

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
18. Mai 2006 (18.05.2006)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2006/050949 A2

(51) Internationale Patentklassifikation:

C12N 15/13 (2006.01) *A61K 35/12* (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01) *A61P 37/02* (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01) *A61P 37/04* (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01) *A61P 37/06* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) *G01N 33/53* (2006.01)
A61K 31/7088 (2006.01) *G01N 33/577* (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2005/012050

(22) Internationales Anmeldedatum:
10. November 2005 (10.11.2005)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2004 055 622.9
11. November 2004 (11.11.2004) DE
05010264.9 11. Mai 2005 (11.05.2005) EP

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): **TEGENERO AG** [DE/DE]; Science Park Würzburg,
Friedrich-Bergius-Ring 15, 97076 Würzburg (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **HANKE, Thomas**
[DE/DE]; Egerlandstr. 12, 97209 Veitschöchheim (DE).
TRISCHLER, Martin [DE/DE]; Steigstr. 2, 97291
Thüningersheim (DE). **GUNTERMANN, Christine**
[DE/DE]; Kreymlühlenweg 19, 45659 Recklinghausen
(DE).

(74) Anwalt: **VOSSIUS & PARTNER**; Siebertstr. 4, 81675
München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,
AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,
CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES,
FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV,
LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI,
NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG,
SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,
UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,
GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG,
ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU,
TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC,
NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu ver-
öffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Ab-
kürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Co-
des and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der
PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: SUPERAGONISTIC ANTI-CD28 ANTIBODY

(54) Bezeichnung: SUPERAGONISTISCHE ANTI-CD28 ANTIKÖRPER

(57) Abstract: The invention relates to a nucleic acid or several nucleic acids coding for a binding molecule which specifically binds a human CD28-molecule, comprising (a) a nucleic acid sequence coding for a V_H-region and a nucleic acid sequence coding for a V_L-region comprising CDRs in a human immunoglobulin structure, wherein (i) the CDRs of the V_H-region (CDR-H) comprise the amino acid sequences of the SEQ ID NO: 2 or 18 (CDR-H3), 4 or 20 (CDR-H2) and 6 or 22 (CDR-H1) or are coded by the nucleic acid sequences of the SEQ ID NR: 1 or 17 (CDR-H3), 3 or 19 (CDR-H2) and 5 or 21 (CDR-H1); and (ii) the CDRs of the V_L-region (CDR-L) comprise the amino acid sequences of the SEQ ID NO: 8 or 24 (CDR-L3), 10 or 26 (CDR-L2) and 12 or 28 (CDR-L1) or are coded by the nucleic acid sequences of the SEQ ID NR: 7 or 23 (CDR-L3), 9 or 25 (CDR-L2) and 11 or 27 (CDR-L1); and (b) a nucleic acid sequence coding for a constant region of a human IgG1- or IgG4-antibody.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft eine Nukleinsäure oder mehrere Nukleinsäuren, kodierend ein Bindungsmolekül, das spezifisch ein menschliches CD28-Molekül bindet, umfassend (a) eine Nukleinsäuresequenz kodierend eine V_H-Region und eine Nukleinsäuresequenz kodierend eine V_L-Region umfassend CDRs in einem human Immunoglobulin-Gerüst, wobei (i) die CDRs der V_H-Region (CDR-H) die Aminosäuresequenzen der SEQ ID NO: 2 oder 18 (CDR-H3), 4 oder 20 (CDR-H2) und 6 oder 22 (CDR-H1) umfassen oder kodiert werden durch die Nukleinsäuresequenzen der SEQ ID NR: 1 oder 17 (CDR-H3), 3 oder 19 (CDR-H2) und 5 oder 21 (CDR-H1); und (ii) die CDRs der V_L-Region (CDR-L) die Aminosäuresequenzen der SEQ ID NO: 8 oder 24 (CDR-L3), 10 oder 26 (CDR-L2) und 12 oder 28 (CDR-L1) umfassen oder kodiert werden durch die Nukleinsäuresequenzen der SEQ ID NR: 7 oder 23 (CDR-L3), 9 oder 25 (CDR-L2) und 11 oder 27 (CDR-L1); und (b) eine Nukleinsäuresequenz, die eine konstante Region eines humanem IgG1- oder IgG4-Antikörpers kodiert.

WO 2006/050949 A2

5

Superagonistische anti-CD28 Antikörper

- Die Erfindung betrifft eine Nukleinsäure oder mehrere Nukleinsäuren, kodierend ein Bindungsmolekül, das spezifisch ein menschliches CD28-Molekül bindet, umfassend
- 10 (a) eine Nukleinsäuresequenz kodierend eine V_H-Region und eine Nukleinsäuresequenz kodierend eine V_L-Region umfassend CDRs in einem humanen Immunglobulin-Gerüst, wobei
- (i) die CDRs der V_H-Region (CDR-H) die Aminosäuresequenzen der SEQ ID NO:
- 15 2 oder 18 (CDR-H3), 4 oder 20 (CDR-H2) und 6 oder 22 (CDR-H1) umfassen oder
- kodiert werden durch die Nukleinsäuresequenzen der SEQ ID NR: 1 oder 17 (CDR-H3), 3 oder 19 (CDR-H2) und 5 oder 21 (CDR-H1); und
- (ii) die CDRs der V_L-Region (CDR-L) die Aminosäuresequenzen der SEQ ID NO:
- 20 8 oder 24 (CDR-L3), 10 oder 26 (CDR-L2) und 12 oder 28 (CDR-L1) umfassen oder
- kodiert werden durch die Nukleinsäuresequenzen der SEQ ID NR: 7 oder 23 (CDR-L3), 9 oder 25 (CDR-L2) und 11 oder 27 (CDR-L1); und
- (b) eine Nukleinsäuresequenz, die eine konstante Region eines humanem IgG1- oder IgG4-Antikörpers kodiert.
- 25

In der Beschreibung werden eine Reihe an Dokumenten inklusive Patentanmeldungen und Hersteller-Gebrauchsanweisungen aus dem Stand der Technik genannt. Während der Offenbarungsgehalt dieser Dokumenté als nicht

30 relevant für die Patentfähigkeit der Erfindung angesehen wird, ist er per Referenz in die vorliegende Beschreibung inkorporiert.

Die Stimulation ruhender T-Lymphozyten zur Aktivierung, Proliferation und funktionellen Differenzierung erfordert die Besetzung zweier Oberflächenstrukturen,

35 so genannter Rezeptoren: 1. des Antigenrezeptors, der von Zelle zu Zelle eine

unterschiedliche Spezifität besitzt und für die Erkennung von Antigenen, z.B. viralen Spaltprodukten, notwendig ist; sowie 2. des auf allen ruhenden T-Zellen mit Ausnahme einer Untergruppe der CD8 T-Zellen des Menschen gleichermaßen exprimierten CD28 Moleküls, welches natürlicherweise an Liganden auf der Oberfläche anderer Zellen des Immunsystems bindet. Man spricht von der Costimulation der antigenspezifischen Immunreaktion durch CD28. In Zellkultur können diese Vorgänge nachgestellt werden durch Besetzung des Antigenrezeptors sowie des CD28-Moleküls mit geeigneten monoklonalen Antikörpern (mAb). Im klassischen System der Costimulation führt weder die Besetzung des Antigenrezeptors noch die des CD28-Moleküls allein zur T-Zellproliferation, die Besetzung beider Rezeptoren ist jedoch effektiv. Diese Beobachtung wurde an T-Zellen des Menschen, der Maus und der Ratte gemacht.

Allerdings sind auch CD28-spezifische monoklonale Antikörper (mAb) bekannt, die ohne Costimulation die T-Zellproliferation einleiten können. Eine solche superagonistische, d. h. von der Besetzung des Antigenrezeptors unabhängige Aktivierung ruhender T-Lymphozyten durch CD28-spezifische mAb ist beispielsweise aus Tacke et al., Eur. J. Immunol., 1997, 27:239-247, bekannt. Demnach wurden zwei Arten von CD28-spezifischen monoklonalen Antikörpern mit unterschiedlichen funktionellen Eigenschaften beschrieben: costimulatorische mAb, die die Aktivierung ruhender T-Zellen nur bei gleichzeitiger Besetzung des Antigenrezeptors costimulieren, und superagonistische mAb, die ohne Besetzung des Antigenrezeptors T-Lymphozyten aller Klassen in vitro und in Ratten zur Proliferation aktivieren können.

Aus der DE 101 60 516.1 sowie aus Lühder et al., J. Exp. Med., 2003, 197: 955-966, sind darüber hinaus superagonistische mAb mit Spezifität für das CD28 Molekül des Menschen bekannt, welche in vitro ohne Stimulation des T-Zellantigenrezeptors (TCR) T-Zellen sehr effizient aktivieren und expandieren. Hier bediente man sich jedoch immobilisierter Antikörper, die sich, wie weiter unten dargestellt, nicht für therapeutische Anwendung eignen.

Des weiteren zeigten superagonistische anti-CD28 Antikörper Antikörper in Tiermodellen und in Zellkultur ausgeprägte anti-inflammatorische Eigenschaften. So kann beispielsweise, wie in Schmidt et al., J. Neuroimmunol., 2003, 140: 143-152, belegt, die Applikation eines superagonistischen mAk gegen das CD28 Molekül der Ratte die Entstehung einer entzündlichen peripheren Nervenerkrankung, der Experimentellen Autoimmunen Neuritis, EAN, verhindern. Aus der DE 102 12 108.7 sowie aus Lin et al., Eur. J. Immunol., 2003, 33:626-638, ist bekannt, dass superagonistische anti-CD28 Antikörper eine überproportional starke Aktivierung regulatorischer T-Zellen bewirken können. Die Funktion regulatorischer T-Zellen ist, autoaggressive T Zellen zu kontrollieren und dafür Sorge zu tragen, dass es generell zu keiner überschießenden Entzündungsreaktion kommt (Schwartz, Nature Immunol., 2005, 6: 327-330). Allerdings kann ein Eingreifen in die CD28-vermittelte Costimulation das Th1/Th2-Gleichgewicht zugunsten des pro-inflammatorischen Th1-Phänotyps verschieben und birgt daher die Gefahr, Autoimmun-/ entzündliche Reaktionen zu verschlimmern (sh. Schmidt et al., supra).

Für therapeutische Antikörperkandidaten ist es aus nahe liegenden Gründen erstrebenswert, die Immunogenität, d.h. das Auslösen einer Immunantwort gegen die Wirksubstanz, zu vermeiden mit dem Ziel, die pharmakologische Wirksamkeit im Menschen voll auszuschöpfen und gleichzeitig unerwünschte Nebenwirkungen zu reduzieren. Um die Immunogenität von Antikörpern, die nicht aus dem Menschen stammen, zu vermeiden, ist beispielsweise die „Humanisierung“ von Antikörpern mittels gentechnologischer Methoden Stand der Technik. Hierbei wird die Antigenbindungsstelle eines ursprünglich nicht aus dem Menschen stammenden Antikörpers konserviert, während der Rest des Antikörpermoleküls, insbesondere die konstanten Anteile der Antikörper (konstante Domäne oder Fc-Fragment) gegen eine strukturähnliche Variante aus dem menschlichen Erbgut ausgetauscht wird. (Hwang et al., Methods, 2005, 36: 3-10).

Wie aus der DE 102 30 223.5 bekannt ist, verstärkt die Quervernetzung (oder Kreuzvernetzung, „cross-linking“) superagonistischer anti-human CD28 Antikörper deren Fähigkeit, T-Lymphozyten in einer Zellsuspension zu aktivieren. Beispielsweise wird die Proliferation gereinigter T-Lymphozyten um ein vielfaches

verstärkt, wenn superagonistische Antikörper in Form von immobilisierten Molekülkomplexen auf paramagnetischen Kügelchen verwendet werden, statt in der T-Zellsuspension in löslicher Form vorzuliegen. Für die galenische Anwendung im Menschen ist die Applikation solchermaßen komplexierter Darreichungsformen von superagonistischen anti-CD28 Antikörpern aus nahe liegenden Gründen jedoch nicht
5 möglich. Des weiteren kamen in der DE 102 30 223.5 auf paramagnetischen Kügelchen immobilisierte anti-Maus-IgG-Antikörper als kreuzvernetzendes Agens zum Einsatz. Auch in dieser Hinsicht kommt der analoge Ansatz für eine therapeutische Anwendung im Menschen nicht in Frage, da sich die Verwendung
10 von anti-human-IgG-Antikörpern auf Grund der Fülle der zu erwartenden Kreuzreaktionen verbietet. Nicht zuletzt ist der in der DE 102 30 223.5 beschriebene Ansatz auf ein in vitro Verfahren, bei dem gereinigte T-Zellen zum Einsatz kommen, beschränkt. Für die Entwicklung therapeutischer superagonistischer anti-CD28 Antikörper war demzufolge zu prüfen, ob ein geeignetes Antikörperformat existiert,
15 das in vivo eine hinreichende Kreuzvernetzung ermöglicht, ohne unerwünschte Effekte zu erzielen.

Es ist bekannt, dass eine natürliche Erkennung und Quer- oder Kreuzvernetzung von Fc Domänen von Antikörpern im menschlichen Körper durch Fc-Rezeptoren, die auf
20 unterschiedlichen Zelltypen ausgeprägt werden, vermittelt wird (Woof et al., Nature Reviews Immunol., 2004, 1-11). Ziel der Fc-Rezeptor-vermittelten Antikörper-Bindung im physiologischen Kontext ist das „aus-dem-Verkehr-Ziehen“ oder Zerstören von antikörperbeladenen Zellen, da davon auszugehen ist, dass Antikörper nur gegen solche Zellen gebildet werden, die von fremdem Gewebe stammen,
25 bakteriell oder viral infiziert, gestresst oder bösartig entartet sind. Wichtige Fc-Rezeptor-vermittelte Mechanismen der Eliminierung antikörperbeladener Zellen sind die komplementabhängige Zytotoxizität (CDC), die antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC) und die Opsonisierung, d.h. Kenntlichmachung zur Phagozytose durch spezialisierte Fresszellen.

30

Die Fc-Rezeptoren, die für die Erkennung von Fc-Domänen menschlicher Antikörper des IgG Isotyps verantwortlich sind, lassen sich in die Gruppen CD64 (Fc gamma Rezeptor I; hoch-affiner Rezeptor); CD32 (Fc gamma Rezeptor II; intermediär-affiner

Rezeptor) und CD16 (Fc gamma Rezeptor III; niedrig-affiner Rezeptor) klassifizieren. Ihre Bindungseigenschaften an Antikörper der IgG Untergruppen IgG1, IgG2, IgG3 und IgG4 sowie die durch die Bindung an diese Antikörper ausgelösten Effektorfunktionen sind weitgehend bekannt (Woof et al., Nature Reviews Immunol., 5 2004, 1-11). So bewirkt die Stimulation von Fc-Rezeptoren, die an IgG1 bzw. IgG4 binden (CD64 stark an IgG1, mäßig an IgG4; CD32 schwach an IgG1, nicht an IgG4; CD16b stark an IgG1, sehr schwach oder nicht an IgG4), in der Regel auch eine Eliminierung der Zielzellen über ADCC oder CDC.

10 Zusammenfassend ist somit aus dem Stand der Technik bekannt, dass Quervernetzung, wenn sie durch im menschlichen Körper vorhandene Moleküle bewirkt wird, überwiegend mit einer Eliminierung der antikörperbeladenen Zellen einhergeht.

15 Demzufolge bestand die Aufgabe bei der Entwicklung therapeutischer superagonistischer anti-CD28 Antikörper darin, ein Antikörperformat zu finden, das sich zum einen im Körper durch physiologisch vorhandene Strukturen oder Moleküle, beispielsweise Fc-Rezeptoren, kreuzvernetzen lässt. Zum anderen soll eine solche Kreuzvernetzung aber nicht zu einer (wesentlichen) Eliminierung oder Zerstörung der 20 eigentlichen Zielstruktur des Antikörpers, nämlich den CD28⁺ T-Zellen führen. Diese Aufgabe wird durch die in den Ansprüchen bereitgestellten Ausführungsformen gelöst.

Dementsprechend betrifft die Erfindung eine Nukleinsäure oder mehrere 25 Nukleinsäuren, kodierend ein Bindungsmolekül, das spezifisch ein menschliches CD28-Molekül bindet, umfassend

(a) eine Nukleinsäuresequenz kodierend eine V_H-Region und eine Nukleinsäuresequenz kodierend eine V_L-Region umfassend CDRs in einem human Immunglobulin-Gerüst, wobei

30 (i) die CDRs der V_H-Region (CDR-H) die Aminosäuresequenzen der SEQ ID NO: 2 oder 18 (CDR-H3), 4 oder 20 (CDR-H2) und 6 oder 22 (CDR-H1) umfassen oder

kodiert werden durch die Nukleinsäuresequenzen der SEQ ID NR: 1 oder 17 (CDR-H3), 3 oder 19 (CDR-H2) und 5 oder 21 (CDR-H1); und

(ii) die CDRs der V_L-Region (CDR-L) die Aminosäuresequenzen der SEQ ID NO: 8 oder 24 (CDR-L3), 10 oder 26 (CDR-L2) und 12 oder 28 (CDR-L1) umfassen
oder

kodiert werden durch die Nukleinsäuresequenzen der SEQ ID NR: 7 oder 23 (CDR-L3), 9 oder 25 (CDR-L2) und 11 oder 27 (CDR-L1); und

(b) eine Nukleinsäuresequenz, die eine konstante Region eines humanem IgG1- oder IgG4-Antikörpers kodiert.

Der Begriff „Nukleinsäure“ im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung bezieht sich auf ein Nukleinsäuremolekül oder mehrere Nukleinsäuremoleküle, die in ihrer Gesamtheit das erfindungsgemäße Bindungsmolekül kodieren. Die kodierenden Regionen für die Komponenten des erfindungsgemäßen Bindungsmolekül können somit von einem Nukleinsäuremolekül umfasst sein oder sich auf distinkten, zwei oder mehr als zwei Nukleinsäuremolekülen befinden. Insbesondere können sich die kodierenden Bereiche für die V_H-Region und die konstante Region der schweren Kette des humanen IgG1 oder IgG4 auf einem Nukleinsäuremolekül befinden und die V_L-Region und die konstante Region der leichten Kette des IgG1 oder IgG4 auf einem zweiten Nukleinsäuremoleküle befinden. Die konstante Region der leichten Kette kann sowohl der Sequenz eines κ-Gens als auch eines λ-Gens entsprechen, die für die konstanten Regionen menschlicher leichter Ketten kodieren. Entsprechend der Erfindung ist im Bindungsmolekül, das von der/den erfindungsgemäßen Nukleinsäure(n) kodiert wird, die V_H-Region bzw. V_L-Region mit der konstanten Region funktionell verbunden, wie dies beispielsweise in einem Antikörper der Fall ist. Ebenso versteht es sich, dass sich die kodierte(n) (Poly)peptidkette(n) nach ihrer Synthese so falten bzw. assemblieren, dass die V_H-Region und die V_L-Region in räumliche Nachbarschaft gelangen und eine Antigen-Bindungsstelle ausbilden. Auch dies ist durch einen Antikörper exemplifiziert.

Der Begriff „umfasst“ bedeutet einerseits „enthält“ (neben anderen Gegenständen) und andererseits „besteht daraus“ (ohne den Einschluss weiterer Gegenstände).

Das CD28-Molekül ist, wie oben beschrieben, ein transmembranes Molekül, das als Homodimer auf der Oberfläche von T-Zellen exprimiert wird. Die Aminosäuresequenz von humanem CD28 kann unter der GenBank Accession No. NM_006139 abgerufen werden.

5

Der Ausdruck „superagonistisch“ beschreibt im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung eine Eigenschaft erfindungsgemäßer Bindungsmoleküle, die durch spezifische Bindung an/Interaktion mit einem bestimmten Epitop des CD28-Moleküls eine Antigenrezeptor-unabhängige Aktivierung von Lymphozyten ermöglichen. Somit entspricht eine „superagonistische Stimulation“ der Aktivierung von CD28⁺ T-Zellen, ohne dass eine Costimulation, d.h. ein weiteres Bindungsereignis neben einer Bindung/Interaktion des CD28-spezifischen Antikörpers zur Stimulation der Proliferation erforderlich ist. Eine solche Aktivierung kann u.a. über eine Detektion von Aktivierungsmarkern auf den Zellen, die Induktion von Transkriptionsfaktoren, einer Proliferation oder der Expression oder Sezernierung von Zytokinen nachgewiesen werden.

Mit Aktivierung und/oder Expansion von T-Zellen ist insbesondere die Vermehrung der Stoffwechselaktivität, Vergrößerung des Zellvolumens, Synthese immunologisch wichtiger Moleküle, wie CD71 oder CD25, und Eintritt in die Zellteilung (Proliferation) auf einen äußeren Reiz hin bezeichnet. Bevorzugt liegen im Ergebnis nach der Aktivierung bzw. Expansion mehr T-Zellen vor als vorher.

Die Begriffe „V_H-Region“ und „V_L-Region“ sind dem Fachmann allgemein bekannt und beschreiben im Stand der Technik die aminoterminalen Domäne eines Antikörpers, die während der B-Lymphozytenreifung durch Rekombination der V-, D- und J-Gensegmente entsteht. Die variablen Regionen der schweren und der leichten Kette von Antikörpern sind für die spezifische Bindung/Interaktion eines Antikörpers an/mit dessen spezifischen Epitop verantwortlich (vgl. Haseman und Capra „immunoglobulins: Structure and Function“, in „Fundamental Immunology“ (ed. W. E. Paul), Raven Press, New York, 2. Ausgabe 1989). Die V_H- und V_L-Regionen können über rekombinante Verfahren auch mit anderen Strukturen als den natürlicherweise auftretenden C-Regionen kombiniert werden.

Der Begriff „CDR“ (complementarity determining regions) beschreibt komplementaritätsbestimmende Regionen der Rezeptoren des Immunsystems, insbesondere von Antikörpern und T-Zellrezeptoren. Diese sind dem Fachmann als Bereiche eines Rezeptors bekannt, die mit dem Liganden in Kontakt treten und die Spezifität des Rezeptors bestimmen. Die CDRs sind die variabelsten Teile der Rezeptoren und für deren Vielfalt verantwortlich. Beispiele für solche Rezeptoren umfassen Antikörper. Je drei der Schleifen befinden sich an den distalen Enden der beiden variablen Domänen von Antikörpern. Diese werden allgemein als CDR-H1 bis CDR-H3 auf der schweren Kette und CDR-L1 bis CDR-L3 auf der leichten Kette von Antikörpern durchnummeriert.

Die Aminosäuresequenz einer CDR oder mehrerer CDRs kann der Fachmann aus einer bekannten Aminosäuresequenz eines Antikörpers, Antikörperfragments oder Derivats bestimmen. Die oben genannten CDRs sind entsprechend dem modifizierten Kabat-Verfahren (AbM/Kabat-Kombi) ermittelt worden. Dieses ergibt sich u.a. aus den Regeln „How to identify the CDRs by looking at a sequence“ auf der Homepage von Andrew C.R. Martin (<http://www.bioinf.org.uk/abs/>). Alternativ können erfindungsgemäß Regeln zur Ermittlung der CDRs der beschriebenen Bindungsmoleküle gemäß Kabat (sh. Kabat, E. A. et al. 1991; *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition. NIH Publication No. 91-3242, sowie Johnson, G. and Wu, T. T. 2000, *Nucleic Acids Research*) verwendet werden. In diesem Falle gelten in den erfindungsgemäßen Ausführungsformen die nach Kabat ermittelten und in Figur 17 dargestellten sowie in den Figuren 2 und 6 hervorgehobenen CDR-Sequenzen. Das bedeutet ferner, dass sich die Framework-Regionen leicht verändern, ohne dass sich jedoch die Gesamtsequenz des Bindungsmoleküls ändert oder ändern müsste. Wie erwähnt: Die CDRs der erfindungsgemäßen Bindungsmoleküle gemäß des Kabat-Systems, als auch des AbM/Kabat-Kombi-Systems sind in der Figur 17 dargestellt. Beispielsweise ist die CDR-H1 Sequenz nach dem modifizierten Kabat-System durch die Sequenz GYTFTSYIYH gegeben, nach dem herkömmlichen Kabat-Verfahren durch SYIYH.

Der Begriff „humanes Immunglobulin-Gerüst“ („Immunglobulin-Framework“) beschreibt die Gesamtheit jener Aminosäuresequenzabschnitte im gefalteten

Zustand, die in der variablen Region eines humanen Antikörpers zwischen den CDRs sowie N- und C-terminal hiervon liegen und das räumliche Gerüst (sterische Formation) des Immunglobulins vorgeben.

- 5 Der Begriff konstante Region ist dem Fachmann u.a. aus Janeway und Travers (Immunologie, 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, s. a. Referenz W. E. Paul, supra) bekannt. Humane Antikörper des Isotyps IgG umfassen die Subklassen IgG1, IgG2, IgG3 und IgG4. Erfindungsgemäß kommt in den Bindungsmolekülen eine konstante Region eines humanem IgG1- oder IgG4-Antikörpers zum Einsatz.
- 10 Der Begriff „binden an/interagieren mit“ wird im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung definiert als Bindung/Interaktion von einer „Antigen-Bindungsstelle“ mit einem Epitop. Der Begriff „Antigen-Bindungsstelle“ definiert, in Übereinstimmung mit der vorliegenden Erfindung, ein Motiv eines Polypeptids/Bindungsmoleküls, das geeignet ist, mit einem spezifischen Antigen
- 15 oder einer Gruppe von Antigenen zu interagieren. Eine solche spezifische Bindung/Interaktion wird auch als ein „spezifisches Erkennen“ eines Antigens definiert. Eine spezifische Erkennung eines Antigens ist erfindungsgemäß eine spezifische Bindung an/Interaktion mit mindestens zwei, vorzugsweise drei, weiter bevorzugt mit mindestens vier Aminosäuren eines Antigens. Der Teil des Antigens,
- 20 der die Bindung/Interaktion mit der Antigen-Bindungsstelle eingeht, wird als Epitop bezeichnet. Das Antigen ist für die erfindungsgemäßen Bindungsmoleküle das CD28-Molekül. Das Epitop der erfindungsgemäßen Bindungsmoleküle befindet sich im als C'D-loop bezeichneten Bereich des CD28-Moleküls. Diese spezifische Bindung/Interaktion führt zur Induktion eines superagonistischen Signals
- 25 (Aktivierung/Stimulation) in einer CD28⁺ Zelle. Eine spezifische Bindung/Interaktion kann auch mit dem „Schlüssel-Schloss-Prinzip“ beschrieben werden. Spezifische Motive in einer Aminosäuresequenz der Antigen-Erkennungsstelle und des Antigens binden aneinander aufgrund ihrer primären, sekundären oder tertiären Struktur.
- Die Begriff „spezifische Interaktion“, wird im Zusammenhang mit der vorliegenden
- 30 Erfindung so verstanden, dass das Bindungsmolekül nicht oder nicht signifikant kreuz-reagiert mit (Poly)peptiden, die eine ähnliche Struktur wie das spezifisch erkannte Antigen haben und auf den selben Zellen exprimiert werden. Die Kreuzreaktivität einer Gruppe von Bindungsmolekülen kann z.B. durch Bestimmung

der Bindungseigenschaften/Bindungsstärken unter üblichen Bedingungen untersucht werden (siehe u.a. Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988 und Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999). Explizit umfasst sind durch die
5 Definition des „Bindens an/Interagieren mit“ auch Konformationsepitope, strukturelle Epitope und diskontinuierliche Epitope, die aus zwei oder mehr Bereichen eines Antigens zusammengesetzt sind (Reste unterschiedlicher Bereiche einer oder mehrerer Polypeptidketten) und ein „natürliches Epitop“ zusammensetzen (siehe Sela, (1969) Science 166, 1365 und Laver, (1990) Cell 61, 553-6).

10

Der Begriff „Kreuzvernetzung/Quervernetzung“ beschreibt eine Herbeiführung einer räumlichen Nähe mehrerer Bindungsmoleküle, die an das spezifische Antigen gebunden sind/mit dem spezifischen Antigen interagieren, wodurch es zu einer multivalenten Bindung des Zielmoleküls (spezifischen Epitops) CD28 kommt. Bei
15 den erfindungsgemäßen Bindungsmolekülen ist eine Kreuzvernetzung/Quervernetzung über das F_C-Fragment des humanisierten IgG-Antikörpers bevorzugt. Dies kann z.B. durch Bindung dieses Fragments an F_C-Rezeptoren auf Lymphozyten oder anderen Zellen erreicht werden. Erfindungsgemäße Bindungsmoleküle (die durch erfindungsgemäße Nukleinsäuren kodiert werden)
20 haben die überraschende Eigenschaft, dass CD28⁺ Zellen durch kreuzvernetzte Bindungsmoleküle aktiviert/stimuliert werden können, ohne eliminiert zu werden.

Der Begriff „Bindungsmolekül“ wird im Zusammenhang mit der Erfindung zur Beschreibung einer Gruppe von Molekülen verwendet, die sowohl als Monomere, als
25 auch als Di-, Tri- oder Oligomere auftreten können. Di-, Tri- oder Oligomere können sowohl Homomere, als auch Heteromere sein. Vorzugsweise sind die einzelnen Ketten von Di-, Tri- oder Oligomere kovalent miteinander verbunden. Insbesondere bevorzugt sind hierbei kovalente Verbindungen über Disulfidbrücken. Alternativ können die Di-, Tri- oder Oligomere aber auch über nicht-kovalente
30 Wechselwirkungen miteinander verbunden sein. Entsprechende Di- Tri- oder Oligomerisierungen können z.B. durch Wechselwirkungen spezifischer Sequenzmotive in den einzelnen Molekülen zustande kommen. Ein Beispiel für eine solche intrinsische Wechselwirkung ist die Wechselwirkung von Monomeren durch

ein „Leucin-Zipper-Motiv“, welches zu einer Dimerisierung führt.

Als Ausgangspunkt für die erfindungsgemäßen superagonistischen CD28-Bindungsmoleküle diente der in Luhder et al., J. Exp. Med., 2003, 197: 955-966, beschriebene Maus anti-human CD28 Antikörper 5.11A1. Die variablen Regionen der schweren und leichten Kette des 5.11A1 Antikörpers wurden dem Stand der Technik entsprechend gentechnologisch humanisiert. Diese Technik ist u.a. als „CDR-grafting“ dem Fachmann bekannt (sh. P.T. Jones et al. 1986. Nature 321: 522-525 sowie Ewert et al., 2004. Methods, 34: 184-199). Die humanisierten variablen Regionen wurden mit der konstanten Region humaner Antikörper des IgG-Isotyps fusioniert.

Es ist bekannt, dass für den therapeutischen Einsatz in Prinzip alle IgG Isotypen (IgG1-4) geeignet sind. Bekanntermaßen besitzen die große Mehrheit der sich in der therapeutischen Entwicklung befindlichen Antikörper ein neutralisierendes, blockierendes oder zerstörerisches (negatives) Wirkprinzip und unterscheiden sich dadurch grundlegend von dem hier verfolgten superagonistischen (positiven) Wirkprinzip. Die erfindungsgemäße Auswahl der Isotypen IgG1 und IgG4 als therapeutische Formate von superagonistischen anti-CD28 Antikörpern beruht auf folgenden Überlegungen und überraschenden experimentellen Befunden:

Basis des erfinderischen Prinzips ist die Auswahl von F_C-Fragmenten des IgG1 bzw. IgG4 Isotyps. IgG1-Antikörper können mittels im Körper vorhandener F_C-Rezeptoren effizient quervernetzt werden. Dies sollte dem superagonistischen Wirkprinzip zuträglich sein (siehe auch Evans et al., Nature Immunol., 2005, 6: 271-279). Dagegen sprach allerdings, dass zu erwarten war, dass eine solche Quervernetzung zu einer Eliminierung der T-Zellen führen würde, was dem gewünschten Wirkprinzip entgegen stünde bzw. zu erwarten stand, dass das gewünschte Wirkprinzip durch diese Eliminierung zunichte gemacht würde. Im Falle des IgG4 Isotyps war dem Stand der Technik zufolge zu erwarten, dass dieser Isotyp der gewünschten Wirksamkeit gegenläufig ist. Für diesen war z.B. eine antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC) auslösende Wirkung beschrieben; siehe Isaacs et al., Clin. Exp. Immunol., 106: 427-433. Darüber hinaus war aufgrund der zu erwartenden fehlenden oder sehr geringen F_C-Rezeptor Bindung nicht davon auszugehen, dass

dieser Isotyp eine T-Zell-Aktivierung beispielsweise in einer Kultur von peripheren Blutleukozyten fördern würde.

Es wurde nach Bereitstellung der erfindungsgemäßen Bindungsmoleküle überraschenderweise festgestellt, dass diese superagonistisch T-Zellen stimulieren.

5 Dies ist für die Antikörper des IgG1 Isotyps (TGN1112) und des IgG4 Isotyps (TGN1412) in den beigefügten Beispielen und den in den Figuren 1 bis 8 dargestellten experimentellen Ergebnissen gezeigt. Die schwere und leichte Kette von TGN1412 ist jeweils in SEQ ID NR: 14 und 16 dargestellt. SEQ ID NR: 30 und 32 zeigen die Aminosäuresequenzen der schweren und leichten Kette von
10 TGN1112. Wie den Figuren 1 bis 8 zu entnehmen ist, werden sowohl die leichten als auch die schweren Ketten der Antikörper TGN1112 und TGN1412 zunächst mit Signalpeptid (in den Figuren als Leaderpeptid bezeichnet) synthetisiert. Das Signalpeptid bestimmt das Targeting innerhalb der Zelle und ist auf der reifen leichten bzw. schweren Kette nicht mehr vorhanden. Hinsichtlich der schweren Kette
15 von TGN1412 ist noch anzumerken, dass bei der Expression in CHO-Zellen zwei Varianten des C-Terminus beobachtet wurden, die sich um einen zusätzlichen Aminosäurerest unterscheiden (Fig. 2). Die DNA-Sequenzen einschließlich Introns und UTR und für das Signalpeptid kodierender Region sind für die schwere und leichte Kette von TGN1412 in SEQ ID NR: 41 und 43 dargestellt; für schwere und
20 leichte Kette von TGN1112 in SEQ ID NR: 45 und 47. Die davon kodierten Aminosäuresequenzen sind in SEQ ID NR: 42, 44, 46 und 48 dargestellt.

Die vorliegenden Erfindung stellt somit in einer bevorzugten Ausführungsform die löslichen anti-CD28 Antikörper TGN1412 und TGN1112 zur polyklonalen Stimulation
25 menschlicher CD4 und CD8 T-Lymphozyten auf eine neuartige, TCR unabhängige Art und Weise zur Verfügung. Unerwartet war der Befund, dass TGN1412 und TGN1112 in löslicher Form die T-Lymphozyten ex vivo sehr effizient aktivieren und expandieren. Dieser Befund war insbesondere für TGN1412 überraschend, da einerseits Quervernetzung des Antikörpers für das superagonistische Wirkprinzip
30 notwendig ist, andererseits aber keine Bindung an hoch- oder intermediär-affine Fc-Rezeptoren nachweisbar war. Für TGN1112 war der Befund überraschend, da der Antikörper in Zellkultur eine stark ausgeprägte Antikörper-abhängige Zytotoxizität gegenüber T-Zellen vermittelt (Fig.16), jedoch gleichzeitig eine sehr starke

Proliferation induziert (Fig. 10A). Gegenüber dem Ausgangsantikörper 5.11A1 zeichnen sich sowohl TGN1412 als auch TGN1112 dadurch aus, dass sie in der Lage sind, den aktivierungsinduzierten Zelltod (Apoptose) menschlicher T-Lymphozyten in Zellkultur sehr niedrig zu halten (Fig. 15). Dieses Ergebnis stellt in
5 Aussicht, dass auch im Menschen TGN1412 und TGN1112 in der Lage sein sollten, T-Lymphozyten sehr effektiv und schonend zu aktivieren und zu expandieren.

Die erfindungsgemäße Nukleinsäure oder die erfindungsgemäßen mehreren Nukleinsäuren umfasst/umfassen vorzugsweise eine Nukleinsäuresequenz
10 kodierend eine V_H -Region und eine Nukleinsäuresequenz kodierend eine V_L -Region, wobei

- (i) die Nukleinsäuresequenz der V_H -Region SEQ ID NR: 33 oder 37 umfasst und/oder ein (Poly)peptid kodiert, das die Aminosäuresequenz SEQ ID NR: 34 oder 38 umfasst; und
- 15 (ii) die Nukleinsäuresequenz der V_L -Region SEQ ID NR: 35 oder 39 umfasst und/oder ein (Poly)peptid kodiert, das die Aminosäuresequenz SEQ ID NR: 36 oder 40 umfasst.

Die erfindungsgemäße Nukleinsäure oder die erfindungsgemäßen mehreren
20 Nukleinsäuren umfasst/umfassen weiter bevorzugt eine Nukleinsäuresequenz, wobei die Nukleinsäuresequenz

- (i) SEQ ID NR: 13, 29, 41 oder 45 ist; und/oder
- (ii) ein (Poly)peptid mit der Aminosäuresequenz SEQ ID NR: 14, 30, 42 oder 46 kodiert.

25 Ebenso bevorzugt sind eine Nukleinsäure oder mehrere Nukleinsäuren, die eine Nukleinsäuresequenz umfassen, wobei die Nukleinsäuresequenz

- (i) SEQ ID NR: 15, 31, 43 oder 47 ist; und/oder
- (ii) ein (Poly)peptid mit der Aminosäuresequenz SEQ ID NR: 16, 32, 44 oder 48 kodiert.

30 Es ist darüber hinaus ein bevorzugter Gegenstand der Erfindung, dass eine erfindungsgemäße Nukleinsäure oder die mehreren erfindungsgemäßen

Nukleinsäuren zusätzlich eine Nukleinsäuresequenz umfasst/umfassen, die für ein Markierungselement oder Tag kodiert.

Der Begriff „Markierungselement“ oder „Tag“ beschreibt im Zusammenhang mit der Erfindung ein Element, das die Fähigkeit zur Wechselwirkung mit einem bekannten Bindungspartner vermittelt. Diese Wechselwirkung ihrerseits eröffnet Anwendungen wie (erleichterte) Aufreinigung oder Isolierung sowie Detektion oder Nachweis.

Die erfindungsgemäßen Markierungselemente oder Tags können beispielhaft ausgewählt sein aus einer Gruppe bestehend aus His-tag, Flag-tag, Myc-tag, HA-tag, GST-tag, T100TM, VSV-G, V5, S-tagTM, HSV, CFP, RFP, YFP, GFP, BFP, Cellulose binding domain (CBD), Maltose binding protein (MBP), NusA-tag, thioredoxin (Trx), DsbA, DabC und einer Biotinylierungssequenz. Alternativ dazu bzw. insbesondere kann das Markierungselement eine radioaktive, fluoreszierende, phosphoreszierende oder lumineszierende Markierung sein. Radioaktive Markierungen schließen Markierungen mit ³²P (bei Nukleinsäuren) und ¹²⁵I oder ¹³²I (bei Proteinen) ein.

In einer alternativen Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung einen Vektor umfassend eine oder mehrere der oben beschriebene erfindungsgemäßen Nukleinsäuren.

Dem Molekularbiologen als Fachmann sind eine Vielzahl von geeigneten Vektoren bekannt. Die Wahl eines Vektors hängt in diesem Zusammenhang von den gewünschten Eigenschaften ab und schließt Plasmide, Cosmide, Viren, Bakteriophagen und andere konventionell in der Gentechnologie verwendete Vektoren ein. Allgemein bekannte Verfahren können zur Herstellung verschiedener Vektoren verwendet werden; siehe u.a. Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd edition 1989 and 3rd edition 2001; Gerhardt et al.; Methods for General and Molecular Bacteriology; ASM Press, 1994; Lefkovits; Immunology Methods Manual: The Comprehensive Sourcebook of Techniques; Academic Press, 1997; Golemis; Protein-Protein Interactions: A Molecular Cloning Manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2002 und Ausubel, Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1989), (1994).

Zu exprimierende Nukleotidsequenzen können in geeignete Expressionsvektoren

kloniert werden. Übliche Klonierungsvektoren umfassen pBluescript SK, pGEM, pUC9, pBR322 und pGBT9. Übliche Expressionsvektoren umfassen u.a. pTRE, pCAL-n-EK, pESP-1, pOP13CAT, pKNOH2 und pLNOK (Norderhaug et al., 1997. J. Immunol. Methods, 204: 77-87).

5

Ein erfindungsgemäßer Vektor umfasst üblicherweise eine „regulatorische Sequenz“, die funktionell mit der zu exprimierenden Nukleotidsequenzen verknüpft ist. Der Begriff „regulatorische Sequenz“ beschreibt DNA Sequenzen, die notwendig sind, um die Expression einer kodierten Sequenz zu initiieren. Die Eigenschaften solcher Kontrollsequenzen unterscheiden sich in Abhängigkeit von einem Wirtsorganismus. Der Begriff „funktionell verknüpft“ beschreibt eine Anordnung, in der die genannten Komponenten in für die Expression geeigneter Weise angeordnet sind. Die geeignete Anordnung ist dem Fachmann bekannt.

10

15

Vorzugsweise ist der beschriebene Vektor ein Expressionsvektor. Ein Expressionsvektor ist ein Konstrukt, das zur Transformation eines ausgewählten Wirtes geeignet ist und eine Expression der kodierten Sequenz in dem Wirt ermöglicht. Expressionsvektoren können entsprechend Klonierungsvektoren, binäre Vektoren oder integrierte Vektoren sein. Expression umfasst die Transkription der Nukleinsäure, vorzugsweise in translatierbare mRNA. Regulatorische Elemente, die eine Expression in Prokaryoten und/oder eukaryotischen Zellen gewährleisten sind dem Fachmann bekannt. Kontrollsequenzen für Prokaryoten umfassen im allgemeinen einen Promotor, eine ribosomale Bindungsstelle und einen Terminator. Mögliche regulatorische Elemente für prokaryotische Wirte umfassen z.B. PL, lac, trp or tac Promotoren aus E. coli. Kontrollsequenzen für eukaryotische Zellen umfassen im allgemeinen Promotoren und Terminatoren und unter Umständen Enhancer, Transaktivatoren oder Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen. Promotoren gewährleisten eine Initiation der Transkription. Terminatoren, wie poly-A Signale, gewährleisten eine Termination der Transkription und eine Stabilisation des Transkripts. Beispiele für regulatorische Elemente für eukaryotische Wirtszellen sind z.B. der AOX1 oder GAL1 Promotor für Hefen oder der CMV-, der SV40-, der RSV-Promotor (Rous Sarcoma Virus), der CMV-Enhancer, der SV40-Enhancer oder ein Globin-Intron für Säugerzellen oder andere tierische Zellen. In diesem

20

25

30

Zusammenhang aus dem Stand der Technik bekannte Expressionsvektoren umfassen u.a. Vektoren wie den Okayama-Berg cDNA Expressionvektor pcDV1 (Pharmacia), pCDM8, pRc/CMV, pcDNA1, pcDNA3 (Invitrogen), pEF-DHFR und pEF-ADA (Raum et al. Cancer Immunol Immunother (2001) 50(3), 141-150)
5 „pSPORT1 (GIBCO BRL), sowie pKNOH2 und pLNOK (Norderhaug et al., 1997. J. Immunol. Methods, 204: 77-87).

Der Begriff „Kontrollsequenz“ wird verwendet als Beschreibung aller mindestens für eine Expression in einem ausgewählten Wirt notwendigen Sequenzen und kann
10 somit weitere Komponenten umfassen.

Die Erfindung betrifft ferner einen Wirt, transformiert oder transfiziert mit einem oben beschriebenen Vektor.

Dieser Wirt kann ein Prokaryot oder bevorzugt eine eukaryotische Zelle sein.

15 Prokaryotische Wirte umfasst im Zusammenhang mit der Erfindung alle Eubakterien und Archaeobakterien, die mit den Nukleinsäuren transformiert werden können. Diese Gruppe umfasst somit Gram-negative wie Gram-positive Bakterien wie z.B. E. coli, S. typhimurium, Serratia marcescens und Bacillus subtilis. Eukaryotische Zellen umfassen u.a. Hefen, höhere Pflanzen, Insekten und, vorzugsweise, Säugerzellen;
20 wie CHO-, COS-7-, NS0-, und Per.C6-Zellen.

Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Herstellung eines Bindungsmoleküls, das von einer oder mehreren der oben beschriebenen Nukleinsäuren kodiert wird, umfassend das Züchten des erfindungsgemäßen Wirts unter geeigneten
25 Bedingungen; und Isolieren des Bindungsmoleküls aus der Kultur.

Der transformierte/transfizierte Wirt kann in einem Fermentor gezüchtet werden. Protokolle für eine Züchtung/Kultivierung unterschiedlicher Wirte sind dem Fachmann bekannt. Diese können ohne weitere erfinderische Tätigkeit bestimmt und
30 optimiert werden. Ebenso kennt der Fachmann Verfahren zur Isolation eines rekombinanten (Poly)peptids wie des erfindungsgemäßen Bindungsmoleküls aus einer Kultur bzw. eines Kulturüberstands. Solche Isolationsverfahren umfassen u.a. Ammoniumsulfat-Präzipitation, Affinitätsaufreinigungen (z.B. mit Hilfe von

Chromatographiesäulen), Gelelektrophorese und ähnliches; siehe u.a. Scopes, "Protein Purification", Springer-Verlag, N.Y. (1982) oder Rehm, „Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics“, Spektrum, Akademischer Verlag. Im wesentliche reine Präparationen von Bindungsmolekülen mit 90 bis 95% Homogenität, vorzugsweise mit 98 bis 99% oder noch höherer Homogenität, sind für pharmazeutische Verwendungen bevorzugt.

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung ein Bindungsmolekül, kodiert von einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure oder mehreren erfindungsgemäßen Nukleinsäuren oder hergestellt mit dem erfindungsgemäßen Verfahren.

Antikörper oder Fragmente oder Derivate eines Antikörpers die einem erfindungsgemäßen Bindungsmolekül entsprechen oder dieses enthalten sind bevorzugt.

Antikörperfragmente im Sinne der Erfindung umfassen Fragmente der vorstehend beschriebenen Antikörper, die sowohl die spezifischen Bindungseigenschaften der definierten variablen Regionen umfassen, als auch über einen Teil der konstanten Region eines IgG1 oder IgG4 Antikörpers verfügen, der eine Kreuzvernetzung ermöglicht.

Derivate von erfindungsgemäßen Antikörpern umfassen, sind jedoch nicht beschränkt auf, markierte Antikörper/Antikörperfragmente, wie auch chemisch modifizierte Antikörper/Antikörperfragmente. Die Markierung/Modifikation der Antikörper/Antikörperfragmente kann posttranslational oder durch chemische/biochemische oder molekularbiologische Modifikation erfolgen. Diese Modifikationen umfassen z.B. eine Modifikation der Glykosylierung (Umana et al., 1999, Nature Biotech. 17: 176-180) und eine PEGylierung (Delgado et al., 1996, J. Drug Target. 3: 321-340).

Vorzugsweise ist der erfindungsgemäße Antikörper ein monoklonaler Antikörper.

In einer alternativen Ausführungsform betrifft die Erfindung eine Zusammensetzung, welche die erfindungsgemäße(n) Nukleinsäure(n), einen erfindungsgemäßen Vektor, Wirt, Bindungsmolekül und/oder den Antikörper oder Fragment oder Derivat eines Antikörpers umfasst.

Es ist bevorzugt, das die erfindungsgemäße Zusammensetzung eine pharmazeutische Zusammensetzung ist. Gegebenenfalls kann diese darüberhinaus einen pharmazeutisch verträglichen Träger, einen pharmazeutisch verträglichen Exzipienten oder ein pharmazeutisch verträgliches Verdünnungsmittel enthalten.

Eine erfindungsgemäße pharmazeutische Zusammensetzung umfasst u.a. Arzneimittel und Arzneimitteln Zubereitungen. Beispiele für besonders geeignete pharmazeutisch/pharmakologisch verträgliche Träger/Exzipienten und Verdünnungsmittel sind dem Fachmann bekannt. Diese umfassen gepufferte Kochsalzlösungen, Wasser, Emulsionen wie z.B. Öl/Wasser-Emulsionen, verschiedene Arten von Detergenzien, sterile Lösungen, etc. Arzneimittel, die solche Träger umfassen, können mittels bekannter konventioneller Methoden formuliert werden. Die erfindungsgemäße pharmazeutische Zusammensetzung kann einem Individuum in einer geeigneten Dosis verabreicht werden. Die Verabreichung kann parenteral erfolgen, z.B. intravenös, intraperitoneal, subcutan, intramuskulär, lokal, intranasal, intrabronchial oder intradermal, oder über einen Katheter an einer Stelle in einer Arterie. Die Art der Dosierung wird vom behandelnden Arzt entsprechend den klinischen Faktoren bestimmt. Es ist dem Fachmann bekannt, dass die Art der Dosierung von verschiedenen Faktoren abhängig ist, wie z.B. der Körpergröße bzw. dem Gewicht, der Körperoberfläche, dem Alter, dem Geschlecht oder der allgemeinen Gesundheit des Patienten, aber auch von dem speziell zu verabreichenden Mittel, der Dauer und Art der Verabreichung, und von anderen Medikamenten, die möglicherweise parallel verabreicht werden. Eine typische Dosis kann z.B. in einem Bereich zwischen 0,001 und 500000 µg liegen, wobei Dosen unterhalb oder oberhalb dieses beispielhaften Bereiches, vor allem unter Berücksichtigung der oben erwähnten Faktoren, vorstellbar sind. Im allgemeinen sollte sich bei regelmäßiger Verabreichung der erfindungsgemäßen Zusammensetzung die Dosis in einem Bereich zwischen 10 ng- und 10 mg-Einheiten pro Tag bzw. pro Applikationsintervall befinden. Wird die Zusammensetzung intravenös verabreicht sollte sich die Dosis in einem Bereich zwischen 1 ng- und 1 mg-Einheiten pro Kilogramm Körpergewicht pro Minute befinden.

Die erfindungsgemäße pharmazeutische Zusammensetzung kann lokal oder systemisch verabreicht werden. Präparate für eine parenterale Verabreichung umfassen sterile wäßrige oder nicht-wäßrige Lösungen, Suspensionen und Emulsionen. Beispiele für nicht-wäßrige Lösungsmittel sind Propylenglykol, Polyethylenglykol, pflanzliche Öle wie z.B. Olivenöl, und organische Esterverbindungen wie z.B. Ethyloleat, die für Injektionen geeignet sind. Wäßrige Träger umfassen Wasser, alkoholisch-wäßrige Lösungen, Emulsionen, Suspensionen, Salzlösungen und gepufferte Medien. Parenterale Träger umfassen Natriumchlorid-Lösungen, Ringer-Dextrose, Dextrose und Natriumchlorid, Ringer-Laktat und gebundene Öle. Intravenöse Träger umfassen z.B. Flüssigkeits-, Nährstoff- und Elektrolyt-Ergänzungsmittel (wie z.B. solche, die auf Ringer-Dextrose basieren). Die erfindungsgemäße Zusammensetzung kann außerdem Konservierungsmittel und andere Zusätze umfassen, wie z.B. antimikrobielle Verbindungen, Antioxidantien, Komplexbildner und inerte Gase, und/oder Substanzen, welche die Löslichkeit fördern, wie beispielsweise Tween. Des weiteren können, abhängig von der beabsichtigten Verwendung, Verbindungen wie z.B. Interleukine, Wachstumsfaktoren, Differenzierungsfaktoren, Interferone, chemotaktische Proteine oder ein unspezifisches immunmodulatorisches Agens enthalten sein.

20

Alternativ ist bevorzugt, dass die erfindungsgemäße Zusammensetzung eine diagnostische Zusammensetzung ist.

Es ist ebenso bevorzugt, dass die erfindungsgemäße Zusammensetzung ein Kit ist, der die Nukleinsäure(n), den Vektor, den Wirt, das Bindungsmolekül, und/oder den Antikörper oder Fragment oder Derivat eines Antikörpers in einem oder mehreren Behältern umfasst. Weiter bevorzugt umfasst dieser Kit einen Beipackzettel. Dieser kann eine Beschreibung des Kits, seiner Bestandteile und/oder seiner Verwendung umfassen. Die Beschreibung der Verwendung kann darüber hinaus Dosierungsanweisungen für einen Arzt umfassen.

30

In einer Ausführungsform betrifft die Erfindung die Verwendung der erfindungsgemäßen Nukleinsäure(n), des erfindungsgemäßen Vektors, des erfindungsgemäßen Wirts, des erfindungsgemäßen Bindungsmoleküls und/oder des

erfindungsgemäßen Antikörpers oder Fragments oder Derivats eines
erfindungsgemäßen Antikörpers zur Herstellung einer pharmazeutischen
Zusammensetzung zur Behandlung von Krankheiten, die mit einer fehler- oder
mangelhaften Co-stimulierbarkeit, Funktionalität oder Anzahl von T-Zellen
5 einhergehen, von entzündlichen Krankheiten, und/oder von
Autoimmunerkrankungen.

Alternativ dazu betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Behandlung von Krankheiten,
die mit einer fehlerhaften Co-stimulierbarkeit, Funktionalität oder Anzahl von T-Zellen
10 einhergehen, von entzündlichen Krankheiten, und/oder von Autoimmun-
erkrankungen, umfassend die Verabreichung der erfindungsgemäßen
Nukleinsäure(n), des erfindungsgemäßen Vektors, des erfindungsgemäßen Wirts,
des erfindungsgemäßen Bindungsmoleküls, und/oder des erfindungsgemäßen
Antikörpers oder Fragments oder Derivats eines erfindungsgemäßen Antikörpers.

15 Erfindungsgemäße Verwendungen und Verfahren sind dann bevorzugt, wenn die
Krankheiten, die mit einer fehlerhaften Co-stimulierbarkeit, Funktionalität oder Anzahl
von T-Zellen einhergehen, ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus chronisch
lymphozytäre Leukämie des B-Zell-Typs (B-CLL), akute lymphoblastische Leukämie
20 (ALL), T-Lymphopenie, soliden Tumoren, HIV-Infektion und HTLV-Infektion. Die
soliden Tumore sind vorzugsweise ausgewählt aus Nierenkarzinomen,
Lungenkarzinomen und Melanomen.

Alternativ bevorzugt sind Verwendungen und Verfahren, wobei die entzündlichen und
25 Autoimmunerkrankungen ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus
rheumatoider Arthritis (RA), Typ I Diabetes mellitus, multipler Sklerose, Psoriasis,
Guillain-Barre-Syndrom, Morbus Crohn, und Erkrankungen, die auf unerwünschte T-
Zellaktivierungsreaktionen zurückzuführen sind wie „graft-versus-host disease“
(GvHD) oder „host-versus-graft disease“ (HvGD). Bei den HvGDs ist die Abstoßung
30 solider Organtransplantate, wie Leber, Lunge, Herz und Nieren besonders ins Auge
gefasst.

In einer weiteren alternativen Ausführungsform betrifft die Erfindung die Verwendung der erfindungsgemäßen Nukleinsäure(n), des erfindungsgemäßen Vektors, des erfindungsgemäßen Wirts, des erfindungsgemäßen Bindungsmolekül und/oder des erfindungsgemäßen Antikörper oder Fragment oder Derivat eines Antikörpers zur Herstellung einer diagnostischen Zusammensetzung zur in-vitro Analyse der Responsivität eines Patienten für eine Therapie mit einer pharmazeutischen Zusammensetzung.

Ein mit dieser diagnostischen Zusammensetzung ausführbare in-vitro Analyse umfasst beispielsweise folgende Schritte:

- (a) Isolation von Blutzellen aus einer Blutprobe (z.B. PBMCs (peripheren mononukleären Zellen aus Blut) und/oder Lymphozyten);
 - (b) Inkubation der Blutzellen mit einem erfindungsgemäßen Antikörper und ggf. Zugabe eines exogenen Kreuzvernetzungsreagenz;
 - (c) Detektion einer Antikörper-abhängigen Stimulation von T-Zellen in der Probe.
- Wird eine Antikörper-abhängigen Stimulation von T-Zellen in der Probe detektiert, so ist der Patient, von dem die Probe stammt, responsiv für eine Therapie mit einer erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzung.

Die Figuren zeigen:

Figuren 1-8: zeigen die Nukleotid-bzw. Aminosäuresequenzen der leichten und schweren Ketten von TGN1412 und TGN1112.

Figur 9: Bindungsspezifität der Antikörper TGN1412 und 5.11A1 für CD28 auf transfizierten Jurkat Zellen und auf primären menschlichen T-Zellen.

Für Immunfluoreszenzfärbungen und Durchflusszytometrie wurden je $1-2 \times 10^6$ Zellen/ml in FACS Puffer (PBS, BSA, Na-Azid) mit sättigenden Mengen der Antikörper 5.11A1, TGN1412 irrelevanten, Isotyp-spezifischen Kontrollantikörpern für 40 Minuten bei 4°C inkubiert. Die Färbungen wurden gewaschen, um überschüssigen Antikörper zu entfernen, und vor der Analyse mit sättigenden

Mengen an PE-konjugiertem anti-Maus IgG (für 5.11A1) bzw. PE-konjugiertem anti-human IgG (für TGN1412) für 15 Minuten inkubiert. Die Zellen wurden anschließend mit anti-CD4 Antikörper gegengefärbt. Die durchflusszytometrische Analyse erfolgte an einem FACSCalibur™ mit Hilfe der Cell Quest™ Software (Becton Dickinson). Fluoreszenzsignale und Side-scatter (ssc) Signale wurden logarithmisch, Forward-scatter (fsc) Signale linear aufgenommen. Histogramme zeigen durchweg Signale von Zellen, die in einem empirischen "Life-Gate", definiert durch ssc und fsc, liegen. Sie zeigen die Bindung von 5.11A1 oder TGN1412 (ausgefüllte Kurven) im Vergleich zu Isotyp-Kontroll-Antikörpern (offene Kurven) an Jurkat-Zellen, die kein CD28 exprimieren (linke Graphik) bzw. mit CD28 transfiziert wurden (mittlere Graphiken), sowie an CD4 positive periphere Blut-Mononukleäre Zellen (PBMC, rechte Graphik).

Figur 10: Zellgewinnung und Proliferationstests.

PBMC wurden durch Ficoll-Dichtezentrifugation aus frisch gewonnenen peripherem Blut bzw. aus Buffy Coats isoliert, gewaschen und in einer Konzentration von 2×10^5 Zellen pro 200 µl Napf in 96-Napf Rundbodenplatten in Kultur genommen. Entsprechend den Beschriftungen wurden sie mit löslichem TGN1112, TGN1412, 5.11A1 oder Isotyp-Kontrollantikörpern in einer Konzentration von 1 µg/ml (A) oder entsprechend der Beschriftung an der Abszisse (B) kultiviert. Nach 48 Stunden wurde die relative Zellproliferationsrate -dargestellt als mean cpm $\pm$ SD = Mittelwert counts-per-minute $\pm$ Standardabweichung- mittels [*methyl*- ^3H] Thymidin-Einbau über einen Zeitraum von 18 Stunden und anschließender Flüssig-Szintillationsmessung bestimmt. Die Ergebnisse sind repräsentativ für multiple Bestimmungen mit diversen Spendern.

Figur 11: Zellgewinnung, PBMC-Stimulation und Darstellung waren wie für Figur 10 beschrieben. Die Stimulation von TGN1112 wurde mit der von TGN1112(Fab)₂-Fragmenten verglichen, deren biochemische Qualität und spezifische Bindung an CD28 Transfektanten zuvor gezeigt worden war.

Figur 12: Stimulation von CD4 und CD8 T-Zellen durch TGN1412.

(A) PBMC (Gewinnung und Kulturbedingungen siehe Figur 10) wurden mit TGN1412 (1 µg/ml) bzw. einem Isotyp-Kontroll-Antikörper für die angegebene Zeiträume stimuliert. Der Zellzyklus-Status für CD4 bzw. CD8 Zellen wurde durch intrazelluläre Färbung mittels FITC-markiertem anti- Ki-67 Antikörper bestimmt.
5 Dazu wurden Zellen mit anti-human CD4 PE bzw. anti-CD8 PE Antikörpern für 15 Minuten inkubiert, gewaschen und in Cytofix/Cytoperm™ Puffer (Becton Dickinson) für 20 Minuten bei 4°C inkubiert. Nach Waschen mit Perm/Wash™ Puffer (Becton Dickinson) wurden die Zellen für weitere 30 Minuten bei 4°C mit anti-Ki-67-FITC gefärbt, gewaschen und durchflusszytometrisch wie unter Figur 9 beschrieben
10 gemessen.

(B) CD4+ bzw. CD8+ T-Zellen wurden aus einer PBMC Suspension mit Hilfe geeigneter T-Zell-Isolierungskits und anschließender AutoMACS™-Separation (beides Miltenyi) gewonnen. Die durchflusszytometrisch überprüfte Reinheit betrug 93-98% für CD4+ und 81-95% für CD8+ T-Zellen. 96 Napf-Flachbodenplatten
15 wurden mit anti-human-Ig (40 µg/ml in PBS) für 3 h bei Raumtemperatur beschichtet und anschließend gewaschen. Die Zellen wurden anschließend in einer Dichte von 1×10^5 /Napf zusammen mit TGN1412 oder einem Referenzantikörper kultiviert. Als Positivkontrolle für Zellproliferation diente der Zusatz von PHA (5 µg/ml) und IL-2 (200 U/ml). Die Proliferation wurde nach 48 Stunden wie für Figur
20 10 beschrieben bestimmt und stellt ein repräsentatives Ergebnis für verschiedene Donoren dar.

Figur 13: Analyse des TCR Repertoires TGN1412-stimulierter PBMC.

Die TCR V[beta] Repertoire-Analyse von PBMC, die 96 Stunden mit TGN1412
25 (1µg/ml) bzw. einem IgG4 Kontrollantikörper kultiviert wurden, erfolgte mit Hilfe des IOTest® Beta Mark TCR V[beta] Repertoire. Kit™ (Beckman Coulter) nach Herstellerangaben. Proben wurden mit anti-CD3 und anti-CD4 Antikörpern wie für Figur 9 beschrieben gegengefärbt. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis dreier Bestimmungen, bei dem das Analysefenster auf CD3+ CD4+ Zellen gesetzt
30 wurde.

Figur 14: Messung der anti-CD28 vermittelten T-Zell Apoptose.

PBMC ($2 \times 10^5/\text{ml}$) wurden mit löslichem 5.11A1, TGN1412, TGN1112 oder Isotypkontrollantikörper ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$) für 72 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 15 Minuten mit anti-CD3-APC gefärbt und mit FACS Puffer gewaschen. PBMC wurden in Annexin V Binding Buffer (BD Pharmingen) resuspendiert und mit anti-Annexin V und 7AAD für 15 Minuten inkubiert. Die Apoptose im Sinne von T-Zellen (CD3^+ Fenster), welche Annexin V positiv und 7AAD permeabel waren, wurden mittels Durchflusszytometrie innerhalb 1 Stunde bestimmt.

Figur 15: Induktion des pro-apoptischen Rezeptors CD95 durch anti-CD28 Antikörper.

Der Versuchsaufbau entspricht dem in Figur 14 beschriebenen. Anstelle der Annexin V / 7AAD Färbung wurden PBMC mit anti-CD3 FITC und CD95-PE gefärbt und es wurde die Expression von CD95 auf CD3^+ T-Zellen mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Gezeigt ist ein beispielhaftes Ergebnis für zwei verschiedene Donoren.

Figur 16: Induktion von Antikörper-abhängiger zellulärer Zytotoxizität, ADCC.

Die ADCC diverser anti-CD28 Antikörper wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Dazu wurden 5×10^4 Calcein-AM markierte CD28^+ Jurkat Zellen mit frisch isolierten PBMC in Anwesenheit von $6 \mu\text{g}/\text{ml}$ der angegebenen Antikörper bei den dargestellten Effektor:Zielzellen-Verhältnissen (E:T) für 3,5 Stunden ko-kultiviert. Die Zellen wurden mit $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ Propidium-Iodid in FACS Puffer aufgenommen und durchflusszytometrisch vermessen. Das Verhältnis von Calcein negativen oder Calcein schwach positiven Zellen / Propidium-Iodid positiven Zellen ($\times 100$) zu gesamt-Calcein positiven Zellen wurde als Prozentanteil an Zytotoxizität bestimmt. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis von Bestimmungen mit Zellen verschiedener Donoren.

Figur 17: CDRs der erfindungsgemäßen Bindungsmoleküle nach Kabat-System und nach dem AbM/Kabat-Kombi-System.

Die Beispiele erläutern die Erfindung. Die Beispiele sollen nicht als Limitierung der Erfindung angesehen werden. Die Beispiele sind lediglich zur Illustration der Erfindung beigefügt und die Erfindung wird lediglich durch die Ansprüche begrenzt.

5 Beispiel 1: Bindungseigenschaften der erfindungsgemäßen Antikörper an CD28, CD16b, CD32 und CD64

Es wurde untersucht, ob bei dem Humanisierungsprozess die Bindung an das CD28 Molekül des Menschen erhalten blieb. Wie in Fig.9 beispielhaft für TGN1412 gezeigt,
10 war dies für beide Isotypen der Fall.

Anschließend wurden die Bindungseigenschaften von TGN1412 und TGN112 an CD16b, CD32 und CD64 ermittelt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Es zeigte sich erwartungsgemäß, dass TGN112 mit gut
15 nachweisbarer Affinität an CD16 und CD64, nicht jedoch an CD32 bindet, während TGN1412 nur schwach und ausschließlich mit CD64 interagierte.

Tabelle 1: Bindungseigenschaften von TGN1412 und TGN112 an humane Fc gamma Rezeptoren

FcγR	TGN112	TGN1412
CD16b	++	+
CD32	-	-
CD64	++	+

Legende:

- nicht detektierbar
+ mittlere Bindung
++ starke Bindung

Tabelle 1: Die Bindung von TGN1412 und TGN1112 an FcγRIIIb (CD16b) wurde mittels ELISA gemessen wobei humanes, rekombinantes CD16b (R&D Systems) als „Capture-Antigen“ diente. Die Interaktion zwischen CD16b und TGN1112 wurde mittels HRP-konjugiertem anti-human light chain kappa Ig nachgewiesen. Zum Nachweis der Bindung von TGN1112 bzw. TGN1412 an CD32 und CD64 wurden humane, CD28 negative Zelllinien, welche konstitutiv CD32 und/oder CD64 exprimieren, mit TGN1112 oder TGN1412 für 40 Minuten inkubiert, gewaschen und mit PE- konjugiertem anti-human IgG Antikörper, der die kappa Kette erkennt, gegengefärbt. Zellen wurden gewaschen und die Bindung von TGN1112 und TGN1412 an FcγR wurde mittels Durchflusszytometrie detektiert. Die Spezifität für CD64 wurde bei Zelllinien, welche sowohl CD32 als auch CD64 exprimieren, durch Konkurrenzexperimente mit blockierendem anti-CD64 Antikörper ermittelt.

Beispiel 2: T-Zell-Stimulation durch die erfindungsgemäßen Antikörper

Nachfolgend sind experimentelle Befunde erläutert, die zeigen, dass überraschender Weise sowohl TGN1112 als auch TGN1412 ohne künstliche Quervernetzung in der Lage sind, ex vivo humane T-Lymphozyten zu aktivieren. Aufgrund der Tatsache, dass TGN1412 nur schwach an den Fc-Rezeptor CD64 bindet, war dies insbesondere für TGN1412 nicht zu erwarten.

Es wurde zunächst untersucht, ob die T-Zell-aktivierenden Eigenschaften der humanisierten Antikörper gegenüber dem Ausgangsantikörper 5.11A1 erhalten blieben. Das überraschende Ergebnis ist in Fig.10 beispielhaft dargestellt. In Fig.10A ist gezeigt, dass sowohl TGN1112 als auch TGN1412 in löslicher Form in der Lage sind, in Zellsuspension periphere Blut-mononukleäre Zellen (PBMC) effizient zur Proliferation anzuregen. In Fig.10B ist gezeigt, dass die Induktion der Proliferation von T-Zellen durch TGN1412 ähnlich stark erfolgt wie die Induktion der Proliferation durch den Ausgangsantikörper 5.11A1, dass jedoch konventionelle, d.h. nicht-superagonistische anti-CD28 Antikörper wie beispielsweise die Antikörper 28.2 oder 152-2E10 dazu nicht in der Lage sind.

Beispiel 3: Relevanz der Fc-Domäne für die stimulatorischen Eigenschaften

Anschließend wurde untersucht, ob die Fc-Domäne für die stimulatorischen Eigenschaften gegenüber menschlichen T-Zellen in einer Kultur von PBMC notwendig ist. Dazu wurden von TGN1112 F(ab)₂ Fragmente hergestellt und diese in Zellkultur mit intaktem Antikörper hinsichtlich der Aktivierung von PBMC verglichen. Das Ergebnis ist in Fig. 11 dargestellt. Es zeigt sich, dass F(ab)₂ Fragmente von TGN1112 keinerlei Proliferation induzierten, während der intakte Antikörper dosisabhängig eine starke Proliferation der PBMC auslöste.

Beispiel 4: T-Zellen sind die Zielzellen der stimulatorischen Aktivität der erfindungsgemäßen Antikörper

Um zu zeigen, dass es sich bei den durch TGN1412-Stimulation proliferierenden Zellen in der PBMC Kultur um T-Zellen handelt, wurde die Analyse des Zellzyklusmarkers Ki-67 mit der Analyse der Oberflächenmarker CD4 und CD8 verknüpft. Die Expression von CD4 bzw. CD8 kennzeichnet die beiden Hauptgruppen von T-Zellen, T-Helferzellen (CD4 exprimierend) bzw. zytotoxische T-Zellen (CD8 exprimierend). In Fig.12A ist gezeigt, dass löslicher TGN1412 die Proliferation beider Untergruppen in einer PBMC Suspension deutlich anregt. In Fig.12B ist gezeigt, dass auch gereinigte CD4 bzw. CD8 T-Lymphozyten durch TGN1412 Stimulation deutlich zur Proliferation angeregt werden, allerdings ist in diesem System die Anwesenheit eines quervernetzenden Agens notwendig.

In Fig. 13 ist gezeigt, dass durch die TGN1412-vermittelte Expansion von CD4 T-Zellen in Zellkultur das Repertoire der TCRVB Expression erhalten bleibt. Dies ist dahingehend ein wichtiger Befund, dass es in der angestrebten Immuntherapie von Nutzen ist, die natürlich vorkommende Vielfalt des TCR Repertoire zu konservieren, um Immuntoleranz zu erhalten und Reaktivität gegenüber einem breiten Spektrum von möglichen Erregern zu gewährleisten.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse überraschender Weise, dass sowohl TGN1412 als auch TGN1112 in löslicher Form in der Lage sind, in Zellkultur menschliche T-Zellen zu stimulieren.

Beispiel 5: Hohe stimulatorische bei geringer pro-apoptotischer Wirkung der erfindungsgemäßen Antikörper

- 5 Anschließend wurde die T-Zell-Aktivierung, welche durch TGN1412, TGN1112 und den Ausgangsantikörper 5.11A1 vermittelt wurde, hinsichtlich der Induktion von programmiertem Zelltod (Apoptose) genauer untersucht. Repräsentative Ergebnisse sind in Fig.14 und Fig.15 zusammengefasst.
- 10 In Fig.14 ist dargestellt, dass der Anteil apoptotischer T-Zellen innerhalb einer PBMC Kultur, welche mit den anti-CD28 Antikörpern 5.11A1, TGN1412 und TGN1112 in löslicher Form stimuliert wurden, bei den 5.11A1 stimulierten Kulturen am häufigsten, bei den TGN1112 stimulierten Kulturen intermediär und bei den TGN1412 stimulierten Kulturen am geringsten ausgeprägt war. Im Einklang mit diesen
- 15 Ergebnissen zeigt Fig.15, dass die Expression des Apoptose-auslösenden Rezeptors CD95 auf T-Zellen, die mit 5.11A1 stimuliert waren, am häufigsten war, während TGN1112 stimulierte Zellen eine mittlere und TGN1412 stimulierte T-Zellen eine geringe Häufigkeit an CD95 positiven Zellen aufwiesen.

Literatur

- Delgado et al., 1996. J. Drug Target. 3: 321-340
- Evans et al., Nature Immunol., 2005, 6: 271-279
- 5 Ewert et al., 2004. Methods, 34: 184-199
- Hwang et al., Methods, 2005, 36: 3-10
- Isaacs et al., Clin. Exp. Immunol., 106: 427-433
- Johnson, G. and Wu, T. T. 2000, Nucleic Acids Research
- Jones et al. 1986. Nature 321: 522-525
- 10 Kabat, E. A. et al. 1991; *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition. NIH Publication No. 91-3242
- Lin et al., Eur. J. Immunol., 2003, 33:626-638
- Luhder et al., J. Exp. Med., 2003, 197: 955-966
- Norderhaug et al., 1997. J. Immunol. Methods, 204: 77-87
- 15 Schmidt et al., J. Neuroimmunol., 2003, 140: 143-152
- Schwartz, Nature Immunol., 2005, 6: 327-330
- Tacke et al., Eur. J. Immunol., 1997, 27:239-247
- Umana et al., 1999, Nature Biotech. 17: 176-180
- Woof et al., Nature Reviews Immunol., 2004, 1-11

Patentansprüche

1. Nukleinsäure, kodierend ein Bindungsmolekül, das spezifisch ein menschliches CD28-Molekül bindet, umfassend
- (a) eine Nukleinsäuresequenz kodierend eine V_H -Region und eine Nukleinsäuresequenz kodierend eine V_L -Region umfassend CDRs in einem humanen Immunglobulin-Gerüst, wobei
- (i) die CDRs der V_H -Region (CDR-H) die Aminosäuresequenzen der SEQ ID NO: 2 oder 18 (CDR-H3), 4 oder 20 (CDR-H2) und 6 oder 22 (CDR-H1) umfassen oder kodiert werden durch die Nukleinsäuresequenzen der SEQ ID NR: 1 oder 17 (CDR-H3), 3 oder 19 (CDR-H2) und 5 oder 21 (CDR-H1); und
- (ii) die CDRs der V_L -Region (CDR-L) die Aminosäuresequenzen der SEQ ID NO: 8 oder 24 (CDR-L3), 10 oder 26 (CDR-L2) und 12 oder 28 (CDR-L1) umfassen oder kodiert werden durch die Nukleinsäuresequenzen der SEQ ID NR: 7 oder 23 (CDR-L3), 9 oder 25 (CDR-L2) und 11 oder 27 (CDR-L1); und
- (b) eine Nukleinsäuresequenz, die die konstante Region eines humanen IgG1- oder IgG4-Antikörpers kodiert.
2. Nukleinsäure nach Anspruch 1, umfassend eine Nukleinsäuresequenz kodierend eine V_H -Region und eine Nukleinsäuresequenz kodierend eine V_L -Region, wobei
- (i) die Nukleinsäuresequenz der V_H -Region SEQ ID NR: 33 oder 37 umfasst und/oder ein (Poly)peptid kodiert, das die Aminosäuresequenz SEQ ID NR: 34 oder 38 umfasst; und
- (ii) die Nukleinsäuresequenz der V_L -Region SEQ ID NR: 35 oder 39 umfasst

und/oder ein (Poly)peptid kodiert, das die Aminosäuresequenz SEQ ID NR: 36 oder 40 umfasst

3. Nukleinsäure nach Anspruch 1 oder 2, umfassend eine Nukleinsäuresequenz,
5 wobei die Nukleinsäuresequenz
 - (i) SEQ ID NR: 13, 29, 41 oder 45 ist; und/oder
 - (ii) ein (Poly)peptid mit der Aminosäuresequenz SEQ ID NR: 14, 30, 42 oder 46 kodiert.
- 10 4. Nukleinsäure einem der Ansprüche 1 bis 3, umfassend eine Nukleinsäuresequenz, wobei die Nukleinsäuresequenz
 - (i) SEQ ID NR: 15, 31, 43 oder 47 ist; und/oder
 - (ii) ein (Poly)peptid mit der Aminosäuresequenz SEQ ID NR: 16, 32, 44 oder 48 kodiert.
- 15 5. Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 4, darüber hinaus umfassend eine Nukleinsäuresequenz kodierend für ein Markierungselement oder Tag.
- 6 Vektor, umfassend die Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 5.
- 20 7. Wirt, transformiert oder transfiziert mit dem Vektor nach Anspruch 6.
8. Verfahren zur Herstellung eines Bindungsmoleküls, das von einer Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 5 kodiert wird, umfassend
25 Züchten des Wirts nach Anspruch 7 unter geeigneten Bedingungen; und Isolieren des Bindungsmoleküls aus der Kultur.
9. Bindungsmolekül, kodiert von einer Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 6; oder hergestellt mit dem Verfahren nach Anspruch 8.
- 30 10. Antikörper oder Fragment oder Derivat eines Antikörpers, umfassend zumindest ein Bindungsmolekül nach Anspruch 9.

11. Antikörper nach Anspruch 10, der ein monoklonaler Antikörper ist.

12. Zusammensetzung, umfassend die Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 5, den Vektor nach Anspruch 6, den Wirt nach Anspruch 7, das Bindungsmolekül nach Anspruch 9, und/oder den Antikörper oder Fragment oder Derivat eines Antikörpers nach Anspruch 10 oder 11.

13. Zusammensetzung nach Anspruch 12, die eine pharmazeutische Zusammensetzung ist und gegebenenfalls darüberhinaus einen pharmazeutisch verträglichen Träger, einen pharmazeutisch verträglichen Exzipienten oder ein pharmazeutisch verträgliches Verdünnungsmittel enthält.

14. Zusammensetzung nach Anspruch 12, die eine diagnostische Zusammensetzung ist.

15. Zusammensetzung nach Anspruch 12, die ein Kit ist, der die Nukleinsäure, den Vektor, den Wirt, das Bindungsmolekül, und/oder den Antikörper oder Fragment oder Derivat eines Antikörpers in einem oder mehreren Behältern umfasst.

16. Verwendung der Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 5, den Vektor nach Anspruch 6, den Wirt nach Anspruch 7, das Bindungsmolekül nach Anspruch 9, und/oder den Antikörper oder Fragment oder Derivat eines Antikörpers nach Anspruch 10 oder 11 zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung von Krankheiten, die mit einer fehler- oder mangelhaften Co-stimulierbarkeit, Funktionalität oder Anzahl von T-Zellen einhergehen, von entzündlichen Krankheiten, und/oder von Autoimmunerkrankungen.

17. Verfahren zur Behandlung von Krankheiten, die mit einer fehlerhaften Co-stimulierbarkeit, Funktionalität oder Anzahl von T-Zellen einhergehen, von entzündlichen Krankheiten, und/oder von Autoimmunerkrankungen, umfassend die Verabreichung der Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1

bis 5, den Vektor nach Anspruch 6, den Wirt nach Anspruch 7, das Bindungsmolekül nach Anspruch 9, und/oder den Antikörper oder Fragment oder Derivat eines Antikörpers nach Anspruch 10 oder 11.

- 5 18. Verwendung nach Anspruch 16 oder Verfahren nach Anspruch 17, wobei die Krankheiten, die mit einer fehlerhaften Co-stimulierbarkeit, Funktionalität oder Anzahl von T-Zellen einhergehen, ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus chronisch lymphozytäre Leukämie des B-Zell-Typs (B-CLL), akute lymphoblastische Leukämie (ALL), T-Lymphopenie, soliden Tumoren, HIV-
10 Infektion und HTLV-Infektion.
19. Verwendung nach Anspruch 16 oder Verfahren nach Anspruch 17, wobei die entzündlichen und Autoimmunerkrankungen ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus rheumatoider Arthritis (RA), Typ I Diabetes mellitus, multipler
15 Sklerose, Psoriasis, Guillain-Barre-Syndrom, Morbus Crohn, und Erkrankungen, die auf unerwünschte T-Zellaktivierungsreaktionen zurückzuführen sind wie „graft-versus-host disease“ (GvHD) oder „host-versus-graft disease“ (HvGD).
- 20 20. Verwendung der Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 5, den Vektor nach Anspruch 6, den Wirt nach Anspruch 7, das Bindungsmolekül nach Anspruch 9, und/oder den Antikörper oder Fragment oder Derivat eines Antikörpers nach Anspruch 10 oder 11 zur Herstellung einer diagnostischen Zusammensetzung zur in-vitro Analyse der Responsivität eines Patienten für
25 eine Therapie mit einer pharmazeutischen Zusammensetzung nach Anspruch 13.

DNA-Sequenz der HC von TGN1412 inklusive Introns, UTRs und Leaderpeptid

```

1  ggtaccgggc cgacctcacc atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag
61  ctacaggtaa ggggctcaca gtagcaggct tgaggctctgg acatatatat gggtgacaat
121 gacatccact ttgcctttct ctccacagggt gtgcattccc aggtgcagct ggtgcagtct
181 ggggctgagg tgaagaagcc tggggcctca gtgaaggctc cctgcaaggc ttctggatac
241 accttcacca gctactatat acactgggtg cgacaggccc ctggacaagg gcttgagtgg
301 attggatgta tttatccttg aaatgtcaat actaactata atgagaagtt caaggacagg
361 gccaccctga ccgtagacac gtccatcagc acagcctaca tggagctgag caggctgaga
421 tctgacgaca cggccgtgta tttctgtaca agatcacact acggcctcga ctggaacttc
481 gatgtctggg gccaaaggac cacggtcacc gtctcctcag gtgagtcgta cgctagcaag
541 ctttctgggg caggccgggc ctgacttttg ctgggggcag ggagggggct aaggtagcgc
601 aggtggcgcc agccagggtg acaccaatg cccatgagcc cagacactgg accctgcatg
661 gaccatcgcg gatagacaag aaccgagggg cctctgcgcc ctgggcccag ctctgtccca
721 caccgcggtc acatggcacc acctctcttg cagcttcac caagggccca tccgtcttcc
781 ccctggcgcc ctgctccagg agcacctcgc agagcacagc cgccctgggc tgcctgggtca
841 aggactactt cccgaaccg gtgacgggtg cgtggaactc aggcgcctg accagcggcg
901 tgcacacctt cccggctgtc ctacagtctt caggactc ctccctcagc agcgtggtga
961 ccgtgccttc cagcagcttg ggcacgaaga cctacacctg caacgtagat cacaagocca
1021 gcaacaccaa ggtggacaag agagttgggt agaggccagc acagggaggg aggggtgtctg
1081 ctggaagcca ggctcagccc tctgccttg acgcaccccg gctgtgcagc cccagcccag
1141 ggcagcaagg catgccccat ctgtctcttc acccgagggc ctctgaccac cccactcatg
1201 ctgagggaga ggtcttctg gatttttcca ccaggctccg ggcagccaca ggctggatgc
1261 ccctacccca ggccctgcgc atacaggggc aggtgctgcg ctgagacctg ccaagagcca
1321 tatccgggag gaccctgccc ctgacctaa gcccacccaa aggccaaact ctccactccc
1381 tcagctcaga cacttctct cctccagat ctgagtaact cccaatcttc tctctgcaga
1441 gtccaaatat ggtcccccac gccatcatg cccaggtaa gccaaccagg cctgcgcctc
1501 cagctcaagg cgggacaggt gccttagagt agcctgcata cagggacagg cccagccggg
1561 gtgctgacgc atccacctcc atctcttctt cagcacctga gttcctgggg ggaccatcag
1621 tcttctgtt cccccaaaa cccaaggaca ctctcatgat ctcccgacc cctgaggtca
1681 cgtgcgtggt ggtggacgtg agccaggaag accccgaggt ccagttcaac tggtagctgg
1741 atggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa agccgcggga ggagcagttc aacagcaagt
1801 accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaacggc aaggagtaca
1861 agtgcaaggt ctccaacaaa ggcctccgt cctccatcga gaaaaccatc tccaaggcca
1921 aagggtggac ccacgggggt cgagggccac atggacagag gtcagctcgg cccacctctt
1981 gccctgggag tgaccgctgt gccaacctct gtccctacag ggcagccccg agagccacag
2041 gtgtacaccc tgcccccatc ccaggaggag atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc
2101 ctggtcaaa gcttctaccc cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg
2161 gagaacaa acaagaccac gcctcccggt ctggactccg accgctcctt cttcctctac
2221 agcaggctaa ccgtggacaa gagcaggtg caggagggga atgtcttctc atgtccgtg
2281 atgcatgagg ctctgcacaa ccactacaca cagaagagcc tctcctgtc tctgggtaaa
2341 tgagtgccag ggccggcaag ccccgctcc cgggctctc ggggtcgcgc gaggatgctt
2401 ggcacgtacc ccgtctacat acttcccagg caccagcat ggaaataaag caccaccac
2461 tgccctgggc ccctgtgaga ctgtgatggt tctttccacg ggtcaggccg agtctgaggc
2521 ctgagtgaca tgaggggaggc agagcggatc c

```

Pos. 21 atg: 1. Leader-Codon Pos. 157 tcc: letztes Leader-Codon (Leader mit Intron!)

Pos. 160 cag: 1. VHR-Codon Pos. 517 tca: letztes VHR-Codon

Pos. 2338 aaa : letztes IgG4-Konst.-Codon

Pos. 2341 tga: STOP

FIGURE 1

FIG.2: A3-Sequenz der HC von TGN1412 inklusive Leaderpeptid

MGWSCIIILFLVATATGVHSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSY^YIHWVRQAPGQ
CDR-H1

GLEWIGCIYPCGNVNTNYNEKFKDRATLTVDTSISTAYMELSR^LRSDDTAVYFCTRSHYGLDW
CDR-H2 CDR-H3

NFDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT
CDR-H3

SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG^TKTYTCNV^DHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSC

PAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV^SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP

REEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK^TISKAKGQPREPQVYITLPP

SQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK^TTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKS

RWQEGNVFSCSVMEALENHYTQKSLSLSLGK

Beobachtete Varianten am C-Terminus bei Expression in CHO-Zellen

(...) SLGK oder (...) SLG

Leaderpeptid

MGWSCIIILFLVATATGVHS

DNA-Sequenz der LC von TGN1412 inklusive Introns, UTRs und Leaderpeptid

```

1  ggtaccgggc  cgacctcacc  atgggatgga  gctgtatcat  cctcttcttg  gtagcaacag
61  ctacaggtaa  ggggctcaca  gtagcaggct  tgaggctctg  acatatatat  gggtgacaat
121 gacatccact  ttgcctttct  ctccacaggt  gtgcattccg  acatccagat  gaccagtcct
181 ccactcctcc  tgtctgcac  tgtaggagac  agagtcacca  tcacttgcca  tgccagtcaa
241 aacatttatg  tttggttaaa  ctggtatcag  cagaaaccag  ggaaagcccc  taagctcctg
301 atctataagg  cttccaacct  gcacacaggg  gtoccatcaa  ggttcagtgg  cagtggatct
361 gggacagatt  tcaactctac  catcagcagt  ctgcaacctg  aagattttgc  aacttactac
421 tgtcaacagg  gtcaaaactta  tccgtacacg  ttccggcggag  ggaccaaggt  ggagatcaaa
481 cgtgagtcgt  acgctagcaa  gcttgatata  gaattctaaa  ctctgagggg  gtcggatgac
541 gtggccattc  tttgcctaaa  gcattgagtt  tactgcaagg  tcagaaaagc  atgcaaagcc
601 ctcagaatgg  ctgcaaagag  ctccaacaaa  acaatttaga  actttattaa  ggaatagggg
661 gaagctagga  agaaactcaa  aacatcaaga  ttttaaatac  gcttcttggt  ctcccttgcta
721 taattatctg  ggataagcat  gctgttttct  gtctgtccct  aacatgccct  gtgattatcc
781 gcaaacaaca  caccaaggg  cagaactttg  ttacttaaac  accatcctgt  ttgcttcttt
841 cctcaggaac  tgtgctgca  ccatctgtct  tcatcttccc  gccatctgat  gagcagttga
901 aatctggaac  tgctctgtt  gtgtgcctgc  tgaataactt  ctatcccaga  gaggccaaag
961 tacagtggaa  ggtggataac  gccctccaat  cgggtaactc  ccaggagagt  gtcacagagc
1021 aggacagcaa  ggacagcacc  tacagcctca  gcagcaccct  gacgctgagc  aaagcagact
1081 acgagaaaca  caaagtctac  gcctgcgaag  tcacccatca  gggcctgagc  tcgcccgtca
1141 aaaagagctt  caacagggga  gagtggttaga  gggagaagtg  cccccacctg  ctccctcagtt
1201 ccagcctgac  cccctcccat  cctttggcct  ctgacccttt  ttccacaggg  gacctacccc
1261 tattgoggte  ctccagctca  tctttcacct  caccctccctc  ctccctcctg  gctttaatta
1321 tgctaagtgt  ggaggagaat  gaataataaa  agtgaatctt  tgcacctgtg  gtttctctct
1381 ttctcatttt  aataattatt  atctgttggt  ttaccaacta  ctcaatttct  cttataaggg
1441 actaaatatg  tagtcacct  aaggcgcata  accatttata  aaaatcatcc  ttcattctat
1501 tttaccctat  catcctctgc  aagacagtc  tcctcctcaa  ccacaagcct  tctgtcctca
1561 cagtccctgt  ggccatggta  ggagagactt  gcttccttgt  tttccctcc  tcagcaagcc
1621 ctcatagtc  tttttaagg  tgacaggtct  tacagtcata  tatcctttga  ttcaattccc
1681 tgagaatcaa  ccaaagcaaa  ttcctgcagc  cggggggatc  c

```

Pos. 21 atg: 1. Leader-Codon Pos. 157 tcc: letztes Leader-Codon (Leader mit Intron!)

Pos. 160 gac: 1. VLR-Codon Pos. 478 aaa: letztes VLR-Codon

Pos. 1164 tgt.: letztes Kappa-Konst.-Codon

Pos. 1167 tag: STOP

FIGURE 3

AS-Sequenz der LC von TGN1412 inklusive Leaderpeptide

MGWSCIILFLVATATGVHSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNIYVWLNWYQQKPGKA
PKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGQTYPTYTFGGGTKVE
IKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD
SKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Leaderpeptid

MGWSCIILFLVATATGVHS

FIGURE 4

DNA-Sequenz der HC von TGN1112 inklusive Introns, UTRs und Leaderpeptid

```

1  ggtaccgggc  cgacctcacc  atgggatgga  gctgtatcat  cctcttcttg  gtagcaacag
61  ctacaggtaa  ggggctcaca  gtagcaggct  tgaggctctg  acatatatat  ggggtgacaat
121  gacatccact  ttgcctttct  ctccacagg  gtgcattccc  aggtgcagct  ggtgcagtct
181  ggggctgagg  tgaagaagcc  tggggcctca  gtgaaggctc  cctgcaaggc  ttctggatac
241  accttcacca  gctactatat  acactgggtg  cgacaggccc  ctggacaagg  gcttgagtgg
301  attggatgta  tttatcctgg  aaatgtcaat  actaactata  atgagaagtt  caaggacagg
361  gccaccctga  cgttagacac  gtccatcagc  acagcctaca  tggagctgag  caggctgaga
421  tctgacgaca  cggccgtgta  tttctgtaca  agatcacact  acggcctcga  ctggaacttc
481  gatgtctggg  gccaaaggga  cacggtcacc  gtctcctcag  gtgagtcgta  cgctagcaag
541  ctttctgggg  caggccaggc  ctgaccttgg  ctttggggca  gggagggggc  taaggtaggg
601  cagggtggcg  cagccagggt  cacaccaat  gcccatgagc  ccagacactg  gacgctgaac
661  ctogcggaca  gttaaagaac  caggggcctc  tgcgccctgg  gccagctctc  gtcccacacc
721  gcggtcacat  ggcaaccact  ctcttgagc  ctccaccaag  ggcccatcgg  tcttccccct
781  ggcaccctcc  tccaagagca  cctctggggg  cacagcggcc  ctgggctgcc  tgggtcaagga
841  ctacttcccc  gaaccgggtg  cgggtgctgt  gaactcaggc  gccctgacca  ggggctgca
901  cacttccccg  gctgtcctac  agtctcagg  actctactcc  ctacgcagcg  tggtagaccg
961  gccctccagc  agcttgggca  cccagaccta  catctgcaac  gtgaatcaca  agcccagcaa
1021  caccaagggt  gacaagaaag  ttggtgagag  gccagcacag  ggaggggagg  tgtctgtctg
1081  aagccaggct  cagcgtcctc  gcctggagcg  atcccggcta  tgcagcccca  gtccagggca
1141  gcaaggcagg  ccccgctctg  ctcttcacc  ggaggcctct  gccgccccca  ctcatgctca
1201  gggagagggt  cttctggcct  tttcccaggc  tctgggcagg  cacaggctag  gtgcccctaa
1261  ccagggccct  gcacacaaag  gggcagggtc  tgggctcaga  cctgccaaga  gccatatccg
1321  ggaggaccct  gccctgacc  taagcccacc  ccaaaggcca  aactctccac  tccctcagct
1381  cggacacctt  ctctcctccc  agattccagt  aactcccaat  cttctctctg  cagagcccaa
1441  atcttgtgac  aaaactcaca  catgccacc  gtgcccagg  aagccagccc  aggcctcgcc
1501  ctccagctca  aggcgggaca  ggtgccttag  agtagcctgc  atccagggac  agggcccagc
1561  cgggtgctga  caggtccacc  tccatctctt  cctcagcacc  tgaactcctg  gggggaccgt
1621  cagtcttctt  ctcccccca  aaacccaagg  acaccctcat  gatctcccg  acccctgagg
1681  tcacatgcgt  ggtggtggag  gtgagccacg  aagaccctga  ggtcaagttc  aactggtacg
1741  tggacggcgt  ggaggtgcat  aatgccaaga  caaagcccg  ggaggagcag  tacaacagca
1801  cgtaccgggt  ggtcagcgtc  ctcccgctcc  tgcaccagga  ctggctgaat  ggcaaggagt
1861  acaagtgcaa  ggtctccaac  aaagccctcc  cagcccccac  cgagaaaacc  atctccaaag
1921  ccaaagggtg  gaccggtggg  gtgcgagggc  cacatggaca  gaggccggct  cggcccaccc
1981  tctgccctga  gagtgaccgc  tgtaccaacc  tctgtcccta  cagggcagcc  ccgagaacca
2041  cagggtgata  ccctgcccc  atcccgggat  gagctgacca  agaaccaggt  cagcctgacc
2101  tgctgtgta  aaggcttcta  tcccagcgac  atcgccgtgg  agtgggagag  caatgggcag
2161  ccggagaaga  actacaagac  cagcctcccc  gtgctggact  ccgacggctc  cttcttctc
2221  tacagcaagc  tcaccgtgga  caagagcagg  tggcagcagg  ggaacgtctt  ctcatgctcc
2281  gtgatgcgat  aggtctctga  caaccactac  acgcagaaga  gcctctccct  gtctccgggt
2341  aaatgagtg  gacggccggc  aagccccgc  tccccgggct  ctgcgggtcg  cagcaggatg
2401  ctbggcacgt  acccctgta  catacttccc  gggcgcccag  catggaaata  aagcaccag
2461  cgctgccctg  ggcccctgcg  agactgtgat  ggttctttcc  acgggtcagg  ccgagtctga
2521  ggcttgagtg  gcatgaggga  ggcagagcgg  gtc

```

Pos. 21 atg: 1. Leader-Codon Pos. 157 tcc: letztes Leader-Codon (Leader mit Intron!)

Pos. 160 cag: 1. VHR-Codon Pos. 517 tca: letztes VHR-Codon

Pos. 2341 aaa : letztes IgG1-Konst.-Codon

Pos. 2344 tga: STOP

FIGURE 5

FIG.6: AS-Sequenz der HC von TGN1112 inklusive Leaderpeptid

MGWSCIILFLVATATGVHSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYYIHWVRQAPGQ
CDR-H1

GLEWIGCIYPGNVNTNYNEKFKDRATLTVDTSISTAYMELSRRLRSDDTAVYFCTRSHYGLDW
CDR-H2 CDR-3H

NFDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT

SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC

PPCRAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK

TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT

LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTV

DKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

Leaderpeptid

MGWSCIILFLVATATGVHS

7/17

DNA-Sequenz der LC von TGN1112 inklusive Introns, UTRs und Leaderpeptid

```

1  ggtaccgggc cgacctcacc atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag
61 ctacaggtaa ggggctcaca gtagcaggct tgaggctctg acatatatat gggtgacaat
121 gacatccact ttgcctttct ctccacagggt gtgcattccg acatccagat gaccagctct
181 ccctctctcc tgtctgcac tgtaggagac agagtcacca tcacttgcca tgccagtcaa
241 aacatttatg tttggttaaa ctggtatcag cagaaaccag ggaaagcccc taagctcctg
301 atctataagg cttccaacct gcacacagggt gtcccatcaa gggttcagtgg cagtggatct
361 gggacagatt tcactctcac catcagcagt ctgcaacctg aagattttgc aacttactac
421 tgtcaacagg gtcaaaactta tccgtacacg ttccggcggag ggaccaaggt ggagatcaaa
481 cgtgagtcgt acgctagcaa gcttgatata gaattctaaa ctctgagggg gtccgatgac
541 gtggccattc tttgcctaaa gcattgagtt tactgcaagg tcagaaaagc atgcaaagcc
601 ctcagaatgg ctgcaaagag ctccaacaaa acaatttaga actttattaa ggaatagggg
661 gaagctagga agaaactcaa aacatcaaga ttttaaatac gcttcttggt ctcttgcta
721 taattatctg ggataagcat gctgttttct gtctgtccct aacatgccct gtgattatcc
781 gcaaacacaa caccacaggg cagaactttg ttacttaaac accatcctgt ttgcttcttt
841 cctcaggaac tgtggctgca ccactgtctc tcactctccc gccatctgat gagcagttga
901 aatctggaac tgcctctggt gtgtgcttgc tgaataactt ctatoccaga gaggccaaag
961 tacagtggaa ggtggataac gccctccaat cgggtaactc ccaggagagt gtcacagagc
1021 aggacagcaa ggacagcacc tacagcctca gcagcaccct gacgctgagc aaagcagact
1081 acgagaaaaca caaagtctac gcctgcgaag tcacccatca gggcctgagc tcgcccgtca
1141 caaagagctt caacagggga gagtgtttaga gggagaagtg cccccacctg ctctcagtt
1201 ccagcctgac cccctcccat cctttggcct ctgacccttt ttccacaggg gacctacccc
1261 tattgcggtc ctccagctca tctttcacct caccocctc ctctccttg gctttaatta
1321 tgctaattgtt ggaggagaat gaataaataa agtgaatctt tgcacctgtg gtttctctct
1381 ttctcatttt aataattatt atctgttgtt ttaccaacta ctcaatttct cttataaggg
1441 actaaatatg tagtcatctt aaggcgcata accatttata aaaatcatcc ttcattctat
1501 tttaccctat catctcttgc aagacagtcc tccctcaaac ccacaagcct tctgtcctca
1561 cagtcccttg ggccatggtg ggagagactt gcttcttgtt tttccctcc tcagcaagcc
1621 ctcatagtcc tttttaaggg tgacaggctc tacagtcata tatcctttga ttcaattccc
1681 tgagaatcaa ccaaagcaaa ttcctgcagc ccgggggatc c

```

Pos. 21 atg: 1. Leader-Codon Pos. 157 tcc: letztes Leader-Codon (Leader mit Intron!)

Pos. 160 gac: 1. VLR-Codon Pos. 478 aaa: letztes VLR-Codon

Pos. 1164 tgt : letztes Kappa-Konst.-Codon

Pos. 1167 tag: STOP

FIGURE 7

AS-Sequenz der LC von TGN1112 inklusive Leaderpeptide

MGWSCIILFLVATATGVHSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNIYVWLNWYQQKPGKA
PKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS^{SL}QPEDFATYYCQQGQTPYTFGGGTKVE
IKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD
SKDSTYSLSS^{TL}TLTKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Leaderpeptid

MGWSCIILFLVATATGVHS

FIGURE 8

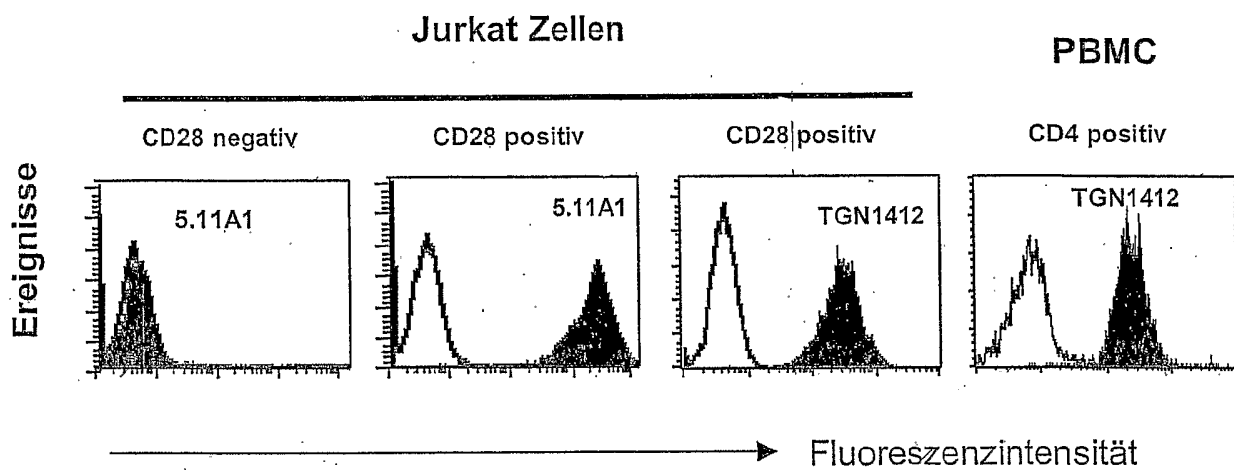


FIGURE 9

10/17

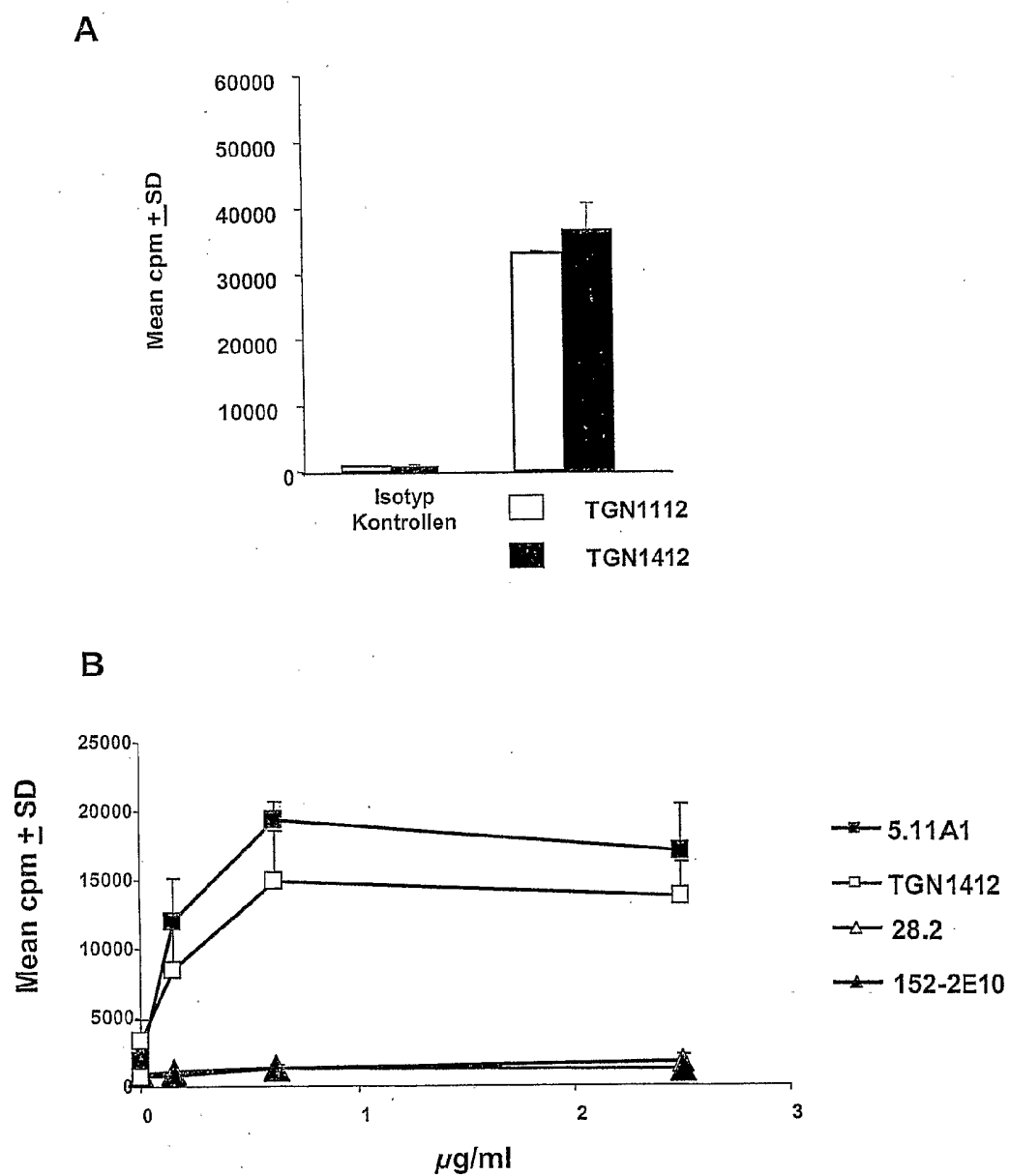


FIGURE 10

11/17

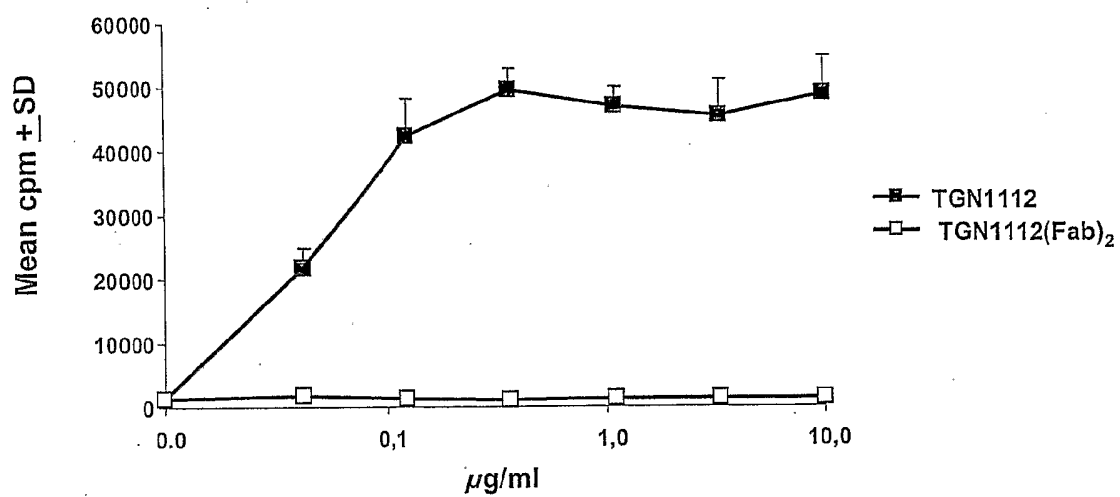


FIGURE 11

12/17

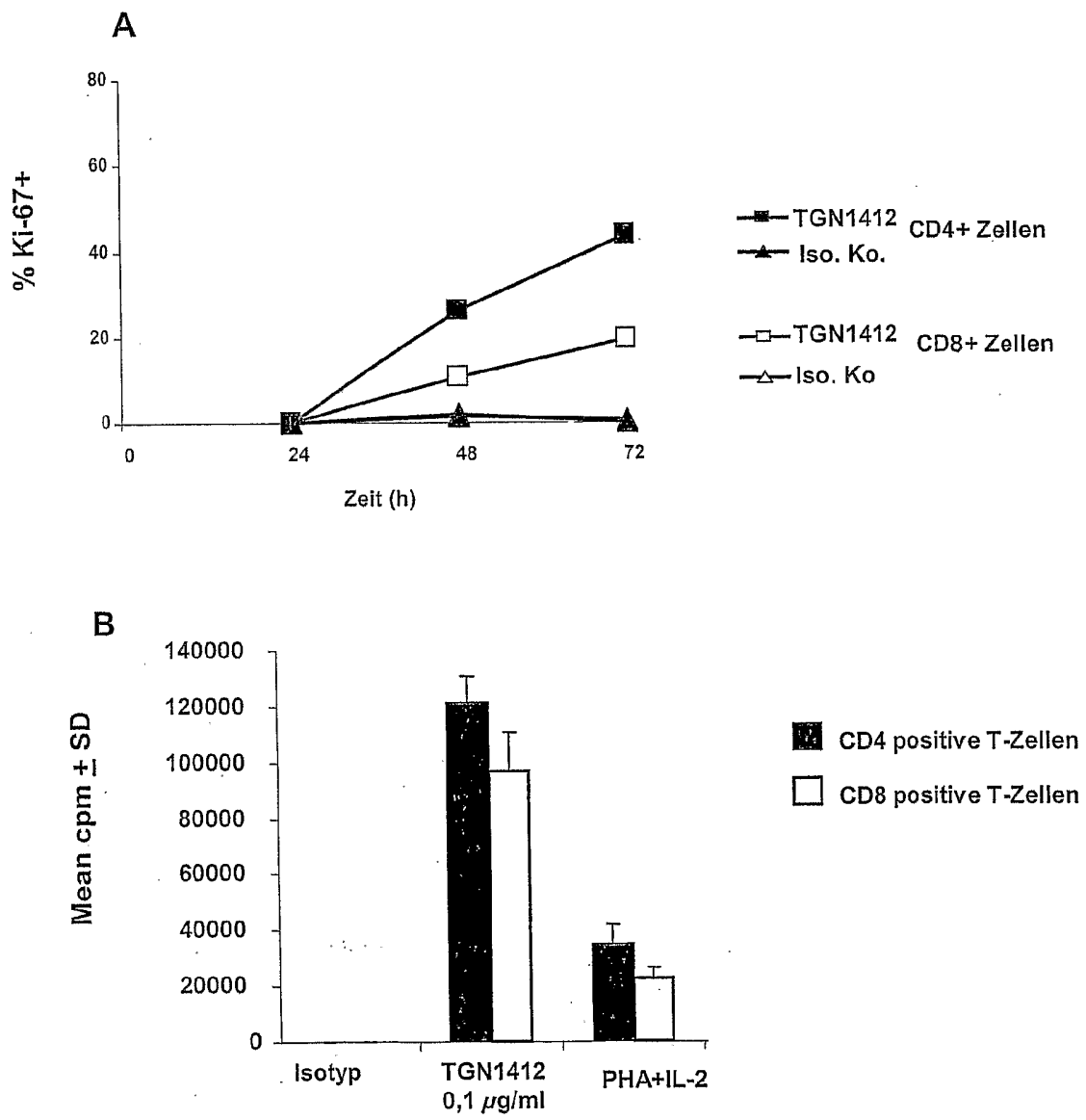


FIGURE 12

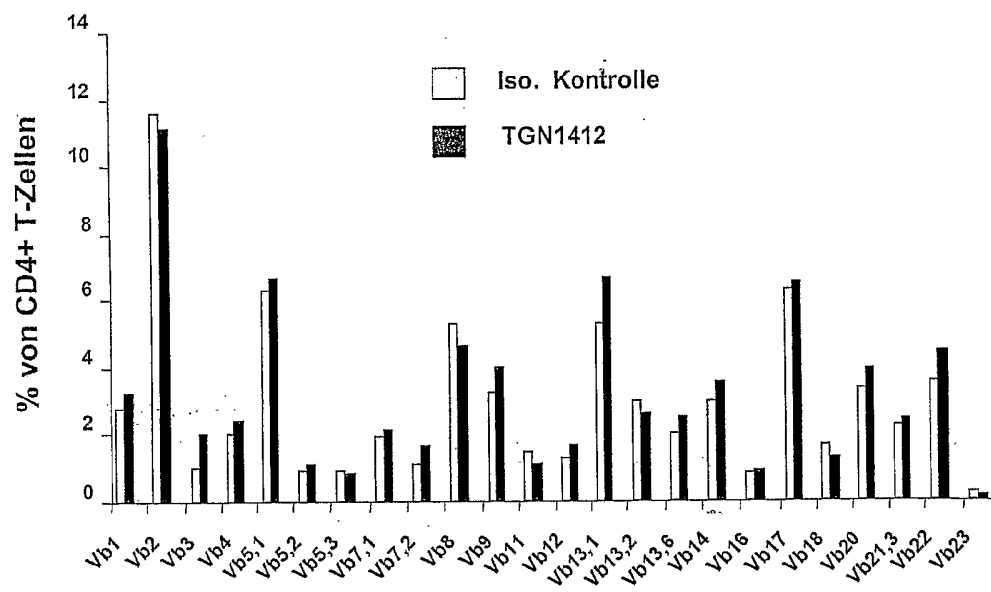


FIGURE 13

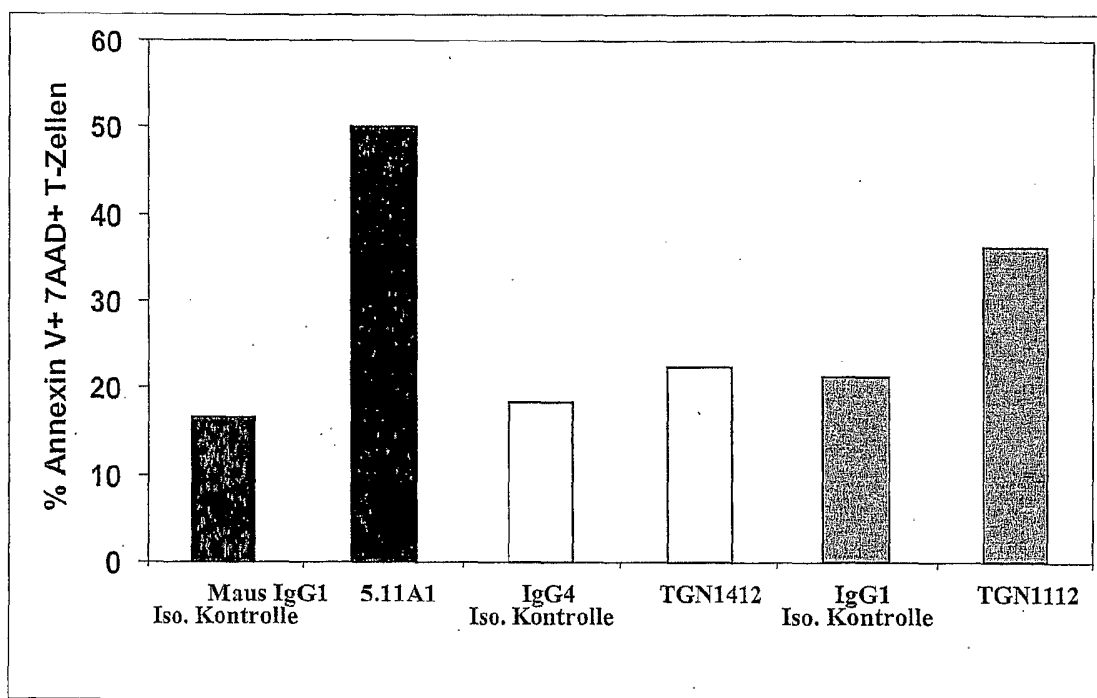


FIGURE 14

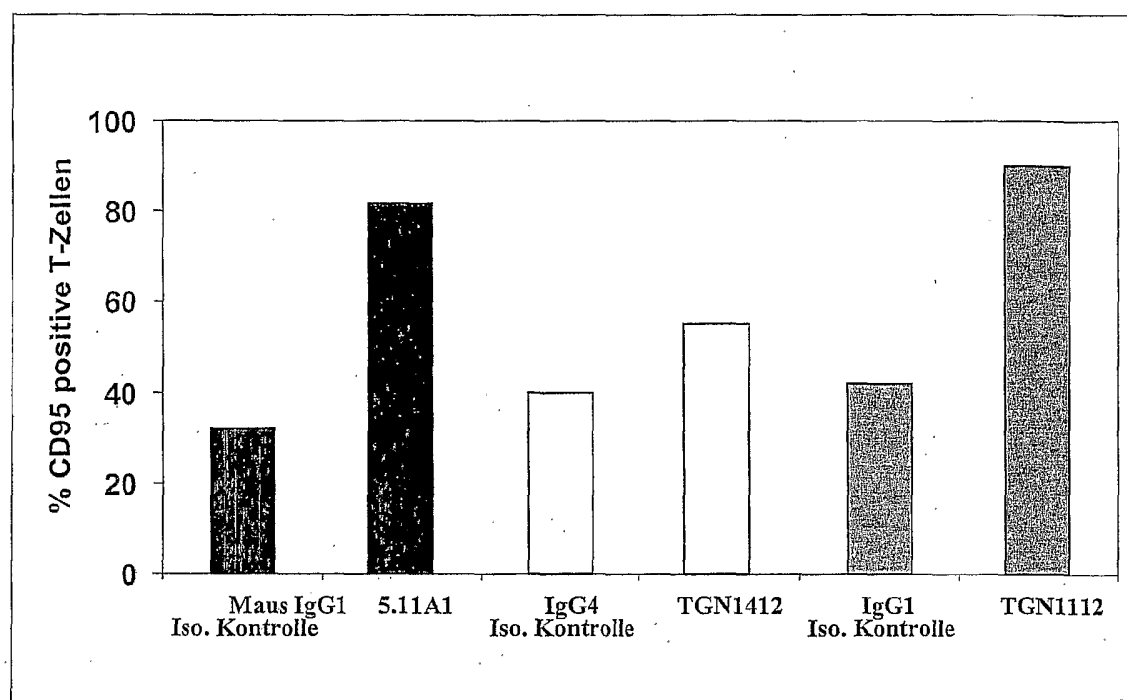


FIGURE 15

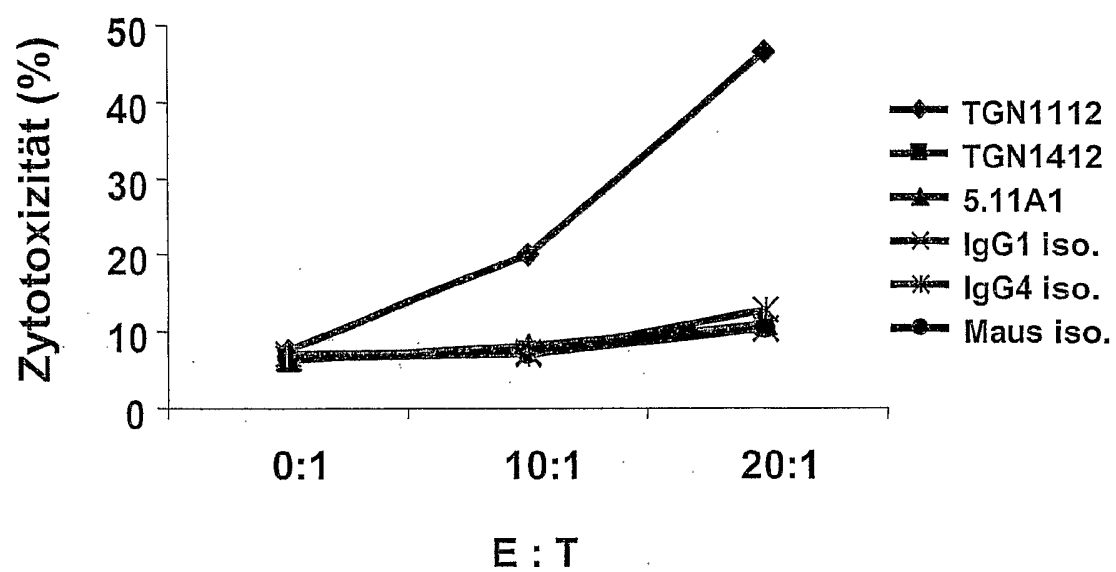


FIGURE 16

17/17

VRLC von TGN1112/TGN1412:

CDR-Definition nach	AbM/Kabat-Kombi	Kabat
CDR-L1	HASQNTIYVWLN	HASQNTIYVWLN
CDR-L2	KASNLET	KASNLET
CDR-L3	QQGQTYPYT	QQGQTYPYT

Für die VRLC sind die CDRs nach beiden Systemen gleich definiert.

VRHC von TGN1112/TGN1412:

CDR-Definition nach	AbM-Kabat-Kombi	Kabat
CDR-H1	GYTFTSYYIH	SYYIH
CDR-H2	CIYPGNVNTNYNEKFKD	CIYPGNVNTNYNEKFKD
CDR-H3	SHYGLDWNFDV	SHYGLDWNFDV

FIGURE 17

SEQUENCE LISTING

<110> TeGenero AG

<120> Superagonistische anti-CD28 Antikörper

<130> L 1701 PCT

<160> 48

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 33

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> CDR

<400> 1

tcacactacg gcctcgactg gaacttcgat gtc

33

<210> 2

<211> 11

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> CDR

<400> 2

Ser His Tyr Gly Leu Asp Trp Asn Phe Asp Val
1 5 10

<210> 3

<211> 51

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> CDR

<400> 3

tgtatttatc ctggaaatgt caatactaac tataatgaga agttcaagga c

51

<210> 4

<211> 17

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> CDR

<400> 4

Cys Ile Tyr Pro Gly Asn Val Asn Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Asp

<210> 5
<211> 30
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> CDR

<400> 5
ggatacacct tcaccagcta ctatatacac

30

<210> 6
<211> 10
<212> PRT
<213> artificial sequence

<220>
<223> CDR

<400> 6

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Tyr Ile His
1 5 10

<210> 7
<211> 27
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> CDR

<400> 7
caacagggtc aaacttatcc gtacacg

27

<210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> artificial sequence

<220>
<223> CDR

<400> 8

Gln Gln Gly Gln Thr Tyr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 9
<211> 21
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> CDR

<400> 9
aaggcttcca acctgcacac a

21

<210> 10
<211> 7
<212> PRT
<213> artificial sequence

<220>
<223> CDR

<400> 10

Lys Ala Ser Asn Leu His Thr
1 5

<210> 11
<211> 33
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> CDR

<400> 11
catgccagtc aaaacattta tgtttggtta aac

33

<210> 12
<211> 11
<212> PRT
<213> artificial sequence

<220>
<223> CDR

<400> 12

His Ala Ser Gln Asn Ile Tyr Val Trp Leu Asn
1 5 10

<210> 13
<211> 2178
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> HC

<400> 13
cagggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggggcttc agtgaaggtc 60
tcctgcaagg cttctggata caccttcacc agctactata tacactgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagt gattggatgt atttatcctg gaaatgtcaa tactaactat 180
aatgagaagt tcaaggacag ggccaccctg accgtagaca cgtccatcag cacagcctac 240
atggagctga gcaggctgag atctgacgac acggccgtgt atttctgtac aagatcacac 300

tacggcctcg actggaactt cgatgtctgg ggccaaggga ccacggtcac cgtctcctca	360
ggtgagtcgt acgctagcaa gctttctggg gcaggccggg cctgactttg gctgggggca	420
gggagggggc taagggtgacg caggtggcgc cagccagggtg cacaccaat gccatgagc	480
ccagacactg gaccctgcat ggaccatcgc ggatagacaa gaaccgaggg gcctctgcgc	540
cctgggcccc gctctgtccc acacggcggt cacatggcac cacctctctt gcagcttcca	600
ccaagggccc atccgtcttc cccctggcgc cctgtccag gagcacctcc gagagcacag	660
ccgccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacgggtg tcgtggaact	720
caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct tccggctgt cctacagtcc tcaggactct	780
actccctcag cagegtgggt accgtgccct ccagcagctt gggcacgaag acctacacct	840
gcaacgtaga tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gagagtgggt gagaggccag	900
cacagggagg gaggtgtct gctggaagcc aggtcagcc ctctgcctg gacgcacccc	960
ggctgtgcag cccagcccc gggcagcaag gcatgcccc tctgtctcct caccggagg	1020
cctctgacca cccactcat gtcagggag aggtctctt ggatttttcc accaggctcc	1080
gggcagccac aggotggatg cccctacccc aggcctgcg catacagggg cagggtgctgc	1140
gctcagacct gccaaagacc atatccggga ggacctgcc cctgacctaa gccacccca	1200
aaggccaaac tctccactcc ctgagctcag acaccttctc tctcccaga totgagtaac	1260
tccaatctt ctctctgcag agtccaaata tgggtcccca tgcccatcat gccaggtaa	1320
gccaaaccag gcctcgccct ccagctcaag gggggacagg tgccctagag tagcctgcat	1380
ccagggacag gccccagccg ggtgctgacg catccacctc catctcttcc tcagcacctg	1440
agttcctggg gggaccatca gtcttctgt tcccccaaa acccaaggac actctcatga	1500
tctcccgac cctgaggtc acgtgcgtgg tgggtggacgt gagccaggaa gaccccgagg	1560
tccagttcaa ctggtacgtg gatggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg	1620
aggagcagtt caacagcacg taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact	1680
ggctgaacgg caaggagtac aagtgcaagg tctccaacaa aggcctcccg tctccatcg	1740
agaaaaccat ctccaaagcc aaagggtggga ccacgggggt gcgagggccca catggacaga	1800
ggtcagctcg gccaccctc tgccctggga gtgaccgctg tgccaacctc tgtccotaca	1860
gggcagcccc gagagccaca ggtgtacacc ctgccccat ccaggagga gatgaccaag	1920
aaccaggtea gcctgacctg cctgggtcaaa ggcttctacc ccagcgacat cgcgtggag	1980
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccggt gctggactcc	2040
gacggctcct tcttctctca cagcaggcta accgtggaca agagcagggtg gcaggagggg	2100
aatgtcttct catgtccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac acagaagagc	2160
ctctccctgt ctctgggt	2178

<210> 14
 <211> 446
 <212> PRT
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> HC

<400> 14

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Cys Ile Tyr Pro Gly Asn Val Asn Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Lys Asp Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Thr Arg Ser His Tyr Gly Leu Asp Trp Asn Phe Asp Val Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala
 130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys
 195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro

6

<220>

<223> LC

<400> 15

```

gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc      60
atcacttgcc atgccagtca aaacatttat gtttggttaa actgggatca gcagaaacca      120
gggaaagccc ctaagctcct gatctataag gcttccaacc tgcacacagg ggtcccatca      180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct      240
gaagattttg caacttacta ctgtcaacag ggtcaaaactt atccgtacac gttcggcgga      300
gggaccaagg tggagatcaa acgtgagtcg tacgctagca agcttgatat cgaattctaa      360
actctgaggg ggtcggatga cgtggccatt ctttgcctaa agcattgagt ttactgcaag      420
gtcagaaaag catgcaaagc cctcagaatg gctgcaaaga gctccaacaa aacaatttag      480
aactttatta aggaataggg ggaagctagg aagaaactca aaacatcaag attttaaata      540
cgcttcttgg tctccttgct ataattatct gggataagca tgetgttttc tgtctgtccc      600
taacatgccc tgtgattatc cgcaaacaac acaccaagg gcagaacttt gttacttaaa      660
caccatcctg tttgcttctt tctcaggaa ctgtggctgc accatctgtc ttcattctcc      720
cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg ctgaataact      780
tctatcccag agaggocaaa gtacagtgga aggtggataa cgccctccaa tcgggtaact      840
cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc agcagcacc      900
tgacgtgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgctgcgaa gtcacccatc      960
agggcctgag ctgcgccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgt      1007

```

<210> 16

<211> 214

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> LC

<400> 16

```

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 His Ala Ser Gln Asn Ile Tyr Val Trp
20           25           30

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

Tyr Lys Ala Ser Asn Leu His Thr 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 Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Thr Tyr Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 17
<211> 33
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> CDR

<400> 17
tcacactacg gcctcgactg gaacttcgat gtc

33

<210> 18
<211> 11
<212> PRT
<213> artificial sequence

<220>
<223> CDR

<400> 18

Ser His Tyr Gly Leu Asp Trp Asn Phe Asp Val

1 5 10

<210> 19
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> CDR

<400> 19
 tgtatattatc ctggaaatgt caatactaac tataatgaga agttcaagga c 51

<210> 20
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> CDR

<400> 20
 Cys Ile Tyr Pro Gly Asn Val Asn Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
 1 5 10 15

Asp

<210> 21
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> CDR

<400> 21
 ggatacacct tcaccagcta ctatatacac 30

<210> 22
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> CDR

<400> 22
 Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Tyr Ile His
 1 5 10

<210> 23
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

<220>

<223> CDR

<400> 23

caacagggtc aaacttatcc gtacacg

27

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> CDR

<400> 24

Gln Gln Gly Gln Thr Tyr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 25

<211> 21

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> CDR

<400> 25

aaggcttcca acctgcacac a

21

<210> 26

<211> 7

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> CDR

<400> 26

Lys Ala Ser Asn Leu His Thr
1 5

<210> 27

<211> 33

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> CDR

<400> 27

catgccagtc aaaacattta tgttttggtta aac

33

<210> 28

<211> 11

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> CDR

<400> 28

His Ala Ser Gln Asn Ile Tyr Val Trp Leu Asn

1

5

10

<210> 29

<211> 2184

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> HC

<400> 29

caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc	60
tcttgcaagg cttctggata caccttcacc agctactata tacactgggt gcgacaggcc	120
cctggacaag ggcttgagtg gattggatgt atttatcctg gaaatgtcaa tactaactat	180
aatgagaagt tcaaggacag ggccaccctg accgtagaca cgtccatcag cacagcctac	240
atggagctga gcaggctgag atctgacgac acggccgtgt atttctgtac aagatcacac	300
tacggcctcg actggaactt cgatgtctgg ggccaaggga ccacggtcac cgtctcctca	360
ggtgagtcgt acgctagcaa gctttctggg gcaggccagg cctgaccttg gctttggggc	420
agggaggggg ctaaggtagag gcaggtaggg ccagccagggt gcacacccaa tgcccatgag	480
cccagacact ggacgctgaa cctcgcgagc agttaagaac ccaggggcct ctgcgccctg	540
ggcccagctc tgtccacac cgcggtcaca tggcaccacc tctcttgag cctccaccaa	600
ggggcccatcg gtcttcccc tggcaccctc ctccaagagc acctctgggg gcacagcggc	660
cctgggctgc ctggtcaagg actacttccc cgaaccggtg acggtgtcgt ggaactcagg	720
cgccctgacc agcggcgtgc acaccttccc ggctgtccta cagtcctcag gactctactc	780
cctcagcagc gtggtgaccg tgccctccag cagcttgggc acccagacct acatctgcaa	840
cgtgaatcac aagcccagca acaccaagggt ggacaagaaa gttggtgaga ggccagcaca	900
gggagggagg gtgtctgctg gaagccaggc tcagcgctcc tgcttgagc catcccggt	960
atgcagcccc agtcaggggc agcaaggcag gcccgtctg cctcttcacc cggaggcctc	1020
tgcccgcctc actcatgctc agggagaggg tcttctggct ttttcccagg ctctgggcag	1080
gcacaggcta ggtgcccta acccaggccc tgacacaaaa ggggcagggt ctgggctcag	1140
acctgccaa agccatatcc gggaggacct tgcccctgac ctaagccac cccaaaggcc	1200
aaactotcca ctccctcagc tcggacacct tctctcctcc cagattccag taactccaa	1260
tcttctctct gcagagccca aatcttgtga caaaactcac acatgccac cgtgccagg	1320
taagccagcc caggcctcgc cctccagctc aaggcgggac aggtgcccta gagtagcctg	1380

catccaggga caggccccag cggggtgctg acacgtccac ctccatctct tcttcagcac 1440
 ctgaactcct ggggggaccg tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca 1500
 tgatctcccg gaccctgag gtcacatgcg tgggtggtgga cgtgagccac gaagaccctg 1560
 aggtcaagtt caactggtac gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc 1620
 gggaggagca gtacaacagc acgtaccggg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg 1680
 actggctgaa tggcaaggag tacaagtgca aggtctccaa caagccctc ccagccccca 1740
 tcgagaaaac catctccaaa gccaaaggtg ggaccctggt ggtgcgaggg ccacatggac 1800
 agaggccggc tcggcccacc ctctgccttg agagtgaccg ctgtaccaac ctctgtccct 1860
 acagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga tgagctgacc 1920
 aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg 1980
 gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 2040
 tccgacggct ccttcttctc ctacagcaag ctccaccgtg acaagagcag gtggcagcag 2100
 gggaaactgt tctcatgctc cgtgatgcat gaggtctctg acaaccacta cagcgagaag 2160
 agcctctccc tgtctccggg taaa 2184

<210> 30
 <211> 450
 <212> PRT
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> HC
 <400> 30

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Cys Ile Tyr Pro Gly Asn Val Asn Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Lys Asp Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Thr Arg Ser His Tyr Gly Leu Asp Trp Asn Phe Asp Val Trp Gly Gln
 12

100 105 110
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 130 135 140
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu

355

360

365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445

Gly Lys
 450

<210> 31
 <211> 1007
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> LC

<400> 31
 gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc atgccagtc aaacatttat gtttggttaa actggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatctataag gcttccaacc tgcacacagg ggtcccatca 180
 aggttcagtg gcagtggtac tgggacagat ttactctca ccatcagcag totgcaacct 240
 gaagattttg caacttacta ctgtcaacag ggtcaaaactt atccgtacac gttcgggcga 300
 gggaccaagg tggagatcaa acgtgagtcg tacgctagca agcttgatat cgaattctaa 360
 actctgaggg ggtcggtatga cgtggccatt ctttgcctaa agcattgagt ttactgcaag 420
 gtcagaaaag catgcaaagc cctcagaatg gctgcaaaga gctccaacaa aacaatttag 480
 aactttatta aggaataggg ggaagctagg aagaaactca aaacatcaag attttaaata 540
 cgcttccttg tctccttgct ataattatct gggataagca tgctgttttc tgtctgtccc 600
 taacatgccc tgtgattatc cgaaacaac acaccaagg gcagaacttt gttacttaaa 660
 caccatcctg tttgcttctt tcctcaggaa ctgtggctgc accatctgtc ttcattctoc 720
 cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcttg ctgaataact 780
 tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgccctocaa tcgggtaact 840

```

cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc agcagcacc 900
tgacgctgag caaagcagac tacgagaaaac acaaagtcta cgctgcgaa gtcaccatc 960
agggcctgag ctgcccgcgc acaaagagct tcaacagggg agagtgt 1007

```

```

<210> 32
<211> 214
<212> PRT
<213> artificial sequence

```

```

<220>
<223> LC

```

```

<400> 32

```

```

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 His Ala Ser Gln Asn Ile Tyr Val Trp
20           25           30

```

```

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

```

```

Tyr Lys Ala Ser Asn Leu His Thr 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 Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Thr Tyr Pro Tyr
85           90           95

```

```

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100          105          110

```

```

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115          120          125

```

```

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130          135          140

```

```

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145          150          155          160

```

```

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165          170          175

```

```

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180          185          190

```

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 33
 <211> 360
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> VHC

<400> 33
 caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
 tctctgcaagg cttctggata caccttcacc agctactata tacactgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gattggatgt atttatcctg gaaatgtcaa tactaactat 180
 aatgagaagt tcaaggacag ggccaccctg accgtagaca cgtccatcag cacagcctac 240
 atggagctga gcaggctgag atctgacgac acggccgtgt atttctgtac aagatcacac 300
 tacggcctcg actggaactt cgatgtctgg ggccaaggga ccacggtcac cgtctcctca 360

<210> 34
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> VHC

<400> 34

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Cys Ile Tyr Pro Gly Asn Val Asn Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Lys Asp Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Thr Arg Ser His Tyr Gly Leu Asp Trp Asn Phe Asp Val Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 35
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> VLC

<400> 35
 gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc atgccagtca aaacatttat gtttggttaa actggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatctataag gcttccaacc tgcacacagg ggtcccatca 180
 aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaagattttg caaottacta ctgtcaacag ggtcaaactt atccgtacac gttcggcgga 300
 gggaccaagg tggagatcaa a 321

<210> 36
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> VLC

<400> 36

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 His Ala Ser Gln Asn Ile Tyr Val Trp
 20 25 30

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

Tyr Lys Ala Ser Asn Leu His Thr 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 Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Thr Tyr Pro Tyr
 85 90 95

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

<210> 37
<211> 360
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> VHC

<400> 37
caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
tcttgcaagg cttctggata caccttcacc agctactata tacactgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gattggatgt atttatcctg gaaatgtcaa tactaactat 180
aatgagaagt tcaaggacag ggccaccctg accgtagaca cgtccatcag cacagcctac 240
atggagctga gcaggctgag atctgacgac acggccgtgt atttctgtac aagatcacac 300
tacggcctcg actggaactt cgatgtctgg ggccaaggga ccacggtcac cgtctcctca 360

<210> 38
<211> 120
<212> PRT
<213> artificial sequence

<220>
<223> VHC

<400> 38

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Cys Ile Tyr Pro Gly Asn Val Asn Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Asp Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Thr Arg Ser His Tyr Gly Leu Asp Trp Asn Phe Asp Val Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 39
<211> 321
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> VLC

<400> 39
gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc atgccagtca aaacatttat gtttggttaa actggatatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctataag gottccaacc tgcacacagg ggtcccatca 180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattttg caacttacta ctgtcaacag ggtcaaactt atccgtacac gttcggcgga 300
gggaccaagg tggagatcaa a 321

<210> 40
<211> 107
<212> PRT
<213> artificial sequence

<220>
<223> VLC

<400> 40

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 His Ala Ser Gln Asn Ile Tyr Val Trp
20 25 30

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

Tyr Lys Ala Ser Asn Leu His Thr 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 Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Thr Tyr Pro Tyr
85 90 95

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

<210> 41
 <211> 2551
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> HC

<400> 41
 ggtaccgggc cgacctcacc atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag 60
 ctacaggtaa ggggctcaca gtagcaggct tgaggctctgg acatatatat gggtgacaat 120
 gacatccact ttgcctttct ctccacaggt gtgcattccc aggtgcagct ggtgcagtct 180
 ggggctgagg tgaagaagcc tggggcctca gtgaaggctct cctgcaaggc ttctggatac 240
 accttcacca gctactatat acaactgggtg cgacaggccc ctggacaagg gcttgagtgg 300
 attggatgta tttatcctgg aaatgtcaat actaactata atgagaagtt caaggacagg 360
 gccaccctga ccgtagacac gtccatcagc acagcctaca tggagctgag caggctgaga 420
 tctgacgaca cggcctgtga tttctgtaca agatcacact acggcctcga ctggaacttc 480
 gatgtctggg gccaaaggac cacggtcacc gtctcctcag gtgagtcgta cgtagcaag 540
 ctttctgggg caggccgggc ctgacttttg ctgggggcag ggagggggct aaggtagcgc 600
 aggtggcgcc agccagggtgc acaccaatg cccatgagcc cagacactgg accctgcatg 660
 gaccatcgcg gatagacaag aaccgagggg cctctgcgcc ctgggcccag ctctgtccca 720
 caccgcggtc acatggcacc acctctcttg cagcttccac caagggccca tccgtcttcc 780
 ccctggcgcc ctgctccagg agcacctccg agagcacagc cgcctgggc tgcctgggtca 840
 aggactactt cccgaaccg gtgacgggtg cgtggaactc aggcgcctg accagcggcg 900
 tgcacaectt cccggtgtc ctacagtcct caggactcta ctccctcagc agcgtggtga 960
 ccgtgccctc cagcagcttg ggcacgaaga cctacacctg caacgtagat cacaagccca 1020
 gcaacaccaa ggtggacaag agagtgggtg agaggccagc acagggaggg aggtgtctg 1080
 ctggaagcca ggctcagccc tcctgcctgg acgcacccg gctgtgcagc ccagcccag 1140
 ggcagcaagg catgcccct ctgtctctc acccgaggc ctctgaccac cccactcatg 1200
 ctgagggaga gggcttctg gatTTTTTcca ccaggctccg ggcagccaca ggctggatgc 1260
 ccctacccca ggccctgcgc atacaggggc aggtgtctgc ctgagacctg ccaagagcca 1320
 tatccgggag gacctgccc ctgacctaa cccaccccaa aggcctaaact ctccactccc 1380
 tcagctcaga caccttctct cctcccagat ctgagtaact cccaatcttc tctctgcaga 1440
 gtccaaatat ggtccccat gccatcatg cccaggtaag ccaaccagc cctcgccctc 1500
 cagctcaagg cgggacaggt gccctagagt agcctgcac cagggacagg cccagccgg 1560
 gtgctgacgc atccacctcc atctcttcc cagcacctga gttcctgggg ggacctcag 1620

tcttcctggt cccccaaaa cccaaggaca ctctcatgat ctcccgacc cctgaggtca 1680
 cgtgcgtggt ggtggacgtg agccaggaag accccgaggt ccagttcaac tggtagctgg 1740
 atggcgtgga ggtgcataat gccaaagacaa agccgcggga ggagcagttc aacagcacgt 1800
 accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaacggc aaggagtaca 1860
 agtgcaaggt ctccaacaaa ggctcccggt cctccatcga gaaaaccatc tccaaagcca 1920
 aaggtgggac ccacggggtg cgagggccac atggacagag gtcagctcgg cccaccctct 1980
 gccctgggag tgaccgctgt gccaacctct gtccctacag ggcagccccg agagccacag 2040
 gtgtacacc cgtccccatc ccaggaggag atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc 2100
 ctgggtcaaag gcttctaccc cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg 2160
 gagaacaact acaagaccac gcctcccggt ctggactccg acggctcctt ctctctctac 2220
 agcaggctaa ccgtggacaa gagcaggtgg caggagggga atgtcttctc atgctccgtg 2280
 atgcatgagg ctctgcacaa ccactacaca cagaagagcc tctccctgtc tctgggtaaa 2340
 tgagtgcag gcccggaag cccccgtcc cggggtctc ggggtcgcgc gaggatgctt 2400
 ggcacgtacc ccgtctacat acttcccagg caccagcat ggaaataaag caccaccac 2460
 tgccctgggc cctgtgaga ctgtgatgt tctttccacg ggtcaggccg agtctgaggc 2520
 ctgagtgcac tgagggaggc agagcggatc c 2551

<210> 42
 <211> 466
 <212> PRT
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> HC

<400> 42

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45

Thr Ser Tyr Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Ile Gly Cys Ile Tyr Pro Gly Asn Val Asn Thr Asn Tyr Asn
 65 70 75 80

Glu Lys Phe Lys Asp Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ile Ser

85 90 95
 Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val
 100 105 110
 Tyr Phe Cys Thr Arg Ser His Tyr Gly Leu Asp Trp Asn Phe Asp Val
 115 120 125
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
 130 135 140
 Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser
 145 150 155 160
 Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
 165 170 175
 Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
 180 185 190
 Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 195 200 205
 Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val
 210 215 220
 Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys
 225 230 235 240
 Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly
 245 250 255
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 260 265 270
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu
 275 280 285
 Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 290 295 300
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg
 305 310 315 320
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 325 330 335
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu

340 345 350
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 355 360 365
 Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 370 375 380
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 385 390 395 400
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 405 410 415
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp
 420 425 430
 Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 435 440 445
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu
 450 455 460
 Gly Lys
 465

<210> 43
 <211> 1721
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> LC

<400> 43
 ggtacggggc cgacctcacc atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag 60
 ctacaggtaa ggggctcaca gtagcaggct tgagggtctgg acatatatat gggtgacaat 120
 gacatccact ttgcctttct ctccacaggt gtgcattccg acatccagat gaccagttct 180
 ccatactccc tgtctgcata tggtaggagac agagtcacca tcaacttgcca tgocagtcaa 240
 aacatttatg tttgggttaa ctggtatcag cagaaaccag ggaaagcccc taagctcctg 300
 atctataagg cttccaacct gcacacaggg gtcccatcaa gggtcagtg gagggtatct 360
 gggacagatt tcaactctcac catcagcagt ctgcaacctg aagattttgc aacttactac 420
 tgtcaacagg gtcaaaacta tccgtacacg ttccggcggag ggaccaaggt ggagatcaaa 480
 cgtgagtcgt acgctagcaa gcttgatata gaattctaaa ctctgagggg gtccgatgac 540
 gtggccattc tttgcctaaa gcattgagtt tactgcaagg tcagaaaagc atgcaaagcc 600

```

ctcagaatgg ctgcaaagag ctccaacaaa acaatttaga actttattaa ggaatagggg      660
gaagctagga agaaactcaa aacatcaaga ttttaaatac gtttcttggt ctcttgcta      720
taattatctg ggataagcat gctgttttct gtctgtccct aacatgccct gtgattatcc      780
gcaaacaaca cacccaaggg cagaactttg ttacttaaac accatcctgt ttgcttcttt      840
cctcaggaac tgtggctgca ccactgtgtc tcacttccc gccatctgat gagcagttga      900
aatctggaac tgctctgttt gtgtgcctgc tgaataactt ctatcccaga gagggccaaag      960
tacagtggaa ggtggataac gccctccaat cgggtaactc ccaggagagt gtcacagagc     1020
aggacagcaa ggacagcacc tacagcctca gcagcacctt gacgctgagc aaagcagact     1080
acgagaaaaca caaagtctac gcctgcgaag tcacccatca gggcctgagc tcgcccgtca     1140
caaagagctt caacagggga gagtgttaga gggagaagtg ccccccactg ctctcagtt      1200
ccagcctgac ccctcccat cctttggcct ctgacccttt ttccacaggg gacctacccc      1260
tattgcggtc ctccagctca tctttcacct cccccctc ctctccttg gctttaatta      1320
tgctaattgt ggaggagaat gaataaataa agtgaatctt tgcacctgtg gtttctctct      1380
ttcctcattt aataattatt atctgttgtt ttaccaacta ctcaatttct cttataaggg      1440
actaaatatg tagtcactct aaggcgcata accatttata aaaatcatcc ttcattctat      1500
tttaccctat catctctgca aagacagtcc tccctcaaac ccacaagcct tctgtcctca      1560
cagtcacctg ggccatggta ggagagactt gcttccttgt ttcccccctc tcagcaagcc      1620
ctcatagtcc tttttaaggg tgacaggtct tacagtcata tatcctttga ttcaattccc      1680
tgagaatcaa ccaaagcaaa ttctgcagc ccgggggatc c                                1721

```

<210> 44
 <211> 233
 <212> PRT
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> LC

<400> 44

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15

Val His Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala
 20 25 30

Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys His Ala Ser Gln Asn Ile
 35 40 45

Tyr Val Trp Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
 50 55 60

Leu Leu Ile Tyr Lys Ala Ser Asn Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg
65 70 75 80

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser
85 90 95

Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Thr
100 105 110

Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
115 120 125

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
130 135 140

Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
145 150 155 160

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
165 170 175

Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
180 185 190

Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
195 200 205

Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
210 215 220

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230

<210> 45
<211> 2553
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> HC

<400> 45
ggtagcgggc cgacctcacc atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag 60
ctacaggtaa ggggctcaca gtagcaggct tgaggtctgg acatatatat gggtgacaat 120
gacatccact ttgcctttct ctccacaggt gtgcattccc aggtgcagct ggtgcagtct 180
ggggctgagg tgaagaagcc tggggcctca gtgaaggctt cctgcaaggc ttctggatac 240
accttcacca gctactatat aactgggtg cgacaggccc ctggacaagg gcttgagtgg 300

attggatgta tttatcctgg aaatgtcaat actaactata atgagaagtt caaggacagg 360
 gccaccctga ccgtagacac gtccatcagc acagcctaca tggagctgag caggctgaga 420
 tctgaogaca cggccgtgta tttctgtaca agatcacact acggcctoga ctggaacttc 480
 gatgtctggg gccaaaggac cacggtcacc gtctcctcag gtgagtcgta cgctagcaag 540
 ctttctgggg caggccaggc ctgaccttgg ctttggggca gggagggggc taagggtgagg 600
 cagggtggcg cagccagggtg cacaccaat gccatgagc ccagacactg gacgctgaac 660
 ctgcgagaca gttaagaacc caggggcctc tgogccctgg gccagctct gtcccacacc 720
 gcggtcacat ggcaccacct ctcttgagc ctccaccaag ggcccatcgg tcttccccct 780
 ggcacccctcc tccaagagca cctctggggg cacagcggcc ctgggctgoc tgggtcaagga 840
 ctacttcccc gaaccgggtga cgggtgtcgtg gaactcaggc gccctgacca gcggcgtgca 900
 caccttcccg gctgtcctac agtcctcagg actotactcc ctgagcagcg tggtgaccgt 960
 gccctccagc agcttgggca ccagaccta catctgcaac gtgaatcaca agcccagcaa 1020
 cadcaagggtg gacaagaaag ttggtgagag gccagcacag ggaggagagg tgtctgctgg 1080
 aagccagggt cagcgtcctc gcctggagc atcccggtc tgcagcccca gtccagggca 1140
 gcaaggcagg ccccgctctg ctcttcaccc ggaggcctct gcccgccca ctcatgctca 1200
 gggagagggg cttctggctt tttcccaggc totgggcagg cacaggctag gtgcccctaa 1260
 cccaggccct gcacacaaag gggcagggtg tgggctcaga cctgccaaaga gccatatccg 1320
 ggaggaccct gccctgacc taagcccacc ccaaaggcca aactctccac tccctcagct 1380
 cggacacctt ctctcctcc agattccagt aactccaat cttctctctg cagagcccaa 1440
 atcttgtgac aaaactcaca catgccacc gtgccagggt aagccagccc aggcctcgcc 1500
 ctccagctca aggogggaca ggtgccctag agtagcctgc atccagggac aggccccagc 1560
 cgggtgctga cagctccacc tccatctctt cctcagcacc tgaactcctg gggggaccgt 1620
 cagtcttctt cttccccca aaaccaagg acacctcat gatctcccg acccctgagg 1680
 tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccagc aagaccctga ggtcaagttc aactggtacg 1740
 tggacggcgt ggagggtgcat aatgccaaga caaagccgag ggaggagcag tacaacagca 1800
 cgtaccgggt ggtcagcgtc ctaccgctc tgcaccagga ctggctgaat ggcaaggagt 1860
 acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc cagcccccat cgagaaaacc atctccaaag 1920
 ccaaagggtg gaccggtggg gtgogagggc cacatggaca gaggccggct cggccaccc 1980
 tctgccctga gagtgaccgc tgtaccaacc tctgtcccta cagggcagcc ccgagaacca 2040
 cagggtgaca cctgcccc atccgggat gagctgacca agaaccaggc cagcctgacc 2100
 tgctgtgca aaggcttcta tcccagcagc atgcgctgg agtgggagag caatgggcag 2160
 ccggagaaca actacaagac cagcctccc gtgctggact ccgacggctc cttcttctc 2220

tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc 2280
 gtgatgcatg aggctctgca caaccactac acgcagaaga gcctctccot gtctccgggt 2340
 aaatgagtgc gacggccggc aagccccgc tccccgggct ctgcgggtcg cagcaggatg 2400
 cttggcacgt accccctgta catacttccc gggcgcccag catggaaata aagcaccag 2460
 cgctgccctg ggcccctgcg agactgtgat gggtctttcc acgggtcagg ccgagtctga 2520
 ggctgagtg gcatgaggga ggcagagcgg gtc 2553

<210> 46
 <211> 469
 <212> PRT
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> HC

<400> 46

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45

Thr Ser Tyr Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Ile Gly Cys Ile Tyr Pro Gly Asn Val Asn Thr Asn Tyr Asn
 65 70 75 80

Glu Lys Phe Lys Asp Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ile Ser
 85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Phe Cys Thr Arg Ser His Tyr Gly Leu Asp Trp Asn Phe Asp Val
 115 120 125

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
 130 135 140

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
 145 150 155 160

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val

28

420

425

430

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 435 440 445

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 450 455 460

Leu Ser Pro Gly Lys
 465

<210> 47
 <211> 1721
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> LC

<400> 47
 ggtaccgggc cgacctcacc atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag 60
 ctacaggtaa ggggctcaca gtagcaggct tgaggctctgg acatatatat gggtgacaat 120
 gacatccact ttgcctttct ctccacaggt gtgcattccg acatccagat gaccagctct 180
 ccctcctccc tgtctgcac ttagggagac agagtcacca tcaacttgcca tgccagtcaa 240
 aacatttatg tttggttaaa ctggtatcag cagaaaccag ggaaagcccc taagctcctg 300
 atctataagg cttccaacct gcacacaggg gtcccatcaa ggttcagtgg cagtggatct 360
 gggacagatt tcaactctac catcagcagt ctgcaacctg aagattttgc aacttactac 420
 tgtcaacagg gtcaaaactta tccgtacacg ttcggcggag ggacdaaggt ggagatcaaa 480
 cgtgagtcgt acgctagcaa gcttgatata gaattctaaa ctctgagggg gtcggatgac 540
 gtggccattc tttgcctaaa gcattgagtt tactgcaagg tcagaaaagc atgcaaagcc 600
 ctcagaatgg ctgcaaagag ctccaacaaa acaatttaga actttattaa ggaatagggg 660
 gaagctagga agaaactcaa aacatcaaga ttttaaatac gcttcttggt ctcttgcta 720
 taattatctg ggataagcat gctgttttct gtctgtccct aacatgccct gtgattatcc 780
 gcaaacaaca cacccaaggg cagaactttg ttacttaaac accatcctgt ttgcttcttt 840
 cctcaggaac tgtggctgca ccatctgtct tcatcttccc gccatctgat gacgattga 900
 aatctggaac tgcctctgtt gtgtgcctgc tgaataactt ctatcccaga gaggccaaag 960
 tacagtggaa ggtggataac gccctccaat cgggtaactc ccaggagagt gtcacagagc 1020
 aggacagcaa ggacagcacc tacagcctca gcagcaccct gacgctgagc aaagcagact 1080
 acgagaaaca caaagtctac gcctgcgaag taccatca gggcctgagc tcgcccgtca 1140
 caaagagctt caacagggga gagtggttaga gggagaagtg cccccacctg ctctcagtt 1200

```

ccagcctgac cccctcccat cctttggcct ctgacccttt ttccacaggg gacctacccc 1260
tattgcggtc ctccagctca tctttcacct caccocccctc ctctccttg gctttaatta 1320
tgctaattgtt ggaggagaat gaataaataa agtgaatctt tgcacctgtg gtttctctct 1380
ttctcatttt aataattatt atctgttgtt ttaccaacta ctcaatttct cttataaggg 1440
actaaatatg tagtcctcct aaggcgcata accatttata aaaatcatcc ttcattctat 1500
tttaccctat catcctctgc aagacagtcc tccctcaaac ccacaagcct tctgtcctca 1560
cagtcacctg ggccatggta ggagagactt gcttccttgt tttccctcc tcagcaagcc 1620
ctcatagtcc tttttaaggg tgacaggtct tacagtcata tatcctttga ttcaattccc 1680
tgagaatcaa ccaaagcaaa ttcctgcagc cggggggatc c 1721

```

```

<210> 48
<211> 233
<212> PRT
<213> artificial sequence

```

```

<220>
<223> LC

```

```

<400> 48

```

```

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1           5           10           15

```

```

Val His Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala
20           25           30

```

```

Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys His Ala Ser Gln Asn Ile
35           40           45

```

```

Tyr Val Trp Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
50           55           60

```

```

Leu Leu Ile Tyr Lys Ala Ser Asn Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg
65           70           75           80

```

```

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser
85           90           95

```

```

Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Thr
100           105           110

```

```

Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
115           120           125

```

```

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
130           135           140

```

Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
145 150 155 160

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
165 170 175

Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
180 185 190

Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
195 200 205

Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
210 215 220

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230