-VH-CDR3-Domäne führt dennoch zu einem Anti-hTNF α -Antikörper mit einer K_{off} von 1 x 10⁻³ s.⁻¹ oder weniger.

BEISPIEL 3: Bindungsanalyse von D2E7-verwandten Antikörpern

[0133] Eine Reihe Antikörper, deren Sequenzen mit der von D2E7 verwandt sind, wurden mittels Oberflächen-Plasmon-Resonanz, wie in Beispiel 1 beschrieben, auf ihre Bindung an rhTNF α , und zwar im Vergleich zu D2E7, untersucht. Die Aminosäuresequenzen der getesteten VL-Regionen sind in **Fig. 1A** und **1B** gezeigt. Die Aminosäuresequenzen der getesteten VH-Regionen sind in **Fig. 2A** und **2B** gezeigt. Die K_{off}-Geschwindigkeiten der verschiedenen VH/VL-Paare (in der angegebenen Form, entweder als Full-Length-IgG1- oder -IgG4-Antikörper oder als scFV) sind nachstehend in Tabelle 6 zusammengefasst:

Tabelle 6: Bindung von D2E7-verwandten Antikörpern an biotinyliertes rhTNF α

<u>VH</u>	<u>VL</u>	<u>Form</u>	<u>K_{off} (s⁻¹)</u>
D2E7 VH	D2E7 VL	IgG1/IgG4	9,65 x 10 ⁻⁵
VH1-D2	LOE7	IgG1/IgG4	7,7 x 10 ⁻⁵
VH1-D2	LOE7	scFv	4,6 x 10 ⁻⁴
VH1-D2.N	LOE7.T	IgG4	2,1 x 10 ⁻⁵
VH1-D2.Y	LOE7.A	IgG4	2,7 x 10 ⁻⁵
VH1-D2.N	LOE7.A	IgG4	3,2 x 10 ⁻⁵
VH1-D2	EP B12	scFv	8,0 x 10 ⁻⁴
VH1-D2	2SD4 VL	scFv	1,94 x 10 ⁻³
3C-H2	LOE7	scFv	1,5 x 10 ⁻³
2SD4 VH	LOE7	scFv	6,07 x 10 ⁻³
2SD4 VH	2SD4 VL	scFv	1,37 x 10 ⁻²
VH1A11	2SD4 VL	scFv	1,34 x 10 ⁻²
VH1B12	2SD4 VL	scFv	1,01 x 10 ⁻²
VH1B11	2SD4 VL	scFv	9,8 x 10 ⁻³
VH1E4	2SD4 VL	scFv	1,59 x 10 ⁻²
VH1F6	2SD4 VL	scFv	2,29 x 10 ⁻²
VH1D8	2SD4 VL	scFv	9,5 x 10 ⁻³
VH1G1	2SD4 VL	scFv	2,14 x 10 ⁻²
2SD4 VH	EP B12	scFv	6,7 x 10 ⁻³
2SD4 VH	VL10E4	scFv	9,6 x 10 ⁻³
2SD4 VH	VL100A9	scFv	1,33 x 10 ⁻²
2SD4 VH	VL100D2	scFv	1,41 x 10 ⁻²
2SD4 VH	VL10F4	scFv	1,11 x 10 ⁻²
2SD4 VH	VLLOE5	scFv	1,16 x 10 ⁻²
2SD4 VH	VLL0F9	scFv	6,09 x 10 ⁻³

2SD4 VH	VLL0F10	scFv	$1,34 \times 10^{-2}$
2SD4 VH	VLLOG7	scFv	$1,56 \times 10^{-2}$
2SD4 VH	VLLOG9	scFv	$1,46 \times 10^{-2}$
2SD4 VH	VLLOH1	scFv	$1,17 \times 10^{-2}$
2SD4 VH	VLLOH10	scFv	$1,12 \times 10^{-2}$
2SD4 VH	VL1B7	scFv	$1,3 \times 10^{-2}$
2SD4 VH	VL1C1	scFv	$1,36 \times 10^{-2}$
2SD4 VH	VL1C7	scFv	$2,0 \times 10^{-2}$
2SD4 VH	VL0.1F4	scFv	$1,76 \times 10^{-2}$
2SD4 VH	VL0.1H8	scFv	$1,14 \times 10^{-2}$

[0134] Die langsamen Dissoziationsraten (d. h. $K_{off} 1 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$) der Full-Length-Antikörper (d. h. im IgG-Format) mit einer VL, ausgewählt aus D2E7, LOE7, LOE7.T und LOE7.A, welche entweder ein Threonin oder ein Alanin in Position 9 haben, zeigen, dass Position 9 der D2E7-VL-CDR3 von einem dieser zwei Reste besetzt sein kann, ohne dass die K_{off} wesentlich beeinflusst wird. Daher umfasst ein Konsensusmotiv für die D2E7-VL-CDR3 die Aminosäuresequenz: Q-R-Y-N-R-A-P-Y-(T/A) (SEQ ID NO: 3). Ferner zeigen die langsame Dissoziationsraten (d. h. $K_{off} 1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$) für Antikörper mit einer VH, die aus D2E7, VH1-D2.N und VH1-D2.Y ausgewählt sind, welche entweder ein Tyrosin oder ein Asparagin in Position 9 besitzen, dass die Position 12 der D2E7-VH-CDR3 durch einen dieser zwei Reste besetzt sein kann, ohne dadurch die K_{off} wesentlich zu beeinflussen. Demnach umfasst ein Konsensusmotiv für die D2E7-VH-CDR3 die Aminosäuresequenz: V-S-Y-L-S-T-A-S-S-L-D-(Y/N) (WO SEQ ID NO: 4).

[0135] Die in Tabelle 6 gezeigten Ergebnisse demonstrieren, dass, im scFV-Format, Antikörper mit der 2SD4-VL- oder -VH-CDR3-Region eine höhere K_{off} (d. h. $K_{off} 1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) zeigen als Antikörper, welche die D2E7-VL- oder -VH-CDR3-Region enthalten. Innerhalb der VL-CDR3 unterscheiden sich 2SD4 und D2E7 in Positionen 2, 5 und 9. Wie oben beschrieben, kann die Position 9 jedoch durch Ala (wie in 2SD4) oder Thr (wie in D2E7) besetzt sein, ohne dass der K_{off} wesentlich beeinflusst wird. Der Vergleich von 2SD4 und D2E7 zeigt, dass in den Positionen 2 und 5 der D2E7-VL-CDR3 beide Arginine entscheidend für die Assoziation des Antikörpers an hTNF α sind. Diese Reste könnten direkt als Kontaktreste in der Antikörperbindungsstelle beteiligt sein oder könnten entscheidend zur Aufrechterhaltung der Gerüststruktur des Antikörpermoleküls in dieser Region beitragen. Zur Wichtigkeit der Position 2 ist zu sagen, dass das Ersetzen von Arg (in LOE7, welches die gleiche VL CDR3 wie D2E7 hat) durch Lys (in EP B12) die Dissoziationsrate um einen Faktor 2 beschleunigt. Hinsichtlich der Wichtigkeit der Position 5 ist zu sagen, dass der Austausch von Arg (in D2E7) gegen Ala (in D2E7*.A5), wie in Beispiel 2 beschrieben, die Dissoziationsrate ebenfalls um das zweifache beschleunigt. Ferner ist die Dissoziationsrate um das fünffache höher, ohne dass ein Arg in Position 2 und 5 ist (in 2SD4). Dennoch sei erwähnt, dass, obwohl Position 5 wichtig für das Verbessern der Bindung an hTNF α ist, eine Veränderung in dieser Position im Vergleich zu Veränderungen in anderen Positionen zu vernachlässigen ist, wie man bei VLLOE4, VLLOH1 oder VL0.1H8 sehen kann.

[0136] Innerhalb der VH CDR3 unterscheiden sich 2SD4 und D2E7 in Position 1, 7 und 12. Wie oben beschrieben, kann die Position 12 jedoch durch Asn (wie in 2SD4) oder Tyr (wie in D2E7) besetzt sein, ohne dass der K_{off} wesentlich beeinflusst wird. Durch den Vergleich von 2SD4 und D2E7 lassen sich daher die Positionen 1 und 7 der D2E7 VH CDR3 als entscheidend für die Bindung an hTNF α ausmachen. Wie oben beschrieben, könnten diese Reste direkt als Kontaktreste an der Antikörper-Bindungsstelle beteiligt sein oder könnten wesentlich dazu beitragen, die Gerüststruktur des Antikörpermoleküls in diesem Bereich aufrechtzuerhalten. Beide Positionen sind wichtig für die Bindung an hTNF α , da, wenn man die 3C-H2-VH-CDR3 (welche eine Valin-zu-Alanin-Veränderung in Position 1 in Bezug auf die D2E7-VH-CDR3 enthält) verwendet, die scFV eine 3-fach schnellere Dissoziationsrate aufweist, als wenn man die D2E7-VH-CDR3 verwendet, wobei diese Dissoziationsrate dennoch 4-mal langsamer ist als wenn man die 2SD4-VH-CDR3 verwendet (die im Vergleich zu der D2E7-VH-CDR3 Veränderungen sowohl in Position 1 als auch 7 aufweist).

BEISPIEL 4: Funktionale Aktivität von D2E7

[0137] Um die funktionale Aktivität von D2E7 zu untersuchen, wurde der Antikörper in mehreren Assays verwendet, welche die Fähigkeit des Antikörpers, die hTNF α -Aktivität entweder in vitro oder in vivo zu hemmen, messen.

A. Neutralisierung der TNF α -induzierten Zytotoxizität in L929-Zellen

[0138] Humanes rekombinantes TNF α (rhTNF α) verursacht nach einer Inkubationszeit von 18 bis 24 Stunden eine Zell-Zytotoxizität in Maus-L929-Zellen. Humane Anti-hTNF α -Antikörper wurden in L929-Assays untersucht, indem man die Antikörper zusammen mit rhTNF α und den Zellen wie folgt inkubierte. Eine 96-Well-Mikrotiterplatte, die 100 μ l Anti-hTNF α -Antikörper enthielt, wurde in Duplikaten in einer 1/3-Verdünnung der Platte entlang mit RPMI-Medium, welches 10% fötales Rinderserum (FBS) enthielt, herunterverdünnt. 50 μ l rhTNF α wurden für eine Endkonzentration von 500 pg/ml in jedem Probenwell zugegeben. Die Platten wurden dann 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 50 μ l TNF α -sensitive L929 Maus-Fibroblastenzellen für eine Endkonzentration von 5×10^4 Zellen pro Well, einschließlich 1 μ g/ml Actinomycin-D, zugegeben. Kontrollen enthielten Medium plus Zellen und rTNF α plus Zellen. Diese Kontrollen und eine TNF α -Standardkurve, reichten von 2 ng/ml bis 8,2 pg/ml und wurden verwendet, um die Qualität des Assays zu bestimmen und ein Fenster für die Neutralisierung bereitzustellen. Die Platten wurden dann über Nacht (18 bis 24 Stunden) bei 37°C in 5% CO₂ inkubiert.

[0139] 100 μ l Medium wurden aus jedem Well entfernt und 50 μ l 5 mg/ml 3-(4,4-Dimethylthiazol-2-yl)2,5-di-phenyl-tetrazoliumbromid (MTT; gewerblich von Sigma Chemical Co., St. Louis, MO zu beziehen) in PBS wurden zugegeben. Die Platten wurden dann 4 Stunden bei 37°C inkubiert. 50 μ l 20%-iges Natriumdodecylsulfat (SDS) wurden dann in jedes Well gegeben und die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Die optische Dichte bei 570/630 nm wurde gemessen, die Kurven wurden für jede Probe aufgezeichnet und die IC₅₀-Werte wurden durch Standardverfahren bestimmt.

[0140] Repräsentative Ergebnisse für humane Antikörper mit verschiedenen VL- und VH-Paaren sind im Vergleich zum monoklonalen Maus-Antikörper MAK-195 in **Fig. 3** und nachstehender Tabelle 7 gezeigt.

Tabelle 7: Neutralisierung der durch TNF α -induzierten L929-Zytotoxizität

<u>VH</u>	<u>VL</u>	<u>Struktur</u>	<u>IC₅₀, M</u>
D2E7	D2E7	scFV	$1,1 \times 10^{-10}$
D2E7	D2E7	IgG4	$4,7 \times 10^{-11}$
2SD4	2SD4	scFV/IgG1/IgG4	$3,0 \times 10^{-7}$
2SD4	LOE7	scFV	$4,3 \times 10^{-8}$
VH1-D2	2SD4	scFV	$1,0 \times 10^{-8}$
VH1-D2	LOE7	scFV/IgG1/IgG4	$3,4 \times 10^{-10}$
VH1.D2.Y	LOE7.T	IgG4	$8,1 \times 10^{-11}$
VH1.D2.N	LOE7.T	IgG4	$1,3 \times 10^{-10}$
VH1.D2.Y	LOE7.A	IgG4	$2,8 \times 10^{-11}$
VH1.D2.N	LOE7.A	IgG4	$6,2 \times 10^{-11}$
MAK 195	MAK 195	scFV	$1,9 \times 10^{-8}$
MAK 195	MAK 195	F(ab') ₂	$6,2 \times 10^{-11}$

[0141] Die Ergebnisse in **Fig. 3** und Tabelle 7 zeigen, dass der humane D2E7-anti-hTNF α -Antikörper und verschiedene D2E7-verwandte Antikörper die TNF α -induzierte L929-Zytotoxizität mit einer fast äquivalenten Kapazität zu der des monoklonalen Maus-anti-hTNF α -Antikörpers MAK-195 neutralisieren.

[0142] In einer weiteren Versuchsreihe wurde die Fähigkeit der IgG1-Form von D2E7, die TNF α -induzierte L929-Zytotoxizität zu neutralisieren, wie oben beschrieben, untersucht. Die Ergebnisse aus drei unabhängigen Versuchen und der Mittelwert daraus sind nachstehend in Tabelle 8 zusammengefasst:

Tabelle 8: Neutralisierung der TNF α -induzierten L929-Zytotoxizität durch D2E7-IgG1

<u>Versuch</u>	IC_{50} [M]
1	$1,26 \times 10^{-10}$
2	$1,33 \times 10^{-10}$
3	$1,15 \times 10^{-10}$
Mittelwert	$1,25 \pm 0,01 \times 10^{-10}$

[0143] Diese Versuchsreihe bestätigte, dass D2E7 in der Full-Length-IgG1-Form, die TNF α -induzierte L929-Zytotoxizität mit einem durchschnittlichen IC_{50} [M] von $1,25 \pm 0,01 \times 10^{-10}$ neutralisiert.

B. Hemmung der TNF α -Bindung an TNF α -Rezeptoren auf U-937-Zellen

[0144] Die Fähigkeit humaner Anti-hTNF α -Antikörper, die Bindung von hTNF α an hTNF α -Rezeptoren auf der Oberfläche von Zellen zu hemmen, wurde mit Hilfe der U-937-Zelllinie (ATCC Nr. CRL 1593), einer humanen histiozytischen Zelllinie, welche hTNF α -Rezeptoren exprimiert, untersucht. U-937-Zellen wurden in RPMI-1640-Medium, welches mit 10% fetalem Rinderserum (Hyclone A-1111, Hyclone Laboratories, Logan, UT), L-Glutamin (4 nM), HEPES-Pufferlösung (10 mM), Penicillin (100 μ g/ml) und Streptomycin (100 μ g/ml) angereichert war, aufgezogen. Um die Aktivität der Full-Length-IgG-Antikörper zu untersuchen, wurden U-937-Zellen mit PBS, welches mit 1 mg/ml humanem IgG (Sigma I-4506, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) angereichert war, 45 Minuten auf Eis vorinkubiert und dann wurden die Zellen dreimal mit Bindungspuffer gewaschen. Für den Rezeptor-Bindungsassay wurden U-937-Zellen (5×10^6 Zellen pro Well) in einem Bindungspuffer (PBS, angereichert mit 0,2% Rinderserumalbumin) in 96-Well-Mikrotiterplatten (Costar 3799, Costar Corp., Cambridge, MA) zusammen mit 125 I-markiertem rhTNF α (3×10^{-10} M; 25 μ Ci/ml; bezogen von NEN Research Products, Wilmington, DE) mit oder ohne Anti-hTNF α -Antikörpern in einem Gesamtvolumen von 0,2 ml inkubiert. Die Platten wurden 1,5 Stunden auf Eis inkubiert. Dann wurden 75 μ l jeder Probe in 1,0-ml-Teströhren (Sarstedt 72.700, Sarstedt Corp., Princeton, NJ), welche Dibutylphthalat (Sigma D-2270, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) und Dinonylphthalat (ICN 210733, ICN, Irvine, CA) enthielten, übertragen. Die Teströhren enthielten ein 300- μ l-Gemisch aus Dibutylphthalat und Dinonylphthalat in einem Volumenverhältnis von 2 : 1. Freies (d. h. ungebundenes) 125 I-markiertes rhTNF α wurde durch 5 Minuten Mikrozentrifugieren entfernt. Dann wurde jedes Teströhrenende, welches ein Zellpellet enthielt, mit Hilfe einer Mikrotube-Schere (Bel-Art 210180001, Bel-Art Products, Pequannock, NJ) abgeschnitten. Das Zellpellet enthält an den p60- oder p80-TNF α -Rezeptor gebundenes 125 I-markiertes rhTNF α , wohingegen die wässrige Phase über dem Ölgemisch überschüssiges freies 125 I-markiertes rhTNF α enthält. Alle Zellpellets wurden in einem Zählrohrchen gesammelt (Falcon 2052, Becton Dickinson Labware, Lincoln Park, NJ) und in einem Scintillationszähler gezählt.

[0145] Repräsentative Ergebnisse sind in **Fig. 4** gezeigt. Der IC_{50} -Wert für die D2E7-Hemmung der hTNF α -Bindung an hTNF α -Rezeptoren auf U-937-Zellen beträgt in diesen Versuchen etwa 3×10^{-10} M. Diese Ergebnisse zeigen, dass der humane anti-hTNF α -Antikörper D2E7 die rhTNF α -Bindung an hTNF α -Rezeptoren auf U-937-Zellen in etwa äquivalenten Konzentrationen hemmt wie der monoklonale Maus-anti-hTNF α -Antikörper MAK-195.

[0146] In einer weiteren Versuchsreihe wurde die Fähigkeit der IgG1-Form von D2E7, die rhTNF α -Bindung an hTNF α -Rezeptoren auf U-937-Zellen zu hemmen, wie oben beschrieben untersucht. Die Ergebnisse aus drei unabhängigen Versuchen sowie der Mittelwert daraus sind nachstehend in Tabelle 9 zusammengefasst.

Tabelle 9: Hemmung der TNF-Rezeptor-Bindung auf U-937-Zellen durch D2E7-IgG1

<u>Versuch</u>	IC_{50} [M]
1	$1,70 \times 10^{-10}$
2	$1,49 \times 10^{-10}$
3	$1,50 \times 10^{-10}$
Mittelwert	$1,56 \pm 0,12 \times 10^{-10}$

[0147] Diese Versuchsreihe bestätigte, dass D2E7 in der Full-Length-IgG1-Form die TNF-Rezeptor-Bindung auf U-937-Zellen mit einem durchschnittlichen IC_{50} [M] von $1,56 \pm 0,12 \times 10^{-10}$ hemmt.

[0148] Um die inhibitorische Leistungsfähigkeit von D2E7 in Bezug auf die Bindung von ^{125}I -rhTNF an einzelne p55- und p75-Rezeptoren zu untersuchen, wurde ein Festphasen-Radioimmunoassay durchgeführt. Um die IC_{50} -Werte für D2E7 auf separaten TNF-Rezeptoren zu messen, wurden verschiedene Konzentrationen des Antikörpers mit einer 3×10^{-10} Konzentration von ^{125}I -rhTNF indubiert. Das Gemisch wurde dann auf getrennten Platten, die entweder den p55- oder den p75-TNF-Rezeptor enthielten, in einer Dosis-abhängigen Weise untersucht. Die Ergebnisse sind nachstehend in Tabelle 10 zusammengefasst:

Tabelle 10: Hemmung der TNF-Rezeptor-Bindung an p55- und p75-TNFR durch D2E7 IgG1

<u>Reagens</u>	$\text{IC}_{50} [\text{M}]$	
	p55 TNFR	p75 TNFR
D2E7	$1,47 \times 10^{-9}$	$1,26 \times 10^{-9}$
rhTNF	$2,31 \times 10^{-9}$	$2,70 \times 10^{-9}$

[0149] Die Hemmung der ^{125}I -rhTNF-Bindung an die p55- und p75-TNF-Rezeptoren auf U937-Zellen durch D2E7 folgte einer einfachen sigmoiden Kurve, was auf ähnliche IC_{50} -Werte für beide Rezeptoren hinweist. In den Festphasen-Radioimmunoassay-(RIA)-Versuchen mit rekombinanten TNF-Rezeptoren wurden die IC_{50} -Werte für die Hemmung der ^{125}I -rhTNF-Bindung an die p55- und p75-Rezeptoren durch D2E7 als $1,47 \times 10^{-9}$ bzw. $1,26 \times 10^{-9}$ M berechnet. Die Verringerung der IC_{50} -Werte in der Festphase geht vermutlich auf eine höhere Rezeptordichte im RIA-Format zurück, da nicht-markiertes rhTNF ebenfalls mit ähnlichen IC_{50} -Werten hemmte. Die IC_{50} -Werte für die Hemmung der ^{125}I -rhTNF-Bindung an die p55- und p75-Rezeptoren durch unmarkiertes rhTNF betrugen $2,31 \times 10^{-9}$ bzw. $2,70 \times 10^{-9}$ M.

C. Hemmung der ELAM-1-Expression auf HUVEC

[0150] Humane Nabelvenen-Endothelzellen (HUVEC) können zur Expression des Endothelzell-Leukozyten-Adhäsionsmoleküls 1 (ELAM-1) auf ihrer Zelloberfläche durch die Behandlung mit TNF α induziert werden, was man durch Umsetzen von rhTNF α -behandelten HUVECs mit einem Maus-anti-Mensch-ELAM-1-Antikörper nachweisen kann. Die Fähigkeit humaner Anti-hTNF α -Antikörper, diese TNF α -induzierte Expression von ELAM-1 auf HUVEC zu hemmen, wurde wie folgt untersucht: HUVEC (ATCC Nr. CRL 1730) wurden in 96-Well-Platten (5×10^4 Zellen pro Well) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden Reihenverdünnungen von humanem Anti-hTNF α -Antikörper (1 : 10) in einer Mikrotiterplatte hergestellt, wobei mit 20 bis 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Antikörper begonnen wurde. Eine Stammlösung aus 4,5 ng/ml rhTNF α wurde hergestellt, Aliquots von rhTNF α wurden in jedes Antikörper-haltige Well gegeben und der Inhalt wurde gut gemischt. Kontrollen enthielten Medium alleine, Medium plus Anti-hTNF α -Antikörper und Medium plus rhTNF α . Die HUVEC-Platten wurden aus ihrer Über-Nacht-Inkubation bei 37°C entfernt und das Medium vorsichtig aus jedem Well abgesaugt. 200 μl des Antikörper-rhTNF α -Gemischs wurden in jedes Well der HUVEC-Platten übertragen. Die HUVEC-Platten wurden weitere 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Danach wurde eine Maus-anti-ELAM-1-Antikörperstammlösung 1 : 1000 in RPMI verdünnt. Das Medium in jedem Well der HUVEC-Platte wurde vorsichtig abgesaugt, 50 $\mu\text{l}/\text{Well}$ der Anti-ELAM-1-Antikörperlösung wurden zugegeben und die HUVEC-Platten wurden 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Eine ^{125}I -markierte Anti-Maus-Ig-Antikörperlösung wurde in RPMI (etwa 50000 cpm in 50 μl) hergestellt. Das Medium in den Wells der HUVEC-Platten wurde vorsichtig abgesaugt, die Wells wurden zweimal mit RPMI gewaschen und es wurden 50 μl der ^{125}I -markierten Anti-Maus-Ig-Lösung in jedes Well gegeben. Die Platten wurden 1 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und jede Platte wurde dreimal mit RPMI gewaschen. 180 μl 5% SDS wurden in jedes Well gegeben, um die Zellen zu lysieren. Das Zelllysat aus jedem Well wurde dann in ein Röhrchen überführt und in einem Szintillationszähler gezählt.

[0151] Repräsentative Ergebnisse sind in **Fig. 5** gezeigt. Die IC_{50} -Werte für die D2E7-Hemmung der hTNF α -induzierten Expression von ELAM-1 auf HUVEC betrug in diesen Versuchen etwa 6×10^{-1} M. Diese Ergebnisse zeigen, dass der humane anti-hTNF α -Antikörper D2E7 die hTNF α -induzierte Expression von ELAM-1 auf HUVEC in etwa äquivalenten Konzentrationen wie der monoklonale Maus-anti-hTNF α -Antikörper MAK-195 hemmt.

[0152] In einer weiteren Versuchsreihe wurde die Fähigkeit der IgG1-Form von D2E7, die hTNF α -induzierte Expression von ELAM-1 auf HUVECs zu hemmen, wie oben beschrieben, untersucht. Die Ergebnisse aus drei unabhängigen Versuchen sowie der Mittelwert daraus sind nachstehend in Tabelle 11 zusammengefasst:

Tabelle 11: Hemmung der TNF α -induzierten ELAM-1-Expression über den D2E7- IgG1-Rezeptor

<u>Versuch</u>	$IC_{50} [M]$
1	$1,95 \times 10^{-10}$
2	$1,69 \times 10^{-10}$
3	$1,90 \times 10^{-10}$
Mittelwert	$1,85 \pm 0,14 \times 10^{-10}$

[0153] Diese Versuchsreihe bestätigte, dass D2E7, in der Full-Length-IgG1-Form, die TNF α -induzierte ELAM-1-Expression auf HUVECs mit einem mittleren $IC_{50} [M]$ von $1,85 \pm 0,14 \times 10^{-10}$ hemmt.

[0154] Das Neutralisierungs-Potential von D2E7-IgG1 wurde auch für die durch rhTNF induzierte Expression zweier weiterer Adhäsionsmoleküle, ICAM-1 und VCAM-1, untersucht. Da die rhTNF-Titrationskurve für die ICAM-1-Expression nach 16 Stunden sehr ähnlich zu der Kurve der ELAM-1-Expression ist, wurden in den Antikörper-Neutralisierungsversuchen die gleichen rhTNF-Konzentrationen verwendet. Die HUVECs wurden 16 Stunden mit rhTNF in Gegenwart verschiedener Konzentrationen D2E7 in einem 37°C CO₂-Inkubator inkubiert und die ICAM-1-Expression wurde mit Hilfe eines Maus-anti-ICAM-1-Antikörpers und anschließend eines ¹²⁵I-markierten Schaf-anti-Maus-Antikörpers gemessen. Zwei unabhängige Versuche wurden durchgeführt und die IC_{50} -Werte wurden berechnet. Ein nicht-verwandter humaner IgG1-Antikörper hemmte die ICAM-1-Expression nicht.

[0155] Das experimentelle Verfahren zum Testen der Inhibierung der VCAM-1-Expression war das gleiche wie das Verfahren für die ELAM-1-Expression, außer dass der monoklonale Anti-VCAM-1-Antikörper anstelle des monoklonalen Anti-ELAM-1-Antikörpers verwendet wurde. Drei unabhängige Versuche wurden durchgeführt und die IC_{50} -Werte wurden berechnet. Ein nicht-verwandter humaner IgG1-Antikörper hemmte die VCAM-1-Expression nicht.

[0156] Die Ergebnisse sind nachstehend in Tabelle 12 zusammengefasst:

Tabelle 12: Hemmung der ICAM-1- und VCAM-1-Expression durch den D2E7-IgG1

<u>ICAM-1-Hemmung</u>		$IC_{50} [M]$	
<u>Versuch</u>	$IC_{50} [M]$	<u>Versuch</u>	$IC_{50} [M]$
1	$1,84 \times 10^{-10}$	1	$1,03 \times 10^{-10}$
2	$2,49 \times 10^{-10}$	2	$9,26 \times 10^{-10}$
		3	$1,06 \times 10^{-10}$
Mittelwert	$2,17 \pm 0,46 \times 10^{-10}$	Mittelwert	$1,01 \pm 0,01 \times 10^{-10}$

[0157] Diese Versuche zeigen, dass die Behandlung von primären humanen Nebennieren-Endothelzellen mit rhTNF nach 4 Stunden zu einer optimalen Expression der Adhäsionsmoleküle ELAM-1 und VCAM-1 führen und das Maximum der hochregulierten Expression von ICAM-1 nach 16 Stunden erreicht wird. D2E7 konnte die Expression der drei Adhäsionsmoleküle in einer Dosis-abhängigen Weise hemmen. Die IC_{50} -Werte der Inhibition von ELAM-1, ICAM-1 und VCAM-1 betrugen $1,85 \times 10^{-10}$, $2,17 \times 10^{-10}$ bzw. $1,01 \times 10^{-10}$ M. Diese Werte sind sehr ähnlich, was für ähnliche Erfordernisse für die Dosis des rhTNF-Aktivierungssignals zur Induktion der ELAM-1-, ICAM-1- und VCAM-1-Expression spricht. Interessanterweise war D2E7 im längeren Inhibitionssassay der ICAM-1-Expression ähnlich wirksam. Der ICAM-1-Inhibitionssassay benötigte eine 16-stündige Coinkubation von rhTNF und D2E7 mit den HUVECs im Vergleich zu 4 Stunden wie bei den ELAM-1- und VCAM-1-Inhibitionssassays. Da D2E7 eine langsame Dissoziationsrate für rhTNF besitzt, ist es denkbar, dass, während der 16-stündigen Co-Inkubationsperiode keine wesentliche Kompetition zwischen den TNF-Rezeptoren auf den HUVECs erfolgte.

D. In vivo-Neutralisierung von hTNF α

[0158] Drei verschiedene in vivo-Systeme wurden verwendet, um zu zeigen, dass D2E7 die hTNF α -Aktivität in vivo wirksam hemmt.

I. Hemmung der TNF-induzierten Sterblichkeit bei D-Galactosamin-sensibilisierten Mäusen

[0159] Die Injektion von rekombinantem humanen TNF α (rhTNF α) in D-Galactosamin-sensibilisierte Mäuse führte innerhalb eines Zeitraums von 24 Stunden zum Tod. TNF α -neutralisierende Mittel konnten die Letalität in diesem Modell verhindern. Um die Fähigkeit von humanen Anti-hTNF α -Antikörpern, hTNF α in vivo in diesem Modell zu neutralisieren, zu untersuchen, wurden C57B1/6-Mäusen verschiedene Konzentrationen des D2E7-IgG1 oder eines Kontrollproteins, in PBS, intraperitoneal (i. p.) injiziert. Den Mäusen wurden 30 Minuten später 1 μ g rhTNF α und 20 mg D-Galactosamin in PBS i. p. verabreicht und die Mäuse 24 Stunden später untersucht. Die Menge von rhTNF α und D-Galactosamin wurden zuvor so bestimmt, dass eine 80 bis 90%-ige Letalität in diesen Mäusen auftrat.

[0160] Repräsentative Ergebnisse, dargestellt als Balkendiagramm des prozentualen Überlebens in Abhängigkeit zur Antikörperkonzentration, sind in **Fig. 6** gezeigt. Die schwarzen Balken stehen für D2E7, wohingegen die gestreiften Balken für MAK 195 stehen. Die Injektion von 2,5 bis 25 μ g D2E7-Antikörper pro Maus schützte die Tiere vor der TNF α -induzierten Letalität. Der ED₅₀-Wert betrug etwa 1 bis 2,5 μ g/Maus. Der positive Kontrollantikörper MAK 195 zeigte eine ähnliche Schutzfähigkeit. Die Injektion von D2E7 in Abwesenheit von rhTNF α hatte keine nachteilige Wirkung auf die Mäuse. Die Injektion eines nicht-spezifischen humanen IgG1-Antikörpers bot keinen Schutz vor einer TNF α -induzierten Sterblichkeit.

[0161] In einem zweiten Versuch wurden 49 Mäuse in 7 gleich große Gruppen geteilt. Jeder Gruppe wurden 30 Minuten vor einer LD₈₀-Dosis des rhTNF α /D-Galactosamin-Gemisches (1,0 μ g rhTNF und 20 mg D-Galactosamin pro Maus) verschiedene Dosen D2E7 verabreicht. Die Kontrollgruppe 7 erhielt den normalen humanen IgG1-Kappa-Antikörper in einer Dosis von 25 μ g/Maus. Die Mäuse wurden 24 Stunden später untersucht. Das Überleben in jeder Gruppe ist nachstehend in Tabelle 13 zusammengefasst.

Tabelle 13: 24-Stunden-Überleben nach der Behandlung mit D2E7

<u>Gruppe</u>	<u>Überleben (lebend/gesamt)</u>	<u>Überleben (%)</u>
1 (kein Antikörper)	0/7	0
2 (1 μ g)	1/7	14
3 (2,6 μ g)	5/7	71
4 (5,2 μ g)	6/7	86
5 (26 μ g)	6/7	86
6 (26 μ g; kein rhTNF)	7/7	100
7 (25 μ g Hu IgG1)	1/7	14

II. Hemmung von TNF-induzierter Hasen-Pyrexie

[0162] Die Wirksamkeit von D2E7, die rhTNF-induzierte Pyrexieantwort in Hasen zu hemmen, wurde untersucht. Weibliche NZW-Hasen mit einem Gewicht von etwa 2,5 kg, in Gruppen von jeweils 3, wurde intravenös D2E7, rhTNF und Immunkomplexe aus D2E7 und rhTNF injiziert. Die Temperatur wurde rektal im Minutenabstand über etwa 4 Stunden durch Thermistor-Sonden auf einem Kaye-Thermalrekorder gemessen. Rekombinantes humanes TNF in Kochsalzlösung, injiziert in einer Konzentration von 5 μ g/kg, führte etwa 45 Minuten nach der Injektion zu einem Temperaturanstieg über 0,4°C. Das Antikörperpräparat selbst, in Kochsalzlösung und in einer Dosierung von 138 μ g/kg, führte bis zu 140 Minuten nach der Verabreichung an die Hasen zu keinem Temperaturanstieg. In allen weiteren Versuchen wurden D2E7 oder Kontrollreagenzien (humanes IgG1 oder ein Kochsalzlösungs-Vehikel) i. v. in Hasen injiziert, und 15 Minuten später erfolgte eine i. v.-Injektion von rhTNF in Kochsalzlösung in einer Konzentration von 5 μ g/kg. Repräsentative Ergebnisse mehrerer Versuche sind nachstehend in Tabelle 14 zusammengefasst.

Tabelle 14: Inhibierung von rhTNF-induzierter Pyrexie mit D2E7 in Hasen

D2E7-Dosis (μ g/kg)	Temperaturanstieg*, °C		% Inhibierung **	Molverhältnis D2E7:rhTNF	Minuten nach rhTNF-Gabe
	rhTNF	rhTNF + D2E7			
14	0,53	0,25	53	1	60
24	0,43	0,13	70	1,6	40
48	0,53	0,03	94	3,3	50
137	0,53	0,00	100	9,5	60
792	0,80	0,00	100	55	60

* = Peaktemperatur

** = % Inhibierung = $(1 - \{\text{Temperaturanstieg mit rhTNF \& D2E7} / \text{Temperaturanstieg mit rhTNF alleine}\}) \times 100$.

[0163] Die intravenöse Vorbehandlung mit D2E7 in einer Dosis von 14 μ g/kg hemmte die fiebererregende Antwort partiell im Vergleich zu Hasen, die nur mit Kochsalzlösung vorbehandelt wurden. D2E7, verabreicht in einer Konzentration von 137 μ g/kg, unterdrückte die fiebererregende Antwort von rhTNF in dem gleichen Versuch vollständig. In einem zweiten Versuch wurde D2E7 in einer Konzentration von 24 μ g/kg verabreicht und hemmte die fiebererregende Antwort partiell im Vergleich zu Hasen, die nur mit Kochsalzlösung behandelt wurden. Das Molverhältnis von D2E7 zu rhTNF betrug in diesem Versuch 1/6 : 1. In einem dritten Versuch unterdrückte D2E7, i. v. in einer Konzentration von 48 μ g/kg injiziert (Molverhältnis D2E7 : rhTNF = 3,3 : 1), die fiebererregende Antwort vollständig im Vergleich zu Hasen, die mit humanem Kontroll-IgG1 in Kochsalzlösung in einer Konzentration von 30 μ g/kg behandelt wurden. In dem letzten Versuch zeigten Hasen, welche mit D2E7 (792 μ g/kg) bei einem sehr hohen Molverhältnis zu rhTNF (55 : 1) behandelt worden waren, zu keiner Zeit bis zu 4 Stunden der Beobachtung einen Temperaturanstieg. Die Behandlung von Hasen mit Immunkomplexen aus einem Gemisch aus D2E7 und rhTNF, 1 Stunde bei 37°C mit einem Molverhältnis von 55 : 1 inkubiert, ohne anschließende rhTNF-Verabreichung, zeigte in dem gleichen Versuch ebenfalls keinen Temperaturanstieg.

III: Polyarthritis-Prävention in transgenen Tg197-Mäusen

[0164] Die Wirkung von D2E7 auf die Entwicklung der Erkrankung wurde in einem transgenen Mausmodell für Arthritis untersucht. Transgene Mäuse (Tg197), welche humanes Wildtyp-TNF (modifiziert in der 3'-Region hinter den kodierenden Sequenzen) exprimieren, wurden bereits erzeugt; diese Mäuse entwickeln mit 100%-iger Wahrscheinlichkeit im Alter von 4–7 Wochen chronische Polyarthritis (siehe EMBO J (1991) 10: 4025–4031 für eine weitere Beschreibung des Tg197-Modells für Polyarthritis).

[0165] Transgene Tiere wurden im Alter von 3 Tagen mittels PCR identifiziert. Würfe aus transgenen Mäusen wurden in 6 Gruppen geteilt. Transgene Mäuse wurden mittels Slot-Blot-Hybridisierungsanalyse im Alter von 15 Tagen verifiziert. Die Behandlungsprotokolle der 6 Gruppen waren wie folgt: Gruppe 1 = keine Behandlung; Gruppe 2 = Kochsalzlösung (Vehikel); Gruppe 3 = D2E7 zu 1,5 μ g/g; Gruppe 4 = D2E7 zu 15 μ g/g; Gruppe 5 = D2E7 zu 30 μ g/g und Gruppe 6 = IgG1-Isotyp-Kontrolle zu 30 μ g/g. Ein Wurf nicht-transgener Mäuse wurde auch als Kontrolle in die Studie aufgenommen (Gruppe 7 – nicht transgen; keine Behandlung). Jede Gruppe erhielt drei i. p.-Injektionen der angegebenen Behandlung pro Woche. Die Injektionen erfolgten über 10 Wochen. Die makroskopischen Veränderungen der Gelenkmorphologie jedes Tiers wurden wöchentlich aufgezeichnet. Nach 10 Wochen wurden alle Mäuse getötet und das Mausgewebe wurde in Formalin gesammelt. Es erfolgte eine mikroskopische Untersuchung des Gewebes.

[0166] Das Gewicht jeder Maus, in Gramm, wurde zu Beginn jeder Woche bestimmt. Zur gleichen Zeit wurde die Größe des Gelenks (in mm) gemessen und die Schwere der Erkrankung bestimmt. Die Gelenkgröße wurde als Durchschnitt aus drei Messungen am rechten Hinterknöchel mit Hilfe einer Mikrometervorrichtung bestimmt. Die Arthritisbewertung erfolgte wöchentlich wie folgt: 0 = keine Arthritis (normales Aussehen und Beugung); + = leichte Arthritis (Gelenkstörung); ++ = mittlere Arthritis (Schwellung, Gelenkverformung) und +++ = schwere Arthritis (Gelenkversteifung bei Beugung und schwer gestörte Bewegung). Die histopathologische Bewertung, beruhend auf einer Hämatoxylin/Eosin-Färbung der Gelenkbereiche, beruhte auf folgendem: 0 =

keine nachweisbare Erkrankung; 1 = Proliferation der Synovialis; 2 = schwere Synovial-Verdickung; 3 = Knorpelzerstörung und Knochenerosion.

[0167] Die Wirkung der D2E7-Behandlung auf die mittlere Gelenkgröße der arthritischen transgenen Tg197-Mäuse ist in der Kurve von **Fig. 9** gezeigt. Die histopathologischen und arthritischen Bewertungen der transgenen Tg197-Mäuse, im Alter von 11 Wochen, sind nachstehend in Tabelle 15 zusammengefasst:

Tabelle 15: Wirkung von D2E7 auf die histopathologische und arthritische Bewertung in Tg197-Mäusen

Gruppe	Behandlung	Histopathologische Bewertung	Arthritische Bewertung
1	keine	3 (7/7)	+++ (7/7)
2	Kochsalzlösung	3 (8/8)	+++ (8/8)
6	IgG1-Kontrolle	3 (9/9)	+++ (7/9)
3	D2E7 zu 1,5 µg/g	0 (6/8)	0 (8/8)
4	D2E7 zu 15 µg/g	0 (7/8)	0 (8/8)
5	D2E7 zu 30 µg/g	0 (8/8)	0 (8/8)

[0168] Dieser Versuch zeigt, dass der D2E7-Antikörper eine definitiv vorteilhafte Wirkung auf transgene Mäuse hat, welche humanes Wildtyp-TNF exprimieren (Tg197), wobei sich nach dem Untersuchungszeitraum keine Arthritis zeigt.

E. D2E7-Neutralisierung von TNFas aus anderen Arten

[0169] Die Bindungsspezifität von D2E7 wurde durch Messen seiner Fähigkeit, Tumor-Nekrose-Faktoren aus verschiedenen Primatenarten und von Maus zu neutralisieren, wobei der L929-Zytotoxizitätsassay verwendet wurde (wie oben in Beispiel 4, Unterabschnitt A beschrieben). Die Ergebnisse sind nachstehend in Tabelle 16 zusammengefasst:

Tabelle 16: Fähigkeit von D2E7, TNF aus verschiedenen Arten im L929-Assay zu neutralisieren

<u>TNFα*</u>	<u>Quelle</u>	<u>IC₅₀ für die D2E7-Neutralisierung (M)**</u>
Mensch	rekombinant	$7,8 \times 10^{-11}$
Schimpanse	LPS-stimuliertes PBMC	$5,5 \times 10^{-11}$
Pavian	rekombinant	$6,0 \times 10^{-11}$
Krallenaffe	LPS-stimuliertes PBMC	$4,0 \times 10^{-10}$
Cynomolgus	LPS-stimuliertes PBMC	$8,0 \times 10^{-11}$
Rhesus	LPS-stimuliertes PBMC	$3,0 \times 10^{-11}$
Hund	LPS-stimuliertes WBC	$2,2 \times 10^{-10}$
Schwein	rekombinant	$1,0 \times 10^{-7}$
Maus	rekombinant	$> 1,0 \times 10^{-7}$

[0170] Die Ergebnisse aus Tabelle 16 zeigen, dass D2E7 die Aktivität von 5 TNFas aus Primaten etwa gleichwertig zu humanem TNFα neutralisieren kann und ferner auch die Aktivität von Hunde-TNFα (etwa 10-fach schlechter als humanes TNFα) ebenso wie die von Schweine- und Mäuse-TNFα (etwa 1000-fach schlechter als humanes TNFα) neutralisieren kann. Ferner wurde die Bindung von D2E7 an rhTNFα in der Lösungsphase nicht durch andere Cytokine, wie Lymphotoxin (TNFβ), IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IFNy und TGFβ gehemmt, was dafür spricht, dass D2E7 sehr spezifisch für seinen TNFα-Liganden ist.

F. Fehlende Cytokin-Freisetzung durch mit D2E7 inkubiertes humanes Gesamtblut

[0171] In diesem Beispiel wurde die Fähigkeit von D2E7 untersucht, alleine normale humane Blutzellen zum Sekretieren von Cytokinen oder Shed-Zell-Oberflächenmolekülen zu induzieren. D2E7 wurde 24 Stunden mit Gesamtblut aus drei verschiedenen normalen Spendern in unterschiedlichen Konzentrationen inkubiert. Eine LPS-positive Kontrolle wurde gleichzeitig laufen gelassen, und zwar in einer Konzentration, die zuvor so bestimmt wurde, dass immunkompetente Blutzellen zur Sekretierung von Cytokinen stimuliert wurden. Die Überstände wurden gesammelt und in einer Reihe aus löslichen Cytokin-, Rezeptor- und Adhäsionsmolekül-ELISA-Kits untersucht: IL-1 α , IL-1 β , IL-1-Rezeptorantagonist, IL-6, IL-8, TNF α , löslicher TNF-Rezeptor I, löslicher TNF-Rezeptor II, lösliches ICAM-1 und lösliches E-Selektin. Es wurden keine wesentlichen Mengen an Cytokinen oder abgeschiedenen Zell-Oberflächenmolekülen als Ergebnis der D2E7-Antikörper-Coinkubation in Konzentration bis zu 343 μ g/ml gemessen. Kontrollkulturen ohne die Zugabe von Antikörpern führten auch nicht zu messbaren Cytokinmengen, wohingegen die LPS-Cokulturkontrolle zu erhöhten Werten im hohen Picogramm- oder niedrigen Nanogrammbereich führten. Diese Ergebnisse zeigen, dass D2E7 Geamtblutzellen nicht dazu anregte, über das normale Maß hinaus in ex vivo-Kulturen Cytokine zu sekretieren oder Zell-Oberflächenproteine abzuscheiden.

[0172] Einen Teil der vorliegenden Offenbarung bildet das angefügte Sequenzprotokoll, dessen Inhalt in nachstehender Tabelle zusammengefasst ist:

SEQ ID NO:	ANTIKÖRPERKETTE	REGION	SEQUENZTYP
1	D2E7	VL	Aminosäure
2	D2E7	VH	Aminosäure
3	D2E7	VL CDR3	Aminosäure
4	D2E7	VH CDR3	Aminosäure
5	D2E7	VL CDR2	Aminosäure
6	D2E7	VH CDR2	Aminosäure
7	D2E7	VL CDR1	Aminosäure
8	D2E7	VH CDR1	Aminosäure
9	2SD4	VL	Aminosäure
10	2SD4	VH	Aminosäure
11	2SD4	VL CDR3	Aminosäure
12	EP B12	VL CDR3	Aminosäure
13	VL10E4	VL CDR3	Aminosäure
14	VL100A9	VL CDR3	Aminosäure
15	VLL100D2	VL CDR3	Aminosäure
16	VLL0F4	VL CDR3	Aminosäure
17	LOE5	VL CDR3	Aminosäure
18	VLLOG7	VL CDR3	Aminosäure
19	VLLOG9	VL CDR3	Aminosäure
20	VLLOH1	VL CDR3	Aminosäure
21	VLLOH10	VL CDR3	Aminosäure
22	VL1B7	VL CDR3	Aminosäure
23	VL1C1	VL CDR3	Aminosäure
24	VL0.1F4	VL CDR3	Aminosäure
25	VL0.1H8	VL CDR3	Aminosäure
26	LOE7.A	VL CDR3	Aminosäure
27	2SD4	VH CDR3	Aminosäure
28	VH1B11	VH CDR3	Aminosäure
29	VH1D8	VH CDR3	Aminosäure
30	VH1A11	VH CDR3	Aminosäure
31	VH1B12	VH CDR3	Aminosäure
32	VH1E4	VH CDR3	Aminosäure
33	VH1F6	VH CDR3	Aminosäure
34	3C-H2	VH CDR3	Aminosäure
35	VH1-D2.N	VH CDR3	Aminosäure
36	D2E7	VL	Nukleinsäure
37	D2E7	VH	Nukleinsäure

Äquivalente

[0173] Der Fachmann wird viele Äquivalente zu den hier beschriebenen spezifischen erfindungsgemäßen

Ausführungsformen erkennen oder diese mit Hilfe routinemäßiger Versuche bestimmen können. Solche Äquivalente sind von nachstehenden Ansprüchen umfasst.

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

- (i) ANMELDER:
(A) Name: BASF Aktiengesellschaft
(B) Straße: Carl-Bosch-Str. 38
(C) Stadt: 67056 Ludwigshafen
(D) Staat: Rheinland-Pfalz
(E) Land: Bundesrepublik Deutschland
- (ii) TITEL DER ERFINDUNG: Humane Antikörper, die humanes TNF α binden
- (iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 37
- (iv) KORRESPONDENZ-ADRESSE:
(A) Adressat: LAHIVE & COCKFIELD
(B) Straße: 60 State Street, Suite 150
(C) Stadt: Boston
(D) Staat: Massachusetts
(E) Land: USA
(F) ZIP: 02109-1875
- (v) COMPUTER-LESBARE FORM:
(A) Medium-Typ: Floppy-Diskette
(B) Computer: IBM-PC-kompatibel
(C) Betriebssystem: PC-DOS/MS-DOS
(D) Software: PatentIn, Ausgabe Nr. 1.0, Version Nr. 1.25
- (vi) DERZEITIGE ANMELDUNGSDATEN:
(A) Anmeldenummer:
(B) Anmeldetag:
(C) Klassifikation:
- (vii) FRÜHERE ANMELDEDATEN:
(A) Anmeldenummer: US 08/599,226
(B) Anmeldetag: 9. Februar 1996
(C) Klassifikation:
- (viii) FRÜHERE ANMELDEDATEN:
(A) Anmeldenummer: US 60/031,476
(B) Anmeldetag: 25. November 1996
(D) Klassifikation:
- (ix) ANWALTS-/VERTRETERANGABEN:
(A) Name: DeConti, Giulio A., Jr.
(B) Registrationsnummer: 31,503
(C) Referenz-/Aktenzeichen: BBI-043CPPC

(ix) TELEKOMMUNIKATIONS-ANGABEN:

- (A) Telefon: (617)227-7400
- (B) Telefax: (617)227-5941

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) Länge: 107 Aminosäuren
- (B) Typ: Aminosäure
- (D) Topologie: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(v) FRAGMENTTYP: intern

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Arg Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) Länge: 121 Aminosäuren
- (B) Typ: Aminosäure
- (D) Topologie: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(v) FRAGMENTTYP: intern

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
 20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Lys Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) Länge: 9 Aminosäuren
- (B) Typ: Aminosäure
- (D) Topologie: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(v) FRAGMENTTYP: intern

(ix) Merkmal:

- (A) Name/Schlüssel: modifizierte Stelle
- (B) Ort: 9
- (D) Weitere Information: /beachte = „Xaa entspricht Thr oder Ala“

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3

Gln Arg Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Xaa
 1 5

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) Länge: 12 Aminosäuren
- (B) Typ: Aminosäure
- (D) Topologie: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(v) FRAGMENTTYP: intern

(ix) Merkmal:

- (A) Name/Schlüssel: modifizierte Stelle
- (B) Ort: 12
- (D) Weitere Information: /beachte = „Xaa entspricht Tyr oder Asn“

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Xaa
1 5 10

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) Länge: 7 Aminosäuren
- (B) Typ: Aminosäure
- (D) Topologie: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(v) FRAGMENTTYP: intern

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser
1 5

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) Länge: 17 Aminosäuren
- (B) Typ: Aminosäure
- (D) Topologie: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(v) FRAGMENTTYP: intern

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val Glu
1 5 10 15

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 7:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) Länge: 11 Aminosäuren
- (B) Typ: Aminosäure
- (D) Topologie: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(v) FRAGMENTTYP: intern

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr Leu Ala
1 5 10

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 8:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) Länge: 5 Aminosäuren
- (B) Typ: Aminosäure
- (D) Topologie: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(v) FRAGMENTTYP: intern

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

Asp Tyr Ala Met His
1 5

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 9:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN

- (A) Länge: 107 Aminosäuren
- (B) Typ: Aminosäure
- (D) Topologie: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(v) FRAGMENTTYP: intern

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Ile Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Tyr
85 90 95

Ala Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 10:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) Länge: 121 Aminosäuren
- (B) Typ: Aminosäure
- (D) Topologie: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(v) FRAGMENTTYP: intern

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
 20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Asp Trp Val
 35 40 45

Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Glu Gly Arg Phe Ala Val Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ala Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Thr Lys Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Ser Leu Asp Asn Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 11:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) Länge: 9 Aminosäuren
- (B) Typ: Aminosäure
- (D) Topologie: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(v) FRAGMENTTYP: intern

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11:

Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Tyr Ala
 1 5

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 12:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN

- (A) Länge: 9 Aminosäuren
- (B) Typ: Aminosäure
- (D) Topologie: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(v) FRAGMENTTYP: intern

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 12:

Gln Lys Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Ala
1 5

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 13:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) Länge: 9 Aminosäuren
- (B) Typ: Aminosäure
- (D) Topologie: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(v) FRAGMENTTYP: intern

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 13:

Gln Lys Tyr Gln Arg Ala Pro Tyr Thr
1 5

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 14:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) Länge: 9 Aminosäuren
- (B) Typ: Aminosäure
- (C) Topologie: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(v) FRAGMENTTYP: intern

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 14:

Gln Lys Tyr Ser Ser Ala Pro Tyr Thr
1 5

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 15:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) Länge: 9 Aminosäuren
- (B) Typ: Aminosäure
- (D) Topologie: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(v) FRAGMENTTYP: intern

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 15:

Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Tyr Thr
1 5

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 16:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) Länge: 9 Aminosäuren
- (B) Typ: Aminosäure
- (D) Topologie: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(v) FRAGMENTTYP: intern

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 16:

Gln Lys Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Thr
1 5

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 17:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) Länge: 9 Aminosäuren
- (B) Typ: Aminosäure
- (D) Topologie: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(v) FRAGMENTTYP: intern

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 17:

Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Tyr Tyr
1 5

⋮

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 18:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) Länge: 9 Aminosäuren
- (B) Typ: Aminosäure
- (D) Topologie: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(v) FRAGMENTTYP: intern

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 18:

Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Tyr Asn
1 5

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 19:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN

- (A) Länge: 9 Aminosäuren
- (B) Typ: Aminosäure
- (D) Topologie: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(v) FRAGMENTTYP: intern

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 19:

Gln Lys Tyr Thr Ser Ala Pro Tyr Thr
1 5

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 20:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN

- (A) Länge: 9 Aminosäuren
- (B) Typ: Aminosäure
- (D) Topologie: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(v) FRAGMENTTYP: intern

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 20:

Gln Lys Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Asn
1 5

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 21:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) Länge: 9 Aminosäuren
- (B) Typ: Aminosäure
- (D) Topologie: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(v) FRAGMENTTYP: intern

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 21:

Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Ala Tyr Ser
1 5

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 22:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
- (A) Länge: 9 Aminosäuren
 - (B) Typ: Aminosäure
 - (D) Topologie: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(v) FRAGMENTTYP: intern

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 22:

Gln Gln Tyr Asn Ser Ala Pro Asp Thr
1 5

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 23:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
- (A) Länge: 9 Aminosäuren
 - (B) Typ: Aminosäure
 - (D) Topologie: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(v) FRAGMENTTYP: intern

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 23:

Gln Lys Tyr Asn Ser Asp Pro Tyr Thr
1 5

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 24:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
- (A) Länge: 9 Aminosäuren
 - (B) Typ: Aminosäure
 - (D) Topologie: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(v) FRAGMENTTYP: intern

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 24:

Gln Lys Tyr Ile Ser Ala Pro Tyr Thr
1 5

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 25:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) Länge: 9 Aminosäuren
 - (B) Typ: Aminosäure
 - (D) Topologie: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(v) FRAGMENTTYP: intern

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 25:

Gln Lys Tyr Asn Arg Pro Pro Tyr Thr
1 5

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 26:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) Länge: 9 Aminosäuren
 - (B) Typ: Aminosäure
 - (D) Topologie: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(v) FRAGMENTTYP: intern

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 26:

Gln Arg Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Ala
1 5

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 27:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) Länge: 12 Aminosäuren
 - (B) Typ: Aminosäure
 - (D) Topologie: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(v) FRAGMENTTYP: intern

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 27:

Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu Asp Asn
1 5 10

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 28:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) Länge: 12 Aminosäuren
 - (B) Typ: Aminosäure

(D) Topologie: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(v) FRAGMENTTYP: intern

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 28:

Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Ser Leu Asp Lys
1 5 10

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 29:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) Länge: 12 Aminosäuren
- (B) Typ: Aminosäure
- (D) Topologie: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(v) FRAGMENTTYP: intern

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 29:

Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Ser Leu Asp Tyr
1 5 10

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 30:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) Länge: 12 Aminosäuren
- (B) Typ: Aminosäure
- (D) Topologie: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(v) FRAGMENTTYP: intern

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 30:

Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Ser Leu Asp Asp
1 5 10

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 31:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) Länge: 12 Aminosäuren
- (B) Typ: Aminosäure
- (D) Topologie: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(v) FRAGMENTTYP: intern

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 31:

Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Phe Ser Leu Asp Tyr
1 5 10

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 32:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN

- (A) Länge: 12 Aminosäuren
- (B) Typ: Aminosäure
- (D) Topologie: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(v) FRAGMENTTYP: intern

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 32:

Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu His Tyr
1 5 10

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 33:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) Länge: 12 Aminosäuren
- (B) Typ: Aminosäure
- (D) Topologie: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(v) FRAGMENTTYP: intern

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 33:

Ala Ser Phe Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu Glu Tyr
1 5 10

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 34:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) Länge: 12 Aminosäuren
- (B) Typ: Aminosäure
- (D) Topologie: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(v) FRAGMENTTYP: intern

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 34:

Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Glu Tyr
 1 5 10

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 35:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) Länge: 12 Aminosäuren
- (B) Typ: Aminosäure
- (D) Topologie: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(v) FRAGMENTTYP: intern

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 35:

Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Asn
 1 5 10

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 36:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) Länge: 321 Basenpaare
- (B) Typ: Nukleinsäure
- (C) Strangart: doppel
- (D) Topologie: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 36:

GACATCCAGA	TGACCCAGTC	TCCATCCTCC	CTGTCTGCAT	CTGTAGGGGA	CAGAGTCACC	60
ATCACTTGTC	GGGCAAGTCA	GGGCATCAGA	AATTACTTAG	CCTGGTATCA	GCAAAAACCA	120
GGGAAAGCCC	CTAAGCTCCT	GATCTATGCT	GCATCCACTT	TGCAATCAGG	GGTCCCATCT	180
CGGTTCACTG	GCAGTGGATC	TGGGACAGAT	TTCACTCTCA	CCATCAGCAG	CCTACAGCCT	240
GAAGATGTTG	CAACTTATTA	CTGTCAAAGG	TATAACCGTG	CACCGTATAC	TTTTGGCCAG	300
GGGACCAAGG	TGGAAATCAA	A				321

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 37:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) Länge: 363 Basenpaare

- (B) Typ: Nukleinsäure
- (C) Strangart: doppel
- (D) Topologie: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 37:

GAGGTGCAGC	TGGTGGAGTC	TGGGGGAGGC	TTGGTACAGC	CCGGCAGGTC	CCTGAGACTC	60
TCCTGTGCGG	CCTCTGGATT	CACCTTGAT	GATTATGCCA	TGCACTGGGT	CCGGCAAGCT	120
CCAGGGAAGG	GCCTGGAATG	GGTCTCAGCT	ATCACTTGGA	ATAGTGGTCA	CATAGACTAT	180
GC GGACTCTG	TGGAGGGCCG	ATTCAACCATC	TCCAGAGACA	ACGCCAAGAA	CTCCCTGTAT	240
CTGCAAATGA	ACAGTCTGAG	AGCTGAGGAT	ACGGCCGTAT	ATTACTGTGC	GAAAGTCTCG	300
TACCTTAGCA	CCGCGTCCTC	CCTTGACTAT	TGGGGCCAAG	GTACCCCTGGT	CACCGTCTCG	360
AGT						363

Patentansprüche

1. Isolierter humaner Antikörper oder Antigen-bindender Bereich davon, welcher die Merkmale umfasst, dass er

a) von humanem TNF α mit einer K_{off} -Geschwindigkeitskonstante von $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ oder weniger, bestimmt mittels Oberflächen-Plasmon-Resonanz, dissoziiert;

b) eine CDR3-Domäne der leichten Kette hat, welche die Aminosäuresequenz der SEQ ID NO: 3 oder eine durch eine einzige Alanin-Substitution in Position 1, 4, 5, 7 oder 8 oder durch ein bis fünf konservative Aminosäuresubstitutionen in Position 1, 3, 4, 6, 7, 8 und/oder 9 modifizierte Sequenz der SEQ ID NO: 3 enthält;

c) eine CDR3-Domäne der schweren Kette hat, welche die Aminosäuresequenz der SEQ ID NO: 4 oder eine durch eine einzige Alanin-Substitution in Position 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10 oder 11 oder durch ein bis fünf konservative Aminosäuresubstitutionen in Position 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11 und/oder 12 modifizierte Sequenz der SEQ ID NO: 4 enthält.

2. Isolierter humaner Antikörper oder Antigen-bindender Bereich davon nach Anspruch 1, welcher von humanem TNF α mit einem K_d von $1 \times 10^{-8} \text{ M}$ oder weniger und einer K_{off} -Geschwindigkeitskonstante von $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ oder weniger, beide mittels Oberflächen-Plasmon-Resonanz bestimmt, dissoziiert und die humane TNF α -Zytotoxizität in einem Standard-in vitro-L929-Assay mit einem IC_{50} von $1 \times 10^{-7} \text{ M}$ oder weniger neutralisiert.

3. Isolierter humaner Antikörper oder Antigen-bindender Bereich davon nach Anspruch 2, welcher die humane TNF α -Zytotoxizität in einem Standard-in vitro-L929-Assay mit einem IC_{50} von $1 \times 10^{-8} \text{ M}$ oder weniger neutralisiert.

4. Isolierter humaner Antikörper oder Antigen-bindender Bereich davon nach Anspruch 2, welcher die humane TNF α -Zytotoxizität in einem Standard-in vitro-L929-Assay mit einem IC_{50} von $1 \times 10^{-9} \text{ M}$ oder weniger neutralisiert.

5. Isolierter humaner Antikörper oder Antigen-bindender Bereich davon nach Anspruch 2, welcher die humane TNF α -Zytotoxizität in einem Standard-in vitro-L929-Assay mit einem IC_{50} von $5 \times 10^{-10} \text{ M}$ oder weniger neutralisiert.

6. Isolierter humaner Antikörper oder Antigen-bindender Bereich davon nach Anspruch 2, welcher ein rekombinanter Antikörper oder Antigen-bindender Bereich davon ist.

7. Isolierter humaner Antikörper oder Antigen-bindender Bereich davon nach Anspruch 2, welcher die durch humanes TNF α induzierte Expression von ELAM-1 in humanen Nebennieren-Endothelzellen hemmt.

8. Isolierter humaner Antikörper nach Anspruch 1 oder 2 oder ein Antigen-bindender Bereich davon, welcher von humanem TNF α mit einer K_{off} -Geschwindigkeitskonstante von $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ oder weniger dissoziiert.

9. Isolierter humaner Antikörper nach Anspruch 1 oder 2 oder ein Antigen-bindender Bereich davon, welcher von humanem TNF α mit einer K_{off} -Geschwindigkeitskonstante von $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ oder weniger dissoziiert.

10. Isolierter humaner Antikörper oder Antigen-bindender Bereich davon nach Anspruch 1 mit einer variablen Region der leichten Kette (LCVR) mit einer CDR3-Domäne, welche die Aminosäuresequenz der SEQ ID NO: 3 oder eine durch eine einzige Alanin-Substitution in Position 1, 4, 5, 7 oder 8 modifizierte Sequenz der SEQ ID NO: 3 enthält, und mit einer variablen Region der schweren Kette (HCVR) mit einer CDR3-Domäne, welche die Aminosäuresequenz der SEQ ID NO: 4 oder eine durch eine einzige Alanin-Substitution in Position 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10 oder 11 modifizierte Sequenz der SEQ ID NO: 4 enthält.

11. Isolierter humaner Antikörper oder Antigen-bindender Bereich davon nach Anspruch 10, worin die LCVR ferner eine CDR2-Domäne hat, welche die Aminosäuresequenz der SEQ ID NO: 5 umfasst, und die HCVR ferner eine CDR2-Domäne hat, welche die Aminosäuresequenz der SEQ ID NO: 6 umfasst.

12. Isolierter humaner Antikörper oder Antigen-bindender Bereich davon nach Anspruch 11, worin die LCVR ferner eine CDR1-Domäne hat, welche die Aminosäuresequenz der SEQ ID NO: 7 umfasst, und die HCVR ferner eine CDR1-Domäne hat, welche die Aminosäuresequenz der SEQ ID NO: 8 umfasst.

13. Isolierter humaner Antikörper oder Antigen-bindender Bereich davon mit einer variablen Region der leichten Kette (LCVR), welche die Aminosäuresequenz der SEQ ID NO: 1 enthält, und einer variablen Region der schweren Kette (HCVR), welche die Aminosäuresequenz der SEQ ID NO: 2 enthält.

14. Isolierter humaner Antikörper nach Anspruch 13, welcher eine konstante IgG1-Region der schweren Kette besitzt.

15. Isolierter humaner Antikörper nach Anspruch 13, welcher eine konstante IgG4-Region der schweren Kette hat.

16. Isolierter humaner Antikörper nach Anspruch 13, welcher ein Fab-Fragment ist.

17. Isolierter humaner Antikörper nach Anspruch 13, welcher ein einkettiges Fv-Fragment ist.

18. Isolierter humaner Antikörper oder Antigen-bindender Bereich davon nach Anspruch 1 mit einer variablen Region der leichten Kette (LCVR) mit einer CDR3-Domäne, welche eine aus der Gruppe aus SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26 ausgewählte Aminosäuresequenz enthält, oder mit einer variablen Region der schweren Kette (HCVR) mit einer CDR3-Domäne, welche eine aus der Gruppe aus SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33 und SEQ ID NO: 34 ausgewählte Aminosäuresequenz enthält.

19. Rekombinanter humaner Antikörper oder Antigen-bindender Bereich davon, welcher die Aktivität von humanem TNF α , nicht jedoch die von humanem TNF β , neutralisiert und die Merkmalseigenschaften einer der in Anspruch 1 bis 18 definierten Antikörper besitzt.

20. Rekombinanter humaner Antikörper oder Antigen-bindender Bereich davon nach Anspruch 19, welcher auch die Aktivität von Schimpansen-TNF α und wenigstens eines weiteren Primaten-TNF α s, ausgewählt aus der Gruppe aus Pavian-TNF α , Krallenaffe-TNF α , Cynomolgus-TNF α und Rhesus-TNF α , neutralisiert.

21. Rekombinanter humaner Antikörper oder Antigen-bindender Bereich davon nach Anspruch 20, welcher auch die Aktivität von Hund-TNF α neutralisiert.

22. Rekombinanter humaner Antikörper oder Antigen-bindender Bereich davon nach Anspruch 20, welcher auch die Aktivität von Schwein-TNF α neutralisiert.

23. Isolierte Nukleinsäure, welche für die leichte Kette eines Antikörpers gemäß Anspruch 1 kodiert, worin die CDR3-Domäne die Aminosäuresequenz der SEQ ID NO: 3 oder eine durch eine einzige Alanin-Substitution in Position 1, 4, 5, 7 oder 8 oder durch ein bis fünf konservative Aminosäuresubstitutionen in Position 1, 3, 4, 6, 7, 8 und/oder 9 modifizierte Sequenz der SEQ ID NO: 3 enthält.

24. Isolierte Nukleinsäure nach Anspruch 23, welche für eine variable Region der leichten Kette eines Antikörpers (LCVR) kodiert.

25. Isolierte Nukleinsäure nach Anspruch 24, worin die CDR2-Domäne der Antikörper-LCVR die Aminosäuresequenz der SEQ ID NO: 5 enthält.

26. Isolierte Nukleinsäure nach Anspruch 25, worin die CDR1-Domäne der Antikörper-LCVR die Aminosäuresequenz der SEQ ID NO: 7 enthält.

27. Isolierte Nukleinsäure, welche für die schwere Kette eines Antikörpers nach Anspruch 1 kodiert, worin die CDR3-Domäne die Aminosäuresequenz der SEQ ID NO: 4 oder eine durch eine einzige Alanin-Substitution in Position 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10 oder 11 oder durch ein bis fünf konservative Aminosäuresubstitutionen in Position 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11 und/oder 12 modifizierte Sequenz der SEQ ID NO: 4 enthält.

28. Isolierte Nukleinsäure nach Anspruch 27, welche für eine variable Region der schweren Kette des Antikörpers (HCVR) kodiert.

29. Isolierte Nukleinsäure nach Anspruch 28, worin die CDR2-Domäne der Antikörper-HCVR die Aminosäuresequenz der SEQ ID NO: 6 enthält.

30. Isolierte Nukleinsäure nach Anspruch 29, worin die CDR1-Domäne der Antikörper-HCVR die Aminosäuresequenz der SEQ ID NO: 8 enthält.

31. Isolierte Nukleinsäure, welche für die leichte oder schwere Kette des Antikörpers nach Anspruch 1 kodiert, worin die CDR3-Domäne eine aus der Gruppe aus:

- a) leichte Kette: SEQ ID NO: 3, SEQ ID NOs: 11–26
 - b) schwere Kette: SEQ ID NO: 4, SEQ ID NOs: 27–34
- ausgewählte Aminosäuresequenz enthält.

32. Isolierte Nukleinsäure, die für eine variable Region der leichten Kette des Antikörpers, welche die Aminosäuresequenz der SEQ ID NO: 1 enthält, kodiert.

33. Isolierte Nukleinsäure nach Anspruch 32, welche für die variable Region der leichten Antikörperkette und eine konstante Region der leichten Antikörperkette kodiert.

34. Isolierte Nukleinsäure nach Anspruch 33, welche in einem rekombinanten Expressionsvektor ist.

35. Isolierte Nukleinsäure, die für eine variable Region der schweren Antikörperkette, welche die Aminosäuresequenz der SEQ ID NO: 2 enthält, kodiert.

36. Isolierte Nukleinsäure nach Anspruch 35, welche für die variable Region der schweren Antikörperkette und eine konstante Region der schweren Antikörperkette kodiert.

37. Isolierte Nukleinsäure nach Anspruch 36, worin die konstante Region der schweren Antikörperkette eine konstante IgG1-Region ist.

38. Isolierte Nukleinsäure nach Anspruch 36, worin die konstante Region der schweren Antikörperkette eine konstante IgG4-Region ist.

39. Isolierte Nukleinsäure nach Anspruch 37, welche in einem rekombinanten Expressionsvektor ist.

40. Rekombinanter Expressionsvektor, welcher für:

- a) eine leichte Antikörperkette mit einer variablen Region, welche die Aminosäuresequenz der SEQ ID NO: 1 enthält; und
- b) eine schwere Antikörperkette mit einer variablen Region, welche die Aminosäuresequenz der SEQ ID NO:

2 enthält,
kodiert.

41. Wirtszelle, in die der rekombinante Expressionsvektor nach Anspruch 40 eingeführt wurde.
42. Verfahren zur Herstellung eines humanen Antikörpers, welcher humanes TNF α bindet, wobei man die Wirtszelle nach Anspruch 41 in einem Kulturmedium kultiviert, bis ein humaner Antikörper, welcher humanes TNF α bindet, von der Zelle synthetisiert wird.
43. Pharmazeutische Zusammensetzung, welche den Antikörper oder Antigen-bindenden Bereich davon nach einem der Ansprüche 1 bis 22 und einen pharmazeutisch annehmbaren Träger enthält.
44. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 43, welche ferner wenigstens ein zusätzliches therapeutisches Mittel zur Behandlung einer Erkrankung, für die die TNF α -Aktivität schädlich ist, enthält.
45. Verfahren zum Hemmen der Aktivität von humanem TNF α in vitro, wobei man humanes TNF α mit dem Antikörper oder Antigen-bindenden Bereich davon nach einem der Ansprüche 1 bis 22 zusammenbringt, so dass die Aktivität des humanen TNF α s gehemmt wird.
46. Antikörper oder Antigen-bindender Bereich davon nach einem der Ansprüche 1 bis 22 zur Verwendung für die Hemmung der Aktivität von humanem TNF α in einem menschlichen Subjekt, das unter einer Krankheit leidet, bei der die TNF α -Aktivität schädlich ist.
47. Verwendung des Antikörpers oder Antigen-bindenden Bereichs davon nach einem der Ansprüche 1 bis 22 für die Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung einer Erkrankung, bei der die TNF α -Aktivität schädlich ist.
48. Verwendung nach Anspruch 46 oder 47, wobei die Erkrankung Sepsis ist.
49. Verwendung nach Anspruch 46 oder 47, wobei der Antikörper der Person zusammen mit dem Cytokin Interleukin-6 (IL-6) oder einer Person mit einer IL-6-Serum- oder -Plasmakonzentration über 500 pg/ml verabreicht wird.
50. Verwendung nach Anspruch 46 oder 47, wobei die Erkrankung eine Autoimmunerkrankung ist.
51. Verwendung nach Anspruch 46 oder 47, wobei die Autoimmunerkrankung aus der Gruppe aus rheumatoider Arthritis, rheumatoider Spondylitis, Gelenkarthrose und Gichtarthritis ausgewählt ist.
52. Verwendung nach Anspruch 46 oder 47, wobei die Autoimmunerkrankung aus der Gruppe aus einer Allergie, Multipler Sklerose, Autoimmundiabetes, Autoimmunuveitis und Nephrose ausgewählt ist.
53. Verwendung nach Anspruch 46 oder 47, wobei die Erkrankung eine infektiöse Erkrankung ist.
54. Verwendung nach Anspruch 46 oder 47, wobei die Erkrankung eine Transplantatabstoßung oder Transplantat-Wirt-Reaktion ist.
55. Verwendung nach Anspruch 46 oder 47, wobei die Erkrankung eine Malignität ist.
56. Verwendung nach Anspruch 46 oder 47, wobei die Erkrankung eine Lungenerkrankung ist.
57. Verwendung nach Anspruch 46 oder 47, wobei die Erkrankung eine Darmerkrankung ist.
58. Verwendung nach Anspruch 46 oder 47, wobei die Erkrankung eine Herzerkrankung ist.
59. Verwendung nach Anspruch 46 oder 47, wobei die Erkrankung aus der Gruppe aus entzündlichen Knochenerkrankungen, Knochenresorptionserkrankungen, alkoholischer Hepatitis, viraler Hepatitis, fulminanter Hepatitis, Gerinnungsstörungen, Verbrennungen, Neudurchblutungsverletzungen, Keloidbildung, Narbengewebebildung, Pyrexie, peridontalen Erkrankungen, Fettleibigkeit und Bestrahlungstoxizität ausgewählt ist.
60. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 44, worin das zusätzliche therapeutische Mittel

aus der Gruppe aus nicht-steroidalen entzündungshemmenden Wirkstoffen, Cytokin-suppressiven, entzündungshemmenden Wirkstoffen, CDP-571/BAY-10-3356, cA2, 75 kdTNFR-IgG, 55 kdTNFR-IgG, IDEC-CE9.1/SB 210396, DAB 486-IL-2, DAB 389-IL-2, Anti-Tac, IL-4, IL-10, IL-4-Agonisten, IL-10-Agonisten, IL-1RA, TNF-bp/s-TNFR, S284, R973401, MK-966, Iloprost, Methotrexat, Thalidomid, Thalidomid-verwandte Wirkstoffe, Leflunomid, Tranexaminsäure, T-614, Prostaglandin E1, Tenidap, Naproxen, Meloxicam, Piroxicam, Diclofenac, Indomethacin, Sulfasalazin, Azathioprin, ICE-Inhibitoren, zap-70-Inhibitoren, Ick-Inhibitoren, VEGF-Inhibitoren, VEGF-R-Inhibitoren, Corticosteroide, TNF-Convertase-Inhibitoren, Anti-IL-12-Antikörpern, Interleukin-11, Interleukin-13, Interleukin-17-Inhibitoren, Gold, Penicillinamin, Chloroquin, Hydroxychloroquin, Chlorambucil, Cyclophosphamid, Cyclosporin, Anti-Thrombocyten-Globulin, Anti-CD4-Antikörpern, CD5-Toxinen, oral-verabreichten Peptiden, Collagen, Lobenzaritdinatrium, den Cytokin-regulierenden Mittel HP228 und HP466, ICAM-1-Antisense-Phosphorthioat-Oligodesoxynukleotiden, löslichem Komplementrezeptor 1, Prednison, Orgotein, Glycosaminoglycan-polysulfat, Minocyclin, Anti-IL2R-Antikörpern, meeressbiologischen Lipiden, botanischen Lipiden, Auranofin, Phenylbutazon, Meclofenaminsäure, Flufenaminsäure, intravenösem Immunglobulin, Zileuton, Mycophenolsäure, Tacrolimus, Sirolimus, Amiprilose, Cladribin, Azarabin, Budenosid, epidermalem Wachstumsfaktor, Aminosalicylaten, 6-Mercaptopurin, Metronidazol, Lipoxygenase-Inhibitoren, Mesalamin, Olsalazin, Balsalazid, Antioxidantien, Thromboxan-Inhibitoren, IL-1-Rezeptorantagonisten, monoklonalen Anti-IL-1β-Antikörpern, monoklonalen Anti-IL-6-Antikörpern, Wachstumsfaktoren, Elastase-Inhibitoren, Pyridinyl-Imidazol-Verbindungen, Glucuronid-konjugierten Wirkstoffvorläufer von Prednisolon, Dexamethason oder Budesonid, Dexrankonjugierten Wirkstoffvorläufer von Prednisolon, Dexamethason oder Budenosid, löslichem Komplementrezeptor 1, langsam-freigesetztem Mesalazin, Antagonisten des Blutplättchen-aktivierenden Faktors (PAF), Ciprofloxacin, Lignocain, Prednisolon, Methylprednisolon, Cyclophosphamid, 4-Aminopyridin, Tizanidin, Interferon-β1a, Interferon-β1b, Copolymer 1, hyperbarischem Sauerstoff, intravenösem Immunglobulin, Cladribin, hypertonische Kochsalzlösungen, Antibiotika, kontinuierlicher Hämofiltration, Carbanem, Antagonisten von Cytokinen wie TNFα, IL-1β, IL-6 und/oder IL-8, SK&F 107647, tetravalentem Guanylhydrazon CNI-1493, Gewebefaktor-Stoffwechselweg-Inhibitor, PHP, Eisenchelatoren und Chelatoren, einschließlich Diethylentriamin-pentaessigsäure-Eisen(III)Komplex, Lisofyllin, PGG-Glucan, mit Lipiden rekonstituiertem Apolipoprotein A-1, chiralen Hydroxaminsäuren, Anti-Endotoxin-Antikörpern, E5531, rBPI₂₁, synthetischen Anti-Endotoxin-Peptiden, Surfactant-Ersatztherapien und Anit-IL-8-Antikörpern ausgewählt ist.

61. Antikörper und Antigen-bindende Bereiche davon nach einem der Ansprüche 1 bis 22 für die Verwendung in einem Therapieverfahren.

62. Antikörper und Antigen-bindender Bereich davon nach einem der Ansprüche 1 bis 22, der in Kombination mit wenigstens einem zusätzlichen therapeutischen Mittel für die Behandlung einer Erkrankung verwendet wird, bei der die TNFα-Aktivität schädlich ist.

63. Verwendung nach Anspruch 62, worin das zusätzliche therapeutische Mittel aus der Gruppe aus nicht-steroidalen entzündungshemmenden Wirkstoffen, Cytokin-suppressiven, entzündungshemmenden Wirkstoffen, CDP-571/BAY-10-3356, cA2, 75 kdTNFR-IgG, 55 kdTNFR-IgG, IDEC-CE9.1/SB 210396, DAB 486-IL-2, DAB 389-IL-2, Anti-Tac, IL-4, IL-10, IL-4-Agonisten, IL-10-Agonisten, IL-1RA, TNF-bp/s-TNFR, S284, R973401, MK-966, Iloprost, Methotrexat, Thalidomid, Thalidomid-verwandte Wirkstoffe, Leflunomid, Tranexaminsäure, T-614, Prostaglandin E1, Tenidap, Naproxen, Meloxicam, Piroxicam, Diclofenac, Indomethacin, Sulfasalazin, Azathioprin, ICE-Inhibitoren, zap-70-Inhibitoren, Ick-Inhibitoren, VEGF-Inhibitoren, VEGF-R-Inhibitoren, Corticosteroide, TNF-Convertase-Inhibitoren, Anti-IL-12-Antikörpern, Interleukin-11, Interleukin-13, Interleukin-17-Inhibitoren, Gold, Penicillinamin, Chloroquin, Hydroxychloroquin, Chlorambucil, Cyclophosphamid, Cyclosporin, Anti-Thrombocyten-Globulin, Anti-CD4-Antikörpern, CD5-Toxinen, oral-verabreichten Peptiden, Collagen, Lobenzaritdinatrium, den Cytokin-regulierenden Mittel HP228 und HP466, ICAM-1-Antisense-Phosphorthioat-Oligodesoxynukleotiden, löslichem Komplementrezeptor 1, Prednison, Orgotein, Glycosaminoglycan-polysulfat, Minocyclin, Anti-IL2R-Antikörpern, meeressbiologischen Lipiden, botanischen Lipiden, Auranofin, Phenylbutazon, Meclofenaminsäure, Flufenaminsäure, intravenösem Immunglobulin, Zileuton, Mycophenolsäure, Tacrolimus, Sirolimus, Amiprilose, Cladribin, Azarabin, Budenosid, epidermalem Wachstumsfaktor, Aminosalicylaten, 6-Mercaptopurin, Metronidazol, Lipoxygenase-Inhibitoren, Mesalamin, Olsalazin, Balsalazid, Antioxidantien, Thromboxan-Inhibitoren, IL-1-Rezeptorantagonisten, monoklonalen Anti-IL-1β-Antikörpern, monoklonalen Anti-IL-6-Antikörpern, Wachstumsfaktoren, Elastase-Inhibitoren, Pyridinyl-Imidazol-Verbindungen, Glucuronid-konjugierten Wirkstoffvorläufer von Prednisolon, Dexamethason oder Budesonid, Dexran-konjugierten Wirkstoffvorläufer von Prednisolon, Dexamethason oder Budensonid, löslichem Komplementrezeptor 1, langsam-freigesetztem Mesalazin, Antagonisten des Blutplättchen-aktivierenden Faktors (PAF), Ciprofloxacin, Lignocain, Prednisolon, Methylprednisolon, Cyclophosphamid, 4-Aminopyridin, Tizanidin, Interferon-β1a, Interferon-β1b, Copolymer 1, hyperbarischem Sauerstoff, intravenösem Immunglobulin, Cladribin, hypertonische Kochsalzlösungen, Antibiotika, kontinuierlicher Hämofiltration, Carbanem, Antagonisten von Cytokinen wie TNFα, IL-1β, IL-6 und/oder IL-8, SK&F 107647, tetravalentem Guanylhydrazon CNI-1493, Gewebefaktor-Stoffwechselweg-Inhibitor, PHP, Eisenchelatoren und Chelatoren, einschließlich Diethylentriamin-pentaessigsäure-Eisen(III)Komplex, Lisofyllin, PGG-Glucan, mit Lipiden rekonstituiertem Apolipoprotein A-1, chiralen Hydroxaminsäuren, Anti-Endotoxin-Antikörpern, E5531, rBPI₂₁, synthetischen Anti-Endotoxin-Peptiden, Surfactant-Ersatztherapien und Anit-IL-8-Antikörpern ausgewählt ist.

gonisten von Cytokinen wie TNF α , IL-1 β , IL-6 und/oder IL-8, SK&F 107647, tetravalentem Guanylhydrazon CNI-1493, Gewebefaktor-Stoffwechselweg-Inhibitor, PHP, Eisenchelatoren und Chelaten, einschließlich Diet-hylentriaminpentaessigsäure-Eisen(III)Komplex, Lisofyllin, PGG-Glucan, mit Lipiden rekonstituiertem Apolipoprotein A-1, chiralen Hydroxaminsäuren, Anti-Endotoxin-Antikörpern, E5531, rBPI₂₁, synthetischen Anti-Endotoxin-Peptiden, Surfactant-Ersatztherapien und Anit-IL-8-Antikörpern ausgewählt ist.

Es folgen 11 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

CDR L1	2SD4 VL DIQMTQSPSSLSASSIGDRVTITC	RASQGIRNYLA	WYQQKPGKAPKLLIY	AASTLQS
EP B12
VL10E4
VL100A9
VL100D2
VL10F4
LOE5
VLL0F9
VLL0F10
VLL0G7
VLL0G9
VLL0H1
VLL0H10
VL1B7
VL1C1
VL1C7
VLO.1F4
VLO.1H8
LOE7
LOE7.A
LOE7.T
CDR L2
D2E7 VL DIQMTQSPSSLSASSVGDRVTITC	RASQGIRNYLA	WYQQKPGKAPKLLIY	AASTLQS	...
LD2E7*.A1
LD2E7*.A3
LD2E7*.A4
LD2E7*.A5
LD2E7*.A7
LD2E7*.A8

	CDR	L3	1	2	3	4	5	6	7	8	9
2SD4 VL	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSSLQPEDVATYYC	QKYNSAPYAA									
EP B12	.	R.	.								
VL10E4	.	Q R.	.								
VL100A9	.	S.	T.	.							
VL100D2	.	T.	A.	.							
VL10F4	.	R.	T.	.	P.	.					
LOE5	.	Y.	S.	.							
VLL0F9	.	R.	T.	.	P.	.					
VLL0F10	.	T.	T.	.	N.	.					
VLL0G7	.	T.	T.	.	N.	.					
VLL0G9	.	R.	N.	.	A.	S.	.				
VLL0H1	.	Q.	D T.	.	W.	.					
VLL0H10	.	D.	T.	.	N.	.					
VL1B7	.	N.	.		I.	T.	.				
VL1C1	.	T.	R P.	.	T.	.					
VL1C7	.	R.	R.	.	R.	.					
VL0.1F4	.	R.	R.	.	R.	.					
VL0.1H8	.	R.	R.	.	R.	.					
LOE7	.	R.	R.	.	R.	.					
LOE7.A	.	R.	R.	.	R.	.					
LOE7.T	.	R.	R.	.	T.	.					
D2E7 VL	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSSLQPEDVATYYC	QRYNRAPYTA									
LD2E7*.A1	.	A.	.								
LD2E7*.A3	.	A.	.								
LD2E7*.A4	.	A.	.								
LD2E7*.A5	.	A.	.								
LD2E7*.A7	.	A.	.								
LD2E7*.A8	.	A.	.								

	CDR	H1	CDR	H2
2SD4 VH	Q.VQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFD	DYAMH	WVRQAPGKGLEWVS	AITWNSGHIDYADSV
VH1B11
VH1D8
VH1A11
VH1B12
VH1-D2
VH1E4
VH1F6
VH1G1
3C-H2
VH1-D2.N
VH1-D2.Y
D2E7 VH	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFD	DYAMH	WVRQAPGKGLEWVS	AITWNSGHIDYADSV
HD2E7*.A1
HD2E7*.A2
HD2E7*.A3
HD2E7*.A4
HD2E7*.A5
HD2E7*.A6
HD2E7*.A7
HD2E7*.A8
HD2E7*.A9

FIGUR 2A

CDR H3

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	AS Y L S T S S S L D N	W G Q G T L V T V S S
2SD4 VH	R F F A V S R D N A K N A L Y L Q M N S L R P E D T A V Y Y C T K
VH1B11
VH1D8
VH1A11
VH1B12
VH1-D2
VH1E4
VH1F6
VH1G1
3C-H2
VH1-D2.N
VH1-D2.Y
D2E7 VH	R F T I S R D N A K N S L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A K
HD2E7*.A1
HD2E7*.A2
HD2E7*.A3
HD2E7*.A4
HD2E7*.A5
HD2E7*.A6
HD2E7*.A7
HD2E7*.A8
HD2E7*.A9

FIGUR 2B

FIG. 3

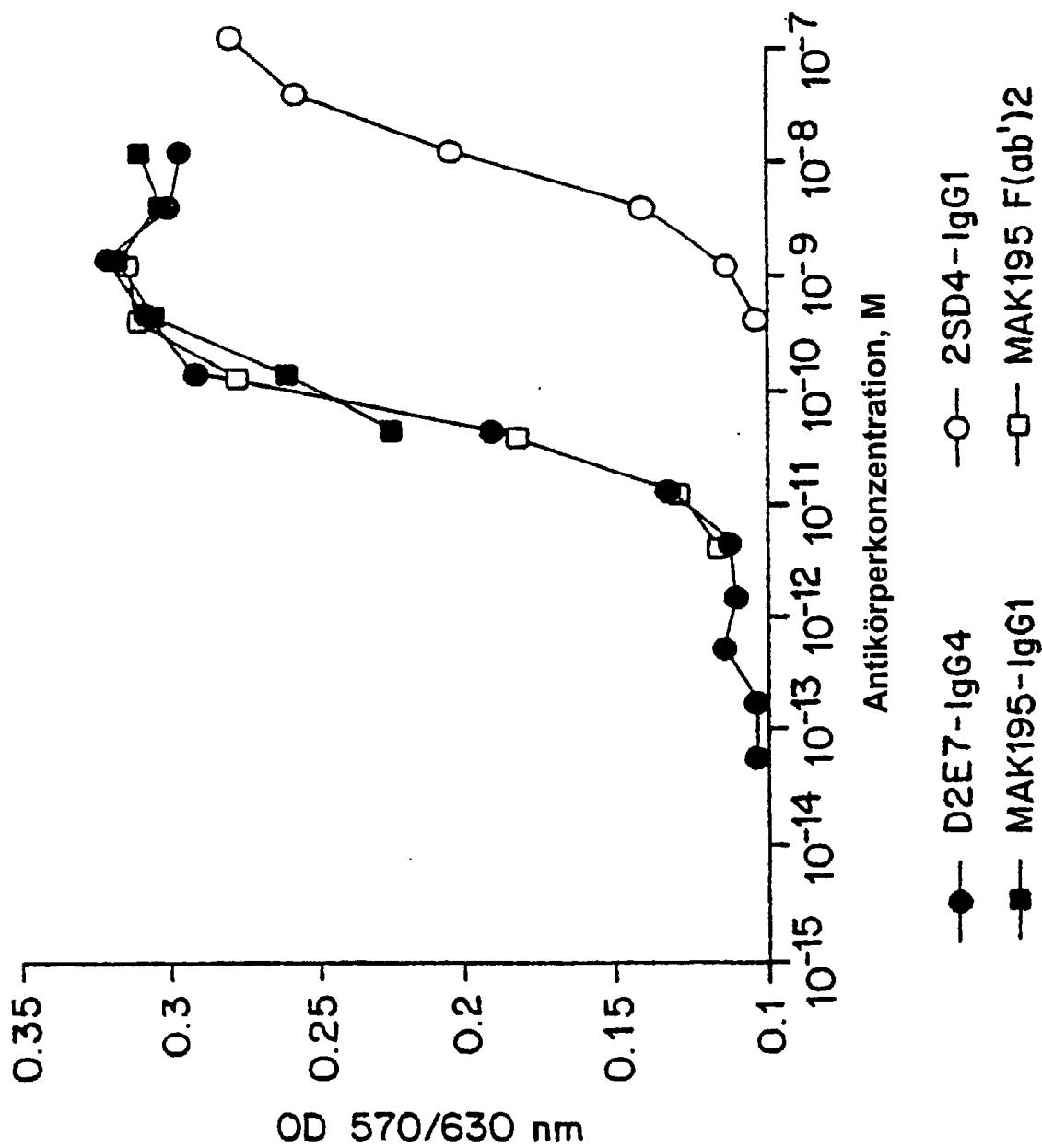
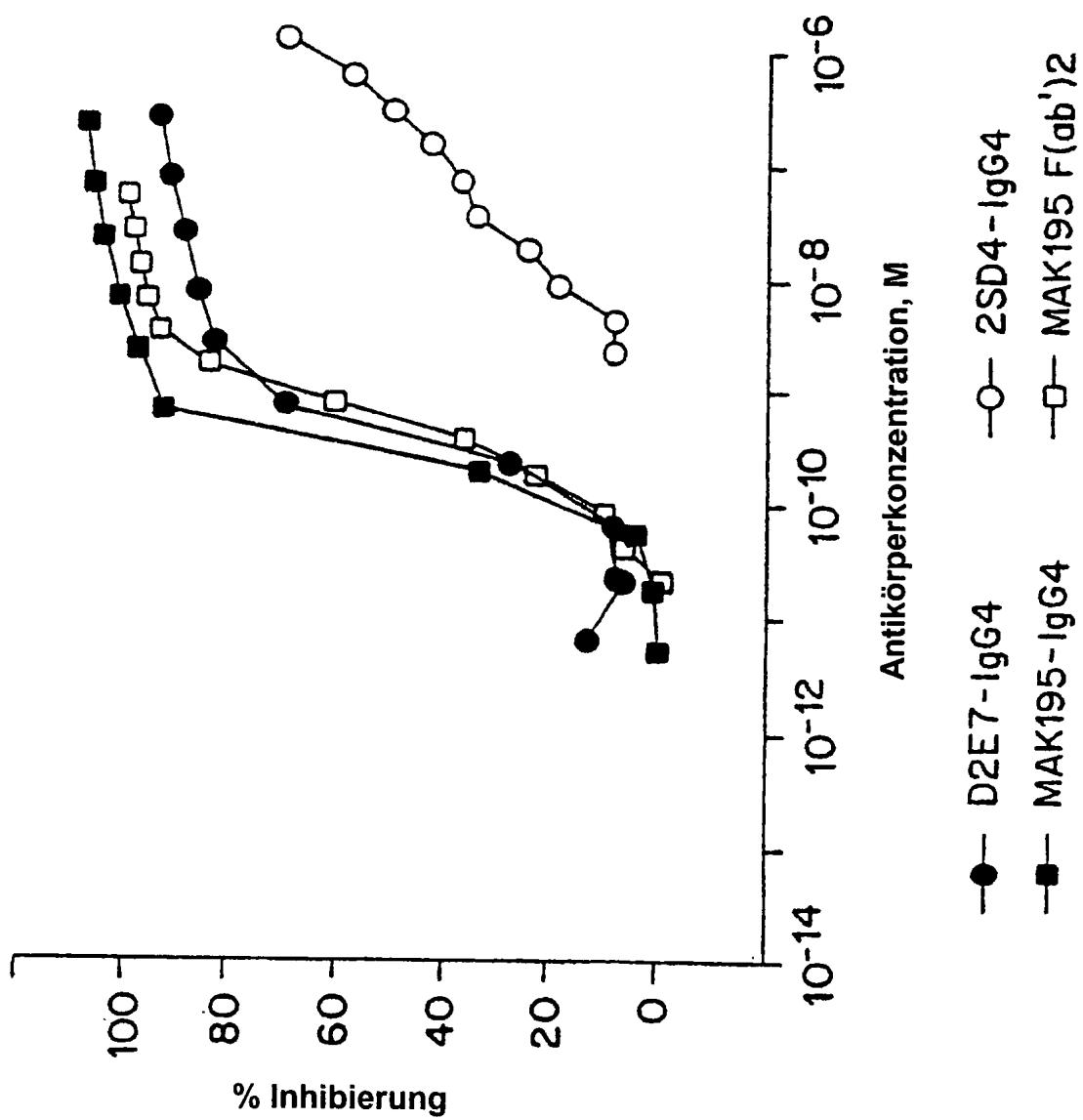


FIG. 4



5
—
上

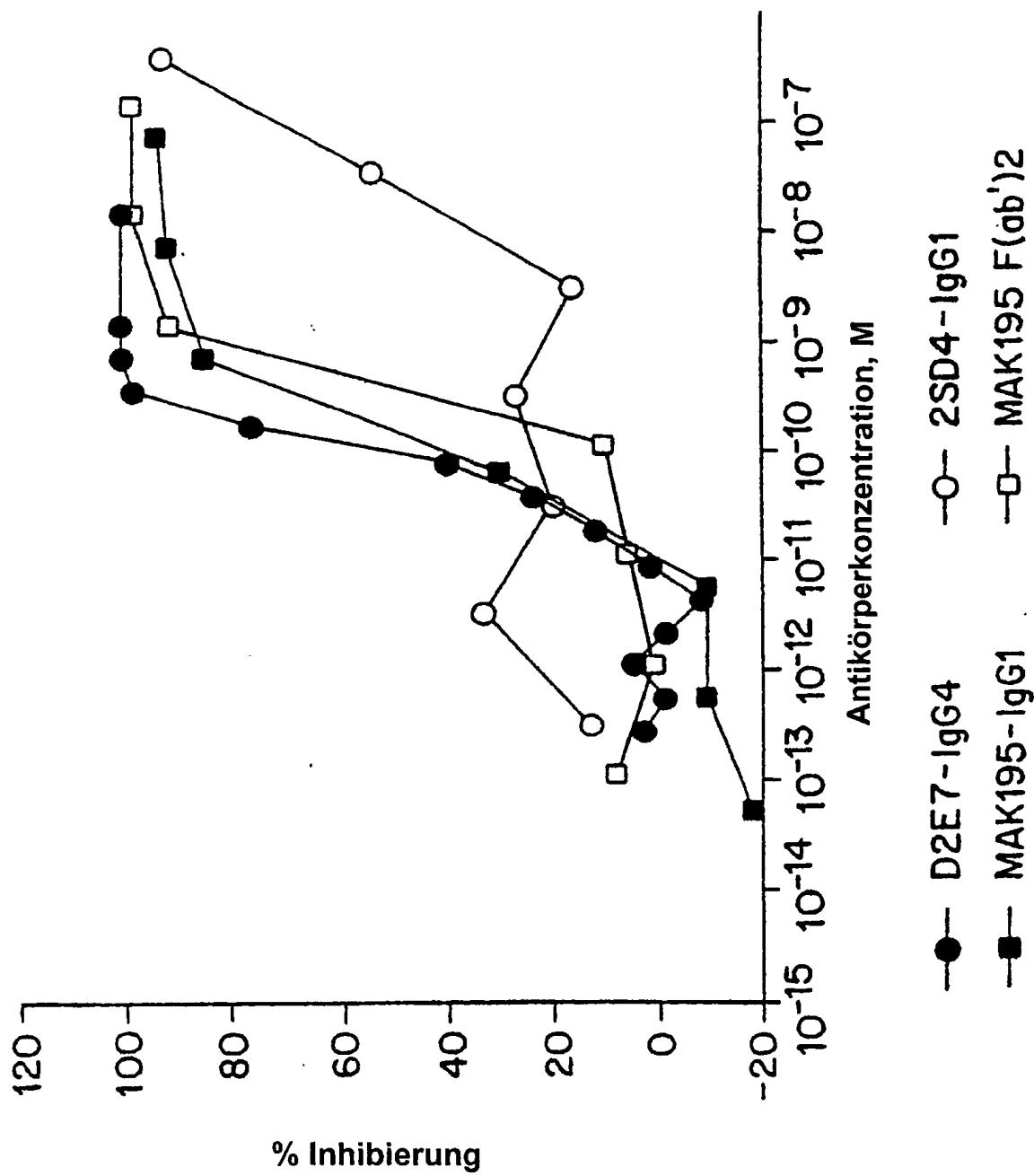
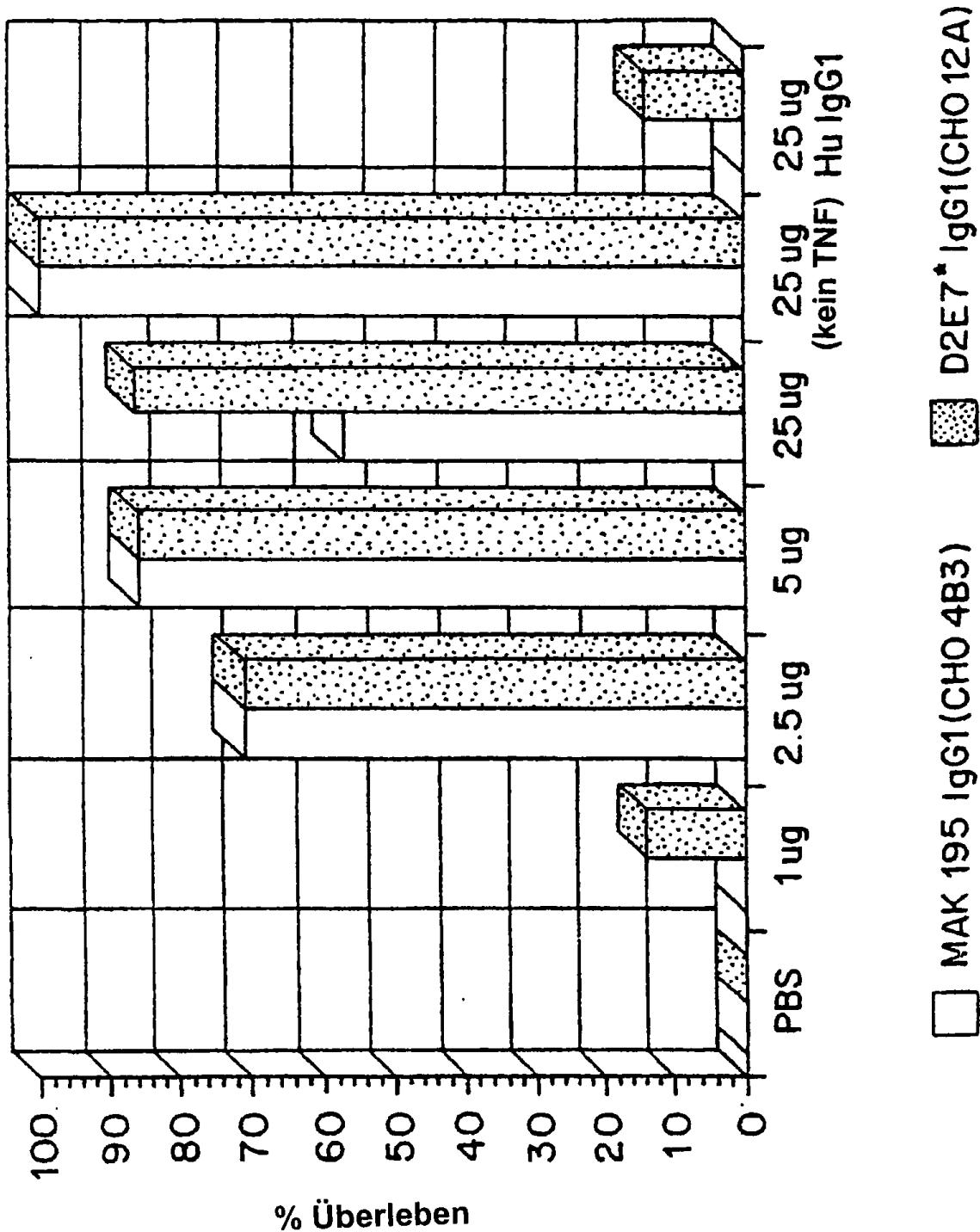


FIG. 6



D2E7 VL

GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCA TCT GTA
 D I Q M T Q S P S S L S A S V

CDR L1

GGG GAC AGA GTC ACC ATC ACT TGT CGG GCA AGT CAG GGC ATC AGA
 G D R V T I T C R A S Q G I R

AAT TAC TTA GCC TGG TAT CAG CAA AAA CCA GGG AAA GCC CCT AAG
N Y L A W Y Q Q K P G K A P K

CDR L2

CTC CTG ATC TAT GCT GCA TCC ACT TTG CAA TCA GGG GTC CCA TCT
L L I Y A A S T L Q S G V P S

CGG TTC AGT GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC
 R F S G S G S G T D F T L T I

AGC AGC CTA CAG CCT GAA GAT GTT GCA ACT TAT TAC TGT CAA AGG
 S S L Q P E D V A T Y Y C Q R

CDR L3

TAT AAC CGT GCA CCG TAT ACT TTT GGC CAG GGG ACC AAG GTG GAA
Y N R A P Y T F G Q G T K V E

ATC AAA
 I K

FIGUR 7

D2E7 VH

GAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GCC TTG GTA CAG CCC GGC
 E V Q L V E S G G G L V Q P G

AGG TCC CTG AGA CTC TCC TGT GCG GCC TCT GGA TTC ACC TTT GAT
 R S L R L S C A A S G F T F D

CDR H1

GAT TAT GCC ATG CAC TGG GTC CGG CAA GCT CCA GGG AAG GGC CTG
D Y A M H W V R Q A P G K G L

CDR H2

GAA TGG GTC TCA GCT ATC ACT TGG AAT AGT GGT CAC ATA GAC TAT
E W V S A I T W N S G H I D Y

GCG GAC TCT GTG GAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA GAC AAC GCC
A D S V E G R F T I S R D N A

AAG AAC TCC CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGT CTG AGA GCT GAG GAT
K N S L Y L Q M N S L R A E D

CDR H3

ACG GCC GTA TAT TAC TGT GCG AAA GTC TCG TAC CTT AGC ACC GCG
T A V Y Y C A K V S Y L S T A

TCC TCC CTT GAC TAT TGG GGC CAA GGT ACC CTG GTC ACC GTC TCG
S S L D Y W G Q G T L V T V S

AGT
 S

FIGUR 8

FIG. 9

