(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 697 34 109 T2** 2006.06.29

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 939 653 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **697 34 109.7**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US97/04696**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **97 916 185.8**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 97/034636**
(86) PCT-Anmeldetag: **19.03.1997**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **25.09.1997**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **08.09.1999**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **31.08.2005**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **29.06.2006**

(51) Int Cl.[8]: ***A61K 39/42*** (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)
C12P 21/08 (2006.01)
C07H 21/04 (2006.01)
C07K 1/00 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/542 (2006.01)

(30) Unionspriorität:
13708 P **20.03.1996** **US**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:
Immunomedics, Inc., Morris Plains, N.J., US

(74) Vertreter:
Witte, Weller, Gahlert, Otten & Steil, 70178 Stuttgart

(72) Erfinder:
LEUNG, Shui-on, Madison, US; LOSMAN, J., Michele, South Orange, US; HANSEN, Hans, Mystic Island, US

(54) Bezeichnung: **Humanisierung von anti-carcinoembryonalen Antigen anti-idiotypischen Antikörper und dessen Verwendung als Tumorvakzin und zur Markierung**

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

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

Beschreibung

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft chimäre und humanisierte Anti-Idiotyp-Antikörper, die spezifisch Antikörper gegen das carcinoembryonale Antigen binden. Die Erfindung betrifft ferner die Verwendung von chimären und humanisierten Anti-Idiotyp-Antikörpern als Klärmittel in therapeutischen Verfahren, als Impfstoff, und um in biologischen fluiden Proben das Vorhandensein eines Antikörpers oder eines Fragmentes davon zu detektieren, der bzw. das spezifisch CEA bindet.

[0002] Die Verwendung des Targetings von monoklonalen Antikörpern, die mit Radionucliden oder anderen cytotoxischen Agenzien konjugiert sind, bietet die Möglichkeit, solche Agenzien direkt an die Stelle des Tumors zu bringen, wobei die Exposition von normalen Geweben an die toxischen Agenzien limitiert bleibt. (Goldenberg, Semin. Nucl. Med., 19: 334 (1989)). In den letzten Jahren wurde das Potenzial von antikörperbasierender Therapie und deren Genauigkeit in der Lokalisierung von tumorassoziierten Antigenen sowohl im Labor als auch in klinischen Studien demonstriert (vgl. bspw. Thorpe, TIBTECH, 11: 42 (1993); Goldenberg, Scientific American, Science & Medicine, 1: 64 (1994); Baldwin et al., U.S. 4,925,922 und 4,916,213; Young, U.S. 4918163; U.S. 5,204,095; Irie et al., U.S. 5,196,337; Hellstrom et al., U.S. 5,134,075 und 5,171,665). Im Allgemeinen ist die Verwendung von radiomarkierten Antikörpern oder Antikörper-Fragmenten gegen tumorassoziierte Marker zur Lokalisierung von Tumoren erfolgreicher gewesen als für die Therapie, teilweise deshalb, da die Aufnahme der Antikörper durch den Tumor im Allgemeinen gering ist und sich im Bereich von lediglich 0,01% bis 0,001% der gesamten injizierten Dosis bewegt (Vaughan et al., Brit. J. Radiol., 60: 567 (1987)). Eine Erhöhung der Konzentration der Radiomarkierung, um die Dosis für den Tumor zu erhöhen, ist kontraproduktiv, da dadurch im Allgemeinen auch die Exposition von gesundem Gewebe an Radioaktivität erhöht wird. Graziano et al., J. Immunol 155: 4996–5002 (1995), offenbart die Konstruktion und Charakterisierung eines Mausantikörpers (M22), der an den humanen hochaffinen Rezeptor für den Fc-Teil des IgG (FcγR1) bindet. M22 erkennt ein Epitop auf dem FcγR1, das sich von der natürlichen Ligandenbindungsstelle (Fc) unterscheidet, was die Bindung an FcγR1 in der Gegenwart von sättigenden Spiegeln von IgG ermöglicht, die in vivo gefunden werden. Mountain et al., Biotech. and Gen. Eng. Rev. 10: 1–142 (1992) geben einen allgemeinen Überblick über die Herstellung von Antikörpern zur Verwendung in der Therapie.

[0003] Das carcinoembryonale Antigen (CEA) ist ein 180.000 Da Glycoprotein, das in den meisten Adenocarcinomen der endodermal abgeleiteten Epithelien des Verdauungssystems und in einigen anderen Krebstypen, wie Brustkrebs und nicht-kleinzelligem Lungenkrebs, exprimiert wird. Einer der Hauptvorteile des CEA-Systems liegt darin, dass AB1-Anti-CEAs als Agenzien in der Radioimmundetektion in Krebspatienten umfangreich verwendet wurden. Einer dieser Antikörper, MN-14, ist ein Maus-IgG1K-monoklonaler Antikörper (Mab) mit hoher Affinität (KD = 10-M) für humanes CEA. In Krebspatienten erkennt 131I-MN-14 wirksam CEA-produzierende Tumoren, und radiomarkierter MN-14-Fab' kann kleine Läsionen mit einem Durchmesser von 2 cm detektieren. Die WO 96/11013 offenbart humanisierte und chimäre monoklonale Antikörper, die die komplementaritätsbestimmenden Regionen eines monoklonalen Anti-CEA-Antikörpers der parentalen Maus-Klasse III aufweisen, der weniger immunogen ist als der parentale Maus-monoklonale Antikörper. Ebenfalls offenbart sind DNA-Konstrukte und -Vektoren zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern, Konjugate, die diese Antikörper enthalten, sowie die Verwendung dieser Antikörper in der Diagnose und Therapie.

[0004] Der Ratten-Anti-Idiotyp-Antikörper (rWI2), der gegen einen Anti-carcinoembryonales-Antigen-Antikörper (MN-14) gerichtet ist, wurde als ein potenzieller Idiotyp-Impfstoff angesehen, der in der Lage ist eine Ab3-Antwort in immunisierten Tieren hervorzurufen, Losman et al., Int. J. Cancer 56: 580–584 (1994). Es ist ebenfalls gezeigt worden, dass WI2 als ein wirksames Klärmittel dienen kann, das die Verhältnisse von Tumor/Nicht-Tumor verbessert und die Myelotoxizität reduziert, wenn dieser dazu verwendet wird, um überschüssigen radiomarkierten MN-14 zu entfernen, wie dies bspw. in dem US-Patent 4,624,846 gezeigt ist. Allerdings ist dessen Verwendung durch die kurze biologische Halbwertzeit des Ratten-Ab auf Grund der Abstoßung durch den humanen Wirt begrenzt. Die cDNA, die für die VH- und VK-Domänen von rWI2 kodiert, ist in Leung et al., Proceedings of AACR Annual Meeting 37, Seite 468, Abstract 3191 (1996) erwähnt.

ZUSAMMENFASSENDE DARSTELLUNG DER ERFINDUNG

[0005] Eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, einen chimären Anti-Idiotyp-Ab mit Eigenschaften eines Anti-carcinoembryonalen Antikörpers, einen humanisierten Anti-Idiotyp-Ab mit Eigenschaften eines Anti-carcinoembryonalen Antikörpers als ein immunologisches Reagens, das nützlich im Klären eines Organismusses von Anti-CEA-Antikörpern ist, die ursprünglich zur Krebsbehandlung oder als Diagnostikum oder Impf-

stoff verwendet wurden, bereitzustellen, wobei der Anti-Idiotyp-Ab die immunogenen Eigenschaften eines humanen MAb in einem humanen Patienten aufweist, und einen Anti-Idiotyp-Ab mit Eigenschaften eines Anti-carcinoembryonalen Antikörpers bereitzustellen, der als ein Detektionsagens oder Impfstoff dienen kann. Eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, DNA-Konstrukte bereitzustellen, die für solche Antikörper kodieren.

[0006] Um diese Aufgaben zu lösen, wird ein chimärer Anti-Idiotyp-Antikörper oder ein Fragment davon bereitgestellt, der spezifisch den Idiotyp-Bereich eines monoklonalen Anti-CEA-Antikörpers bindet, wobei der Anti-Idiotyp-Antikörper zumindest zwei komplementaritätsbestimmende Regionen (CDRs) des variablen Bereiches der leichten Kette des Ratten-Anti-Idiotyp-Antikörpers rWI2 aufweist, wobei die CDRs Folgendes aufweisen, nämlich
die CDR-1-Sequenz, SEQ ID-Nr. 4, RASQDIGNYLR,
die CDR-2-Sequenz, SEQ ID-Nr. 5, GATNLAA, und
die CDR-3-Sequenz, SEQ ID-Nr. 6, LHHSEYPYT; und
wobei der Anti-Idiotyp-Antikörper zumindest zwei CDRs des schweren variablen Bereiches des Ratten-Anti-Idiotyp-Antikörpers rWI2 aufweist, wobei die CDRs Folgendes aufweisen, nämlich:
die CDR-1-Sequenz, SEQ ID-Nr. 1, NYWMT,
die CDR-2-Sequenz, SEQ ID-Nr. 2, SITSTGGTYHAESVKG, und
die CDR-3-Sequenz, SEQ ID-Nr. 3, DDYGGQSTYVMDA, oder
ein Derivat davon, verursacht durch eine oder mehrere stille Mutationen.

[0007] In einer bevorzugten Ausführungsform weist der variable Bereich der schweren Kette die ratWI2VK-Sequenz auf, die in **Fig. 1** gezeigt ist, und der variable Bereich der leichten Kette weist die RatWI2VK-Sequenz auf, die in **Fig. 2** gezeigt ist.

[0008] Gemäß einem anderen Aspekt der Erfindung wird ein humanisierter Anti-Idiotyp-Antikörper oder ein Fragment davon, der bzw. das spezifisch den Idiotyp-Bereich eines monoklonalen Anti-CEA-Antikörpers bindet, bereitgestellt, der bzw. das rWI2 CDR-Bereiche und humanisierte FR-Region aufweist. In einer bevorzugten Ausführungsform weist der variable Bereich der schweren Kette die KOLWI2VH-1- oder die KOLWI2VH-2-Sequenz, die in **Fig. 1** gezeigt ist, auf, und der variable Bereich der leichten Kette weist die RIWI2VK- oder die RIWI2VKRS-Sequenz auf, die in **Fig. 2** gezeigt ist.

[0009] Gemäß einem anderen Aspekt der Erfindung wird ein isoliertes Polynucleotid bereitgestellt, das für die schwere Kette oder den variablen Bereich der schweren Kette eines chimären oder humanisierten Antikörpers oder Antikörper-Fragmentes kodiert, der bzw. das spezifisch den Idiotyp-Bereich eines monoklonalen Anti-CEA-Antikörpers bindet, das Sequenzen aufweist, die für zumindest zwei rWI2-schwere-Ketten-CDRs kodieren, die ausgewählt sind aus der Gruppe von CDRs, bestehend aus:
der komplementaritätsbestimmenden Region-1-(CDR-1)-Sequenz NYWMT (SEQ ID-Nr. 1),
der komplementaritätsbestimmenden Region-2-(CDR-2)-Sequenz SITSTGGTYHAESVKG (SEQ ID-Nr. 2), und
der komplementaritätsbestimmenden Region-3-(CDR-3)-Sequenz DDYGGQSTYVMDA (SEQ ID-Nr. 3).

[0010] Gemäß einem anderen Aspekt der Erfindung wird ein isoliertes Polynucleotid bereitgestellt, das für die leichte Kette oder den variablen Bereich der leichten Kette eines chimären oder humanisierten Antikörpers oder Antikörper-Fragment kodiert, der bzw. das spezifisch den Idiotyp-Bereich eines monoklonalen Anti-CEA-Antikörpers bindet, das Sequenzen aufweist, die für zumindest zwei rWI2-CDRs kodieren, die ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus:
der komplementaritätsbestimmenden Region-1-(CDR-1)-Sequenz RASQDIGNYLR (SEQ ID-Nr. 4),
der komplementaritätsbestimmenden Region-2-(CDR-2)-Sequenz 25 GATNLAA (SEQ ID-Nr. 5), und
der komplementaritätsbestimmenden Region-3-(CDR-3)-Sequenz LHHSEYPYT (SEQ ID-Nr. 6).

[0011] Gemäß einem weiteren Aspekt der Erfindung werden ein isolierter erster Expressionsvektor, der ein Gen für die schwere Kette des chimären WI2 aufweist, und ein isolierter zweiter Expressionsvektor, der ein Gen für die leichte Kette des chimären WI2 aufweist, bereitgestellt.

[0012] Gemäß einem weiteren Aspekt der Erfindung werden ein erster Expressionsvektor, der ein Gen für eine schwere Kette eines humanisierten WI2 aufweist, und ein isolierter zweiter Expressionsvektor, der ein Gen für eine leichte Kette eines humanisierten WI2 aufweist, bereitgestellt.

[0013] Es wird ein Wirt beschrieben, der Folgendes aufweist, nämlich einen isolierten ersten Vektor, der ein

Gen für die schwere Kette des chimären WI2 aufweist, und einen isolierten zweiten Expressionsvektor, der ein Gen für die leichte Kette des chimären WI2 aufweist, oder einen isolierten ersten Expressionsvektor, der ein Gen für eine schwere Kette eines humanisierten WI2 aufweist, und einen isolierten zweiten Expressionsvektor, der ein Gen für eine leichte Kette eines humanisierten WI2 aufweist.

[0014] Hier wird ein Verfahren zur Stimulierung einer Immunantwort in einem Patienten gegen einen solchen Krebs, der das carcinoembryonale Antigen exprimiert, beschrieben, das die Verabreichung einer wirksamen Menge eines solchen Impfstoffes in den Patienten umfasst, der einen humanisierten Anti-Idiotyp-Antikörper oder ein Fragment aufweist, der bzw. das spezifisch den Idiotyp-Bereich eines monoklonalen Anti-CEA-Antikörpers bindet, konjugiert mit einem löslichen immunogenen Trägerprotein, optional in Kombination mit einem pharmazeutisch akzeptablen Impfstoffzusatz.

[0015] Zusätzlich wird ein Verfahren zur Diagnose oder Behandlung eines Patienten beschrieben, wobei ein Antikörper oder ein Antikörper-Fragment, der bzw. das spezifisch CEA bindet, als ein Targeting-, Pre-Targeting- oder therapeutisches Agens verwendet wird, entweder als solcher bzw. solches oder als Komponente eines Konjugates, wobei die Verbesserung an dem Verfahren darin besteht, dass ein Anti-Idiotyp-Antikörper verwendet wird, um einen nicht-zielgerichteten Antikörper oder ein Antikörper-Fragment zu beseitigen.

[0016] Gemäß einem anderen Aspekt der Erfindung wird ein Verfahren zur Detektion des Vorhandenseins eines Antikörpers oder eines Fragmentes in einer fluiden biologischen Probe bereitgestellt, der bzw. das spezifisch CEA bindet, das ein Kontaktieren der Probe mit rWI2 oder mit einem chimären Anti-Idiotyp-Antikörper oder mit einem Antikörper-Fragment, der bzw. das spezifisch den Idiotyp-Bereich eines monoklonalen Anti-CEA-Antikörpers bindet, oder mit einem humanisierten Anti-Idiotyp-Antikörper oder mit einem Antikörper-Fragment, der bzw. das spezifisch den Idiotyp-Bereich eines monoklonalen Anti-CEA-Antikörpers bindet, und ein Detektieren des Bindens des Anti-Idiotyp-Antikörpers oder des Antikörper-Fragmentes an einen Antikörper-Idiotyp oder ein Antikörper-Idiotyp-Fragment in der Probe, umfasst.

BESCHREIBUNG DER FIGUREN

[0017] Fig. 1 zeigt die Konstruktion von hVR. rVH (SEQ ID-Nr. 18) ist in Ausrichtung mit KOL (SEQ ID-Nr. 17) und mit den konstruierten KOLWI2VH-1-(SEQ ID-Nr. 19)- und -2-(SEQ ID-Nr. 20)-Sequenzen dargestellt. Die Striche deuten an, dass die Sequenz an dieser Position mit der rWI2VK-Sequenz übereinstimmt. Die schmalen Kästen deuten Bereiche an, wo die Ratten-AS in den humanisierten FR-Sequenzen beibehalten wurde. Beachte, dass die KOLWI2VK-1-Sequenz verglichen mit KOLWI2VK-2 an Position 5 eine extra Ratten-AS enthält. CDRs werden durch breitere Kästen angegeben und sind oben als entsprechende Box gemäß CDR1 bis CDR3 markiert.

[0018] Fig. 2 zeigt die Konstruktion von hVK. Die RATWI2VK-(SEQ ID-Nr. 22)-Sequenz ist in Ausrichtung mit REI (SEQ ID-Nr. 21) und mit der konstruierten REIWI2VK (SEQ ID-Nr. 24) und mit RIWI2VKRS (SEQ ID-Nr. 23) dargestellt. Die Striche deuten an, dass die Sequenz an dieser Position mit der RATWI2VK-Sequenz übereinstimmt. Die schmalen Kästen stellen die Bereiche dar, wo die Ratten-AS in den humanisierten FR-Sequenzen beibehalten wurde. Wie angegeben, wurden vier Ratten-AS-Reste in den FR-Regionen beibehalten. CDRs werden durch breitere Kästen dargestellt und sind oben als jeweilige Box gemäß CDR1 bis 3 markiert.

[0019] **Fig.** 3 zeigt die Polynucleotid-Sequenz (SEQ ID-Nr. 25) für den variablen Bereich der hWI2 schweren Kette. Die verwendeten PCR-Primer und die synthetisierten Oligo K (SEQ ID-Nr. 34) und Oligo L (SEQ ID-Nr. 37), die im Text beschrieben sind, sind angedeutet. Die Oligos 21 bis 24 sind in den SEQ ID-Nrn. 33, 36, 35 bzw. 38 gezeigt. Ein Einzelbuchstaben-AS-Code ist unter der Polynucleotid-Sequenz angegeben, um das Translationsprodukt (SEQ ID-Nr. 26) darzustellen. In der Proteinsequenz sind die CDRs unterstrichen.

[0020] **Fig.** 4 zeigt die Polynucleotid-Sequenz (SEQ ID-Nr. 27) für den variablen Bereich der leichten Kette von hWI2. Die verwendeten PCR-Primer und synthetisierten Oligo M' (SEQ ID-Nr. 41) und Oligo N (SEQ ID-Nr. 44), die im Text beschrieben sind, sind angezeigt. Oligo 25 (PvuII), Oligo 25, Oligo 26, Oligo 27 und Oligo 28 sind in den SEQ ID-Nrn. 39, 40, 43, 41 bzw. 45 gezeigt. Ein Einzelbuchstaben-AS-Code ist unter der Polynucleotid-Sequenz für das Translationsprodukt (SEQ ID-Nr. 28) angegeben. In der Proteinsequenz sind die CDRs unterstrichen.

[0021] Fig. 5 zeigt einen Vergleich zwischen hWI2(RS), hWI2, cWI2 und rWI2 in einem kompetitiven Bindungssassay. Die Bindung eines jeden dieser Antikörper ist in Prozent der Inhibition der Bindung durch einen peroxidasekonjugierten MN-14-Antikörper dargestellt.

[0022] Fig. 6 zeigt die Nucleinsäure-Sequenz (SEQ ID-Nr. 29) für den variablen Bereich der leichten Kette von rWI2. Das Proteintranslationsprodukt (SEQ ID-Nr. 30) ist unter der Nucleinsäure-Sequenz angegeben, wobei der Einbuchstaben-AS-Code verwendet wird. Die AS-Reste, die die CDRs1 bis 3 darstellen, sind unterstrichen und markiert.

[0023] Fig. 7 zeigt die Nucleinsäure-Sequenz (SEQ ID-Nr. 31) für den variablen Bereich der schweren Kette von rWI2. Das Proteintranslationsprodukt (SEQ ID-Nr. 32) ist unter der Nucleinsäure-Sequenz angegeben, wobei der Einbuchstaben-AS-Code verwendet wird. Die AS-Reste, die die CDRs1 bis 3 darstellen, sind unterstrichen und markiert.

ILLUSTRATIVES GLOSSAR

[0024] Die folgenden Begriffe und Abkürzungen werden in der vorliegenden Anmeldung verwendet. Die Bedeutungen, die in diesem Glossar angegeben werden, haben lediglich illustrative Zwecke. Die vollständige Bedeutung der Begriffe ist dem Fachmann geläufig.

[0025] „CDR" wird als Abkürzung für komplementaritätsbestimmende Region verwendet. Dies sind die Bereiche innerhalb der variablen Bereiche eines Antikörpers, die hauptsächlich, aber nicht ausschließlich, für die Antigen-Antikörper-Bindung verantwortlich sind.

[0026] „FR" ist eine Abkürzung für Gerüstregion. Allgemein ausgedrückt handelt es sich hierbei um die Abschnitte der variablen Bereiche eines Antikörpers, die an die CDRs angrenzen oder diese flankieren. Im Allgemeinen haben diese Bereiche eher eine strukturelle Funktion, die die Konformation des variablen Bereiches beeinflussen, und sind weniger direkt verantwortlich für die spezifische Bindung des Antigens an den Antikörper, obwohl nichtsdestotrotz die Gerüstregionen der variablen Bereiche die Interaktion beeinflussen können.

[0027] Ein „Antikörper-Bindebereich" ist der Teil eines Antikörpers, der insgesamt verantwortlich ist für die Aufrechterhaltung der Struktur des Antikörpers, die mit dem Antigen interagiert. Im Allgemeinen handelt es sich hierbei um die kombinierten leichten und schweren variablen Domänen eines Antikörpers.

[0028] Wie hier verwendet, bezieht sich „chimär" auf einen Antikörper, in dem der variable Bereich von einem Ratten-Antikörper abgeleitet ist, und der konstante Bereich von einem humanen Antikörper abgeleitet ist.

[0029] „Humanisiert" bezieht sich auf einen wie oben definierten chimären Antikörper, wobei in diesem jedoch die FR-variablen Bereiche modifiziert sind, um diesen in seiner Sequenz einem humanen Antikörper ähnlicher zu machen.

[0030] Ein „Promotor" ist eine DNA-Sequenz, die die Transkription eines strukturellen Genes regelt. Typischerweise ist ein Promotor in dem 5'-Bereich eines Genes, proximal zu der Startstelle für die Transkription eines strukturellen Genes lokalisiert. Wenn es sich bei einem Promotor um einen induzierbaren Promotor handelt, dann nimmt die Transkriptionsrate als Antwort auf ein induzierendes Agens zu. Hierzu im Gegensatz wird die Transkriptionsrate, wenn es sich bei dem Promotor um einen konstitutiven Promotor handelt, nicht durch ein induzierendes Agens reguliert.

[0031] Ein isoliertes DNA-Molekül ist ein DNA-Fragment, das nicht in die genomische DNA eines Organismus integriert ist. Bspw. ist ein kloniertes T-Zell-Rezeptorgen ein DNA-Fragment, das von der genomischen DNA einer Säugetierzelle separiert wurde. Ein anderes Beispiel eines isolierten DNA-Moleküles ist ein chemisch synthetisiertes DNA-Molekül, das nicht in die genomische DNA eines Organismus integriert ist.

[0032] Eine komplementäre DNA (cDNA) ist ein einzelsträngiges DNA-Molekül, das aus einem mRNA-Template durch das Enzym reverse Transkriptase gebildet wird. Typischerweise wird zur Initiation der reversen Transkription ein Primer verwendet, der komplementär ist zu Abschnitten der mRNA. Ein Fachmann verwendet den Begriff „cDNA" auch, um sich auf ein doppelsträngiges DNA-Molekül zu beziehen, das aus einem solchen einzelsträngigen DNA-Molekül und dessen komplementären DNA-Strang besteht.

[0033] Der Begriff Expression bezeichnet die Biosynthese eines Genproduktes. Im Fall eines strukturellen Genes involviert die Expression die Transkription eines strukturellen Genes in mRNA und die Translation von mRNA in ein oder mehrere Polypeptide.

[0034] Ein Klonierungsvektor ist ein DNA-Molekül, wie bspw. ein Plasmid, Cosmid oder Bakteriophage, das

die Fähigkeit hat, autonom in einer Wirtszelle zu replizieren. Klonierungsvektoren enthalten typischerweise eine oder eine kleine Anzahl von Erkennungsstellen für Restriktionsendonucleasen, in die fremde DNA-Sequenzen in einer festlegbaren Art und Weise eingefügt werden können, ohne dass eine essenzielle biologische Funktion des Vektors verloren geht, wobei auch ein Markergen eingefügt werden kann, das zur Verwendung in der Identifizierung und Selektion von Zellen, die mit dem Klonierungsvektor transformiert wurden, geeignet ist. Markergene umfassen typischerweise Gene, die eine Resistenz gegen Tetracyclin oder Ampicillin bereitstellen.

[0035] Ein Expressionsvektor ist ein DNA-Molekül, das ein Gen aufweist, das in einer Wirtszelle exprimiert wird. Typischerweise wird die Genexpression unter die Kontrolle von bestimmten regulatorischen Elementen, einschließlich konstitutiver oder induzierbarer Promotoren, gewebespezifischer regulatorischer Elemente und Enhancern, platziert. Man sagt, dass solch ein Gen „operativ verbunden ist mit" den regulatorischen Elementen.

[0036] Ein rekombinanter Wirt kann jede prokaryotische oder eukaryotische Zelle sein, die entweder einen Klonierungsvektor oder einen Expressionsvektor enthält. Dieser Begriff umfasst ebenfalls solche prokaryotischen oder eukaryotischen Zellen, die genetisch hergestellt wurden, um das/die klonierte(n) Gen(e) in dem Chromosom oder Genom der Wirtszelle zu enthalten.

[0037] Wie hier verwendet, ist eine stille Mutation eine Veränderung, die in die Kodierungssequenz eines Antikörper-Genes eingebracht wurde, und die zu der Expression eines Antikörpers führt, der in seiner AS-Sequenz verändert ist, der jedoch im Übrigen, im Wesentlichen im Hinblick auf die Immunaktivität, dem Antikörper entspricht, dessen Sequenz nicht verändert wurde.

[0038] Ein tumorassoziiertes Antigen ist ein Protein, das normalerweise von einem normalen Gegenstück nicht exprimiert, oder auf einem sehr niedrigen Niveau exprimiert wird. Beispiele von tumorassoziierten Antigenen umfassen α-Fetoprotein und carcinoembryonales Antigen (CEA).

[0039] Im vorliegenden Kontext ist ein Anti-CEA-MAb ein Klasse-III-MAb, wie beschrieben von Primus et al., Cancer Research 43: 686 (1983) und von Primus et al., US-Patent Nr. 4,818,709.

[0040] Wie hier verwendet, ist ein Ab1 ein Antikörper, der an ein tumorassoziiertes Antigen bindet.

[0041] Ein Anti-Idiotyp-Antikörper (Ab2) ist, wie hier verwendet, ein Antikörper, der an Ab1 bindet. Wichtig ist, dass ein Ab2 an den variablen Bereich von Ab1 bindet, und deshalb ein Ab2 ein Epitop eines tumorassoziierten Antigenes oder ein Epitop eines mit einem infektiösen Agens assoziierten Antigens nachahmt.

[0042] Ein Antikörper-Fragment ist ein Abschnitt eines Antikörpers, wie bspw. $F(ab')_2$, $F(ab)_2$, Fab', Fab, usw. Unabhängig von der Struktur bindet ein Antikörper-Fragment an das gleiche Antigen, das von dem intakten Antikörper erkannt wird. Bspw. bindet ein Anti-CEA-Mab(Ab1)-Fragment an CEA, während ein Ab2-Fragment an den variablen Bereich von Ab1 bindet und ein Epitop von CEA nachahmt.

[0043] Der Begriff „Antikörper-Fragment" umfasst ebenfalls jedes synthetisch oder genetisch hergestellte Protein, das durch Bindung eines spezifischen Antigens, um einen Komplex zu bilden, wie ein Antikörper funktioniert. Bspw. umfassen Antikörper-Fragmente isolierte Fragmente, die aus dem variablen Bereich der leichten Kette bestehen, „Fv"-Fragmente bestehend aus den variablen Bereichen der schweren und leichten Ketten, rekombinante einzelkettige Polypeptidmoleküle, in denen leichte und schwere variable Bereiche durch einen Peptid-Linker verbunden sind („sFv-Proteine), und minimale Erkennungseinheiten, die aus den Aminosäureresten bestehen, die den hypervariablen Bereich nachahmen.

[0044] Wie hier verwendet, kann der Begriff Antikörperkomponente oder der Begriff Antikörper sowohl einen gesamten Antikörper als auch ein Antikörper-Fragment umfassen.

[0045] Bei einem Impfstoff, wie dies im vorliegenden Kontext verwendet wird, handelt es sich um einen Antikörper oder ein Antikörper-Fragment, der bzw. das hergestellt wird, um eine Immunantwort auf wirksame Art und Weise zu stimulieren. Typischerweise wird dies durch die Konjugation der Antikörper-Komponente mit einem löslichen immunogenen Trägerprotein erreicht.

DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

Ein Überblick. Bereitstellung von chimären und humanisierten WI2-Anti-Idiotyp-Antikörpern.

[0046] Bei Raten-WI2 (rWI2) handelt es sich um einen monoklonalen Anti-Idiotyp-Antikörper, der die CDR von MN-14 bindet; vgl. Losman et al., (1994) supra. Es wurde bereits früher vorgeschlagen, dass PCT-Primerpaare konstruiert werden können, die die variablen Bereiche von Ratten-Antikörpern von einem RNA-Substrat isolieren könnten; vgl. Kutemeier et al., Hybridoma, 11: 23–32 (1992). Ähnliche Ansätze wurden verwendet, um die variablen Bereiche von Maus-Antikörpern zu isolieren; vgl. Orlandi et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 86: 3833 (1989). In der vorliegenden Erfindung ist eine Kombination von PCR-Primern, wie beschrieben durch Kutemeier et al., und durch Orlandi et al., supra, erforderlich, um den rWI2-variablen Bereich zu isolieren. Diese Primer können verwendet werden, um andere Ratten-variablen Bereiche zu isolieren.

[0047] Die cDNA für die variablen Bereiche der sowohl leichten als auch schweren Ketten von rWI2 wird isoliert und die Sequenz von einer Anzahl von Klonen wird verifiziert. Die Ratten-variablen Bereiche werden so in Plasmidvektoren kloniert, dass die Ratten-variablen K- und H-Bereiche an entsprechende humane IgG-konstante Bereiche angefügt sind. Die Plasmide werden in SP2/O-Zellen transfiziert, Klone, die beide Plasmide aufweisen, werden selektiert, und ein chimärer WI2-(cWI2)-Antikörper wird exprimiert.

[0048] Um die variablen Bereiche zu humanisieren, werden die FR-Rattenbereiche durch die humanen IgG-Gegenstücke ersetzt. Die Ratten-CDR-Bereiche bleiben erhalten, um die Spezifität des Antikörpers aufrechtzuerhalten. Um jedoch die Stabilität zu erhöhen und die Spezifität und Bindeaffinität des Antikörpers aufrechtzuerhalten, ist es am besten, wenn eine humane Sequenz verwendet wird, die höchst ähnlich mit den neu identifizierten Ratten-FR-Sequenzen ist. Ratten-Reste, die nahe bei den CDRs liegen, oder für die auf Grund früherer Erfahrungswerte bekannt ist, dass diese wichtig für die Interaktionen mit den CDRs sind, werden in beiden humanisierten Sequenzen beibehalten.

[0049] Für die sowohl schweren als auch für die leichten Ketten werden den variablen Bereichen entsprechende lange Oligonucleotide hergestellt, um das humanisierte Design zu reflektieren. Die Oligonucleotide ersetzen den Ratten-variablen Bereich in den Plasmidkonstrukten, die dazu vorgesehen sind, um den vollständigen humanen WI2 (hWI2) herzustellen. Die Wirksamkeit von cWI2 oder hWI2 wird mit der Wirksamkeit von rWI2 in Assays verglichen, in denen diese mit CEA um die Bindung an einen peroxidasekonjugierten MN-14 kompetitieren.

[0050] Um den cWI2 und die hWI2s zu exprimieren, werden die Ratten- und die humanisierten variablen Bereiche in einen oder in separate Plasmidvektoren derart inseriert, dass die Koexpression der vollständigen leichten und schweren Ketten des Antikörpers ermöglicht wird. Die Vektoren können in SP2/0-Zellen transfiziert werden. Die Selektion von transfizierten Zellen und ggf. die Amplifizierung von Klonen basiert auf der Expression des Dihydrofolat-Reduktase(DHFR)-Genes, das auf demselben Plasmidvektor lokalisiert ist. Die Funktionalität von mehreren Konstrukten wird durch Bindeassays bestimmt. Bspw. wurden finale hWI2-Konstrukte mit sowohl rWI2 als auch cWI2 in deren Fähigkeit verglichen, MN-14 zu binden, vgl. **Fig. 5**.

Herstellung von monoklonalen Ab1- und Ab2-Antikörpern

[0051] Nager-monoklonale Antikörper, die gegen spezifische Antigene gerichtet sind, können durch Verfahren erhalten werden, die einem Fachmann geläufig sind; vgl. bspw. Köhler und Milstein, Nature 256: 495 (1975) und Coligan et al. (Hrsg.), CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, VOL. 1, Seiten 2.5.1–2.6.7 (John Wilay & Sons 1991) [im Folgenden "Coligan"]. Kurz gesagt, monoklonale Antikörper können erhalten werden, indem in Ratten eine Zusammensetzung injiziert wird, die ein Antigen enthält, das Vorhandensein der Antikörperproduktion durch die Entnahme einer Serumprobe bestätigt wird, die Milz entfernt wird, um B-Lymphocyten zu erhalten, die B-Lymphocyten mit Myelomzellen fusioniert werden, um Hybridome herzustellen, Hybridome kloniert werden, positive Klone selektiert werden, die Antikörper gegen das Antigen produzieren, Klone kultiviert werden, die Antikörper gegen das Antigen produzieren, und Antikörper aus den Hybridomkulturen isoliert werden. Diese Techniken sind anwendbar auf die Herstellung eines monoklonalen Antikörpers aus anderen Säugetieren, in die ein Antigen injiziert wird.

[0052] Es ist eine Vielzahl von monoklonalen Antikörpern gegen tumorassoziierte Antigene oder infektiöse Agenzien entwickelt worden; vgl. bspw. Goldenberg et al., internationale Anmeldung mit der Veröffentlichungsnummer WO 91/11465 (1991) und Goldenberg, internationale Anmeldung mit der Veröffentlichungsnummer WO 94/04702 (1994).

[0053] Ein polyklonaler Ab2 lässt sich durch die Immunisierung von Tieren mit Ab1 oder mit Fragmenten unter der Verwendung von Standardtechniken herstellen; vgl. bspw. Green et al., „Production of Polyclonal Antisera", in METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY. IMMUNOCHEMICAL PROTOCOLS, Manson (Hrsg.), Seiten 1–12 (Humana Press 1992). Vgl. ebenfalls Coligan auf Seiten 2.4.1–2.4.7. Alternativ kann ein monoklonaler Ab2 unter Verwendung von Ak1 oder Fragmenten als Immunogen mit den oben beschriebenen Techniken hergestellt werden.

[0054] Mabs können aus Hybridomkulturen durch eine Vielzahl von gut etablierten Techniken isoliert und gereinigt werden. Solche Isolierungstechniken umfassen die Affinitäts-Chromatographie mit Protein-A-Sepharose, die Größen-Ausschluss-Chromatographie und die Ionenaustausch-Chromatographie; vgl. bspw. Coligan auf Seiten 2.7.1–2.7.12 und Seiten 2.9.1–2.9.3. Vgl. ebenso Baines et al., „Purification of Immunoglobulin G (IgG)", in METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, VOL. 10, Seiten 79–104 (The Humana Press Inc. 1992).

Die Konstruktion eines humanisierten Antikörpers

[0055] Ein Antikörper der vorliegenden Erfindung ist ein „humanisierter" monoklonaler Antikörper. Das bedeutet, dass Rattenkomplementaritätsbestimmende Regionen von den schweren und leichten variablen Ketten des Ratten-Immunglobulins in einen variablen Bereich transferiert werden, der dazu konstruiert ist, um eine Anzahl von AS-Resten zu enthalten, die in der FR-Region von humanem IgG gefunden werden. Eine entsprechende Umwandlung von Maus/humanen chimären Antikörpern in einen humanisierten Antikörper ist bereits früher beschrieben worden. Allgemeine Techniken zur Klonierung von variablen Domänen von Maus-Immunglobulin werden bspw. durch die Publikation von Orlandi et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 86: 3833 (1989), beschrieben. Techniken zur Herstellung von humanisierten Mabs werden bspw. beschrieben durch Jones et al., Nature 321: 522 (1986), Riechmann et al., Nature 332: 323 (1988), Verhoeyen et al., Science 239: 1534 (1988), Carter et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 89: 4285 (1992), Sandhu, Crit. Rev. Biotech. 12: 437 (1992).

Konstruieren von cWI2 und hWI2

[0056] Bei der Herstellung von chimären und humanisierten WI2 werden Standardansätze der Molekularbiologie und der Zellbiologie verwendet, bspw. PCR-Reaktionen, Sequenzierung von DNA, Synthese von langen Oligonucleotiden, Klonierung, ortsspezifische Mutagenese, Transfektion von Vektoren in Zellen, Expression von chimären und humanisierten Antikörpern, deren Reinigung, usw. Die verwendeten Techniken sind Standardtechniken, die im Stand der Technik wohlbekannt und gut etabliert sind. Ein Fachmann wird mit der Ausführung dieser Techniken keine Schwierigkeiten haben. Sämtliche erforderlichen Materialien sind direkt verfügbar. Referenzanleitungen, die diese Techniken beschreiben, sind umfassend verfügbar; vgl. bspw. Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, second ed., Cold Spring Harbor Press, (1989); Co et al., J. Immunol., 148: 1149 (1992); Ausubel et al., Hrsg., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, und Updates, John Wiley & Sons, NY, (1987); "Protocols – Current Methods and Applications" White, ed., Methods in Mol. Biol. (15), Humana Press, Totawa, New Jersey (1993); Uhlmann, Gene 71: 29 (1998); Wosnick et al., Gene 60: 115 (1988); und Huse, in ANTIBODY ENGINEERING: A PRACTICAL GUIDE, Boerrbaeck, ed., W. H. Freeman & Co., 103–120 (1992).

[0057] Die PCR-Primer, die in der anfänglichen Klonierung des Ratten-variablen Bereiches verwendet werden, werden über Bereichen der Sequenz konstruiert, von denen angenommen wird, dass diese zwischen humanen Antikörpern relativ konserviert sind. Des Weiteren kann eine Aminosäure (AS) im Allgemeinen durch mehr als ein Codon dargestellt werden, obwohl die Codons sich häufig nur an der dritten Position unterscheiden. Solche Codons werden manchmal als „degeneriert" bezeichnet. Um den PCR-Primer zu konstruieren, wird versucht, eine Proteinsequenz zu wählen, über die degenerierte Codons in der Anzahl begrenzt sind. Dieser Ansatz ist ferner durch das Erfordernis limitiert, über eine konservierte Proteinsequenz zu konstruieren, wie oben diskutiert. Deshalb besteht der konstruierte „Primer" eigentlich aus einer Mischung von verschiedenen Molekülen, die sich an spezifischen Positionen in der Sequenz voneinander unterscheiden. Ein Primermolekül, das perfekt zu dem spezifischen zu amplifizierenden mRNA-Substrat passen würde, ist in der gesamten Primermischung als Minuskelfraktion vorhanden. Um die Wahrscheinlichkeit des Erfolges zu erhöhen, werden im Allgemeinen einige wenige Primerpaare, d.h. solche, die verschiedene Bereiche der mRNA abdecken, ausprobiert.

[0058] Einem Fachmann ist ersichtlich, dass alternative Techniken unmittelbar zur Verfügung stehen. Bspw. können anfängliche Veränderungen in den klonierten Ratten-variablen Bereich durch ein beliebiges Protokoll, aus einer Vielzahl von Protokollen zur ortsspezifischen Mutagenese, eingebracht werden. Ferner sollte klar sein, dass zusätzliche AS-Veränderungen in den variablen und insbesondere in den FR-Bereichen möglich

sein können, wobei davon auszugehen ist, dass einige Veränderungen stattfinden, die von stiller Natur sind. Stille Veränderungen sind solche Ersetzungen, Deletionen oder Additionen von einer oder einer geringen Anzahl von AS, die nicht signifikant die Bindeaffinität oder -spezifität des Antikörpers oder Antikörper-Fragmentes hiervon beeinflussen. Am augenscheinlichsten unter solchen stillen Veränderungen wäre der Austausch von einer AS durch eine AS mit ähnlicher Größe und ähnlichen chemischen Eigenschaften. Solche Veränderungen sind im Stand der Technik wohlbekannt und werden im Allgemeinen als eine „konservative" AS-Substitution bezeichnet. Im Allgemeinen ist davon auszugehen, wenn ein Leucin durch ein Isoleucin ersetzt wird, dass dadurch die Struktur eines Proteins nicht beeinflusst wird. All diese konservierten AS-Veränderungen sowie die stillen Veränderungen, die nicht signifikant die Bindeaffinität oder -spezifität des Anti-carcinoembryonalen-Antikörpers beeinflussen, liegen im Rahmen der Erfindung.

Expression der hergestellten cWI2 oder hWI2

[0059] Gene, die für die Antikörper der Erfindung kodieren, werden zur Expression über Expressionsvektoren in eine Wirtszelle eingebracht. In einer bevorzugten Ausführungsform werden die Gene für sowohl die leichten als auch schweren Gene in einen einzigen Expressionsvektor eingebracht, der in eine Wirtszelle eingebracht wird. Die Expressionsvektoren enthalten im Allgemeinen einen Wirkstoffmarker zur Selektion einer transformierten Zelle. Ein Wirkstoffmarker kann ferner dazu verwendet werden, um die Anzahl der Kopien von nahegelegenen Genen zu amplifizieren, was zu einem Klon führt, der den Antikörper überexprimiert. Bspw. wird ein Vektor, der die leichten und schweren Ketten von cWI2 oder hWI2 exprimiert, über Vektoren, die das DHFR-Gen enthalten, in SP2/O-Zellen eingebracht. Die Originalklone wurden nach der Selektion durch Wachstum auf Methotrexat (MTX) amplifiziert.

[0060] Es versteht sich, dass alternative Wege zur Koexpression der Gene für die leichte und schwere Kette möglich sind. Ein Fachmann kann andere Selektionsstrategien, das Einbringen von Genen für sowohl die leichte als auch die schwere Kette auf einem einzigen Plasmid oder die Cotransformation mit separaten Vektoren, die für die Gene der leichten und für die Gene der schweren Kette kodieren, und die Transfektion von anderen Zelllinien, in Erwägung ziehen. Ferner ist die Expression des Antikörpers in weiteren Systemen möglich. Bspw. kann die Expression in Hefe stattfinden. Alternativ können Baculoviren mit den leichten und schweren Genen hergestellt und in kultivierten Zellen exprimiert oder dazu verwendet werden, um ein Insekt zu infizieren.

[0061] Die Antikörper erfordern eine Reinigung aus ihren Expressionssystemen und -medien durch Verfahren, die grundsätzlich den Verfahren entsprechen, die oben zur Reinigung von MAbs aus Hybridomen beschrieben wurden.

Verwendungsmöglichkeiten für die erfindungsgemäßen Antikörper

[0062] Die humanisierten monoklonalen Antikörper sind gemäß der Erfindung zur Verwendung in therapeutischen Verfahren geeignet. So wurde bspw. MN-14 als therapeutisches Agens oder als Impfstoff zur Stimulierung von Ab2 vorgeschlagen. Die Dosierung von MN-14, der mit einem Arzneimittel konjugiert ist, kann erhöht werden, wenn die Entfernung oder Klärung von ungebundenem MN-14 durch dessen Bindung und Aggregatbildung mit hWI2 ermöglicht wird. Entsprechend kann MN-14 als ein Impfstoff verwendet werden, optional durch alternative Applikationen mit einem Anti-Idiotyp-Antikörper-Impfstoff. Die Zufuhr von Ab2 wäre in der Gegenwart eines Überschusses von sich in freiem Zustand befindlichen MN-14-Impfstoff kontraproduktiv. Hier würde bspw. hWI2 den MN-14-Impfstoff klären, um eine effiziente Verabreichung des Ab2-Impfstoffes zu ermöglichen.

[0063] Zusätzlich kann hWI2 selbst ein Impfstoff sein. Im Allgemeinen können die Antikörper und Fragmente der vorliegenden Erfindung durch Konjugation der Antikörper oder Fragmente mit einem löslichen immunogenen Trägerprotein als Impfstoffe verwendet werden. Geeignete Trägerproteine umfassen Hämocyanin der Schlüssellochnapfschnecke (key hole limpet hemocyanin), welches das bevorzugte Trägerprotein ist. Die Antikörper und Fragmente können unter Verwendung von Standardverfahren mit dem Trägerprotein konjugiert werden; vgl. bspw. Hancock et al., "Synthesis of Peptides for Use as Immunogen", in METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY: IMMUNOCHEMICAL PROTOCOLS, Manson (ed.), Seiten 23–32 (Humana Press 1992).

[0064] Eine bevorzugte Impfstoffzusammensetzung weist ein Antikörper-Konjugat oder Fragment-Konjugat und ein Hilfsmittel auf. Beispiele von geeigneten Hilfsstoffen umfassen Aluminiumhydroxid und Lipid. Verfahren zur Formulierung von Impfstoffzusammensetzungen sind dem Fachmann wohlbekannt; vgl, bspw. Rola. „Immunizing Agents and Diagnostic Skin Antigens", in REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18th

Edition, Gennaro (ed.), Seiten 1389–1404 (Mack Publishing Company 1990).

[0065] Weitere pharmazeutische Verfahren können verwendet werden, um die Wirkungsdauer eines Impfstoffes in einer therapeutischen Applikation zu kontrollieren. Über die Verwendung von Polymeren zur Komplexierung oder Adsorption der Antikörper oder Fragmente können Präparationen mit kontrollierter Freisetzung hergestellt werden. Bspw. umfassen biokompatible Polymere Matrices von Poly(ethylen-co-vinylacetat) und Matrices eines Polyanhydridcopolymers, eines Stearinsäuredimeres und Sebacinsäure; Sherwood et al., Bio/Technology 10: 1446 (1992). Die Freisetzungsrate eines solchen Antikörpers oder Antikörper-Fragmentes aus solch einer Matrix hängt vom Molekulargewicht des Antikörpers oder des Fragmentes, von der Menge des Antikörpers oder des Fragmentes innerhalb der Matrix, und von der Größe der dispergierten Partikel ab; Saltzman et al., Biophys. J. 55: 163 (1989); Sherwood et al., supra. Andere feste Dosierungsformen werden beschrieben in Ansel et al., PHARMACEUTICAL DOSAGE FORMS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS, 5. Ausgabe (Lea & Febiger 1990), und Gennaro (ed.), REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18. Ausgabe (Mack Publishing Company 1990).

[0066] Die erfindungsgemäßen Anti-Idiotyp-Ab können zur Detektion von einem Anti-carcinoembryonalen-Antikörper verwendet werden. Bspw. können rWI2, cWI2 und hWI2 dazu verwendet werden, um in vitro die Blutprobe eines Patienten auf das Vorhandensein eines Anti-carcinoembryonalen-Antikörpers zu testen. Die Detektion von MN-14-Spiegeln, wenn MN-14 als ein therapeutisches Agens oder als ein Impfstoff verwendet wird, ist wichtig. Das Vorhandensein von MN-14 kann durch rWI2, cWI2 oder hWI2 detektiert werden. Entsprechend kann hWI2 in einem Patienten dazu verwendet werden, um das Vorhandensein von natürlichen Anti-CEA-Abs zu bestimmen. Zur Detektion eines Anti-CEA-Ab können die Anti-Idiotyp-Abs mit einem Marker konjugiert sein. Geeignete Marker umfassen bspw. einen Radiomarker, ein Enzym, oder einen fluoreszierenden Marker. Solche Markeragenzien und Verfahren zur Konjugation sind dem Fachmann wohlbekannt.

[0067] Die Antikörper-Präparationen der vorliegenden Erfindung können gemäß bekannten Verfahren formuliert werden, um pharmazeutisch nutzbare Zusammensetzungen herzustellen, wobei die Antikörper oder die Antikörper-Fragmente in einer Mischung mit einem pharmazeutisch akzeptablen Träger kombiniert werden. Von einer Zusammensetzung wird als ein „pharmazeutisch akzeptabler Träger" gesprochen, wenn dessen Verabreichung durch ein Empfängersäugetier toleriert wird. Sterile phosphatgepufferte Saline ist ein Beispiel eines pharmazeutisch akzeptablen Trägers. Andere geeignete Träger sind einem Fachmann wohlbekannt; vgl. bspw. Ansel et al., PHARMACEUTICAL DOSAGE FORMS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS, 5. Ausgabe (Lea & Febiger 1990), und Gennaro (ed.), REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18. Ausgabe (Mack Publishing Company 1990).

[0068] Die Antikörper oder die Fragmente können einem Mammalier intravenös oder subkutan verabreicht werden. Ferner kann die Verabreichung durch eine kontinuierliche Infusion oder durch einen einzigen Bolus oder mehrere Boli erfolgen. Vorzugsweise wird ein Antikörper-Impfstoff subkutan verabreicht, während eine Antikörper-Präparation, die kein Impfstoff ist, intravenös verabreicht wird. Im Allgemeinen wird die Dosierung von verabreichten Antikörpern oder von Fragmenten für den Menschen in Abhängigkeit solcher Faktoren variieren, wie bspw. des Alters des Patienten, des Gewichtes, der Größe, des Geschlechtes, der allgemeinen medizinischen Verfassung und der vorherigen medizinischen Historie. Typischerweise ist es wünschenswert, Empfänger mit einer Dosierung von Antikörpern oder Fragmenten zu versehen, die im Bereich von etwa 1 pg/kg bis 10 mg/kg (Menge des Agens/Körpergewicht des Patienten) liegt, obwohl je nach den Umständen auch eine niedrigere oder höhere Dosis verabreicht werden kann.

[0069] Zu Therapiezwecken werden dem Mammalier Antikörper oder Fragmente in einer therapeutisch wirksamen Menge verabreicht. Von der Verabreichung einer Antikörper-Präparation in einer „therapeutisch wirksamen Menge" wird gesprochen, wenn die verabreichte Menge physiologisch signifikant ist. Ein Agens ist physiologisch signifikant, wenn dessen Vorhandensein zu einer detektierbaren Veränderung in der Physiologie eine Empfängersäugetieres führt. Eine erfindungsgemäße Antikörper-Präparation ist insbesondere physiologisch signifikant, wenn deren Vorhandensein eine humorale und/oder zelluläre Immunantwort in dem Empfängermammalier auslöst.

[0070] Die vorliegende Erfindung baut zusätzlich zu den speziell beschriebenen Techniken, Zelllinien und Vektoren auf Beschreibungen dieser Techniken, Zelllinien und Vektoren auf, dargestellt in den US-Patenten Nr. 5,443,953 und 4,624,846 und in den WO 96/11013 und WO 96/04925.

Beispiel 1

Humanisierung des WI2-Klones

[0071] Die Sequenzen, die für die WI2-VH- und VK-Domänen kodieren, wurden durch reverse Transkriptase, gefolgt von PCR-Reaktionen (RT-PCR) erhalten, bei denen RNA, die aus WI2-Hybridomen präpariert wurde, als Templates verwendet wurde. Da die WI2-Antikörper-Sequenzen aus der Ratte stammen, könnten die Orlandi-VH1FOR/BACK- und -VK1FORBACK-Primersätze für deren PCR-Klonierung nicht brauchbar sein; vgl. Orlandi et al., 1989, supra. Basierend auf den Sequenzen, die von Kutemeier et al., supra, vorgeschlagen werden, wurden die folgenden Primersätze für die PCR-Klonierung der VH- und VK-Domänen von WI2 synthetisiert:
(RCH1) 5'-GAC GTA TAC CTG TGG TTT TCT G-3' (SEQ ID-Nr. 7),
(RVH-1BACK) 5'-AGG TSM ARC TGC AGS AGT CWG G-3' (SEQ ID-Nr. 8), und
(RVH-1FOR) 5'-TGA GGA GAC GGT GAC CGT GGT CCC TTG GCC CC-3' (SEQ ID-Nr. 9), wobei S = G + C; M = A + C; R = A + G; und W = A + T, und
(RK1) 5'-GGA TGA TGT CTT ATG AAC AA-3' (SEQ ID-Nr. 10);
(RVK-1BACK) 5'-CCA GTT CCG AGC TCG TGC TCA CCC AGT CTC CA-3' (SEQ ID-Nr. 11),
(RVK-2BACK) 5'-CCA GTT CCG AGC TCC AGA TGA CCC AGT CTC CA-3' (SEQ ID-Nr. 12),
(RVK-3BACK) 5'-CCA GAT GTG AGC TCG TGA TGA CCC AGA CTC CA-3' (SEQ ID-Nr. 13),
(RVK-4BACK) 5'-CCA GAT GTG AGC TCG TCA TGA CCC AGT CTC CA-3' (SEQ ID-Nr. 14),
(RVK-5BACK) 5'-CCA GTT CCG AGC TCG TGA TGA CAC AGT CTC CA-3' (SEQ ID-Nr. 15), und
(RVK-1FOR) 5'-GTT AGA TCT CCA GCT TGG TCC C-3' (SEQ ID-Nr. 16).

Die Klonierung der VH-Sequenz

[0072] Erststrang-cDNA wurde aus Gesamt-RNA hergestellt, die aus WI2-Hybridomen isoliert wurde, wobei randomisierte Hexamere als Anlagerungsprimer verwendet wurden. RCH1 (der sich an die Ratten-IgG1-CH1-Domäne anlagert) und RVH-1BACK (der sich an den Ratten-5'-VH-Bereich anlagert) wurden unter Verwendung von Standardprotokollen als Primerpaar getestet, um die VH-Sequenz von dem Erststrang-cDNA-Template mittels PCR zu amplifizieren und zu isolieren. Es wurde jedoch kein PCR-Produkt erhalten. Unerwarteterweise produzierte der RCH1-Primer in Verbindung mit dem Orlandi-Primer VH1BACK (5'-AGG TSM ARC TGC AGS AGT CWG G-3') (SEQ ID-Nr. 8) ein PCR-Produkt mit erwarteter Größe. Die PCR-amplifizierte VH-Sequenz wurde mit den Restriktionsenzymen PstI/BstEII verdaut und in die entsprechenden Stellen des Schwere-Ketten-Gerüstvektors VHpBS subkloniert; vgl. Leung et al., Hybridoma 13: 469 (1994). Sechs individuelle Klone wurden sequenziert und es wurde bestätigt, dass diese miteinander identisch sind. RVH-1FOR, der sich an den Ratten-3'-VH-Bereich anlagert, und RVH-1BACK, produzierten ebenfalls ein PCR-Produkt mit der erwarteten Größe, welches nicht weiter analysiert wurde. **Fig. 7** zeigt die Sequenz des variablen Bereiches der schweren Kette.

Klonierung der VK-Sequenz

[0073] Erststrang-cDNA wurde aus Gesamt-RNA hergestellt, die aus WI2-Hybridomen isoliert wurde, wobei randomisierte Hexamere als Anlagerungsprimer verwendet wurden. Es wurde der RK1 (der sich an die Ratten-CK-Domäne anlagert) in Verbindung mit RVK-3BACK (der sich an den 5'-VK-Bereich anlagert) dazu verwendet, um den VK-Bereich von rWI2 mittels PCR zu amplifizieren und zu isolieren, wobei Standard-PCR-Protokolle verwendet wurden. Es wurde das erwartete Produkt mit 320 Basenpaaren (bp) erhalten. Das PCR-Produkt wurde weiter analysiert. Andere Primerpaare wurden nicht getestet. **Fig. 6** zeigt die Sequenz des variablen Bereiches der leichten Kette.

[0074] Die Restriktionsanalyse des 320 bp VK-PCR-Produktes zeigte das Vorhandensein einer zusätzlichen PvuII-Stelle, die mit der anschließenden Klonierung in die PvuII/BclI-Stellen des Gerüstvektors VKpBR (Id.) interferieren würde. Da dem PCR-Produkt die geeigneten Enden für den Gerüstvektor fehlen, wurde es direkt in den TA-Klonierungsvektor (Invitrogen) subkloniert, der eine direkte Insertion von PCR-DNA ermöglicht. Sechs individuelle Klone wurden sequenziert und es konnte gezeigt werden, dass alle sechs identisch waren. Die Analyse der abgeleiteten Protein-Sequenz zeigte eine funktionelle VK-Domäne an. Um die Sequenz in einen Gerüstvektor subzuklonieren, wurde ein neuer Primer konstruiert. In diesen Primer wurde anstelle der gesamten Restriktionserkennungsstelle ein PvuII-kompatibles Ende eingebracht, so dass das PCR-Produkt an seinem 5'-Ende eine kompatible Stelle für die Ligation in die entsprechende PvuII-Stelle innerhalb des VKpBR-Gerüstvektors haben wird. Das PCR-Produkt wurde mit BglII verdaut und in die PvuII/BclI-Klonierungsstellen des VKpBR-Gerüstvektors kloniert (Id.). Die Ligation wurde in E. coli transformiert und auf Selektions-

platten ausplattiert. Eine Miniprep-DNA wurde präpariert und analysiert. DNA aus positiven Klonen wurde sequenziert, um sicherzugehen, dass der Verbindungsbereich wie erwartet an der PvuII-Stelle war. Die PCR-amplifizierte VH- und VK-Sequenzen für WI2 wurden aus ihrem jeweiligen Gerüstvektor durch HindII/BamHI-Restriktionsverdau ausgeschnitten und die isolierten Fragmente wurden in ihre jeweiligen Schwere- und Leichte-Ketten-Expressionsvektoren pG1g und pKh (Id.) subkloniert. Chimärer WI2 (cWI2) wurde aus Klonen gereinigt, die mit den Schwere- und Leichte-Ketten-Expressionsvektoren cotransfiziert waren, und die Immunreaktivität von cWI2 wurde mit der von Ratten-WI2 verglichen. Die Ergebnisse zeigten, dass beide Antikörper die Bindung von MN-14 an CEA im gleichen Ausmaß inhibieren, was die Funktionalität des chimären Antikörpers und die Authentizität der VH- und VK-Sequenzen bestätigt.

Konstruktion der humanisierten WI2-Sequenz

VH- und VK-Konstruktion

[0075] Durch Vergleichen der Sequenzhomologie von einer Anzahl von humanen IgG mit der rWI2-Gerüstregion wurde die humane KOL-Gerüstregion zum Graften der Schwere-Ketten-CDRs gewählt. Zwei Versionen von humanisierten schweren Ketten, die als KOLWI2VH-1 und KOLWI2VH-2 bezeichnet werden, wurden konstruiert; vgl. **Fig. 1**. Es wurde jedoch nur die KOLWI2VH-1 synthetisiert und getestet. Die KOLWI2VH-1 unterscheidet sich von der KOLWI2VH-2 nur durch eine Aminosäure an Position 5 (Q anstelle von V). Die Ratten-Reste, die in der Nähe der CDRs liegen, oder für die man auf Grund früherer Erfahrungswerte weiß, dass diese wichtig für Interaktionen mit den CDRs sind, wurden in beiden humanisierten Sequenzen beibehalten. Insgesamt fünf Ratten-Reste wurden in der FR-Region der Sequenz KOLWI2VH-1 der humanisierten WI2 schweren Kette beibehalten. Bei der KOLWI2VH-2-Sequenz würden vier Ratten-AS-Reste beibehalten werden.

[0076] Das REI-Gerüst wurde zum Graften der Leichte-Ketten-CDRs gewählt. Vier Ratten-Reste wurden in der FR-Region der designten leichten Kette beibehalten. Die Sequenz der designten leichten Kette REIWI2VK ist in **Fig. 2** gezeigt.

Gensynthese für die humanisierte WI2-, VH- und VK-Domäne

[0077] Unter Verwendung einer Computeranalyse wurden die Nucleotid-Sequenzen, die für die humanisierte VH- und VK-Domäne von WI2 kodieren, wie folgt zusammengefügt.

hWI2-VH

[0078] Das lange Oligo K (135-mer) wurde unter Verwendung der flankierenden Primer Oligo 21 (45-mer) und Oligo 22 (54-mer) mittels PCR amplifiziert. Das PCR-Produkt für Oligo K kodiert für die N-terminale Hälfte der VH-Domäne. Entsprechend wurde das lange Oligo L (133-mer) unter Verwendung der flankierenden Primer Oligo 23 (48-mer) und Oligo 24 (45-mer) mittels PCR amplifiziert. Das PCR-Produkt für Oligo L kodiert für die C-terminale Hälfte der VH-Domäne. Die Sequenzen der verschiedenen Oligos, die für die PCR-Synthese der humanisierten WI2VH-Domäne verwendet wurden, sind in **Fig.** 3 zusammengefasst.

[0079] Das PCR-Produkt für Oligo K wurde mit PstI/AlwNI verdaut, wohingegen das PCR-Produkt für Oligo L mit AlwNI/BstEII verdaut wurde. Die K- und L-Fragmente wurden gelgereinigt und an die PstI/BstEII-Stellen des Gerüstvektors VHpBR ligiert. Minipreps wurden sowohl durch Restriktionsanalyse als auch durch eine Sequenzierungsreaktion analysiert. Für MP33#4 (1.6.95) wurde bestätigt, dass die korrekte Sequenz für die hWI2-VH vorhanden war, und diese wurde für die folgende Klonierung und Subklonierung verwendet. Das BamHI/HindIII-Fragment, das die hWI2VH-Domäne enthielt, wurde nach Restriktionsverdau von der DNA gereinigt und in die entsprechenden Stellen des Schwere-Ketten-Expressionsvektors pGlg kloniert; Leung et al., Hybridoma 13: 469 (1994).

hWI2-VK

[0080] Das lange Oligo M' (129-mer) wurde unter Verwendung der flankierenden Primer Oligo 25, der eine PvuII-Stelle enthält, und Oligo 26 mittels PCR amplifiziert. Das PCR-Produkt für Oligo M' kodiert für die N-terminale Hälfte der VK-Domäne. Das lange Oligo N (127-mer) wurde durch die flankierenden Primer Oligo 27 (44-mer) und Oligo 28 (39-mer) mittels PCR amplifiziert. Das PCR-Produkt für Oligo N kodiert für die C-terminale Hälfte der VK-Domäne. Die Sequenzen der Oligonucleotide, die für die PCR-Amplifizierung der humanisierten WI2-VK-Domäne verwendet wurden, sind in **Fig.** 4 zusammengefasst.

[0081] Das PCR-Produkt für Oligo M' wurde mit PstI und PvuII verdaut, wohingegen das PCR-Produkt für Oligo N mit PstI/BglII verdaut wurde. Die M- und N-Fragmente wurden gelgereinigt und an die PvuII/BclI-Stelle des Gerüstvektors VKpBR ligiert. Durch Analyse von Miniprep-DNA wurden drei Klone als die für hWI2VKpBR am wahrscheinlichsten positiv identifiziert. Für diese drei Minipreps wurden Hogness-Lösungen hergestellt. Die Sequenz wurde von beiden Richtungen, die die PvuII- und BglII/BclI-Verbindungen kreuzen, bestätigt. Plasmid-DNA wurde hergestellt. Das BamHI/HindIII-Fragment, das die hWI2-VK-Domäne enthielt, wurde nach Restriktionsverdau aus der DNA gelgereinigt und wurde in die entsprechenden Stellen des Leichte-Ketten-Expressionsvektors pKh (Id.) kloniert. Es wurde Plasmid-DNA sowohl für den Schwere- als auch den Leichte-Ketten-Vektor, die hWI2 exprimieren, präpariert und in SP2/O-Myelomzellen durch Elektroporation cotransfiziert.

[0082] Unter Verwendung von ELISA-Assays wurden insgesamt acht Antikörper produzierende Kolonien identifiziert. Die drei größten Produzenten wurden behalten und Zellaliquote wurden zur Lagerung eingefroren. Der höchste Produzent wurde expandiert und für die anschließende Antikörper-Reinigung und -Testung vermehrt.

Überprüfung der Immunreaktivität der schweren Kette von hWI2 in einem „Mix-und-match"-Experiment

[0083] Der Mix-und-match-Antikörper, der die humanisierten schweren und chimären leichten Ketten von WI2 enthielt, wurde gereinigt. Verschiedene Konzentrationen des Mix-und-match-Antikörpers wurden dazu verwendet, um mit einem CEA, mit dem eine ELISA-Platte beschichtet wurde, um die Bindung an den peroxidasekonjugierten MN-14-Antikörper zu kompetitieren. Ein chimärer Ab wurde produziert und exprimiert und es wurde gezeigt, dass dieser immunogene Reaktivität hat, die vergleichbar ist mit der von Ratten-WI2.

WI2

[0084] Die Originalsequenzen für die humanisierten schweren und leichten Ketten von WI2 wurden durch Sequenzhomologievergleich ohne die Hilfe des Computermodelings konstruiert (**Fig. 2**). In einem kompetitiven Bindungsassay konnte gezeigt werden, dass die erste Version des humanisierten WI2 (hWI2) geringfügig weniger aktiv in der Blockierung der Bindung von peroxidasekonjugiertem MN-14 an CEA war, verglichen mit rWI2 und cWI2 (**Fig. 5**). In dem Mix-und-match-Experiment (rVK + hVH), das oben beschrieben ist, wurde demonstriert, dass die Konstruktion der humanisierten schweren Kette gut war. Deshalb wurde eine Rekonstruktion der humanisierten VK-Sequenz mit der Intention unternommen, die volle Immunreaktivität von hWI2 wieder herzustellen. Studien an der Kristallstruktur für das REI-Protein legten nahe, dass die Ratten-Reste Arg (66) und Ser (69) mit den Leichte-Ketten-CDRs interagieren könnten. Diese beiden Ratten-Reste, Arg und Ser, wurden wieder in die VK-FR3 von hWI2 durch ortsgerichtete Mutagenese eingeführt. Die neu konstruierte leichte Kette REIWI2VKRS ist in **Fig. 2** gezeigt. Humanisierter WI2, der diese beiden Mutationen trägt, wurde als hWI2RS bezeichnet. Sämtliche Mutationen und Vektorkonstruktionen wurden durch Sequenzierung sowie ferner durch umfassende Restriktionsanalyse verifiziert. Expressionsvektoren für diese neue Version von humanisierter leichter Kette (hWI2RSpKh) wurden für Transfektionsexperimente durch Elektroporation verwendet.

[0085] Auf Grund unbekannter Ursachen war es schwierig, Antikörper produzierende Klone zu erhalten, die mit dem hWI2RS-Expressionsvektor transfiziert waren. Die Klone 131A9 und 132F7 wurden als positive Klone identifiziert, die etwa 0,4 bzw. 0,2 mg/Liter von hWI2RS-Antikörpern produzieren. Ein Liter der Kultur der Klone 131A9 und 132F7 wurde in Rollflaschen wachsen gelassen und der Antikörper wurde durch ein Standard-Proteinreinigungsverfahren gereinigt. Etwa 0,4 bzw. 0,2 mg von hWI2RS wurde aus dem Klon 131A9 bzw. 132F7 gewonnen. Die Immunreaktivitäten von 131A9 und 132F7 hWI2RS, wie dies durch deren Fähigkeiten, die Bindung von MN-14 an CEA zu blockieren, gemessen wurde, stellten sich als vergleichbar heraus.

Beispiel 2

Vergleich der Immunreaktivitäten von verschiedenen Versionen von WI2

[0086] In einem Experiment wurden die Immunreaktivitäten von hWI2 und hWI2RS gemessen durch deren Fähigkeiten, die Bindung von NM-14 an CEA zu blockieren, mit der von rWI2 bzw. cWI2 verglichen (**Fig. 5**). Sowohl hWI2 als auch hWI2RS scheinen gegenüber rWI2 und cWI2 geringfügig reduzierte Immunreaktivitäten auszuüben. Die Einführung der RS-Mutation in die FR3-Region von hWI2 scheint die Immunreaktivität nicht zu verbessern, wie vorhergesagt. Nichtsdestotrotz war hWI2 nahezu so immunreaktiv wie rWI2 oder cWI2.

[0087] Sowohl hWI2 als auch hWI2RS zeigten eine sehr ähnliche, wenn nicht identische, Immunreaktivität. Da hWI2RS zwei zusätzliche Ratten-Reste in der FR3-Region der zweiten Kette aufweist und potenziell stärker

immunogen ist, wurde die erste humanisierte Version von WI2, hWI2, als derjenige Antikörper ausgewählt, der für die Produktion weiter vermehrt wurde.

Beispiel 3

Konstruktion eines amplifizierbaren Expressionsvektors für hWI2

[0088] Die VH- und VK-Sequenzen für hWI2 wurden aus den jeweiligen Gerüstvektoren ausgeschnitten und an einen einzigen amplifizierbaren Vektor pdHL2 ligiert. Der pdHL2-Vektor weist Sequenzen für humane CK, IgG1, und ein amplifizierbares DHFR-Gen auf, jeweils kontrolliert durch separate Promotoren; vgl. Leung et al., Tumor Targeting 2: 183 (#93) (1996). Der resultierende Vektor, der den hWI2 exprimiert, wurde als hWI2pdHL2 bezeichnet. Die Plasmid-DNA für den hWI2pdHL2 wurde linearisiert und durch Elektroporation in SP2/O-Zellen transfiziert. Die Selektion erfolgte durch Zugabe von 0,1 μM Methotrexat (MTX) in das Kulturmedium. Die Amplifizierung wurde schrittweise mit zunehmender Konzentration von MTX (von 0,1 bis 3 μM) durchgeführt. hWI2, der aus amplifizierten Klonen gereinigt wurde, zeigte die identische Immunreaktivität wie hWI2, der aus vorherigen, nicht amplifizierbaren Klonen gewonnen wurde.

SEQUENZPROTOKOLL

<110> IMMUNOMEDICS, INC.

<120> HUMANISIERUNG EINES ANTI-CARCINOEMBRYONALEN-ANTIGEN-
ANTI-IDIOTYP-ANTIKÖRPERS UND VERWENDUNG ALS TUMOR-IMPFSTOFF
UND ZUR TARGETING-ANWENDUNG

<130> 1406P314DE(EP)

<140> EP 97916185.8
<141> 1997-03-19

<150> PCT/US97/04696
<151> 1997-03-19

<150> 60/013,708
<151> 1996-03-20

<160> 45

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 5
<212> PRT
<213> Rattus sp.

<400> 1
Asn Tyr Trp Met Thr
1 5

<210> 2

<211> 16

<212> PRT

<213> Rattus sp.

<400> 2

Ser Ile Thr Ser Thr Gly Gly Thr Tyr His Ala Glu Ser Val Lys Gly
1 5 10 15

<210> 3

<211> 13

<212> PRT

<213> Rattus sp.

<400> 3

Asp Asp Tyr Gly Gly Gln Ser Thr Tyr Val Met Asp Ala
1 5 10

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> Rattus sp.

<400> 4

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

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Rattus sp.

<400> 5

Gly Ala Thr Asn Leu Ala Ala
1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Rattus sp.

<400> 6

Leu His His Ser Glu Tyr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 7

<211> 22

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 7

gacgtatacc tgtggttttc tg 22

<210> 8

<211> 22

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 8

aggtsmarct gcagsagtcw gg 22

<210> 9

<211> 32

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 9

tgaggagacg gtgaccgtgg tcccttggcc cc 32

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 10

ggatgatgtc ttatgaacaa 20

<210> 11

<211> 32

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 11

ccagttccga gctcgtgctc acccagtctc ca 32

<210> 12

<211> 32

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 12

ccagttccga gctccagatg acccagtctc ca 32

<210> 13

<211> 32

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 13

ccagatgtga gctcgtgatg acccagactc ca 32

<210> 14

<211> 32

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

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

<400> 14
ccagatgtga gctcgtcatg acccagtctc ca 32

<210> 15
<211> 32
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

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

<400> 15
ccagttccga gctcgtgatg acacagtctc ca 32

<210> 16
<211> 22
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

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

<400> 16
gttagatctc cagcttggtc cc 22

<210> 17

<211> 122

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MOD_RES

<222> (31)..(35)

<223> Variable Aminosäure

<220>

<221> MOD_RES

<222> (50)..(66)

<223> Variable Aminosäure

<220>

<221> MOD_RES

<222> (99)..(111)

<223> Variable Aminosäure

<400> 17

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ser Ser Gly Phe Ile Phe Ser Xaa Xaa
             20                  25                  30

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

Ala Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
     50                  55                  60

Xaa Xaa Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe
 65                  70                  75                  80
```

```
Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Phe Cys
                 85                  90                  95

Ala Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp
            100                 105                 110

Gly Gln Gly Thr Pro Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 18
<211> 122
<212> PRT
<213> Rattus sp.

<400> 18

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

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

Trp Met Thr Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

Ala Ser Ile Thr Ser Thr Gly Gly Gly Thr Tyr His Ala Glu Ser Val
    50                  55                  60

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

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

```
Ser Arg Asp Asp Tyr Gly Gly Gln Ser Thr Tyr Val Met Asp Ala Trp
            100                 105                 110

Gly Gln Gly Ser Ser Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 19
<211> 122
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Synthetisches Konstrukt KOLWI2VH-1

<400> 19

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ser Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
             20                  25                  30

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

Ala Ser Ile Thr Ser Thr Gly Gly Gly Thr Tyr His Ala Glu Ser Val
     50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe
 65                  70                  75                  80
```

```
Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys
                 85                  90                  95

Ser Arg Asp Asp Tyr Gly Gly Gln Ser Thr Tyr Val Met Asp Ala Trp
            100                 105                 110

Gly Gln Gly Thr Pro Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 20
<211> 122
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Synthetisches Konstrukt KOLWI2VH-2

<400> 20

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ser Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
             20                  25                  30

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

Ala Ser Ile Thr Ser Thr Gly Gly Gly Thr Tyr His Ala Glu Ser Val
     50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe
 65                  70                  75                  80
```

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

Ser Arg Asp Asp Tyr Gly Gly Gln Ser Thr Tyr Val Met Asp Ala Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Pro Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 21
<211> 109
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (24)..(34)
<223> Variable Aminosäure

<220>
<221> MOD_RES
<222> (50)..(56)
<223> Variable Aminosäure

<220>
<221> MOD_RES
<222> (89)..(97)
<223> Variable Aminosäure

<400> 21
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 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
20 25 30

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

Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
85 90 95

Xaa Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr Arg Thr
100 105

<210> 22
<211> 108
<212> PRT
<213> Rattus sp.

<400> 22
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Pro Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15

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

Leu Arg Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

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

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

Glu Asp Met Ala Ile Tyr Tyr Cys Leu His His Ser Glu Tyr Pro Tyr
                 85                  90                  95

Thr Phe Gly Ile Gly Thr Lys Leu Glu Arg Lys Arg
            100                 105
```

<210> 23
<211> 108
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Synthetisches Konstrukt REIWI2VKRS

<400> 23

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

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

Leu Arg Trp Phe Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
         35                  40                  45
```

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

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu His His Ser Glu Tyr Pro Tyr
                 85                  90                  95

Thr Phe Gly Ile Gly Thr Lys Leu Gln Ile Lys Arg
            100                 105
```

<210> 24
<211> 108
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Synthetisches Konstrukt REIWI2VK

<400> 24

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

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

Leu Arg Trp Phe Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
         35                  40                  45

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

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu His His Ser Glu Tyr Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Ile Gly Thr Lys Leu Gln Ile Lys Arg
100 105

<210> 25
<211> 366
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(366)

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Synthetischer variabler Bereich der schweren Kette hWI2

<400> 25
cag gtc caa ctg cag gag tca ggg gga ggt gta gtg cag cct gga agg 48
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

tct ctg aga ctt tcc tgt agc tca tct gga ttc aca ttc agt aat tac 96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ser Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

```
tgg atg act tgg ata cgc cag gct cca ggg aag ggt ctt gaa tgg gtt   144
Trp Met Thr Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
         35                  40                  45

gcg tcc att act agt act ggt ggt ggt acc tac cat gca gag tct gtg   192
Ala Ser Ile Thr Ser Thr Gly Gly Gly Thr Tyr His Ala Glu Ser Val
     50                  55                  60

aag ggc cga ttc act atc tcc aga gat aat tca aaa aac acc ctg ttc   240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe
 65                  70                  75                  80

ctg caa atg gac agt ctg agg cct gag gac acg ggc gtt tat tac tgt   288
Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

tca aga gat gac tac gga gga cag agc acc tat gtt atg gat gcc tgg   336
Ser Arg Asp Asp Tyr Gly Gly Gln Ser Thr Tyr Val Met Asp Ala Trp
            100                 105                 110

ggt cag gga act ccg gtc acc gtc tcc tcc                          366
Gly Gln Gly Thr Pro Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 26
<211> 122
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Synthetischer variabler Bereich der schweren Kette hWI2

<400> 26

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ser Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
             20                  25                  30

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

Ala Ser Ile Thr Ser Thr Gly Gly Gly Thr Tyr His Ala Glu Ser Val
     50                  55                  60

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

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

Ser Arg Asp Asp Tyr Gly Gly Gln Ser Thr Tyr Val Met Asp Ala Trp
            100                 105                 110

Gly Gln Gly Thr Pro Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 27

<211> 325

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(324)

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Synthetischer variabler Bereich der leichten Kette hWI2

<400> 27

```
gac att cag atg acc cag tct cca tct tcc ctg tct gcg tct gtg gga   48
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
  1               5                  10                  15

gac aga gtc act att act tgc cgg gca agt caa gac att gga aat tat   96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Gly Asn Tyr
             20                  25                  30

tta aga tgg ttc cag cag aca ccg ggg aaa gct ccg aaa ctt ttg att   144
Leu Arg Trp Phe Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
         35                  40                  45

tat ggt gca acc aac ttg gct gca ggg gtc cca tca cgg ttc agt ggc   192
Tyr Gly Ala Thr Asn Leu Ala Ala Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
     50                  55                  60

agt ggg tct ggg aca gat ttt act ttt acc atc tca agc ctt cag cct   240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65                  70                  75                  80

gaa gat att gct act tat tac tgt ctg cac cat tct gag tat cca tac   288
Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu His His Ser Glu Tyr Pro Tyr
                 85                  90                  95

acg ttt gga att ggg acc aag ttg cag atc aaa cgt g                 325
Thr Phe Gly Ile Gly Thr Lys Leu Gln Ile Lys Arg
            100                 105
```

<210> 28

<211> 108

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Synthetischer variabler Bereich der leichten Kette hWI2

<400> 28

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

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

Leu Arg Trp Phe Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
         35                  40                  45

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

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu His His Ser Glu Tyr Pro Tyr
                 85                  90                  95

Thr Phe Gly Ile Gly Thr Lys Leu Gln Ile Lys Arg
            100                 105
```

<210> 29

<211> 324

<212> DNA

<213> Rattus sp.

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(324)

<400> 29

```
gac att cag ctg acc cag tct cca gct tcc ctg cct gcg tct ctg gga   48
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Pro Ala Ser Leu Gly
  1               5                  10                  15

gac aga gtc act att act tgc cgg gca agt caa gac att gga aat tat   96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Gly Asn Tyr
             20                  25                  30

tta aga tgg ttc cag cag aaa ccg ggg aaa tct ccg agg ctt ttg att   144
Leu Arg Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Arg Leu Leu Ile
         35                  40                  45

tat ggt gca acc aac ttg gca gct ggg gtc cca tca cgg ttc agt cgc   192
Tyr Gly Ala Thr Asn Leu Ala Ala Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Arg
     50                  55                  60

agt agg tct ggg tca gat ttt tct ctg acc atc aac agc ctg gag tct   240
Ser Arg Ser Gly Ser Asp Phe Ser Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ser
 65                  70                  75                  80

gaa gat atg gct att tat tac tgt ctg cac cat tct gag tat cca tac   288
Glu Asp Met Ala Ile Tyr Tyr Cys Leu His His Ser Glu Tyr Pro Tyr
                 85                  90                  95
```

acg ttt gga att ggg acc aag ctg gaa cgg aaa cgg 324
Thr Phe Gly Ile Gly Thr Lys Leu Glu Arg Lys Arg
100 105

<210> 30
<211> 108
<212> PRT
<213> Rattus sp.

<400> 30
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Pro Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15

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

Leu Arg Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

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

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

Glu Asp Met Ala Ile Tyr Tyr Cys Leu His His Ser Glu Tyr Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Ile Gly Thr Lys Leu Glu Arg Lys Arg
100 105

<210> 31

<211> 366

<212> DNA

<213> Rattus sp.

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(366)

<400> 31

```
cag gtc caa ctg cag gag tca ggg gga gat cta gtg cag cct gga agg   48
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Arg
  1               5                  10                  15

tct ctg aaa ctt tcc tgt gta gcc tct gga ttc aca ttc agt aat tac   96
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
             20                  25                  30

tgg atg act tgg atc cgc cag gct cca ggg gag ggt ctt gaa tgg gtt   144
Trp Met Thr Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp Val
         35                  40                  45

gcg tcc att act agt act ggt ggt ggg act tac cat gca gag tct gtg   192
Ala Ser Ile Thr Ser Thr Gly Gly Gly Thr Tyr His Ala Glu Ser Val
     50                  55                  60

aag ggc cga ttc act atc tcc aga gat aat tca aaa agc acc ctg tac   240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Ser Thr Leu Tyr
 65                  70                  75                  80

ctg caa atg aac agt ctg agg cct gag gac acg gcc act tat tac tgt   288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
                 85                  90                  95
```

```
tca aga gat gac tac gga gga cag agc acc tat gtt atg gat gcc tgg   336
Ser Arg Asp Asp Tyr Gly Gly Gln Ser Thr Tyr Val Met Asp Ala Trp
            100                 105                 110

ggt cag gga tct tcg gtc acc gtc tcc tca                           366
Gly Gln Gly Ser Ser Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 32
<211> 122
<212> PRT
<213> Rattus sp.

<400> 32

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

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

Trp Met Thr Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp Val
         35                  40                  45

Ala Ser Ile Thr Ser Thr Gly Gly Gly Thr Tyr His Ala Glu Ser Val
     50                  55                  60

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

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

Ser Arg Asp Asp Tyr Gly Gly Gln Ser Thr Tyr Val Met Asp Ala Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Ser Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 33
<211> 46
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Synthetisches Oligonucleotid

<400> 33
caggtccaac tgcaggagtc aggggaggt gtagtgcagc ctggaa 46

<210> 34
<211> 130
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Synthetisches Oligonucleotid

<400> 34
agtaatggac gcaacccatt caagaccctt ccctggagcc tggcgtatcc aagtcatcca 60
gtaattactg aatgtgaatc cagatgagct acaggaaagt ctcagagacc ttccaggctg 120
cactacacct 130

<210> 35
<211> 48
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Synthetisches Oligonucleotid

<400> 35
atgcagagtc tgtgaagggc cgattcacta tctccagaga taattcaa 48

<210> 36
<211> 54
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Synthetisches Oligonucleotid

<400> 36
ttcacagact ctgcatggta ggtaccacca ccagtactag taatggacgc aacc 54

<210> 37
<211> 133
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Synthetisches Oligonucleotid

<400> 37
accccaggca tccataacat aggtgctctg tcctccgtag tcatctcttg aacagtaata 60
aacgcccgtg tcctcaggcc tcagactgtc catttgcagg aacagggtgt tttttgaatt 120
atctctggag ata 133

<210> 38
<211> 45
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Synthetisches Oligonucleotid

<400> 38
ggaggagacg gtgaccggag ttcgctgacc ccaggcatcc ataac 45

<210> 39
<211> 50
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Synthetisches Oligonucleotid

<400> 39
gacattcagc tgacccagtc tccatcttcc ctgtctgcgt ctgtgggaga 50

<210> 40
<211> 41
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Synthetisches Oligonucleotid

<400> 40
atgacccagt ctccatcttc cctgtctgcg tctgtgggag a 41

<210> 41
<211> 129
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Synthetisches Oligonucleotid

<400> 41
agttggttgc accataaatc aaaagtttcg gagctttccc cggtgtctgc tggaaccatc 60
ttaaataatt tccaatgtct tgacttgccc ggcaagtaat agtgactctg tctcccacag 120
acgcagaca 129

<210> 42
<211> 44
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Synthetisches Oligonucleotid

<400> 42

tggctgcagg ggtcccatca cggttcagtg gcagtgggtc tggg 44

<210> 43

<211> 36

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Synthetisches Oligonucleotid

<400> 43

ggacccctgc agccaagttg gttgcaccat aaatca 36

<210> 44

<211> 128

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Synthetisches Oligonucleotid

<400> 44

ttggtcccaa ttccaaacgt gtatggatac tcagaatggt gcagacagta ataagtagca 60

atatcttcag gctgaaggct tgagatggta aaagtaaaat ctgtcccaga cccactgcca 120

ctgaaccg 128

<210> 45

<211> 39

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Synthetisches Oligonucleotid

<400> 45

cacgttagat ctgcaacttg gtcccaattc caaacgtgt 39

Patentansprüche

1. Anti-Idiotyp-Antikörper oder Antigen-Bindefragment davon, der bzw. das spezifisch den Idiotyp-Bereich eines monoklonalen Anti-CEA-Antikörpers bindet, wobei der Anti-Idiotyp-Antikörper zumindest zwei komplementaritätsbestimmende Regionen (CDRs) des variablen Bereiches der leichten Kette des Ratten-Anti-Idiotyp-Antikörpers rWI2 aufweist, wobei die CDRs Folgendes aufweisen, nämlich:
die CDR-1-Sequenz, SEQ ID-Nr. 4, RASQDIGNYLR,
die CDR-2-Sequenz, SEQ ID-Nr. 5, GATNLAA, und
die CDR-3-Sequenz, SEQ ID-Nr. 6, LHHSEYPYT; und
wobei der Anti-Idiotyp-Antikörper zumindest zwei CDRs des schweren variablen Bereiches des Ratten-Anti-Idiotyp-Antikörpers rWI2 aufweist, wobei die CDRs Folgendes aufweisen, nämlich:
die CDR-1-Sequenz, SEQ ID-Nr. 1, NYWMT,
die CDR-2-Sequenz, SEQ ID-Nr. 2, SITSTGGTYHAESVKG, und
die CDR-3-Sequenz, SEQ ID-Nr. 3, DDYGGQSTYVMDA, oder
ein Derivat davon, verursacht durch eine oder mehrere stille Mutationen.

2. Anti-Idiotyp-Antikörper oder Antigen-Bindefragment davon nach Anspruch 1, wobei der Antikörper ein chimärer Antikörper ist, in dem die Gerüstregionen (FR) der variablen Bereiche der leichten und schweren Kette jene der SEQ ID-Nr. 18 bzw. SEQ ID-Nr. 22 des rWI2-Antikörpers sind, und die konstanten Bereiche von einem humanen Antikörper abgeleitet sind.

3. Anti-Idiotyp-Antikörper oder Antigen-Bindefragment davon nach Anspruch 2, wobei der Anti-Idiotyp-Antikörper einen variablen Bereich der leichten Kette des Ratten-Anti-Idiotyp-Antikörpers (rWI2), der SEQ ID-Nr. 22 aufweist, und einen variablen Bereich der schweren Kette, der SEQ ID-Nr. 18 aufweist, abgeleitet von einem Ratten-Antikörper, und konstante Bereiche, die ausgewählt sind aus humanen Antikörpersequenzen, aufweist.

4. Anti-Idiotyp-Antikörper oder Antigen-Bindefragment davon nach Anspruch 1, wobei der Antikörper ein humanisierter Antikörper ist, in dem die Gerüstregion (FR) der variablen Bereiche der leichten und schweren Kette humanisierte Bereiche sind und die konstanten Bereiche abgeleitet sind von einem humanen Antikörper.

5. Anti-Idiotyp-Antikörper oder Fragment davon gemäß Anspruch 4, wobei der variable Bereich der schweren Kette die KOLWI2VH-1- oder die KOLWI2VH-2-Sequenz bzw. SEQ ID-Nr. 19 oder 20 aufweist.

6. Anti-Idiotyp-Antikörper oder Fragment davon gemäß Anspruch 4, wobei der variable Bereich der leichten Kette die REIWI2VK- oder die REIWI2VKRS-Sequenz bzw. SEQ ID-Nr. 24 oder 23 aufweist.

7. Anti-Idiotyp-Antikörper oder Fragment davon gemäß Anspruch 4, wobei der variable Bereich der schweren Kette die KOLWI2VH-1- oder die KOLWI2VH-2-Sequenz bzw. SEQ ID-Nr. 19 oder 20 aufweist, und der variable Bereich der leichten Kette die REIWI2VK- oder die REIWI2VKRS-Sequenz bzw. SEQ ID-Nr. 24 oder 23 aufweist.

8. Anti-Idiotyp-Antikörper oder Fragment davon gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei der Anti-Idiotyp-Antikörper oder das Antikörper-Fragment mit einem Radiomarker, einem Enzym oder einem fluoreszieren-

den Agens markiert ist.

9. Impfstoff, der den Anti-Idiotyp-Antikörper oder das Antikörper-Fragment gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7 aufweist, konjugiert mit einem löslichen immunogenen Trägerprotein.

10. Impfstoff gemäß Anspruch 9 zur Verwendung in der Stimulierung einer Immunantwort gegen einen solchen Krebs in einem Patienten, der durch die Expression von CEA gekennzeichnet ist.

11. Anti-Idiotyp-Antikörper gemäß Anspruch 4 zur Verwendung in einem Verfahren zur Diagnose oder Behandlung eines Patienten, wobei ein Antikörper oder Antikörper-Fragment, der bzw. das spezifisch an CEA bindet, als ein Targeting-, Pre-Targeting- oder therapeutisches Agens verwendet wird, entweder als solcher bzw. solches oder als Komponente eines Konjugates, und wobei der Anti-Idiotyp-Antikörper gemäß Anspruch 4 dazu verwendet wird, um einen nicht-zielgerichteten Antikörper oder ein Antikörper-Fragment zu beseitigen.

12. Verfahren zur Detektion des Vorhandenseins eines Antikörpers oder Fragmentes davon in einer biologischen flüssigen Probe, der bzw. das spezifisch an CEA bindet, das ein Kontaktieren der Probe mit einem chimären Anti-Idiotyp-Antikörper oder einem Antikörper-Fragment gemäß Anspruch 2 oder einem humanisierten Anti-Idiotyp-Antikörper oder Antikörper-Fragment gemäß Anspruch 4, und ein Detektieren des Bindens des Anti-Idiotyp-Antikörpers oder Antikörper-Fragmentes an einen Antikörper-Idiotyp oder Antikörper-Idiotyp-Fragment in der Probe, aufweist.

13. Verfahren nach Anspruch 12, wobei der Anti-Idiotyp-Antikörper oder das Antikörper-Fragment mit einem Radiomarker, einem Enzym oder einem fluoreszierenden Agens markiert ist.

14. Isoliertes Polynukleotid, das für die schwere Kette oder den variablen Bereich der schweren Kette eines chimären oder humanisierten Antikörpers oder Antikörper-Fragmentes gemäß Anspruch 2 oder 4 kodiert, das Sequenzen aufweist, die für zumindest zwei rWI2-schwere-Ketten-CDRs kodieren, die ausgewählt sind aus der Gruppe von CDRs bestehend aus:
der Sequenz NYWMT der komplementaritätsbestimmenden Region-1 (CDR-1),
der Sequenz SITSTGGTYHAESVKG der komplementaritätsbestimmenden Region-2 (CDR-2), und
der Sequenz DDYGGQSTYVMDA der komplementaritätsbestimmenden Region-3 (CDR-3).

15. Isoliertes Polynukleotid, das für die leichte Kette oder den variablen Bereich der leichten Kette eines chimären oder humanisierten Antikörpers oder Antikörper-Fragmentes gemäß Anspruch 2 oder 4 kodiert, das Sequenzen aufweist, die für zumindest zwei rWI2-leichte-Ketten-CDRs kodieren, die ausgewählt sind aus der Gruppe von CDRs bestehend aus:
der Sequenz RASQDIGNYLR der komplementaritätsbestimmenden Region-1 (CDR-1),
der Sequenz GATNLAA der komplementaritätsbestimmenden Region-2 (CDR-2), und
der Sequenz LHHSEYPYT der komplementaritätsbestimmenden Region-3 (CDR-3).

16. Isolierter Expressionsvektor, der eine erste Nukleotidsequenz aufweist, die für eine schwere Kette eines chimären Antikörpers kodiert, und eine zweite Nukleotidsequenz, die für eine leichte Kette eines chimären Antikörpers kodiert, wobei die Antikörperketten wie in einem der Ansprüche 2 oder 3 definiert sind.

17. Isolierter Expressionsvektor, der eine erste Nukleotidsequenz aufweist, die für eine schwere Kette eines humanisierten Antikörpers kodiert, und eine zweite Nukleotidsequenz, die für eine leichte Kette eines humanisierten Antikörpers kodiert, wobei die Antikörperketten wie in einem der Ansprüche 4 bis 7 definiert sind.

18. Isolierter Expressionsvektor, der eine Nukleotidsequenz aufweist, die entweder für eine schwere Kette eines chimären Antikörpers oder für eine leichte Kette eines chimären Antikörpers kodiert, wobei die Antikörperketten wie in einem der Ansprüche 2 oder 3 definiert sind.

19. Isolierter Expressionsvektor, der eine Nukleotidsequenz aufweist, die entweder für eine schwere Kette eines humanisierten Antikörpers oder für eine leichte Kette eines humanisierten Antikörpers kodiert, wobei die Antikörperketten wie in einem der Ansprüche 4 bis 7 definiert sind.

Es folgen 9 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

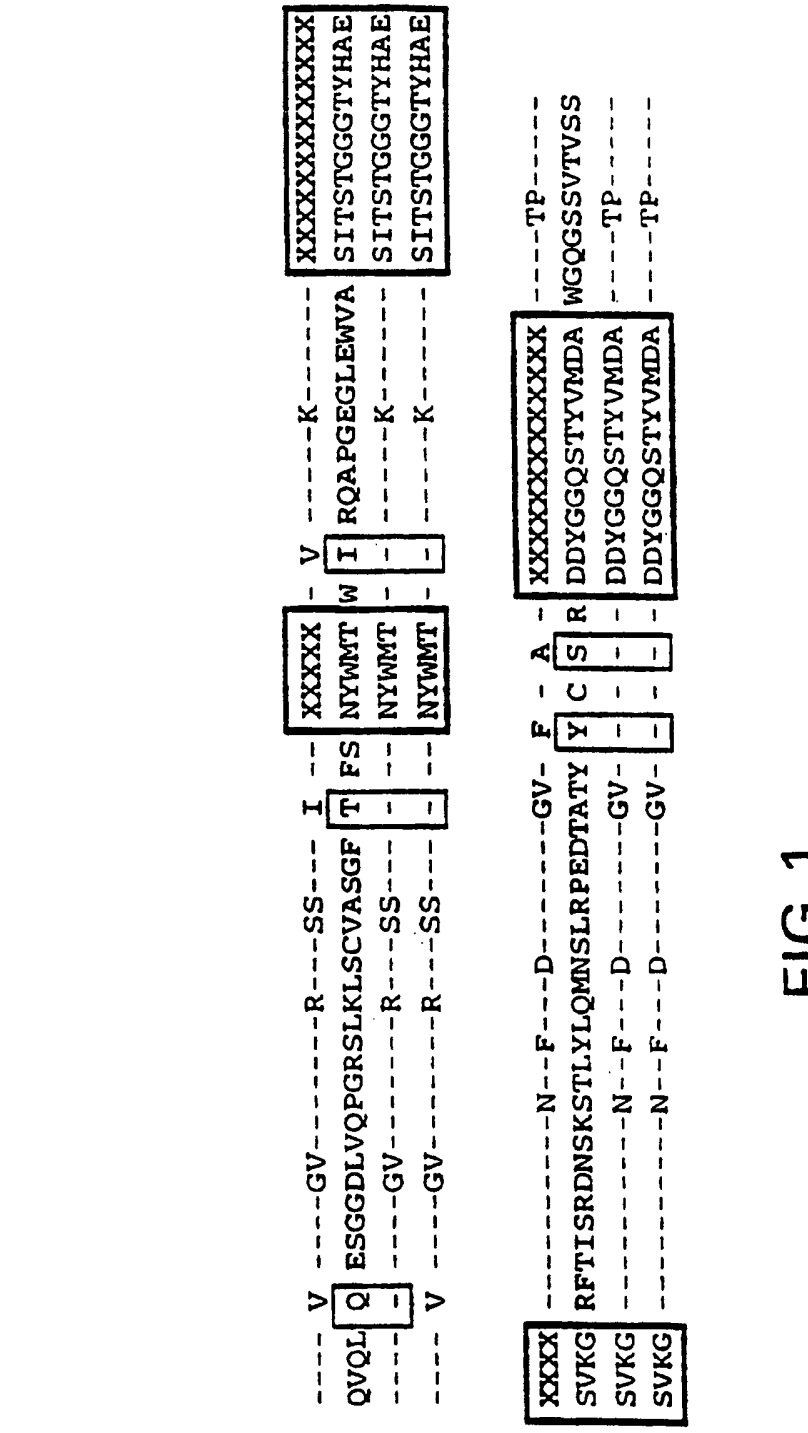


FIG.1

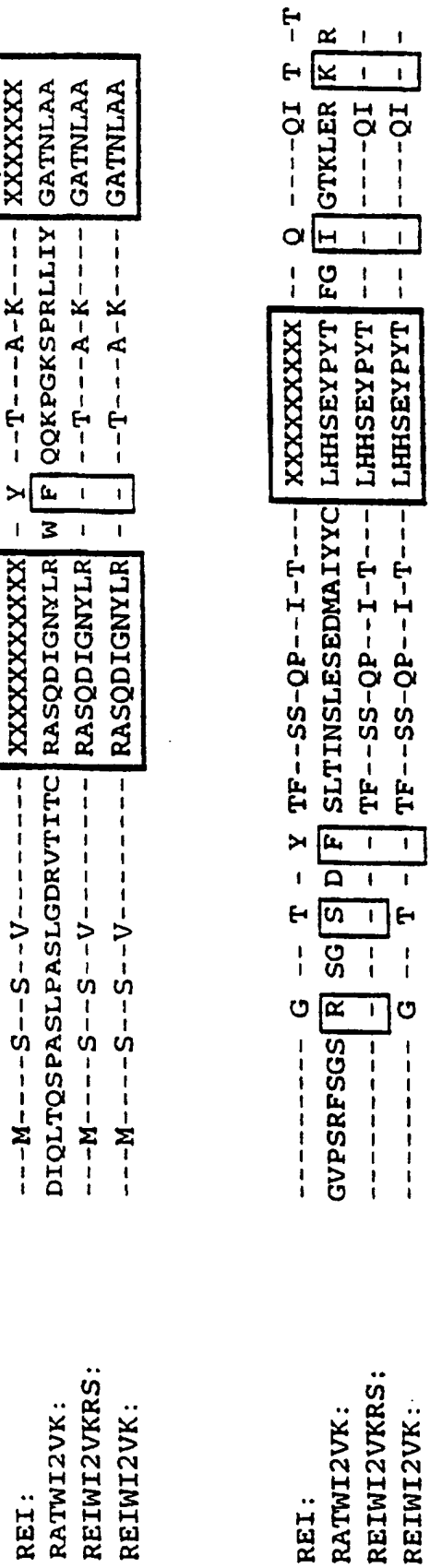
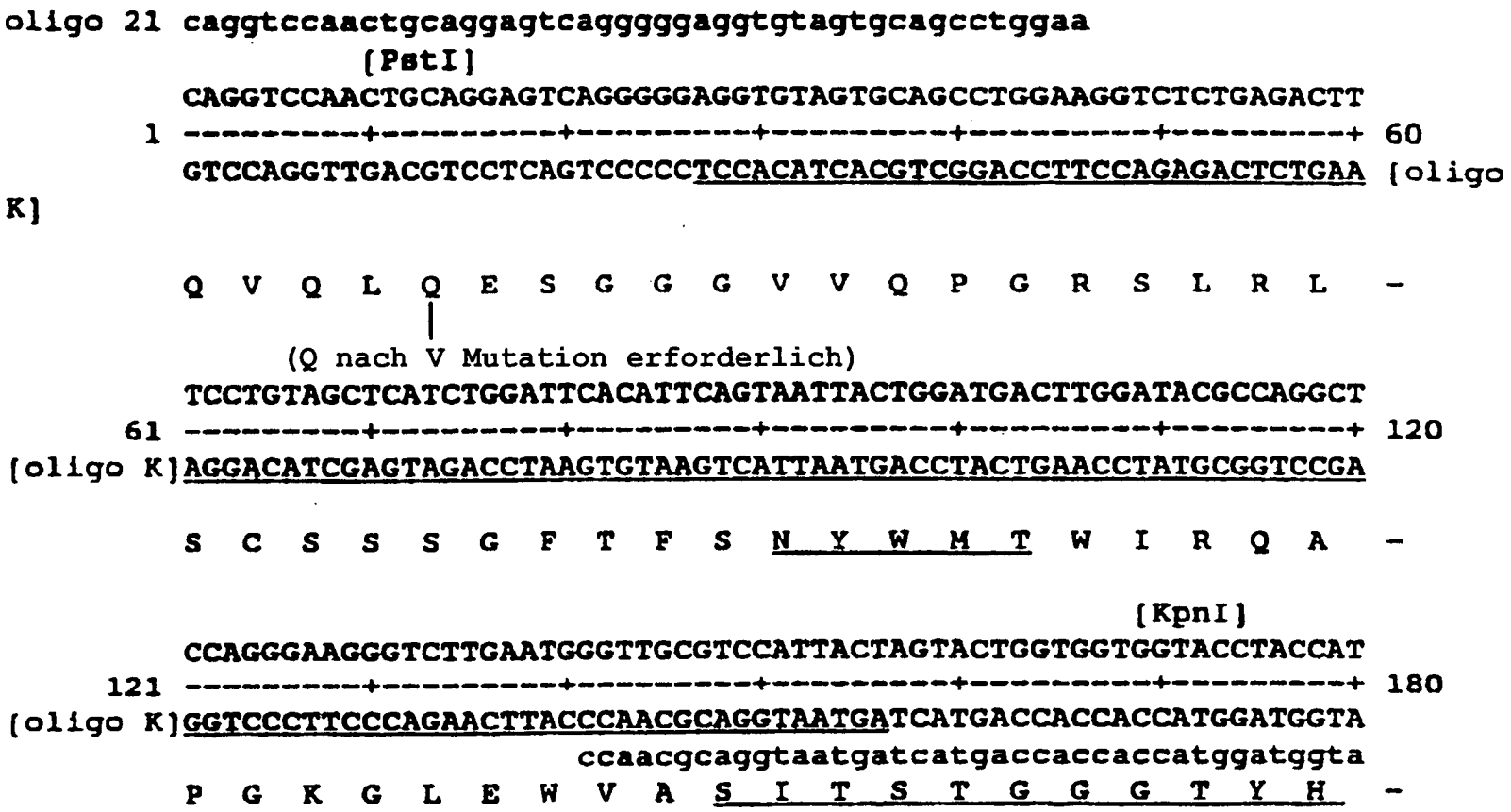

REI: ---M----S--S--V--------- XXXXXXXXXXX - Y --T---A-K---- XXXXXXX
RATWI2VK: DIQLTQSPASLPASLGDRVTITC RASQDIGNYLR W F QQKPGKSPRLLIY GATNLAA
REIWI2VKRS: ---M----S--S--V--------- RASQDIGNYLR - - --T---A-K---- GATNLAA
REIWI2VK: ---M----S--S--V--------- RASQDIGNYLR - - --T---A-K---- GATNLAA
REI: --------- G -- T - Y TF--SS-QP--I-T--- XXXXXXXXX -- Q ----QI T -T
RATWI2VK: GVPSRFSGS R SG S D F SLTINSLESEDMAIYYC LHHSEYPYT FG I GTKLER K R
REIWI2VKRS: --------- - -- - - - TF--SS-QP--I-T--- LHHSEYPYT -- - ----QI - -
REIWI2VK: --------- G -- T - - TF--SS-QP--I-T--- LHHSEYPYT -- - ----QI - -

FIG.2

FIG.3A



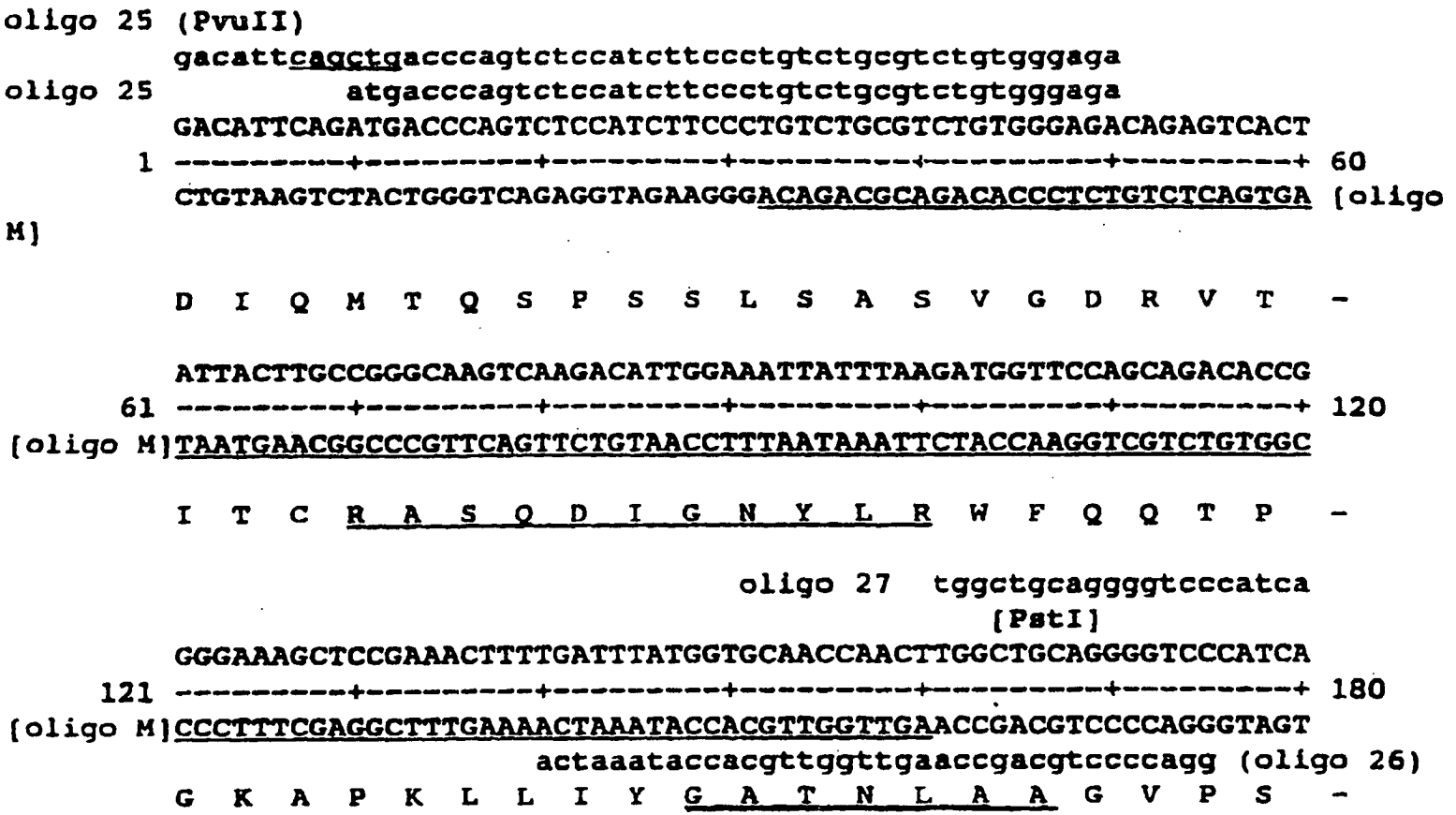
DE 697 34 109 T2 2006.06.29

FIG.3B



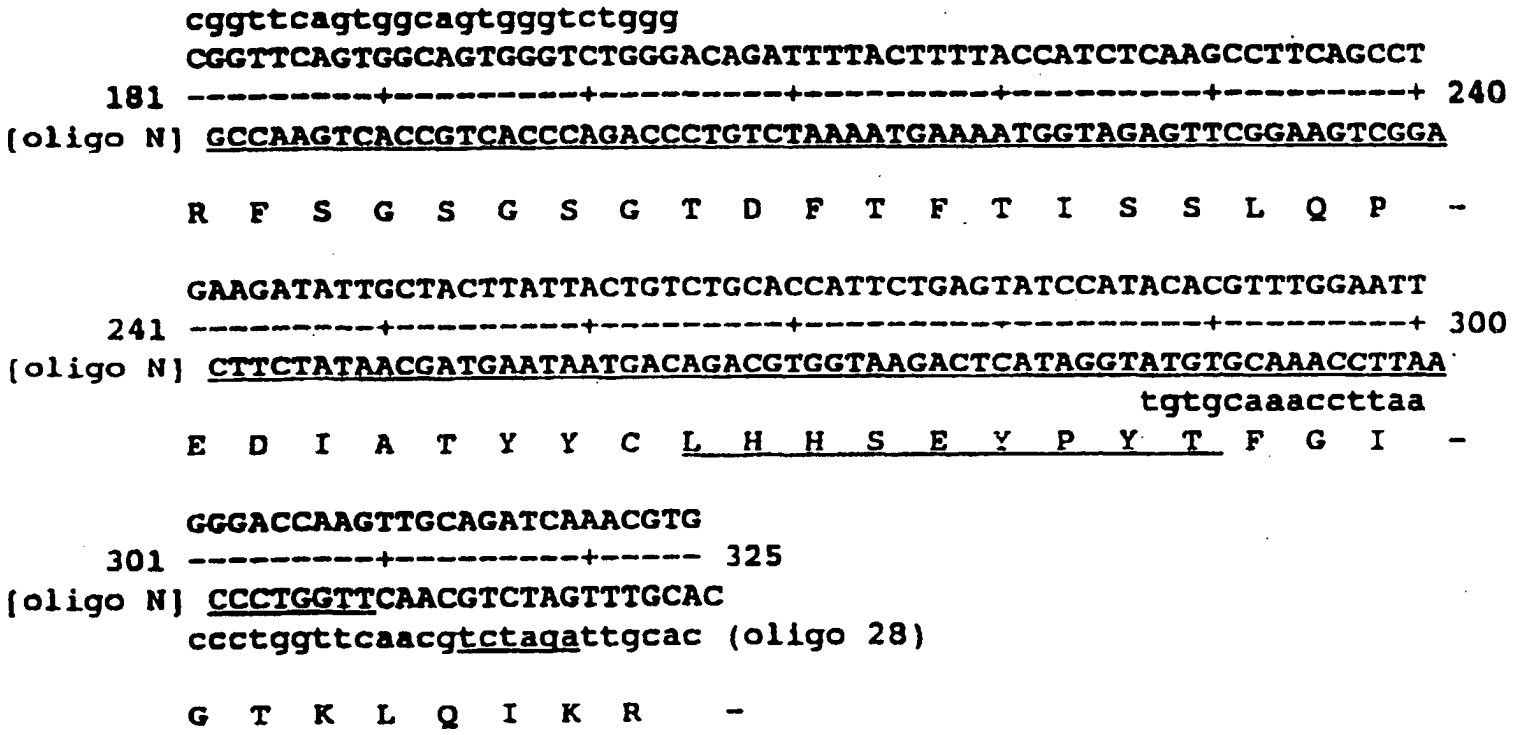
DE 697 34 109 T2 2006.06.29

FIG.4A



DE 697 34 109 T2 2006.06.29

FIG.4B



DE 697 34 109 T2 2006.06.29

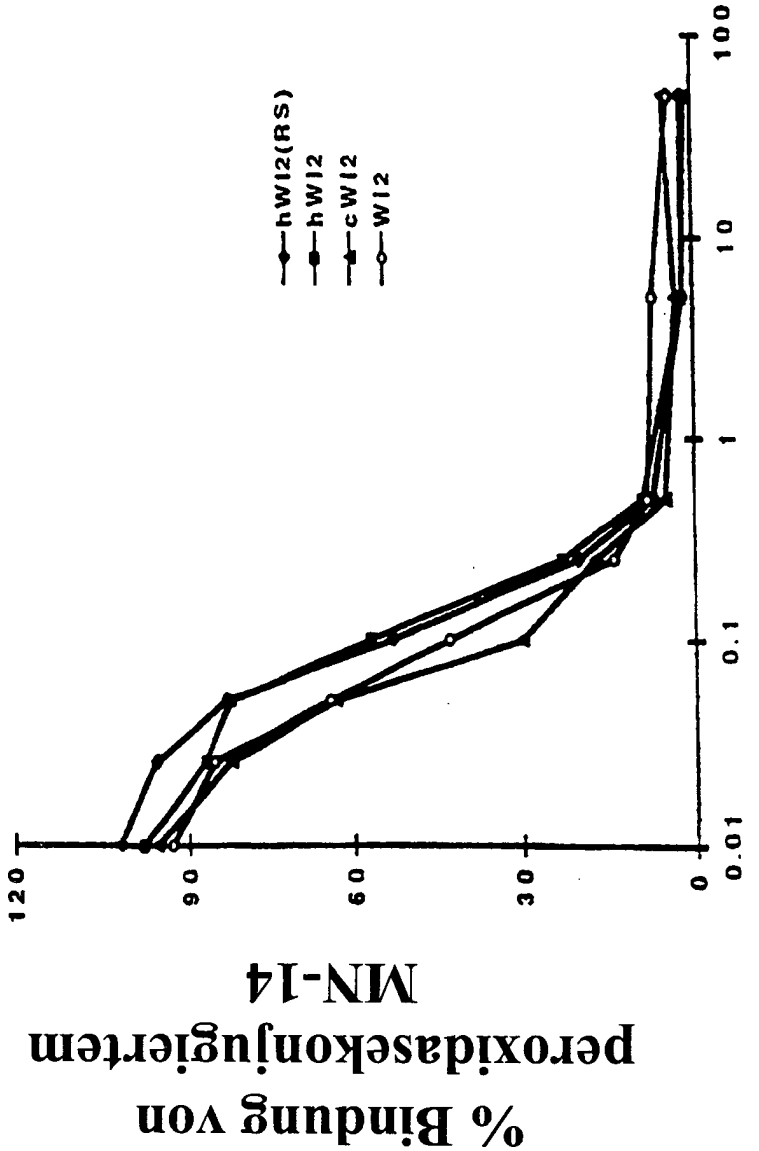

hWI2(RS)
hWI2
cWI2
WI2
120
90
60
30
0
0.01
0.1
1
10
100
% Bindung von
peroxidasekonjugiertem
MN-14
Konzentration von kompetitierenden
Antikörpern (µ/ml)

FIG.5

```
GACATTCAGC TGACCCAGTC TCCAGCTTCC CTGCCTGCGT CTCTGGGAGA          50
CTGTAAGTCG ACTGGGTCAG AGGTCGAAGG GACGGACGCA GAGACCCTCT
D  I  Q  L   T  Q  S   P  A  S   L  P  A  S   L  G  D

CAGAGTCACT ATTACTTGCC GGGCAAGTCA AGACATTGGA AATTATTTAA         100
GTCTCAGTGA TAATGAACGG CCCGTTCAGT TCTGTAACCT TTAATAAATT
 R  V  T   I  T  C  R  A  S  Q  D  I  G  N  Y  L  R
                    CDR1

GATGGTTCCA GCAGAAACCG GGGAAATCTC CGAGGCTTTT GATTTATGGT         150
CTACCAAGGT CGTCTTTGGC CCCTTTAGAG GCTCCGAAAA CTAAATACCA
  W  F  Q   Q  K  P   G  K  S  P   R  L  L   I  Y  G

GCAACCAACT TGGCAGCTGG GGTCCCATCA CGGTTCAGTC GCAGTAGGTC         200
CGTTGGTTGA ACCGTCGACC CCAGGGTAGT GCCAAGTCAG CGTCATCCAG
A  T  N  L   A  A  G   V  P  S   R  F  S  G   S  R  S
   CDR2

TGGGTCAGAT TTTTCTCTGA CCATCAACAG CCTGGAGTCT GAAGATATGG         250
ACCCAGTCTA AAAAGAGACT GGTAGTTGTC GGACCTCAGA CTTCTATACC
 G  S  D   F  S  L  T   I  N  S   L  E  S   E  D  M  A

CTATTTATTA CTGTCTGCAC CATTCTGAGT ATCCATACAC GTTTGGAATT         300
GATAAATAAT GACAGACGTG GTAAGACTCA TAGGTATGTC CAAACCTTAA
  I  Y  Y   C  L  H   H  S  E  Y   P  Y  T   F  G  I
                CDR3

GGGACCAAGC TGGAACGGAA ACGG                                     324
CCCTGGTTCG ACCTTGCCTT TGCC
G  T  K  L   E  R  K  R
```

FIG.6

```
CAGGTCCAAC TGCAGGAGTC AGGGGGAGAT CTAGTGCAGC CTGGAAGGTC          50
GTCCAGGTTG ACGTCCTCAG TCCCCCTCTA GATCACGTCG GACCTTCCAG
Q  V  Q  L   Q  E  S   G  G  D   L  V  Q  P   G  R  S

TCTGAAACTT TCCTGTGTAG CCTCTGGATT CACATTCAGT AATTACTGGA          100
AGACTTTGAA AGGACACATC GGAGACCTAA GTGTAAGTCA TTAATGACCT
 L  K  L   S  C  V  A   S  G  F   T  F  S   N  Y  W  M
                                              CDR1

TGACTTGGAT CCGCCAGGCT CCAGGGGAGG GTCTTGAATG GGTTGCGTCC          150
ACTGAACCTA GGCGGTCCGA GGTCCCCTCC CAGAACTTAC CCAACGCAGG
 T  W  I   R  Q  A   P  G  E  G   L  E  W   V  A  S

ATTACTAGTA CTGGTGGTGG GACTTACCAT GCAGAGTCTG TGAAGGGCCG          200
TAATGATCAT GACCACCACC CTGAATGGTA CGTCTCAGAC ACTTCCCGGC
I  T  S  T   G  G  G   T  Y  H   A  E  S  V   K  G  R
                CDR2

ATTCACTATC TCCAGAGATA ATTCAAAAAG CACCCTGTAC CTGCAAATGA          250
TAAGTGATAG AGGTCTCTAT TAAGTTTTTC GTGGGACATG GACGTTTACT
 F  T  I   S  R  D  N   S  K  S   T  L  Y   L  Q  M  N

ACAGTCTGAG GCCTGAGGAC ACGGCCACTT ATTACTGTTC AAGAGATAGAC         300
TGTCAGACTC CGGACTCCTG TGCCGGTGAA TAATGACAAG TTCTCTATCTG
  S  L  R   P  E  D   T  A  T  Y   Y  C  S   R  D  D

TACGGAGGAC AGAGCACCTA TGTTATGGAT GCCTGGGGTC AGGGATCTTC          350
ATGCCTCCTG TCTCGTGGAT ACAATACCTA CGGACCCCAG TCCCTAGAAG
Y  G  G  Q   S  T  Y   V  M  D   A  W  G  Q   G  S  S
                CDR3

GGTCACCGTC TCCTCA                                               376
CCAGTGGCAG AGGAGT
 V  T  V   S  S
```

FIG.7